

**Untersuchung des Phasenverhaltens von Membranen
durch konfokale Mikroskopie und Kalorimetrie.**

Diplomarbeit
vorgelegt von
Matthias Fidorra
aus Jülich

angefertigt
im Institut für Schwingungsphysik
der Georg-August-Universität zu Göttingen
2004

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand in der Zeit vom 1.April 2003 bis zum 31.März 2004 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen.

Besonderer Dank gebührt dabei Herrn Prof. Dr. Thomas Heimburg für seine fruchtbaren und anregenden Diskussionen während der gesamten Tätigkeit sowie für die Unterstützung bei der Umsetzung meiner Ideen.

Dank gilt auch Prof. Dr. Werner Lauterborn, der meine Arbeit von der Seite der Universität Göttingen betreute.

Prof. Dr. Luis Bagatolli hat meiner Arbeit durch sein experimentelles Fachwissen bedeutende Impulse gegeben.

Dr. Rainer Heintzmann war bei der Entwicklung des Khoros-Workspace eine große Hilfe, da er das Grundgerüst designt hat.

Heiko Seeger danke ich für die großartigen Monte-Carlo-Schnapschüsse, Vitaliy Oliynyk danke ich für den Einsatz bei den AFM-Messungen, die tolle Ergebnisse gebracht haben.

Überblick

Diese Arbeit versucht dazu beizutragen, die Funktionsweise biologischer Zellmembranen besser zu verstehen. Diese sind im Aufbau sehr komplex und die Ergebnisse eines Experiments schwer zu interpretieren, da viele unterschiedliche Faktoren dessen Verlauf beeinflussen. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein einfaches Modellsystem genutzt, das mit der Zeit zu einem komplexeren Systemen erweitert werden kann.

Es wurden Lipidmembranen aus binären Lipidmischungen hergestellt, die im untersuchten Temperaturbereich Bereiche mit unterschiedlichen Eigenschaften ausbilden. Diese Bereiche kann man mit geeigneten Farbstoffen markieren und mit konfokaler Mikroskopie visualisieren. In dieser Arbeit wurde eine softwarebasierende, quantitative Auswertung der mikroskopischen Bilder ermöglicht und die Ergebnisse wurden in Beziehung mit den Ergebnissen eigener kalorimetrischer Experimente und bekannten theoretischen Erkenntnissen gesetzt.

Durch den Einsatz eines höher auflösenden Rasterkraftmikroskops wurden die mit der konfokalen Mikroskopie erlangten Erkenntnisse verfeinert.

Zusätzlich wurde der Einfluß der in den konfokalen Experimenten genutzten Farbstoffe auf das Phasenverhalten der Lipidmembranen kalorimetrisch untersucht. Es wurde festgestellt, dass es möglich ist, anhand kalorimetrischer Experimente festzustellen, in welcher Phase sich ein Farbstoff bevorzugt löst.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Zellmembran	1
1.2 Der Weg zum heutigen Wissen über Membranen	2
1.3 Über die Struktur von Lipiden	5
1.4 Lipide im Lösungsmittel	6
1.5 Phasenübergänge von Phospholipiden	7
1.6 Phasenübergänge in Membranen einer Lipidsorte	9
1.7 Phasenübergänge in binären Lipidmischungen	14
1.8 Motivation der Arbeit	14
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 Kalorimetrie	18
2.2.2 Vesikelpräparation	22
2.2.3 Mikroskopie	26
2.2.4 Rasterkraftmikroskopie	32
3 Kalorimetrischer Teil	35
3.1 Phasen	35
3.2 Ideale Lipidmischungen	36
3.3 Reale Lipidmischungen	40
3.4 Monte-Carlo-Simulation von Einkomponentensystemen	41
3.5 Histogramm-Methode	46
3.6 Histogramm-Methode angewandt auf Lipid/Peptid-Systeme	51
3.7 Farbstoffe in Membranen	57
3.7.1 Anmerkungen zum Lipid DLPC	57
3.7.2 DLPC und Farbstoff Bodipy-C ₁₆	58
3.7.3 DLPC und Farbstoff DiI-C ₁₈	60
3.7.4 DPPC und Farbstoff Bodipy-C ₁₆	60

3.7.5	DPPC und Farbstoff DiI-C ₁₈	62
3.7.6	Binäre Lipidmischung und Farbstoff DiI-C ₁₈	62
3.8	Diskussion	66
4	Mikroskopischer Teil	69
4.1	Der Khoros-Workspace	69
4.2	Berechnung der Phasenverteilung mit “Igor”	72
4.3	Berechnete Verteilungen	73
4.4	AFM-Messungen	77
4.5	Diskussion	79
4.6	Weitere Beobachtungen	84
5	Fazit	89
5.1	Kalorimetrische Experimente	89
5.2	Konfokale Mikroskopie	89
A	Raffinessen der Vesikelherstellung	91
B	Multivesikelaufnahmen	95
C	DMPC/DSPC-Vesikel	99
D	DLPC/DPPC-Vesikel	101

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Zellmembran

Ein wichtiger Evolutionsschritt zur Ausbildung hochkomplexer Organismen, wie sie heutzutage anzutreffen sind, war sicherlich die Ausbildung der Zellmembran. Dieser Bestandteil der Zelle trennt eine für die Zelle eher unwirtliche äussere Umgebung von einem äusserst sensitiven Zellinneren, lässt aber einen gezielten Stoffwechsel zu, um der Zelle das Überleben zu ermöglichen. Auf der Zellmembran finden viele wichtige Reaktionen statt, wobei das Aufeinandertreffen der Reaktionspartner durch die Reduktion des Systems auf zwei Dimensionen möglicherweise erleichtert wird, wie theoretische Überlegungen zeigen (Adam und Delbrück, 1968). Reaktionen werden oft noch durch auf der Membran sitzende Enzyme beschleunigt.

In der Biologie unterscheidet man zwei Typen von Zellen: Prokaryotische und eukaryotische Zellen. Eukaryotische Zellen erkennt man daran, dass sie im Unterschied zu Prokarioten einen im Lichtmikroskop erkennbaren Zellkern besitzen, und in der Zellflüssigkeit innerhalb der Zellmembran, dem Cytosol, noch Untereinheiten, die sogenannten Organellen, anzutreffen sind, die ebenfalls von einer Zellmembran umgeben sind. Zu den Organellen zählen z.B. die Mitochondrien, Ribosomen, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat¹.

Gemeinsam ist allen Membranen, die Zellen oder Organellen umschließen,

¹ In den Mitochondrien wird Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert, das als Energielieferant für viele energieabhängige Prozesse dient. In den Ribosomen erfolgt die Proteinsynthese, wie auch im rauen Endoplasmatischen Retikulum. Im glatten Endoplasmatischen Retikulum finden Lipidsynthese und Entgiftungsprozesse statt. Die im glatten Endoplasmatischen Retikulum produziert Proteine werden dort in Vesikel (kugelförmige Strukturen mit einfacher Membranhülle) verpackt und gelangen zum Golgi-Apparat, von wo sie auf verschiedene Wege versandt werden.

dass sie zu einem großen Anteil aus Lipiden und Proteinen bestehen (Abbildung 1.1). Dabei zeigen die natürlichen Membranen aber eine ungeheure Vielfalt unterschiedlicher Lipide und Proteine, wobei zu vermuten ist, dass diese Mischungen die Membranen für bestimmte Aufgaben spezialisieren. So gibt es zum Beispiel die Membran des endoplasmatischen Retikulums, auf der die Proteinsynthese stattfindet, oder die Myelinmembran von Axonen, über die sich Nervenpulse ausbreiten.

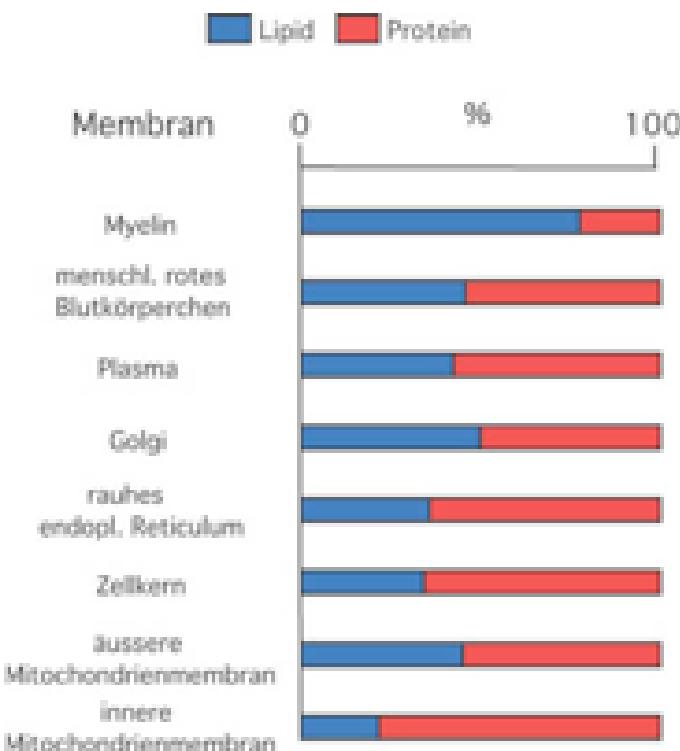


Abbildung 1.1: Anteil von Lipiden und Proteinen in unterschiedlichen Membranen. Lipide und Proteine sind die wichtigsten Bausteine der Zellmembran (nach Devlin (1992)).

1.2 Der Weg zum heutigen Wissen über Membranen

Bis sich das heutige Bild der Zellmembran prägte, verging einige Zeit, in der wichtige Entdeckungen gemacht und bedeutende Modelle aufgestellt wurden:

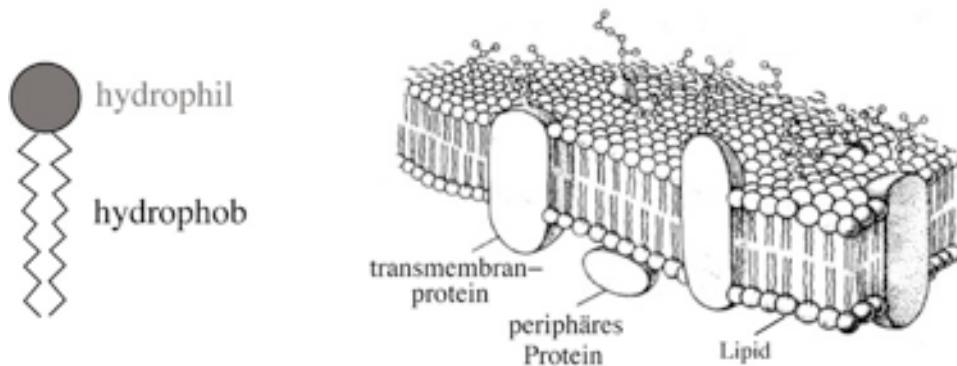


Abbildung 1.2: (a) *Grundstruktur eines Lipids.* Man unterscheidet grob die hydrophile Kopfgruppe und die hydrophoben Ketten; (b) *Aufbau der Membran nach dem Fluid Mosaic Model von Nicolson und Singer: Die Proteine sind in eine Lipiddoppelschicht eingebettet* (Zeichnung aus Stryer (1988)).

Ende des 19. Jahrhunderts bemerkte Overton einen Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten von Wasser und Lipiden und der Geschwindigkeit, mit der kleine Moleküle durch Pflanzenzellen diffundieren (Overton, 1895). Dies ließ ihn über eine Zusammensetzung der Membran aus Lipiden spekulieren. Lipide sind Moleküle, die aus einer hydrophilen (wasserliebend) Kopfgruppe und einer oder mehreren hydrophoben (wassermeidend) Ketten bestehen (Abbildung 1.2a und 1.3). Solche Moleküle nennt man amphiphil. 1925 machten Gorter und Casimir ein Experiment mit aus der Membran von Erythrozyten extrahierten Lipiden im Langmuir-Trog². Sie stellten dabei fest, dass die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht bestehen muss (Gorter und Grendel, 1925). Die hydrophilen Kopfgruppen weisen nach außen, die hydrophoben Ketten zeigen nach innen.

Davson und Danielli beschrieben 1935 ein Modell, in dem die Membran nicht mehr aus einer nackten Lipiddoppelschicht besteht, sondern außen mit Proteinen besetzt ist (Danielli und Davson, 1935).

1972 nutzten Nicolson und Singer die damals existierenden wissenschaftlichen

² In einem Langmuir-Trog werden Lipid-Monoschichten hergestellt: Man hat einen Trog in den ein wässriges Lösungsmittel eingefüllt ist. Tropft man in einem Lösungsmittel (z.B. Methanol) gelöste Lipide auf die Oberfläche, so verdampft das Lösungsmittel schnell und die Lipide lagern sich zu einer Monoschicht zusammen. In dieser Monoschicht sind die polaren Kopfgruppen zum wässrigen Lösungsmittel, die unpolaren Ketten zur Luft orientiert.

Erkenntnisse zu Membranen und formulierten davon ausgehend das “Fluid Mosaic Model” (Singer und Nicolson, 1972). Dieses Modell (Abb. 1.2b) teilt die Bestandteile der Membran in zwei Teile, funktionstragende und die strukturbildende. Die strukturbildenden Einheiten sind die Lipide, die eine flüssige Matrix bilden, in der die funktionstragenden Bestandteile, die Proteine, homogen verteilt eingebettet sind. Das “Fluid Mosaic Modell” unterscheidet zwischen Transmembranproteinen, die die ganze Lipiddoppelschicht durchdringen, und peripheren Proteinen, die nur in eine Lipidschicht eingebettet sind oder aussen an der Membran anliegen. Wie die Proteine letztendlich in der Membran orientiert sind, hängt von der Anordnung hydrophober und hydrophiler Gruppen innerhalb der Proteinstruktur ab, da diese mit den hydrophoben Ketten und hydrophilen Kopfgruppen der Lipide wechselwirken.

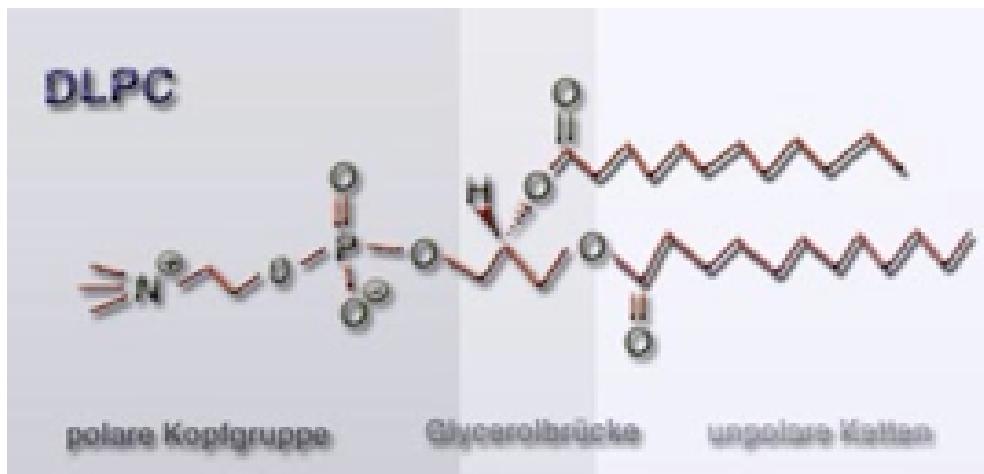


Abbildung 1.3: Vereinfachte Valenzstrichformel des Phospholipids DLPC (Dilaureoyl Phosphatidylcholine). Der zwitterionische Charakter der polaren Kopfgruppe beruht auf der positiven Ladung der Cholingruppe und der negativen Ladung der Phosphatgruppe. Die hydrophile Kopfgruppe ist über eine Glycerolbrücke mit den hydrophoben Ketten verestert.

Dem “Fluid Mosaic Model” von Nicolson und Singer folgte 1984 das “Mattice Model” von Mouritsen und Bloom (1984). In diesem Modell sind die Proteine nicht mehr homogen über die Membran verteilt und die Dicke der Lipiddoppelschicht variiert in der Umgebung von Proteinen. Der Grund für das Auftreten dieser Effekte liegt im hydrophoben Versatz, d.h. die hydrophoben Ketten der Phospholipide passen ihre Länge an die Dicke des hydrophoben Bereiches der Proteine an (Abbildung 1.4).

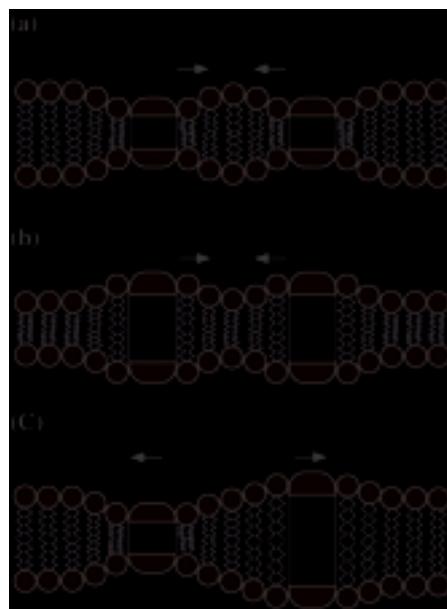


Abbildung 1.4: Der hydrophobe Versatz führt zur Zusammenlagerung (a,b) oder zur gegenseitigen Abstoßung der Proteine (c). Die Lipiddoppelschicht passt ihren Durchmesser im Bereich um die Proteine an. Dies kann entweder dadurch geschehen, dass sich Lipide mit einer passenden Kettenlänge um die Proteine sammeln, oder die Lipide ihre Ketten stauchen oder strecken (nach Mouritsen und Bloom (1984)).

1.3 Über die Struktur von Lipiden

Wie schon im vorhergehenden Abschnitt erläutert, handelt es sich bei den Lipiden um Moleküle mit einer hydrophilen Kopfgruppe und ein bis drei hydrophoben Kohlenstoffketten. Es gibt mehrere Klassen von Lipiden, die sich in ihrer Morphologie unterscheiden:

- Verschiedene Ladung (zwitterionisch, neutral, einfach oder mehrfach negativ geladen) und unterschiedliche molekulare Struktur der Kopfgruppe.
- Die Länge und Anzahl der Fettsäurereste kann variieren (Die Zahl der Kohlenstoffatome liegt zwischen 12 und 24 pro Kette).
- Die Fettsäurereste können unterschiedlich stark gesättigt sein; Doppelbindungen können an verschiedenen Stellen der Kohlenstoffketten

liegen.

Da Lipide aus der Klasse der Phosphocholide in der Natur eine äußerst wichtige Rolle spielen, und unsere Gruppe diesen deshalb hohe Aufmerksamkeit zukommen lässt, möchte ich diese im folgenden kurz vorstellen. Die vereinfachte Valenzstrichformel des Phospholipides DLPC (Dilauroyl Phosphatidylcholine) ist in Abbildung 1.3 angegeben.

Phospholipide sind Glycerintriester, die jedoch nur zwei Fettsäurereste enthalten. Die dritte Hydroxy-Gruppe des Glycerins ist mit einer Phosphorsäure verestert, und die Phosphorsäure ist mit einer Cholingruppe weiter verestert. Die Kopfgruppe ist aufgrund der negativen Ladung der Phosphorsäuregruppe und der positiven Ladung der Cholingruppe zwitterionisch und löst sich deshalb gut in polaren Lösungsmitteln wie z.B. Wasser.

1.4 Lipide im Lösungsmittel

Gibt man Lipide in ein polares Lösungsmittel, so ordnen sich die Lipidmoleküle so an, dass die hydrophoben Ketten nicht mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen. Mit Elektronenmikroskopie, Röntgenbeugung und ^{31}P -NMR hat man mehrere Strukturen nachweisen können, deren Auftreten von Parametern wie Lipidkonzentration, Druck, pH-Wert und Ionenkonzentration im Lösungsmittel abhängt Gennis (1989):

1. **Die Lipiddoppelschicht** (Abbildung 1.5a): Die Lipide ordnen sich so in einer zweidimensionalen, planaren Struktur an, dass die polaren Kopfgruppen nach aussen, die unpolaren Ketten nach innen gerichtet sind und diese so durch die Kopfgruppen vom Lösungsmittel abgeschirmt werden. Es können sich auch Schichtsysteme aus einzelnen Doppelschichten bilden. Die Dicke einer Lipiddoppelschicht beträgt ca. 5nm, der Abstand zwischen den Doppelschichten eines Schichtsystems ca. 3nm (Cevc und Marsh, 1985).

Die Doppelschichten können sphärische Strukturen ausbilden, die man als Vesikel oder Liposomen bezeichnet. Man unterscheidet zwischen Vesikeln aus einer einzigen Lipiddoppelschicht (unilamellar) und solchen aus mehreren Doppelschichten (multilamellar). Je nach Durchmesser der Vesikel klassifiziert man kleine (small) Vesikel mit einem Durchmesser zwischen 20 und 50nm, große (large) Vesikel mit einem Durchmesser von 50 bis 500nm und riesige (giant) Vesikel mit Durchmessern bis zu 300 μm . Kurzbezeichnungen für unterschiedliche Vesikel setzt man aus

den Anfangsbuchstaben für Schichtigkeit und Größe zusammen, z.B. SUV³, LMV⁴, GUV⁵ usw.

2. **Die Mizelle** (Abbildung 1.5b): Es bildet sich eine sphärische Struktur aus einer Lipidmonoschicht, bei der die Kopfgruppen nach aussen, die Ketten nach innen weisen. Im Inneren der Mizelle befindet sich kein Lösungsmittel.
3. **Vesikel oder Liposomen**: Es handelt sich bei den Vesikeln um sphärische Strukturen aus Lipiddoppelschichten.
4. **hexagonale Struktur** (Abbildung 1.5c): Bei dieser Struktur bilden die Lipide Röhren aus, die sich in einem hexagonalen Gitter anordnen. Man unterscheidet zwischen Typ 1 (die Kopfgruppen zeigen nach aussen, die Fettsäurereste nach innen) und Typ 2 (die Fettsäurereste zeigen nach aussen, die Kopfgruppen nach innen).
5. **Kubische und Sponge-Phase**: In der kubischen Phase ordnen sich Lipidmembranen in dreidimensionalen Gittern an. Dabei zeigen sie eine hohe Ordnung, die man mit Streuversuchen nachweisen kann. Man hat sechs verschiedene Gittertypen in Lipidsystemen nachgewiesen. Die Sponge-Phase ähnelt den kubischen Phasen, nur dass es keine regelmäßige dreidimensionale Struktur gibt.

1.5 Phasenübergänge von Phospholipiden

Man weiß, dass Lipide nicht wie im “Fluid Mosaic Model” beschrieben ausschließlich eine flüssige Matrix ausbilden, sondern dass sie mehrere Zustände annehmen können. Für diese Arbeit sind dabei die sogenannte Gel- und Fluidphase von Bedeutung. Bei der Nutzung dieser Begriffe sollte man beachten, dass sie das wirkliche Bild nicht exakt wiederspiegeln⁶. Beide Begriffe werden aber heute noch oft genutzt und werden auch in dieser Arbeit verwendet. Näheres zu dem Thema in Abschnitt 1.6.

Lipide in der Gelphase nehmen eine Gitterstruktur, Lipide in der fluiden Phase eine ungeordnete Struktur an. Da es sich bei der Gelphase um eine starre Struktur handelt, ist in dieser der Diffusionskoeffizient niedriger

³ Small Unilamellar Vesicle

⁴ Large Multilamellar Vesicle

⁵ Giant Unilamellar Vesicle

⁶ Man unterscheidet heute drei Phasen: “solid ordered”, “liquid ordered” und “liquid disordered”. Der Begriff “solid ordered” ist der Gelphase zuzuweisen und der Begriff “liquid disordered” der fluiden Phase. Die Begriffe werden in Abschnitt 1.6 erläutert

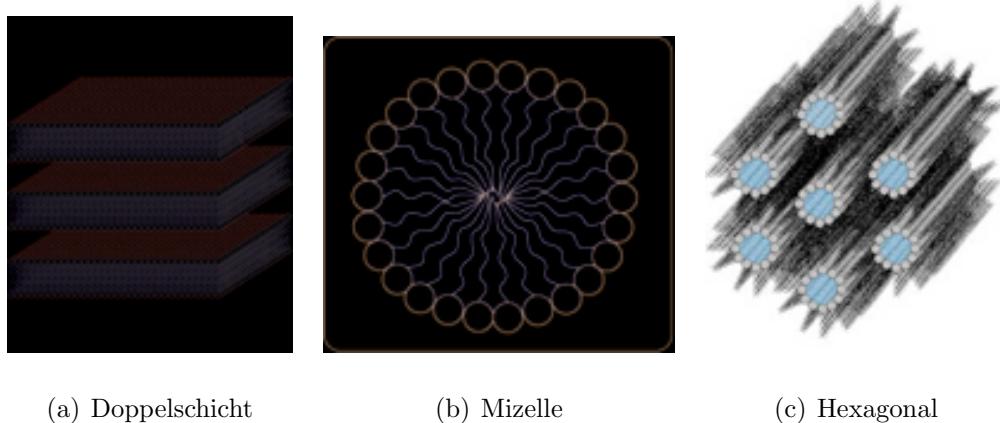


Abbildung 1.5: Unterschiedliche Strukturen, die Lipide in polaren Lösungsmitteln annehmen können. Übereinstimmend ist, dass bei allen Strukturen die Kopfgruppen dem Lösungsmittel zu, die Ketten abgewandt sind.

als in der unstrukturierten fluiden Phase, was mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) nachgewiesen worden ist (Hac, 2003). Bei niedrigen Temperaturen liegen die Ketten eines Lipids in der sogenannten “all-trans” Konfiguration vor, bei der die einzelnen Kohlenstoffatome sich bidirektional gegenüberliegen (Abbildung 1.6 links). In diesem Zustand befindet sich das Lipid in der Gelpause (Diese wird in der Literatur auch als $L_{\beta'}$ -Phase bezeichnet). Die all-trans-Konfiguration zeichnet sich dadurch aus, dass sich das Lipid im energetisch niedrigsten Zustand befindet: Die Kettenlänge ist am größten, und der Querschnitt des Lipids im Bereich der Ketten ist am kleinsten. Erwärmst man das Lipid, so werden an einem bestimmten Punkt der Temperaturskala durch die ausreichende thermische Energie die Rotationsfreiheitsgrade der Kohlenstoffbindungen der Ketten angeregt, und diese können daher von der “trans” in die “gauche” Konformation wechseln (Abbildung 1.6 rechts). Dabei kommen sich die Kohlen- und Wasserstoffatome in vielen Bereichen der Ketten näher, was energetisch ungünstiger ist. Ein solches Lipid, bei dem nicht alle Kohlenstoffbindungen eine trans-Konformation bilden, nennt man fluid (L_{α} -Phase). Ein fluides Lipid hat einen größeren Querschnitt und ist kürzer als ein gelförmiges Lipid. Die Verkürzung der geschmolzenen Ketten wurde bereits mit Rasterkraftmikroskopie an Membranen untersucht, die Längendifferenz beträgt ca. 1nm (Gliss et al., 1998).

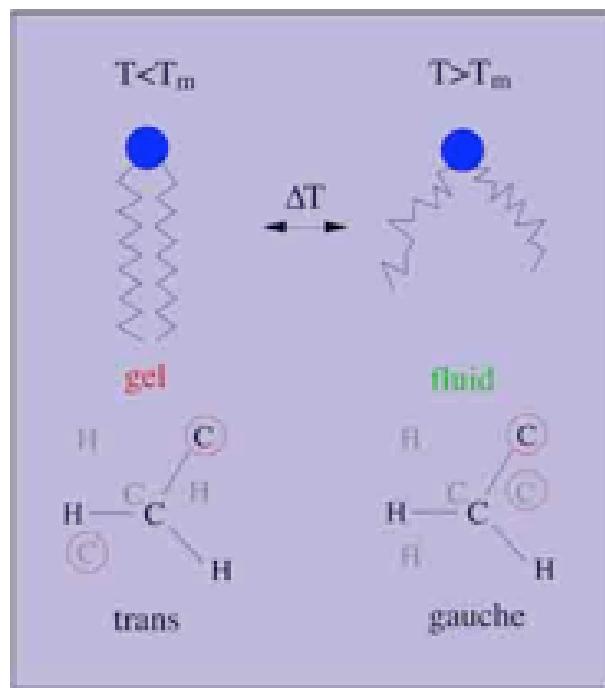


Abbildung 1.6: Schmelzen eines Phospholipids. All-trans-Konfiguration (links): Das Lipid befindet sich im Minimum der freien Energie. Die Länge des Moleküls ist am größten, der Durchmesser am kleinsten; gauche-Konfiguration (rechts): Die Entropie des Lipids ist höher als bei der all-trans-Konfiguration. Die Länge des Moleküls ist kleiner und der Durchmesser ist größer.

1.6 Phasenübergänge in Membranen einer Lipidsorte

Anhand kalorimetrisch ermittelter Schmelzprofile kann man bestimmen, in welchem Zustand die Lipide einer Membran sich zu einer gegebenen Temperatur befinden und an welchem Punkt ein Phasenübergang erfolgt. Dies wird anhand von Abbildung 1.7 erläutert:

Bei niedrigen Temperaturen befinden sich alle Lipide einer Membran in der Gelphase. Erhöht man langsam die Temperatur, so gibt es einen Punkt, an dem die Ketten einiger Lipide zu schmelzen beginnen und diese Lipide sich in einer periodischen, linienförmigen Struktur anordnen. Diesen Zustand nennt man Ripple-Phase ($P_{\beta'}$; Abbildung 1.8; Heimburg (2000); Leidy et al. (2002)). Diese Phase tritt aber nur bei Lipiden mit großer polarer Kopfgruppe, wie

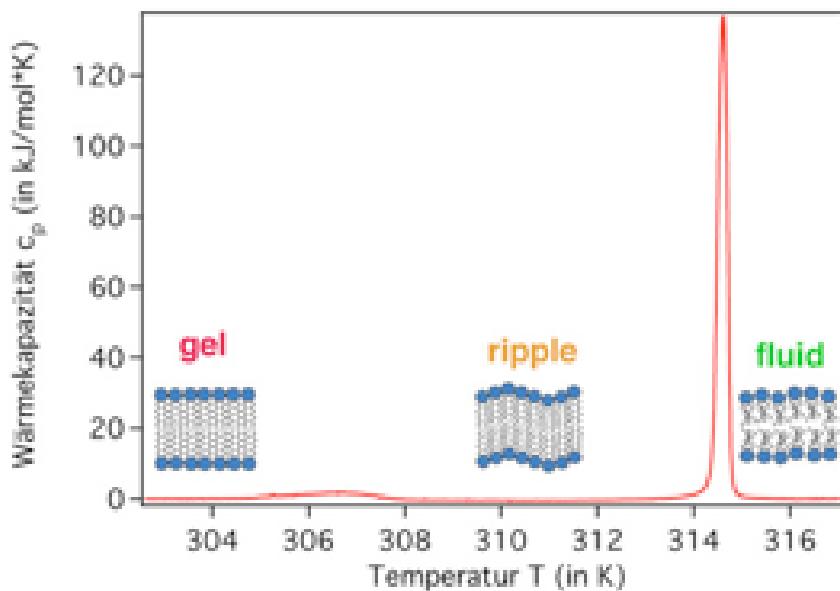


Abbildung 1.7: Wärmekapazitätskurve multilamellarer Vesikel des Phospholipids DPPC. Gemessen wurde von niedrigen zu hohen Temperaturen. Bei ca. 307K findet der Übergang von der Gelphase zur Ripple-Phase statt: Einige Lipide schmelzen und ordnen sich in periodischen Liniendefekten an. Bei 314.65K erfolgt die Hauptumwandlung, bei höheren Temperaturen liegt ausschließlich die fluide Phase vor.

beispielsweise den Phosphocholinen, auf. Bewegt man sich im Schmelzprofil weiter zu höheren Temperaturen, so gibt es einen Punkt, an dem auch die restlichen Lipide in die fluide Phase wechseln. Die Membran ist dann im Zustand der fluiden Phase. Der Schmelzpunkt ist definiert als der Punkt auf der Temperaturskala, an dem je die Hälfte der Moleküle im geschmolzenen, die andere im ungeschmolzenen Zustand ist. Dass es sich bei diesem Schmelzpeak um einen sehr schmalen mit einer Halbwertsbreite von nur ca. 1/10K handelt, liegt daran, dass die Lipide nicht unabhängig voneinander schmelzen, sondern Kooperativität zeigen. Schmelzen die Lipide unabhängig voneinander, so wäre die Umwandlungsenthalpie gleich der van't Hoffschen Wärme und die Halbwertsbreite der Umwandlung beträge ca. 60K.

Die Lage des Schmelzpunktes von Lipiden beruht auf dem Wechselspiel zweier Faktoren: Die van-der-Waals-Wechselwirkung der Ketten untereinander und ihre Entropie. Die Entropie erhöht sich, umso mehr Lipide sich in der fluiden Phase befinden und nimmt mit zunehmender Anzahl gelförmiger Lipide ab.

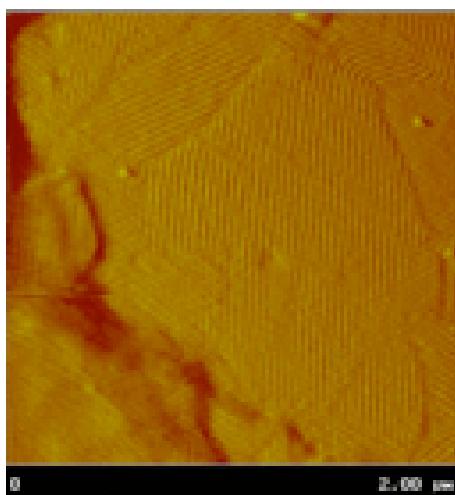


Abbildung 1.8: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Ripple-Phase (mit freundlicher Genehmigung von Vitaliy Oliynik). Geschmolzene Lipide bilden eine periodische Linienstruktur aus. Der Abstand zwischen den einzelnen Ripples beträgt ca. 30nm.

Die van-der-Waals-Wechselwirkung hingegen ist höher, umso mehr Lipide in der Gelphase sind und geringer, wenn die Anzahl fluider Lipide zunimmt. Je nachdem, welcher Faktor überwiegt, liegt entweder die Gelphase (van-der-Waals überwiegt) oder die fluide Phase (Entropie überwiegt) vor. Auf den Schmelzpunkt haben deshalb verschiedene Eigenschaften der Lipide Einfluß:

- Eine längere Kette begünstigt die van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Ketten und verschiebt somit den Schmelzpunkt zu höheren Temperaturen (Tabelle 1.1).
- Ein auf das Lipidsystem wirkender Druck begünstigt die Gelphase, da die Lipide in diesem Zustand das geringste Volumen einnehmen. So verschiebt sich z.B. der Schmelzpunkt von DPPC um 22 K/kbar (Parkson und Weber, 1983; Ebel et al., 2001).
- Eine Doppelbindung in einem Fettsäurerest verschiebt den Schmelzpunkt zu tieferen Temperaturen hin. Die ideale Wechselwirkung der Ketten untereinander wird beeinträchtigt, da um Doppelbindungen nicht rotiert werden kann.
- Abhängig von der Größe der Kopfgruppe kann sich der Schmelzpunkt zu höheren oder tieferen Temperaturen verschieben: Bei einer großen

Lipid	Kettenlänge (Anzahl Kohlenstoffatome)	Schmelzpunkt (in K)	Molekulargewicht (in g/mol)
<i>D LPC</i>	12	271.15	621.83
<i>D MPC</i>	14	297.15	677.94
<i>D PPC</i>	16	314.65	724.05
<i>D SP C</i>	18	327.65	790.15

Tabelle 1.1: Einige Eigenschaften von Phospholipiden (Koynova und Caffrey, 1998)

Kopfgruppe wird die fluide Phase bevorzugt, der Schmelzpunkt verschiebt sich hin zu tiefen Temperaturen; bei kleinen Kopfgruppen zu hohen Temperaturen. Grund für diesen Effekt ist, dass die Ketten ihren Querschnitt dem Querschnitt der Kopfgruppe anpassen müssen.

- Der Schmelzpunkt geladener Lipide kann durch Änderungen des pH-Wertes verschoben werden, da durch die zusätzlichen Ionen im Lösungsmittel die abstoßenden Kräfte der Kopfgruppen verändert werden. Ob sich der Schmelzpunkt zu höheren oder tieferen Temperaturen hin verschiebt, ist Abhängig von der pH-Wertänderung und dem Lipid Gennis (1989).

Nun noch einmal zurück zu den im vorhergehende Kapitel eingeführten Bezeichnungen “solid ordered”, “liquid ordered” und “liquid disordered” (Abbildung 1.9).

Der Begriff der Gelphase ist dem Phasenzustand solid ordered zuzuweisen. In diesem sind die Ketten der Lipide in der all-trans Konfiguration und die Lipide bilden eine Gitterstruktur. Fremdmoleküle werden nur ungern als Gitterdefekte eingebaut und je nach Stärke der Abweichung von der Struktur der Lipide aus der Gelphase herausgedrängt.

Der Begriff liquid ordered wurde von Ipsen et al. (1987) anhand der Ergebnisse theoretischer Überlegungen geprägt und bezeichnet eine Phase, in der die Ketten der Lipide ebenfalls in der all-trans-Konfiguration der gelförmigen Lipide vorliegen, die Lipide aber keine Gitterstruktur ausbilden. Diese Struktur wird besonders unter Biologen gerne für die momentan aktuellen “Rafts” beansprucht (Simons und Ikonen, 1997). Bei den Rafts handelt es sich um Komplexe aus Glycosphingolipiden, Cholesterin und Proteinen, die man gewinnt, wenn man Membranen in Detergenzien löst. Übrig bleiben dann eben genannte Komplexe. Die Interpretation der Rafts ist äußerst umstritten (Jacobson und Dietrich, 1999).

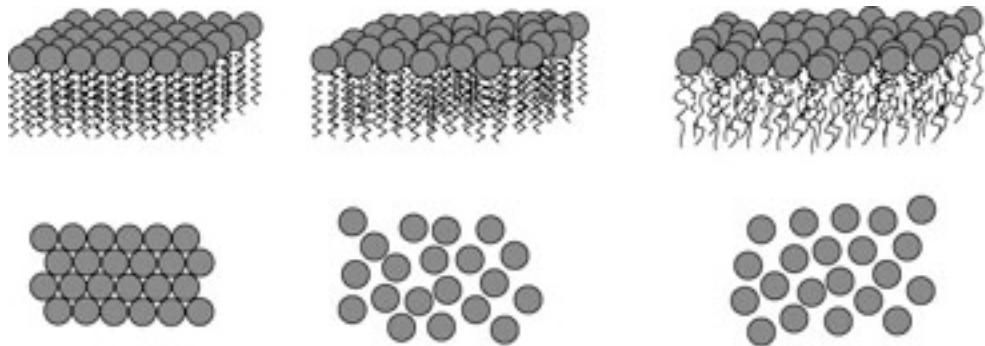


Abbildung 1.9: Unterschiedliche Phasen in Seitenansicht (oben) und Aufsicht (unten). *solid ordered* (links): Die Lipide befinden sich in der *all-trans*-Konfiguration und ordnen sich in einem Dreiecks-Gitter (Janiak et al., 1978) an. Diese Phase wird auch als *Gelphase* bezeichnet. *liquid ordered* (mitte): Die Ketten der Lipide sind in der *all-trans*-Konfiguration, aber die Gesamtheit zeigt keine geordnete Struktur. *liquid disordered* (rechts): Die Ketten der Lipide sind in der *gauche*-Konfiguration und die Gesamtheit der Moleküle zeigt eine ungeordnete Struktur. Diese Phase wird auch *fluide Phase* genannt.

Bei der fluiden Phase handelt es sich um den Phasenzustand *liquid disordered*. In diesem sind die Ketten der Lipide geschmolzen und die Gesamtheit der Lipide zeigt keine Struktur in der lateralen Gesamtheit.

Da auf dem Forschungsgebiet der Membranen die Begriffe *fluide Phase* und *Gelphase* völlig ausreichen und beide Begriffe in der Wissenschaft noch häufig und gerne genutzt werden, verwende ich diese auch in meiner Arbeit weiter. Im Bereich der Phasenumwandlung zeigen einige Eigenschaften und Parameter von Membranen starke Fluktuationen, wie z.B. die Enthalpie, die lokale Packungsdichte sowie das Volumen. Die Theorie besagt, dass die spezifische Wärme linear proportional zu den Fluktuationen der Enthalpie ist, die Fluktuationen also im Bereich der Umwandlung maximal werden müssen. Die starken Fluktuationen in der Nähe der Phasenumwandlung führen zur Ausbildung von Mikrodomänen, die in Monte-Carlo-Simulationen bereits simuliert worden sind (Nielsen et al., 2000b) und die mit Raster-Kraft-Mikroskopie sichtbar gemacht wurden (Nielsen et al., 2000a; Gliss et al., 1998). Die Ausbildung der Mikrodomänen könnte für viele Prozesse, wie z.B. das Durchdringen der Membran mit Molekülen oder die Regulierung von Diffusionsprozessen, äußerst wichtig sein. Der Kontakt von Molekülen wird möglicherweise durch die Ausbildung von Domänen erleichtert oder auch verhindert.

Dass einige biologische Membranen nahe des Temperaturbereichs der Pha-

senumwandlung befinden, ist eventuell ein Zeichen dafür, wie wichtig die Phasenumwandlung für die Regulierung der Prozesse in und auf Membranen ist.

1.7 Phasenübergänge in binären Lipidmischungen

Während man für reine Lipide eine scharfe Umwandlung in einem sehr schmalen Temperaturbereich bekommt, sieht das Phasenverhalten von binären Lipidmischungen anders aus. Es bildet sich ein Phasenkoexistenzbereich aus. Dieser ist theoretisch vorhergesagt (Lee, 1977), mit Kalorimetrie experimentell nachgewiesen (Lee (1977); Schlotzer (2002), Abbildung 3.4 und 3.5) und mit bildgebenden Verfahren wie konfokaler Mikroskopie (Korlach et al., 1999) sichtbar gemacht worden. Innerhalb des Koexistenzbereichs kommt es zur mikroskopischen sowie makroskopischen Entmischung der Gel -und Fluidphase.

Anhand binärer Lipidmischungen wurde auch eingehend der Einfluss von Cholesterin, das in vielen natürlichen Membranen zu unterschiedlichen Anteilen enthalten ist, auf das Phasenverhalten untersucht. Es zeigt sich, dass die Phasentrennung durch Cholesterin stark beeinflusst wird, und eine makroskopische Phasentrennung mit konfokaler Mikroskopie bei bestimmten Lipidmischungen mit Anteilen über 16% Cholesterin nicht mehr zu erkennen ist (Feigenson und Buboltz, 2001), die Phasentrennung im mikroskopischen Bereich aber erhalten bleibt.

1.8 Motivation der Arbeit

1999 ist es erstmals gelungen makroskopische Strukturen, die als Domänen bezeichnet werden, auf unilamellaren Riesenvesikeln (GUVs) sichtbar zu machen (Bagatolli und Gratton, 1999; Korlach et al., 1999). Diese ersten und weitere, später durchgeführte Studien konzentrierten sich auf die Form der Domänen binärer Lipidmischungen in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses und der Temperatur (Bagatolli und Gratton, 2000). Andere Studien untersuchten die Domänenform (Feigenson und Buboltz, 2001; Dietrich et al., 2001) oder die Vesikelform Veatch und Keller (2003); Baumgart et al. (2003) bei Zugabe von Cholsterin.

In dieser Arbeit soll versucht werden, die erhaltenen Bilder aus den konfokalen Aufnahmen im Computer graphisch auszuwerten, um die prozentuale

Verteilung der beiden sichtbaren makroskopischen Bereiche zu bestimmen⁷ Anhand der erhaltenen Daten soll untersucht werden, ob für unterschiedliche Wärmekapazität auch die Fluktuationen (gemessen durch die mittlere quadratische Abweichung) in den Domänengrößen unterschiedlich sind. Dazu werden binäre Lipidsysteme mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen ausgewählt und deren Wärmekapazität bei einer bestimmten Temperatur bestimmt. Man vermutet, dass für eine höhere Wärmekapazität auch die Fluktuationen der Domänengrößen stärker er sind. Grund für diese Vermutung ist das Fluktuations-Dissipations-Theorem, das besagt, dass für eine höhere Wärmekapazität auch die Fluktuationen in der Enthalpie größer sind, und man möchte dies auf die Fluktuationen in den Domänengrößen übertragen. Weiteres Interesse gilt den Farbstoffen, die für die konfokalen Experimente genutzt werden. Warum sich die Farbstoffe in einer bestimmten Phase bevorzugt lösen und man deshalb die Domänen markieren kann ist unklar. Bisher werden bestimmte Farbstoffe für Experimente ausgewählt, weil sie empirisch bereits gewünschte Ergebnisse erbracht haben. Es soll in dieser Arbeit versucht werden herauszufinden, ob man anhand kalorimetrischer Experimente eine Vorhersage machen kann, in welcher Phase einer binären Lipidmischung sich ein Farbstoff bevorzugt lösen wird. Dies würde die Farbstoffwahl und die Interpretation von Versuchsergebnissen in Zukunft erleichtern und beschleunigen.

⁷ Bei der Kennzeichnung dieser Bereiche als gelförmige oder fluide Domänen muss man vorsichtig sein. Es ist nicht auszuschließen, dass sich innerhalb dieser Makrostrukturen mikroskopische Bereiche befinden, die mit konfokaler Mikroskopie nicht Auflösbar sind.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Die für die konfokalen und kalorimetrischen Messungen verwendeten Phospholipide DLPC¹, DPPC², DMPC³ und DSPC⁴ wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA) bezogen, die Fluoreszenzfarbstoffe Bodipy-C₁₆⁵ (Herstellerbezeichnung D3803) und DiI-C₁₈⁶ (Herstellerbezeichnung D7757) wurden von Molecular Probes (Deventer, Niederlande) geliefert.

Die zur Herstellung der Vorratslösungen für kalorimetrische Messungen an Lipiden benutzten Lösungsmittel Chloroform, Methanol, Dichlormethan stammen von der Firma Merck (Darmstadt, Germany), das zur Herstellung der Lipidproben für die konfokale Mikroskopie benutzte Lösungsmittel Trifluorethanol (TFE) stammt von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz).

Aus den in Pulverform gelieferten Farbstoffen und Lipiden wurden Vorratslösungen hergestellt. Die Konzentrationen betrugen $0.5 \frac{mg}{ml}$ und $1 \frac{mg}{ml}$ bzw. $1 \frac{mg}{ml}$ für die Farbstoffe D3803 bzw. D7757, gelöst in einer Mischung Dichlormethan/Methanol 2:1 (Volumenverhältnis). Für die Lipid-Vorratslösungen betrugen die Konzentrationen $10 \frac{mg}{ml}$ in einer Mischung Dichlormethan/Methanol 2:1 (Volumenverhältnis) bzw. TFE für kalorimetrische bzw. konfokale Messungen. Aus den Vorratslösungen für die konfokalen Experimente wurden dann später Vorratslösungen mit geringerer Konzentration ($c=0.9 \frac{mg}{ml}$) im gewünschten Lipid-Mischungsverhältnis hergestellt, denen

¹ 1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

² 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

³ 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

⁴ 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

⁵ 2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

⁶ 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate salt

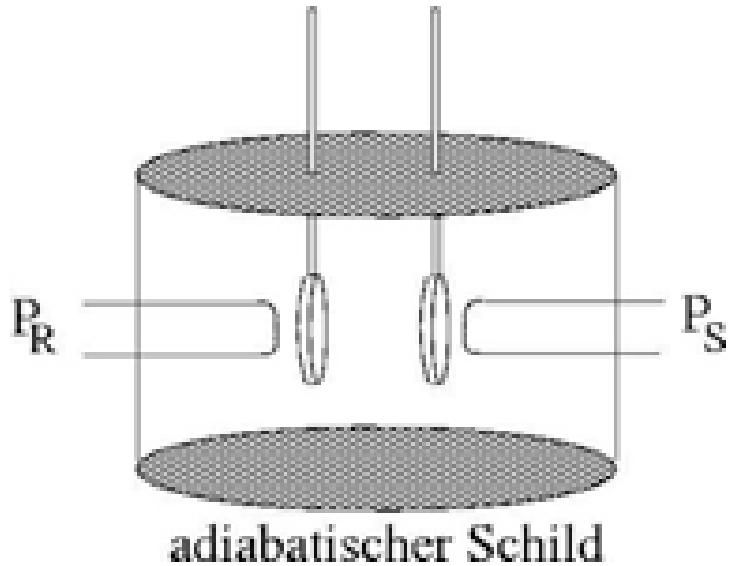


Abbildung 2.1: Schnitt durch ein DSC-Kalorimeter.

zusätzlich die Farbstoffe im Verhältnis 500:1 (Lipid/Farbstoff) zugesetzt wurden.

2.2 Methoden

2.2.1 Kalorimetrie

Die spezifische Wärmekapazität c_p ist definiert als Wärmebetrag ΔQ , den man einer Probe mit der Masse m zuführen muss, um diese um eine Temperaturdifferenz ΔT zu erwärmen:

$$c_p = \frac{m \cdot \Delta T}{\Delta Q} . \quad (2.1)$$

Aus der Wärmekapazitätskurve lässt sich der Schmelzpunkt T_m sowie durch Integration der Kurve die Umwandlungsenthalpie eines Stoffes bestimmen. Daraus kann man die Entropieänderung ΔS der Umwandlung berechnen: Weil am Schmelzpunkt die Änderung der Gibbschen freien Energie $\Delta G = 0$ ist und $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ gilt, erhält man $\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m}$.

Das Kalorimeter

Die zwei für die Messungen benutzten Kalorimeter der Firma MicroCal (Northampton/MA, USA) bestehen aus je zwei gleichgeformten münzförmigen Zellen aus Tantal (Das Gerät VP-DSC mit 0.5152ml und das Gerät MCS-DSC mit 1,21ml Probenvolumen pro Zelle), die von einem adiabatischen Schild umgeben sind, um den Wärmeaustausch mit der Umgebung zu minimieren (Abbildung 2.1). Die Zellen sind über je eine Kapillare von oben zugänglich. Eine der Zellen ist die Probenzelle, in die die zu untersuchende Probe in Lösungsmittel eingefüllt wird, die andere Zelle ist die Referenzzelle, in die nur das Lösungsmittel eingefüllt wird. Die Außenflächen der Zellen sind mit Heizelementen bedeckt, die von der CPU des Gerätes angesteuert werden. Beide Zellen werden während der Laufzeit des Versuchs mit konstanter Rate erhitzt und die Referenzzelle erhält noch einen kleinen zusätzlichen Energiebeitrag, den Reference-Offset. Die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen wird ständig gemessen und die Energiezufuhr so geregelt, dass die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen möglichst nahe bei Null liegt. Da Masse und Volumen von Referenz- und Probenzelle ziemlich genau übereinstimmen, ist die zugeführte Energie ein direktes Maß für den Wärmekapazitätsunterschied zwischen Referenz- und Probelösung. Aus der im Experiment aufgezeichneten Leistungsdifferenz ΔP kann man anhand der bekannten Heizrate $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ die aufgenommene Wärme ΔQ bestimmen:

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} \Delta P dt \simeq \Delta P \Delta t$$

Mit Gleichung 2.1 und der Teilchenzahl N erhält man die Differenz der spezifischen Wärmekapazität

$$\Delta c_p \simeq \frac{\Delta P \Delta t}{N \cdot \Delta T} .$$

Gesteuert werden die Kalorimeter über die von MicroCal entwickelte Software MCS-Observer (MCS-DSC) und VP-Viewer (VP-DSC). Über ein Menü werden folgende Scanparameter eingestellt:

- Starting Temperature: Starttemperatur, bei der die Messung beginnen soll.
- Final Temperature: Temperatur, bei der die Messung enden soll.
- Scanrate: Geschwindigkeit, mit der die Messung erfolgen soll (in °/h)
- Prescan Thermostat: Zeitspanne, über die die Probe vor Beginn der Messung auf der Starttemperatur gehalten werden soll. Diesen Wert

setzt man, damit die Probe, nachdem die Temperatur, ab der gemessen werden soll erreicht worden ist, relaxieren kann, und sich beim Start der Messung im Gleichgewicht befindet. Dieser Wert wurde jeweils auf 10 Minuten gesetzt.

- Postscan Thermostat: Zeitspanne, über die die Probe nach der Messung auf der Endtemperatur gehalten wird. Dieser Wert ist für die Messung unwichtig und wurde immer auf 0 gesetzt.
- Filtering Period: Dieser Wert gibt an, über wieviele Sekunden die Datenwerte gemittelt werden, bevor der Mittelwert gespeichert wird. Dieser Wert wurde in den Messungen auf 10 Sekunden gesetzt.
- Resting Temperature: Dieser Temperaturwert wird vom Gerät eingestellt, wenn alle Messungen abgeschlossen sind (meist 23 °C).
- Data File Name: Hier wird der Name eingegeben, unter dem die Ascii-Messwerttabelle gespeichert werden soll.
- Feedback Mode/Gain (Nur bei der VPViewer-Software des VP-DSC): Hier stehen vier Optionen zur Auswahl mit denen man einstellen kann, wie stark das Kalorimeter durch Wärmeausgleich auf Veränderungen in der Probe reagiert. Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Messungen wurde das Feedback auf "mid" gesetzt; In Messungen, bei denen in Temperaturbereichen über 60°C gemessen wurde, wurde der Wert auf "None" gesetzt, da sonst Messartefakte auftraten.

Das MCS-DSC ist ein älteres Instrument und das Vorgängermodell des VP-DSC. Grundsätzlich bringen beide Instrumente gute Ergebnisse, jedoch hat das neuere VP-DSC einige Vorteile:

- Mit dem VP-DSC kann man mehr Datenpunkte aufnehmen als mit dem MCS-DSC, was gerade bei Messungen über weite Temperaturbereiche eine höhere Genauigkeit ermöglicht.
- Das VP-DSC kommt mit weniger Probenvolumen aus, was besonders bei teuren Proben die Kosten senkt.
- Das MCS-DSC kann nur in Temperaturbereichen über 0°C messen, und dies auch nur im positiven Scanmodus von niedrigen zu hohen Temperaturen. Im umgekehrten Fall ist das Signal stark verrauscht und unauswertbar, weil die Temperaturregelung durch Wasserbäder erfolgt und man mit diesen schlecht mit einer festen Rate kühlen kann.
Da keine Möglichkeit der Kühlung des Mantels und der Zellen während

der Messung gegeben ist, kann man im Bereich von 0°C bis Raumtemperatur keine geringere Scanrate wählen als die, mit der sich die Zellen durch Wärmeaufnahme mit der Umgebung aufwärmen. Beim VP-DSC treten diese Probleme nicht auf, da die Temperaturregelung dieses Geräts mit Peltier-Elementen erfolgt, so dass sich beliebige Scanraten und -Richtungen im vom Gerät unterstützten Temperaturbereich (-10°C bis 120°C) einstellen lassen.

- Das VP-DSC unterstützt die Temperaturmessung unter 0°C, was mit dem MCS-DSC nicht möglich ist.

Probenpräparation

Abhängig davon, ob der Temperaturbereich für die Messung unterhalb von 0°C liegt, werden die Proben für eine Kapillarmessung ($T < 0^\circ\text{C}$) oder für die Standardmessung ($T > 0^\circ\text{C}$) präpariert.

Kapillarmessung Die Messung findet in der Kapillare statt, weil man der Probe für eine Messung nach der Standardpräparation ein Frostschutzmittel, wie z.B. Ethylenglycol, beimengen müsste. Würde man dies unterlassen, könnte die Probe unterhalb des Gefrierpunktes einfrieren. Das als Lösungsmittel dienende Wasser würde beim Ausdehnungsprozess die empfindliche Probenzelle des Kalorimeters zerstören. Dies würde das gesamte Kalorimeter unbrauchbar machen. Ethylenglycol hat jedoch die unerwünschte Eigenschaft, dass es Einfluss auf den Schmelzpunkt der Lipide hat. Deshalb gibt man die Probe in eine sehr schmale Metallkapillare (diese würde das Gefrieren des Wassers überstehen) mit geringem Probenvolumen ($70\mu\text{l}$) und hofft, dass das Wasser in der Probe nicht gefriert (Die Messung wäre unbrauchbar), was glücklicherweise selten der Fall ist. Die Lipidlösung, die in die Kapillare gegeben wird, hat eine Konzentration von 10mMol.

Um die Probe herzustellen, wird die entsprechende Menge Vorratslösung, die gegebenenfalls vorher mit Farbstoff-Vorratslösung gemischt wurde, unter einem Stickstoffstrom verdampft. Das zurückbleibende Lipid wird für mehrere Stunden im Exsikkator eingelagert (Vakuum mit Druck $p \approx 1 \cdot 10^{-2}\text{mbar}$), um Lösungsmittelreste zu verdampfen. Danach wird die Probe mit der entsprechenden Menge bidestillierten Wasser versetzt, das über den Schmelzpunkt der Lipide erwärmt ist, auf dieser Temperatur gehalten und das Lipid mit dem Magnetrührer gelöst. Nach diesem Schritt wird die Probe im Exsikkator für 10 Minuten entgast, weil die Möglichkeit besteht, dass Luftblasen in der Probe gelöst sind, die die Messung stören könnten. Die entgaste Probe wird dann vorsichtig in die Kapillare eingefüllt und die Kapillare zentrifugiert (ca.

5min bei 5000 U/min), damit sich das Lipid im unteren Teil der Kapillare sammelt (der obere Teil sitzt nicht im Kalorimeter und die in diesem Teil enthaltene Probe wäre verschwendet). Anschließend wird die Kapillare in das Kalorimeter eingebaut und die Messung kann beginnen.

Standardmessung Die benötigte Menge Lipidlösung-Vorratslösung wird, nachdem sie gegebenenfalls mit Farbstoff-Vorratslösung vermischt worden ist, unter einem Stickstoffstrom verdampft (Der Stickstoff beschleunigt den Verdampfungsprozess). Das zurückbleibende Lipid wird für mehrere Stunden (meist über Nacht) im Vakuum bei einem Druck $p \approx 1 \cdot 10^{-2}$ mbar gelagert. Danach wird die Probe mit der entsprechenden Menge bidestillierten Wasser versetzt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Das Wasser wurde vorher über den Schmelzpunkt der Lipide erhitzt. Diese Temperatur wird gehalten und die Probe auf dem Magnetrührer gerührt, um das Lipid zu lösen. Nach dieser Prozedur wird die Probe für 10 Minuten entgast, um eventuell vorhandene Luftblasen aus der Lösung zu entfernen. Nach dem Entgasen kann die Lösung in die Probenzelle gefüllt werden und die Messung beginnen.

2.2.2 Vesikelpräparation

Zur Herstellung von Phospholipidvesikeln für die konfokale Mikroskopie wurden mehrere Methoden entwickelt, zwei wurden im Laufe dieser Arbeit angewandt und werden im Folgenden vorgestellt:

Sanfte Hydratation

Bei der Methode der sanften Hydratation wird eine Lipidlösung mit einer Konzentration von $10 \frac{mg}{ml}$ in einer Mischung Dichlormethan/Methanol 2:1 (Volumenverhältnis) in einem Rotationsevaporator verdampft, so dass eine dünne Lipidschicht zurückbleibt. Die Probe wird anschließend noch für einige Stunden im Vakuum aufbewahrt (Druck $p \approx 1 \cdot 10^{-2}$ mbar), um auch die letzten Reste des Lösungsmittels zu verdampfen. Rückstände würden die Phasentrennung stören, weil sich das Lösungsmittel in die Lipidschicht einbaut. Nachdem die Probe aus dem Exsikkator entnommen wurde, wird in den Kolben über den Schmelzpunkt der Lipide erwärmtes bidestilliertes Wasser gegeben und die Probe für mehrere Stunden über der Phasenumwandlungstemperatur gehalten. Wenn die Präparation gelungen ist, kann man anschließend am Boden des Kolbens eine feine weiße Wolke aus Phospholipidvesikeln erkennen. Von dieser Wolke werden ein paar μl in eine Lab-TekTM-Zelle der Firma Nunc (Rochester/NY, USA) pipettiert, worin sie dann unter dem Mikroskop untersucht werden können.

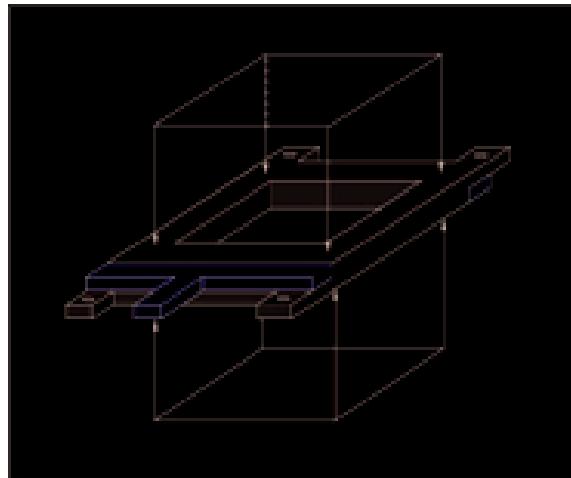


Abbildung 2.2: Zur Vesikelpräparationszelle gehörender Spacer, der für die Zuleitung des Stroms zur Generation des elektrischen Wechselfeldes zwischen den ITOs sorgt. Graue Bereiche bestehen aus isolierendem Plastik, gelbe aus leitendem Messing. Der Spacer wird beidseitig mit ITOs abgeschlossen, so dass man einen Kondensator erhält. Ist einer der ITOs auf der leitenden Seite mit einer Lipidschicht bedeckt und zwischen beiden ITOs destilliertes Wasser, so schwellen im elektrischen Wechselfeld Vesikel.

Elektroformation

Die Methode der Elektroformation auf Platindrähten wurde von Angelova und Dimitrov (1986) erstmals genutzt und ein paar Jahre später auch auf ITOs⁷ ausprobiert (Angelova und Dimitrov, 1992; Scherfeld et al., 2003). Letztere Methode wurde auch zur Präparation der Vesikel für die konfokale Mikroskopie dieser Arbeit angewandt, die Präparation funktioniert folgendermaßen:

- Auf die leitend beschichtete Seite eines ITOs (Pgo, Iserlohn/Deutschland; die ITOs wurden zuvor von der feinoptischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie Göttingen auf 0.175mm heruntergeschliffen) werden $2\mu\text{l}$ einer Lipidlösung mit einer Konzentration $c=0.9 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ gegeben und das Lösungsmittel unter einem Stickstoff-

⁷ ITO = Indium-Tin-Oxide; es handelt sich um einseitig leitend beschichtete Glasträger, die im sichtbaren Bereich des Lichts transparent sind. Um die Glasträger in der Mikroskopie benutzen zu können, müssen sie eine Stärke von 0.175mm haben, weil Mikroskopobjektive auf diese Stärke geeicht sind.

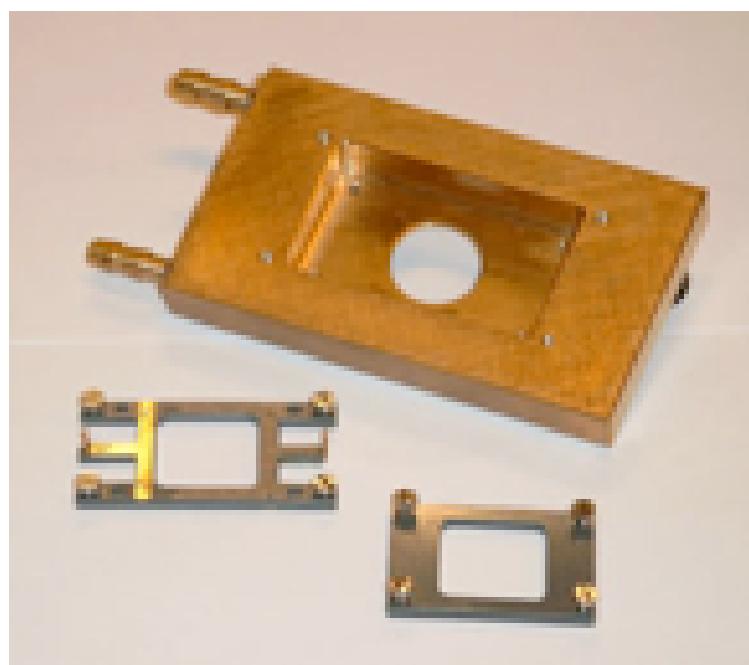


Abbildung 2.3: Temperierbare Messingzelle zur Züchtung von Phospholipidvesikeln

strom verdampft. Der Stickstoff beschleunigt den Verdampfungsprozess.

- Der ITO wird für mindestens $1\frac{1}{2}$ Stunden im Exsikkator aufbewahrt (Vakuum mit Druck $p \approx 1 \cdot 10^{-2} \text{ bar}$)
- Danach wird der Objektträger mit Vakuumfett (Beckman, Glenrothes Fife/Scotland) auf einem Spacer (Abbildung 2.2) fixiert, die mit Lipid beschichtete Seite zeigt dabei nach innen. Der Spacer gehört zu einer in der feinmechanischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie Göttingen (Deutschland) nach meinen Plänen hergestellten, temperierbaren Messingzelle zur Vesikelzüchtung (Abbildung 2.3).
- Mit einem Wasserbad wird die Messingzelle auf ca. 60°C gehalten.
- In die durch Spacer und ITO gebildete Ausbuchtung wird auf ca. 60°C vorgewärmtes Wasser gegeben und die offene Seite ebenfalls mit einem beschichteten ITO und Vakuumfett verschlossen. Der Spacer wird dann in die temperierte Messingzelle geschraubt.
- Mit einem Funktionsgenerator der Firma H-Tronic (Hirschau, Deutschland) wird über einen Zeitraum von mindestens 15 Minuten eine Wechselspannung mit einer Frequenz von 10Hz und einer Amplitude von 3V angelegt. Dadurch wird im Spacer ein Wechselfeld erzeugt, dass die Vesikel schwellen lässt.
- Nach dieser Prozedur sind die Vesikel fertig zur Beobachtung im konfokalen Mikroskop. Genutzt wurden konfokale Mikroskope TCS SP2 AOBS (Leica, Heidelberg/Deutschland) LSM410 bzw LSM510 (Zeiss, Jena/Deutschland).

Die Methode der Elektroformation hat gegenüber der Methode der sanften Hydratation den Vorteil, dass die Präparation schneller abgeschlossen ist, und die Ausbeute an unilamellaren Vesikeln erheblich größer ist. Bei der sanften Hydratation erhält man überwiegend multilamellare Vesikel und viele Lipidcluster, die für diese Arbeit nutzlos sind.

Der Vorteil der Methode der Elektroformation auf ITOs hat gegenüber der Methode der Elektroformation auf Platindrähten ist, dass man die Vesikel innerhalb der Präparationszelle mit stark vergrößernden Immersionsobjektiven nutzen kann (für diese Arbeit Öl-Immersionsobjektive mit 40facher Vergrößerung), da die Vesikel direkt auf dem Deckglas wachsen. Der Arbeitsabstand von Immersionsobjektiven ist sehr gering, so dass es schwierig

sein dürfte, eine Zelle zu Konstruieren bei der man mit einem Immersionsobjektiv den Platindraht beobachten kann.

Es muss erwähnt werden, dass es sich bei den von mir präparierten Vesikeln nur um auf den ITOs sitzende Halbsphären handelt. Diese Halbsphären haben aber den Vorteil, dass sie auf dem ITO fixiert sind. Bei anderen Methoden bekommt man zwar sphärische Vesikel, diese sind aber oft in Bewegung, was eine Schichtaufnahme im konfokalen Mikroskop unmöglich macht.

Die Vorteile der Methode der Elektroformation auf ITOs liegen also in der kurzen Zeitspanne der Probenpräparation, und der hohen Ausbeute an unilamellaren, ortsfesten Halbsphären, von denen man problemlos mehrere in einer Aufnahme mit dem Mikroskop platzieren kann.

2.2.3 Mikroskopie

Fluoreszenz

Der Nutzen der Fluoreszenz für die Mikroskopie biologischer Proben ist enorm. Man kann z.B. einzelne Moleküle markieren und deren Transport und ihre Anreicherung in Organismen beobachten. Man kann auch fluoreszierende Moleküle einsetzen, die ihre Fluoreszenzeigenschaften abhängig von der gegebenen Umgebung ändern, beispielsweise der Farbstoff Lourdan, bei dem die Lage des Emissionsmaximums in der fluiden Phase und in der Gelphase von einigen Phosphocolinen (z.B. DPPC) unterschiedlich ist (Bagatolli und Gratton, 1999), so dass sich dieser Farbstoff gut eignet, um Domänen zu markieren. In unseren Versuchen konnte dieser Farbstoff aber nicht eingesetzt werden, da das Absorptionsmaximum im ultravioletten Bereich des Spektrums liegt und uns dafür kein geeigneter Aufbau zur Verfügung steht. Fluoreszierende Moleküle besitzen Gruppen mit delokalisierten Elektronenwolken. Aus dem Grundzustand mit einer Energie E_0 werden Elektronen durch Absorption von Photonen einer geeigneten Wellenlänge in einen angeregten Zustand mit der Energie E_1 angehoben (Abbildung 2.4). Durch innere Verluste (z.b. Stöße) verlieren die Elektronen einen Teil ihrer Energie und gelangen auf ein Energieniveau $E_2 < E_1$. Abhängig von der Stabilität von diesem Zustand gelangen die Elektronen nach einer mittleren Lebensdauer $\tau \approx 10^{-8}$ s durch Emission eines Photons mit der Frequenz ν_2 in den Grundzustand.

Auswahl der Farbstoffe Mit den Farbstoffen sollen in der konfokalen Mikroskopie die Domänen auf den GUVs markiert werden. Es werden also zwei Farbstoffe benötigt, von denen einer sich bevorzugt in der fluiden Phase und der andere sich bevorzugt in der Gelphase lösen soll. Für die konfokalen Mes-

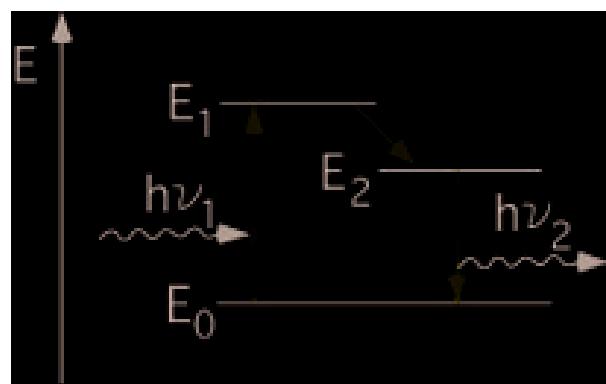


Abbildung 2.4: Prinzip der Fluoreszenz: Ein Elektron der Grundzustandsenergie E_0 wird durch Absorption eines Photons der Energie $h\nu_1$ in einen Energiezustand E_1 angehoben. Durch Stöße verliert es einen Teil der Energie und gelangt auf das Energieniveau E_2 , von dem es nach einer mittleren Lebensdauer τ , durch Emission eines Photons der Energie $h\nu_2$, auf den Grundzustand zurückfällt.

Farbstoff	Kettenlänge	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Molekulargewicht [g/mol]
Bodipy-C ₁₆ (D3803)	16	503	512	797.77
DiI-C ₁₈ (D7757)	18	644	663	1052.08

Tabelle 2.1: Eigenschaften der Farbstoffe Bodipy-C₁₆ und DiI-C₁₈. Diese wurden für konfokale Mikroskopie und kalorimetrische Messungen verwendet.

sungen wurden die Farbstoffe Bodipy-C₁₆, Herstellerbezeichnung D3803, und DiI-C₁₈, Herstellerbezeichnung D7757, gewählt. Die wichtigen Eigenschaften dieser Farbstoffe zeigt Tabelle 2.1.

Der Grund für die Wahl des Farbstoffs D3803 war die Tatsache, dass dieser Farbstoff schon in Messungen anderer Gruppen gute Ergebnisse gebracht hatte (Feigenson und Buboltz, 2001). Der DiI-C₁₈ Farbstoff wurde gewählt, weil ein Farbstoff mit einer Kettenlänge von 20 Kohlenstoffen, wie er in der zuvor genannten Arbeit genutzt worden war, nicht mehr hergestellt wird, und auf Grund der Übereinstimmung mit der Kettenlänge des DPPC die besten Ergebnisse erwartet wurden.

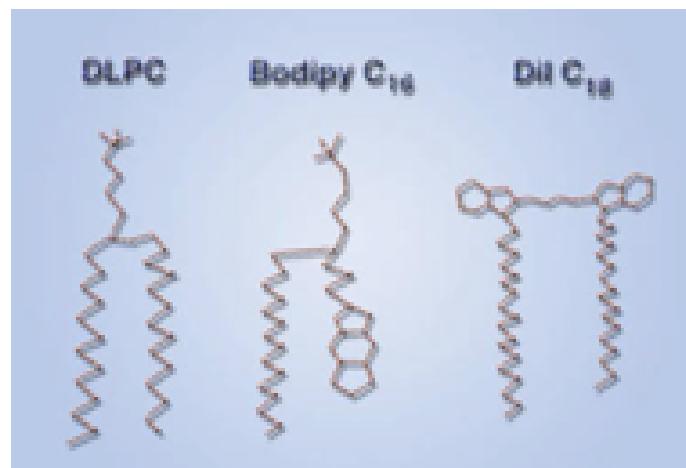


Abbildung 2.5: Vereinfachte Struktur des Lipids DLPC und der für die Experimente genutzten Farbstoffe Bodipy-C₁₆ (D3803) und DiI-C₁₈ (D7757) im Vergleich. Die Farbstoffe wurden so gewählt, dass ihre Struktur der des Lipids ähnelt.

Bei der Wahl der Farbstoffe wird darauf geachtet, dass die Struktur der Farbstoffe der Lipide ähnlich ist (Abbildung 2.5).

Der Bodipy-Farbstoff ist ein Phosphocholin, dessen Ende einer der beiden Ketten durch Kohlenstoffringe ersetzt sind. Diese Ringe sind wegen der delokalisierten Elektronenwolken der fluoreszierende Teil des Moleküls.

Beim DiI-C₁₈ Farbstoff handelt es sich nicht um einen phosphocholinartigen Farbstoff, dieser Farbstoff ist aber ein Phospholipid-Tracer, der synthetisiert worden ist, um Lipide zu markieren. Bei diesem Farbstoff sitzen die delokalisierten Elektronenwolken in der Kopfgruppe.

Ein weiterer zu beachtender Punkt bei der Auswahl der Farbstoffe sind die Absorptions- und Emissionsspektren. Diese zeigt Abbildung 2.6.

Die Farbstoffe sind so gewählt, dass die Emissionsspektren möglichst nicht überlappen, da man die Fluoreszenz mit den Photodetektoren der Mikroskope sonst nicht trennen kann und man dann keine Aussage darüber machen kann, von welchem Farbstoff das detektierte Signal kommt, man also fluide und gelförmige Bereiche nicht trennen kann.

Da in den meisten Mikroskopen meist nur Bandpassfilter zur Verfügung stehen, die in einem engen Wellenlängenbereich Licht durchlassen, wählt man die Farbstoffe so, dass möglichst der gesamte Bereich der Emission mit der Durchlässigkeit der Filter übereinstimmt. Neuere Mikroskope, wie z.B. das Leica TC2 AOBS, erleichtern die Farbstoffwahl, da man hier durch ein neu-

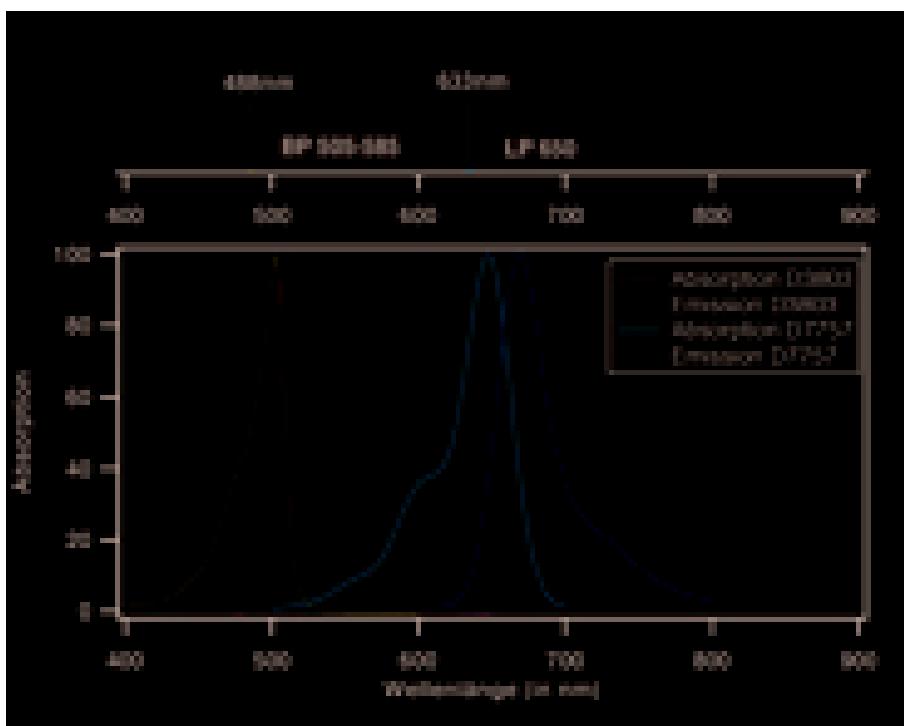


Abbildung 2.6: Absorptions- und Emissionsspektren der Farbstoffe Bodipy- C_{16} (D3803) und DiI- C_{18} (D7757). Im oberen Teil des Bildes sind die Laserlinien der in den Experimenten verwendeten Laser (Argon 488nm, HeNe 633nm), sowie die im Zeiss-Mikroskop LSM410 verwendeten Emissionsfilter (Bandpassfilter BP505-585nm; Langpassfilter LP650nm) gezeigt.

artiges Filtersystem die Wellenlänge der Filterbereiche kontinuierlich wählen kann.

Bei älteren Mikroskoptypen sollte man auch darauf achten, dass die Absorptionsspektren der Farbstoffe nicht überlappen, da einige Modelle nicht mehrere Farbkanäle simultan aufnehmen können. Daher würde man den Farbstoff, der gerade nicht mit dem Detektor aufgenommen werden kann, unnötig ausbleichen, wenn beide Absorptionsspektren überlappen.

Konventionelle Mikroskopie

Ohne die Erfindung des Mikroskops wären viele wichtige Entdeckungen nicht möglich gewesen. Im Prinzip besteht ein Mikroskop aus zwei Sammellinsen - dem Objektiv und dem Okular - aber es werden grundsätzlich mehr Linsen

eingesetzt, um Abbildungsfehler zu korrigieren.

Voraussetzung um zwei Punkte aufzulösen ist, dass sich die Haupmaxima der Beugungsscheiben der Beugungsbilder der Punkte nicht überschneiden. Sei φ der halbe Öffnungswinkel eines von einem Punkt eines Objekts ausgehenden Strahlenbündels ($\sin\varphi = \frac{r}{f}$; r: Radius der Objektivblende, f: Abstand Objekt-Objektiv \approx Brennweite), so gilt für den minimalen Abstand x_{min} zweier Bildpunkte (Auflösungsvermögen):

$$x_{min} \approx \frac{\lambda}{\sin\varphi} . \quad (2.2)$$

λ ist die Wellenlänge des einfallenden Lichts. Das Auflösungsvermögen verbessert sich also mit steigendem Objektiv- und Objektivblendendurchmesser und ist durch die kleinste Wellenlänge λ des sichtbaren Spektralbereichs begrenzt.

Eine Verbesserung der Auflösung erhält man, indem man eine Immersionsflüssigkeit zwischen Objekt und Objektiv einbringt. Die Immersionsflüssigkeit, mit einem Brechungsindex n, verringert die Wellenlänge auf $\frac{\lambda}{n}$, so dass

$$x_{min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin\varphi} \quad (2.3)$$

gilt. Den Wert $n \cdot \sin\varphi$ nennt man numerische Apertur.

Objekte, die kleiner sind als die halbe Wellenlänge des eingestrahlten Lichts, können nicht aufgelöst werden, die Auflösung optischer Mikroskope liegt bei ca. $0.5\mu\text{m}$.

Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde in den 60er Jahren von Marvin Minski erdacht. Er hatte die Absicht, die Tiefenschärfe konventioneller mikroskopischer Bilder zu verbessern, da hier bei dicken Proben das Streulicht aus Ebenen ausserhalb der Fokusebene das Bild unscharf macht. Zur Optimierung der Bildqualität nutzte er drei Tricks, die ich anhand der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, die für diese Arbeit genutzt wurde, erläutere (vgl. Abbildung 2.7):

- Das Licht der Lichtquelle (meist ein Laser, da dieser mit einer diskreten Wellenlänge abstrahlt) wird über einen strahlteilenden Spiegel, der im Bereich der Wellenlänge des Laserlichts reflektiert, auf ein Objektiv gelenkt, das das Licht auf einen Punkt der Probe fokussiert. So reicht die

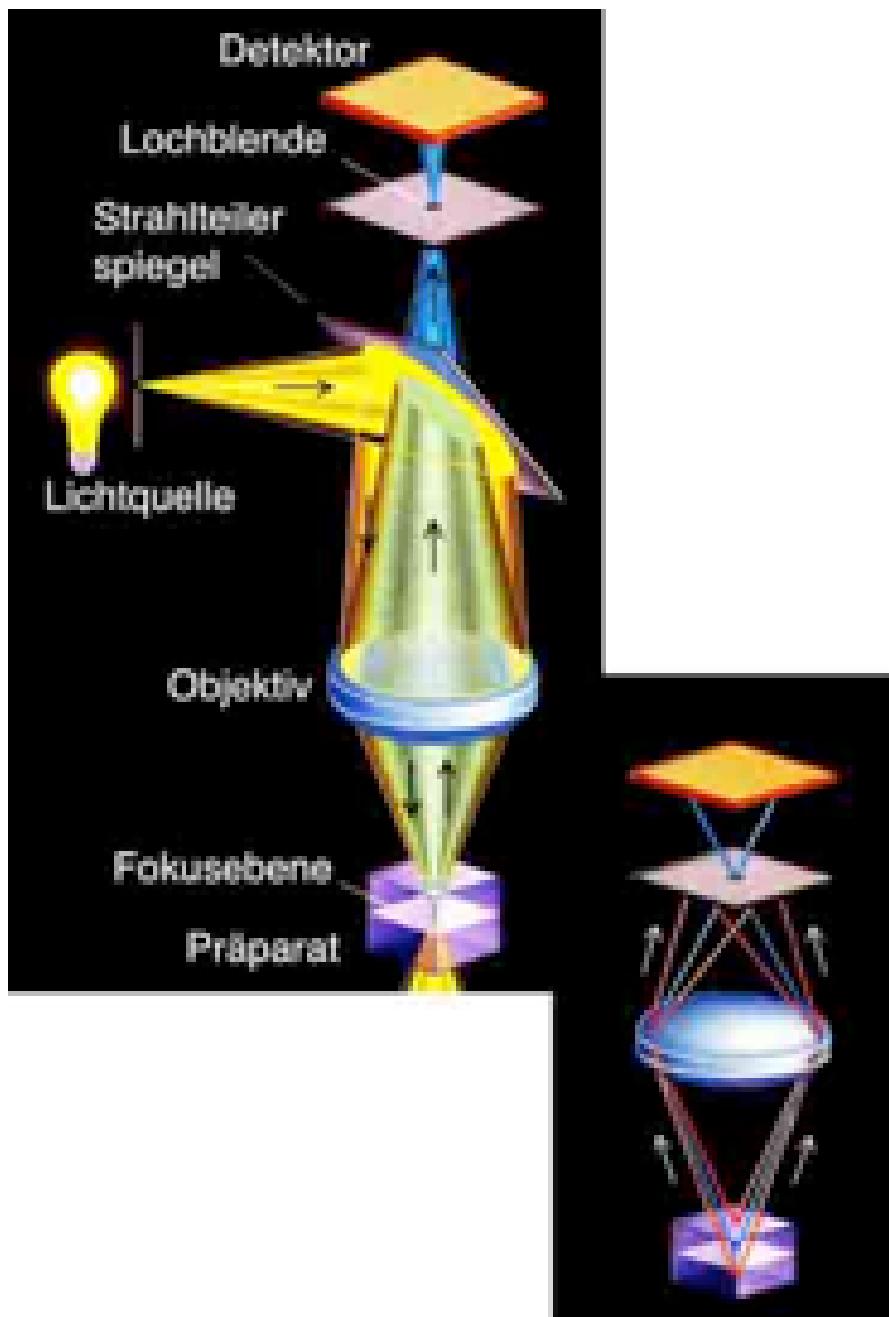


Abbildung 2.7: Schematische Zeichnung zur Verdeutlichung des konfokalen Prinzips: Nur Licht aus der Fokusebene passiert das Pinhole und gelangt in den Photodetektor (Bild rechts unten). Die Probe wird Punkt für Punkt abgetastet und durch eine zusätzliche Bewegung in z-Richtung werden Daten zur Generierung dreidimensionaler Bilder gesammelt (Bilder aus Lichtman (1994)).

Lichtintensität nur im Bereich der schmalen Taille des sanduhrförmigen Strahlengangs aus, um die Fluoreszenz anzuregen, was auch die Probe schont.

- Das von der mit Fluoreszenzmarkern angefärbten Probe abgestrahlte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv wieder auf den strahlteilenden Spiegel gelenkt, der im Wellenlängenbereich des Fluoreszenzlichts durchlässig ist. Das Licht fällt auf ein Pinhole (in den Versuchen lag der Pinholedurchmesser bei ca. $80\mu\text{m}$), das Licht, das nicht aus der Fokus-ebene stammt abblockt. Es kann also nur Licht, das von Molekülen aus der Fokusebene abgestrahlt wird, das Pinhole passieren und fällt auf einen dahinter platzierten Photomultiplier, der die erfassten Lichtintensitäten in elektrische Signale umwandelt, die dann im Computer verarbeitet werden können.
- Die Rasterung der Oberfläche ergibt dann einen optischen Schnitt durch die Probe, und wenn man die Lage des Fokus zusätzlich in z-Richtung ändert, ermöglicht dies dem Computer die Darstellung von dreidimensionalen Objekten, da jeder Bildpunkt in einem dreidimensionalen Gitter gespeichert wird. Diese Bildpunkte nennt man Voxel.

Konfokale Mikroskope wurden für diese Arbeit genutzt, um die Domänen auf GUVs zu visualisieren. Durch die Wahl geeigneter Farbstoffe und Filtersätze können die Fluoreszenzsignale aus den unterschiedlich angefärbten Domänen getrennt werden. Die Software der konfokalen Mikroskope bietet die Möglichkeit, die gesammelten Intensitäten, die mit den Photomultipliern aufgenommen werden, unterschiedlich darzustellen.

2.2.4 Rasterkraftmikroskopie

Eine neue Entwicklung, die sich in der Forschung schnell etabliert hat, ist die Rasterkraftmikroskopie⁸ (Binning et al., 1986). Ein Rasterkraftmikroskop kann in mehreren Moden betrieben werden, einer davon ist der Kontakt-Modus (konstante-Kraft-Modus, engl. constant force mode), der prinzipiell folgendermaßen funktioniert (Abbildung 2.8): Die Probe wird auf einem Glitterplättchen befestigt, das wiederum auf einem XYZ-Piezo⁹ befestigt wird. Ein Laserstrahl wird über eine Tastfeder (engl. Cantilever) auf eine 4-segmentige Diode gelenkt. Am Cantilever befindet sich eine sehr feine Spalte.

⁸ Rasterkraftmikroskopie wird mit AFM abgekürzt, was für Atomic Force Microscopy steht.

⁹ Ein Piezo ist ein Kristall, den man durch Anlegen einer Spannung kontrolliert dehnen oder stauchen kann, so dass man eine Probe sehr genau positionieren kann.

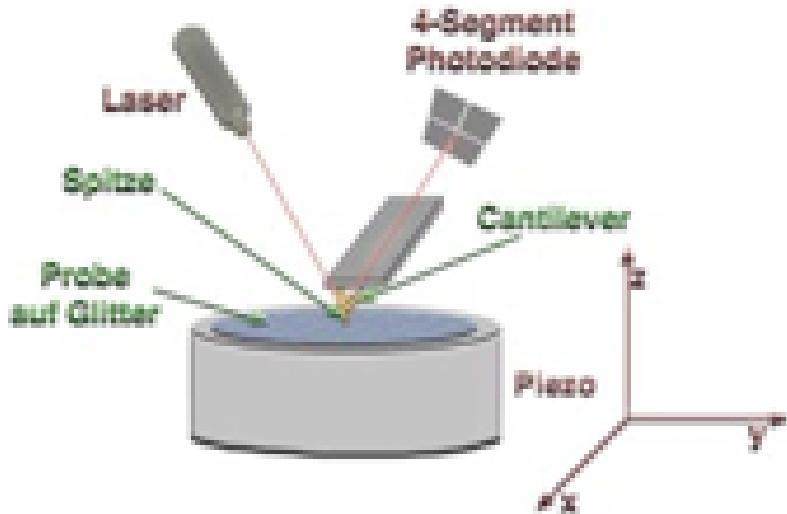


Abbildung 2.8: Schematische Zeichnung zum AFM-Funktionsprinzip.

Diese Spitze wird in den abstoßenden Bereich des van-der-Waals-Potentials der an der Oberfläche der Probe sitzenden Atome herangefahren. Der Piezo wird so angesteuert, dass die Probe unter der Spitze herfährt und die Probe somit gerastert wird. Der Cantilever wird durch Höhenänderungen auf der Probenoberfläche ausgelenkt, was die Richtung des Laserstrahls ändert. Diese Änderung wird mit der 4-segmentigen Photodiode registriert, die zu Beginn so justiert wird, dass der Laserstrahl auf die Mitte zwischen den Segmenten fällt. Wird der Laserstrahl von seinem ursprünglichen Verlauf abgelenkt, so resultiert daraus eine veränderte Intensität im detektierten Signal der einzelnen Segmente der Diode. Ein Regelmechanismus ermittelt die Differenzsignale der Diodensegmente und gibt als Ergebnis ein Signal an den Piezo, der die z-Position des Cantilevers ändert, um die Kraft zwischen Probe und Spitze konstant zu halten. Die Software des Rasterkraftmikroskops erstellt anhand der Auslenkung des Cantilevers (Deflection) und der Änderung der z-Ausrichtung (Height) des Piezos ein farbiges Höhenprofil. Höheninformationen kann man nur dem Bild der Height-Darstellung entnehmen, aber auch das Bild der Deflection-Darstellung kann hilfreich sein, da die Kontraste meist höher sind.

Der andere Modus, in dem ein Rasterkraftmikroskop betrieben werden kann, ist der sogenannte "Tapping-Modus": Der Cantilever wird zu Schwingungen

mit einer Frequenz von ungefähr 200kHz angeregt und die Probe schonender als im kostante-Kraft-Modus gerastert. Die Elektronik kann die Verschiebung zwischen der anregenden Frequenz und der Frequenz bestimmen, mit der der Cantilever schwingt. Abhängig von der Härte der Oberfläche kommt es zu einer Phasenverschiebung, so dass man in diesem Modus zusätzlich Informationen über die Elastizität gewinnen kann.

Der Grund, warum die Rasterkraftmikroskopie so erfolgreich ist, liegt darin, dass man eine sehr hohe laterale und vertikale Auflösung von 1nm bzw 0.1nm hat. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, in wässriger Lösung zu messen.

Probenpräparation

Vorratslösungen der Lipide DLPC und DPPC mit einer Konzentration von $10 \frac{mg}{ml}$ wurden im gewünschten Verhältnis gemischt und das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom verdampft. Die Proben wurden anschließend über Nacht im Exsikkator (Druck $p \approx 10^{-2}$ mbar gehalten, um Lösungsmittelreste restlos zu verdampfen. Danach wurden die Proben in über den Schmelzpunkt erwärmtem, bidestilliertem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 1 mMol verdünnt. Um SUVs herzustellen, wurde die Lipidlösung für 15 Minuten in einem Sonifier Cell Disruptor B-15 (Branson, Dietzenbach/Germany) mit Ultraschall beschallt, bis die Lösung klar wurde. Die SUVs wurden sofort nach dem Beschallen bei einer Temperatur über dem Schmelzpunkt gelagert, um die Fusion zu LUVs zu unterbinden. 40 μ l der Lipidlösung wurden auf ein frisch gespaltenes Glitterplättchen gebracht und bei Raumtemperatur 20 Minuten stehengelassen. Anschließend wurde das Glitterplättchen mit 150mM NaCl-Lösung gespült, ohne das Glitterplättchen austrocknen zu lassen. Nach dem Spülen konnte das Glitterplättchen in das AFM eingebaut werden.

Gemessen wurde an einem MultiMode-AFM mit einem NanoScope IIIa Controler der Firma Digital Instruments (Santa-Barbara, Kalifornien/USA). Das Gerät wurde im Kontakt-Modus und im Tapping-Modus mit oxidgeschärften Siliziumnitrid AFM-Spitzen (ebenfalls Digital Instruments) mit Federkonstanten von 0.06 N/m bzw. 0.12 N/m betrieben. Die Temperaturregelung erfolgte durch Änderung der Raumtemperatur, die Temperatur im AFM wurde mit einem Thermoelement möglichst nahe der Probe gemessen.

Kapitel 3

Kalorimetrischer Teil

3.1 Phasen

Eine Ansammlung von Molekülen verschiedener Aggregatzustände kann homogene Bereiche eines Zustands zeigen, die durch Grenzflächen voneinander abgetrennt sind. Diese homogenen Bereiche nennt man Phasen¹. Verschiedene Phasen besitzen unterschiedliche Eigenschaften, beispielsweise Dichte und Kompressibilität. Man unterscheidet flüssige, feste und gasförmige Phasen, die jeweils noch in unterschiedlichen Modifikationen (beispielsweise unterschiedliche Kristallstrukturen in der festen Phase) auftreten können. Zwei Phasen sind im Phasengleichgewicht, wenn sie sich im thermischen Gleichgewicht befinden. Das Ehrenfest-Theorem versucht, eine Klassifikation von Phasenübergängen zu geben. Es besagt, dass bei einem Phasenübergang n-te Ordnung die n-te Ableitung der Gibbschen freien Energie nach der Temperatur bei konstantem Druck, $\partial^n G / \partial T^n$, eine Unstetigkeit zeigt und alle niedrigeren Ableitungen stetig sind. Bei einem Phasenübergang 1.Ordnung ist die Gibbsche freie Energie stetig und $(\partial G / \partial T)_p$ zeigt eine Unstetigkeit. Da Entropie und Volumenänderungen in Beziehung zu $(\partial G / \partial T)_p$ stehen, zeigen auch diese Größen eine Unstetigkeit. Da $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ und $\Delta G = 0$ für einen Phasenübergang 1.Ordnung, gilt $\Delta H = T_m \Delta S$. Weil die Entropie unstetig ist, zeigt auch die Enthalpie bei einem Phasenübergang 1.Ordnung eine Unstetigkeit, was sich in der latenten Wärme² bemerkbar macht. Für Phasenübergänge höherer Ordnung ist ΔS und ΔG null, so dass Phasenübergänge mit höherer Ordnung keine latente Wärme besitzen.

¹ Die Grenzflächen werden in theoretischen Betrachtungen ignoriert.

² Die latente Wärme bezeichnet einen zugeführten Energiebetrag, der nicht zur Temperaturänderung einer Substanz führt. So muss man Eis beim Schmelzen beispielsweise Energie zuführen, um die Kristallstruktur zu brechen. Solange noch Eis vorhanden ist, ändert sich die Temperatur aber trotz Energiezufuhr nicht.

Ob es sich bei Lipidsystemen um einen Phasenübergang 1. Ordnung handelt ist umstritten. Messungen der Enthalpie zeigen einen stetigen Verlauf, was gegen einen Phasenübergang 1. Ordnung spräche. Der Verlauf könnte aber auch auf winzige Verunreinigungen zurückzuführen sein, die bei der Probenpräparation nicht zu vermeiden sind. Es wird empfohlen, Phasenübergänge mit vorhandener latenter Wärme als Phasenübergänge 1. Ordnung und Phasenübergänge ohne latente Wärme als Phasenübergänge höherer Ordnung zu klassifizieren.

Die Anzahl F der intensiven, unabhängigen Variablen, die man benötigt um ein System mit K Komponenten und P Phasen zu beschreiben, ist durch die Gibbssche Phasenregel gegeben:

$$F = K + 2 - P . \quad (3.1)$$

So benötigt man für ein Lipidsystem mit $K=2$ Komponenten und $P=2$ Phasen noch zwei intensive Variablen, beispielsweise Druck und Temperatur, um das System zu beschreiben. Experimentelle Messungen werden meist bei konstantem Druck durchgeführt, so dass ein Freiheitsgrad entfällt und die Phasenregel $F = K + 1 - P$ gilt.

Eine wichtige Orientierungshilfe, um festzustellen, in welchem Zustand sich ein System aus mehreren Komponenten zu einem gegebenen Mischungsverhältnis befindet, sind Phasendiagramme. Im Folgenden wird auf Phasendiagramme binärer Mischungen eingegangen, da Mischungen mit mehr als zwei Molekülsorten für diese Arbeit nicht von Interesse sind.

3.2 Ideale Lipidmischungen

Ideale Mischungen sind solche, in denen Moleküle unterschiedlicher Molekülsorten miteinander wechselwirken wie die Moleküle einer Sorte. Der Wechselwirkungsparameter unterschiedlicher Molekülsorten ist also der gleiche wie der für gleiche Moleküle. Seien x_A^G und x_A^F die Anteile von Molekülen der Sorte A in der festen bzw. der flüssigen Phase, und x_B^G und x_B^F die entsprechenden Anteile für Molekülsorte B. Sind beide Molekülsorten bei einer Temperatur T im chemischen Gleichgewicht, so müssen die Potentiale der festen und flüssigen Phase gleich sein:

$$\mu_A^G = \mu_A^F \quad (3.2)$$

Das chemische Potential für die Molekülsorte A ist durch folgende Gleichungen gegeben:

$$\mu_A^G = \mu_A^{G,0} + RT \ln x_A^G \quad (3.3)$$

$$\mu_A^F = \mu_A^{F,0} + RT \ln x_A^F \quad (3.4)$$

$\mu_A^{G,0}$ und $\mu_A^{F,0}$ sind die Gibbschen freien Energien eines Mols puren Stoffes der Sorte A in der festen bzw. in der flüssigen Phase bei der Temperatur T , R ist die Gaskonstante. Im Gleichgewicht gilt dann

$$\ln \frac{x_A^F}{x_A^G} = \frac{-\mu_A^{F,0} + \mu_A^{G,0}}{RT}. \quad (3.5)$$

Die erste Ableitung von 3.5 ergibt

$$\left(\frac{\partial \ln \frac{x_A^F}{x_A^G}}{\partial T} \right) = \frac{H_A^{F,0} - H_A^{G,0}}{RT^2} = \frac{\Delta(H_A)_T}{RT^2} \quad (3.6)$$

mit der Schmelzenthalpie $\Delta(H_A)_T = H_A^{F,0} - H_A^{G,0}$ der puren Komponente A bei der Temperatur T. $H_A^{F,0}$ und $H_A^{G,0}$ bezeichnen die Enthalpien der puren Komponente A in der flüssigen bzw. in der festen Phase. Integriert man zwischen dem Schmelzpunkt T_A der reinen Komponente A und der Temperatur T, so erhält man

$$\ln \frac{x_A^F}{x_A^G} = \int_{T_A}^T \frac{(\Delta H_A)_T}{RT^2} dT. \quad (3.7)$$

Für die Schmelzenthalpie der Komponente A erhält man mit der Differenz Δc_p der spezifischen Wärme von fester und flüssiger Phase:

$$\Delta(H_A)_T = (\Delta H_A)_{T_A} + \int_{T_A}^T \Delta c_p dT = (\Delta(H_A)_{T_A} + \Delta c_p(T - T_A)) \quad (3.8)$$

Da man davon ausgehen kann, dass die Wärmekapazitätsdifferenz zwischen fester und flüssiger Phase $\Delta c_p = 0$ ist, folgt:

$$\ln \frac{x_A^F}{x_A^G} = \int_{T_A}^T \frac{(\Delta H_A)_{T_A}}{RT^2} dT \quad (3.9)$$

und damit:

$$\ln \frac{x_A^F}{x_A^G} = -\frac{(\Delta H_A)_{T_A}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \quad (3.10)$$

was man zu

$$\frac{x_A^F}{x_A^G} = \exp \left[\frac{-(\Delta H_A)_{T_A}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \right] = e^{-A} \quad (3.11)$$

umformen kann. Analog erhält man für Komponente B:

$$\frac{x_B^F}{x_B^G} = \exp \left[\frac{-(\Delta H_B)_{T_B}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_B} \right) \right] = e^{-B}, \quad (3.12)$$

wobei

$$A \equiv -\frac{(\Delta H_A)_{T_A}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \quad (3.13)$$

$$B \equiv -\frac{(\Delta H_B)_{T_B}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_B} \right) \quad (3.14)$$

Um die Gleichungen (3.11) und (3.12) mit den vier Unbekannten x_A^F , x_A^G , x_B^F und x_B^G zu lösen, nutzt man folgende Relationen:

$$x_A^G = 1 - x_B^G \quad (3.15)$$

$$x_A^F = 1 - x_B^F \quad (3.16)$$

Setzt man nun x_A^F aus Gleichung 3.11 in Gleichung 3.16 ein, so erhält man

$$x_A^F = (1 - x_B^G) e^{-A}. \quad (3.17)$$

Gleichung 3.12 kann man mit Gleichung 3.16 zu

$$x_B^G = \frac{x_B^F}{e^{-B}} \quad (3.18)$$

umformen und erhält durch Einsetzen in 3.17

$$x_A^F = \left[1 - \left(\frac{x_B^F}{e^{-B}} \right) \right] e^{-A}. \quad (3.19)$$

Nutzt man Formel 3.16, so erhält man

$$x_A^F = \left[1 - \frac{(1 - x_A^F)}{e^{-B}} \right] e^{-A} \quad (3.20)$$

und kann dies zu

$$x_A^F = \frac{e^{-A}(e^{-B} - 1)}{e^{-B} - e^{-A}} \quad (3.21)$$

umformen. Setzt man dieses Ergebnis in 3.16 ein, so kommt man auf

$$x_B^F = \frac{e^{-B}(e^{-A} - 1)}{e^{-A} - e^{-B}}. \quad (3.22)$$

Mit den Gleichungen 3.11 und 3.12 erhält man aus den beiden letzten Gleichungen die Anteile der Molekülsorten A und B an der festen Phase

$$x_A^G = \frac{e^{-B} - 1}{e^{-B} - e^{-A}} \quad (3.23)$$

$$x_B^G = \frac{e^{-A} - 1}{e^{-A} - e^{-B}} \quad (3.24)$$

Gleichungen 3.22 und 3.24 nutzt man um das theoretische Phasendiagramm zu erstellen. Das Phasendiagramm einer idealen Mischung (nach Lee (1977)) ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Die Form des Phasendiagramms muss nicht unbedingt, wie in der Abbildung, linsenförmig sein, sondern kann auch abhängig von den in das Modell eingehenden Parametern, Schmelzpunkt und Schmelzenthalpie, konvex oder konkav sein.

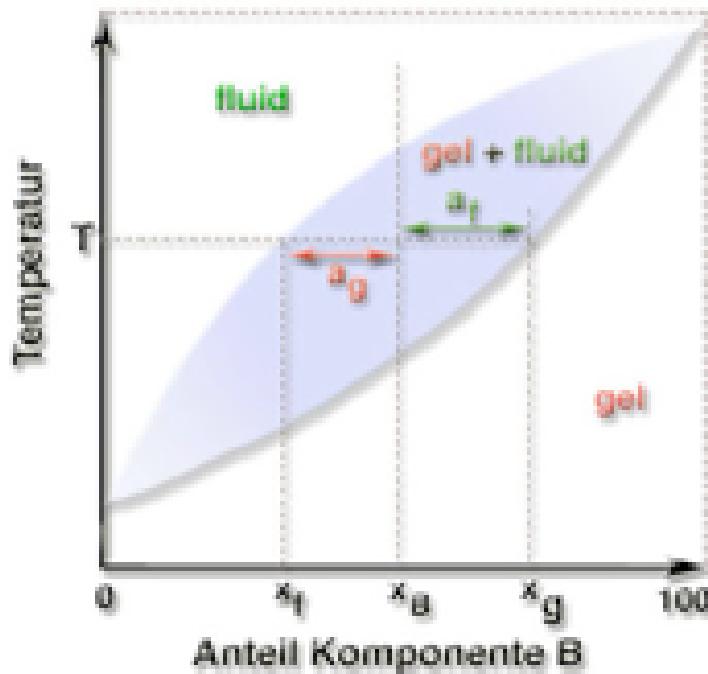


Abbildung 3.1: Theoretisches Phasendiagramm einer idealen Lipidmischung

Wie man anhand von Gleichung 3.11 und 3.12 nachvollziehen kann, ist im Temperaturbereich $T_B \leq T \leq T_A$ der Anteil der bei niedriger Temperatur schmelzenden Komponente B in der fluiden und der Anteil der bei hoher Temperatur schmelzenden Komponente A in der Gelphase größer. Die prozentuale Verteilung der beiden Phasen (x_{gel}, x_{fluid}) lässt sich anhand des Hebelgesetzes bestimmen (vgl. Abb. 3.1):

$$x_{gel} = \frac{a_g}{a_g + a_f} = \frac{x_g - x_B}{x_g - x_f} \quad (3.25)$$

$$x_{fluid} = 1 - x_{gel} \quad (3.26)$$

3.3 Reale Lipidmischungen

Der vorhergehende Abschnitt befasste sich mit dem Phasendiagramm idealer Lipidmischungen. Bei den meisten Lipidmischungen, wie auch bei der für diese Arbeit verwendeten DLPC/DPPC Mischungen, kann man aber nicht von idealer Mischbarkeit ausgehen. Dieser Abschnitt zeigt daher die theoretische Grundlage für das Phasendiagramm realer Lipidmischungen, bei denen die Lipide einer Lipidsorte mit den Lipiden der anderen Lipidsorte nicht in der Weise wechselwirken, als wären es Lipide der eigenen Lipidsorte. Auch dies ist ausführlich in Lee (1977) beschrieben. Das chemische Potential einer Lipidsorte A einer nicht idealen Lipidmischung ist durch

$$\mu_A = \mu_A^0 + RT\ln(x_A \cdot j_A) \quad (3.27)$$

gegeben, wobei der Aktivitätskoeffizient j_A die Nichtidealität beschreibt. Man definiert einen zusätzlichen Beitrag μ_A^R zum chemischen Potential,

$$\mu_A^R = RT\ln j_A , \quad (3.28)$$

der von der Nichtidealität der Lipidmischung herrührt. Daher bekommt man einen zusätzlichen Beitrag

$$G^R = x_A \mu_A^R + x_B \mu_B^R \quad (3.29)$$

zur Gibbschen freien Energie. Es ist problematisch, einen Ausdruck für diese zusätzlichen Größen zu finden. Eine einfache Möglichkeit ist die Annahme, dass die Entropie der Lipidmischung noch angenähert ideal ($\Delta S_M \cong 0$) ist, aber die Mischenthalpie ungleich Null ist:

$$\Delta H_M = \rho_0 x_A x_B \quad (3.30)$$

Die Konstante ρ_0 beschreibt das Mischungsverhalten und kann als der Unterschied in den Wechselwirkungsenergien U_{AB} , U_{AA} und U_{BB} der möglichen Paarungen der Lipide beider Lipidsorten interpretiert werden:

$$\rho_0 = Z(2U_{AB} - U_{AA} - U_{BB}) , \quad (3.31)$$

Z ist die Koordinationszahl. Für den zusätzlichen Beitrag zum chemischen Potential gilt dann:

$$\mu_A^R = \rho_0 x_A^2 \quad (3.32)$$

$$\mu_B^R = \rho_0 x_B^2 . \quad (3.33)$$

Diese Gleichungen können für die Fälle angewendet werden, dass sich beide Lipidsorten gar nicht in der festen Phase lösen, oder dass beide Molekülsorten

reale Mischbarkeit in beiden Phasen zeigen. Im für diese Arbeit vorliegenden Fall des realen Mischungsverhaltens beider Lipidsorten ist das chemische Potential der Gelphase

$$\mu_A^G = \mu_A^{G,0} + RT \ln x_A^G + \rho_0^G (1 - x_A^G)^2 \quad (3.34)$$

$$\mu_B^G = \mu_B^{G,0} + RT \ln(1 - x_A^G) + \rho_0^G (x_A^G)^2. \quad (3.35)$$

ρ_0^G ist der Wechselwirkungsparameter von Lipiden in der Gelphase nach Gleichung 3.31. Entsprechend formuliert man das chemische Potential der fluiden Phase mit der Konstanten ρ_0^F nach Gleichung 3.31. Mit der Phasengleichgewichtsbedingung $\mu_A^F = \mu_A^G$ und $\mu_B^F = \mu_B^G$ für fluide Phase und Gelphase erhält man

$$\ln \frac{x_A^F}{x_A^G} + \frac{\rho_0^F (1 - x_A^F)^2 - \rho_0^G (1 - x_A^G)^2}{RT} = -\frac{\mu_A^{F,0} + \mu_A^{G,0}}{RT} \quad (3.36)$$

Dies führt zu

$$\ln \frac{x_A^F}{x_A^G} + \frac{\rho_0^F (1 - x_A^F)^2 - \rho_0^G (1 - x_A^G)^2}{RT} = -\frac{(\Delta H_A)_{T_A}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \quad (3.37)$$

$$\ln \frac{1 - x_A^F}{1 - x_A^G} + \frac{\rho_0^F (x_A^F)^2 - \rho_0^G (x_A^G)^2}{RT} = -\frac{(\Delta H_B)_{T_B}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_B} \right) \quad (3.38)$$

Auf Grund ihrer transzendenten Natur können diese Gleichungen nur am Computer gelöst werden. Ungenauigkeiten in nach der Theorie der realen Lipidmischung hergestellten Phasendiagrammen sind darauf zurückzuführen, dass für die Lipide ein Übergang mit unendlich schmalen Schmelzpeak vorausgesetzt wird, was nicht der Realität entspricht. Zusätzlich wird angenommen, dass die Entropie der des idealen Verhaltens entspricht, und der Term der Mischungsenthalpie wird durch Gleichung 3.30 beschrieben. Der in der Mischungsenthalpie auftretende Faktor ρ_0 ist dem experimentell bestimmten Phasendiagramm entnommen.

Ein Ansatz, der versucht, die in der realen Mischungstheorie auftretenden Ungenauigkeiten zu korrigieren, ist die Monte-Carlo-Simulation, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

3.4 Monte-Carlo-Simulation von Einkomponentensystemen

Monte Carlo-Simulationen werden benutzt, um verschiedene thermodynamische Größen, beispielsweise die Enthalpie, eines Systems aus vielen Teilchen oder Molekülen numerisch zu bestimmen. Abhängig vom der Simulation zugrundeliegenden Modell werden den einzelnen Teilchen oder Molekülen

Zustände zugeordnet. Im Pink-Modell (Pink et al., 1980) sind es beispielsweise 10 Zustände, im Folgenden wird ein Zwei-Zustands-Ising-Modell der Thermodynamik zugrundegelegt (Doniach, 1978; Heimburg und Biltonen, 1996). Die beiden Zustände sind Gelförmig und Fluid.

Die Lipide sind auf einem hexagonalen Gitter mit n Gitterplätzen angeordnet, auf jedem Gitterplatz sitzt ein Lipid (Koordinationszahl Z=6)³. Um Randeffekte zu minimieren, werden dem Gitter periodische Randbedingungen zugrunde gelegt, so dass die Lipidmatrix auf einem Torus liegt, statt, wie dem Experiment ähnlicher, auf einer Kugel⁴. Auf einer Kugeloberfläche sind aber keine Gitter mit fester Koordinationszahl möglich⁵.

Zur freien Energie jedes Lipids tragen zwei Anteile bei: Die intrinsische freie Energie G_i (der Index i steht für g=gel oder f=fluid) und die Summe über die freie Energie der Wechselwirkung mit den nächsten Nachbarn, ϵ_{ij} . Weitere Wechselwirkungen gehen in dieses Modell nicht ein. Für einen Phasenübergang mit schmaler Halbwertsbreite ist es eine angemessene Vereinfachung anzunehmen, dass die Nächstnachbarwechselwirkungen ϵ_{ij} ausschließlich enthalpischer Natur sind, also Temperaturunabhängig. Die totale freie Energie ist dann die Summe über alle n Lipide:

$$G = n_g \cdot G_g + n_f \cdot G_f + n_{gg} \cdot \epsilon_{gg} + n_{ff} \cdot \epsilon_{ff} + n_{gf} \cdot \epsilon_{gf} \quad (3.39)$$

n_g und n_f ist die Anzahl gelförmiger bzw. fluider Lipide, n_{gg} , n_{ff} und n_{gf} sind die Anzahlen der Lipidkontakte gel-gel, fluid-fluid und gel-fluid. Im Fall der hier angewendeten periodischen Randbedingungen kann man für die Werte n_i und n_{ij} folgende Beziehungen formulieren:

$$n_{ff} = \frac{1}{2} (Z \cdot n_f - n_{gf}) \quad (3.40)$$

$$n_{gg} = \frac{1}{2} (Z \cdot n_g - n_{gf}) \quad (3.41)$$

Damit kann man die Gibbsche freie Energie des Systems zu

$$G = n \cdot \left(G_g + \frac{Z}{2} \epsilon_{gg} \right) + n_f \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gf} \cdot \omega_{gf} \quad (3.42)$$

³ Es wurden auch Monte-Carlo-Simulationen, bei denen pro Gitterplatz eine Molekülkette sitzt, durchgeführt. Diese Berechnungen zeigen jedoch gleiche Ergebnisse (Jerala et al., 1996).

⁴ Man will Membranen von Lipidvesikeln simulieren, weil die sphärische Form dem natürlichen Erscheinungsbild ähnlicher ist als planare Systeme.

⁵ Eine Krümmung wird aber in den Simulationen nicht eingearbeitet, hätte aber Einfluss auf das Phasenverhalten (Biltonen, 1990)

umformen. Dabei sind

$$\Delta H = \left(H_f + Z \cdot \frac{\epsilon_{ff}}{2} \right) - \left(H_g + Z \cdot \frac{\epsilon_{gg}}{2} \right) , \quad (3.43)$$

$$\Delta S = (S_f - S_g) \quad (3.44)$$

$$\text{und } \omega_{gf} = \epsilon_{gf} - \frac{1}{2} \cdot (\epsilon_{gg} + \epsilon_{ff}) , \quad (3.45)$$

wobei ω_{gf} der Kooperativitätsparameter ist. Das System ist im Minimum der Enthalpie, wenn alle Lipide im gelförmigen Zustand sind. Also gilt für die Differenz der Gibbschen freien Energie des Systems:

$$\Delta G = G - n \cdot G_g = n_f \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gf} \cdot \omega_{gf} \quad (3.46)$$

Für $\omega_{gf} = 0$ besitzt die Umwandlung keine Kooperativität und die Umwandlung findet über einen sehr weiten Temperaturbereich statt. Je größer der Wert für ω_{gf} , desto höher die Kooperativität, was sich in einer verringerten Halbwertsbreite des Schmelzprofils zeigt. Da im Schmelzpunkt T_m die freie Energie $\Delta G = \Delta H - T \Delta S = 0$ ist, bestimmt man die Entropie der Umwandlung zu $\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m}$. Man muss also in diesem Modell drei Parameter bestimmen: Den Schmelzpunkt T_m , die Enthalpie ΔH und den Kooperativitätsfaktor ω_{gf} . Schmelzpunkt und Enthalpie kann man aus dem kalorimetrisch gemessenen Schmelzprofil ablesen, den Wert für ω_{gf} legt man fest, indem man die theoretisch berechneten Schmelzkurven an die experimentellen Schmelzkurven anpasst. Zur Berechnung der Schmelzkurven wird ein Glauber-Algorithmus angewandt:

- Man wählt eine beliebige Startkonfiguration des Systems
- Man wählt einen beliebigen Gitterpunkt der Matrix
- Man ändert den Zustand des Lipids und berechnet die Differenz der Enthalpie zwischen alter und neuer Konfiguration:

$$\Delta G = \pm(\Delta H - T \cdot \Delta S) + \Delta n_{gf} \cdot \omega_{gf} \quad (3.47)$$

das positive Vorzeichen steht für den Übergang gel-fluid, das negative für den Übergang fluid-gel. Δn_{gf} ist die Änderung der Anzahl ungleicher Lipidkontakte n_{gf} .

- Man berechnet die Übergangswahrscheinlichkeit

$$P = \frac{K(T)}{1 + K(T)} ,$$

mit statistischem Gewicht $K(T) = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)$ (3.48)

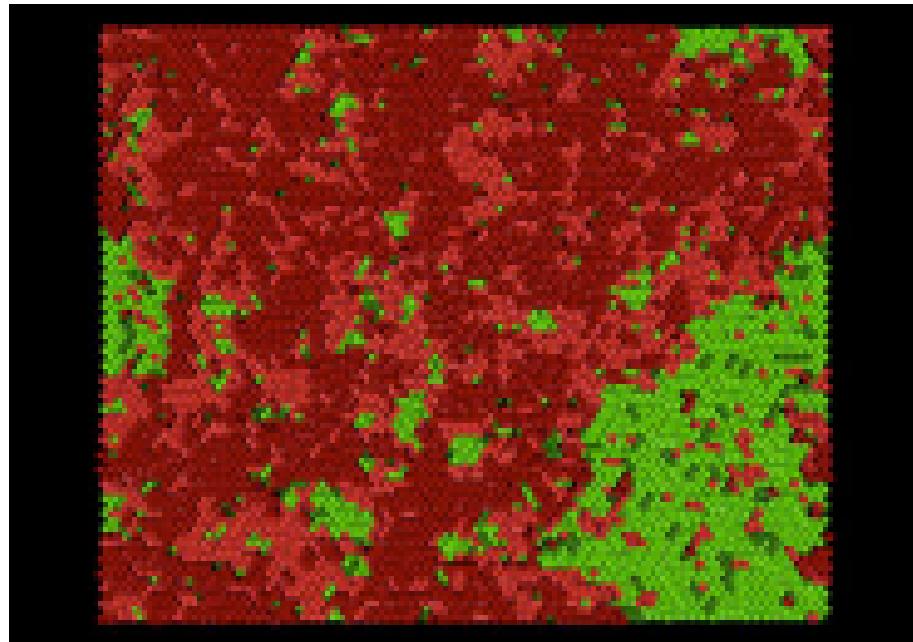


Abbildung 3.2: Schnappschuß aus einer Monte-Carlo-Simulation eines DMPC/DSPC 50:50 Lipidsystems. Simuliert wurde eine Matrix aus 80×80 Lipiden bei einer Temperatur von $T=303.6\text{ K}$ (Hac et al. (2004); Dunkelrot = DSPC gel, Hellrot = DMPC gel, Dunkelgrün = DSPC fluid, Hellgrün = DMPC fluid).

- Man generiert eine Zufallszahl RAN, mit $0 \leq \text{RAN} \leq 1$, und vergleicht ihren Wert mit der berechneten Wahrscheinlichkeit. Das Ergebnis bestimmt, ob der Übergang stattfindet oder das System in der alten Anordnung bleibt:

$$\text{RAN} \leq P \mapsto \text{neue Konfiguration} \quad (3.49)$$

$$\text{RAN} > P \mapsto \text{alte Konfiguration} \quad (3.50)$$

Das gerade gezeigte Schema beschreibt einen Monte-Carlo-Schritt. Eine Momentaufnahme der graphischen Ausgabe einer Monte-Carlo-Simulation zeigt Abbildung 3.2. Eine vollständige Monte-Carlo-Simulation besteht aus mehreren solcher Schritte⁶. Die Genauigkeit der Ergebnisse hängt von der Anzahl der Simulationsschritte ab, und volle Genaugkeit würde erst für unendlich

⁶ Für die Anzahl von Schritten die einen Monte-Carlo-Zyklus ergeben gibt es unterschiedliche Definitionen. Eine ist z.B., dass ein Zyklus abgeschlossen ist, wenn bei einer Lipidmatrix mit n Lipiden n -mal eine Zustandsänderung vorgenommen wurde.

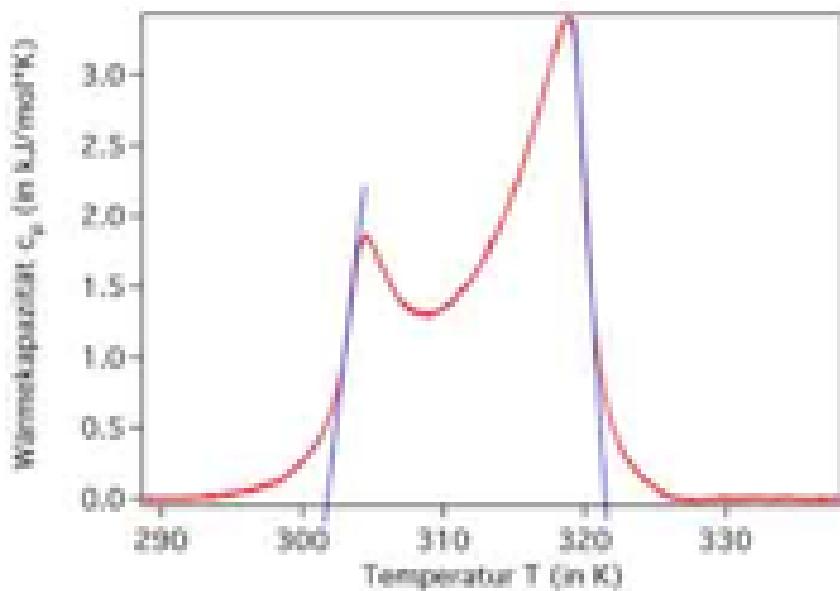


Abbildung 3.3: Wärmekapazitätskurve einer DMPC/DSPC 44:66-Lipidmischung. Die Schnittpunkte der an die Flanken des Schmelzprofils angelegten Tangenten mit der Temperaturachse ergeben den solidus- bzw. den liquidus-Punkt⁶.

viele Simulationsschritte erzielt. Um aus den Monte-Carlo-Simulationen die spezifische Wärme zu berechnen, nimmt man das Fluktuations-Dissipations-Theorem:

$$c_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2} \quad (3.51)$$

Zu einer festen Temperatur werden viele Monte-Carlo-Zyklen berechnet, die Enthalpie nach jedem Schritt aufgezeichnet, und anhand der Fluktuationen in der Enthalpie die spezifische Wärme bestimmt. Um aus der spezifischen Wärme ein Phasendiagramm zu erstellen, nimmt man ausreichend viele Schmelzkurven für Lipidmischungen unterschiedlicher Zusammensetzung und legt an die Flanken des Schmelzprofils Tangenten (siehe Abbildung 3.3). Die Werte der Schnittpunkte mit der Temperaturachse werden gegen die

⁶ Die solidus-Linie ist die Grenze zwischen dem Bereich der Gelphase und dem Phasenkoexistenzbereich und die liquidus-Linie die Grenzlinie von Phasenkoexistenzbereich und fluider Phase im Phasendiagramm. Trägt man die solidus- und liquidus-Punkte aller möglichen Lipidmischungsverhältnisse auf, erhält man das Phasendiagramm der Lipidmischung.

Konzentration aufgetragen, wobei man annimmt, dass ausserhalb des von den Tangenten abgegrenzten Bereiches nur die vollständige fluide bzw. gelförmige Phase vorliegt.

Für die dieser Arbeit zugrundeliegende Lipidmischung DLPC/DPPC gibt es in der Literatur kein theoretisches Phasendiagramm. Die Berechnung des Phasendiagramms dieser speziellen Lipidmischung wird dadurch erschwert, dass das kurzkettige Lipid DLPC nicht nur den Phasenübergang fluid-gelförmig zeigt, sondern dass es im Bereich des Phasenübergangs möglicherweise auch noch zu Änderungen in der Struktur der Vesikel kommt, wie kalorimetrische Experimente vermuten lassen. Wie in Abschnitt 1.6 beschrieben, zeigen die Lipide der Gruppe der Phosphocholine, die mehr als 12 Kohlenstoffe pro Kette besitzen, einen sehr schmalen Peak im Bereich der Phasenumwandlung (Abb. 1.7). Beim Lipid DLPC ist aber zusätzlich noch ein weiterer, flacher und breiter Peak zu sehen, der dem Hauptpeak der Phasenumwandlung folgt. Eine vergleichbare Schmelzkurve zeigt das Lipid DMPG. Bei diesem Lipid, dessen Hauptumwandlung bei ca. 294K liegt, sieht man anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine Strukturumwandlung von vakuären Strukturen zu einem Netzwerk((Schneider et al., 1999)). Ob beim Lipid DLPC auch eine Strukturumwandlung vorliegt, lässt sich nur vermuten. Dazu liegen aber noch keine systematischen Untersuchungen vor. Messungen an DLPC gestalten sich aufgrund des bei 269.35K liegenden Schmelzpunkts oftmals schwierig.

Um mit Monte-Carlo-Simulationen das Schmelzverhalten von DLPC zu simulieren, müssten noch weitere Parameter in die Simulation aufgenommen werden.

Ein Beispiel für ein Phasendiagramm einer DMPC/DSPC-Lipidmischung, bei dem Theorie und Experiment gute Übereinstimmung zeigen, ist in Abbildung 3.4 dargestellt, das experimentell bestimmte Phasendiagramm der Lipidmischung DLPC/DPPC zeigt Abbildung 3.5.

3.5 Histogramm-Methode

Die Histogramm Methode hat in vorhergehenden Arbeiten Ergebnisse geliefert (Ivanova et al., 2003) die helfen sollen, Messergebnisse aus Experimenten für diese Arbeit zu interpretieren. Die Histogramm-Methode basiert auf der Monte-Carlo-Simulation, und ihr Hauptvorteil liegt in der Beschleunigung der Rechenzeit. Die Theorie zeigt, dass es egal ist, ob man den Mittelwert einer Observablen durch Mittelung über die Zeit oder über alle möglichen Konfigurationen des Ensembles bestimmt. Um den Weg über die Ensemblemittelung zu gehen, berechnet man für einen Satz von Parametern

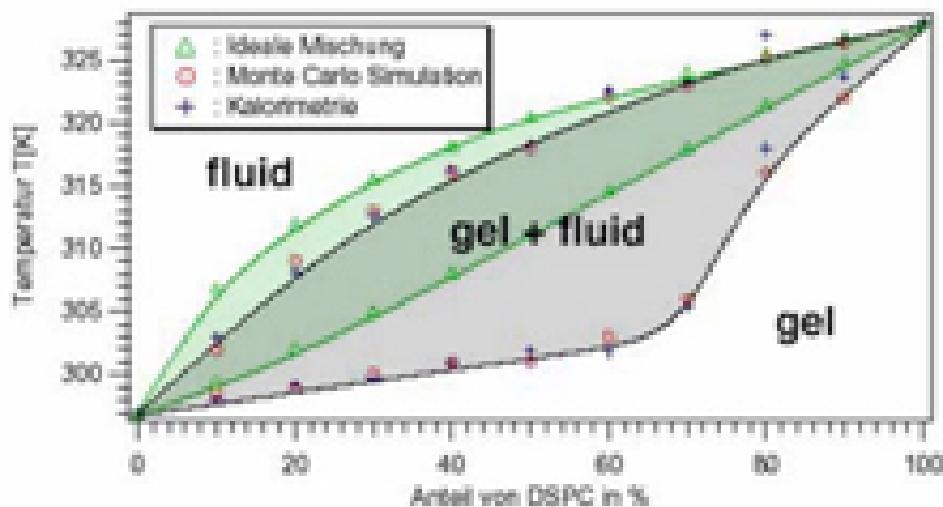


Abbildung 3.4: Theoretisch und experimentell bestimmtes Phasendiagramm der binären Lipidmischung DMPC/DSPC (nach Schlotzter (2002)). Der grüne Bereich ist der nach der Theorie der Idealen Mischung bestimmte Phasenkoeexistenzbereich, der graue Bereich der mit Monte-Carlo-Simulationen bzw. Kalorimetrie bestimmte Phasenkoeexistenzbereich.

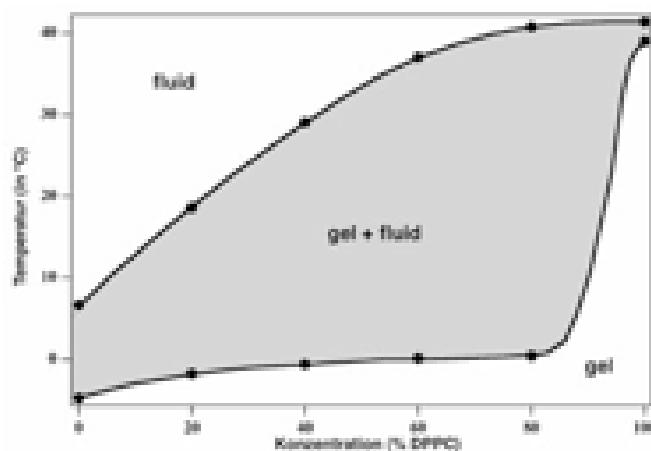


Abbildung 3.5: Kalorimetrisch bestimmtes Phasendiagramm der binären Lipidmischung DLPC/DPPC (Heimburg 1998, unveröffentlicht).

$\zeta = (T, T_m, \Delta H, \omega_{gf})$ den Mittelwert der interessierenden Observable X:

$$\begin{aligned}\langle X(T) \rangle &= \sum_{n_f} \sum_{n_{gf}} X(n_f, n_{gf}) \cdot P(\zeta, n_f, n_{gf}) \\ &= \frac{\sum_{n_f} \sum_{n_{gf}} X(n_f, n_{gf}) \cdot \Omega(n_f, n_{gf}) \cdot \exp\left(-\frac{n_f \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gf} \cdot \omega_{gf}}{RT}\right)}{\sum_{n_f} \sum_{n_{gf}} \Omega(n_f, n_{gf}) \cdot \exp\left(-\frac{n_f \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gf} \cdot \omega_{gf}}{RT}\right)}\end{aligned}\quad (3.52)$$

$P(\zeta, n_f, n_{gf})$ ist die Wahrscheinlichkeit, für einen vorgegebenen Satz von Parametern ζ eine Matrixkonfiguration mit n_f fluiden Lipiden und n_{gf} ungleicher Lipidkontakte (und damit ungleicher Nächstnachbar-Wechselwirkung) zu finden und $\Omega(n_f, n_{gf})$ ist die Anzahl unabhängiger Möglichkeiten solch eine Konfiguration zu generieren, also die Entartung der Zustände.

Die Entartung $\Omega(n_f, n_{gf})$ ist unabhängig vom Parametersatz ζ , aber abhängig von der Größe der Matrix der Monte-Carlo-Simulation. Für große Systeme lässt sich die Entartung nicht mehr analytisch berechnen, man kann sie aber mit Hilfe der Monte-Carlo-Simulation abtasten. Kennt man einmal die Entartung $\Omega(n_f, n_{gf})$ kann man für jeden beliebigen Satz von Parametern $\zeta (T, T_m, \Delta H, \omega_{gf})$ den Mittelwert $\langle X \rangle$ der Observablen X mit Gleichung 3.53 berechnen, ohne eine neue Monte-Carlo-Simulation berechnen zu müssen.

Jede Monte-Carlo-Simulation liefert eine Wahrscheinlichkeitsverteilung

$$P(\zeta, n_f, n_{gf}) = \frac{\Omega(n_f, n_{gf}) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G(\zeta, n_f, n_{gf})}{RT}\right)}{\sum_{n_f} \sum_{n_{gf}} \Omega(n_f, n_{gf}) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G(\zeta, n_f, n_{gf})}{RT}\right)}, \quad (3.53)$$

die in Kästen aufgeteilt wird. Jeder Kasten enthält die Summe der Wahrscheinlichkeiten in einem Bereich des Phasenraums. Da die Entartung $\Omega(n_f, n_{gf})$ im Fall der Lipidschicht von zwei Variablen n_f und n_{gf} abhängt, werden die Ergebnisse der Wahrscheinlichkeitsverteilung in ein zweidimensionales Histogramm gesetzt.

Die Genauigkeit der Bestimmung der Entartung hängt von der Größe der Kästen ab. Man erhöht die Genauigkeit, wenn man die Größe der Kästen verkleinert, muss aber dann mehr Rechenzeit investieren, um den ganzen Phasenraum zu erkunden. Hat man ein Histogramm anhand eines Parametersatzes ζ bestimmt, kann man damit eine neue Wahrscheinlichkeitsverteilung

mit einem neuen Parametersatz ζ^* berechnen:

$$P^*(n_f, n_{gf}, \zeta^*) = \frac{P(n_f, n_{gf}, \zeta) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}, \zeta)}{RT} - \frac{\Delta G(n_f, n_{gf}, \zeta^*)}{RT}\right)}{\sum_{n_f} \sum_{n_{gf}} P(n_f, n_{gf}, \zeta) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}, \zeta)}{RT} - \frac{\Delta G(n_f, n_{gf}, \zeta^*)}{RT}\right)} \quad (3.54)$$

Die Berechnung thermodynamischer Funktionen ist nur möglich, wenn fast der ganze zugängliche Phasenraum durch die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(n_g, n_{gf}, \zeta)$ abgedeckt wird. Da aber aufgrund der endlichen Monte-Carlo-Schritte nicht der ganze Phasenraum abgetastet werden kann, kommt es besonders in den äusseren Bereichen der Wahrscheinlichkeitsverteilung zu Ungenauigkeiten. Die Genauigkeit der Histogramm-Methode kann wesentlich verbessert werden, wenn man Histogramme, die man zu unterschiedlichen Parametersätzen ζ^* berechnet hat, vereinigt. Ein Verfahren, um dies zu verwirklichen, wurde in Bowen et al. (1989) eingeführt und von Ivanova (2000); Ivanova und Heimburg (2001) erweitert: Man berechnet ein Histogramm $P(n_f, n_{gf}, \zeta)$ zu einem Parametersatz ζ , nennen wir dieses das primäre Histogramm, und ein zweites normiertes Histogramm $P(n_f, n_{gf}, \zeta^*)$ zu einem Parametersatz ζ^* , dieses sei sekundäres Histogramm genannt. Um die Histogramme zu vereinigen, muss eine gute Überlagerung beider Histogramme gegeben sein. Der Bereich der überschneidenden Region der Histogramme, M^{2d} , in dem die sekundäre Verteilung bessere Statistik zeigt als die erste, ist definiert als der Bereich im Phasenraum für den gilt:

$$P^*(n_f, n_{gf}, \zeta^*) > P(n_f, n_{gf}, \zeta) \quad \text{für } \{n_f, n_{gf}\} \in M^{2d} \quad (3.55)$$

Die zweite Verteilung wird mittels Gleichung 3.54 neu berechnet, wobei der Parametersatz ζ der primären Verteilung genutzt wird: $\zeta^* \rightarrow \zeta$.

$$P^*(n_f, n_{gf}, \zeta^*) \rightarrow \tilde{P}^*(n_f, n_{gf}, \zeta) \quad (3.56)$$

Ein Skalierungsfaktor r wird folgendermaßen definiert:

$$r = \frac{\sum_{\{n_f, n_{gf}\} \in M^{2d}} P(n_f, n_{gf}, \zeta)}{\sum_{\{n_f, n_{gf}\} \in M^{2d}} \tilde{P}^*(n_f, n_{gf}, \zeta)}. \quad (3.57)$$

Die Erweiterung des primären Histogramms wird folgendermaßen vorgenommen:

1. Wenn $\{n_f, n_{gf}\} \in M^{2d}$, dann wird $P(n_f, n_{gf}, \zeta) = r \cdot \tilde{P}^*(n_f, n_{gf}, \zeta)$ gesetzt.

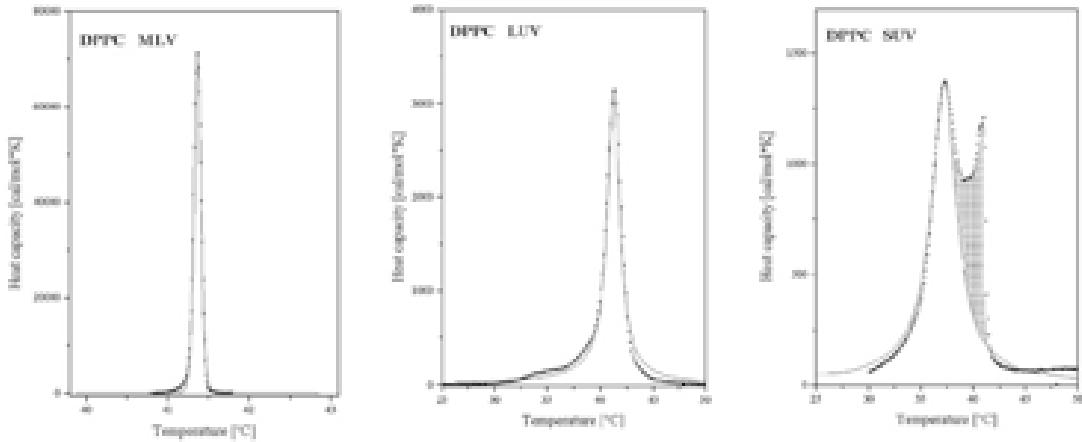


Abbildung 3.6: Vergleich von gemessenen und berechneten Wärme- kapazitätsprofilen (durchgezogene Linien bzw. Punkte). Links: MLV; Mitte: LUV; Rechts: SUV, der schraffierte Bereich stammt von einem Anteil LUVs in der SUV-Probe⁴. (Ivanova, 2000).

2. Wenn $\{n_f, n_{gf}\} \notin M^{2d}$ und

- (i) wenn $P^*(n_f, n_{gf}, \zeta^*) > P(n_f, n_{gf}, \zeta)$,
dann wird $P(n_f, n_{gf}, \zeta) = r \cdot \tilde{P}^*(n_f, n_{gf}, \zeta)$ gesetzt.
- (ii) wenn $P^*(n_f, n_{gf}, \zeta^*) < P(n_f, n_{gf}, \zeta)$,
so wird $P(n_f, n_{gf}, \zeta)$ nicht geändert.

Es folgt abschließend noch eine Normierung des erweiterten Histogramms. Der hier präsentierte Algorithmus verbessert nicht nur die Genauigkeit des Histogramms im überlappenden Bereich, sondern erweitert das primäre Histogramm aufgrund von Schritt 2. Das so konstruierte “weite” Histogramm kann verwendet werden, um Wärmekapazitätskurven zu bestimmen. Abbildung 3.6 zeigt den Vergleich experimentell gemessener und mit der Histogramm-Methode berechneter Wärmekapazitätsprofile.

⁴ Die LUVs entstehen durch Fusion der SUVs. SUVs sind instabil und fusionieren unterhalb des Lipidschmelzpunkts zu LUVs.

3.6 Histogramm-Methode angewandt auf Lipid/Peptid-Systeme

Um das Verhalten von Peptiden in Lipid-Monoschichten zu beschreiben, wurde von Ivanova (2000); Ivanova und Heimburg (2001) eine Erweiterung der Monte-Carlo-Simulation vorgeschlagen. Man nutzt auch hier wieder das hexagonale Ising-Modell aus Abschnitt 3.4. Dies wird um zwei Wechselwirkungsparameter ω_{gp} und ω_{fp} erweitert, die die Wechselwirkungsenergien gelförmiges Lipid-Protein und fluides Lipid-Protein beschreiben. Die Gibbsche freie Energie einer Konfiguration ist dann durch

$$\Delta G(n_f, n_{gf}, n_{gp}, n_{fp}) = n_f \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gf} \cdot \omega_{gf} + n_{gp} \cdot \omega_{gp} + n_{fp} \cdot \omega_{fp} \quad (3.58)$$

gegeben. Die effektiven Wechselwirkungsparameter ω_{gp} und ω_{fp} werden aus den reinen Wechselwirkungsenergien der einzelnen Komponenten bestimmt:

$$\omega_{gp} = \epsilon_{gp} - \frac{1}{2}(\epsilon_{gg} + \epsilon_{pp}) \quad (3.59)$$

$$\omega_{fp} = \epsilon_{fp} - \frac{1}{2}(\epsilon_{ff} + \epsilon_{pp}) \quad (3.60)$$

ϵ_{gp} , ϵ_{fp} und ϵ_{pp} sind die Wechselwirkungsenergien gelförmiges Lipid - Peptid, fluides Lipid - Peptid und Peptid - Peptid.

Vereinfachend wird angenommen, dass die Peptide klein genug sind, um nur einen Gitterplatz zu besetzen und selbst keine Schmelzprozesse zeigen. Der Monte-Carlo-Algorithmus sieht dann folgendermaßen aus (siehe Abbildung 3.7):

- Man wählt einen willkürlichen Gitterpunkt.
- Wenn es ein Lipid ist, wird versucht, seinen Zustand zu ändern und man verfährt wie in Abschnitt 3.4 beschrieben.
- Wenn es ein Peptid ist:
 - Man wählt ein beliebiges Lipid.
 - Man vertauscht es mit dem Peptid.
 - Man berechnet die Differenz der Gibbschen freien Energie zwischen der neuen und der alten Konfiguration.

$$\partial G = \partial G^{lipid} + \partial G^{peptid} \quad (3.61)$$

wobei $\partial G^{lipid} = (\Delta n_{gf} \cdot \omega_{gf} + \Delta n_{gp} \cdot \omega_{gp} + \Delta n_{fp} \cdot \omega_{fp})$ ist. Δn_{gf} , Δn_{gp} und Δn_{fp} sind die Änderungen der Anzahl der nächsten ungleichen Nachbarkontakte der Lipide. ∂G^{peptid} wird durch einen ähnlichen Ausdruck beschrieben, der die Änderung der nächsten Nachbarkontakte der Peptide einbezieht.

- Man berechnet die Wahrscheinlichkeit für eine Änderung des Zustands

$$P = \frac{K(T)}{1 + K(T)},$$

$$\text{mit statistischem Gewicht } K(T) = \exp\left(-\frac{\partial G}{RT}\right) \quad (3.62)$$

- Man generiert eine Zufallszahl RAN mit $0 \leq RAN \leq 1$ und vergleicht diese mit der berechneten Wahrscheinlichkeit P . Das Ergebnis dieses Vergleichs entscheidet, ob der Übergang stattfindet oder nicht:

$$RAN \leq P \mapsto \text{neue Konfiguration} \quad (3.63)$$

$$RAN > P \mapsto \text{alte Konfiguration} \quad (3.64)$$

Mit der Monte-Carlo-Simulation wird, wie auch schon in Kapitel 3.4, der Phasenraum abgetastet und die Entartung bestimmt. Jede Monte-Carlo-Simulation generiert eine Wahrscheinlichkeitsverteilung

$$P(n_p, n_f, n_{gf}, n_{fp}, n_{gp}, \zeta) = \frac{\Omega(n_p, n_f, n_{gf}, n_{fp}, n_{gp}) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}, n_{fp}, n_{gp}, \zeta)}{RT}\right)}{\sum_{n_f, n_{gf}} \Omega(n_p, n_f, n_{gf}, n_{fp}, n_{gp}) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}, n_{fp}, n_{gp}, \zeta)}{RT}\right)} \quad (3.65)$$

ζ ist der Parametersatz $(n_p, T, \Delta H, T_m, \omega_{gf}, \omega_{fp}, \omega_{gp})$, n_f ist die Anzahl flüider Lipide; n_{gf} , n_{fp} , n_{gp} sind die jeweiligen Anzahlen ungleicher Nächst-Nachbar-Kontakte, und n_p bezeichnet die Anzahl der Peptide. Im Gegensatz zum zweidimensionalen Histogramm aus Abschnitt 3.4 hat man es in diesem Fall mit einem vierdimensionalen Histogramm zu tun, dessen Berechnungszeit wesentlich höher ist. Pro Simulation werden im vierdimensionalen Fall nur ungefähr 0,27% des Phasenraumes erkundet, im zweidimensionalen Fall waren es immerhin noch über 10%, so dass im ersten Fall natürlich viel mehr Simulationen erforderlich sind, um ein weites Histogramm zu erzeugen. Die Genauigkeit wird wieder durch den Vergleich mit experimentell erlangten



Abbildung 3.7: Schema eines Monte-Carlo Schritts zur Simulation von Membranen eines Lipid/Peptid-Systems. Eine vollständige Monte-Carlo-Simulation besteht aus vielen Schritten.

Kalorimeterdaten überprüft. Aus dem Experiment stammen auch die drei Wechselwirkungsparameter ω_{gf} , ω_{fp} , ω_{gp} . Interessant in Hinsicht auf diese Arbeit ist nun die Untersuchung von zwei Fällen:

- 1.) Das Peptid löst sich besser in der Gelphase.
- 2.) Das Peptid löst sich besser in der fluiden Phase.

Im ersten Fall setzt man voraus, dass das Peptid ähnliche Eigenschaften wie das gelförmige Lipid hat und ideal mit den gelförmigen Lipiden wechselwirkt. Für den Wechselwirkungsparameter von Gel und Peptid gilt dann $\omega_{gp} = 0$, und für den Wechselwirkungsparameter fluides Lipid-Peptid gilt $\omega_{fp} = \omega_{gf}$. Der Term für die Gibbsche Freie Energie einer gegebenen Konfiguration lautet dann

$$\Delta G(n_f, n_{gf}, n_{fp}) = n_f \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gf}^{fp} \cdot \omega_{gf} \quad (3.66)$$

mit $n_{gf}^{fp} = n_{gf} + n_{fp}$. Man erhält mit diesem Ausdruck den Verteilungskoeffizienten

$$P(n_f, n_{gf}^{fp}, \zeta, n_p) = \frac{\Omega(n_f, n_{gf}^{fp}) \cdot \frac{(n_g+n_p)!}{n_g! \cdot n_p!} \exp\left(-\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}^{fp}, \zeta)}{RT}\right)}{\sum_{n_f} \sum_{n_{gf}^{fp}} \Omega(n_f, n_{gf}^{fp}) \cdot \frac{(n_g+n_p)!}{n_g! \cdot n_p!} \exp\left(-\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}^{fp}, \zeta)}{RT}\right)} \quad (3.67)$$

mit dem Parametersatz $\zeta(T, \Delta H, T_m, \omega_{gf})$. Wärmekapazitätsprofile mit unterschiedlichen Peptidanteilen zeigt Abbildung 3.8b.

Betrachten wir nun den zweiten Fall, bei dem ein Peptid vorausgesetzt wird, das dem Lipid im Zustand in der fluiden Phase ähnelt, es gilt dann $\omega_{fp} = 0$ und $\omega_{gp} = \omega_{gf}$. Für den Verteilungskoeffizienten erhält man in diesem Fall

$$P(n_f, n_{gf}^{gp}, \zeta, n_p) = \frac{\Omega(n_f, n_{gf}^{gp}) \cdot \frac{(n_f+n_p)!}{n_f! \cdot n_p!} \exp\left(-\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}^{gp}, \zeta)}{RT}\right)}{\sum_{n_f} \sum_{n_{gf}^{gp}} \Omega(n_f, n_{gf}^{gp}) \cdot \frac{(n_f+n_p)!}{n_f! \cdot n_p!} \exp\left(-\frac{\Delta G(n_f, n_{gf}^{gp}, \zeta)}{RT}\right)} \quad (3.68)$$

mit $n_{gf}^{gp} = n_{gf} + n_{gp}$ und dem Parametersatz $\zeta(T, \Delta H, T_m, \omega_{gf})$. Wärmekapazitätsprofile für diesen Fall und unterschiedliche Lipidfraktionen zeigt

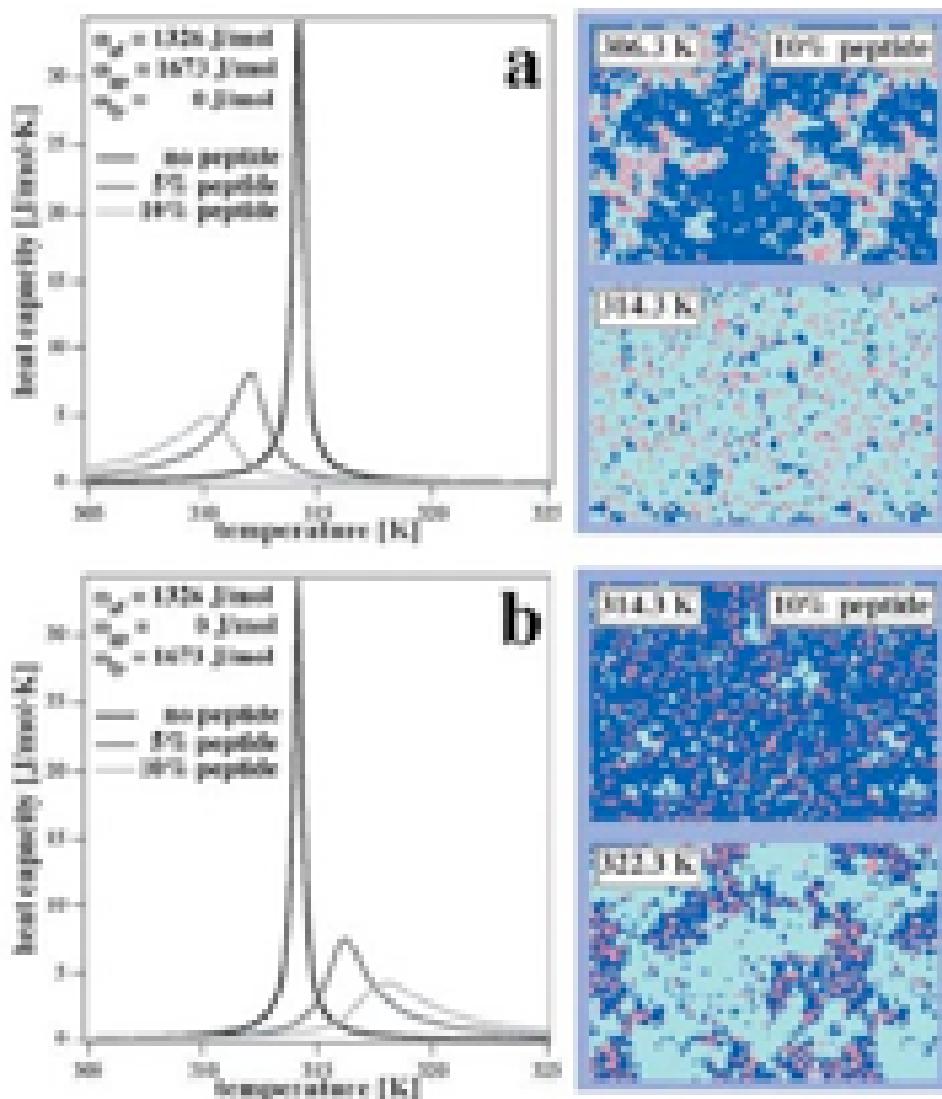


Abbildung 3.8: Mit Monte-Carlo-Simulationen bestimmte Schmelzprofile von Lipiden, die den Einfluss von Peptiden mit unterschiedlichen Wechselwirkungsparametern ω_{gp} bzw. ω_{fp} zeigen, und Momentaufnahmen aus den Monte-Carlo-Simulationen, die die Verteilung der Peptide in den gelförmigen und fluiden Domänen der simulierten Membranen zeigen. (rot: Peptid, blau: gel; dunkelblau: fluid). Aus (Ivanova et al., 2003).

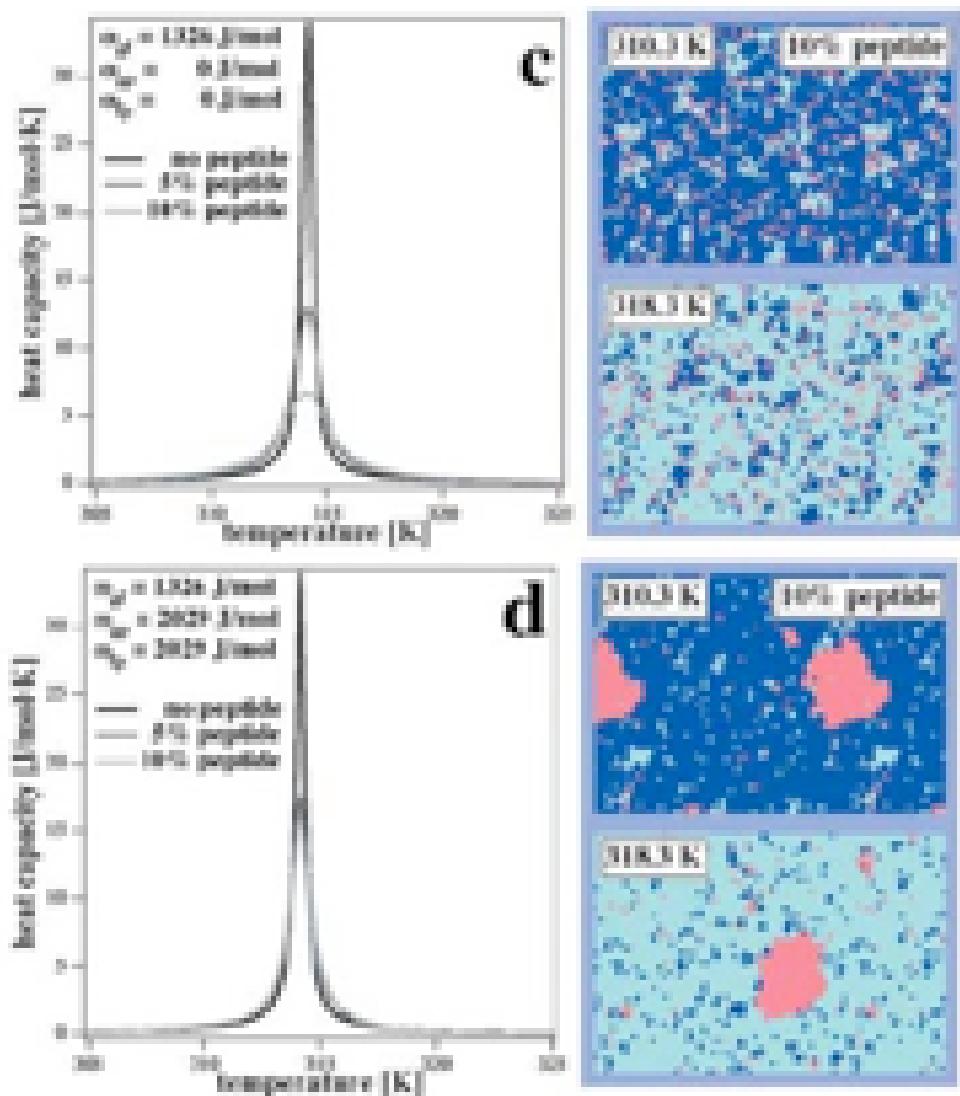


Abbildung 3.9: Mit Monte-Carlo-Simulationen bestimmte Schmelzprofile von Lipiden, die den Einfluss von Peptiden mit gleichen Wechselwirkungsparametern ω_{gp} und ω_{fp} zeigen, und Momentenaufnahmen aus den Monte-Carlo-Simulationen, die die Verteilung der Peptide in den fluiden bzw. gelförmigen Domänen der simulierten Membranen zeigen (rot: Peptid, blau: gel; dunkelblau: fluid). Aus (Ivanova et al., 2003).

Abbildung 3.8a. Das Wärmekapazitätsprofil verschiebt sich zu tieferen Temperaturen und verbreitert sich. Die Verbreiterung der Kurve ist ein Zeichen für geringere Kooperativität.

Beispiele für Wärmekapazitätskurven mit gleichen Wechselwirkungsparametern ω_{gp} und ω_{fp} zeigt Abbildung 3.9. Man beobachtet eine Verbreiterung, aber keine Verschiebung der Wärmekapazitätsprofile.

3.7 Farbstoffe in Membranen

Für diese Arbeit von Interesse ist der Einfluss von Farbstoffen auf das Schmelzprofil von Lipiden, besonders der Lipide DLPC und DPPC. Es wäre interessant zu verstehen, warum bestimmte Farbstoffe sich in den unterschiedlichen Phasen einer Lipidmischung unterschiedlich gut lösen. Dieser Effekt wird hier ausgenutzt, um die Phasentrennung in den Membranen von GUVs im konfokalen Mikroskop sichtbar zu machen.

Um kalorimetrische Messungen mit Farbstoffen in Membranen mittels Vergleich mit Monte-Carlo-Simulationen an Lipid/Peptid-Systemen interpretieren zu können, muss man vorraussetzen, dass die Farbstoffe sich wie Peptide verhalten, also keinen Schmelzvorgang zeigen. Es ist anzunehmen, dass die Wechselwirkungsparameter ω_{fp} und ω_{gp} einen von Null verschiedenen Wert haben. Diese Fälle wurden in Ivanova (2000); Ivanova und Heimburg (2001) untersucht und die Messergebnisse sollen mit den theoretischen Ergebnissen verglichen werden. Dazu sind Wärmekapazitätsprofile der Lipide DLPC bzw. DPPC mit den Farbstoffen Bodipy-C₁₆ (D3803) bzw. DiI-C₁₈ (D7757) gemessen worden. Die Farbstoffe wurden in den Anteilen 1% und 3% bzw. 5% beigemischt⁷. Man hält den Anteil der Farbstoffe gering, um das Phasenverhalten der Lipide nicht zu beeinflussen.

3.7.1 Anmerkungen zum Lipid DLPC

Dass DLPC ein von den anderen Lipiden der Gruppe der Phosphocoline abweichendes Schmelzverhalten zeigt, wurde bereits in Abschnitt 3.4 erwähnt. Dieses abweichende Schmelzverhalten erschwert die Interpretation von Messergebnissen an Lipid/Farbstoff-Systemen. Monte-Carlo-Simulationen an Systemen die das Lipid DLPC enthalten gibt es noch nicht, da die Wechselwirkungsparameter nur die Wechselwirkung unterschiedlicher Lipidzustände untereinander und mit einem Peptid beschreiben und keine weiteren, beispielsweise morphologische, Parameter in das Modell eingehen.

⁷ Die Prozentangaben beziehen sich auf den molaren Anteil der Farbstoffe.

Die Interpretation von kalorimetrischen Messergebnissen muss also mit äuflerster Vorsicht vorgenommen werden.

In vielen vorhergehenden Arbeiten wurde der Schmelzpunkt der Lipide einfach bestimmt, indem man die Lage des Maximums der spezifischen Wärme aus den Messdaten ablas. Für das Lipid DLPC muss man aber die Wärmekapazitätskurve integrieren, was die Enthalpiekurve ergibt. Der Mittelpunkt dieser Kurve, an dem 50% der Lipide geschmolzen sind, ergibt den Schmelzpunkt. Bei den Messungen an Lipiden mit mehr als zwölf Kohlenstoffen pro Kette ergeben beide Verfahren konsistente Ergebnisse, bei DLPC sind die Ergebnisse inkonsistent. Die Definition des Schmelzpunktes ist die, dass er der Punkt auf der Temperaturskala ist, an dem 50% der Lipide geschmolzen sind, so dass bei DLPC das zweite Verfahren das richtige Ergebniss liefert⁸ ($T_m=272,5\text{K}$; Schmelzpunkt bestimmt anhand der Wärmekapazitätskurve: ($T_m=269,35$)).

3.7.2 DLPC und Farbstoff Bodipy-C₁₆

Die Wärmekapazitätsprofile der kalorimetrischen Messung am System Lipid DLPC und Farbstoff Bodipy-C₁₆ zeigt die Abbildung 3.10, die daraus berechneten Enthalpien zeigt Abbildung 3.11.

Abweichend von den Angaben in der Literatur Koynova und Caffrey (1998); Hatta et al. (1994) (Schmelzpunkt bei 271,15K) entnimmt man dem Graphen der Enthalpie einen Schmelzpunkt des puren Lipids von 272,5K. Die Abweichung von den Literaturwerten ist zum Einen darauf zurückzuführen, dass man den Schmelzpunkt anhand des Peaks in der Wärmekapazitätskurve bestimmt hat, zum Anderen sind diese Messungen nicht, wie in dieser Arbeit, in purem Wasser durchgeführt worden⁹. Den Proben der anderen Arbeiten wurde noch Alkohol (z.B. Ethylenglycol) zugefügt, um ein Ausfrieren der Probe zu vermeiden. Unsere Messungen wurden in reinem Wasser durchgeführt - man hofft einfach, dass das Wasser sich unterkühlen lässt und nicht gefriert. Außerdem bestimmen wir den Schmelzpunkt als den Punkt, an dem die Schmelzenthalpie 50% der Gesamtumwandlungsenthalpie beträgt. Diesen Punkt deutet die waagerechte Linie in den Abbildungen an. Anhand der Verschiebung des Peaks in Abbildung 3.10 meint man einen Trend der Verschiebung zu tieferen Temperaturen hin zu sehen, der anhand der Enthalpie bestimmte Schmelzpunkt zeigt dieses Verhalten nicht. Beide Lipidproben

⁸ Anhand der Enthalpiekurve kann man ablesen, wieviele Lipide geschmolzen sind. Bei der Hälfte der Gesamtumwandlungsenthalpie sind 50% der Lipide geschmolzen. Dies ist die Definition des Schmelzpunkts.

⁹ Unsere Messungen ergaben einen Schmelzpunkt bei $T=269,35\text{K}$, wenn man den Schmelzpunkt anhand der Wärmekapazitätskurve bestimmt hat

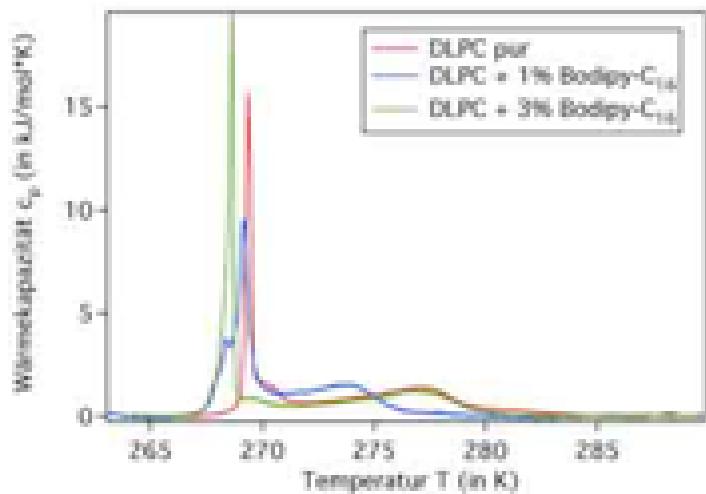


Abbildung 3.10: Wärmekapazitätskurve: Einfluss des Bodipy-C₁₆ Farbstoffs auf das Schmelzprofil von DLPC

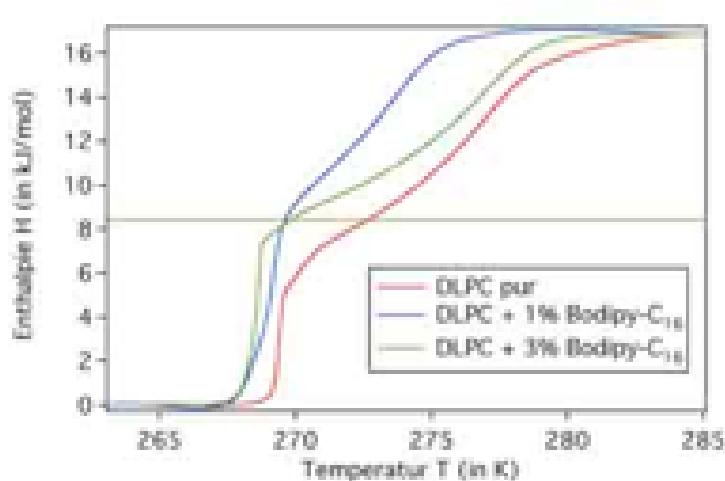


Abbildung 3.11: Enthalpie: Einfluss des Bodipy-C₁₆ Farbstoffes auf das Schmelzprofil von DLPC. Die waagerechte Linie zeigt den Punkt an dem 50% der Lipide geschmolzen sind

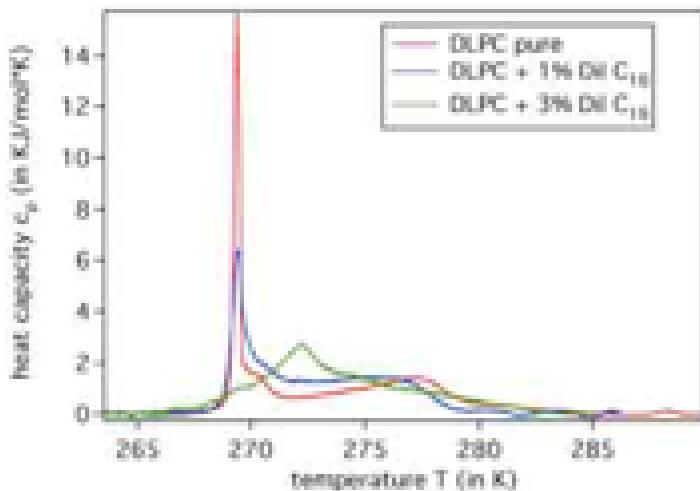


Abbildung 3.12: Wärmekapazitätskurve: Einfluss des DiI Farbstoffes auf das Schmelzprofil von DLPC

mit Farbstoff sind zwar in Bezug auf das pure Lipid zu tieferen Temperaturen verschoben, aber zeigen den gleichen Schmelzpunkt. Man würde einen Trend in der Form erwarten, dass der Schmelzpunkt für die Lipidprobe mit dem höheren Farbstoffanteil weiter zu tieferen Temperaturen verschoben ist als der Peak der Lipidprobe mit geringerem Farbstoffanteil.

3.7.3 DLPC und Farbstoff DiI-C₁₈

Anhand der Enthalpiekurven des Systems DLPC und Farbstoff DiI-C₁₈ (Abbildung 3.13) kann man keinen Trend der Verschiebung der Kurven ausmachen. Eine Aussage, in welcher Phase des Lipids DLPC der Farbstoff DiI-C₁₈ sich besser löst, lässt sich anhand kalorimetrischer Daten nicht machen. Die konfokalen Bilder zeigen aber, dass sich der Farbstoff in beiden Phasen löst, aber eine stärkere Tendenz zur Gelphase zeigt 4.1.

3.7.4 DPPC und Farbstoff Bodipy-C₁₆

Die Wärmekapazitätskurven des Systems DPPC und Farbstoff Bodipy-C₁₈ sind in Abbildung 3.14 aufgetragen. Auffällig ist, dass der erste kleine Peak der Vorumwandlung zur Ripple-Phase, bei den mit Farbstoffen versetzten Membranen verschwunden ist. Die Farbstoffe unterdrücken also die Ripple-Phase. zeigen. Anhand der Wärmekapazitätsprofile (Abbildung 3.14) und der

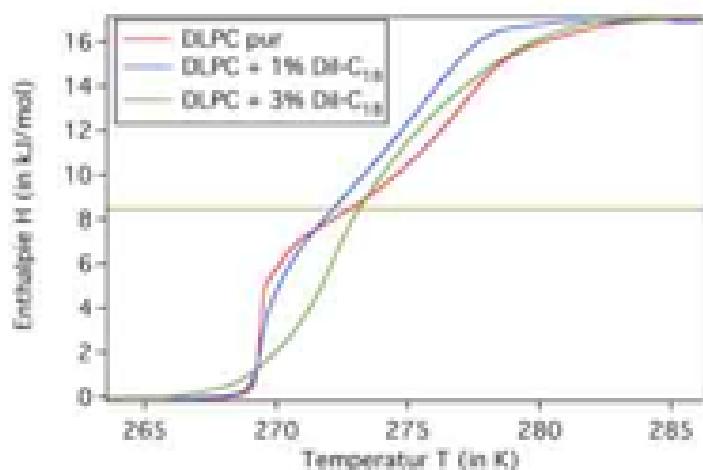


Abbildung 3.13: Enthalpie: Einfluss des DiI Farbstoffes auf das Schmelzprofil von DLPC. Die waagerechte Linie zeigt den Punkt an dem 50% der Lipide geschmolzen sind

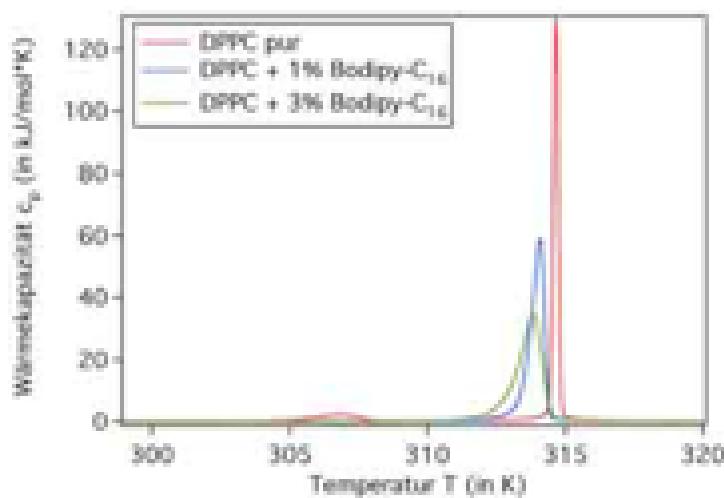


Abbildung 3.14: Wärmekapazitätskurve: Einfluss des Bodipy Farbstoffes auf das Schmelzprofil von DPPC

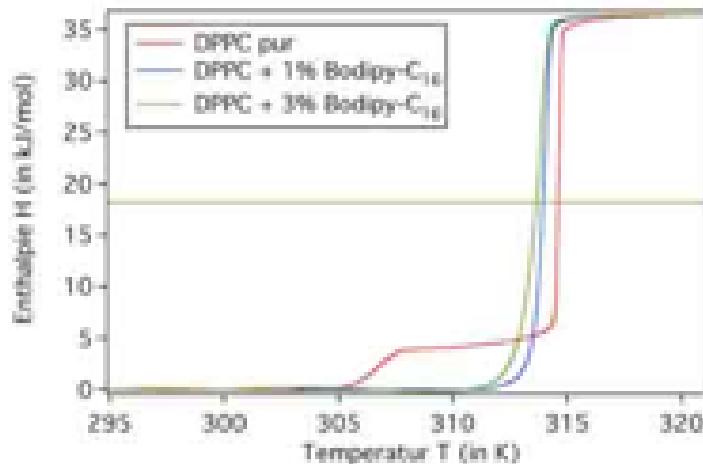


Abbildung 3.15: Enthalpie: Einfluss des DiI Farbstoffes auf das Schmelzprofil von DPPC

Enthalpiekurven (Abbildung 3.15) ist eine Verschiebung des Schmelzpunktes zu tiefen Temperaturen hin zu sehen, was nach der Theorie bedeutet, dass sich der Farbstoff besser in der fluiden Phase des Lipids löst, was auch mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie übereinstimmt. Mit diesem Farbstoff wird die fluide Phase markiert.

3.7.5 DPPC und Farbstoff DiI-C₁₈

Auch im System DPPC und Farbstoff DiI-C₁₈ unterbindet der Farbstoff die Ausbildung der Ripple Phase. Die Wärmekapazitätsprofile (Abbildung 3.16) und die Enthalpiekurven (Abbildung 3.17) zeigen eine Verschiebung des Schmelzpunktes zu tiefen Temperaturen hin. Dies ist sonderbar, da dieser Verschiebungseffekt nach der Theorie ein Zeichen dafür ist, dass der Farbstoff sich besser in der fluiden Phase löst, die konfokalen Bilder aber zeigen, dass sich dieser Farbstoff bei diesem Lipid besser in der Gelphase löst.

3.7.6 Binäre Lipidmischung und Farbstoff DiI-C₁₈

Anfangs wurde von uns vermutet, dass man anhand kalorimetrischer Messungen an Membranen einer Lipidsorte voraussagen kann, in welcher Phase einer binären Lipidmischung sich ein Farbstoff bevorzugt lösen wird. Die Ergebnisse der vorhergehenden Abschnitte zeigen aber, dass dies nicht unbedingt möglich ist. Für den Farbstoff Bodipy-C₁₆ ist dies korrekt, aber für den Farb-

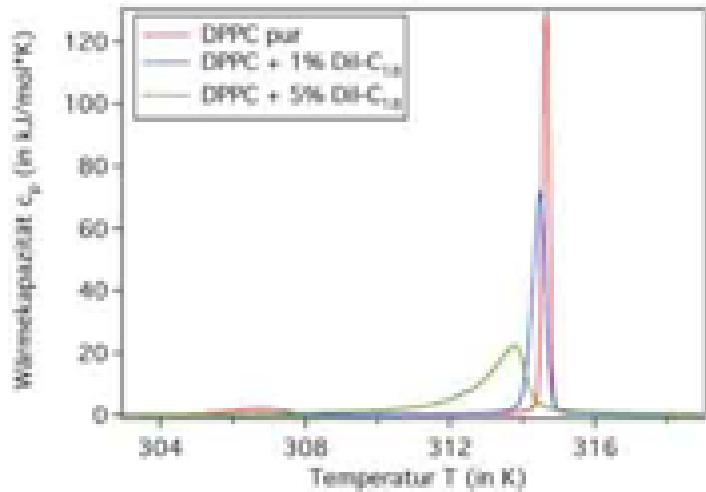


Abbildung 3.16: Wärmekapazitätskurve: Einfluss des DiI Farbstof-fes auf das Schmelzprofil von DPPC

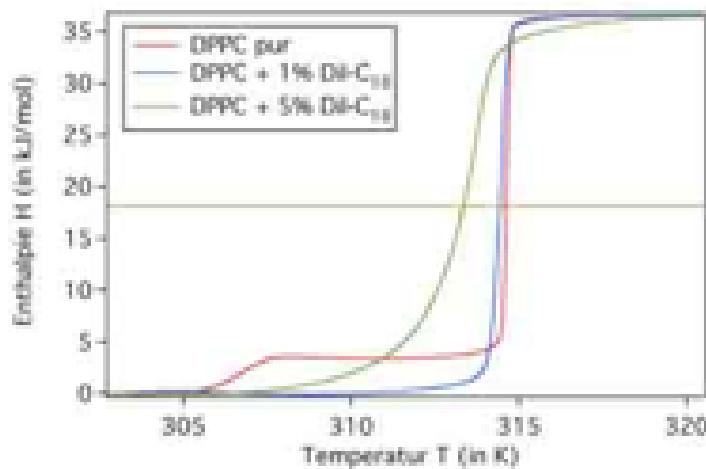


Abbildung 3.17: Enthalpie: Einfluss des DiI Farbstoffes auf das Schmelzprofil von DPPC

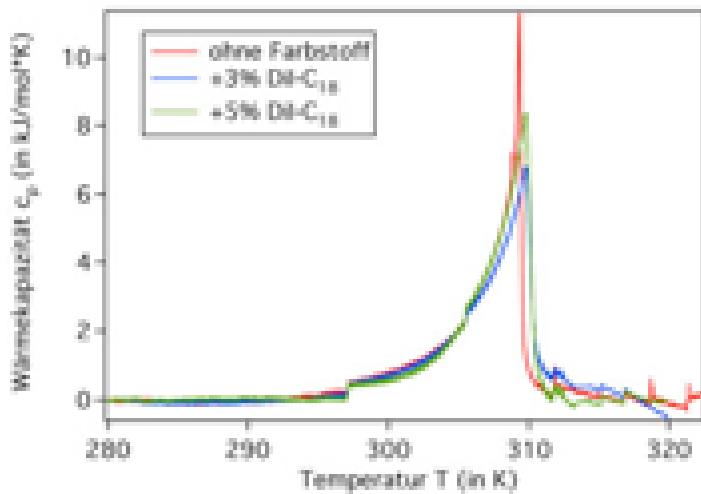


Abbildung 3.18: Wärmekapazitätskurve: Einfluss des DiI-C₁₈ Farbstoffes auf das Schmelzprofil einer DLPC/DPPC 23:77 Lipidmischung

stoff DiI-C₁₈ ist es nicht möglich. Um eine Aussage über das Verhalten dieses Farbstoffs in Membranen binärer Lipidmischungen machen zu können, muß man das Wärmekapazitätsprofil dieses Systems messen. Deswegen wurde für die Lipidmischung DLPC/DPPC 23:77 das Wärmekapazitätsprofil mit einer Zugabe dieses Farbstoffes gemessen, der genutzt wird um in den konfokalen Bildern die Gelphase zu markieren 4.1. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.18, die anhand der Daten berechnete Enthalpie zeigt Abbildung 3.19.

Anhand der Wärmekapazitätskurve und der Enthalpiekurve kann man sehen, dass das Schmelzprofil in den Fällen der Farbstoffzugabe zu höheren Temperaturen hin verschoben wird, so dass man davon ausgehen kann, dass der Farbstoff sich besser in der Gelphase löst. Leider lässt sich der Trend, dass die Schmelzkurve für einen höheren Betrag an Farbstoffzugabe weiter zu höheren Temperaturen hin verschoben wird, nicht erkennen. Die Veränderung zwischen einer Zugabe von 3% und 5% Farbstoff liegt unterhalb der Genauigkeit des für die Messungen genutzten Kalorimeters. Da die Messung in der Kapillare erfolgt ist, kann man keine Aussage machen, wieviel Lipid sich exakt in der Kapillare befand.

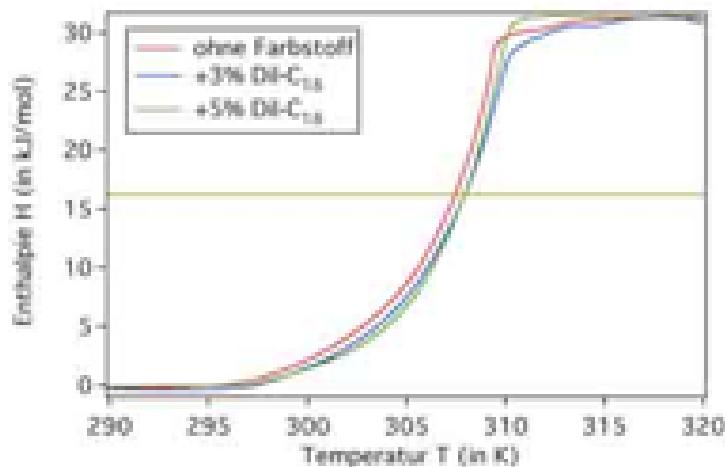


Abbildung 3.19: Enthalpie: Einfluss des DiI-C₁₈ Farbstoffes auf das Schmelzprofil einer DLPC/DPPC 23:77 Lipidmischung

Farbstoff	T_m DLPC (in K) (Wärmekapazität)	T_m DLPC (in K) (Enthalpie)
Lipid pur	269,4	272,5
1% Bodipy-C ₁₆	269,2 (-0,2)	269,6 (-2,9)
3% Bodipy-C ₁₆	268,7 (-0,7)	269,6 (-2,9)
1% DiI-C ₁₈	269,5 (+0,1)	272,0 (-0,5)
5% DiI-C ₁₈	272,2 (+2,8)	273,1 (+0,6)

Tabelle 3.1: Aus den Wärmekapazitätskurven bzw. Enthalpiekurven bestimmte Schmelzpunkte des Lipids DLPC mit Zugabe des Farbstoffs Bodipy-C₁₆ (D3803). Die Werte in Klammern geben die relative Verschiebung der Schmelzpunkte in Bezug auf das pure Lipid an.

Farbstoff	T_m DPPC (in K) (Wärmekapazität)	T_m DPPC (in K) (Enthalpie)
Lipid pur	314,7	314,6
1% Bodipy-C ₁₆	314,1 (-0,6)	314,0 (-0,6)
3% Bodipy-C ₁₆	313,8 (-0,9)	313,7 (-0,9)
1% DiI-C ₁₈	314,5 (-0,2)	314,4 (-0,2)
5% DiI-C ₁₈	313,8 (-0,9)	313,4 (-1,2)

Tabelle 3.2: Aus den Wärmekapazitätskurven bzw. Enthalpiekurven bestimmte Schmelzpunkte des Lipids DPPC mit Zugabe des Farbstoffs DiI-C₁₈ (D7757). Die Werte in Klammern geben die relative Verschiebung der Schmelzpunkte in Bezug auf das pure Lipid an.

3.8 Diskussion

Eine Zusammenfassung der Verschiebungen der Schmelzpunkte der Lipide unter Einfluß von Farbstoffen zeigen Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2.

Ziel der kalorimetrischen Messung der Wärmekapazitätsprofile der Lipide DLPC und DPPC war, herauszufinden, ob man anhand der Wärmekapazitätskurven herausfinden kann, in welcher Phase eines Mischsystems sich ein Farbstoff löst.

Für den Bodipy-C₁₆-Farbstoff reicht es aus, die einzelnen Lipide mit Farbstoff zu messen. Beide Lipidschmelzpunkte verschieben sich bei Zugabe dieses Farbstoffs zu tiefen Temperaturen hin. Dies ist ein Zeichen dafür, dass sich der Farbstoff besser in der fluiden Phase beider Lipide löst. Dies lässt darauf schließen, dass sich der Farbstoff auch besser in der fluiden Phase der Lipidmischung löst, wie die konfokalen Bilder bestätigen.

Für den DiI-C₁₈-Farbstoff ist diese Argumentation aber nicht möglich. Bei diesem Farbstoff zeigt die kalorimetrische Messung eine Verschiebung des Schmelzpunkts zu tiefen Temperaturen hin. Das hieße laut Theorie, dass sich der Farbstoff besser in der fluiden Phase löst. Dies stimmt aber nicht mit den konfokalen Bildern überein. Die kalorimetrische Messung am DLPC/DPPC-Mischsystem zeigt eine Verschiebung des Schmelzpunkts zu höheren Temperaturen hin, worauf man auf eine bessere Löslichkeit des Farbstoffs in der Gelphase schließen kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse zeigen, dass es nicht ausreicht, Wärmekapazitätsprofile der einzelnen Lipide einer Lipidmischung zu untersuchen, sondern dass man den Einfluß eines Farbstoffs auf die Lipidmischung untersuchen muss. Wenn man eine Aussage über das Verhalten eines Farbstoffs in einem System machen will, muss man das gesamte System

untersuchen, nicht einen Teil davon.

Wenn man dass Verhalten eines Farbstoffes auf ein Lipidsystem untersucht hat, ist es nicht möglich, anhand der Ergebnisse auf andere Systeme zu schließen. Es ist durchaus möglich, dass sich der Farbstoff in einem anderen System anders verhält (Luis Bagatolli, persönliche Kommunikation).

Zum Abschluss dieses Kapitels soll betont werden, dass das System DLPC/DPPC für diese Untersuchung eher ungeeignet ist, da das Lipid DLPC von den anderen Phosphocholinen abweichendes Schmelzverhalten zeigt, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Geeigneter ist sicherlich das System DMPC/DSPC, da diese beiden Lipide ein Wärmekapazitätsprofil mit nur einem, schmalen Peak aufweisen. Für diese Arbeit wurde aber das System DLPC/DPPC gewählt, da ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in der konfokalen Mikroskopie liegt. Da die konfokale Mikroskopie zum Anfang dieser Arbeit aber noch nicht vollständig in unserer Gruppe etabliert war, wurde der Einfachheit halber das System DLPC/DPPC gewählt, weil hier der Phasenkoexistenzbereich bei Raumtemperatur liegt, was die Messung erleichtert. Beim System DMPC/DSPC muss man mit Temperaturregelung arbeiten, da der Phasenkoexistenzbereich oberhalb von Raumtemperatur liegt. Die Temperaturmessung in der Zelle ist noch nicht sehr genau, was einen Vergleich der Ergebnisse erschwert hätte.

Kapitel 4

Mikroskopischer Teil

4.1 Der Khoros-Workspace

Giant Unilamellar Vesicles werden erst seit Kurzem mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Erste Ergebnisse präsentierte Korlach et al. (1999) und Bagatolli und Gratton (2000). In diesen Veröffentlichungen stand die Untersuchung der Form der Domänen, die sich im Phasenkoexistenzbereich ausbilden, im Vordergrund. In dieser Arbeit soll die Möglichkeit entwickelt werden, die konfokalen Bilder per Computer auszuwerten, um für jedes Vesikel den prozentualen Anteil von fluiden und Gelformen zu bestimmen.

Bevor mit dieser Diplomarbeit begonnen wurde, hatte man in der Gruppe, in der ich tätig wurde, bereits versucht, konfokale Mikroskopie an Vesikeln zu betreiben (Schlötzer, 2002). Dies war auch gelungen, hatte aber, bis erste Bilder entstanden, viel Zeit und Fleiß gekostet, und es waren dabei leider nur wenige auswertbare Bilder entstanden. Thomas Schröder hatte die Vesikel mittels Elektroformation an Platindrähten hergestellt, ich sollte es mit der Elektroformation an ITOs versuchen. Diese Methode war bis zu diesem Zeitpunkt in unserer Gruppe noch nicht angewandt worden und bis erste Resultate vorzuweisen waren, mussten einige Schwierigkeiten bewältigt werden, die in Anhang A erläutert werden.

Das Computerprogramm Khoros wurde für die Arbeit genutzt, um eine prozentuale Verteilung der auf den Bildern der konfokalen Mikroskopie sichtbaren roten und grünen Bereiche zu erhalten. Diese Bereiche wurden bisher oft als fluide und gelförmige Domänen bezeichnet, aber auf Grund der zu geringen Auflösung muss man mit dieser Bezeichnung vorsichtig sein. Innerhalb der Domänen könnten Mikrostrukturen vorliegen, die mit konfokaler Mikroskopie nicht aufgelöst werden können. Untersuchungen an anderen Li-

pidssystemen haben bereits solche Mikrodomänen gezeigt (Gliss et al., 1998), und ein Auftreten in der für diese Arbeit verwendeten DLPC/DPPC Lipidmischung ist wahrscheinlich.

Es soll im Folgenden überprüft werden, ob hohe Fluktuationen in der Domänenverteilung vieler Vesikel mit einer hohen Wärmekapazität der Probe bei einer gewählten Temperatur in Beziehung stehen.

Um die mit den konfokalen Mikroskopen aufgenommenen Bilder im Computer weiter verarbeiten zu können, müssen erst die unterschiedlichen Farbwerte, die in den grünen und roten Bereichen auftreten, auf je einen Farbwert für grün und einen Farbwert für rot gesetzt werden. Dazu bekam ich von Rainer Heintzmann vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen eine Einführung in das Programm Khoros (Khoros Inc, Albuquerque/NM, USA) und erstellte mit ihm zusammen eine Routine, die die gesuchte Funktion ermöglicht. Diese Routine, die im Programm "Workspace" genannt wird, stelle ich im Folgenden vor (Abbildung 4.1), die einzelnen Unterfunktionen (Im Workspace durch die kleinen Kisten dargestellt) werden Glyphs genannt (Die kleinen eingesetzten Bilder, auf die die roten Pfeile deuten, zeigen das jeweilige graphische Ergebnis des entsprechenden Glyphs):

- ImpTiffSer: Mit dieser Funktion können Serien von Bildern, deren Einzelbilder als Datei im Tiff-Format gespeichert sind, eingelesen werden, also auch die Rohserien der konfokalen Mikroskopie. Ich bin jedoch dazu übergegangen, fertige Projektionen der Bilderserien einzulesen, da eine ganze Serie sehr viel mehr Speicherplatz benötigt als eine Projektion.
- OrthoProj: Es wird eine Serie von Bildern in z-Richtung auf eine Ebene projiziert, um ein zweidimensionales Bild zu erhalten. Diese Funktion musste ich auch einsetzen, wenn ich mit ImpTiffSer nur ein projiziertes Bild eingelesen habe, da sonst ein Fehler im Programm auftrat, weil die Funktion ImpTiffSer eigentlich nicht dafür gedacht ist, nur ein einzelnes Bild einzulesen.
- Rescale: Bei dieser Funktion werden mehrere Pixel zu einem Pixel zusammengelegt. Der resultierende Farbwert stammt aus einer Mittelung.
- Extract: Die beiden Extract-Glyphs stehen an dieser Stelle, um den roten und den grünen Farbkanal voneinander zu trennen.
- Multiply: Mit den beiden Multiply-Glyphs kann man die Intensitäten des roten oder des grünen Kanals anheben. Diese Funktion benötigt man zur Feineinstellung, damit man im Endergebnis auch wirklich 100-prozentige Trennung von roten und grünen Bereichen erhält.

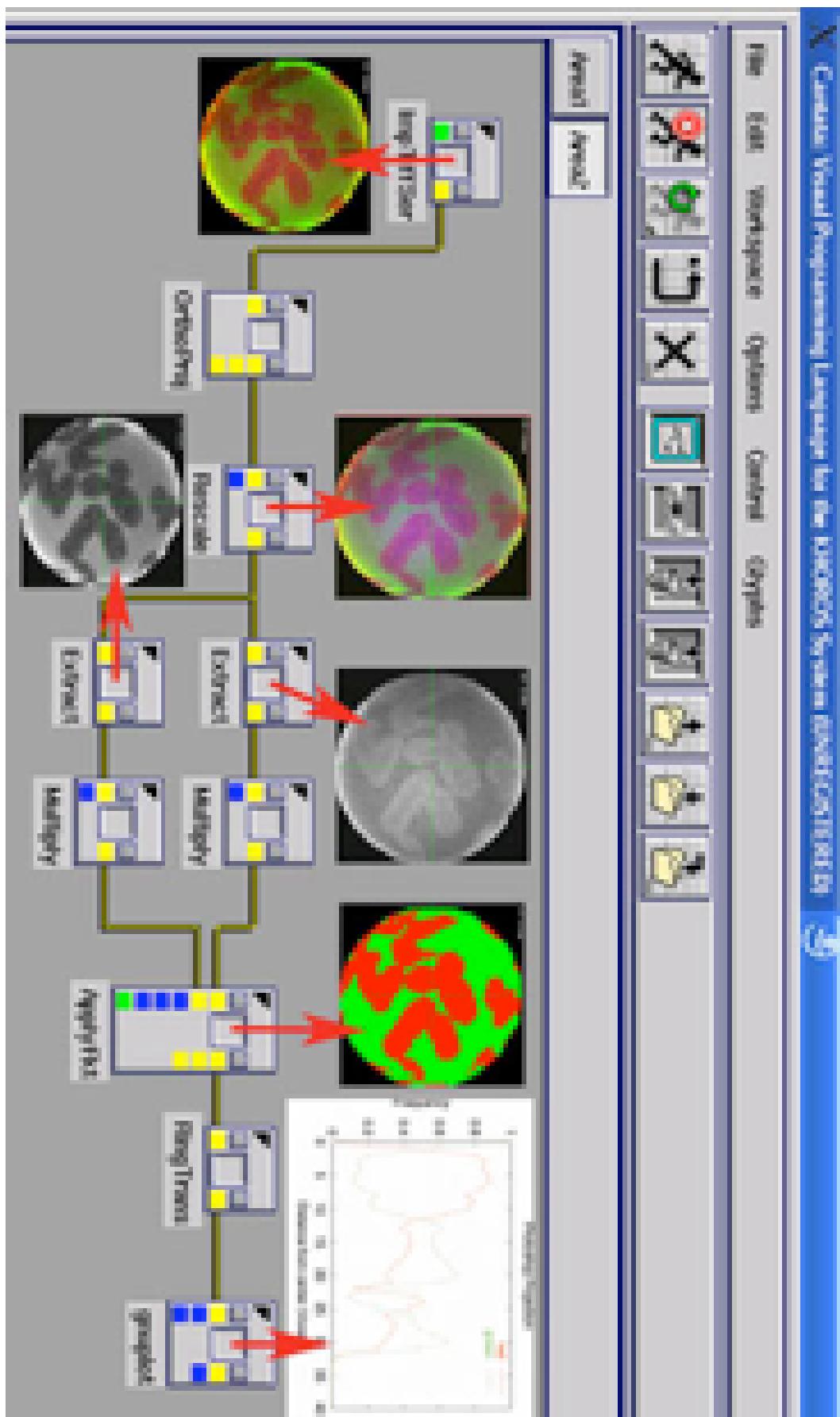


Abbildung 4.1: Screenshot des Khoros Workspace.

- ApplyFkt: Mit diesem Glyph werden roter und grüner Farbkanal wieder zusammengeführt und die Pixel im zusammengesetzten Bild anhand des folgenden Kriteriums gesetzt: Das Programm vergleicht die eingehenden Pixelwerte mit einem Schwellwert. Liegen sie unter diesem Schwellwert, so wird das Ergebnispixel auf Schwarz gesetzt, überschreiten sie den Schwellwert, so wird noch verglichen, ob die rote oder die grüne Intensität höher ist. Die Farbe des eingehenden Pixels mit der höheren Intensität wird gewählt (rot oder grün), aber allen Nuancen einer Farbe ein fester Wert, rot oder grün, zugeordnet. Das Ergebnis ist ein Bild, das nur noch aus zwei Farbwerten besteht. Dieses Bild nenne ich in Anlehnung an eine Funktion bei Adobe-Photoshop™ “posterized”.
- RingTrans: Die Funktion RingTrans teilt das Bild in konzentrische Kreisringe und zählt für jeden Kreisring die Anzahl roter und grüner Pixel.
- gnuplot: Dieses Glyph gibt das Ergebnis der Zählung des RingTrans-Glyph in einer Ascii-Tabelle und einer Eps-Grafik aus.

Im Khoros-Workspace werden drei Schwellwerte gesetzt, um ein posterized-Bild zu erhalten. Einer ist der Wert in der ApplyFkt-Glyph, der entscheidet, ob ein Pixel auf schwarz oder rot bzw. grün gesetzt wird. Dieser Schwellwert ist aber nicht entscheidend für die spätere Auswertung. Von Interesse sind die Schwellwerte in der Rescale- und Multiply-Glyph. Es muss festgestellt werden, wie stark die Auswertung anhand dieser Werte beeinflusst wird. Auf diesen Punkt komme ich in Kapitel 4.2 zurück.

4.2 Berechnung der Phasenverteilung mit “Igor”

Möchte man die mit dem Khoros-Workspace erstellten posterized-Bilder auswerten, so muss man die zweidimensionalen Projektionen wieder auf eine Kugel zurückrechnen. Dazu wird die in der RingTrans-Funktion (siehe Kapitel 4.1) erstellte Ascii-Tabelle mit dem Programm Igor (WaveMetrics, Lake Oswego/OR, USA) eingelesen und mit einer von mir geschriebenen Routine die prozentuale Verteilung gelförmiger und fluider Domänen berechnet.

Anhand der Radien der Ringe, die ein Kreissegment der Projektion umschließen, r_i und r_a , und der Höhe h der Sphäre, auf die projiziert werden

soll¹, wird die Oberfläche A_i der zugehörigen Kugelschicht auf der Halbsphäre bestimmt (Abbildung 4.2).

$$\begin{aligned} h_i &= \sqrt{R^2 - r_i^2} \\ h_a &= \sqrt{R^2 - r_a^2} \\ A_i &= 2\pi R (h_i - h_a) \end{aligned}$$

Nummeriert man die Radien von innen nach aussen in aufsteigender Reihenfolge, so gilt $r_a = r_{i+1}$ und $h_a = h_{i+1}$. Die Gesamtoberfläche A_S der Halbsphäre erhält man indem man über alle Oberflächen A_i aufsummiert.

$$A_S = \sum_i A_i = \sum_i 2\pi R (h_i - h_{i+1})$$

Um die prozentuale Verteilung von Fluid- und Geldomänen zu berechnen, wird die Oberfläche A_i jeder Kugelschicht mit dem prozentualen Anteil für die Domäne multipliziert, der für das zugehörige Kreissegment anhand der Khoros-Projektion bestimmt worden ist. Dies ergibt den prozentualen Anteil fluider bzw. gelförmiger Phase an der Oberfläche der Kugelschicht, A_i^{fluid} bzw. A_i^{gel} . Den Gesamtanteil jeder Phase erhält man, indem man die einzelnen Anteile A_i^{fluid} bzw. A_i^{gel} aufsummier und den Quotienten mit der Oberfläche A_S der Halbsphäre bildet.

4.3 Berechnete Verteilungen

Anhand zweier Versuchstage, die eine ordentliche Anzahl von auswertbaren Vesikelbildern einbrachten, soll geprüft werden, ob die Ergebnisse aus den Berechnungen der Anteile aus den konfokalen Bildern denen aus der Theorie der realen Lösung ähnlich sind.

Tabelle 4.1 zeigt die Auswertung einer Reihe konfokaler Bilder an einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung, Tabelle 4.2 die Ergebnisse der Auswertung konfokaler Bilder einer DLPC/DPPC 23:77 Lipidmischung.

Vergleicht man die Durchschnittswerte der Domänenverteilung für DLPC/DPPC 33:67 und für DLPC/DPPC 23/77, so stimmen die Werte mit der Erwartung, dass man für einen höheren Anteil von DPPC einen höheren

¹ Die Höhe h ist gleich dem äusseren Radius R , der dadurch festgelegt ist, dass er die äußere Begrenzung des äussersten Kreissegments darstellt, das noch keine schwarzen Pixel enthält

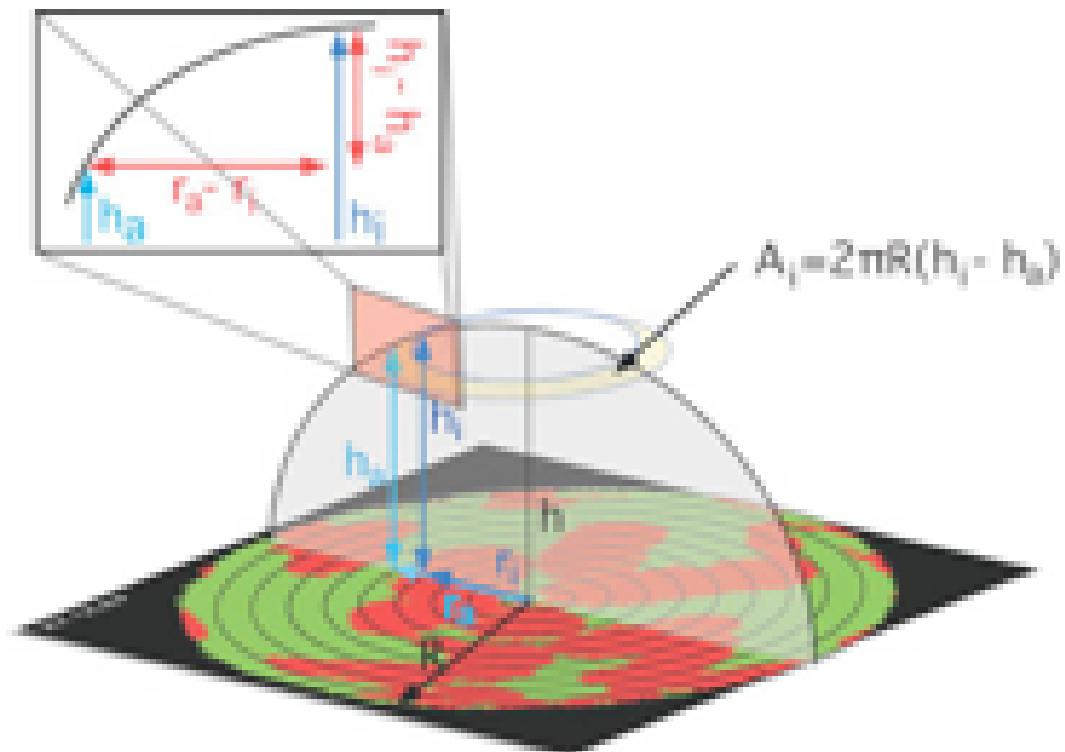


Abbildung 4.2: Die projizierten konfokalen Bilder müssen auf eine Halbsphäre zurückgerechnet werden, um die Verteilung von fluiden und gelförmigen Domänen zu berechnen. Man berechnet für die Oberflächen der Kugelschichten (gelb) den Anteil an roten und grünen Bereichen und summiert diese auf.

Vesikel Nr.	Gelanteil (in %)	Fluidanteil (in %)
1	52,4	47,6
2	49,7	50,3
3	38,1	61,9
4	27,6	72,4
5	43,2	56,8
6	41,9	58,1
Durchschnitt	42,52 ($\pm 8,1$)	57,8 ($\pm 8,1$)

Tabelle 4.1: Mit Igor berechnete Verteilung fluider und gelförmiger Domänen anhand mit Khoros ausgewerteter konfokaler Bilder einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung² an (Temperatur bei der Messung 300K).

Vesikel Nr.	Gelanteil (in %)	Fluidanteil (in %)
1	56,2	43,8
2	61,0	39,0
3	63,5	36,5
4	62,8	37,2
5	58,7	41,3
6	75,0	25,0
7	65,4	34,6
Durchschnitt	63,2 ($\pm 5,6$)	36,8 ($\pm 5,6$)

Tabelle 4.2: Mit Igor berechnete Verteilung fluider und gelförmiger Domänen anhand mit Khoros ausgewerteter konfokaler Bilder einer DLPC/DPPC 23:77 Lipidmischung. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung² an (Temperatur bei der Messung 300K).

	DLPC/DPPC 33:67	Hebelgesetz
Gelanteil (in %)	42,2 ($\pm 8,1$)	56,0
Fluidanteil (in %)	57,8 ($\pm 8,1$)	44,0
	DLPC/DPPC 23:77	Hebelgesetz
Gelanteil (in %)	63,2 ($\pm 5,6$)	72,0
Fluidanteil (in %)	36,8 ($\pm 5,6$)	28,0

Tabelle 4.3: Vergleich der Durchschnittswerte für die Verteilung flüssiger und gelförmiger Domänen nach Tabelle 4.1 und 4.2 (Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung² an) mit den theoretisch bestimmten Werten nach dem Hebelgesetz (Gleichung 3.26).

Anteil an gelförmigen Bereichen erhält, überein. Die Standardabweichung² ist für die Mischung DLPC/DPPC 33:67 höher als für DLPC/DPPC 23:77 (siehe Abbildung 4.3). Bei einer Temperatur von $T \approx 300$ K, bei der auch die Vesikelbilder gemacht wurden, ist die Wärmekapazität der Lipidmischungen DLPC/DPPC 33:67 höher als die der Mischung DLPC/DPPC 23:77. Es ist also gut möglich, dass sich die Beziehung zwischen Fluktuationen in der Enthalpie und der Wärmekapazität auf dieses Ergebnis übertragen lässt: Möglicherweise gibt es eine Beziehung zwischen der Stärke der Fluktuationen in der Domänenverteilung und der Wärmekapazität. Um dies zu bestätigen sind aber noch Messungen an einer größeren Anzahl von Vesikeln und an weiteren Lipid-Mischungsverhältnissen nötig.

Die experimentell bestimmten Durchschnittswerte weichen in beiden Fällen, also bei DLPC/DPPC 33:67 und bei DLPC/DPPC 23:77, weit von den anhand des Hebelgesetzes der Theorie der idealen Mischung (Kapitel 3.2) berechneten Werten ab. In Tabelle 4.3 werden die Durchschnittswerte der Tabellen 4.1 und 4.2 mit den theoretisch berechneten Werten aus der Theorie der idealen Mischung verglichen. Beide Werte liegen unterhalb des theoretischen Wertes und es ist zu vermuten, dass sich dieser Trend auch in Messungen an anderen Mischungsverhältnissen zeigen wird. Um das zu zeigen, wären jedoch weitere Experimente nötig.

² Die Standardabweichung σ (mittlere quadratische Abweichung) ist definiert als $\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$. N ist die Anzahl der gemessenen Werte, \bar{x} ihr Mittelwert.

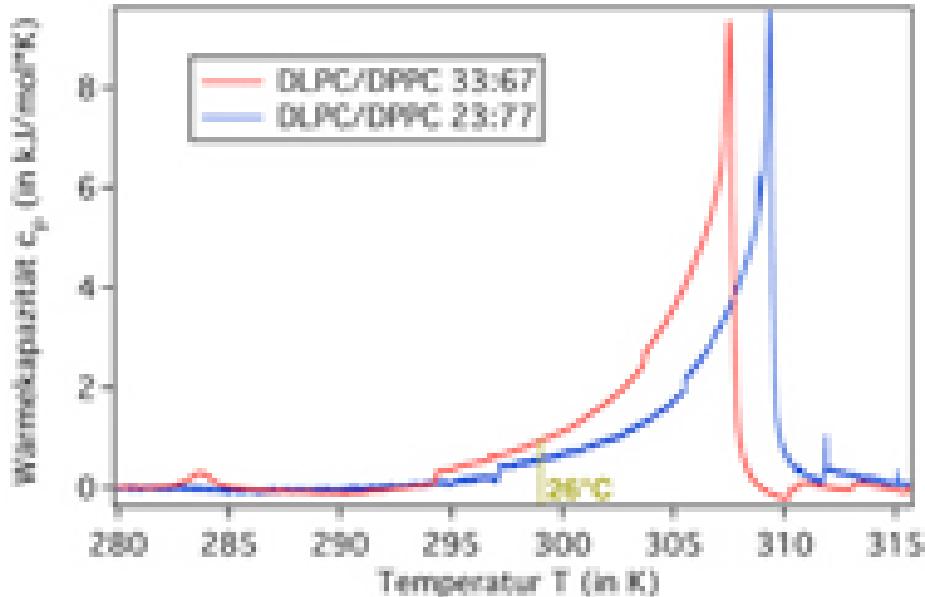


Abbildung 4.3: Wärmekapazitätskurven für DLPC/DPPC 33:76- bzw. DLPC/DPPC 23:77- Lipidmischungen. Bei 300 K ist die Wärmekapazität für DLPC/DPPC 33:76 höher, wie auch die Standardabweichung der berechneten Domänenverteilung (Tabelle 4.1 und 4.2).

4.4 AFM-Messungen

Da konfokale Mikroskope nur ein Auflösungsvermögen von ca. $0.5\mu\text{m}$ haben, wurden noch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen gemacht, da hier die Auflösung mit ca. 1nm wesentlich größer ist. Andere Arbeiten berichten von Mikrostrukturen in Membranen ähnlicher Lipidmischungen (Gliss et al., 1998) mit einer Größe im Nanometerbereich, die konfokalen Mikroskopen verborgen bleiben. Es war anzunehmen, dass diese Mikrodomänen auch in den für diese Arbeit untersuchten Vesikelmembranen auftreten.

Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen AFM-Bilder an einer auf Glitter hergestellten DLPC-DPPC 33:67 Lipidmembran bei einer Temperatur von 295 K. Anhand der Farbskala kann man dem Bild Höheninformationen entnehmen. Man erkennt vier Bereiche, die für die Interpretation des Bildes wichtig sind. In Abbildung 4.4 ist angegeben, wie die einzelnen Bereiche zugeordnet werden. Der ganz dunkle Bereich ist Glitter, der nicht von Lipidmembran überzogen ist. Der fluiden Phase wurden zwei Bereiche zugeordnet, Fluide Phase I und

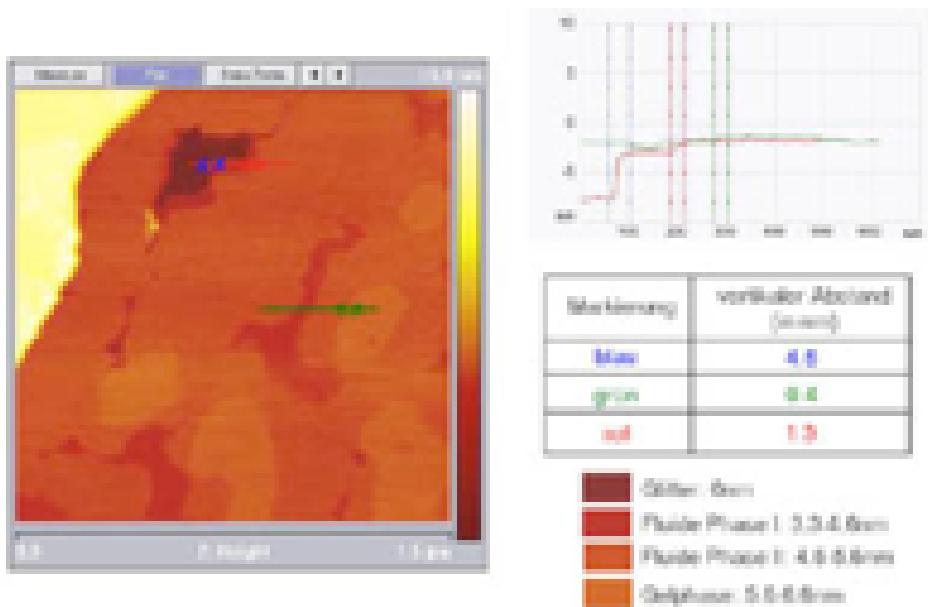


Abbildung 4.4: Rasterkrafmikroskopische Aufnahme der Oberfläche einer auf Glitter gezüchteten Membran einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei $T=295\text{ K}$. Neben dem Glitter (dunkler Bereich) sind noch drei Phasen erkennbar: Fluide Phase I, Fluide Phase II und Gelphase. Innerhalb der Fluiden Bereiche sieht man viele Gel-Mikrodomänen, die 100-400nm groß sind.

Fluide Phase II, da man an der Aufnahme der Phase im Tapping-Mode sehen kann, dass diese Bereiche eine ähnliche Steifigkeit besitzen (Abbildung 4.6). Der vertikale Abstand zwischen den Oberflächen der Fluiden Phase I und II beträgt 0.6-0.8nm und der vertikale Abstand zwischen der Oberfläche der Fluiden Phase II und der Gelphase beträgt 0.4-0.7nm. Die Geldomänen haben einen Durchmesser von ungefähr 200nm.

Die Beobachtung zweier unterschiedlicher fluiden Bereiche ist bisher noch nicht berichtet worden, aber in Schnappschüssen von Monte-Carlo-Simulationen einer DMPC/DSPC 50:50 Lipidmischung (Seeger 2003, unveröffentlicht) ist ebenfalls eine weitere Stufe zwischen fluider Phase und Gelphase erkennbar (Abbildung 4.7).

Diese Phase könnte möglicherweise aus einem großen Anteil gelförmiger DLPC- und fluider DPPC-Moleküle gebildet werden.

Man muß bei der Auswertung der AFM-Bilder und beim Vergleich mit den konfokalen Bildern beachten, dass die Lipidschichten für die AFM-Messungen

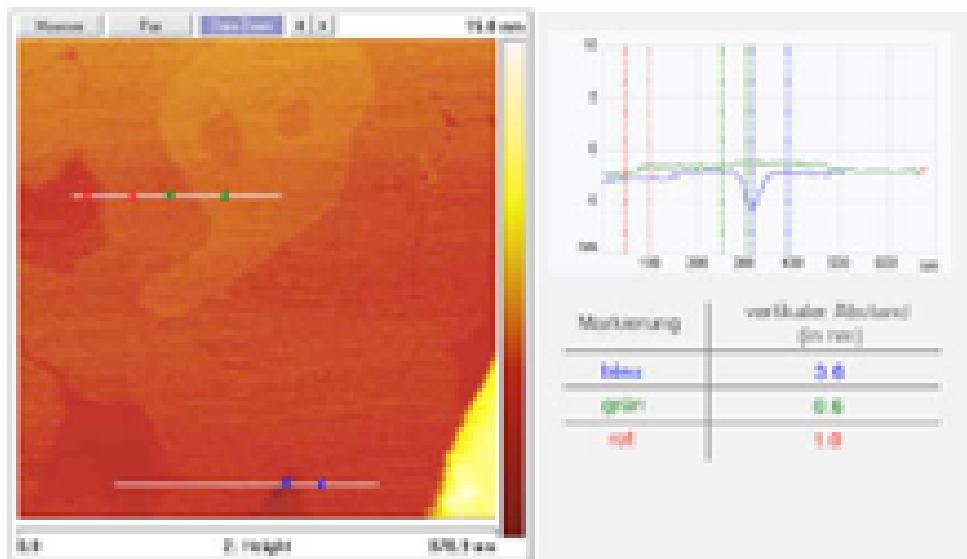


Abbildung 4.5: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Oberfläche einer auf Glitter gezüchteten Membran einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei $T=295\text{ K}$. Neben dem Glitter (kleiner dunkler Bereich) sind noch drei Phasen erkennbar: Fluide Phase I, Fluide Phase II und Gelphase. Innerhalb des fluiden Bereichs sieht man eine Gel-Mikrodomäne mit einem Durchmesser von ca. 450 nm . Innerhalb dieser Gedomäne befinden sich wiederum fluide Mikrodomänen mit ca. 80 nm Durchmesser.

auf Glitter hergestellt wurden und ein Einfluß des Glitters auf das Phasenverhalten wahrscheinlich ist. Kalorimetrische Messungen von Lipidschichten auf Glitter zeigen eine Veränderung des Schmelzprofils (Yang und Appleyard, 2000).

4.5 Diskussion

Im Folgenden möchte ich auf die Genauigkeit der Auswertung der konfokalen Bilder eingehen.

Die Genauigkeit der von mir angegebenen Werte für die Verteilung gelförmiger und fluider Bereiche wird schon durch die Auflösung des konfokalen Mikroskops beschränkt, die ungefähr im Bereich von $0.5\mu\text{m}$ liegt. Mit Rasterkraftmikroskopie wurden Domänen einer Größe bis zu 10 nm entdeckt (Abschnitt 4.4), die unterhalb der Auflösung des konfokalen Mikroskops liegen.

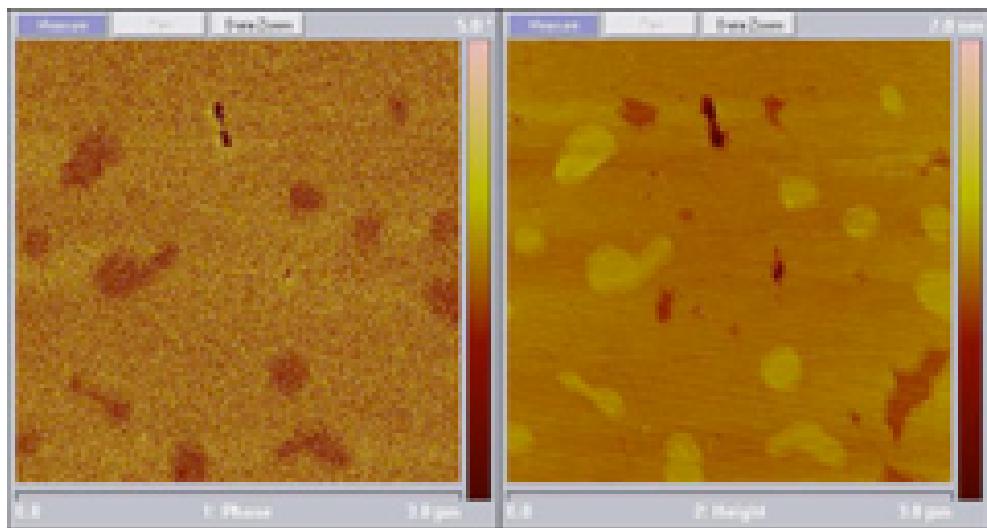


Abbildung 4.6: Rasterkrafmikroskopische Aufnahme der Oberfläche einer auf Glitter gezüchteten Membran einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei $T=295\text{ K}$ im Tapping-Mode. Neben dem Glitter (dunkler Bereich) sind noch drei Phasen erkennbar: Fluide Phase I, Fluide Phase II und Gelphase (rechts), die Phasenverschiebung zwischen Fluider Phase I und Fluider Phase II ist gleich groß, die Phasenverschiebung der Gelphase ist geringer als die der fluiden Phasen (links).

Das Auftreten von Domänen dieser Größe wurde später auch theoretisch beschrieben (Michonova-Alexova und Sugár, 2002). Man muß also betonen, dass mit der von mir angewandten Auswertungsmethode nicht die Verteilung fluider und gelförmiger Domänen bestimmt wird, und es sich nicht um makroskopische Phasenkoexistenzbereiche handelt, sondern nur eine Einteilung in Bereiche “grün”, in denen die fluide Phase zu einem größeren Teil vertreten ist, und “rot”, in denen die Gelphase überwiegend vertreten ist, vorgenommen wird. Diese Tatsache muss man an dieser Stelle unterstreichen, da zusätzlich die Auswertung mit Khoros so durchgeführt wird, dass nur noch große Phasengebiete übrigbleiben, wobei Information über mögliche Mikrobereiche innerhalb der Makrodomänen verloren geht. Denn ob es sich bei den in den Originalbildern sichtbaren grünen bzw. roten Pixeln innerhalb gelförmiger bzw. fluider Bereiche um Mikrodomänen, oder aber nur um Farbstoffmoleküle, die eigentlich die andere Phase markieren sollten, handelt, kann man anhand der konfokalen Bilder nicht entscheiden. Dass man aber durchaus auch ein Fluoreszenzsignal des Bodipy-Farbstoffes, der im idealen

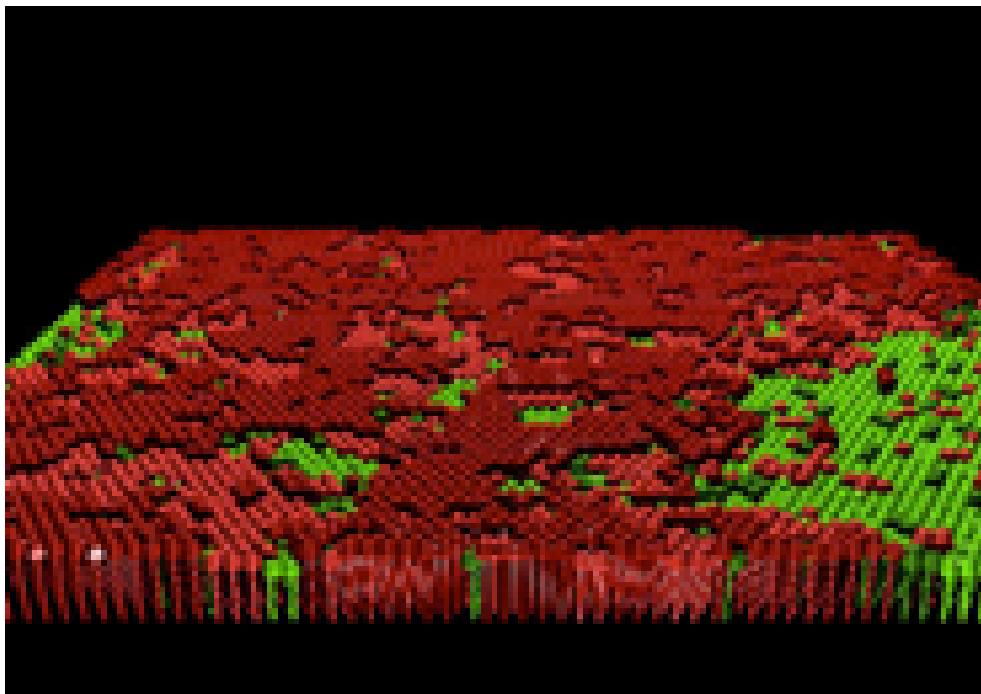


Abbildung 4.7: Schnappschuss aus einer Monte-Carlo-Simulation einer DMPC/DSPC 30:70 Lipidmischung. Simuliert wurde eine 80×80 Lipidmatrix bei einer Temperatur von $T=303.6\text{ K}$. Man kann zwei Stufen auf der fluiden Phase (Hellgrün) erkennen: Die erste Stufe wird von gelförmigen DLPC und fluiden DPPC Molekülen gebildet (Diese wird in dieser Arbeit als Fluide Phase II bezeichnet), die zweite Stufe wird von gelförmigen DPPC-Molekülen gebildet (Dunkelrot: DSPC gel; Hellrot: DMPC gel; Dunkelgrün: DSPC fluid; Hellgrün DMPC fluid).

Fall die fluide Phase markieren soll, aus der Gelphase und ein Fluoreszenzsignal des DiI-Farbstoffes, der die Gelphase markieren soll, aus der fluiden Phase bekommt, sieht man sehr gut an den Bildern der Extract-Funktion des Khoros-Workspace (Abbildung 4.1).

Aktuelle, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Existenz von Mikrodomänen innerhalb der makroskopischen Bereiche. Die Farbstoffe innerhalb dieser Mikrodomänen, deren Größe zu einem großen Teil unterhalb des Auflösungsvermögens konfokaler Mikroskope liegt, werden für das schwache rote bzw. grüne Fluoreszenzsignal in den grünen bzw. roten Bereichen verantwortlich sein. Beeinflusst

Original		Posterized		Weniger Rescale		Mehr Rot		Beides	
fluid	gel	fluid	gel	fluid	gel	fluid	gel	fluid	gel
44,2%	55,8 %	55,7%	44,3%	54,8%	45,2%	53,0%	47,0%	51,2%	48,7%

Tabelle 4.4: Berechnete Werte für die Verteilung grüner und roter Bereiche anhand der Bilder aus Abbildung 4.8.

werden die Werte für die Verteilung von grünen und roten Bereichen auch durch die Wahl der Schwellwerte, wie in Kapitel 4.1 bereits angedeutet. Um zu prüfen, wie groß die Abweichungen durch die Einstellung der Parameter werden, wurden für ein ausgewähltes Bild die Schwellwerte um den kleinsten Schritt geändert, der bei der Auswertung gesetzt wurde, um ein ideales posterized-Bild zu erhalten, was vom jeweiligen Experimentator abhängig ist. Das graphische Ergebnis zeigt Abbildung 4.8, die anhand dieser Bilder berechneten Werte enthält Tabelle 4.4. Die größte Abweichung beträgt 4,5%, was im Rahmen dieser Arbeit akzeptabel ist, jedoch zeigt, dass die Auswertung stark subjektiv ist.

Da mit der graphischen Khoros-Auswertung nicht die Verteilung fluider und gelförmiger Domänen berechnet wurde, ist es auch verständlich, dass eine Diskrepanz zwischen den so erhaltenen und den nach der realen Mischungstheorie bestimmten Werten gibt (Tabelle 4.3). Ein Vergleich dieser Werte ist auf Grund der gerade diskutierten Tatsachen nicht möglich.

Interessant ist aber, dass die Werte der prozentualen Verteilung grüner und roter Bereiche, bestimmt am Originalbild³, den nach dem Hebelgesetz bestimmten Werten näher ist, als die Werte aus auf rote und grüne Bereiche gesetzten Bildern. Die anhand des Originalbilds bestimmten Werte sind aber ebenfalls mit einem Fehler behaftet, da man sich an der Grenze der Auflösung befindet. Es wäre interessant, die Auswertung anhand der Originalbilder weiterzuführen und mit den theoretischen Werten zu vergleichen, wenn man es schafft, die Auflösung der konfokalen Mikroskope noch zu verbessern.

³ Das Originalbild wurde ebenfalls mit Khoros eingelesen und mit dem RingTrans-Glyph ausgewertet, aber das Rescale und das Multiply Glyph wurden nicht genutzt (vgl. Abbildung 4.1), so dass das eigentliche projizierte Bild ausgewertet wurde.

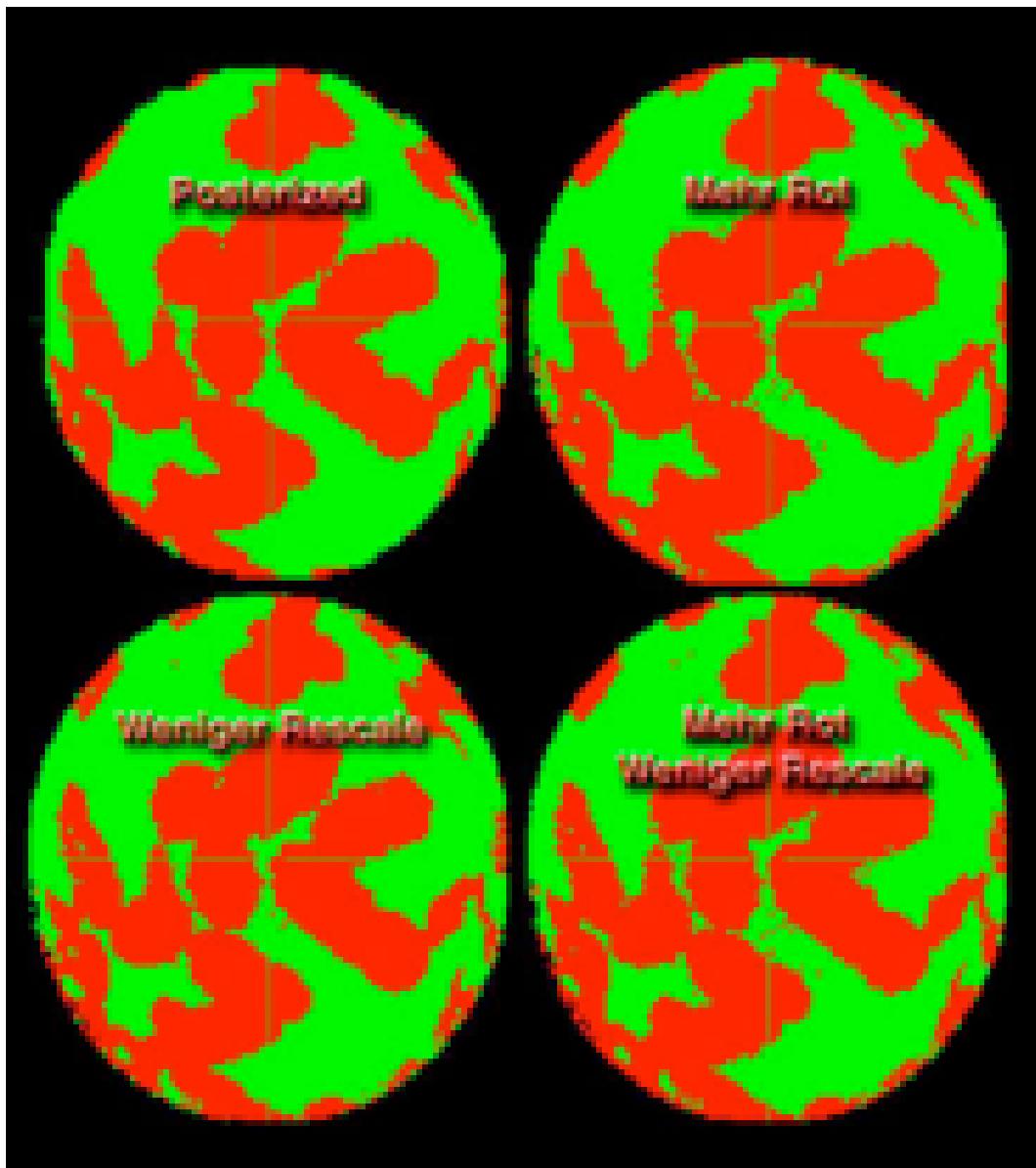


Abbildung 4.8: Vergleich von posterized-Bildern unterschiedlicher Schwellwerte im Khoros-Workspace. Die daraus berechneten Verteilungen grüner und roter Bereiche sind in Tabelle 4.4 angegeben. Das Original zeigt Abbildung A.3 rechts.

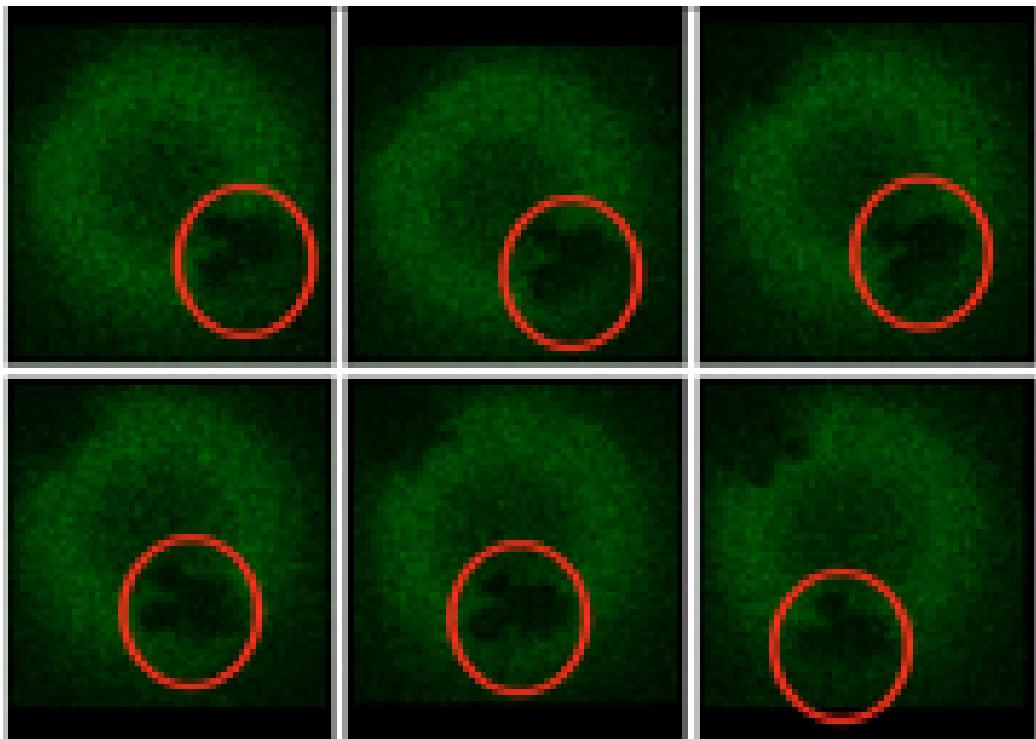


Abbildung 4.9: Direkt aufeinanderfolgende Schnappschüsse einer sich bewegenden Gedomäne. Aufgenommen im grünen Kanal an einer DLPC/DPPC 54:46 Lipidmischung. Messtemperatur unbekannt.

4.6 Weitere Beobachtungen

Mobile Domänen

Die meisten Messungen wurden an Phospholipid-Vesikeln mit einem DPPC-Anteil von mehr als 60% durchgeführt. Der Grund dafür ist, dass sich bei Messungen an Lipidmischungen mit einem DPPC-Anteil von weniger als 60% die Domänen auf den Lipid-Halbsphären bewegt haben, was eine Auswertung im Sinne dieser Arbeit unmöglich macht. Die projizierten Bilder verschwimmen, da die einzelnen Schnitte durch die Vesikel, bedingt durch die Funktionsweise des Mikroskops, zeitlich versetzt aufgenommen werden. Deshalb befinden sich die Domänen bei jedem optischen Schnitt an einer anderen Stelle, da ihre Bewegung schneller als sie Aufnahmegeschwindigkeit des Mikroskops ist. Von solch einem Vorgang werden in Abbildung 4.9 einige Bilder aus einer aufgenommenen Zeitserie gezeigt.

Die Zeit zwischen zwei Aufnahmen betrug $\Delta T = 3,3$ Sekunden, so dass diese

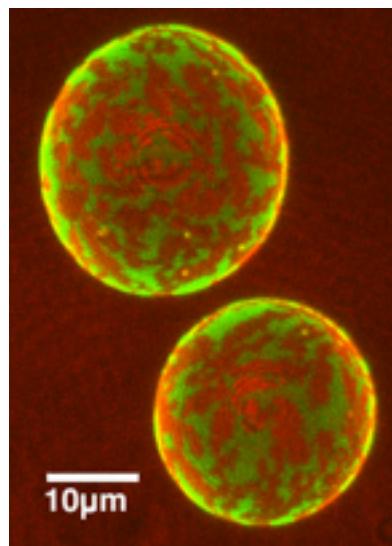


Abbildung 4.10: Netzartige Struktur auf Vesikeln einer DLPC/DPPC 23:77 Mischung (Messung bei 300 K; grün=fluid, rot = gel).

Domäne in 20 Sekunden eine Strecke von ca. $5\mu\text{m}$ zurückgelegt hat, was eine Geschwindigkeit von ungefähr $0,25\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ ergibt. Dieser Wert ist nicht sehr exakt bestimmt, soll aber nur ein Gefühl für die Größenordnung der Geschwindigkeit der Domänenbewegung geben. Dies ist nicht Thema dieser Arbeit. Es ist gut möglich, dass dieser Wert stark vom Verhältnis der Lipidmischung und der Größe der Domänen abhängig ist, da z.B. bei Vesikeln mit einem Mischungsverhältnis DLPC/DPPC 33:67 eine Bewegung der Domänen nicht erkennbar ist (z.B. beim Vesikel der Abbildung A.3), obwohl man sie auch hier erwarten könnte, da nicht alle Domänen miteinander verbunden sind. Bei Vesikeln mit noch höherem Anteil an DPPC bilden die Geldomänen eine netzartige Struktur aus, die jegliche Bewegung verhindert (Abb. 4.10).

Temperaturabhängigkeit der Domänengrößen

In einer Messung ist es gelungen, die Temperaturabhängigkeit der Domänengrößen festzuhalten. Dazu wurde die Zelle, in der die Vesikel gezüchtet wurden, unter dem Mikroskop mit einem Wasserbad geheizt. Mit dem derzeitigen Aufbau der Messzelle ist keine exakte Temperaturnessung möglich. Man kann nur sagen, daß die Bilder der Abbildung 4.11 bei abnehmender Temperatur aufgenommen wurden. Dazu wurde die Messzelle für die erste Aufnahme

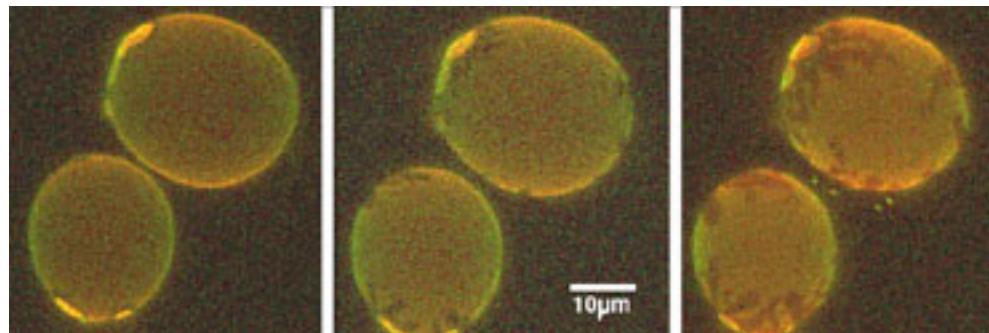


Abbildung 4.11: Bildserie eines Vesikel während des Abkühlens. Das linke Bild entstand bei ungefähr 315 K, danach wurde die Temperatur von links nach rechts sukzessiv erniedrigt (grün=fluid, rot = gel).

auf ca. 315 K und die Temperatur für die weiteren Bilder nach und nach erniedrigt. Man kann an den Aufnahmen gut die Ausbildung der Domänen beobachten, sobald die Temperatur den Phasenkoexistenzbereich erreicht.

Vesikel unter Stress

Nicht immer zeigen die auf den ITOs gezüchteten Halbsphären eine halbkugelartige Struktur mit homogener Krümmung. Bei einigen Versuchen ist es vorgekommen, dass die Vesikel sehr unformig waren (Abbildung 4.12).

Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Gelpause viel steifer als die fluide Phase ist und sich daher weniger krümmt.

Die Vesikel werden bei Temperaturen über der Phasenumwandlung beider vorhandener Lipidsorten gezüchtet, so dass sich während des Wachstumsprozesses alle Lipide in der fluiden Phase befinden. Für die Messung am konfokalen Mikroskop wird die Probe dann bis in den Phasenkoexistenzbereich abgekühlt, so dass sich gelförmige Domänen mit geringer Krümmung bilden. Da durch das Aufsitzen der Vesikel auf dem ITO und den Wachstumsprozess die äußere Struktur schon vorgegeben ist, muss es auch Bereiche hoher Krümmung geben, die zwischen den gelförmigen Bereichen liegen, um eine kugelartige Struktur zu ermöglichen. In diesen Bereichen hoher Krümmung findet man die fluide Phase, die weniger Krümmungssteifigkeit besitzt als die Gelpause. Besonders deutlich sieht man dies in der rechten Aufnahme in Abbildung 4.12. Bereiche unterschiedlicher Krümmung wurden auch schon in konfokalen Bildern von ternären Lipidmischungen Sphingomyelin/DOPC/Cholesterin bzw. DPPC/DOPC/Cholesterin (Veatch und

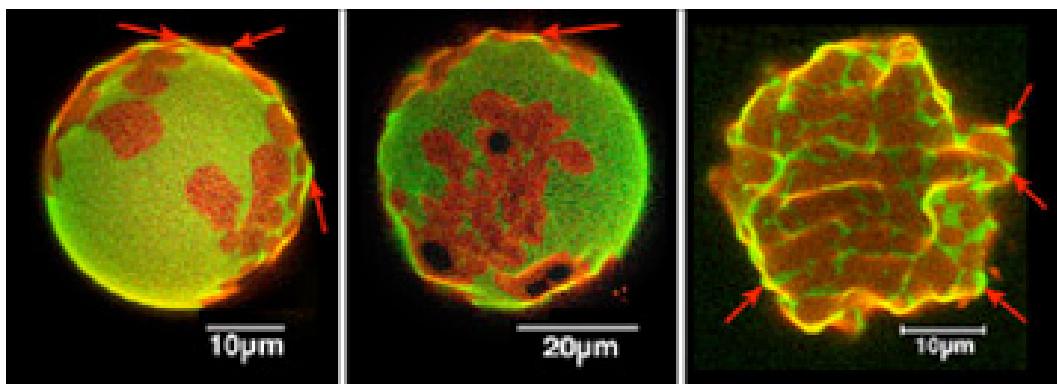


Abbildung 4.12: Bereiche unterschiedlicher Krümmung: In Gebieten hoher Krümmung, die zwischen gelförmigen Bereichen niedriger Krümmung liegen, findet man die fluide Phase (rote Pfeile); linkes und mittleres Bild: DLPC/DPPC 33:67 bei ca. 300 K; rechtes Bild: DLPC/DPPC 23/77 bei ca. 293 K; grün = fluid, rot = gel.

Keller, 2003; Baumgart et al., 2003) entdeckt. In diesen Arbeiten wurden halbschalenförmige Ausbuchtungen (“buds”) fluider Lipide in einem Gerüst gelförmiger Lipide gezeigt. Diese Beobachtung könnte relevant für die Frage sein, wie sich z.B. die synaptischen Vesikel im synaptischen Spalt bilden oder wie andere Transportvesikel entstehen (Huttner und Zimmerberg, 2001).

Farbstoff in der Gelpause

Die Lipide in der Gelpause bilden eine Gitterstruktur aus. Einige konfokale Aufnahmen an Vesikeln der Mischung DLPC/DPPC 33:67 haben gezeigt, dass der Farbstoff sich nicht immer homogen über die roten Bereiche verteilt, sondern man erhält den Eindruck, dass der Farbstoff aus diesen Bereichen zu den Rändern herausgedrängt wird (Abbildung 4.13 und 4.12 Mitte). Innerhalb der roten Bereiche sind Gebiete die kein Fluoreszenzsignal zeigen. Diese erscheinen dunkel. Das liegt daran, dass kein Farbstoff in diesen Bereichen ist. Diesen Effekt beobachtet man bei Defekten in Kristallgittern, und die Beobachtung könnte auf diese Weise erklärt werden, da auch die Gelpause ein Kristallgitter ausbildet. Diese Beobachtungen wurden nicht an jeder Probe gemacht, aber einige unscharfe Aufnahmen an Vesikeln einer DMPC/DSPC Lipidmischung lassen vermuten, dass der Effekt hier noch stärker ist (Abbildung 4.14).

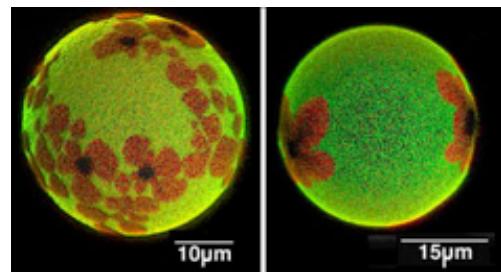


Abbildung 4.13: In dieser Aufnahme zeigen die roten Bereiche kein homogenes Fluoreszenzsignal. Es gibt innerhalb der roten Bereiche schwarze Bereiche die darauf zurückzuführen sind, dass dort kein Farbstoff ist. Man hat den Eindruck als wird der Farbstoff teilweise aus diesen Bereichen herausgedrängt. (DLPC/DPPC 33:67; Messung bei 300 K; grün = fluid, rot = gel).

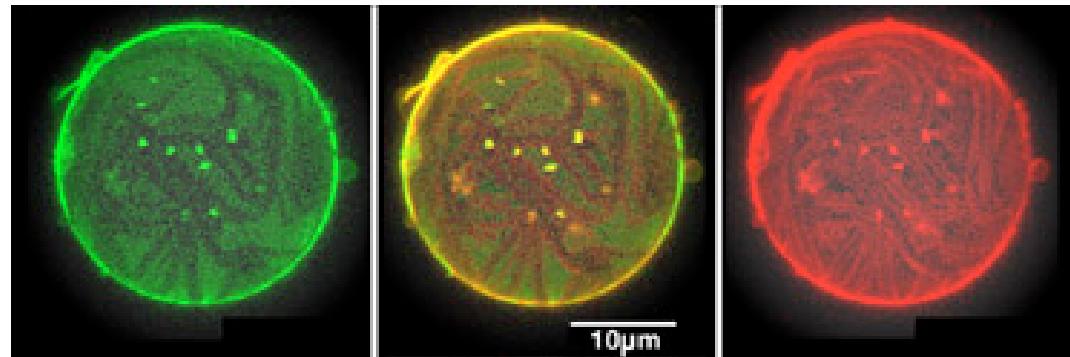


Abbildung 4.14: Die gelförmigen Bereiche zeigen kein homogenes Fluoreszenzsignal, man hat den Eindruck als wird der Farbstoff teilweise aus den gelförmigen Domänen herausgedrängt. Die äusseren Bilder zeigen den grünen (links) und den roten Kanal (rechts), das mittlere Bild ist aus der Überlagerung beider Kanäle entstanden. Die hellen Flecken sind Lipidcluster, die sich im Lösungsmittel um das Vesikel befanden (DMPC/DSPC 33:76; Messung bei 300 K; grün = fluid, rot = gel).

Kapitel 5

Fazit

5.1 Kalorimetrische Experimente

Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse deuten darauf hin, dass es möglich ist, anhand kalorimetrischer Experimente zu untersuchen, in welcher Phase sich ein Farbstoff bevorzugt löst. Dies ist wichtig für die Fluoreszenzmikroskopie, da man nun eine Methode hat, um das Verhalten von Farbstoffen in Membranen einer binären Lipidmischung vorherzusagen. Der Effekt beim verwendeten Farbstoff DiI- C_{18} war nur gering, aber die konfokalen Bilder zeigen übereinstimmend, dass dieser Farbstoff eine leichte Präferenz für die gelreiche Phase hat.

Ein Problem dieser Arbeit ist die Unsicherheit, die das System DLPC/DPPC einbringt, da beim Lipid DLPC nicht klar ist, was im Bereich der Phasenumwandlung exakt passiert. Ein System, das sich für diese Studie besser eignen würde, wäre das Mischsystem DMPC/DSPC. Die dieses System bildenden Lipide DMPC und DSPC sind ausreichend untersucht worden und zeigen nicht so eine breite Umwandlung wie DLPC. Auch wäre ein Farbstoff mit längeren Ketten besser geeignet, wie beispielsweise der von Feigenson und Buboltz (2001) genutzte DiI- C_{20} -Marker, der eine größere Präferenz für die Gelphase zeigt. Phospholipidmarker mit einer größeren Kettenlänge als 18 Kohlenstoffen werden aber nicht mehr hergestellt.

5.2 Konfokale Mikroskopie

Es wurde eine Methode entwickelt, um die anhand der Bilder der optischen Schnitte von Riesenvesikeln hergestellten Projektionen auszuwerten, so dass man eine prozentuale Verteilung gelreicher und fluidreicher Phasen erhält. Damit wurden mehrere Projektionen von Vesikeln der Lipidmischung

DLPC/DPPC 33:67 und DLPC/DPPC 23:87 ausgewertet. Es wurde festgestellt, dass für eine höhere Wärmekapazität bei 26°C auch die Fluktuationen in der Domänenverteilung größer sind. Um aber die Aussage zu machen, dass die Fluktuationen proportional zur Wärmekapazität sind, sind noch weitere Experimente nötig. Diese Arbeit zeigt, dass es möglich ist, diese Fragestellung zu untersuchen.

Die rasterkraftmikroskopischen Messungen haben gezeigt, dass die in den konfokalen Bildern sichtbaren makroskopischen Strukturen keine gelförmigen oder fluiden Domänen sind, sondern aus weiteren mikroskopischen Strukturen bestehen. Die in den konfokalen Bildern sichtbaren makroskopischen Strukturen kann man also nur als gelreiche bzw. fluidreiche Bereiche bezeichnen.

Die Beobachtung, dass Farbstoffe aus der Gelphase herausgedrängt werden, ist bisher noch nicht veröffentlicht worden. Es wäre interessant, den diesem Vorgang zugrundeliegenden Mechanismen auf die Spur zu kommen, die möglicherweise die Diffusion anderer Moleküle ebenfalls beschreiben könnten.

Die in dieser Arbeit gesammelten mikroskopischen Ergebnisse sind von hoherem Wert für die Erforschung von Membranen und haben die Erforschung der Mikrodomänen einen Schritt voran gebracht. Die Entdeckung der Fluiden Phase II ist bislang noch nicht berichtet worden und wird weiteren Diskussionsstoff liefern.

Die Zeitskala der Brown'schen Bewegung von Domänen wurde erstmals bestimmt. Diese ist wichtig für die Diskussion von Diffusionsprozessen in Membranen (Hac et al., 2004) und sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

Ebenfalls beobachtet wurden Bereiche unterschiedlicher Krümmung in Vesikelmembranen, die offensichtlich die Verteilung der Domänen beeinflussen. Ähnliche Beobachtungen wurden kürzlich von cholesterinhaltigen Lipidvesikeln berichtet (Baumgart et al., 2003; Veatch und Keller, 2003) und sind äußerst aktuell und wichtig für biologische Fragestellungen. Es ist möglich, dass diese Bereiche eine wichtige Rolle in der Entstehung von Transportvesikeln spielen (Huttnér und Zimmerberg, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, Anschluß an den derzeitigen Stand der konfokalen Mikroskopie zu erlangen und neue Erkenntnisse und Fragestellungen einzubringen. Wie diese Arbeit zeigt, sind die Möglichkeiten der konfokalen Mikroskopie noch längst nicht ausgeschöpft. Weitere interessante Experimente wären beispielsweise, zu beobachten, wie sich mit Farbstoffen markierte Proteine in den Domänen verteilen, oder möglicherweise den Schritt zu ternären Lipidsystemen (Lipidmischungen aus drei unterschiedlichen Lipiden) zu wagen, um sich natürlichen Membranen weiter anzunähern.

Anhang A

Raffinessen der Vesikelherstellung

Dieser erste Abschnitt des Anhangs geht auf die in Abschnitt 4.1 erwähnten anfänglichen Probleme bei der Vesikelherstellung ein.

Es gelang zwar äußerst schnell, Vesikel mit der Methode der Elektroformation auf ITOs zu züchten, jedoch war auf den konfokalen Aufnahmen keine Phasentrennung sichtbar. Eine erste Vermutung war, dass eine mögliche Verunreinigung der Proben die Phasentrennung störte. Um dies zu prüfen, wurde jeder einzelne Schritt der Probenpräparation mit Kalorimetrie geprüft, da man mit dieser Methode Verunreinigungen feststellen kann, weil sich das Schmelzprofil durch in die Probe eingelagerte Fremdstoffe ändert. Bei den kalorimetrischen Messungen wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Die Lipide wurden einzeln gemessen (Lipid in Wasser gelöst), um die Reinheit der Lipide zu testen. Die Ergebnisse deuteten keine Verunreinigung an.
- Die Lipide wurden erneut gemessen, nur diesmal wurden sie in einer Mischung Chloroform/Methanol 2:1 gelöst und das Lösungsmittel verdampft, bevor die Lipide mit Wasser gemischt wurden. Mit diesem Schritt sollte herausgefunden werden, ob die Lösungsmittel verunreinigt waren. Auch diese Messung zeigte keine Abweichung vom normalen Verlauf.
- Das Vakuum der Vakuumpumpe wurde überprüft und war in Ordnung.
- Persönliche Kommunikation mit Jürgen Klingauf am MPI Göttingen ergab, dass möglicherweise die ITOs zu dick waren. Diese waren in der

feinoptischen Werkstatt des Instituts bereits von 1mm auf 0.2mm abgeschliffen worden, die Objektive der Mikroskope sind aber auf eine Deckglasdicke von 0.175mm ausgelegt. Diese Differenz war eine mögliche Erklärung für die Probleme. Die Deckgläser wurden daraufhin auf die entsprechende Dicke abgeschliffen.

Zu diesem Zeitpunkt wurden zwei Änderungen zugleich vorgenommen, so dass es schwierig ist, das Problem genau zurückzuverfolgen:

- Es wurden Vesikel mit der sanften Hydratation hergestellt. Diese wurden in Lab-TekTM-Zellen untersucht. Es kamen erste Bilder zustande, auf denen die Phasentrennung sichtbar war (Abbildung A.1). Dies spricht dafür, dass die ITOs tatsächlich zu dick waren, da die Lab-TekTM-Zellen die für die Mikroskopie benötigte Dicke besitzen. Es kann aber auch sein, dass zu diesem Zeitpunkt ein erstes unilamellares Vesikel erwischt wurde und vorher nur multilamellare Vesikel beobachtet wurden, an denen mit konfokaler Mikroskopie keine Phasentrennung beobachtbar ist. Mit den unserer Gruppe zur Verfügung stehenden Methoden ist es nicht möglich zu testen, aus wie vielen Schichten ein Vesikel besteht.
- In Experimenten mit Luis Bagatolli (Odense, Dänemark) wurden die auf 0.175mm heruntergeschliffenen ITOs genutzt, gleichzeitig wurde die auf die ITO aufgetragene Lipidmenge herabgesetzt. Auch hier gab es erste Bilder mit sichtbarer Phasentrennung (Abbildung A.2). Auch die Versuche bei Luis stützen die Vermutung, dass die ITOs zu dick waren oder dass zuvor zu viel Lipid auf die ITOs aufgetragen worden war, so dass nur multilamellare Vesikel beobachtet wurden.

Die Probleme, die auftraten, sind darauf zurückzuführen, dass zum einen die ITOs zu dick waren, und sehr lange gebraucht wurde, herauszufinden dass die Objektive auf Deckgläser der Dicke 0.175mm ausgelegt sind und schon kleinste Abweichungen die Optik stören. Zum anderen ist es möglich, dass in der ersten Zeit keine unilamellaren Vesikel beobachtet wurden, sondern diese noch multilamellar waren. An multilamellaren Vesikeln lässt sich mit konfokaler Mikroskopie keine Phasentrennung beobachten.

Ein anderer Faktor, der die Arbeit zumindest erschwerte, war das Mikroskop, an dem die ersten Messungen durchgeführt wurden. Das Mikroskop, das zu Beginn für die Untersuchungen genutzt wurde, war ein älteres Zeiss LSM410. Das Problem bei diesem Mikroskoptyp ist, dass man die Intensität des Lasers nur über Filter steuern kann, und daher nur in diskreten Schritten die Laserintensität herabsetzen kann. Leider sind die verwendeten Farbstoffe

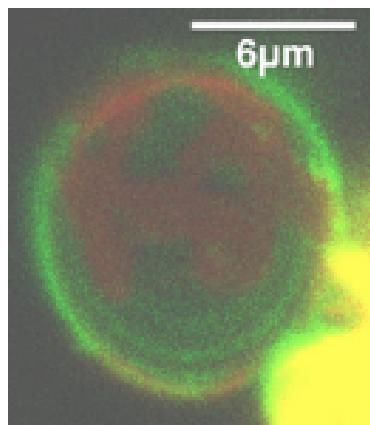


Abbildung A.1: Eines der ersten Vesikel, bei dem es mir gelang Phasentrennung sichtbar zu machen. Hergestellt wurde das Vesikel mit der Methode der sanften Hydratation, es handelt sich um eine DLPC/DPPC 44:56-Probe bei $T \approx 295\text{ K}$ (grün = fluid, rot = gel).

sehr empfindlich und die Intensitätsspanne, in der man den Farbstoff nicht zu stark ausbleicht, aber trotzdem noch ein gutes Signal von der Probe bekommt, ist nicht sehr breit. Gerade wenn man mehrere Bildserien an einem einzigen Vesikel aufnehmen will, um beispielsweise bei verschiedenen Temperaturen zu beobachten, muss man die Intensität sehr fein abstimmen, wozu eine kontinuierliche Steuerung viel besser geeignet ist.

Was die Arbeit mit dem zuerst eingesetzten konfokalen Mikroskop weiter behinderte, war die unausgereifte Bedienung. Die neueren Modelle besitzen eine viel weiter entwickelte eigene Bedienungs- und Auswertungs-Software (besonders das Leica-Mikroskop TCS SP2 AOBS besitzt eine ausgezeichnete Software), und auch bezüglich optischer Komponenten ist das Gerät nicht mehr auf dem neuesten Stand.

Es mit diesem Mikroskop nicht möglich zwei Farbkanäle simultan aufzunehmen. Einen Vergleich zwischen Bildern, die mit den unterschiedlichen Mikroskopen aufgenommen worden sind, zeigt Abbildung A.3.

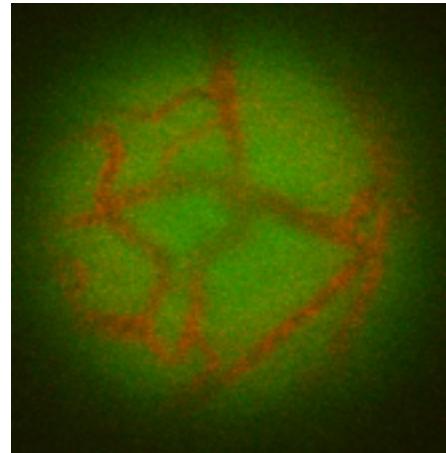


Abbildung A.2: Eines der ersten konfokalen Bilder eines auf einem ITO gezüchteten Vesikels. Es handelt sich um eine DLPC-DPPC 44:56 Lipidmischung, vom Vesikel wurde nur die Top-Region aufgenommen. Die Größe des Ausschnitts und die Temperatur während der Messung sind nicht bekannt (grün = fluid, rot = gel).

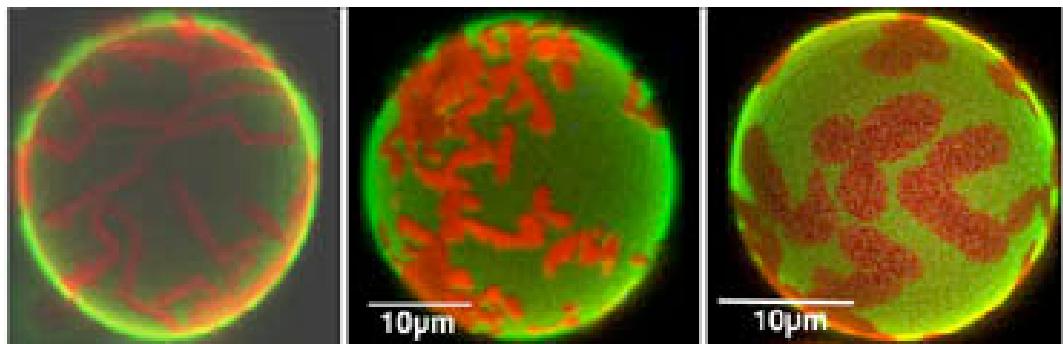


Abbildung A.3: Vergleich von Vesikelbildern, die mit unterschiedlichen Mikroskopen aufgenommen worden sind. links: Zeiss LSM410; mitte: Zeiss LSM510; rechts: Leica TSC SP2 AOBS. Das linke und das mittlere Bild sind am gleichen ITO aufgenommen worden, es handelt sich um die gleiche Probe (grün = fluid; rot = gel; alle Vesikel aus DLPC/DPPC 33:76-Lipidlösungen hergestellt; Temperaturen während der Messungen für linkes und mittleres Bild unbekannt, beim rechten Vesikel war $T \approx 300$ K; die Größe des linken Vesikels ist unbekannt).

Anhang B

Multivesikelaufnahmen

Ab diesem Abschnitt zeigt der Anhang noch einige ergänzende Aufnahmen von Vesikeln.

Die Abbildungen B.1 und B.2 dieses Abschnitts zeigen den Vorteil der Vesikelzüchtung auf ITOs gegenüber der Vesikelherstellung auf Platindrähten: Man kann viele Vesikel in einer Aufnahme unterbringen (Abbildungen B.1 und B.2). Den Extremfall zeigen die Abbildungen B.4 und B.5. Auf diesen Aufnahmen sind viele Vesikel mit einer weit streuenden Größenverteilung zu sehen.

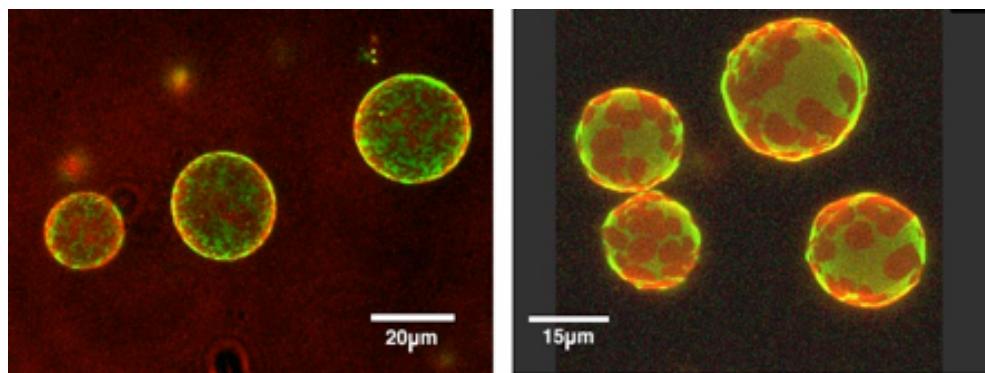


Abbildung B.1: Mehrere Vesikel, die in einem Bild platziert sind. Links eine DLPC/DPPC 23:77 Lipidmischung bei Raumtemperatur, rechts eine DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung, ebenfalls bei Raumtemperatur (grün = fluid, rot = gel).

Abbildung B.3 zeigt zwei Aufnahmen, die an unterschiedlichen Orten auf einem ITO einer Probenpräparation aufgenommen sind. Die Bilder zeigen unterschiedliche Domänengrößen, man hat den Eindruck, dass in der rech-

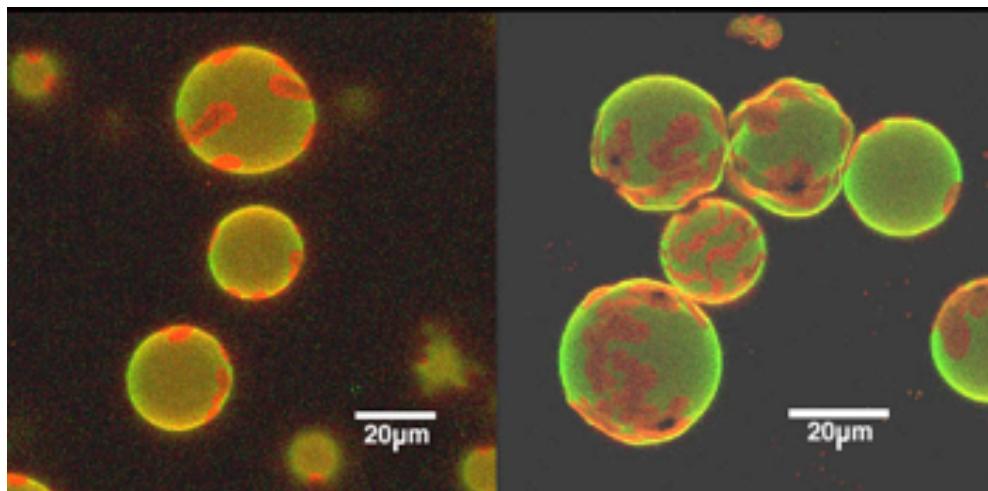


Abbildung B.2: Mehrere Vesikel, die in einem Bild platziert sind. Links eine DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei ca. 303K, rechts eine DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei Raumtemperatur (grün = fluid, rot = gel).

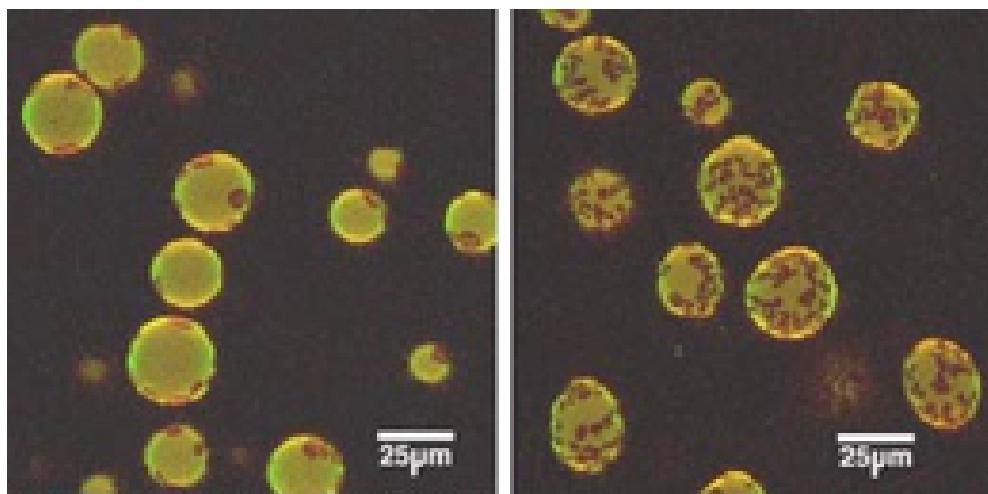


Abbildung B.3: Zwei Aufnahmen an unterschiedlichen Orten einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidvesikelpräparation. Das Bild auf der linken Seite entstand vor dem Bild auf der rechten Seite. Zuvor war die Probe abgekühlt worden, die Probenzelle hatte bei beiden Aufnahmen wieder Raumtemperatur (grün = fluid, rot = gel).

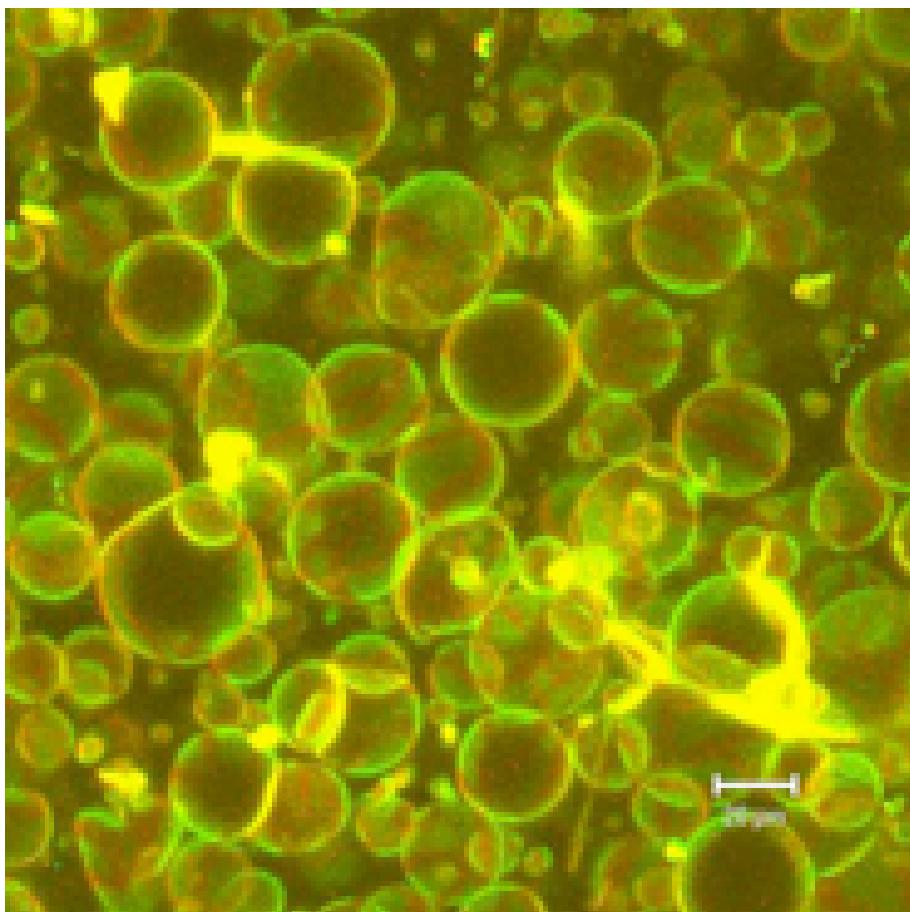


Abbildung B.4: Ein Vesikelcluster. Es handelt sich um eine DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei Raumtemperatur (grün = fluid, rot = gel).

ten Aufnahme der Gelanteil höher ist. Beide Aufnahmen wurden bei gleicher Temperatur der Probenzelle gemacht, aber die Bilder entstanden, nachdem die Probe nach einem Abkühlvorgang wieder auf Raumtemperatur erwärmt worden war. Die auftretenden Effekte sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Lipidmembranen noch nicht relaxiert waren, die Gel-domänen also noch wuchsen.

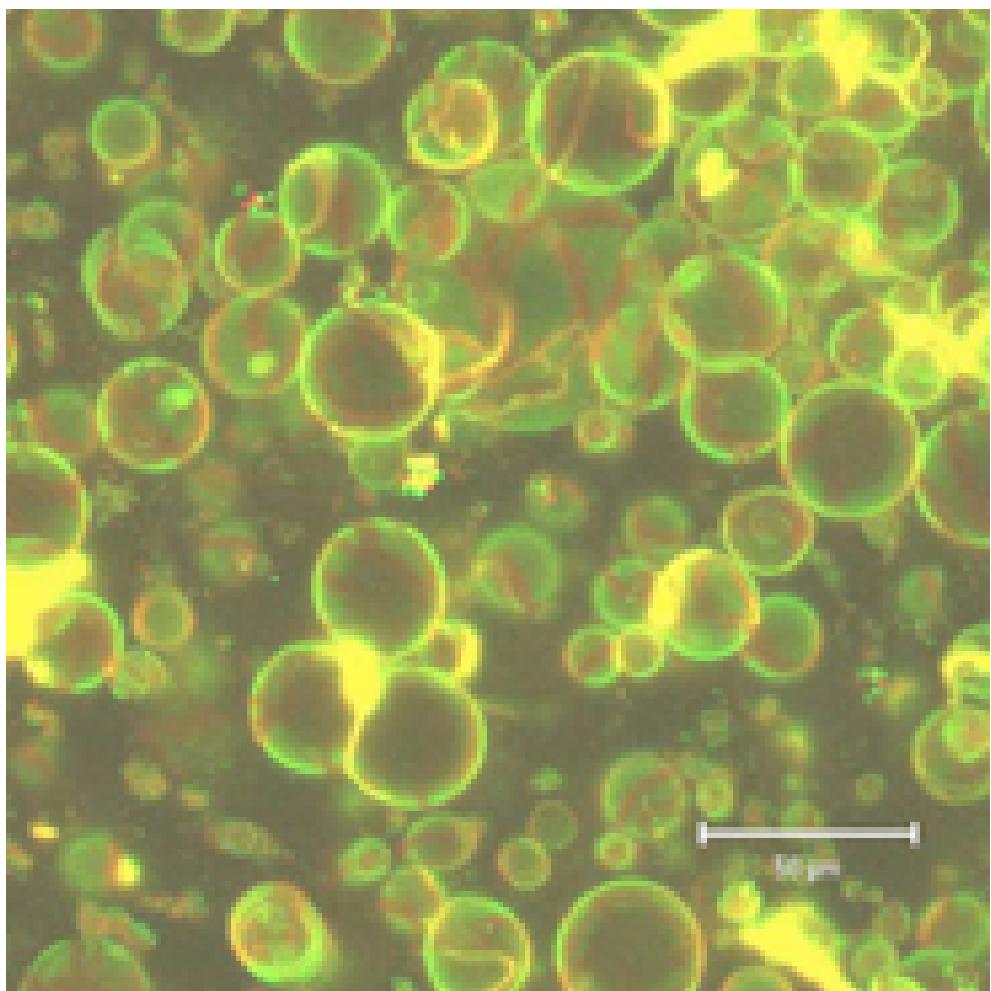


Abbildung B.5: Ein Vesikelcluster. Es handelt sich um eine DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung bei Raumtemperatur (grün = fluid, rot = gel).

Anhang C

DMPC/DSPC-Vesikel

In diesem Abschnitt werden noch einige zusätzliche Aufnahmen an DMPC/DSPC-Vesikeln gezeigt (Abbildung C.1). Alle Bilder zeigen, dass der DiI-C₁₈ Farbstoff aus der Gelpause herausgedrängt wird und das Fluoreszensignal aus dem roten Kanal in der Nähe der Grenzflächen von fluider und Gelpause am stärksten ist.

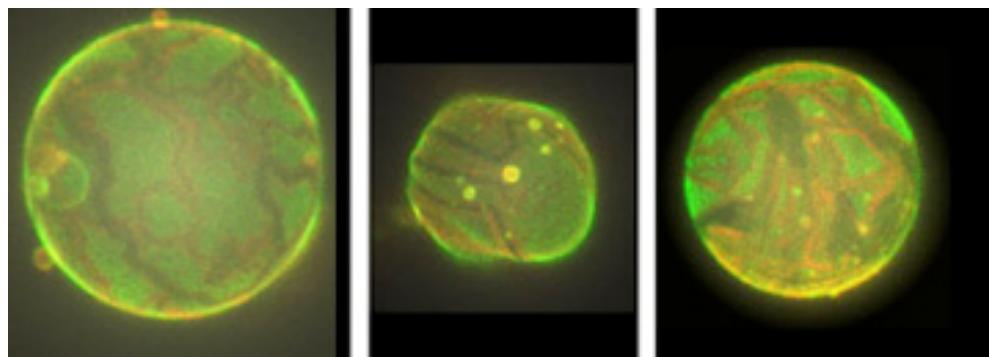


Abbildung C.1: Aufnahmen an Vesikeln einer DMPC/DSPC 33:67 Lipidmischung bei ungefähr 300 K. Der DiI-C₁₈ Farbstoff wird aus der Gelpause herausgedrängt und sammelt sich in den Grenzbereichen von fluider und Gelpause (grün = fluid, rot = gel; die Größe der Vesikel ist unbekannt).

Anhang D

DLPC/DPPC-Vesikel

Dieser Abschnitt zeigt noch einige Aufnahmen an DLPC/DPPC-Vesikeln. Auf einigen Aufnahmen ist der Effekt zu sehen, dass der Di-C₁₈-Farbstoff aus der Gelphase verdrängt wird, auf anderen sieht man, dass die gelförmigen Bereiche oft eine geringere Krümmung zeigen als die fluiden Bereiche.

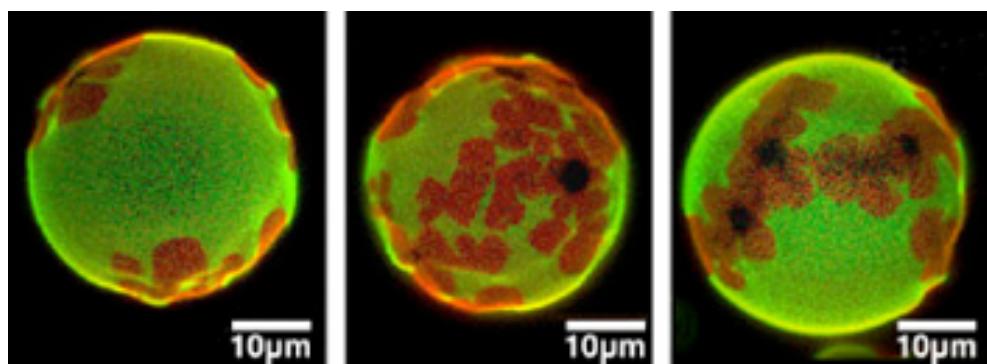


Abbildung D.1: Die Aufnahmen zeigen Vesikel einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung. In allen Bildern sieht man Bereiche innerhalb der Gelphase, aus denen die Farbstoffe vollständig herausgedrängt werden. Man sieht ebenfalls, dass in Bereichen der Gelphase oft eine höhere Krümmung vorliegt als in Bereichen der fluiden Phase. Das linke Bild entstand bei ca. 303 K, das mittlere und das rechte Bild bei Raumtemperatur (ca. 300 K; grün = fluid, rot = gel in allen Aufnahmen).

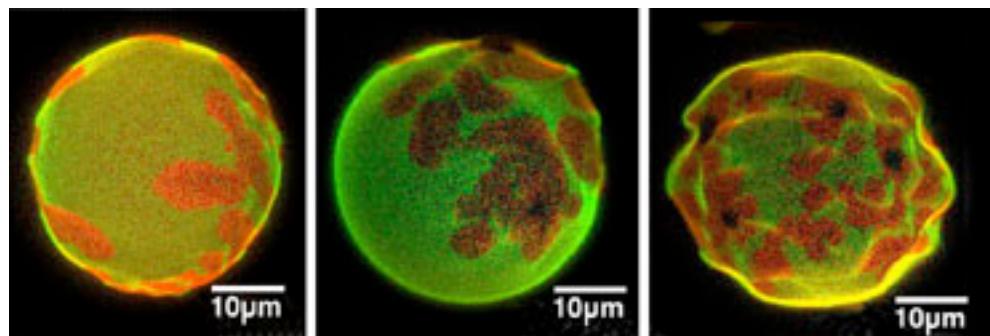


Abbildung D.2: Die Aufnahmen zeigen Vesikel einer DLPC/DPPC 33:67 Lipidmischung. In allen Bildern sieht man Bereiche innerhalb der Gelphase, aus denen die Farbstoffe vollständig herausgedrängt werden. Man sieht ebenfalls, dass in Bereichen der Gelphase oft eine höhere Krümmung vorliegt, als in Bereichen der fluiden Phase. Alle Bilder entstanden bei Raumtemperatur (ca 300 K; grün = fluid, rot = gel).

Literaturverzeichnis

Adam, G. und M. Delbrück. 1968. Structural Chemistry and Biology. W.H. Freeman and Company.

Angelova, M. und D. Dimitrov. 1986. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303–311.

Angelova, M. und D. Dimitrov. 1992. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr. Colloid & Polymer Sci.* 89:127–131.

Bagatolli, L. und E. Gratton. 1999. Two-Photon Fluorescence Microscopy Observation of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* 77:2090–2101.

Bagatolli, L. und E. Gratton. 2000. Two Photon Fluorescence Microscopy of Coexisting Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles of Binary Phospholipid Mixtures. *Biophys. J.* 78:290–305.

Baumgart, T., S.T. Hess, und W.W. Webb. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomenbrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425:821–824.

Biltonen, R. L. 1990. A statistical-thermodynamic view of cooperative structural changes in phospholipid bilayer membranes: their potential role in biological function. *J. Chem. Thermodynamics* 22:1–19.

Binning, G., C. Quate, und C. Gerber. 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930–933.

Bowen, P., J. Burke, P. Corsten, K. Crowell, K. Farrell, J. MacDonald, R. MacDonald, A. MacIsaac, S. MacIsaac, P. Poole, und N. Jan. 1989. Improved Monte Carlo distribution. *Phys. Rev. B* 40:7439–7442.

- Cevc, G. und D. Marsh. 1985. Hydration of noncharged lipid bilayer membranes. Theory and experiments with phosphatidylethanolamines. *Biophys. J.* 47:21–31.
- Danielli, J. und H. Davson. 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Physiol.* 5:495–508.
- Devlin, T., editor. 1992. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. John Wiley and Sons.
- Dietrich, C., L. Bagatolli, Z. Volvolyk, N. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, und E. Gratton. 2001. Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys. J.* 80:1417–1428.
- Doniach, S. 1978. Thermodynamic fluctuations in phospholipid bilayers. *J. Chem. Phys.* 68:4912–4916.
- Ebel, H., P. Grabitz, und T. Heimburg. 2001. Enthalpy and Volume Changes in Lipid (m)embranes. i. The (p)roportionality of Heat and Volume Changes in the Lipid Melting Transition and its Implication for the Elastic Constants. *Biophys. J.* 105:7353–7360.
- Feigenson, G. und J. Buboltz. 2001. Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC/Dilauroyl-PC/Cholesterol: Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol. *Biophys. J.* 80:2775–2788.
- Gennis, R. 1989. Biomembranes. Springer Verlag, 9th edition.
- Gliss, C., H. Clausen-Schaumann, R. Gunther, S. Odenbach, O. Randl, und T. Bayerl. 1998. Direct Detection of Domains in Phospholipid Bilayers by Grazing Incidence Diffraction of Neutrons and Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 74:2443–2450.
- Gorter, E. und F. Grendel. 1925. On biomolecular Layers of Lipid on the Chromacytes of the Blood. *J. Exp. Med.* 41:439–443.
- Hac, A. 2003. Diffusion processes in membranes containing coexisting domains investigated by Fluorescence Correlation Spectroscopy. Doktorarbeit, Universität Göttingen.
- Hac, A., H. Seeger, M. Fidorra, und T. Heimburg. 2004. Diffusion in two-component lipid membranes - A Fluorescence Correlation Spectroscopy and Monte-Carlo simulation study. eingereicht.

- Hatta, I., S. Matuoka, M. Singer, und L. Finegold. 1994. A new liquid crystalline phase in phosphatidylcholine bilayers as studied by X-ray diffraction. *Chem. and Phys. Lipids* 69:129–136.
- Heimburg, T. 2000. A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophys. J.* 78:1154–1165.
- Heimburg, T. und R. Biltonen. 1996. A Monte Carlo Simulation Study of Protein-Induced Heat Capacity Changes and Lipid-Induced Protein Clustering. *Biophys. J.* 70:84–96.
- Huttner, W.B. und J. Zimmerberg. 2001. Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:478–484
- Ipsen, J., G. Karlström, O. Mouritsen, H. Wennerström, und M. Zuckermann. 1987. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta* 905:162–172.
- Ivanova, V. 2000. Theoretical and experimental study of protein-lipid interactions. Master's thesis, Universität Göttingen.
- Ivanova, V. und T. Heimburg. 2001. Histogram Method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers, and membranes containing peptides. *Phys. Rev. E* 63:1–12.
- Ivanova, V., I. Makarov, T.E. Schäffer und T. Heimburg. 2003. Analizing Heat Capacity Profiles of Peptide-Conraining Membranes: Cluster Formation Of Gramicidin A. *Biophys. J.* 84:2427–2439.
- Jacobson, K. und C. Dietrich. 1999. Looking at lipid rafts? *Trends In Cell Biology* 9:87–91.
- Janiak, M., D. Small, und G. Shipley. 1978. Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin. *J. Biol. Chem.* 13:6068–6078.
- Jerala, R., P. Almeida, und R. Biltonen. 1996. Simulation of the Gel-Fluid Transition in a Membrane Composed of Lipids with two connected Acyl Chains: Application of a Dimer-Move Step. *Biophys. J.* 71:609–615.
- Korlach, J., P. Schwille, W. Webb, und G. Feigenson. 1999. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8461–8466.

- Koynova, R. und M. Caffrey. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcolines. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:91–145.
- Lee, A. 1977. Lipid phase transitions and phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* 472:285–344.
- Leidy, C., T. Kaasgaard, J. Crowe, O. Mouritsen, und K. Jorgensen. 2002. Ripples and the Formation of Anisotropic Lipid Domains: Imagin Two-Component Supported Double Bilayers by Atomic Force Microscopy. *Bioophys. J.* 83:2625–2633.
- Lichtman, J. 1994. Konfokale mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft* Okt:78–84.
- Michanova-Alexova, E. und I. Sugár. 2002. Component and State Separation in DMPC/DSPC Lipid Bilayers: A Monte Carlo Simulation Study. *Biophys. J.* 83:1820–1833.
- Mouritsen, O. und M. Bloom. 1984. Mattress Model of Lipid-Protein Interactions in Membranes. *Biophys. J.* 46:141–153.
- Nielsen, L., T. Bjornholm, und O. Mouritsen. 2000a. Fluctuations caught in the act. *Nature* 404:352.
- Nielsen, L., A. Vishnyakov, K. Jorgensen, T. Bjornholm, und O. Mouritsen. 2000b. Nanometre-scale structure of fluid lipid membranes. *J. Phys.: Condens. Matter* 12:A309–A314.
- Overton, E. 1895. über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle. *Vjsch. Naturf. Ges. Zürich* 40:159–201.
- Parkson, L. und G. Weber. 1983. Pressure Dependence of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene Flourescence in singel-component phosphatidylcoline liposomes. *Biochemistry* 22:5544–5550.
- Pink, D., T. Green, und D. Chapman. 1980. Raman Scattering in Bilayers of Saturated Phosphatidylcholines. Experiment and Theory. *Biochemistry* 19:349–356.
- Scherfeld, D., N. Kahya, und P. Schwille. 2003. Lipid Dynamics and Domain Formation in Model Membranes Composed of Ternary Mixtures of Unsaturated and Saturated Phosphatidylcholines and Cholesterol. *Biophys. J.* 85:3758–3768.

- Schlötzer, T. 2002. Domänen in Lipidmembranen: Untersuchung zum Phasenverhalten von binären Lipidmischungen mit Kalorimetrie und konfokaler Floureszenzmikroskopie. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- Schneider, M., D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen, und T. Heimburg. 1999. Network formation of lipid membranes: Triggering structural transitions by chain melting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14312–14317.
- Simons, K. und E. Ikonen. 1997. Functional Rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.
- Singer, S. und G. Nicolson. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175:720–731.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry. Freeman and Company, third edition.
- Veatch, S. und S. Keller. 2003. Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol. *Biophys. J.* 85:3074–3083.
- Yang, J. und J. Appleyard. 2000. The Main Phase Transition of Meica-Supported Phosphatidylcholine Membranes. *J. Phys. Chem. B* 104:8097–8100.