

# Passive Aufnahme von Partikeln durch Lipidvesikel in Theorie und Experiment

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität Augsburg

von  
Florian Georg Strobl

Augsburg, Februar 2022



- 
1. Gutachter: Prof. Dr. Achim Wixforth
  2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2022

## Zusammenfassung

Die Aufnahme von Makromolekülen und Partikeln durch biologische Membranen ist ein grundlegender Prozess in lebenden Systemen. Ein prominentes Beispiel für solche Aufnahmeprozesse ist die Endozytose, bei der die aufgenommene Fracht von der Membran umschlossen wird. Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese Prozesse durch Membranproteine gesteuert werden und Energie verbrauchen. Die ubiquitäre Grundstruktur solcher Membranen ist jedoch die Lipiddoppelschicht. Diese Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Frage, inwieweit endozytoseähnliche Prozesse bereits durch reine Lipidmembranen abgebildet werden können.

Zunächst werden wichtige theoretische Grundlagen zur Physik von Lipidmembranen zusammengefasst und biologische Beispiele für Partikelaufnahmeprozesse in der Biologie besprochen.

Anschließend wird zunächst experimentell gezeigt, dass Lipid-Riesenvesikel, die ein häufig verwendetes Modell für Zellmembranen sind, unter geeigneten Bedingungen zu einer massiven Partikelaufnahme fähig sind. Bei diesem Prozess werden die Partikel von Membran umhüllt und im Vesikelinneren angereichert.

Ein einfaches aus bestehenden Erkenntnissen zu Partikel-Membran-Wechselwirkungen abgeleitetes numerisches Modell liefert ein phänomenologisches Phasendiagramm von möglichen Aufnahmemodi, das unter anderem eine unlimitierte Aufnahme mit den beobachteten Eigenschaften umfasst. Deren Grenzen werden in erster Linie durch die elastischen Eigenschaften der Membran, die Partikelgröße und die Adhäsionsstärke bestimmt. Die Vorhersagen dieses Modells werden im experimentellen Hauptteil der Arbeit mit Befunden verglichen, bei denen eben diese Größen variiert wurden. Eine Verfeinerung des Modells, die auch die Porenbildung in Lipidmembranen berücksichtigt, liefert schließlich Vorhersagen, die auch quantitativ mit den experimentellen Beobachtungen in Einklang stehen.

Die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen werden maßgeblich durch deren thermodynamischen Zustand bestimmt. Daher beschäftigt sich der zweite Teil der Arbeit mit thermodynamischen Einflüssen auf den modellierten Aufnahmeprozess. Es wird gezeigt, dass Zustandsänderungen der Membran prinzipiell die Aufnahme gezielt steuern können, was zum einen eine wichtige Erkenntnis für das Verständnis biologischer Aufnahmeprozesse liefert und zum anderen hoch relevant bei der Entwicklung von pharmazeutischen Partikeln sein kann.

Abschließend werden in zwei Ausblicken erste Versuche zu möglichen Mo-

---

dellsystemen beschrieben, die für physikalische Untersuchungen von Transportprozessen in lebenden Systemen geeignet scheinen. Zellen der Armleuchteralge *Chara australis* sind experimentell extrem leicht zugänglich und eignen sich hervorragend für die Untersuchung von Erregungsphänomenen der Zellmembran bei Veränderung ihres thermodynamischen Zustands. Menschliche Endothelzellen unter Fluss sind wiederum ein anwendungsnahes Modellsystem für die Aufnahme von Partikeln in den menschlichen Körper.

## Abstract

The uptake of macromolecules and particles by biological membranes is a fundamental process in living systems. A prominent example of such uptake processes is endocytosis, in which the ingested cargo is enclosed by the membrane. In general, these processes are thought to be controlled by membrane proteins and energy consuming. However, the ubiquitous basic structure of such membranes is the lipid bilayer. This work therefore addresses the question to what extent endocytosis-like processes can already be found in pure lipid membranes.

First, important theoretical basics on the physics of lipid membranes are summarized and examples of particle uptake processes in biology are discussed.

It is first shown experimentally that lipid giant vesicles, which are a common model systems for cell membranes, are capable of massive particle uptake under suitable conditions. In this process, particles are enveloped by membrane and accumulated in the vesicle interior.

A simple numerical model derived from existing knowledge on particle-membrane interactions provides a phenomenological phase diagram of possible uptake modes, including unlimited uptake with the observed properties. Its limits are determined primarily by the elastic properties of the membrane, particle size, and adhesion strength. The predictions of this model are compared in the experimental main part of this thesis with findings in which those quantities were varied. Finally, a refinement of the model that also accounts for pore formation in lipid membranes yields predictions which are also quantitatively consistent with the experimental observations.

The mechanical properties of lipid membranes are largely determined by their thermodynamic state. Therefore, the second part of the thesis deals with thermodynamic influences on the modeled uptake process. It is shown that changes in the state of the membrane can in principle control the uptake, which on the one hand provides an important finding for the understanding of biological uptake processes and on the other hand can be highly relevant for the development of pharmaceutical particles.

Finally, two outlooks describe initial experiments on model systems which seem suitable for physical studies of transport processes in living systems. Cells of the stonewort alga *Chara australis* are easily accessible in experiments and are ideally suited for the study of excitation phenomena of cell membranes under thermodynamic state changes. In turn, human endothelial cells under flow are an application-oriented model system for the uptake of particles into the human body.

---

*»Es ist ein Gedankengebäude«, seufzte Kolibril. »Meine ewige Baustelle. Halbgare Theorien, Ideenruinen. Ich bezweifle, dass ich mit dieser Doktorarbeit zu Lebzeiten jemals zurande kommen werde.«*

Dr. Kolibril in „Rumo“ von Walter Moers

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Motivation und Grundlagen</b>	<b>11</b>
1.1. Lipidmembranen . . . . .	12
1.1.1. Phospholipide . . . . .	12
1.1.2. Die Bildung von Vesikeln . . . . .	13
1.2. Mechanik: Die Membran als dünne Platte . . . . .	15
1.2.1. Laterale Dehnung . . . . .	15
1.2.2. Scherung . . . . .	16
1.2.3. Biegung . . . . .	16
1.2.4. Elastizitätskonstanten . . . . .	18
1.3. Thermodynamische Einflüsse auf die Materialparameter . . . . .	19
1.3.1. Die Ehrenfest-Klassifikation der Phasenumwandlungen	20
1.3.2. Suszeptibilitäten und Fluktuationen . . . . .	21
1.3.3. Klassische Landau-Theorie . . . . .	23
1.3.4. Landau-Theorie des Hauptübergangs (erster Ordnung)	24
<b>2. Einleitung</b>	<b>27</b>
<b>3. Entwicklung eines Modells zur unlimitierten Partikelaufnahme</b>	<b>31</b>
3.1. Einleitung . . . . .	32
3.2. Theoretische Grundlagen und Überlegungen . . . . .	34
3.2.1. Modelle zur Membranen-Partikel-Wechselwirkung . . . . .	34
3.2.2. Adhäsion . . . . .	39
3.2.3. Unlimitierte Partikelaufnahme und transiente Poren . . . . .	43
3.2.4. Wahrscheinlichkeit von Partikelkollisionen mit der Oberfläche . . . . .	45
3.3. Implementierung eines ersten numerischen Modells . . . . .	47
3.4. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	49
<b>4. Ionenstärke und Adhäsion</b>	<b>53</b>
4.1. Einleitung . . . . .	54
4.2. Materialien und Methoden . . . . .	55
4.3. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	58
<b>5. Experimentelle Untersuchung der Partikelaufnahme</b>	<b>61</b>
5.1. Experimentelle Methoden . . . . .	62
5.1.1. Versuchsablauf . . . . .	62
5.1.2. Kinetisches Modell der Partikelaufnahme und Auswertung	64
5.1.3. Materialien . . . . .	68

5.2.	Ergebnisse . . . . .	70
5.2.1.	Einfluss der Partikeldiffusion . . . . .	71
5.2.2.	Einfluss der Partikelkonzentration . . . . .	72
5.3.	Diskussion . . . . .	74
<b>6.</b>	<b>Verfeinerung des Modells</b>	<b>77</b>
6.1.	Dynamik transienter Poren . . . . .	78
6.1.1.	Theorie zur Porendynamik . . . . .	79
6.1.2.	Implementierung im Aufnahme-Modell . . . . .	80
6.2.	Thermodynamische Aspekte der Partikelaufnahme . . . . .	82
6.3.	Ergebnisse und Diskussion im Lichte der Experimente . . . . .	85
<b>7.</b>	<b>Partikelaufnahme und thermodynamischer Membranzustand</b>	<b>89</b>
7.1.	Steuerung der Partikelaufnahme durch den Membranzustand . . . . .	90
7.1.1.	Einleitung . . . . .	90
7.1.2.	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	91
7.2.	Beeinflussung des thermodynamischen Membranzustands durch Partikelkontakt . . . . .	95
7.2.1.	Einleitung . . . . .	95
7.2.2.	Experimentelle Ergebnisse . . . . .	96
7.2.3.	Theoretische Interpretation . . . . .	96
7.2.4.	Diskussion . . . . .	99
<b>8.</b>	<b>Fazit</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Ausblick: Kontrolle der zellulären Erregbarkeit von Chara australis durch ein- und zweiwertige Ionen</b>	<b>105</b>
9.1.	Einleitung . . . . .	106
9.2.	Experimentelle Methoden . . . . .	109
9.3.	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	111
9.3.1.	Veränderung des Aktionspotentials durch Kalziumionen	111
9.3.2.	Veränderung des Aktionspotentials durch Lithium-Ionen	112
9.3.3.	Diskussion . . . . .	114
9.4.	Schlussfolgerung . . . . .	120
<b>10.</b>	<b>Ausblick: Entwicklung einer Mikropumpe zur Durchführung von Auf- nahmeexperimenten in lebenden Zellen</b>	<b>123</b>
10.1.	Einleitung . . . . .	124
10.2.	Aufbau und Charakterisierung des Systems . . . . .	127
10.3.	Untersuchung des Einflusses von Strömung auf die Partikel- aufnahme von Zellen . . . . .	130
10.4.	Schlussfolgerung . . . . .	132
	<b>Literatur</b>	<b>132</b>

<b>A. Anhang</b>	<b>145</b>
A.1. Experimentelle Details . . . . .	146
A.1.1. Herstellung von Riesenvesikeln . . . . .	146
A.1.2. Herstellung von Nanopartikelsuspensionen für Aufnahmeexperimente . . . . .	147
A.1.3. Herstellung von beschichteten Deckgläsern . . . . .	148
A.1.4. Herstellung von AFM-Cantilevern mit Silica-Mikrokugel	148
A.2. Materialien . . . . .	150
A.2.1. Verwendete Lipide und andere Chemikalien . . . . .	150
A.2.2. Verwendete Nanopartikel . . . . .	150
A.3. Vergleich der Auswirkung von Protonen und zweiwertigen Kationen auf anionische Membranen . . . . .	151
A.4. Simulation . . . . .	152
A.4.1. Beispiel Simulationsergebnis . . . . .	152
A.4.2. Auszüge Quelltext Partikelaufnahme . . . . .	154
A.4.3. Quelltext FitzHugh-Nagumo . . . . .	158
<b>B. Danksagung</b>	<b>161</b>



# 1. Motivation und Grundlagen

Betrachtet man die zellbiologische Fachliteratur, so erkennt man schnell, dass viele grundlegende Abläufe in biologischen Zellen häufig im Rahmen eines sehr mechanistischen Bildes erklärt und Funktionen bestimmten Molekülen oder „Bauteilen“ zugeordnet werden. Problematisch ist dabei, dass diese Herangehensweise dazu führen kann, dass hochkomplexe Systeme gedanklich und experimentell in Einzelteile zerlegt werden, denen dann jeweils bestimmte Teilfunktionen zugeschrieben werden. Die Gefahr hierbei ist, dass Vorgänge, die eigentlich sehr universeller Natur sind, plötzlich unwiderruflich mit spezifischen molekularen Gegebenheiten verbunden werden und tatsächlich zugrundeliegende Gesetzmäßigkeiten, die von der Gesamtheit des biologischen Systems (z.B. der Zelle) getragen werden, übersehen oder fehlinterpretiert werden.

Hier soll aber der Versuch unternommen werden, die Zellmembran, bzw. biologische Membranen ganz allgemein, möglichst universell als thermodynamische Systeme zu betrachten. Um ihre physikalische Beschreibung zu erleichtern, ist es sinnvoll, ein Modellsystem zu verwenden, das noch die relevante Grundstruktur biologischer Membranen repräsentiert, aber in seiner Komplexität deutlich reduziert ist. Die Lipiddoppelschicht ist einerseits allen biologischen Membranen gemein und andererseits einfach genug um sie von einer allgemeinen physikalischen Perspektive aus zu beleuchten. Ihre Eigenschaften bestimmen maßgeblich wichtige mechanische Eigenschaften biologischer Membranen, wie deren Biegesteifigkeit oder Flächenelastizität [1]. Die reiche Landschaft thermodynamischer Zustände von Lipidmembranen führt darüber hinaus dazu, dass diese und andere Eigenschaften nicht statisch sind, sondern stark von den Umgebungsbedingungen der Membran abhängen. Dass Phasenübergänge und Phasenseparationen innerhalb von Lipidmembranen eine wichtige Rolle bei biologischen Prozessen spielen können, ist mittlerweile allgemeiner Konsens. Trotz alledem ist die tragende Rolle von Lipiden bei biologischen Prozessen nicht immer gut untersucht. In dieser Arbeit soll dazu ein kleiner Beitrag zu einzelnen biologischen Prozessen geleistet werden. Zunächst sollen dafür jedoch einige theoretische Grundlagen gelegt werden, wobei auf Auszüge aus [2] zurückgegriffen wird.

## 1.1. Lipidmembranen

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, bilden Lipiddoppelschichten das Grundgerüst aller Biomembranen. Im Folgenden sollen wichtige Aspekte dieser Strukturen erörtert werden. Die Beschreibung orientiert sich an einem Buch von Thomas Heimburg [3], das als Übersicht über das Thema empfohlen sei.

### 1.1.1. Phospholipide

Alle Lipide sind mehr oder weniger amphiphil. Ihre Struktur wird im Wesentlichen durch eine hydrophile Kopfgruppe und einen Bereich hydrophober Kohlenstoffketten bestimmt. Phospholipide stellen den größten Anteil an Lipiden in biologischen Membranen. Ihr Rückgrat bildet eine Glycerolgruppe, deren beiden ersten Kohlenstoffatome über Ester-Bindungen mit Fettsäuren verknüpft sind. Die Kopfgruppe enthält eine Phosphatgruppe, die an die dritte Position des Glycerins gebunden ist. Das mittlere Kohlenstoffatom bildet ein Chiralitätszentrum.

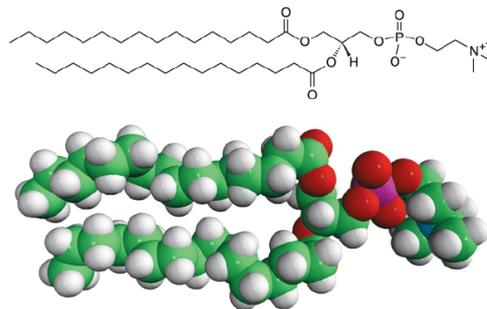


Abbildung 1.1. [übernommen aus [4]] DPPC:

Das in unseren Versuchen am häufigsten verwendete Lipid ist ein Beispiel für ein Phospholipid mit zwei identischen Fettsäureresten. Die Ketten haben eine Länge von 16 C-Atomen und sind vollständig gesättigt.

Die Fettsäuren können sich in Länge und Sättigung unterscheiden und bestimmen so maßgeblich die sterische Gestalt der Lipide. Auch die Kopfgruppen können sich unterscheiden. In der Natur spielen z.B. negativ geladene Serin-Kopfgruppen eine wichtige Rolle.

Das Mengenverhältnis verschiedener Lipide ist sowohl von Lebewesen zu Lebewesen als auch von Zelltyp zu Zelltyp sehr unterschiedlich und passt sich ständig an die jeweiligen Umweltbedingungen (Temperatur, pH, Salzkonzentration) an.

### 1.1.2. Die Bildung von Vesikeln

Aufgrund ihrer großen hydrophoben Anteile weisen Lipide nur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser auf und kommen als gelöste Monomere nur bis zu einer kritischen Konzentration von  $10^{-12}$  M vor. Wird diese überschritten, bilden sich sphärische Mizellen. Steigt die Lipidkonzentration weiter an, verändern die Mizellen ihre Struktur und formen schließlich Lipiddoppelschichten. In planarer Form wäre dies eine energetisch äußerst ungünstige Konfiguration mit großer Linienspannung. Deshalb schließen sich die Doppelschichten, wie in Abbildung 1.2 skizziert, zu geschlossenen Vesikeln zusammen.

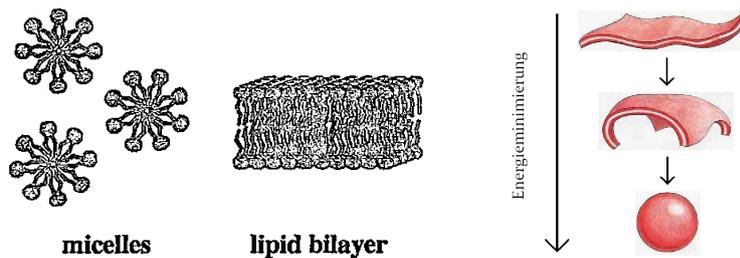


Abbildung 1.2. Links: [übernommen aus [3]] Je nach Konzentration bilden sich aus Lipidmonomeren Mizellen oder Doppelschichten. Rechts: [übernommen aus [5]] Doppelschichten bilden geschlossene Strukturen (Vesikel) um ihre Grenzflächenenergie zu minimieren.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die bevorzugte Struktur der Aggregate nicht nur von der Lipidkonzentration, sondern auch von sterischer Gestalt und Ladung der Lipidmoleküle, sowie Druck und Temperatur abhängt. Es können sich daher neben Mizellen und Doppelschichten weitere sehr unterschiedliche morphologische Phasen ausbilden, die allerdings in der Biologie eine untergeordnete Rolle spielen.

Die treibende Kraft für die Bildung von Vesikeln ist der hydrophobe Effekt, bzw. die geringe Wasserlöslichkeit von Lipiden. Wird ein Alkan aus einer apolaren Umgebung in Wasser überführt, so muss pro Mol ein Unterschied der freien Enthalpie aufgewendet werden, der sich nach [2], [3] als Funktion der Moleküloberfläche bzw. der Länge der Kohlenstoffketten abschätzen lässt. Der größte Energiebeitrag ist dabei durch den Verlust von Entropie begründet, der bei der Anordnung von Wassermolekülen um die hydrophoben Lipidanteile entsteht.

#### Vesikeltypen

Die genaue Struktur von Vesikeln kann sich je nach Präparationsmethode stark unterscheiden:

- Multilamellare Vesikel (MLV) stellen die thermodynamisch stabilste Form dar und entstehen spontan, wenn Lipide in Wasser überführt

werden. Ihre meist sehr unregelmäßige Struktur zeichnet sich durch viele Schichten übereinanderliegender Lipidmembranen aus. Typische Größenordnung: **100 nm bis 10  $\mu\text{m}$**

- Kleine unilamellare Vesikel (SUV) entstehen durch die Behandlung einer MLV-Dispersion mit Ultraschall. Die eingebrachte Energie zerstört große zusammenhängende Membranen und fördert so die Bildung sehr kleiner Vesikel, die unter starker mechanischer Spannung stehen. Typische Größenordnung: **10 nm bis 100 nm**
- Große unilamellare Vesikel (LUV) können durch Fusion aus SUV oder durch Extrusion aus MLV gewonnen werden. Typische Größenordnung: **100 nm bis 1  $\mu\text{m}$**
- Unilamellare Riesenvesikel (GUV) werden meist in der Electroswelling-Methode hergestellt. Diese wird in Abschnitt A.1.1 genauer beschrieben. Aufgrund ihrer Größe eignen sie sich sehr gut als Zellmodell und für mikroskopische Untersuchungen. Typische Größenordnung: **10  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$**

## 1.2. Mechanik: Die Membran als dünne Platte

Wolfgang Helfrich veröffentlichte 1973 ein Modell zur Beschreibung der Mechanik von Vesikeln, in dem er die Membran im Wesentlichen als dünne Platte beschreibt [6]. Diese Arbeit bildet seither die Grundlage der meisten mechanischen Modelle von Biomembranen. Die wichtigsten durch Deformation entstehenden Energiebeiträge sollen hier vorgestellt werden. Eine Platte kann, wie in Abbildung 1.3 dargestellt, auf verschiedene Weisen verformt werden. Da die Membran aufgrund ihrer geringen Dicke von ca. **4 nm** als zweidimensional angenommen wird, können transversale Dehnung und Kippung vernachlässigt werden.

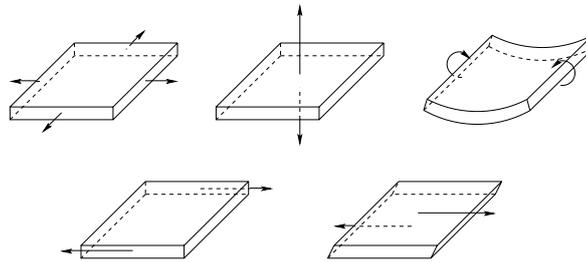


Abbildung 1.3. [Quelle: Website Avanti Lipids] Mögliche Deformationen einer Platte sind a) laterale Dehnung, b) transversale Dehnung, c) Biegung, d) Scherung, 5) Kippung, von links oben nach rechts unten dargestellt.

### 1.2.1. Laterale Dehnung

Dehnung und Stauchung können für kleine Auslenkungen aus der Ruhelage mit dem Hookschen Gesetz beschrieben werden. Die Dehnungsenergiedichte  $g_A$  (Energie pro Fläche) muss für kleine Auslenkungen eine quadratische Funktion der relativen Flächenänderung  $\frac{\Delta A}{A}$  sein:

$$g_A = \frac{K_A}{2} \left( \frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (1.1)$$

$K_A$  ist der Flächenkompressionsmodul.

Für die isotrope Lateralspannung  $\sigma$ , die zu der relativen Flächenänderung  $\frac{\Delta A}{A}$  führt, gilt folglich:

$$\sigma = \frac{dg_A}{d\left(\frac{\Delta A}{A}\right)} = K_A \left( \frac{\Delta A}{A} \right) \quad (1.2)$$

### 1.2.2. Scherung

Scherung kann bei Lipidmembranen nur in der kristallinen oder der Gelphase auftreten. In fluider oder gasförmiger Phase sind die einzelnen Moleküle lateral frei beweglich und können so ohne Kraftaufwand gegeneinander verschoben werden. Natürlich muss im dynamischen Falle die Oberflächenviskosität der Membran  $\eta_s$  berücksichtigt werden.

### 1.2.3. Biegung

Nach [7] gilt für die Dichte der freien Energie einer dünnen Platte unter Biegung:

$$g_B = z^2 \frac{E}{1 + \sigma} \left\{ \frac{1}{2(1 - \sigma)} \left( \frac{\partial^2 \zeta}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \zeta}{\partial y^2} \right)^2 + \left[ \left( \frac{\partial^2 \zeta}{\partial x \partial y} \right)^2 - \frac{\partial^2 \zeta}{\partial x^2} \frac{\partial^2 \zeta}{\partial y^2} \right] \right\} \quad (1.3)$$

$\zeta = \zeta(x, y)$  bezeichnet die vertikale Verschiebung der Platte am Punkt  $(x, y)$  aus der neutralen Ebene,  $E$  den Elastizitätsmodul und  $\sigma$  den Querkontraktionskoeffizienten.

Wie in [8] (S. 67 – 69) in längerer Rechnung gezeigt, kann man (1.3) als Funktion  $g_B(R_1, R_2)$  der beiden Hauptkrümmungsradien  $R_1$  und  $R_2$  umschreiben, die den Vorteil guter Messbarkeit mit sich bringen. Die Hauptkrümmungsradien für einen beliebigen Punkt der Platte sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

$$g_B = \frac{K_B}{2} \left( \underbrace{\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}}_{2C_m} - C_0 \right)^2 + K_G \underbrace{\left( \frac{1}{R_1} \frac{1}{R_2} \right)}_{C_g} \quad (1.4)$$

$C_m$  und  $C_g$  sind die mittlere und die Gaußsche Krümmung. Mit der Einführung der „spontanen Krümmung“  $C_0 = \frac{1}{R_0}$  wird der Tatsache Rechnung getragen, dass Lipidmembranen, im Gegensatz zu homogenen Platten, transversale Asymmetrie aufweisen können, z.B. durch unterschiedliche chemische Zusammensetzungen von innerer und äußerer Monolage.  $K_B$  und  $K_G$  sind die Biegesteifigkeit und der Modul der Gaußschen Krümmung.

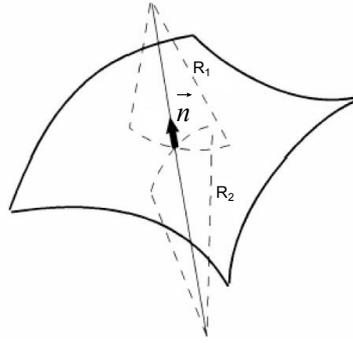


Abbildung 1.4. [aus [8]] Die Hauptkrümmungsradien  $R_1$  und  $R_2$  für ein infinitesimales Flächenelement

Es sei darauf hingewiesen, dass Helfrich (1.4) direkt aus folgenden Überlegungen herleitete ( $\vec{n} = (n_1(x, y), n_2(x, y), 1)$  sei der Normalenvektor an der Stelle  $(x, y)$ ):

- $\text{rot}(\vec{n}) = 0$ , da die Fläche sonst nicht eindeutig definiert ist.
- Die Krümmungsenergie ist für kleine Auslenkungen eine quadratische Funktion der Krümmungen  $C_x = \frac{\partial n_x}{\partial x}$  und  $C_y = \frac{\partial n_y}{\partial y}$ . (Hooksche Näherung)
- Da eine zweidimensionale Flüssigkeit rotationssymmetrisch ist, gehen nur Beiträge ein, die unabhängig von der Orientierung der x- und y-Achsen sind.

Für die gesamte Biegeenergie  $G_B$  eines Vesikels gilt damit:

$$G_B = \iint g_B dA = \frac{K_B}{2} \iint (2C_m - C_0)^2 dA + K_G \underbrace{\iint C_g dA}_M \quad (1.5)$$

Das Theorem von Gauß–Bonnet besagt, dass für das Integral der Gaußschen Krümmung über eine orientierbare, geschlossene Fläche (beim geschlossenen Vesikel gegeben) gilt:

$$M = 4\pi(1 - p) \quad (1.6)$$

$p$  heißt Geschlecht der Fläche und ist gleich der Anzahl ihrer Henkel („Löcher“).

Für ein Vesikel ohne Loch gilt also  $M = \text{const} = 4\pi$ . Dies ist nicht mehr gültig, wenn sich Vesikel abschnüren oder fusionieren!

Der zweite Summand in (1.5) kann also oft bei der Betrachtung von relativen Änderungen der Gesamtbiegeenergie vernachlässigt werden.

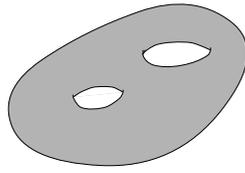


Abbildung 1.5. [aus [8]] Beispiel für eine Fläche mit 2 Henkeln

### 1.2.4. Elastizitätskonstanten

In Teil 1.2 sind mehrere Materialkonstanten aufgetreten, die teilweise sehr schwer messbar sind. Deshalb sollen hier einige wichtige Zusammenhänge sowie typische Größenordnungen genannt werden.

- Der Flächenkompressionsmodul  $K_A := \frac{1}{\kappa_A}$  ist über Filmwaagenmessungen an Monolagen experimentell leicht zugänglich. Seine typische Größenordnung beträgt  $10^{-2}\text{N/m}$  bis  $1\text{N/m}$  und ist in erster Näherung proportional zur Dicke  $d$  der Membran. Er ändert sich während des Hauptphasenübergangs typischerweise um eine Größenordnung.
- Die Biegesteifigkeit  $K_B$  kann aus  $K_A$  abgeschätzt werden, wenn man sich die Biegung als Kombination einer Dehnung der äußeren und einer Stauchung der inneren Monolage vorstellt. Aus geometrischen Gründen ergibt sich dann [3]:

$$K_B = K_A \cdot \frac{d^2}{16} \quad (1.7)$$

Die so berechneten Werte stimmen meist gut mit den experimentell bestimmten überein. Die typische Größenordnung von  $K_B$  liegt bei  $10^{-19}\text{Nm}$  bis  $10^{-18}\text{Nm}$ . Zusammen mit der oben genannten Proportionalität  $K_A \propto d$ , gilt näherungsweise  $K_B \propto d^3$ . Wo möglich wurden dennoch gemessene experimentelle Werte für  $K_B$  verwendet

- Der Modul der Gaußschen Krümmung  $K_G$  ist experimentell schwer zu bestimmen und typischerweise negativ. Sein Betrag liegt in der Größenordnung von  $K_B$ . In [9] argumentiert Helfrich aus energetischen Betrachtungen, dass Vesikel nur dann eine stabile Phase darstellen, wenn gilt

$$K_G < -2K_B \quad (1.8)$$

### 1.3. Thermodynamische Einflüsse auf die Materialparameter

Lipidmembranen zeigen ein Phasenverhalten, das dem von Flüssigkristallen ähnelt. Übergänge zwischen den verschiedenen Phasen können durch die Veränderung verschiedener Zustandsgrößen erzeugt werden. Die Temperatur und der Lateraldruck (bei Monolagen) sind experimentell besonders leicht zugänglich. Prinzipiell kann aber auch die Veränderung anderer Variablen zu Phasenübergängen führen. Für biologische Systeme ist beispielsweise der pH-Wert eine leicht zu variierende Größe.

Die typischen Phasen reiner Lipide, die mit zunehmender Temperatur auftreten, sind in Abbildung 1.6 gezeigt:

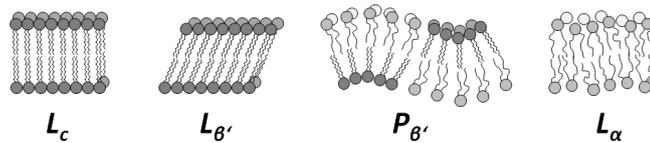


Abbildung 1.6. [aus [10]] Schematische Darstellung der verschiedenen lamellaren Phasen von Lipiden in Wasser; Reihenfolge bei zunehmender Temperatur

**$L_c$ -Phase** In dieser sogenannten „kristallinen“ Phase sind die Kopfgruppen der Moleküle in einem festen, trigonalen Gitter geordnet. Die Kohlenstoffketten sind gerade ausgerichtet und alle Kohlenstoffbindungen stehen in trans-Konfiguration. Die Temperaturen, bei denen diese Phase stabil ist, sind allerdings so niedrig, dass sie keine physiologische Relevanz hat. In einem Phasenübergang zweiter Ordnung geht das System über in die  $L_{\beta'}$ -Phase.

**$L_{\beta'}$ -Phase** Hier sind die Alkanketten gegenüber der Kopfgruppe gekippt, befinden sich aber weiterhin in trans-Konfiguration. Die Kopfgruppen behalten ihre Fernordnung, können aber bereits leichter gegeneinander verschoben werden. Je nachdem, ob der Zustand der Alkanketten oder die Ordnung der Kopfgruppen betont werden soll, spricht man von „fest geordneter Phase“ oder „Gelphase“.

**$P_{\beta'}$ -Phase** Im sogenannten Vorübergang gehen die Membranen in die Rippelphase über, in der sich eine streifenförmige Überstruktur der Membran entwickelt. Es bilden sich Falten, die sich aus der Membranebene stülpen. Verantwortlich sind dafür vermutlich alternierende flüssige Domänen in den beiden Monolagen der Membran. Die Rippelphase kann also als Übergangszustand zwischen der Gelphase und der im Folgenden beschriebenen fluiden Phase angesehen werden [3].

**L<sub>α</sub>-Phase** Im Hauptübergang (Phasenübergang erster Ordnung) schmelzen die Alkanketten der Lipidmoleküle. „Schmelzen“ bedeutet hier, dass die Kohlenstoffbindungen von der all-trans-Stellung in eine Gleichverteilung von gauche<sup>+</sup>-, gauche<sup>-</sup>- und trans-Konfiguration übergehen. Infolge der Knicke, die durch die gauche-Bindungen entstehen, hat der hydrophobe Anteil nun eine größere laterale Ausdehnung, was sich in einer Ausdehnung der gesamten Membran um etwa 25% niederschlägt. Jeder Kopfgruppe steht nun mehr Platz zur Verfügung, und die Moleküle geben ihre Fernordnung auf. Aufgrund der damit verbundenen höheren lateralen Beweglichkeit der Moleküle spricht man auch von einer „fluiden“ Phase. Soll der Zustand der Alkanketten betont werden, so wird der Begriff „ungeordnete“ Phase verwendet.

### 1.3.1. Die Ehrenfest-Klassifikation der Phasenumwandlungen

Es wurden bereits im Vorfeld die Begriffe „Phasenübergang erster Ordnung“ und „Phasenübergang zweiter Ordnung“ verwendet. Diese Einteilung von Phasenübergängen stammt von Paul Ehrenfest, der diskontinuierliche „Phasenübergänge erster Ordnung“ und kontinuierliche „Phasenübergänge  $n$ -ter Ordnung“ unterscheidet.

Ein Phasenübergang  $n$ -ter Ordnung zeichnet sich dadurch aus, dass die Ableitungen des thermodynamischen Potentials des Systems nach seinen natürlichen Variablen bis zur  $(n - 1)$ -ten Ordnung stetig sind, die  $n$ -te Ableitung aber eine Unstetigkeit aufweist. In der Praxis sind vor allem Phasenübergänge erster und zweiter Ordnung wichtig. Für diese beiden Fälle sollen Eigenschaften der freien Enthalpie  $G(p, T, N)$  betrachtet werden. Die Wahl der freien Enthalpie als Potential ist darin begründet, dass ihre natürlichen Variablen Druck  $p$ , Temperatur  $T$  und Teilchenzahl  $N$  im Experiment am einfachsten zu kontrollieren sind. Der Übergang zu anderen Potentialen ist durch Legendre-Transformation möglich.

In der weiteren Behandlung gehen wir davon aus, dass die Teilchenzahl  $N$  konstant bleibt und alle Zustandsänderungen quasistatisch erfolgen, womit  $dS = \frac{\delta Q}{T}$  gilt. Der Umgebungsdruck  $p$  spielt für ein quasi zweidimensionales System wie eine Lipidmembran eine untergeordnete Rolle gegenüber dem Lateraldruck  $\Pi$ , der analog zum Druck in dreidimensionalen Systemen behandelt werden kann. Wir werden die freie Enthalpie daher schreiben als  $G = G(\Pi, T)$ . Mit der Entropie  $S$  und der Fläche  $A$  lautet das totale Differential somit:

$$dG = -SdT + Ad\Pi \quad (1.9)$$

Die ersten Ableitungen des Potentials sind die Entropie und die Fläche:

$$\left. \frac{\partial G}{\partial T} \right|_{\Pi} = -S(T, \Pi) \qquad \left. \frac{\partial G}{\partial \Pi} \right|_T = A(T, \Pi) \qquad (1.10)$$

Die zweiten Ableitungen sind:

$$\left. \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} \right|_{\Pi} = - \left. \frac{\partial S}{\partial T} \right|_{\Pi} = - \frac{1}{T} \frac{\delta Q}{dT} =: - \frac{1}{T} c_{\Pi} \qquad (1.11)$$

$$\left. \frac{\partial^2 G}{\partial \Pi^2} \right|_T = \left. \frac{\partial A}{\partial \Pi} \right|_T =: -A\kappa_T \qquad (1.12)$$

$c_{\Pi}$  nennen wir isobare Wärmekapazität und  $\kappa_T$  isotherme Flächenkompressibilität. Diese beiden Größen beschreiben die Antwort des Systems auf eine isobare Wärmezufuhr bzw. auf eine isotherme Flächenänderung und sind somit Beispiele für sogenannte Suszeptibilitäten des Systems.

### 1.3.2. Suszeptibilitäten und Fluktuationen

Makroskopischen Zustandsgrößen eines Systems unterliegen Fluktuationen, die immer vorhanden sind, aber mit zunehmender Teilchenzahl unwichtiger werden. Ein interessantes Phänomen der Thermodynamik ist, dass die bereits angesprochenen Suszeptibilitäten eng mit den Fluktuationen der thermodynamischen Größen zusammenhängen. Dieser Zusammenhang soll kurz anhand der Herleitung von Landau und Lifschitz [11] erklärt werden:

Die Entropie kann, wie Ludwig Boltzmann vorschlug, als die statistische Wahrscheinlichkeit eines Makrozustandes interpretiert werden [12].

$$S(n_1, n_2, \dots) = k_B \ln W(n_1, n_2, \dots) \quad \Rightarrow \quad W = e^{S/k_B} \qquad (1.13)$$

Die  $n_i$  sind beliebige thermodynamische Observablen ( $A, \Pi, E, \dots$ ).

Die Einstellung eines Gleichgewichts bedeutet für ein abgeschlossenes System eine Entwicklung hin zu Zuständen höherer Wahrscheinlichkeit. Ist das Gleichgewicht erreicht, befindet sich folglich auch die Entropie in einem Maximum. In einer Entwicklung nach den  $n_i$  kann daher der Term erster Ordnung vernachlässigt werden:

$$S \approx S_0 + \frac{1}{2} \sum_{n_i, n_j} \underbrace{\left( \frac{\partial^2 S}{\partial n_i \partial n_j} \right)}_{=: -\chi_{ij}^{-1}} \Delta n_i \Delta n_j \qquad (1.14)$$

Die Abweichung der Observablen  $n_i$  von ihrem Mittelwert  $n_i^0$  wird hier mit  $\Delta n_i := n_i - n_i^0$  bezeichnet. Die  $\chi_{ij}$  nennen wir verallgemeinerte Suszeptibilitäten. Da  $S_0$  ein Entropiemaximum ist, gilt  $\chi_{ij} > 0$ .

Der Einfachheit halber werden weiter nur die Suszeptibilitäten besprochen, die lediglich von einer Zustandsgröße  $n$  abhängen. Die Ableitungen können für den mehrdimensionalen Fall in [11] (S. 318 ff.) nachvollzogen werden.

(1.14) vereinfacht sich dann zu:

$$S(n) \approx S_0 + \frac{1}{2} \underbrace{\frac{\partial^2 S}{\partial n^2}}_{-\chi_n^{-1}} (\Delta n)^2 \quad (1.15)$$

Mit (1.13) ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung um  $n_0$  gegeben durch:

$$W(n) = \text{const} \cdot e^{S(n)} = \sqrt{\frac{1}{2\pi k_B \chi_n}} \cdot e^{-\frac{1}{2k_B \chi_n} (\Delta n)^2} \quad (1.16)$$

Die Konstante ergibt sich aus der Normierungsbedingung  $\int W(n) dn = 1$ . Die Wahrscheinlichkeit folgt also einer Gaußverteilung. Für das mittlere Quadrat der Fluktuationen von  $n$  gilt deshalb folgende Beziehung:

$$\langle (\Delta n)^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} (\Delta n)^2 W(n) dn = k_B \chi_n \quad (1.17)$$

Abschließend wollen wir diese Beziehung noch für  $n = H$  und  $n = A$  berechnen.

Aus  $dS = \frac{1}{T} dH + \frac{\Pi}{T} dA$  folgt für die Fluktuationen der Enthalpie:

$$\langle (\Delta H)^2 \rangle = k_B \chi_H = -k_B \left( \frac{\partial^2 S}{\partial H^2} \right)_{\Pi}^{-1} = k_B \left( \frac{1}{T^2} \frac{\partial T}{\partial H} \right)_{\Pi}^{-1} = k_B T^2 c_{\Pi} \quad (1.18)$$

Aus  $dS = \frac{1}{T} dE + \frac{\Pi}{T} dA$  folgt für die Fluktuationen der Fläche:

$$\langle (\Delta A)^2 \rangle = k_B \chi_A = -k_B \left( \frac{\partial^2 S}{\partial A^2} \right)_{E}^{-1} = k_B \frac{1}{T} \left( \frac{1}{T} \frac{\partial \Pi}{\partial A} \right)_{E}^{-1} = k_B A T \kappa_T \quad (1.19)$$

Die isobare Wärmekapazität ist also proportional zu den Schwankungen der Entropie und die isotherme Kompressibilität proportional zu den Schwankungen des Volumens. Nehmen die Suszeptibilitäten einen Extremwert an, wie es in der Nähe von Phasenübergängen der Fall ist, so ergeben sich folglich Maxima der inversen Krümmung des Entropiepotentials, was zu extrem großen Fluktuationen führt.

In Filmwaagen-Experimenten mit Lipidmonolagen wurden lineare Zusammenhänge zwischen Wärmekapazität  $c_{\Pi}$ , Kompressibilität  $\kappa_T$ , elektrischer Kapazität  $C_T$  und isobarem Expansionskoeffizienten  $\alpha_{\Pi}$  in der Nähe eines kritischen Punktes gefunden [13]:

$$c_{\Pi} \propto \kappa_T \propto C_T \propto \alpha_{\Pi} \quad (1.20)$$

### 1.3.3. Klassische Landau–Theorie

Lev Landau entwickelte eine phänomenologische Beschreibung von Phasenübergängen, die in [14] (S.428 ff) beschrieben wird. Er charakterisiert die Symmetrie eines Zustandes mittels eines Ordnungsparameters  $\eta$ . Welcher Parameter konkret verwendet wird, hängt vom System und der konkreten Fragestellung ab. Wichtig ist nur, dass der Ordnungsparameter von einem endlichen Wert im Zustand niedriger Symmetrie auf  $\eta = 0$  beim Zustand höherer Symmetrie abnimmt. Das thermodynamische Potential des Systems wird nun als Funktion von Druck, Temperatur und Ordnungsparameter  $G(\Pi, T, \eta)$  betrachtet. Dabei sind allerdings nur  $\Pi$  und  $T$  frei wählbare Variable.  $\eta$  ist dadurch bestimmt, dass das System immer einen Zustand minimaler freier Energie einnimmt.

$G$  wird nun nach dem Ordnungsparameter  $\eta$  bis zur vierten Ordnung entwickelt:

$$G(\Pi, T, \eta) = G_0 + A_1\eta + A_2\eta^2 + A_3\eta^3 + A_4\eta^4 + \dots \quad (1.21)$$

Ohne den Einfluss externer Felder soll das Landau-Potential symmetrisch bezüglich  $\eta \rightarrow -\eta$  sein. In diesem Falle gilt.  $A_1 = A_3 = 0$ . Weiterhin wird angenommen, dass  $A_2$  als Funktion der Temperatur um die Phasenübergangstemperatur  $T^*$  entwickelt werden kann:

$$A_2(\Pi, T) = a(\Pi)(T - T^*) \quad (1.22)$$

Somit vereinfacht sich (1.21) zu

$$G(\Pi, T, \eta) = G_0(\Pi, T) + \underbrace{a(\Pi)(T - T^*)}_{A_2(\Pi, T)}\eta^2 + A_4(\Pi, T)\eta^4 \quad (1.23)$$

mit

$$A_4(\Pi, T) = A_4(\Pi) > 0 \quad (1.24)$$

Letztere Bedingung muss gelten, da ansonsten die Energie durch  $\eta \rightarrow \pm\infty$  minimiert werden könnte. Abbildung 1.7 zeigt die Form von  $G(\Pi, T)$  bei konstantem Druck für verschiedene Temperaturen.

Für  $a(\Pi) > 0$  geht der Ordnungsparameter wie in Abbildung 1.7 geplottet mit steigender Temperatur kontinuierlich von endlichen Werten zu  $\eta = 0$  über. Dies entspricht einem Übergang 2. Ordnung von der unsymmetrischen zur symmetrischen Phase. Lipidmembranen durchlaufen bei tiefen Temperaturen einen solchen Übergang z.B. von der kristallinen zur Gel-Phase mit  $a(\Pi) < 0$ .

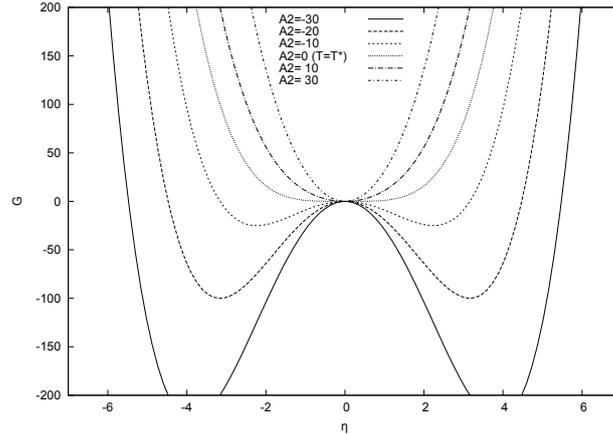


Abbildung 1.7.  $G(\Pi, T)$  für  $G_0 = 0$  und  $A_4 = 1$  bei verschiedenen  $A_2$  (Einheiten beliebig). Bei  $A_2 = 0$  erreicht der Ordnungsparameter  $\eta = 0$ .

### 1.3.4. Landau–Theorie des Hauptübergangs (erster Ordnung)

Obwohl ursprünglich nur für kontinuierliche Phasenübergänge konzipiert, lässt sich die Landau–Theorie auch einsetzen, um Phasenübergänge erster Ordnung zu analysieren. Albrecht et al. verwendeten sie 1978 zur Analyse des Hauptübergangs von Lipidmonolagen, deren Eigenschaften auf die Hauptumwandlung von Doppelschichten übertragen werden können [15]. Anhand dieser Arbeit soll jetzt die Landau–Theorie für diskontinuierliche Phasenübergänge behandelt werden.

#### Die Wahl des Ordnungsparameters

Um die möglichen Symmetriebrüche in Lipidmonolagen vollständig zu erfassen, wird als Ordnungsparameter der sog. deGennes–Dehnungsvektor  $\vec{J}$  [16] eingeführt:

$$\vec{J} = \rho \langle \vec{R}_{m+1} - \vec{R}_m \rangle = \rho \cdot \vec{J}_0 \quad (1.25)$$

$\rho$  gibt die Dichte der monomeren Untereinheiten (z.B. C–C–Bindung) der Lipide an. Für fluide Phasen ist diese lateral isotrop, für kristalline Phasen kann sie durch eine Überlagerung von ebenen Wellen beschrieben werden. Die Richtung von  $\vec{J}_0$  beschreibt das statistische Mittel der Ausrichtung der Lipide. Sein Betrag  $|\vec{J}_0|$  misst die Länge ihrer Projektion auf diese Richtung. Abbildung 1.8 zeigt schematisch die Verhältnisse für  $\rho$  und  $\vec{J}$  in verschiedenen denkbaren Phasen.

#### Die Entwicklung des Potentials

Der Hauptübergang von der  $L_C$ –Phase zur  $L_E$ –Phase entspricht einem Übergang von einer kristallinen Phase mit gekippten Alkanketten zu einer fluiden,

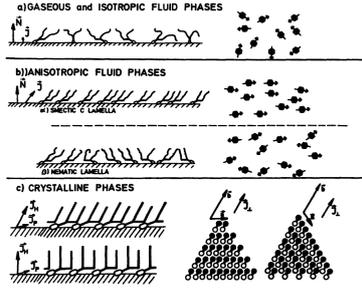


Abbildung 1.8 [aus [15]] Die Verhältnisse der Dichte und der Dehnungsvektoren für verschiedene flüssigkristalline Phasen. Für die kristallinen Phasen sind die Dehnungsvektoren der Kopfgruppe  $\vec{J}_P$  und der Alkylketten  $\vec{J}_H$  getrennt angegeben.

smektischen Phase. Da sich  $\vec{J}_0$  dabei nur leicht ändert, die kristalline Symmetrie aber gebrochen wird, erscheint es sinnvoll, das Potential zunächst im Sinne von (1.21) nach der lateralen Dichte zu entwickeln:

$$G(\Pi, T, \rho) = G_0(\Pi, T) + A_2(\Pi, T)(\Delta\rho)^2 + A_4(\Pi, T)(\Delta\rho)^4 + A_6(\Pi, T)(\Delta\rho)^6 \quad (1.26)$$

$(\Delta\rho) := (\rho - \rho_{LE})/(\rho_{LC} - \rho_{LE})$  ist der Unterschied der lateralen Dichte zur Dichte in der hochsymmetrischen, expandierten Phase. Der Term sechster Ordnung wird später benötigt, um  $G > 0$  für  $\rho \rightarrow \pm\infty$  garantieren zu können. Mit (1.26) würde sich ein Phasenübergang 2. Ordnung ergeben, was jedoch den experimentellen Ergebnissen widerspräche. Das Problem liegt darin, dass (1.26) die Kopplung der lateralen Dichte an die Kettenorientierung vernachlässigt. Albrecht et al. berücksichtigen die Kettenneigung deshalb in einem zusätzlichen Term:

$$G_K = \frac{1}{2}K(\Theta - \Theta_{LE})^2 - t \cdot \rho^2 \cdot (\Theta - \Theta_{LE}) \quad (1.27)$$

$\Theta$  bezeichnet den Neigungswinkel des Dehnungsvektors gegen die Membrannormale. Der erste Term entspricht der Energie, die zur Verkippung der Ketten während der Umwandlung aufgewendet werden muss.  $K$  ist damit ein Elastizitätsmodul der Kettenneigung. Der zweite Term ist der Kopplungsterm der niedrigsten Ordnung. Er darf von der ersten Ordnung in  $(\Delta\Theta) := (\Theta - \Theta_{LE})$  sein, da der Symmetriebruch nur in  $\Delta\rho$  geschieht. Der Zusammenhang zwischen  $(\Delta\rho)$  und  $(\Delta\Theta)$  kann leicht durch Minimierung von  $G_K$  nach  $\Theta$  gefunden werden:

$$(\Delta\Theta) = \frac{t}{K}|\rho|^2 \quad (1.28)$$

Für die Gesamtenergie gilt jetzt also:

$$G(\Pi, T, \rho) = G_0 + A_2(\Delta\rho)^2 + \left(A_4 - \frac{t^2}{2K}\right)(\Delta\rho)^4 + A_6(\Delta\rho)^6 \quad (1.29)$$

### Der Phasenübergang erster Ordnung

So lange gilt  $A_4 < \frac{t^2}{2K}$ , zeigt  $G$  ein völlig anderes Verhalten, als beim Phasenübergang zweiter Ordnung. In Abbildung 1.9 ist zu sehen, wie bei steigender Temperatur bzw. größer werdendem  $A_2$  ab  $T = T^*$  zwei Minima existieren. Da sich das System in einem metastabilen Zustand mit  $\rho > 0$  befindet, kann dieser noch erhalten bleiben, wenn das thermodynamische Gleichgewicht bereits überschritten ist. Erst bei einer Temperatur  $T = T^{**}$  muss das System in den Zustand höherer Symmetrie übergehen. Die gleichen Schlussfolgerungen gelten umgekehrt bei sinkender Temperatur. Das Potential erklärt also die Hysterese, die für Phasenübergänge erster Ordnung typisch ist (Siede-/Gefrierverzögerung). Störungen des Systems (z.B. Kristallisationskeime) können dazu führen, dass die Energiebarriere zwischen beiden Maxima schneller überwunden werden kann und eine Hysterese ausbleibt.

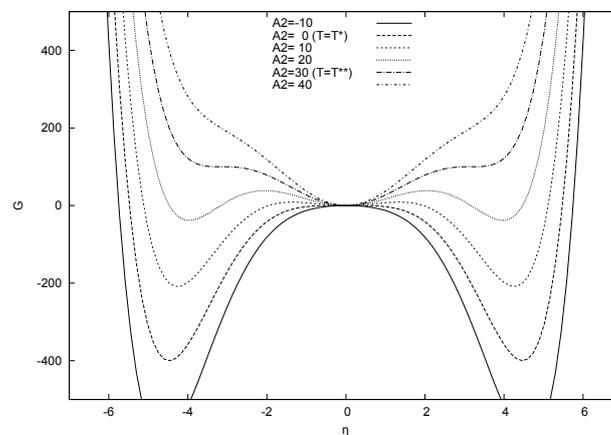


Abbildung 1.9.  $G(\Pi, T)$  für  $G_0 = 0$  und  $A_4 < \frac{t^2}{2K}$  bei verschiedenen  $A_2$  (Einheiten beliebig). Der Verlauf zeigt das typische Verhalten für einen Phasenübergang erster Ordnung.

$K$  steigt mit zunehmendem Druck an, während für  $t$  ein entgegengesetztes Verhalten angenommen wird. Ab einem gewissen Druck wird also  $A_4 > \frac{t^2}{2K}$  gelten. In diesem Moment geht der Phasenübergang erster Ordnung in einen Phasenübergang zweiter Ordnung über, wie er in Abbildung 1.7 gezeigt wurde.

Dieser Übergang ist eine Folge der Kopplung von Dichte- und Orientierungsordnung. Der Punkt, an dem dieser Übergang stattfindet, wird trikritischer Punkt genannt. Bei Lipiden wird oftmals nur von einem kritischen Punkt gesprochen, was bedeuten würde, dass an diesem Punkt die beiden Phasen wie beim van-der-Waals-Gas nicht mehr zu unterscheiden wären. Tatsächlich macht der Symmetriebruch von fluider Verteilung der Moleküle hin zu kristalliner Ordnung aber immer eine Unterscheidung möglich.

## 2. Einleitung

Der Transport größerer Moleküle und Partikel durch Membranen ist ein ubiquitärer Prozess in lebenden Zellen, bei dem die zu transportierende Fracht („Cargo“) durch einen Teil der Plasmamembran umhüllt und so internalisiert wird. Die Biologie kennt hier, je nach Art des transportierten Stoffes und der am Prozess beteiligten Strukturen, unterschiedliche Endozytosepfade. Grundsätzlich unterschieden werden die Pinozytose („Zelltrinken“) und die Phagozytose („Zellfressen“), also die Aufnahme von Flüssigkeiten beziehungsweise von Feststoffen [17]. Eine weitere übliche Unterteilung richtet sich nach Molekülen, die bei der Bildung von Membranvesikeln und deren Abschnürung von der Zellmembran involviert sind. Doherty und McMahon schildern in [18] ausführlich die bekannten Aufnahmepfade und das übliche Verständnis dieser Vorgänge. Es wird dort auch deutlich, dass die Unterscheidung verschiedener Aufnahmeprozesse keineswegs empirisch eindeutig ist, sondern vielmehr dem Bedürfnis der Strukturierung eines äußerst komplexen und unübersichtlichen Themas geschuldet ist. Beispielsweise spielen Proteine, die typisch für einen Endozytose-Mechanismus sind, häufig auch für andere Pfade eine tragende Rolle. Genauso wird eine spezielle Fracht meist nicht nur über einen, sondern über mehrere unterschiedliche Mechanismen transportiert.

Diese Arbeit beschränkt sich auf die Wechselwirkung von Membranen mit sphärischen Nanopartikeln (NP). Einerseits sind diese Partikel zu einer einfachen Modellentwicklung geeignet, andererseits spielen Nanopartikel eine immer wichtigere Rolle in verschiedenen Industriezweigen wie Nahrungsmittel- und Kosmetikherstellung, sowie in medizinischen Anwendungen. Aufgrund ihrer Größe weisen NP besondere Wechselwirkungen mit Zellmembranen auf, wie man sie z.B. auch für große Biomoleküle und Viren beobachtet. Auch Nanopartikel können auf verschiedenen Wegen Zellmembranen durchdringen [19]–[23]. Diese Eigenschaften können zum gezielten Wirkstofftransport medizinisch genutzt werden, andererseits erzeugen sie neuartige Risiken, die im relativ neuen Forschungsfeld der Nanotoxikologie betrachtet werden. In Tierversuchen wurde zum Beispiel die inflammatorische Wirkung von NP und deren fruchtschädigende Wirkung nachgewiesen [24], [25]. In diesen und anderen Untersuchungen wird in aller Regel eine starke Größenabhängigkeit der beobachteten Effekte berichtet. Beispielsweise untersuchten Gao et al. die Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen durch wirkstoffbeladene NP. Sie wiesen deutlich höhere Transportraten für Partikel mit einem Durchmesser von 70 nm nach als für größere Partikel [26]. Hanada et al. berichten ein Maximum der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für einen

Partikeldurchmesser von **30 nm** [27]. Ein systematisches Verständnis dieser Vorgänge würde nicht nur zum Verständnis zellulärer Abläufe helfen sondern auch Wege zur Optimierung von Drug-Delivery-Systemen aufzeigen und zur Risikobetrachtung neuer Materialien beitragen [28].

Physikalische Modelle legen zwar eine Größenabhängigkeit für solche Aufnahmeprozesse nahe, systematische experimentelle Studien zu diesem Thema sind jedoch noch selten. Insbesondere die simultane Aufnahme vieler Partikel wurde bis heute noch kaum untersucht. Gegenstand der folgenden Kapitel soll es sein, genau solche Daten zu erheben und mit den vorhandenen Modellen zu vergleichen. Lipidvesikel sind in sich geschlossene Lipidmembranen, die einen inneren Bereich umhüllen und somit topologisch einer Zelle entsprechen. Besitzen diese Gebilde nur eine einschichtige Doppelmembran und entsprechen sie auch in ihrer Größe der typischen Größe einer Zelle, werden sie Riesenvesikel genannt (giant unilaminar vesicle – GUV). Solche Vesikel werden häufig als Zellmodelle verwendet [29]. Dass sie zu einer passiven Partikel Aufnahme, also einer Aufnahme ohne die Zufuhr chemisch gespeicherter Energie fähig sind, wurde bereits mehrfach gezeigt [30], [31]. Es handelt sich dabei aber in vielen Fällen um elektronenmikroskopische Studien, in denen membranumhüllte Partikel im Inneren von Vesikeln nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.1 (a)). Alle diese Studien haben das Problem gemeinsam, dass die Vesikel bei der Cryo-Elektronenmikroskopie nur noch im eingefrorenen Zustand untersucht werden können. Es kann deshalb nicht zweifelsfrei unterschieden werden, ob ein Partikel vor dem Einfrieren noch mit der Vesikelmembran verbunden war oder zusätzlich zur vollständigen Umhüllung auch eine Abschnürung der Membran stattgefunden hat. Bei dieser Methode sind die Vesikel im Moment des Einfrierens starken thermischen Veränderungen unterworfen, die das Untersuchungsergebnis stark beeinflussen könnten.

Dass ein massenhafter Einschluss von Partikeln in GUVs stattfindet und somit ein endozytoseähnlicher Prozess unter bestimmten Bedingungen möglich ist, wurde in eigenen Arbeiten [32] direkt beobachtet und experimentell untersucht. Wie in Abbildung 2.1 zu erkennen ist, konnte eine massive Konzentration von Partikeln innerhalb von Vesikeln erreicht werden, ohne dass dabei aktive Prozesse beteiligt sind. Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, dass bereits etwas früher bzw. zeitgleich von Michel et al. [33]–[35] Lichtstreuungsexperimente zu ähnlichen Prozessen durchgeführt wurden und entsprechende Ergebnisse lieferten. Während Michel et al. die Partikel Aufnahme hauptsächlich unter dem Gesichtspunkt der technischen Ausnutzung für die Entwicklung von Partikel–Liposom–Hybridsystemen untersucht wurde, soll hier die Betonung auf dem Verständnis der Vorgänge und ihrer Bedeutung für biologische Zellfunktionen liegen.

Wenn Partikel auf Lipidmembranen treffen, sind grundsätzlich verschiedene Szenarien vorstellbar, durch die ein Partikel von einer Membranseite zur anderen gelangen kann. Sowohl in Simulationen [36], [37] als auch in

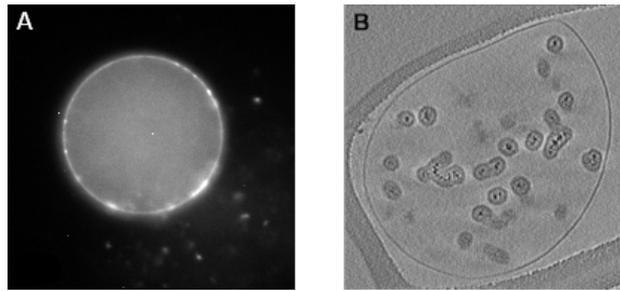


Abbildung 2.1. A) Fluoreszenzmarkierte Partikel im Inneren eines Riesenvesikels. Die Lipidmembran ist hier nicht sichtbar, wohl aber die massiv erhöhte Partikelkonzentration im Vesikelinneren und an der Membran. B) [übernommen aus [31]] Mehrere Silica-Partikel im Inneren eines unilaminaren Vesikels, sichtbar gemacht durch Cryo-TEM. Die Partikel sind von einer Membranschicht umhüllt.

verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass sehr kleine Partikel unter den richtigen Bedingungen die Membran direkt durchdringen können. Eine solche Penetration geht häufig mit der Bildung metastabiler Poren einher [38]. Insbesondere für kationische Partikel werden solche Penetrationsmechanismen mit Bildung transients Poren vermutet [39].

Im Weiteren soll jedoch ausschließlich die Aufnahme von Partikeln betrachtet werden, die die Membran nicht direkt durchdringen können. Die einzige Möglichkeit einer Aufnahme ist hier ein endozytoseähnlicher Prozess, bei dem Partikel von der Membran umhüllt werden. Unter „endozytoseähnlichen Prozessen“ sollen dabei alle Transportvorgänge verstanden werden, bei denen biologische Membranen adhätierende Objekte (Partikel, Proteine, usw.) umhüllen, um sie ins Innere von abgeschlossenen biologischen Einheiten zu transportieren. Sie umfassen die in Abbildung 2.2 grundlegenden Prozessschritte.

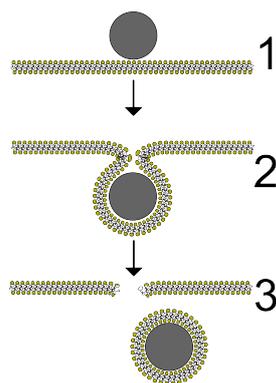


Abbildung 2.2 [übernommen aus [32]] Ein endozytose-ähnlicher Prozess soll hier so verstanden werden, dass im Wesentlichen drei Schritte stattfinden: (1) die Adhäsion eines Partikels an die Membran. (2) seine Umhüllung. (3) die Abschnürung eines Vesikels. Während des letzten Schritts entsteht gezwungener Maßen ein Defekt, der durch Umordnung der Membranmoleküle ausheilen muss. [32]

Es soll nun gezeigt werden, dass schon die Wechselwirkung zwischen Partikeln und reinen Lipidmembranen zur vollständigen Aufnahme und Konzentration dieser Partikel führen und durch den thermodynamischen Zustand der

Membran gesteuert werden kann. Dies widerspricht der häufig anzutreffenden Auffassung, dass bei der Bildung Cargo-beladener Vesikel zwingend aktive, also energieverbrauchende Prozesse beteiligt sein müssen. Grundlegende Funktionen einer Partikelaufnahme scheinen bereits in extrem einfachen, passiven Systemen angelegt zu sein. Folgende Fragen sollen im Speziellen beantwortet werden:

- Welche physikalischen Wechselwirkungen spielen bei der beobachteten Partikelaufnahme eine tragende Rolle?
- Wie kann die Aufnahme auf Basis einer fundamentalen physikalischen Beschreibung modelliert werden?
- Kann die Partikelaufnahme durch Veränderung des thermodynamischen Membranzustands gesteuert werden?

Diese Aspekte werden sowohl theoretisch beleuchtet als auch experimentell untersucht. Dafür werden Wechselwirkungen zwischen reinen Lipidmembranen in Form von Riesenvesikeln und Nanopartikeln untersucht, und ein entsprechendes numerisches Modell entwickelt. Schließlich wird die Frage diskutiert, welche Relevanz die gewonnenen Erkenntnisse für lebende Zellen haben.

### **3. Entwicklung eines Modells zur unlimitierten Partikel Aufnahme**

Wie bereits angedeutet, wird experimentell keineswegs nur ein Einschluss weniger Partikel durch Vesikel beobachtet, sondern eine massive Aufnahme und Anreicherung von Partikeln, die über eine längere Zeit zu einer Schrumpfung des Vesikels führt. Es soll nun ein erstes Modell abgeleitet werden, mit dem eine solche Aufnahme beschrieben werden kann. Die Aufnahmekinetik soll später mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden. Die vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen von [32] und [40] veröffentlicht.

### 3.1. Einleitung

In unseren Experimenten, auf die später noch genauer eingegangen wird, konnten drei fundamental unterschiedliche Aufnahmeszenarien beobachtet werden (siehe Abbildung 3.1). In vielen Fällen (z.B. ohne Zugabe von Ionen oder bei sehr großen Partikeln) findet keinerlei Interaktion der Partikel mit dem Vesikel statt. In anderen Fällen wird zunächst ein Anhaften von Partikeln beobachtet das ggf. von einer initialen Aufnahme einzelner Partikel begleitet sein kann. Nur unter gewissen Umgebungsbedingungen (Partikelgröße, thermodynamischer Zustand, Ionenkonzentration) geht diese anfängliche Aufnahme in eine kontinuierliche Aufnahme vieler Partikel über, die zu einer signifikanten Schrumpfung des Vesikels führt. Im folgenden wird dieses Szenario als „unlimitierte Aufnahme“ bezeichnet. Auf diesen Fall wollen wir hauptsächlich eingehen, da hier offensichtlich eine hohe biologische Relevanz gegeben ist.

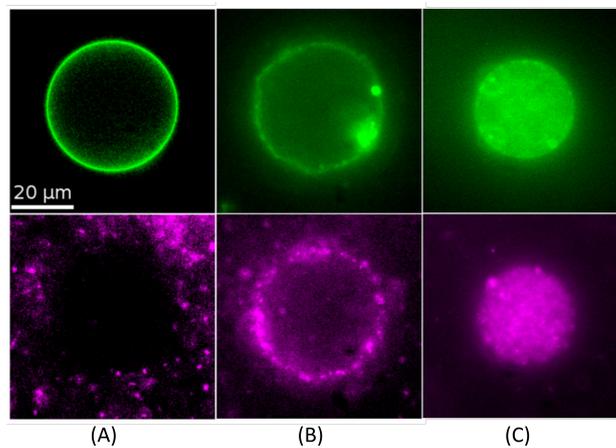


Abbildung 3.1. [Abbildungen übernommen und adaptiert aus [32]] Experimentell beobachtete Aufnahmeszenarien für unterschiedliche Umgebungsbedingungen (Lipid: grün/oben, Partikel: magenta/unten). (A) Ein Vesikel in der fluiden Phase zeigt keinerlei Interaktion mit Partikeln mit Durchmesser 123 nm. (B) 123 nm-Partikel adhäreren an ein Vesikel in der Gel- bzw. Rippel-Phase bei sonst zu (A) identischen Bedingungen. Einzelne Partikel können im Vesikelinneren beobachtet werden. (C) Ein flüdes Vesikel nimmt massiv Partikel des Durchmessers 42 nm auf und schrumpft dabei.

Abbildung 3.2 (A) zeigt eine typische Kurve für den Zeitverlauf der Vesikeloberfläche  $A(t)$  eines Vesikels während der Partikelaufnahme. Klar zu erkennen ist die massive Schrumpfung, die sich einer Oberfläche  $A(t) \approx 0$  annähert. Zusätzlich sind die wichtigsten Beiträge für die freie Energie des Membran-Partikel-Systems skizziert.

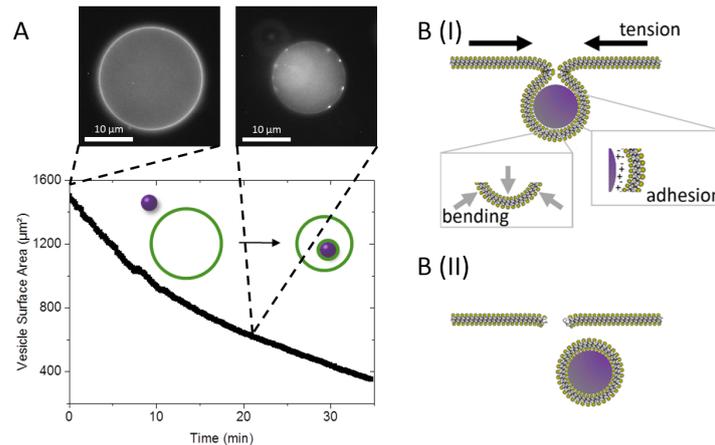


Abbildung 3.2. [übernommen aus [40]] A) Typischer Zeitverlauf der Vesikeloberfläche  $A(t)$  eines schrumpfenden GUV bei der Aufnahme von Partikeln. Die mikroskopischen Aufnahmen illustrieren den Zustand nach  $t = 0$  min und  $t = 20$  min. B(I) Beschreibung der grundlegenden Energieeinflüsse während der Partikel Aufnahme: Lateralspannung durch den Verbrauch von Vesikeloberfläche, Biegeenergie durch die Anpassung an die Partikeloberfläche und durch ionische Wechselwirkung verursachte Adhäsion. B(II) Wir gehen davon aus, dass nach der Aufnahme eines Partikels eine transiente Pore in der Membran existiert, die sich erst nach einer gewissen Lebensdauer  $\tau$  schließt.

Bei vereinfachter Betrachtung tragen mindestens drei physikalische Größen zur freien Enthalpie des Gesamtsystems  $G(T, p)$  bzw. zu der entsprechenden Energiedichte (Energie pro Membranfläche  $A$ )  $g := dG/dA$  bei:

- Die Wechselwirkung der Oberflächen von Partikel und Membran kann prinzipiell natürlich attraktiv oder repulsiv sein. Da im letzteren Falle eine Partikel Aufnahme jedoch von vornherein ausgeschlossen ist, betrachten wir im Weiteren nur den attraktiven Fall. Wir bezeichnen die auftretende Adhäsionsenergie mit  $G_{\text{ad}}$ , beziehungsweise ihre Dichte oder die „Adhäsionsstärke“ mit  $g_{\text{ad}} < 0$ .
- Aufgrund der (relativ zu den relevanten Längenskalen) hohen Biegesteifigkeit von Lipidmembranen muss eine signifikante Biegeenergie  $g_{\text{B}}$  aufgewendet werden, um die Membran um ein Partikel zu krümmen. Für fluide Membranen wird  $g_{\text{B}}$  meistens durch die von Helfrich [6] vorgeschlagene Näherung beschrieben (siehe 1.2.3).
- Membranen, die unter lateraler Spannung stehen, tragen zudem eine Spannungsenergie(dichte)  $g_{\text{A}} > 0$ , die bei einer Partikel Aufnahme durch den Verlust von Membranfläche erhöht wird, falls das Vesikelvolumen während des Prozesses erhalten bleibt.

## 3.2. Theoretische Grundlagen und Überlegungen

### 3.2.1. Modelle zur Membranen–Partikel–Wechselwirkung

In der Literatur findet sich eine Vielzahl theoretischer Modelle, die versuchen, die Wechselwirkung zwischen Festkörperpartikeln und Lipidmembranen anhand der oben genannten Energiebeiträge zu beschreiben. Die wichtigsten Ansätze sollen im Folgenden kurz beleuchtet werden.

#### Membrankrümmung

Geht man davon aus, dass ein Partikel an eine Membran adhärert und die laterale Spannung der Membran während des Prozesses vernachlässigbar klein bleibt, so wird ein Partikel von der Membran umhüllt, solange die Adhäsionsenergie pro Fläche die aufzuwendende Biegeenergie übersteigt und somit die Änderung der freien Energiedichte des Systems negativ ist. Es muss damit gelten:

$$g = g_B + g_{ad} < 0 \quad (3.1)$$

Während die Adhäsionsenergie pro Flächeneinheit in erster Näherung von der Krümmung der Partikeloberfläche und damit der Partikelgröße unabhängig ist, nimmt die Biegeenergie mit höherer Krümmung zu. In erster Näherung kann die Biegeenergie einer fluiden, geschlossenen und symmetrischen (d.h. vernachlässigbare spontane Krümmung) Lipidmembran nach Helfrich [6] beschrieben werden mit:

$$g_b = \frac{2K_b}{r^2} \quad (3.2)$$

Man kann also erwarten, dass sehr kleine Partikel aufgrund ihrer hohen Oberflächenkrümmung nicht mehr von einer Membran umschlossen werden können. Es lässt sich daraus leicht ein minimaler Partikelradius  $r^*$  ableiten, ab dem ein Partikeleinschluss prinzipiell möglich ist (siehe dazu auch [41]):

$$r^* := \sqrt{\frac{2K_b}{g_{ad}}} \quad (3.3)$$

Setzt man hier typische Werte für Lipidmembranen und unspezifische Adhäsion ( $K_b = 10^{-19} \text{ J} \approx 20k_B T$  und  $g_{ad} = 10^{-3} \text{ J/m}^2$ ) ein, so ergibt sich  $r^* \approx 14 \text{ nm}$ . Dieses rudimentäre Modell sagt also voraus, dass Partikel umso eher von Membranen umhüllt werden, je größer sie sind. Diese Aussage steht jedoch in klarem Widerspruch zu unseren Beobachtungen und zu Untersuchungen zur Aufnahme von Nanopartikeln durch Zellen sowie Modellmembranen. Verschiedene Studien zeigen, dass für eine bestimmte Kombination aus Partikel und Membran ein Optimalwert für die Partikelgröße existiert, bei dem

die Aufnahme maximal ist. Die angegebenen Werte variieren je nach untersuchtem System, liegen aber bei lebenden Zellen in der Regel im Bereich zwischen 10 nm und 100 nm [42]–[45]. Sehr große Partikel scheinen ebenso wie zu kleine nicht ideal für eine Aufnahme geeignet zu sein. Aufgrund der alleinigen Betrachtung der Biegespannung ist eine solche Tendenz nicht zu erklären.

### Lateralspannung

Vesikel (und mit Einschränkungen auch Zellen) sind geschlossene Objekte und weisen daher ein mehr oder minder konstantes Volumen als wichtige Randbedingung auf. Da bei den beschriebenen Einschlussprozessen Membranfläche verbraucht wird, kann man also erwarten, dass, wie in Abbildung 3.2 skizziert, der Innendruck und damit die laterale Spannung der Membran (Oberflächenspannung des Vesikels) während der Partikelaufnahme zunehmen.

Qualitativ kann dieser Zusammenhang auch in unseren Experimenten direkt beobachtet werden. In Abbildung 3.3 sind zwei Vesikel zu sehen, die aneinander adhären. Innerhalb der ersten Minuten der Partikelaufnahme zeigt sich zunächst eine Vergrößerung der Kontaktfläche, was vermutlich auf eine Veränderung der Linienspannung an der Kontaktlinie oder die Reduktion von abstoßenden Membranundulationen zurückzuführen ist. Mit zunehmender Partikelaufnahme verkleinert sich die Kontaktfläche aber schnell wieder aufgrund der zunehmenden Membranspannung.

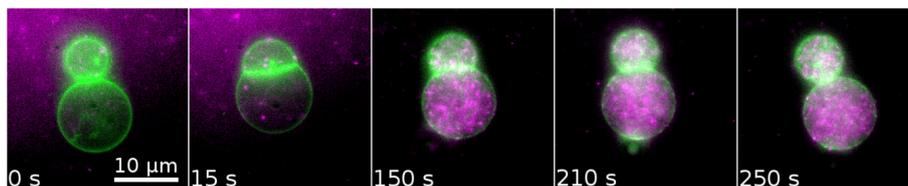


Abbildung 3.3. Gezeigt ist hier eine Zeitsequenz, in der zwei DOPC-Vesikel aneinander adhären. Die Zugabe von  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln (48 nm) bewirkt zunächst eine Vergrößerung der Adhäsionsfläche. Mögliche Gründe könnten die Anlagerung von wenigen Partikeln an der Kontaktlinie sein, ebenso wie eine Reduktion von Membranundulationen. Wenige Sekunden später kann jedoch eine Partikelaufnahme beobachtet werden, die zu einer Vergrößerung der Membranspannung und folgerichtig zu einer sukzessiven Verkleinerung der Adhäsionsfläche führt.

Offensichtlich wird der Einfluss der Lateralspannung vor allem die Aufnahme großer Partikel behindern, was von Dietrich et al. sowohl experimentell als auch theoretisch untersucht [46] wurde. Die Autoren betrachten die Umhüllung von Latexkugeln durch die Membran von Riesenvesikeln und zeigen, dass ein vollständiger Einschluss einer solchen Kugel nur bis zu einer gewissen Größe möglich ist.

Die Fläche, die die Lipidmoleküle im völlig entspannten Zustand einnehmen würden, nennen wir  $A_{\text{lip}}$ , die tatsächliche Oberfläche des Vesikels  $A$ . Der

relative Flächenüberschuss  $\epsilon$  wird damit folgendermaßen definiert:

$$\epsilon := \frac{A_{\text{lip}} - A}{A_{\text{lip}}} \quad (3.4)$$

Vernachlässigt man thermische Fluktuationen (Undulationen), so ist die Membran für  $\epsilon \geq 0$  völlig entspannt. Die Gleichgewichtsgestalt des Vesikels hängt dann von  $\epsilon$  und eventuellen Asymmetrien der Membran ab. Für  $\epsilon < 0$  nimmt das Vesikel die Form einer idealen Kugel an. Mit weiter abnehmenden Werten baut sich eine zunehmende laterale Membranspannung  $\sigma$  auf. Bei konstantem Flächenkompressionsmodul  $K_A$  gilt für die laterale Spannung der Membran:

$$\sigma \stackrel{\epsilon \leq 0}{=} -K_A \epsilon \quad (3.5)$$

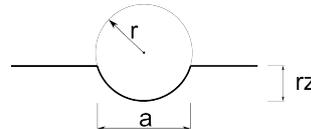
Entsprechend gilt für die im Vesikel gespeicherte Spannungsenergie unter der Annahme  $K_A = \text{const}$ :

$$G_A \stackrel{\epsilon \leq 0}{=} -\frac{1}{2} K_A \epsilon^2 A_{\text{lip}} \quad (3.6)$$

Wird nun ein Partikel mit Radius  $r$  von solch einem Vesikel eingeschlossen, erhöht sich zum einen das von der Membran umschlossene Volumen um das Partikelvolumen, andererseits wird die Membran aus der Kugelform gezwungen (s. Abb. 3.2). Beides führt dazu, dass  $\epsilon$  kleiner wird und die Membranspannung steigt.

Es hängt jetzt vom Größenverhältnis von Partikel und Vesikel und vom Flächenelastizitätsmodul  $K_A$  der Membran ab, wie weit ein Partikel umhüllt werden kann. Der Nomenklatur aus [46] folgend, messen wir die Eindringtiefe des Partikels in Einheiten des Partikelradius (siehe Abbildung 3.4). Hier bedeutet  $z = 2$  einen vollständigen Einschluss, den wir als Voraussetzung einer späteren Abschnürung eines umhüllten Partikels von der Muttermembran ansehen.

Abbildung 3.4 Geometrische Verhältnisse bei einem Kontakt zwischen Vesikel und Partikel.



Wir benennen die initialen Werte für die geometrischen Variablen jeweils mit dem Index  $_0$  (z.B.  $\epsilon_0$ ,  $A_0 = A_{\text{lip}}$ ). Betrachtet man den Fall sehr kleiner Partikel (Partikelradius  $r \ll R_0$  Vesikelradius), so kann der Effekt der Volumenvergrößerung bei solch einem Vorgang in guter Näherung vernachlässigt werden. Die mit der Membrandehnung verbundene Spannungsenergie lässt sich aus 3.6 errechnen:

$$G_A(z) = \frac{K_A (\pi z^2 r^2 - \epsilon_0 A_0)^2}{2 A_0} \quad (3.7)$$

Ihr steht die Adhäsionsenergie gegenüber:

$$G_{ad}(z) = -g_{ad} 2\pi z r^2 \quad (3.8)$$

Im Gleichgewicht mit der Eindringtiefe  $z_{eq}$  muss für die Gesamtenergie  $G = G_A + G_{ad}$  gelten:

$$\left. \frac{dG}{dz} \right|_{z_{eq}} = \frac{K_A}{A_0} (\pi r^2 z^3 - \epsilon_0 A_0 z) - g_{ad} = 0. \quad (3.9)$$

Für einen vollständigen Einschluss  $z_{eq} = 2$  gilt folglich die Voraussetzung:

$$\frac{g_{ad}}{K_A} = \left( \frac{2r}{R_0} \right)^2 - 2\epsilon_0 \quad (3.10)$$

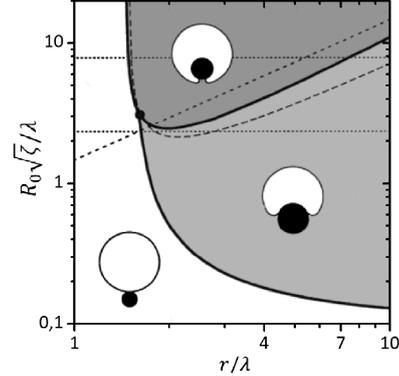
Die für einen vollständigen Einschluss eines Partikels nötige Energie skaliert also quadratisch im Partikelradius  $r$ . Umgekehrt liefert Gleichung 3.10 bei bekannter Adhäsionsstärke Adhäsionsenergiedichte  $g_{ad}$  einen oberen Grenzwert für die Partikelgröße, die vollständig von der Membran umhüllt werden kann. Dabei wird die aufgewendete Biegeenergie bewusst vernachlässigt, was insbesondere für große Partikel gerechtfertigt ist.

### Modelle unter Berücksichtigung von Lateral- und Biegespannung

Bei den für die weiter unten beschriebenen Experimente beschäftigen wir uns mit relativ kleinen Partikeln, weshalb sowohl Biege- als auch Spannungsenergie berücksichtigt werden müssen. Deserno et al. entwickeln in [47] ein numerisches Modell, das sowohl die Biegung als auch die laterale Spannung der Membran berücksichtigt. Darin wird gezeigt, dass die Biegeenergie der Halsregion insbesondere in den hier betrachteten Größenordnungen relevant für das Verhalten des Systems ist. Die Lösung des Problems unter Berücksichtigung der exakten Geometrie gestaltet sich schwierig, weshalb die Autoren die Verbindungsstelle (Hals) zwischen Partikel und freier Membran als Torus-Segment parametrisieren. Für einen Spezialfall wird aber gezeigt, dass dieses vereinfachte Modell qualitativ identische Aussagen über die Eindringtiefe  $z$  des Partikels macht und auch quantitativ nicht stark von der exakten Lösung abweicht. Die Minimierung der Gesamtenergie des Systems liefert auch in diesem Modell die Gleichgewichtswerte für die Eindringtiefe  $z$ . Das Modell führt auf ein Phasendiagramm (Abb. 3.5), das drei Fälle unterscheidet: i) keine Umhüllung  $z = 0$ , ii) partielle Umhüllung  $0 < z < 2$  und iii) vollständige Umhüllung ( $z \geq 2$ ). Eine exakte Betrachtung der Energielandschaft

[48] zeigt, dass der Übergang zur partiellen Umhüllung kontinuierlich stattfindet, wohingegen die in der Halsregion gespeicherte Energie dazu führt, dass der Übergang zur vollständigen Umhüllung sprunghaft in  $z$  verläuft und Werte  $z > 2$  möglich sind. Die Höhe der Energiebarriere, die für diese Diskontinuität verantwortlich ist, wird dabei hauptsächlich durch die Membranspannung bestimmt [48]. Auf diese Aspekte werden wir bei der Diskussion der experimentellen Ergebnisse nochmals zurück kommen.

Abbildung 3.5 Phasendiagramm nach dem Modell von Deserno und Gelbart [47]. Unterschiedliche Graustufen symbolisieren unterschiedliche Phasen des Partikel-einschlusses. Entsprechend den Piktogrammen sind dies der vollständige Einschluss, der partielle Einschluss und freie Partikel. Die kurz gestrichelte Linie ist die Phasengrenze, welche man nach dem Modell von Dietrich et al. [46] (s. Abschn. 3.2.1) erwarten würde.



In diesem Modell wird das aus Vesikel und Partikel bestehende System durch die charakteristische Länge  $\lambda$  und die dimensionslose Kennzahl  $\zeta$  charakterisiert:

$$\lambda = \sqrt{\frac{g_b}{g_{ad}}} \quad (3.11)$$

$$\zeta = \frac{g_{ad}}{K_A} \quad (3.12)$$

$\lambda$  entspricht im Wesentlichen der aus der Biegeenergie resultierenden Bedingung 3.3:  $r^* = \sqrt{2}\lambda$ . Die Grenze zwischen vollständiger Aufnahme und freiem Partikel nähert sich für sehr große Abszissenabschnitte eben diesem Wert an, da die Spannungszunahme durch die Aufnahme eines Partikels in diesem Bereich nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Der Anteil der Biegespannung an der Gesamtenergie des Komplexes wird sowohl für große Abszissen- also auch für große Ordinatenabschnitte kleiner. Die Asymptote für die Phasengrenze zwischen partieller und vollständiger Umhüllung (kurz gestrichelte Linie) ist deshalb dort durch das in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Modell ohne Berücksichtigung der Biegeenergie bestimmt. Die Steigung der Geraden (doppel-logarithmische Auftragung!) kann durch eine Reihenentwicklung beschrieben werden [47]:

$$\frac{r}{R_0} = a^* := x^{\frac{1}{2}} - \frac{1}{3}x + \frac{5}{18}x^{3/2} \mp \dots \quad \text{mit } x = \frac{\zeta/2 + \epsilon}{1 - \epsilon} \quad (3.13)$$

$R_0$  bezeichnet dabei den Radius des Vesikels vor der Wechselwirkung mit dem Partikel.

### 3.2.2. Adhäsion

Den bisher genannten Beiträgen, die eine Partikelumhüllung hemmen, steht die Adhäsionsstärke  $g_{\text{ad}}$  gegenüber. Die Adhäsionsstärke wird dabei durch unterschiedliche Wechselwirkungskräfte zwischen Partikeloberfläche und Membran bestimmt, von Van-der-Waals-Kräften über elektrostatische Beiträge bis zu entropischen Phänomenen, wie Undulations- und Hydratisierungskräften. In dieser ersten Analyse wollen wir uns aber zunächst auf die offensichtlichsten und stärksten Beiträge konzentrieren.

Nähern sich zwei Oberflächen in einem Elektrolyten einander an existieren immer attraktive van-der-Waals-Kräfte. Diese werden empirisch häufig durch eine indirekt kubische Abhängigkeit vom Abstand  $d$  der beiden Oberflächen beschrieben:

$$g_{\text{vdW}} = \frac{A}{d^3} \quad (3.14)$$

$A$  ist die materialabhängige Hamaker-Konstante, die typischerweise in der Größenordnung von  $1 \times 10^{-19} \text{ J}$  liegt.

Weiterhin sorgen kurzreichweitige sterische Wechselwirkungen dafür, dass sich die Oberflächen nicht beliebig weit annähern können.

Bei geladenen Oberflächen dominieren jedoch insbesondere bei größeren Abständen elektrostatische Wechselwirkungen. Diese werden neben den direkten Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen auch durch Beiträge bestimmt, die sich durch die zwischen den geladenen Oberflächen befindlichen Ionen ergeben („elektrostatische Doppelschicht“). Die Ionen schirmen zum einen das Potential der Oberflächen ab, erzeugen zum anderen aber auch einen effektiven osmotischen Druck, der die Oberflächen auseinander treibt. Die elektrostatische Wechselwirkung soll nun näher betrachtet werden.

#### Elektrostatische Wechselwirkung

Bei den hier betrachteten Systemen handelt es sich um unsymmetrische Oberflächen. Die Vielzahl möglicher Einflüsse macht es dabei schwierig, eine quantitative theoretische Vorhersage für die Wechselwirkungsenergie  $g_{\text{ad}}$  zu treffen. Leider sind auch experimentelle Daten für das System Lipidmembran-Silica rar. Einen vielversprechenden systematischen Ansatz zeigt eine Studie von Anderson et al. [49]. Dort wird mithilfe eines spezialisierten „surface force apparatus“ (SFA) die Kraft zwischen einer Silica-Kugel und festkörpergestützten Lipidmembranen (SLB) gemessen. Die Derjaguin-Approximation erlaubt den Rückschluss auf die entsprechende spezifische Wechselwirkungsenergie. Die verwendeten Lipide sind wie in unseren Experimenten zwitterionisch, d.h. in Summe elektrisch neutral. Es zeigt sich, dass die Wechselwirkung der beiden Oberflächen hochgradig von Elektrolytkonzentration des verwendeten Puffers abhängt. Wie Abbildung 3.6 zeigt, weist das System in Reinstwasser

### 3. Entwicklung eines Modells zur unlimitierten Partikelaufnahme

keine messbare Adhäsion auf, während in PBS (phosphate saline buffer) Adhäsionsstärken im Bereich von  $W \approx 1 \text{ mJ/m}^2$  auftreten.

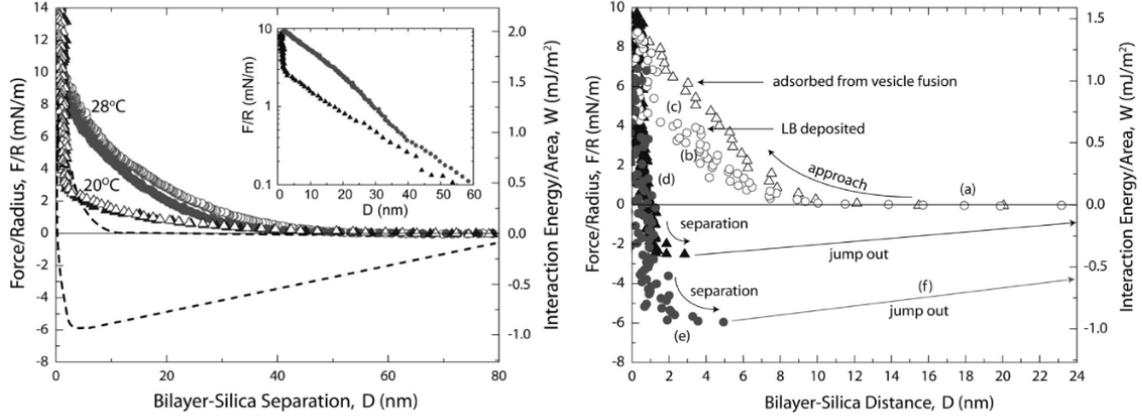


Abbildung 3.6. [übernommen aus [49]] Das Diagramm links zeigt SFA-Messungen für den Silica-Membran-Kontakt in hochreinem Wasser, das Diagramm rechts entsprechende Messung in PBS. Während die Wechselwirkungsstärke (hier mit  $W$  bezeichnet) in Reinstwasser rein repulsiver Natur ist ( $W > 0$ ), zeigt das System in PBS deutliche Adhäsion ( $W < 0$ ). Es wird eine deutliche Abhängigkeit der Kräfte vom Herstellungsverfahren für die SLBs gezeigt. Dies könnte ein Hinweis auf einen starken Beitrag von abstoßenden Undulationskräften sein.

Die Tatsache, dass Ionen einen sehr starken Einfluss auf diese Wechselwirkung haben, zeigt, dass elektrostatische Beiträge die Situation dominieren. Diese Feststellung mag im ersten Moment etwas verwundern, betrachten wir doch die Membran in erster Näherung als elektrisch neutral. Die experimentellen Befunde sprechen jedoch eine klare Sprache. In [49] wird ein entsprechender Erklärungsansatz diskutiert. Die räumliche Einschränkung der Ionenhülle der geladenen Partikel kann zu Kräften führen, die sowohl attraktiv als auch repulsiv sein können. Um diese Kraft zu berechnen, muss die Poisson-Boltzmann-Gleichung für die jeweiligen Randbedingungen gelöst werden. Gut untersucht sind die Grenzfälle konstanter Oberflächenladung  $\sigma = \text{const}$  und konstanten Oberflächenpotentials  $\Psi = \text{const}$ . Beide Fälle führen, insbesondere für asymmetrische Systeme wie dem unseren, zu stark unterschiedlichen Vorhersagen [50]. Die Hogg-Healey-Fürstenau-Gleichung gilt als hervorragende Näherung für den Fall konstanter, nicht zu hoher Oberflächenpotentiale ( $|\Psi| < 100 \text{ mV}$ ) [50], [51]:

$$g_{\text{DL}}(d)|_{\Psi=\text{const}} = \frac{\epsilon\epsilon_0[2\Psi_1\Psi_2 - (\Psi_1^2 + \Psi_2^2)e^{d/l}]}{e^{+d/l} - e^{-d/l}} \quad (3.15)$$

$d$  bezeichnet hier den Abstand zweier paralleler Platten mit den Oberflächenpotentialen  $\Psi_1$  und  $\Psi_2$ .

Für eine Abschätzung der Größenordnung der elektrostatischen Wechselwirkung nehmen wir an, dass das Oberflächenpotential des Partikels seinem

$\zeta$ -Potential von typischerweise  $\Psi_1 = \zeta = -50 \text{ mV}$  entspricht. Für zwitterionische Lipidmembranen, insbesondere für DOPC, kann wiederum in erster Näherung angenommen werden, dass gilt  $\Psi_2 = 0 \text{ mV}$ . In diesem Falle vereinfacht sich die HHF-Gleichung zu:

$$g_{\text{DL}}(d)|_{\Psi=\text{const}} = \frac{\epsilon\epsilon_0[\zeta^2 e^{d/l}]}{l(e^{+d/l} - e^{-d/l})} \quad (3.16)$$

Diese Doppelschicht-Wechselwirkung ist unter allen Umständen attraktiv. Allerdings wird bei der Herleitung der HHF-Gleichung angenommen, dass die Oberflächenpotentiale bei Annäherung konstant bleiben. Diese Annahme ist bei nicht zu kleinen Ionenkonzentrationen gerechtfertigt. Bei sehr kleinen Ionenkonzentrationen (bzw. Ionenstärken  $I$ ) muss eher von der Randbedingung konstanter Oberflächenladung ausgegangen werden. Gregory [50] zeigte, dass die HHF-Gleichung im Falle konstanter Ladung zu groben Fehlern führt und entwickelten eine Näherung, für den durch die Ionen der Doppelschicht ausgelösten osmotischen Druck  $P(d)$  bei konstanter Ladung.

$$P(d) = k_{\text{B}}T \left[ 2 \left( 1 + \frac{(y_1 + y_2)^2}{4} \text{csch}^2(d/2l) \right)^{1/2} - \frac{(y_1 - y_2)^2 \exp(-d/l)}{1 + \frac{1}{4}(y_1 + y_2)^2 \text{csch}^2(d/2l)} - 2 \right] \quad (3.17)$$

$$\text{mit } y_x = \frac{ze\Psi_x}{k_{\text{B}}T}$$

Die  $\Psi_x$  bezeichnen dabei die Potentiale der isolierten, nicht wechselwirkenden Oberflächen. Durch Integration über den Abstand erhält man daraus die spezifische Wechselwirkungsenergie für den Fall konstanter Potentiale:

$$g_{\text{DL}}|_{\sigma=\text{const}} = \int_d^{\infty} P(d) dd \quad (3.18)$$

Die Abbildung 3.7 vergleicht Ergebnisse einer numerischen Integration von Gleichung 3.17 sowie der HHF-Gleichung (Gl. 3.15) für die Wechselwirkung einer neutralen Membran mit negativ geladenen Partikeln unterschiedlicher Potentiale.

Beide Modelle machen höchst unterschiedliche Vorhersagen für das gleiche System. Während die Kraft bei konstanter Ladung über alle Entfernungen repulsiv ist, ziehen sich Partikeloberfläche und Membran im Falle konstanten Potentials gegenseitig an. Im realen System trifft jedoch meist keiner der beiden Grenzfälle exakt zu, und sowohl die Ladung als auch das elektrische Potential der beiden Oberflächen verändern sich bei einer Annäherung zweier Oberflächen. Dieses Verhalten wird als Ladungs-Regulierung (engl.: charge regulation) bezeichnet. Ein Ansatz zur Beschreibung dieses Übergangsbereichs

### 3. Entwicklung eines Modells zur unlimitierten Partikelaufnahme

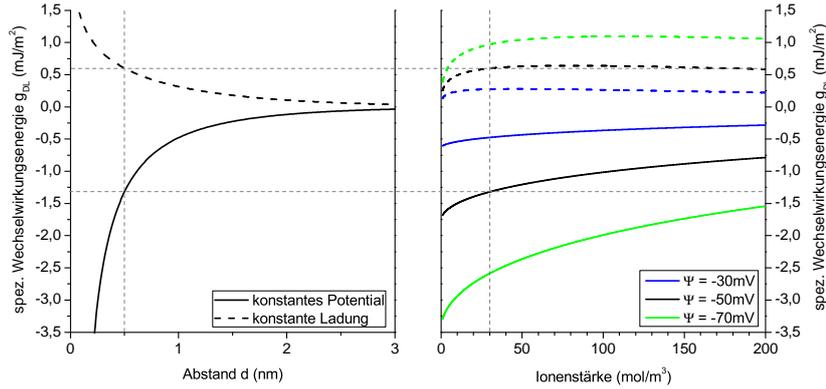


Abbildung 3.7. Elektrostativ Wechselwirkungsenergie unter den Annahmen konstanten Potentials (durchgezogene Linien) und konstanter Ladung (gestrichelte Linien). *links*: Abstandsabhängigkeit für ein Partikel mit einer Oberflächenladung  $\Psi = -50$  mV. Die hellgrauen Hilfslinien markieren die Werte für einen Gleichgewichtsabstand von  $5 \text{ \AA}$ , der in Anbetracht der Daten aus Abb.3.6 [49] sinnvoll erscheint. *rechts*: Für diesen Gleichgewichtsabstand wurde hier die Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers für verschieden starke Oberflächenladung aufgetragen.

verwendet einen phänomenologischen „regulation parameter“  $p$  um beide Modelle gewichtet zu superpositionieren [52], [53]. Bei  $p \rightarrow 1$  entsprechen die Modelle dem Grenzfall der Ladungserhaltung und für  $p \rightarrow 0$  dem der Potentialerhaltung. Bei korrekter Wahl von  $p$  beschreiben die entsprechenden Modelle experimentelle Ergebnisse recht zufriedenstellend [54]. Das Problem für korrekte Vorhersagen für die Adhäsionskraft zwischen unbekanntem Oberflächen ist, dass  $p$  nicht von vornherein bekannt ist und von vielen Faktoren wie den elektrochemischen Eigenschaften der Oberflächen, dem pH-Wert und der Konzentration der sonstigen Ionen abhängig ist. Daher ist eine korrekte Bestimmung der Adhäsionsenergie  $g_{ad}$  nur experimentell möglich.

Wie in Abbildung 3.6 illustriert wird, wurde in [49] gezeigt, dass die Gesamtwechselwirkung zwischen einer Silica-Oberfläche und einer zwitterionischen Lipidschicht in Reinstwasser rein repulsiv ist, während in Phosphat-gepufferter Salzlösung ohne zweiwertige Ionen (PBS) mit einer Ionenkonzentration (bzw. Ionenstärke  $I$ ) von etwa  $150 \text{ mM}$  deutliche Adhäsion vorhanden ist. Das beobachtete Verhalten erklären Anderson et al. mit einem Übergang zwischen den beiden zuvor beschriebenen Regimen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Variation der Ionenkonzentration eine Möglichkeit ist, die Adhäsionskraft  $d_{ad}$  im Modellsystem zu variieren. Bei typischen Werten für das Oberflächenpotential von Silica-Partikeln kann erwartet werden, dass bei zunehmender Ionenkonzentration eine zunächst abstoßende Wechselwirkung übergeht in eine anziehende, die bei typischen Gleichgewichtsabständen eine maximale Stärke von wenigen  $\text{mJ/m}^2$  erreicht. Diese Wechselwirkungsstärke ist deutlich größer als die, die für van-der-Waals-Kräfte erwartet wird, womit diese bei groben Abschätzun-

gen der Adhäsionsenergie vernachlässigt werden können. Der Übergang von abstoßender zu anziehender Wechselwirkung wird bei einer Ionenkonzentration von unter **150 mM** erwartet. Für eine genauere Analyse der Adhäsionskraft in Abhängigkeit der Ionenkonzentration sind experimentelle Daten ähnlich zu denen von Anderson et al. notwendig, weshalb im Rahmen dieser Arbeit entsprechende Versuche mit dem hier verwendeten System unternommen wurden. Diese werden in Abschnitt 4 beschrieben.

### 3.2.3. Unlimitierte Partikelaufnahme und transiente Poren

Die experimentellen Fakten zeigen eindeutig, dass eine Abschnürung von umhüllten Partikeln von der Muttermembran energetisch bevorzugt ist. Bereits Dietrich beobachtete in Einzelfällen die vollständige Aufnahme von Partikeln [46]. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen wie z.B. in [31] weisen klar auf das Vorkommen solcher Ablösungsprozesse hin.

Es ist anzunehmen, dass eine solche Partikelaufnahme auch einen Defekt in der Membran erzeugt, sobald sich der umhüllte Partikel von der Zellbeziehungsweise Vesikelmembran ablöst. Geht man zunächst davon aus, dass die Membran diese Defekte instantan ausheilt, würde man von einer spannungsabhängigen Hemmung der Partikelaufnahme ausgehen, sobald eine hinreichende Verminderung der Membranfläche bewirkt wurde. Die maximale Anzahl internalisierter Partikel kann leicht durch die Anwendung der Bedingung 3.13 gefunden werden, wenn man zusätzlich beachtet, dass sich der Oberflächenüberschuss in Abhängigkeit der Anzahl aufgenommener Partikel ändert [32]:

$$\epsilon(N) = \frac{A_{\text{eq}} - A}{A_{\text{eq}}} = \frac{(R^2 - Nr^2) - (R^3 + Nr^3)^{2/3}}{(R^3 + Nr^3)^{2/3}}. \quad (3.19)$$

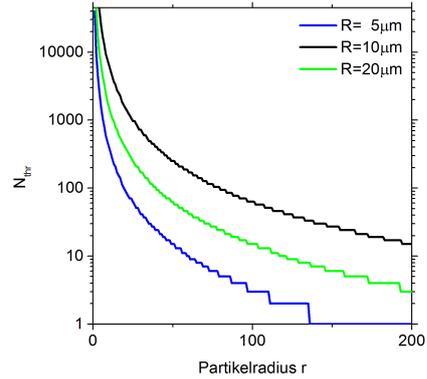
$R_0$  bezeichnet dabei den Radius des Vesikels vor der Wechselwirkung mit dem Partikel.

Eine numerische Berechnung von  $N(r, R_0)$  ist ohne weiteres möglich. Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis beispielhaft für drei verschiedene Vesikelradien:

Die erhaltenen Graphen widersprechen jedoch den experimentellen Befunden. Es wird unter geeigneten Bedingungen eine unbeschränkte Partikelaufnahme beobachtet, die im Extremfall zu einer Schrumpfung des Vesikels, teilweise bis zur Auflösungsgrenze des Messsystems, nach sich zieht. Diese Beobachtung kann ausschließlich dadurch erklärt werden, dass transiente Poren in der Membran existieren, die einerseits einen Volumenverlust und damit einen Abbau der Oberflächenspannung ermöglichen, andererseits aber nicht zu einer vollständigen Destabilisierung bzw. einem Reißen der Membran führen.

Verschiedene Modelle und experimentelle Daten legen die Existenz metastabiler hydrophiler Poren mit einem Radius  $r_p$  von wenigen Nanometern

Abbildung 3.8 [übernommen aus [32]] Maximal mögliche Anzahl aufgenommener Partikel in Abhängigkeit des Partikelradius  $r$  für drei unterschiedlich große Vesikel. Im Falle von größeren Partikeln erzeugt bereits eine geringe Anzahl aufgenommener Partikel eine Spannung, die ausreicht, eine weitere Aufnahme zu verhindern.



und einer Porenlebensdauer  $\tau$  von einigen Millisekunden nahe. Während der Radius dieser Poren nur sehr schwach von der Membranspannung abhängt, kann ihre Lebensdauer durch laterale Spannung und insbesondere durch Fluss erheblich verlängert werden [55]–[57]. Solche Poren entstehen spontan durch thermodynamische Flächenfluktuationen [3], können aber auch durch zunächst hydrophobe Membrandefekte induziert werden, wie wir sie bei einer Partikelaufnahme postulieren.

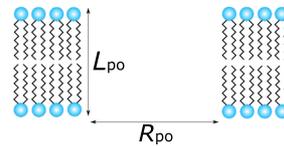
Für alle für uns relevanten Poren gilt, dass ihr Durchmesser größer als die Membrandicke ist und die Porenlänge  $L_{po}$  bzw. die Membrandicke vernachlässigt werden können. Die Scherkräfte in der ausströmenden Flüssigkeit sind von der Größenordnung  $v_L \eta_0 / r_p$ , wobei  $v_L$  hier für die Geschwindigkeit des ausströmenden Mediums und  $\eta_0$  für dessen Viskosität stehen. Die viskosen Kräfte stehen im Gleichgewicht mit dem Überdruck im Inneren des Vesikels  $\Delta P$ , der wiederum nach Young-Laplace von Oberflächenspannung der Membran und dem Radius des Vesikels  $R$  abhängt:  $\Delta P = 2\sigma/R$ . Damit für den Volumenfluss  $Q$  gilt im Gleichgewicht:

$$v_L \eta_0 / r_p \cong \Delta P \quad (3.20)$$

Es folgt damit für den Volumenverlust durch die Pore:

$$Q = dV/dt \cong r_p^2 v_L \cong \frac{\sigma r_p^3}{\eta_0 R} \quad (3.21)$$

Abbildung 3.9 Eine Membranpore mit Radius  $R_p$  und Länge  $L_p$ , die der Membrandicke entspricht.



Das Verhältnis zwischen Membranverbrauch und Volumenverlust durch Poren entscheidet über die Fähigkeit einer Membran zur unlimitierten Par-

tikelaufnahme. Nach einer gewissen Zeit wird sich ein Gleichgewicht einstellen, in dem sich Membranverbrauch und Volumenausstrom während der Partikelaufnahme die Waage halten. Zunächst gehen wir von einer festen charakteristischen Porenlebensdauer  $\tau$  aus.

#### 3.2.4. Wahrscheinlichkeit von Partikelkollisionen mit der Oberfläche

Die Kinetik der Partikelaufnahme wird bei endlicher Konzentration von Partikeln an der Vesikeloberfläche natürlich auch durch die Wahrscheinlichkeit von Kollisionen zwischen Partikeln und der Membran beeinflusst. Um die bisherigen Überlegungen in einen zeitlichen Bezug zu setzen, müssen wir also wissen, wieviele Partikel innerhalb eines Zeitintervalls auf die Membran treffen.  $\Gamma$  soll hier eine Art „Anklopfrequenz“ bezeichnen, also die durchschnittliche Anzahl der Partikel, die pro Zeiteinheit und Membranfläche auftreffen. Intuitiv erwartet man eine Abhängigkeit dieser Frequenz von der Viskosität des Lösungsmittels. Absorbiert die Membran (nahezu) alle Partikel und befindet sich das System im Gleichgewicht, so wird  $\Gamma$  und damit die Aufnahme rate durch den Diffusionsstrom bestimmt, der nötig ist, um Partikel aus der Umgebung nachzuliefern. Dieser Diffusionsstrom kann durch das Fick'sche Gesetz beschrieben werden. Befinden wir uns allerdings im Grenzfall sehr geringer Aufnahmewahrscheinlichkeit, ist das Problem nicht mehr im Rahmen des Diffusionsgesetzes zu behandeln, da der Diffusionsstrom aufgrund des Fehlens eines Konzentrationsgradienten verschwindet. Versucht man die Anklopfrequenz für Teilchen zu bestimmen, die in der Nähe einer Wand einen Random-Walk ausführen, so scheitert man an der fraktalen Struktur der Brownschen Molekularbewegung. Eine Teilchentrajektorie, die die Wand trifft, trifft sie quasi mehrmals auf kleinerer Größenskala. Für infinitesimale Schrittlängen, wie sie in einer Flüssigkeit im allgemeinen angenommen werden, würde dies zu einer Divergenz der Anklopfrequenz führen. Die exakte Bestimmung der Anklopfrequenz für Partikel in einer viskosen Flüssigkeit ist damit nicht so trivial wie es auf den ersten Blick scheint und bedürfte einer numerischen Lösung der Bewegungsgleichungen unter Berücksichtigung der Partikelträgheit zur Behandlung der Stöße mit der Wand. Eine andere Herangehensweise zur Abschätzung von  $\Gamma$ , wäre die Annahme einer sinnvollen freien Weglänge  $\lambda$ , die letztlich jedoch nur empirischer Natur sein kann.

Eine weitaus elegantere Möglichkeit ergibt sich aus einem thermodynamischen Ansatz. Die Partikel mit einer lokalen Konzentration  $C_s$  an der Oberfläche erzeugen einen Partialdruck  $p = C_s K_b T$  auf die Membran, der sich aus der Summe vieler Partikelstöße zusammensetzt. Nehmen wir an, dass das thermische Gleichgewicht erreicht ist und die Partikel ausreichend verdünnt sind, sodass ihr Volumen und gegenseitige Wechselwirkungen vernachlässigbar sind, kann das Problem analog zur kinetischen Gastheorie des idealen Gases behandelt werden. Dort wird zwar angenommen, dass sich die Teilchen zwischen

den Stößen auf geraden Bahnen bewegen, Ludwig Boltzmann begründet aber, warum die kinetische Gastheorie auch zur Beschreibung gelöster Stoffe angewendet werden kann [12]:

„Die Salzmoleküle bewegen sich im allgemeinen zwar nicht während einer endlichen Zeit in geradliniger Bahn; da aber die kritische Ebene eine mathematische Ebene ist und die Zeit  $\tau$  [...] beliebig klein gewählt werden kann, so kann der Weg jedes Salzmoleküls [...] trotzdem als geradlinig betrachtet werden.“

Wir nehmen an, dass in einem Zeitabschnitt  $\tau$  im Mittel ein Impulsübertrag  $\langle \Delta J \rangle$  erfolgt. Für  $\tau \rightarrow dt$  gilt:

$$dF = p dA = C_s K_b T dA = \frac{dJ}{dt} = \Gamma \langle \Delta J \rangle \quad (3.22)$$

wobei  $\langle \Delta J \rangle$  den Erwartungswert des Impulsübertrags pro Teilchenstoß bezeichnet. Im thermodynamischen Gleichgewicht, in dem die Geschwindigkeiten der Teilchen Maxwell-verteilt sind, gilt für den Impulsübertrag während eines Stoßes weiterhin:

$$\langle \Delta J \rangle = 2m \langle v \rangle = \sqrt{\frac{32}{\pi} m k_B T} \quad (3.23)$$

Aus den Gleichungen 3.22 und 3.23 ergibt sich zusammen ein Ausdruck für die Anklopfrequenz an einem Flächenabschnitt  $dA$ :

$$\Gamma = \sqrt{\frac{\pi k_B T}{32m}} C_s dA \quad (3.24)$$

Diese ist jetzt also unabhängig von der Viskosität des Mediums und kann jederzeit berechnet werden, solange die Teilchenkonzentration  $C_s$  an der Oberfläche sowie deren Masse bekannt ist.

### 3.3. Implementierung eines ersten numerischen Modells

Betrachtet man das in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Phasendiagramm und bezieht die Möglichkeit mit ein, dass ein Vesikel über transiente Poren Volumen verlieren kann, so kann man erwarten, dass bei einer ausreichenden Porengröße und -stabilität ein Punkt erreicht wird, in dem das Vesikel in unbegrenztem Maße Partikel aufnehmen kann und diese Aufnahme nicht durch die steigende Membranspannung gebremst wird. Es tritt also eine neue Phase des Aufnahmeverhaltens auf.

Die Untersuchung eines Phasendiagramms unter dieser Annahme erfolgte in einer einfachen zeitdiskreten Berechnung, in der bei jedem Schritt die Fähigkeit des Vesikels zur Aufnahme durch Bedingung 3.13 geprüft wird. Dabei öffnet jede Aufnahme eines Partikels eine metastabile Pore und der Volumenverlust durch alle vorhandenen Poren wird nach Gleichung 3.21 bestimmt. Schließlich wird die Anzahl sich schließender Poren berechnet, wobei für die Verschlusswahrscheinlichkeit eine Poisson-Verteilung entsprechend des Verhältnisses von Porenlebensdauer  $\tau$  und Simulationsschrittlänge angenommen wird (siehe Abbildung 3.10).

Die Simulation bricht ab wenn eine der folgenden Bedingungen erreicht ist; das Abbruchkriterium identifiziert die Aufnahmephase:

1. Keine Wechselwirkung: Die Biegeenergiegedichte  $g_b$  übersteigt die Adhäsionsenergiegedichte  $g_{ad}$ . Entsprechend werden Partikel nicht umhüllt.
2. partielle Umhüllung: Die Biegeenergie erlaubt eine teilweise Umhüllung von Partikeln, jedoch nicht deren vollständige Aufnahme.
3. Limitierte Aufnahme: Nach der vollständigen Aufnahme einer gewissen Anzahl von Partikeln sind alle Poren verschlossen und die Membranspannung verhindert eine weitere Aufnahme.
4. Unlimitierte Aufnahme: Der Volumenverlust durch Poren wird so groß, dass die Membranspannung trotz der Aufnahme aller ankommenden Partikel kontinuierlich abnimmt und das Vesikel schrumpft. Nach Young-Laplace erhöht sich der Überdruck des Vesikels bei konstanter Oberflächenspannung mit kleiner werdendem Vesikelradius. Demnach ist davon auszugehen, dass ein Vesikel unter diesen Bedingungen schrumpfen würde, bis kein Medium mehr vorhanden ist ( $V = A = 0$ ). In der Realität würde die Aufnahme natürlich zuvor durch die endliche Dichte der eingeschlossenen Partikeln beendet.

Die Abbruchbedingungen 1–3 entsprechen den unterschiedlichen Phasen im Phasendiagramm 3.5. Abbruchbedingung 4 entspricht der unlimitierten Aufnahme.

### 3. Entwicklung eines Modells zur unlimitierten Partikelaufnahme

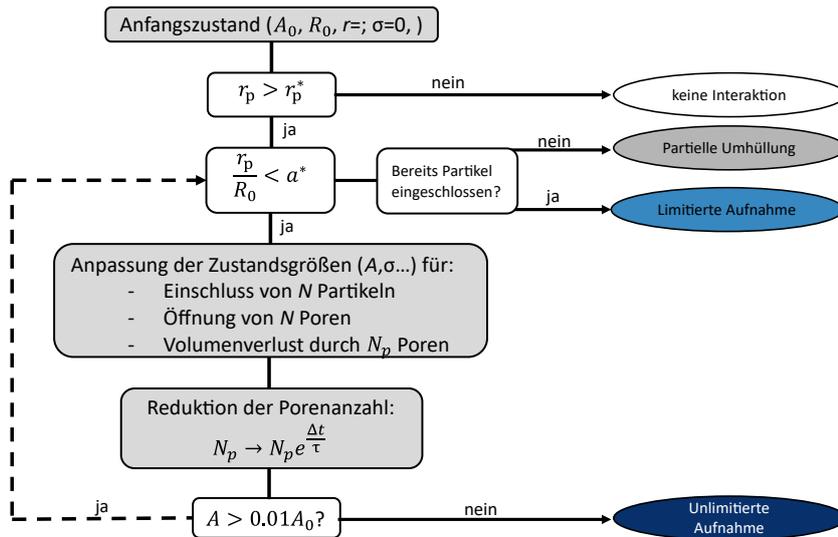


Abbildung 3.10. Schematische Darstellung des zur Beschreibung der Partikelaufnahme verwendeten Modells

Die Simulationsparameter wurden Literaturdaten entnommen, wobei für einige eine große Unsicherheit besteht. Während die Elastizitätsmoduln relativ gut untersucht sind, bestehen in puncto Porenparameter und Adhäsionsstärke große Unsicherheiten und es können zunächst lediglich plausible Schätzwerte verwendet werden.

Tabelle 3.1. Simulationsparameter

Parameter	Wert
Biegesteifigkeit $K_b$	$4 \times 10^{-20}$ J [58]
Flächenkompressionsmodul $K_A$	230 mN/m [59]
Membrandicke $d$	2,8 nm [60]
Porenradius $r_p$	9 nm
Porenlebenszeit $\tau$	500 ms

Für typische Porenlebenszeiten können beispielsweise Experimente mit „black lipid membranes“ (BLM) herangezogen werden. Diese freistehenden, flachen Membranen ermöglichen die Messung eines Transmembranstroms bei Anlegen einer Spannung [61]. Insbesondere nahe der Phasenumwandlung wurden quantisierte Leitfähigkeitssprünge gefunden und mit transienten Poren assoziiert, die durch thermische Fluktuation entstehen [62]. Bei Membranen, die in Zusammensetzung und Umgebungsbedingungen mit unseren Vesikeln vergleichbar sind, wurden Porenlebensdauern von der Größenordnung  $1 \times 10^{-2}$  s bis  $2 \times 10^{-1}$  s beobachtet.

### 3.4. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 3.11 illustriert ein Ergebnis der Simulation für die Parameter, die in Tabelle 3.1 aufgeführt wurden. Alle erwarteten Aufnahmephasen treten hier auf. Die untersuchten Partikelgrößen entsprechen typischen Größen zellulärer Cargo, sowie den später in den Experimenten verwendeten Silica-Partikeln.

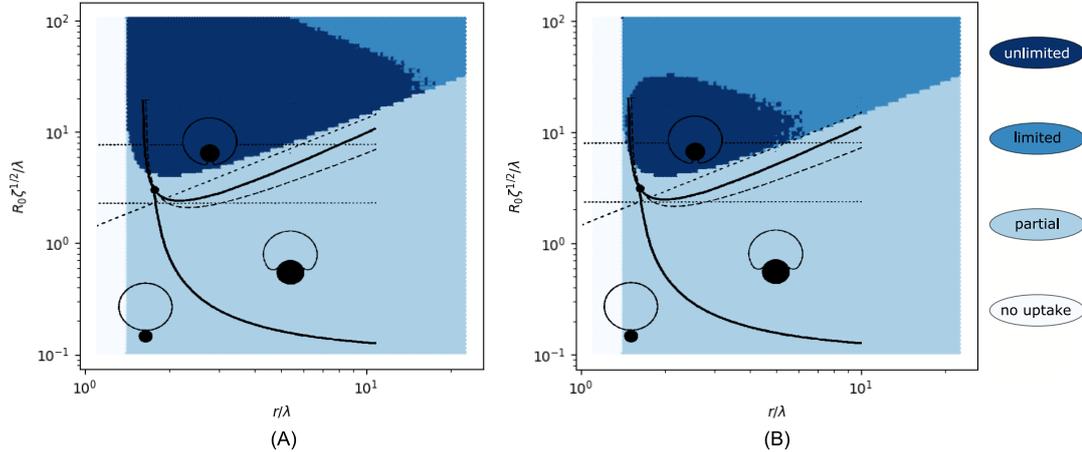


Abbildung 3.11. Durch die beschriebene Simulation erzeugtes Phasendiagramm für Poren mit:  $\tau = 500$  ms, (A)  $R_p = 5$  nm, (B)  $R_p = 2$  nm. Das Phasendiagramm entspricht weitgehend einer vereinfachten Version des Modells von Deserno et al. [47]. Zusätzlich existiert jetzt aber eine Phase, in der der Volumenausstrom durch die Poren ausreicht um unbeschränkt viele Partikel aufzunehmen.

Die Abbildung zeigt auch den Vergleich mit dem Ursprungsmodell von Deserno et al. Offensichtlich werden dessen Schlüsseigenschaften auch in dieser vereinfachten Simulation gut wiedergegeben. Abweichungen ergeben sich vor allem für sehr kleine Vesikel bzw. Partikel, da hier die Form des Gesamtkomplexes von der idealisierten Form zunehmend abweicht. Durch die Vernachlässigung der in der Halsregion gespeicherten Biegeenergie und der damit verbundenen Linienspannung ergibt sich außerdem ein leichter Shift der Phasengrenze zwischen partiellem und vollem Einschluss. Der wichtigste Unterschied zum bisherigen Modell ist jedoch das Auftreten der Phase unbegrenzter Aufnahme (dunkelblauer Bereich), die Gegenstand der weiteren Betrachtung sein soll. Die Ausdehnung dieser Phase ist, wie in der obigen Abbildung gezeigt, natürlich abhängig von den Poreneigenschaften und Materialparametern der Membran.

In den später beschriebenen Experimenten werden ausschließlich Vesikel verwendet, deren Größe in einem engen Bereich um  $R_0 \approx 10 \mu\text{m}$  liegt. Es macht daher Sinn, die Auswirkungen der Poreneigenschaften bei (quasi) konstanter Vesikelgröße zu untersuchen. Dafür eignet sich die Betrachtung eines

Schnitts durch das Phasendiagramm, der senkrecht zur  $R$ -Achse steht bei Variation der Adhäsionsstärke  $g_{\text{ad}}$ . Sowohl im Hinblick auf die biologische Bedeutung, als auch die experimentell sinnvollen Parameterbereiche, soll das Augenmerk hier auf den Phasengrenzen der unlimitierten Aufnahme liegen. Abbildung 3.12 (a) gibt das Ergebnis der Simulation für die in Tabelle 3.1 aufgeführten Parameter wieder. Es ist unschwer zu erkennen, dass ein Optimum der Partikelgröße für die unlimitierte Aufnahme existiert, das im Bereich von ca.  $r \approx 15 \text{ nm}$  liegt. Es sei hier darauf hingewiesen, dass sich dieser Wert, wie bereits angesprochen, sehr häufig auch als Optimum der Partikelaufnahme in lebenden Systemen wiederfindet. Sowohl für kleinere, als auch für größere Partikeldurchmesser nimmt die minimal notwendige Adhäsionsstärke für eine Aufnahme rapide zu. Für Partikel  $r > 50 \text{ nm}$  dürfte eine unbegrenzte Partikelaufnahme für das hier betrachtete System gar nicht mehr stattfinden. Wir werden später aber sehen, dass das experimentelle Ergebnis sich anders darstellt. Auch in lebenden Systemen werden Partikel dieser Größe noch sehr gut aufgenommen. An dieser Stelle sollte man sich aber klar machen, wann ein Aufnahmeprozess unter den gegebenen experimentellen Randbedingungen als „unlimitiert“ erkannt wird. Da die Beobachtungszeit in den Experimenten aus methodischen Gründen auf etwa  $30 \text{ min}$  beschränkt ist, wurde in [32] eine „scheinbar unlimitierte“ Aufnahme so definiert, dass innerhalb dieser Zeit lediglich eine signifikante Schrumpfung des Vesikels verzeichnet werden muss. Abbildung 3.12 (a) zeichnet bei Bild unter genau dieser Definition: Hier bezeichnet die dunkelblaue Phase den Parameterraum, in dem das Vesikel während der Beobachtungszeit um mindestens  $1\%$  schrumpft. Nach diesem Modell existiert ein optimaler Partikelradius von  $r \approx 17 \text{ nm}$ , bei dem eine unbegrenzte Partikelaufnahme schon bei sehr kleinen Wechselwirkungsenergien auftritt. Selbst bei der aufgeweichten Definition unbegrenzten Wachstums sind für die Aufnahme von Partikeln mit einem Durchmesser von  $200 \text{ nm}$  bereits Wechselwirkungsenergien von ca.  $4 \text{ mJ/m}^2$  erforderlich. Dieser Wert liegt deutlich oberhalb der experimentell gefundenen Werte – selbst für hohe Ionenkonzentrationen [49]. Da die Wechselwirkungsenergie stark vom individuellen Kolloid-System abhängt, sollten direkte Messungen der Adhäsion zwischen den hier betrachteten Partikeln und Vesikeln in unterschiedlichen Elektrolyten durchgeführt werden. Diese Untersuchung ist Gegenstand des nächsten Kapitels.

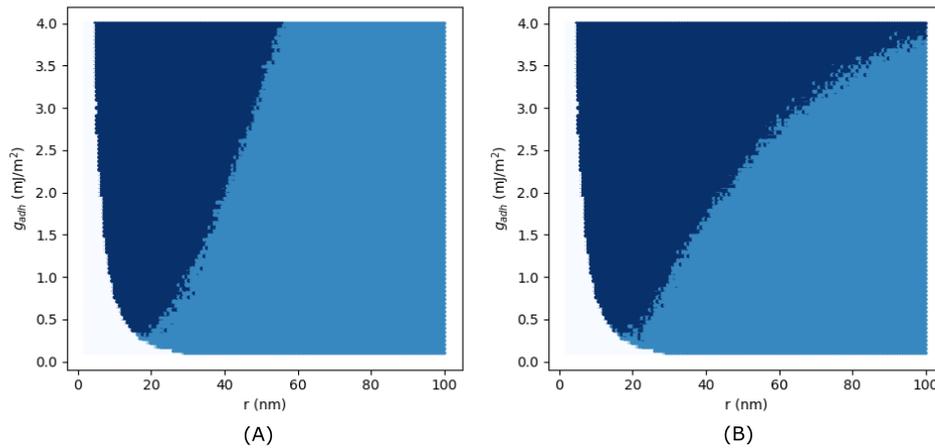


Abbildung 3.12. [übernommen aus [40]] (A) Darstellung des tatsächlichen Phasendiagramms für variable Adhäsionsstärke und Partikelgröße. Eine unbegrenzte Aufnahme von Partikeln mit  $r > 40$  nm ist extrem energieaufwendig und unter den gegebenen experimentellen Bedingungen quasi unmöglich. (B) Die gleiche Darstellung mit einer aufgeweichten Definition unbegrenzter Aufnahme. Es wird davon ausgegangen, dass eine eigentlich begrenzte Aufnahme von großen Partikeln im Experiment u.U. nicht von einer unbegrenzten Aufnahme unterschieden werden kann, da in beiden Fällen eine deutlich sichtbare Schrumpfung des Vesikels über die Beobachtungszeit stattfindet. Als Grenzwert für eine solche „scheinbar unbegrenzte Aufnahme“ legen wir eine Schrumpfung der Vesikeloberfläche um mindestens 1 % fest. Es wird deutlich, dass nach dieser Definition auch eine Aufnahme von großen Partikeln fälschlicherweise als unbegrenzt interpretiert werden kann.



## 4. Ionenstärke und Adhäsion

Wie im vorigen Abschnitt deutlich wurde, fehlen für eine quantitative Betrachtung der oben beschriebenen Aufnahmemechanismen weitere Informationen zu den Adhäsionskräften zwischen Lipidmembran und Partikeloberfläche. Die direkteste Möglichkeit zur Messung solcher Kräfte bieten die Kraftspektroskopie mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) an festkörpergestützten Membranen (Solid Supported Membranes, SLBs) oder ähnliche Methoden. Entsprechende Experimente unter Verwendung des hier besprochenen Membran-Partikelsystems, die in [63] veröffentlicht wurden, werden nun vorgestellt.

### 4.1. Einleitung

Unter biologischen Bedingungen hängt die Adhäsionsstärke  $g_{\text{ad}}$  von vielen Faktoren ab. Zum einen treten physikalische Wechselwirkungen auf, wie sie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurden, zum anderen spielen spezifische Bindungen eine wichtige Rolle. Diese entsprechen starken Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen und entsprechenden Bindungsstellen an Partikeln beziehungsweise Biomolekülen. Für unser Modellsystem können wir uns aber auf physikalische Kräfte beschränken. Wir gehen wie in 3.2.2 beschrieben davon aus, dass die Anwesenheit von Ionen zu einer Adhäsion zwischen der Silica-Oberfläche der Partikel und neutralen Lipidmembranen führt. Dass dies zur Aufnahme von Partikeln führen kann, zeigen sowohl unsere Experimente, als auch diverse Untersuchungen anderer Gruppen ([33], [46], [64], u.v.m.). Welche Kräfte konkret dafür verantwortlich sind, wird aber nur selten näher untersucht.

Neben Vesikeln sind SLBs ein weiteres sehr häufig verwendetes Modellsystem zur Untersuchung von Zellmembranen und insbesondere deren lateralen Dynamik [65], [66]. Offensichtlich sind SLBs aber auch gut geeignet, um Substrateinflüsse auf Lipidmembranen zu untersuchen [67], [68]. Aus dem experimentellen Blickwinkel eignen sich SLBs aufgrund ihrer einfachen Herstellung und Handhabbarkeit auch für Kraftspektroskopie-Experimente sehr gut.

Mithilfe eines optimierten Messsystems (surface force apparatus, SFA) wurden in [49] bereits entsprechende Versuche durchgeführt. Allerdings beschränkten sich diese Messungen auf lediglich zwei verschiedene Ionenstärken: Reinstwasser ( $I = 0$ ), sowie phosphatgepufferte Salzlösung ( $I \approx 150 \text{ mM}$ ). Hier bestätigte sich der erwartete Trend, dass sich die Oberflächen in der Gegenwart von Ionen stärker anziehen (siehe Abschnitt 3.2.2). Um einen echten quantitativen Zusammenhang zwischen Ionenstärke und Adhäsionsenergie zu erhalten, wurden nun Messungen mit einem Rasterkraftmikroskop für unterschiedliche Konzentrationen von NaCl durchgeführt [63].

## 4.2. Materialien und Methoden

Für die Untersuchungen musste eine definierte Silica-Oberfläche zur Verfügung gestellt werden. Zu diesem Zweck wurden spitzenlose AFM-Cantilever mit Silica-Mikrokugeln versehen. Die Herstellung wird in [63] bzw. in Anhang A.1.4 im Detail beschrieben. Für die Messung wurden des Weiteren festkörpergestützte Lipidmembranen durch die Fusionierung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) auf Glas- bzw. Mica-Oberflächen erzeugt. Abbildung 4.1 skizziert den entsprechenden Versuchsaufbau.

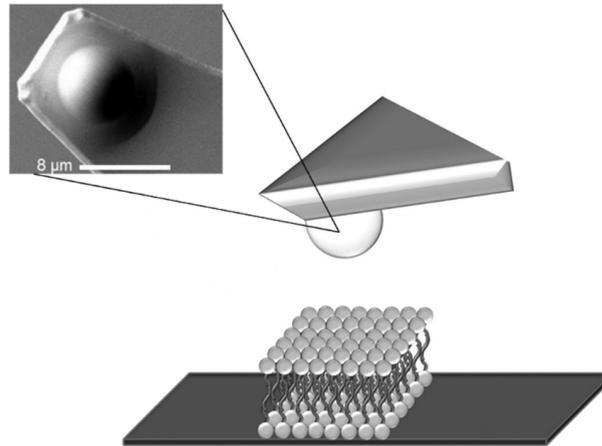


Abbildung 4.1. [übernommen aus [63]] Experimenteller Aufbau: Auf einem festen Substrat (Glas oder Mica) wird eine Lipiddoppelschicht erzeugt. Ein mit einer Silica-Kugel versehener AFM-Cantilever wird in Kontakt mit der Lipidoberfläche gebracht und Kraft-Abstandskurven werden bestimmt.

Die Kugeloberfläche wurde vor jeder Messung gründlich gereinigt, wobei der letzte Reinigungsschritt in einer Sauerstoff-Plasmareinigung für 30 s bestand. Anschließend wurde der Cantilever für 30 min in der jeweiligen Messlösung gelagert, um die bei der Plasmareinigung aktivierte Oberfläche abreagieren zu lassen. Kraft-Abstand-Kurven wurden mit einem Rasterkraft-Mikroskop (Nano Wizard mit BioCell, JPK, Berlin) aufgenommen. Für jeden Messpunkt wurden nun mehrere hundert Einzelmessungen an verschiedenen Positionen einer Doppelschicht durchgeführt, um eine spätere statistische Aussage über die Adhäsionskraft treffen zu können. Liegt eine attraktive Wechselwirkung vor, so zeigen sich charakteristische Abrisskurven (siehe Abbildung 4.2), die folgendermaßen beschrieben werden können:

- Die Messspitze wird zunächst an die Oberfläche angenähert, bis eine Anpresskraft von 80 nN erreicht ist.
- Diese Position wird für 5 s gehalten, um dem System die Möglichkeit zur Relaxation zu geben.

- Schließlich wird die Messspitze wieder vom Substrat entfernt. Beim Zurückziehen der Spitze haftet die Spitze zunächst am Bilayer, bis bei der Kraft  $F_{\min}$  ein Abriss und damit ein Sprung in der Kraftkurve auf  $F = 0$  erfolgt.

Es sei darauf hingewiesen, dass die genauen Messparameter, wie Anpresskraft und Haltezeit einen Einfluss auf die hier dargestellten Ergebnisse haben. Details dazu können der entsprechenden Publikation [63] entnommen werden.

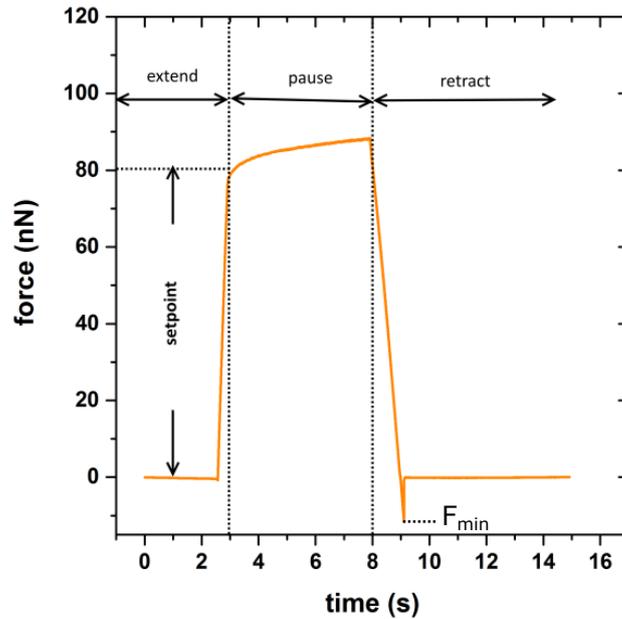


Abbildung 4.2. [adaptiert aus [63]] Typische Kraft-Abstandskurve auf einem Glas-Substrat (Annäherungsgeschwindigkeit:  $0,5 \mu\text{m/s}$ , Anpresskraft:  $80 \text{ nN}$ , Rückzugsgeschwindigkeit:  $0,21 \mu\text{m/s}$ ). Die drei skizzierten Phasen werden im Text beschrieben.

Die Abrisskraft  $F_{\min}$ , also die Minimalkraft die während der Messung erreicht wird, gibt Auskunft über die Adhäsionsstärke. Die Adhäsionsenergie  $g_{\text{ad}}$ , kann man nach der Derjaguin-Approximation mit dem effektiven Radius der Silica-Kugel  $R$  berechnen:

$$g_{\text{ad}} = \frac{F_{\min}}{2\pi R} \quad (4.1)$$

Diese Näherung ist gültig, solange die Debeye-Länge  $\lambda_D$  im verwendeten Medium deutlich kleiner ist, als der Radius der verwendeten Kugel [69], [70]. Für alle hier untersuchten Proben gilt  $\lambda_D \leq 2,5 \text{ nm} \ll R_p$ , da alle untersuchten Proben zumindest gepuffert sind und somit in allen Fällen eine signifikante Ionenstärke besitzen.

Die Messungen erfolgten in  $15 \text{ mM}$  HEPES-Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl. Als Substrate für die Herstellung von SLBs dienten sowohl gespaltene Mica-Slides mit atomar glatter Oberfläche, als auch

Tabelle 4.1. Parameter für die Kraftspektroskopischen Untersuchungen

	Mica	Glas
Annäherungsgeschwindigkeit	0,5 $\mu\text{m/s}$	0,5 $\mu\text{m/s}$
Anpresskraft	26 nN	80 nN
Pause bei konstantem Abstand	0 s	5 s
Rückzugsgeschwindigkeit	0,21 $\mu\text{m/s}$	0,21 $\mu\text{m/s}$

Glas-Objektträger mit typischen Rauigkeiten von 1 nm. Als Lipid diente in allen Versuchen schwach mit 0,05 % DiOC<sub>14</sub> fluoreszenzmarkiertes DOPC. Die Herstellung ist in [63] detailliert beschrieben. Zunächst wurde wässrige Lipidlösung intensivem Ultraschall ausgesetzt um stark gespannte SUVs herzustellen. Gründlich gereinigte Substrate wurden für 60 min mit der Lösung inkubiert, die danach gegen die gewünschte Pufferlösung getauscht wurde. Die Integrität des SLB wurde vor Experimentbeginn mittels FRAP (fluorescence recovery after photobleach, [65]) geprüft.

Die verwendeten Parameter für die AFM-Messungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

### 4.3. Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, ergibt sich auf Mica-Substraten zunächst ein qualitativ ähnliches Bild wie bei Anderson et al. [49]. In Reinstwasser werden keine attraktiven Kräfte registriert. Nach einer Zugabe in HEPES-gepufferter NaCl-Lösung mit einer  $\text{Na}^+$ -Ionenstärke von 75 mM treten deutliche Abrisskräfte auf.

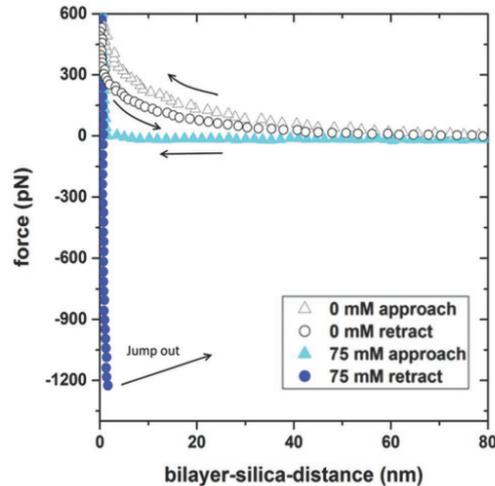


Abbildung 4.3. [adaptiert aus [63]] Vergleich typischer Kraft-Abstands-Kurven für Reinstwasser und 75mM gepufferter NaCl-Lösung. Während in ionenschwacher Umgebung keine Adhäsion auftritt, zeigt sich bei höherer Ionenstärke eine klare Anziehung zwischen Silica-Oberfläche und SLB. Hier tritt während der Retraktion eine negative Kraft auf, bis schließlich der Kontakt zur Oberfläche abreißt.

Wird dieser Versuch bei konstanter Ionenstärke mehrfach wiederholt, so zeigen die Abrisskräfte eine statistische Verteilung (siehe Abbildung 4.4). Werden die Messungen zusätzlich für mehrere Proben (individuelle Bilayer) wiederholt, streuen die Mittelwerte der Verteilungen von Einzelproben noch deutlicher. Der qualitative Verlauf der Gesamtheit dieser Messungen auf Mica-Substraten weist aber grundsätzliche Eigenschaften auf:

1. Ab einer NaCl-Konzentration von ca. 15 mM nimmt die Adhäsionskraft mit der Ionenstärke zunächst stark zu.
2. Im Bereich zwischen 40 mM und 80 mM sättigt die Adhäsionsstärke unterschiedlich schnell auf Werte um  $g_{\text{ad}} = 60 \mu\text{J}/\text{m}^2$ .

Die Messungen sind prinzipiell gut reproduzierbar, allerdings beträgt der daraus ermittelte Maximalwert für die Adhäsionsstärke lediglich  $g_{\text{ad}} \approx 60 \mu\text{J}/\text{m}^2$  und liegt damit mehr als eine Größenordnung unter dem von Anderson et al. gefundenen Wert.

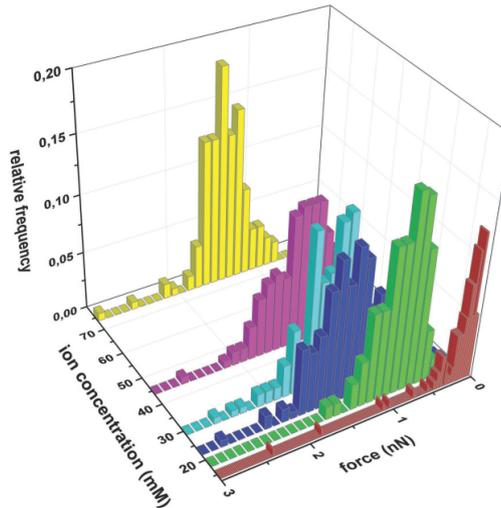


Abbildung 4.4. [adaptiert aus [63]] Auftragung einer gesamten Messreihe für einen SLB. An jedem Messpunkt (Ionenstärke) wurden zwischen 144 und 180 Messkurven aufgenommen.

Ein völlig anderes Bild zeigt sich, wenn nicht Mica- sondern Glassubstrate verwendet werden. In diesem Falle weichen die Ergebnisse für unterschiedliche Proben derart stark von einander ab, dass keine sichere quantitative Aussage getroffen werden kann (Siehe Abbildung 4.5). Während in einigen Proben keine Adhäsion gemessen wurde zeigen andere Wechselwirkungsenergien bis  $g_{\text{ad}} = 1,5 \text{ mJ/m}^2$ . Dieser Wert stimmt wiederum in seiner Größenordnung sehr gut mit den von Anderson et al. gemessenen Werten für DMPC-Bilayer überein. Wir konnten außerdem beobachten, dass die Messwerte auf Glas, im Gegensatz zu denen auf Mica, stark von den gewählten AFM-Parametern abhängen. Erst ab einer gewissen Anpresskraft und Wartezeit findet man hier für eine Probe relativ konstante Werte. Die Gründe für das stark unterschiedliche Verhalten der SLBs auf Glas und Mica werden in [63] weiter diskutiert, bleiben aber Gegenstand von Spekulation. Die Zeitabhängigkeit weist jedoch darauf hin, dass langsam ablaufende Relaxationsvorgänge eine wichtige Rolle spielen.

In der Gesamtschau zeigen diese Untersuchungen also, dass die Adhäsionskraft zwischen Silica und Lipidmembranen bei Erhöhung der Ionenkonzentration wie erwartet zunimmt. Im Detail fällt die Interpretation jedoch schwer, da die Ergebnisse offensichtlich sehr stark vom verwendeten Substrat und den spezifischen Messparametern abhängen. Für Mica-SLB können systematische und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Allerdings werden hier lediglich sehr geringe Adhäsionskräfte gemessen. Betrachtet man die typischen Energiebeiträge aus Abschnitt 3.2.1, so fällt sofort auf, dass die gemessenen Werte für die Adhäsionsenergie noch nicht einmal ausreichend wären um die Biegeenergie während des Aufnahmeprozesses zu kompensieren. Andererseits

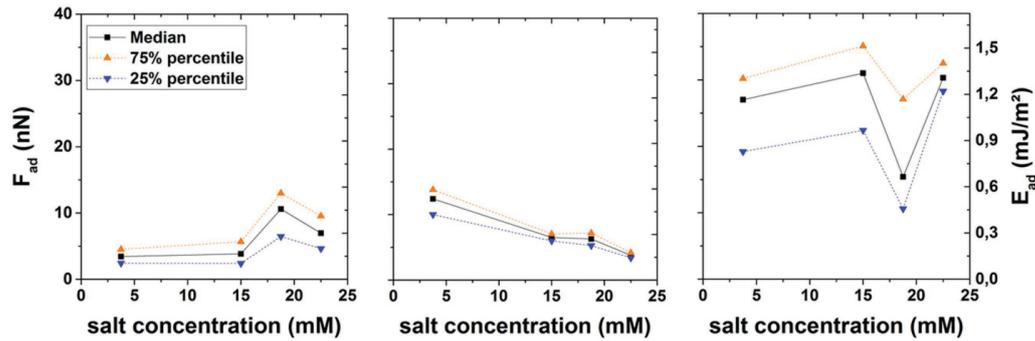


Abbildung 4.5. [adaptiert aus [63]] Messwerte für 3 unterschiedliche SLBs auf Glassubstrat. Es sind sowohl der Mittelwert als auch Perzentilen für jede Messung angegeben. Die gemessenen Werte für diese Substrate zeigen nur wenig Abhängigkeit von der Ionenstärke und weichen stark voneinander ab.

zeigen die Versuche auf Glas um Größenordnungen höhere Adhäsionsstärken, die jedoch nur sehr schlecht reproduzierbar sind. Verlässliche quantitative Aussagen zu der Adhäsionsstärke  $g_{ad}$  bei freien Membranen sind daher kaum abzuleiten. Die zuvor in den Modellrechnungen gemachten Annahmen für die maximale Adhäsionsstärke von  $g_{ad} \approx 1,5 \text{ mJ/m}^2$  erscheinen vor diesem Hintergrund trotz alledem vernünftig und der Bereich der größten Veränderung der Adhäsionsstärke scheint im Bereich einer Ionenstärke von 15 mM bis 50 mM zu liegen. Für eine genauere Untersuchung der Adhäsionsstärke wären experimentelle Daten nötig, die direkt aus der Wechselwirkung zwischen Partikeln und freien Lipidmembranen gewonnen werden, z.B. aus Pipettenaspiration von Vesikeln oder black lipid membranes. Erste derartige Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit zwar unternommen, scheiterten aber an der Instabilität der Membranen unter Partikeleinfluss. Eine Weiterführung der Versuche wäre sicherlich interessant, bedürfte aber einer deutlichen Optimierung der entsprechenden Methoden.

Stattdessen soll im folgenden Kapitel die Frage untersucht werden, ob der theoretisch erwartete Übergang von „keiner Wechselwirkung“ zu „unlimitierter Aufnahme“ tatsächlich auch im Experiment im Bereich von  $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$  stattfindet. Dies wäre ein Indiz dafür, dass die in SLBs gefundenen Kräfte auch für die Partikelaufnahme freier Vesikel verantwortlich sind.

## **5. Experimentelle Untersuchung der Partikelaufnahme**

In diesem Kapitel werden nun im Detail die experimentellen Ergebnisse zur Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch Lipidvesikel vorgestellt und im Lichte der oben entwickelten Vorstellungen diskutiert. Veröffentlicht wurden diese Ergebnisse in [32] und [40].

### 5.1. Experimentelle Methoden

#### 5.1.1. Versuchsablauf

Verläuft ein endozytoseähnlicher Prozess kontinuierlich, so wird dabei Membranfläche des Vesikels verbraucht. Die entstehende Membranspannung muss durch Volumenverlust und damit mit einer Schrumpfung des Vesikels einher gehen. Die durchgeführten Experimente basieren auf einer prinzipiell sehr einfachen Versuchsanordnung die in Abbildung 5.1 skizziert ist. Die Messmethodik soll hier nur sehr kurz Umrissen werden, um dem Leser eine bessere Vorstellung der beschriebenen Ergebnisse zu ermöglichen. Detailliertere Beschreibungen und Rezepte finden sich in Anhang A.1.

Riesenvesikel (GUV) wurden durch Elektroformation hergestellt, wobei Sucroslösung das Vesikellmedium darstellt. Die GUVs wurden in einer Kapillarkammer mit Silica-Nanopartikeln vermischt, die wiederum in einer gepufferten Glucoselösung dispergiert wurden. Für Experimente in denen die Membran sichtbar sein sollte, wurde sie mit **0,05 mol%** des Fluoreszenzfarbstoffes DiOC<sub>14</sub> markiert. Die Nanopartikel waren hingegen nur in einigen Fällen mit einem Fluoreszenzmarker versehen (siehe A.2.2). Dieser Fall erlaubt eine separate Beobachtung beider Systemkomponenten durch alternierende Aufzeichnung beider Fluoreszenzkanäle.

Die höhere Dichte der Sucroslösung innerhalb des Vesikels im Vergleich zum externen Medium führt dazu, dass die Vesikel auf den Kammerboden absinken, was die Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop erheblich vereinfacht. Allerdings birgt dieses Verfahren auch die Gefahr einer starken Wechselwirkung der Vesikelmembran mit dem Kammerboden. Um eine Verfälschung der Messergebnisse oder gar ein Platzen der Riesenvesikel zu verhindern, wurde der Boden der Kammer mit Agarose-Gel beschichtet (A.1.3), das zu einer sterischen Abstoßung der Vesikel führt und so ungewollte Adhäsion verhindert. Die nahezu perfekt sphärische Form und das auftreten von sichtbaren Membranundulationen ohne den Einfluss von Partikeln zeigt, dass die Adhäsion durch dieses Verfahren auf ein vernachlässigbares Maß reduziert wird. Das externe Medium enthält die suspendierten Partikel, HEPES, NaCl sowie Glucose. Da die Oberflächenladung der Nanopartikel vom pH-Wert abhängt, muss dieser bei pH7 stabilisiert werden. Deshalb enthält die Pufferlösung **15 mM HEPES**. Durch die Zugabe von NaCl kann die Ionenstärke eingestellt werden, ohne den pH-Wert stark zu beeinflussen. Dabei ist es extrem wichtig, den osmotischen Druck zwischen interner und externer Lösung sorgfältig anzugleichen. Dies geschieht durch Sucrose im Inneren der Vesikel und Glucose in der Pufferlösung. Wenn nicht explizit erwähnt, wurde in allen Experimenten ein osmotischer Druck von **150 mOsm** eingestellt und mittels Osmometer kontrolliert. Der Unterschied der molaren Massen von Glucose und Sucrose bedingt den oben angesprochenen, gewünschten Dichteunterschied.

Da der thermodynamische Zustand der Vesikelmembran ihre mechanischen

Eigenschaften stark beeinflusst, ist es wichtig die Temperatur während des Experiments exakt zu kontrollieren. Zu diesem Zweck wurde die Kammer-temperatur mithilfe eines PID-gesteuerten Peltierelements aktiv geregelt. So konnte eine Temperaturstabilität von  $\pm 0,1$  °C erreicht werden.

Die Beobachtung der Vesikel erfolgt durch ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) mit angeschlossener Kamera (Hamamatsu Orca 05G).

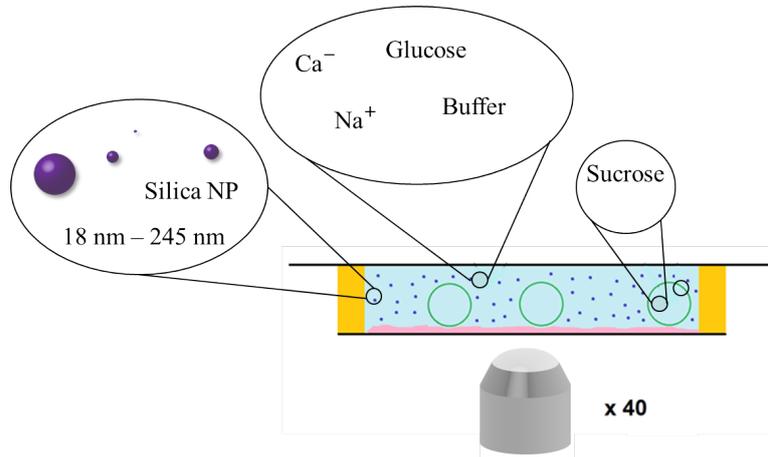


Abbildung 5.1. Schematische Darstellung der Experimente. Die Vesikel liegen auf dem mit Agarosegel beschichteten Boden einer temperierten Kapillarkammer.

Abbildung 5.2 zeigt ein Vesikel, das über eine Dauer von mehreren Minuten während der Partikelaufnahme beobachtet wurde.

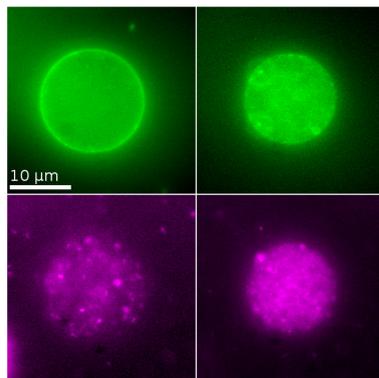


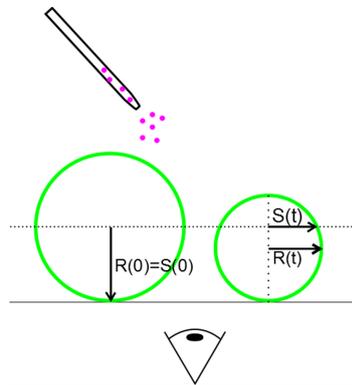
Abbildung 5.2 Ein Vesikel (Lipidmembran: grün) während der Aufnahme von Nanopartikeln (magenta). Tritt eine unbeschränkte Partikel Aufnahme ein, geht diese mit einer deutlichen Schrumpfung des Vesikels einher. Der Partikel-Kanal zeigt ausschließlich das Fluoreszenzsignal der Partikel, während der Membran-Kanal einen geringen Crosstalk aufweist, der vermutlich u.U. durch Förster-Transfer zwischen den beiden Fluorophoren begründet sein dürfte. Dennoch kann die Aufnahme so interpretiert werden, dass Membranmaterial mitsamt den Partikeln ins Innere des Vesikels gelangt.

Der Verlust an Membranoberfläche ist dabei proportional zur Anzahl aufgenommener Partikel. Während der Aufnahme wurde i.d.R. mehrfach

nachfokussiert um den Fokus möglichst nahe an der Ebene des maximalen Vesikelradius zu halten. Es ist sowohl eine Anreicherung von Partikeln im Vesikelinneren sowie eine deutliche Schrumpfung des Vesikels zu beobachten. Die Vesikeloberfläche  $A(t)$  wurde, wie in Abbildung 5.3 skizziert aus der beobachteten Querschnittsfläche beziehungsweise deren mittleren Radius  $S(t)$  entsprechend ermittelt. Während der Phasen ohne Nachfokussierung wurde der Beobachtungsfehler korrigiert.

$$A(t) = 4\pi R(t)^2 = 4\pi \left( \frac{S(t)^2}{2S(0)} + \frac{S(0)}{2} \right) = \frac{A_c(t)^2}{A_c(0)} + 2A_c(t) + A_c(0) \quad (5.1)$$

Abbildung 5.3. Darstellung der geometrischen Verhältnisse bei der Auswertung.



### 5.1.2. Kinetisches Modell der Partikelaufnahme und Auswertung

Das im vorigen Abschnitt 3 beschriebene Phasendiagramm zeigt zwar, wann eine Partikelaufnahme prinzipiell möglich ist, macht aber keine Aussage über den zeitlichen Verlauf des Aufnahmeprozesses. Für eine saubere Analyse der experimentellen Daten wird ein Modell für die Aufnahmekinetik jedoch benötigt und soll deshalb hier entwickelt werden. Wir gehen dafür vom folgenden Bild aus: Phänomenologisch bestimmen zwei Prozesse die Aufnahmegeschwindigkeit in unserem System: die Aufnahmefähigkeit der Membran selbst, sowie der Diffusion von Partikeln aus der Umgebung hin zum Vesikel. Abbildung 5.4 skizziert die entsprechende Situation:

Sind in der Umgebung der Membran beliebig viele Partikel vorhanden, so hängt es von der Relaxation der Membranspannung ab, wie schnell die Partikelaufnahme von statten gehen kann. Im einfachst möglichen Bild können wir davon ausgehen, dass die Überschreitung der Membran als diffusiver Prozess beschrieben werden kann, der durch eine effektive Membranpermeabilität  $P$  und die Partikelkonzentration an der Oberfläche  $C_S^N$  bestimmt ist. (Der

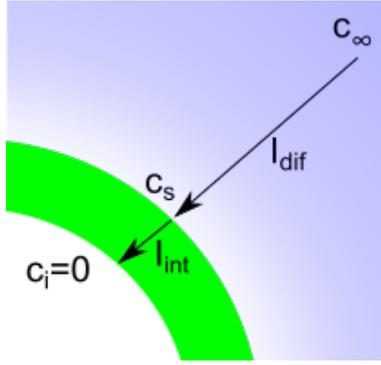


Abbildung 5.4 Da sich infolge der Partikelaufnahme eine Verarmungszone in der Umgebung des Vesikels ausbildet, ist der Prozess durch zwei Faktoren limitiert. Die Diffusion von Partikeln entlang des Konzentrationsgefälles hin zum Vesikel ist als Diffusionsstrom  $I_{\text{dif}}$  dargestellt, die eigentliche Aufnahme der Partikel durch die Membran als Internalisierungsstrom  $I_{\text{int}}$ .

Index  $N$  bezeichnet dabei die Partikelkonzentration im Gegensatz zur sonst verwendeten Oberflächenkonzentration  $C^A = C^N 4\pi r^2$ .)

Gehen wir davon aus, dass sich keine freien (nicht von Membran umschlossenen) Partikel innerhalb des Vesikels befinden ( $C_i^N = 0$ ), so gilt für den Partikelstrom  $I_{\text{int}} = dN/dt$ :

$$I_{\text{int}} = C_S^N(t)PA \quad (5.2)$$

Um einen entsprechenden Ausdruck für den Diffusionsstrom  $I_{\text{dif}}$  zu erhalten, nutzen wir, dass im Fließgleichgewicht für die Diffusionsstromdichte  $j(r)$  gelten muss:

$$j(r) = \frac{I_{\text{dif}}^N}{4\pi r^2} = D \frac{dC^N}{dr} \quad (5.3)$$

Die zweite Identität folgt aus dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz. Mit den Randbedingungen  $C^N(R) = C_S^N$  und  $C^N(\infty) = C_\infty$  folgt:

$$I_{\text{dif}} = 4\pi D(C_\infty^N - C_S^N)R \quad (5.4)$$

Soll sich das Konzentrationsprofil im Gleichgewicht befinden, müssen Diffusions- und Internalisierungsstrom gleich groß sein ( $I_{\text{int}} = I_{\text{dif}} = I$ ).  $C_S^A$  kann damit eliminiert werden und es folgt:

$$I = -\frac{2\sqrt{\pi}C_\infty^N DPA}{P\sqrt{A} + 2\sqrt{\pi}D} \quad (5.5)$$

Ersetzt man nun die Partikelkonzentration  $C_\infty^N$  durch die entsprechende Oberflächenkonzentration  $C_\infty^A = C_\infty^N 4\pi r^2$ , so erhalten wir eine Differentialgleichung für die zeitliche Änderung der Vesikeloberfläche:

$$\frac{dA(t)}{dt} = -\frac{2\sqrt{\pi}C_\infty^A DPA(t)}{P\sqrt{A(t)} + 2\sqrt{\pi}D} \quad (5.6)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung kann als Fitfunktion für die Auswertung der experimentellen Ergebnisse genutzt werden:

$$A(t) = \frac{4\pi D^2 \mathfrak{W} \left( \frac{\sqrt{\frac{K}{e D \sqrt{\pi}} - C_{\infty}^A P t}}{p^2} \right)^2}{p^2} \quad (5.7)$$

Die Konstante  $K$  folgt aus der Integration und  $\mathfrak{W}$  bezeichnet die Lambert-W-Funktion.

Einfache Approximationen für diese Formel lassen sich aus 5.6 ableiten. Für den Fall  $P\sqrt{A} \ll D$ , also für permeabilitätslimitierte Aufnahme gilt:

$$\frac{dA}{dt} = -C_{\infty}^A P A(t) \quad (5.8)$$

und somit

$$A(t) = A_0 e^{-C_{\infty}^A P t} \quad (5.9)$$

mit der Anfangsoberfläche  $A_0 = A(t = 0)$ .

Für diffusionslimitierte Aufnahme ( $P\sqrt{A} \gg D$ ) gilt dagegen

$$\frac{dA}{dt} = -2\sqrt{\pi} C_{\infty}^A D \sqrt{A(t)} \quad (5.10)$$

und damit die Lösung:

$$A(t) = A_0 - \frac{1}{2} \sqrt{\pi A_0} C_{\infty}^A D t + \pi C_{\infty}^A{}^2 D^2 t^2 \quad (5.11)$$

was einer nach oben geöffneten Parabel entspricht, deren Scheitelpunkt auf der x-Achse liegt. Physikalisch sinnvoll ist natürlich nur die linke Seite dieser Parabel. Nach Erreichen des Scheitelpunkts bleibt die Vesikeloberfläche unverändert bei  $A = 0$ .

Zur Charakterisierung eines Systems bzgl. dieser beiden Grenzfälle ist es sinnvoll, die dimensionslose Kenngröße  $X$  einzuführen:

$$X := P\sqrt{A}/D \quad (5.12)$$

Für  $X \gg 1$  ist das Aufnahmeverhalten im Wesentlichen durch die Diffusion der Partikel zum Vesikel bestimmt während für alle  $X \ll 1$  die Membranpermeabilität die maßgebliche Größe ist. Für  $X \approx 1$  spielen beide Aspekte eine tragende Rolle. Offensichtlich gilt  $dX/dt < 0$ , d.h. mit fortschreitender Partikelaufnahme gewinnen die spezifischen Membraneigenschaften mehr und mehr Einfluss.

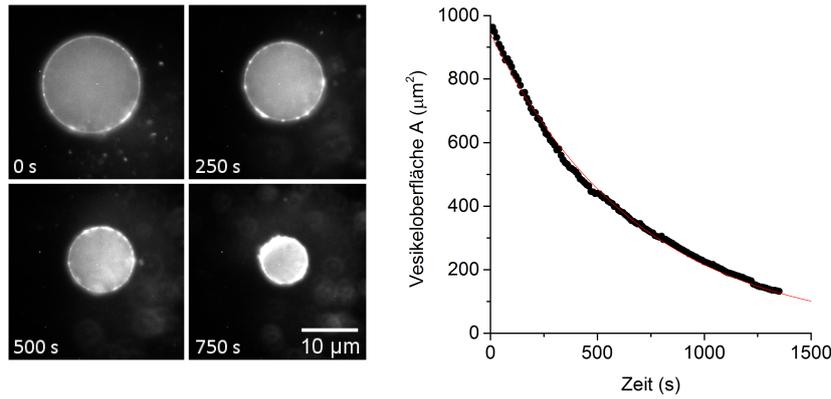


Abbildung 5.5. Vesikel während der Partikelaufnahme. (links) Die Oberflächenabnahme ist bereits in den Rohdaten deutlich zu erkennen. (rechts) Die grafische Analyse mit ImageJ liefert den zeitlichen Verlauf der Vesikeloberfläche. Die rote Linie ist das Resultat der Anpassung des empirischen Modells 5.7 an die Messdaten

Abbildung 5.5 zeigt ein Vesikel, während der Aufnahme von  $20 \text{ nm}$ -Partikeln, sowie einen Graphen, der die entsprechende Entwicklung der Vesikeloberfläche darstellt. Offensichtlich ist das Modell 5.7 hervorragend dazu geeignet, das Schrumpfverhalten der Vesikel über einen langen Beobachtungszeitraum zu beschreiben. Allerdings wurde in den hier folgenden Experimenten nicht in allen Fällen eine derart lange Beobachtungszeit eingehalten. Stattdessen wurde die Anfangssteigung der Schrumpfrate  $dA(t)/dt$  innerhalb der ersten Minuten bestimmt. In diesem Falle ist es gerechtfertigt, Gleichung 5.7 zu linearisieren und nur die anfängliche Schrumpfrate  $1/A_0 \cdot dA(t)/dt$  zu betrachten. Abhängig vom dominierenden Prozess ist diese dann ein Maß für die Diffusionskonstante der Partikel (im Falle sehr permeabler Membranen) oder für die Membranpermeabilität.

$$\frac{1}{A_0} \frac{dA(t)}{dt} \xrightarrow{t \rightarrow 0} PC_\infty^A \quad (5.13)$$

bzw.

$$\frac{1}{A_0} \frac{dA(t)}{dt} \xrightarrow{t \rightarrow 0} DC_\infty^A \sqrt{\frac{\pi}{A_0}} \quad (5.14)$$

### 5.1.3. Materialien

**Die Herstellung von Riesenvesikeln** erfolgte durch die erstmals von Angelova et al. beschriebene Elektroformation [71] und wird in Anhang A.1.1 im Detail beschrieben. Dabei wird zunächst die gewünschte Lipidmischung in einer Chloroform-basierten Lösung auf ein leitfähiges Substrat aufgebracht. Nach restloser Entfernung des Lösemittels wird das Substrat in eine Kammer eingebracht, die die Lösung enthält, die später das interne Medium bilden soll. In allen hier vorgestellten Experimenten war dies eine Sucroslösung mit einer Konzentration von **150 mM**. Durch Anlegen einer Wechsellspannung wird die Bildung von Riesenvesikeln angeregt.

**Als externes Medium** diente eine gepufferte Glucoselösung (**15 mM** HEPES + NaCl + Glucose). NaCl dient dabei zur Einstellung der Ionenstärke und Glucose zur Angleichung der Osmolarität, die möglichst exakt auf derjenige des internen Mediums eingestellt wurde, um osmotischen Druck auf die Vesikelmembran zu vermeiden. In dieses Medium wurden die Vesikel während der Experimente überführt und ggf. nach Größe separiert.

**Die verwendeten Silica-Partikel** wurden im Falle nicht fluoreszenz-markierter Partikel, käuflich erworben bei nanoComposix (Prag, Tschechien). Daten zu Größenverteilung und  $\zeta$ -Potential wurden vom Hersteller bereitgestellt und lediglich in Stichproben geprüft. Die fluoreszenzmarkierten Partikel wurden von Rudolf Herrmann im Stöberverfahren hergestellt und mit geringen Mengen verschiedener Fluorophore (Perylene/ chCy3) gelabelt [72]. Die Oberflächenkonzentration der Farbstoffe wurde so gering gehalten, dass davon auszugehen ist, dass die physikalischen Oberflächeneigenschaften nicht signifikant beeinflusst werden. Die Charakterisierung der Größenverteilung erfolgte durch die statistische Analyse von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Stichprobengröße  $>300$  Partikel), die des  $\zeta$ -Potentials erfolgte unter Verwendung eines  $\zeta$ -Sizers One (Malvern, USA). Anhang A.2.2 gibt eine Übersicht aller verwendeten Partikelspezies.

**Partikelsuspensionen** wurden hergestellt, indem zunächst in Wasser suspendierte Silica-Nanopartikel mehrfach mit Reinstwasser gemischt, abzentrifugiert und mittels Ultraschall redispersiert wurden, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Im letzten Schritt wurde Glucoselösung zugegeben um die Osmolarität derjenigen der oben genannten Medien anzugleichen. Details zu den verwendeten Partikeln und der Herstellung der Suspensionen finden sich in Anhang A.2.2. Die Vesikelsuspensionen wurden jeweils kurz vor den Experimenten mit dem externen Medium gemischt, um eine relevante Sedimentation während des Experiments auch für größere Partikel auszuschließen.

Wichtig: Beim Vergleich unterschiedlicher Partikelgrößen wurde die Konzentration so gewählt, dass für alle Größen jeweils die gleiche kumulierte Partikeloberfläche pro Flüssigkeitsvolumen erreicht wird. Dieses Vorgehen erschien sinnvoll, da es sich bei den beobachteten Prozessen um Oberflächenwechselwirkungen handelt. Die kolloidale Stabilität der Suspensionen bei Zugabe von Ionen wurde jeweils vor Beginn der eigentlichen Versuche durch die Aufnahme von Zeitreihen mittels dynamischer Lichtstreuung (90Plus Particle Analyzer, Brookhaven Instruments, USA) geprüft, um sicher zu stellen, dass nicht die Bildung von Agglomeraten zu Fehlinterpretationen der Experimente führt.

## 5.2. Ergebnisse

Die zuvor beschriebene Analysemethode wurde nun bei unterschiedlichen Randbedingungen für jeweils mehrere Vesikel angewandt. In Abbildung 5.6(A) sind relative Schrumpfraten von Vesikeln bei der Aufnahme von Partikeln unterschiedlicher Größe aufgetragen, die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen für jeweils 10 min inkubiert und beobachtet wurden. Zu beachten ist, dass selbst ohne die Zugabe von NaCl bereits 15 mM Na<sup>+</sup>-Ionen durch die Dissoziation des HEPES-Salzes enthalten sind. Die Partikelkonzentration war bei allen Experimenten so gewählt, dass eine kumulierte Oberflächenkonzentration von 0,5 m<sup>2</sup>/l erreicht wurde.

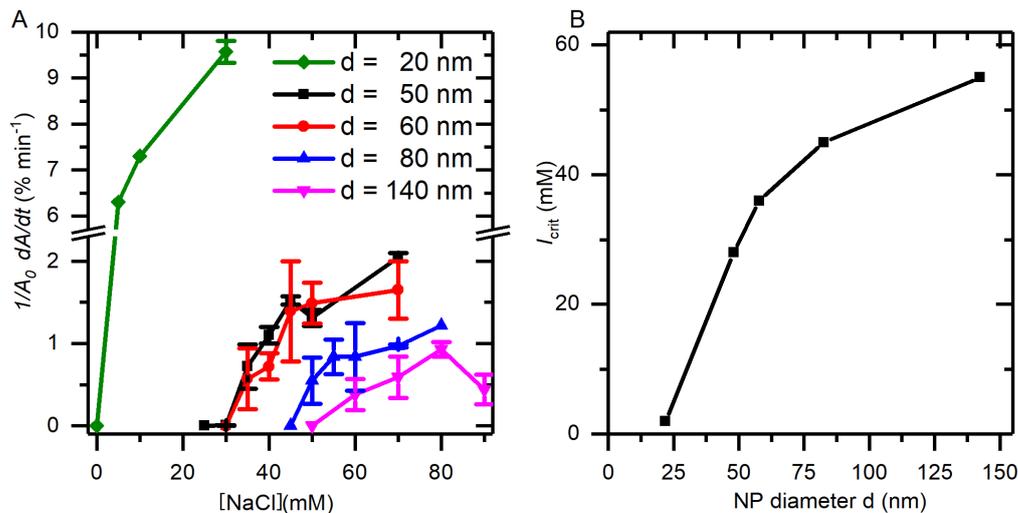


Abbildung 5.6. (A) Abhängigkeit der normierten Schrumpfrate von Partikeldurchmesser der Salzkonzentration [NaCl] in der Pufferlösung. (B) Auftragung der für die Aufnahme nötige minimale Salzkonzentration  $I_{crit}$  über dem Partikeldurchmesser.

Wie erwartet, ist  $dA(t)/dt$  sowohl von der Ionenstärke als auch von der Größe der verwendeten Partikel abhängig. Typischerweise ist für eine spezifische Partikelgröße ein scharfes Einsetzen der Partikelaufnahme ab einer gewissen kritischen Partikelkonzentration  $I_{crit}$  zu beobachten. Bei weiter steigender Ionenkonzentration nimmt die Aufnahme rate weiter zu, strebt aber schnell einem Sättigungswert entgegen. Für eine Charakterisierung des Aufnahmeverhaltens wurden die Ergebnisse für eine Partikelgröße jeweils mit einer Funktion der Form  $P(I) = P_{max}(1 - \exp(-a(I - I_{thr})))$  für  $I > I_{thr}$  gefittet. Die Wahl dieser Fitfunktion ist rein empirischer Natur. Sie hat also keine theoretische Begründung und wurde lediglich gewählt, um eine objektive Bewertung der gemessenen Werte für alle Partikelgrößen zu gewährleisten.

Damit können nun zwei Werte zur weiteren Untersuchung herangezogen werden. Zum einen die Ionenstärke  $I_{crit}$ , ab der überhaupt eine Aufnahme verzeichnet werden kann und zum anderen die maximale Aufnahme rate

(Permeabilität)  $P_{\max}$ . In beiden Werten ist klar der Trend erkennbar, dass eine Partikelaufnahme durch höhere Ionenkonzentration und damit höhere Adhäsionskraft begünstigt wird. Oberhalb von ca.  $I = 80 \text{ mM}$  nimmt die Schrumpfrate wieder ab. Der Grund hierfür liegt jedoch vermutlich in der einsetzenden Bildung von Partikelagglomeraten, die in den Experimenten auch optisch deutlich erkennbar waren. Ab einer Konzentration von  $I = 90 \text{ mM}$  wurde für alle verwendeten Partikelspezies eine Destabilisierung der Suspension mittels dynamischer Lichtstreuung und die Bildung solcher Agglomerate nachgewiesen. In diesen Konzentrationsbereichen ist das hier beschriebene System nicht mehr zur Untersuchung der Aufnahme einzelner Partikel geeignet. Der letzte Datenpunkt in Abbildung 5.6(A) sollte daher nicht weiter berücksichtigt werden.

### 5.2.1. Einfluss der Partikeldiffusion

Die Aufnahmezeit, bleibt man im Bild 5.4, entweder durch die begrenzte Geschwindigkeit des Aufnahmeprozesses, also die Permeabilität der Membran, oder durch die Diffusionsrate der Partikel in der Geschwindigkeit bestimmt sein. Bei ausreichend hoher Salzkonzentration, und damit Adhäsionsstärke, würde man in dieser Vorstellung davon ausgehen, dass irgendwann die Diffusionsrate  $D$  die Aufnahme begrenzt. Um diese Hypothese zu prüfen, wird in 5.7 die Vorhersage des Stokes–Einstein–Gesetzes mit experimentell bestimmten Werten für den Diffusionskoeffizienten verglichen. Hierfür wurde für jede Partikelgröße der Diffusionskoeffizient nach 5.14 aus den ermittelten Sättigungswerten für die Aufnahmezeit  $P_{\max}$  bestimmt.

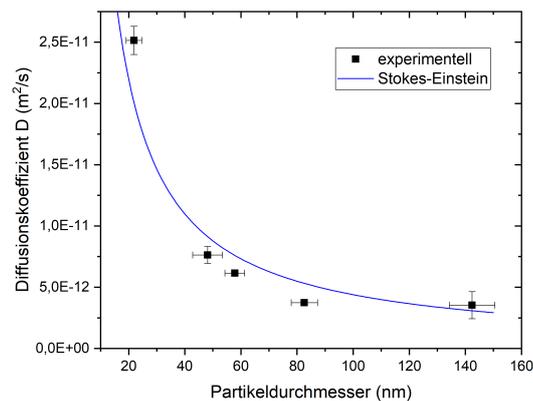


Abbildung 5.7. [übernommen aus [40]] nach Gleichung 5.10 bestimmte Diffusionsraten im Vergleich zur theoretischen Vorhersage des Stokes–Einstein–Gesetzes. Bis auf geringfügige Abweichungen scheint die Aufnahmezeit durch die Diffusionsrate der Partikel im umliegenden Medium bestimmt zu sein.

Bis auf kleine Abweichungen wird die zuvor beschriebene Hypothese bestätigt. Im Rahmen der Messgenauigkeit liegen die Aufnahme­raten für alle Partikel­größen knapp unterhalb des durch die Diffusionsrate vorhergesagten Limits. Eine Ausnahme bilden die kleinsten Partikel, die dieses Limit sogar überschreiten. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen sind mögliche Messfehler bei der Bestimmung der Partikelgröße. Insbesondere für sehr kleine Partikel können DLS-Messungen durch Signale von Partikelagglomeraten hin zu größeren Werten verfälscht werden. (Die Streukraft eines Partikels hängt mit der 6. Potenz von seiner Größe ab.) Es ist daher durchaus möglich, dass die gemessene Partikelgröße einen kleinen systematischen Fehler aufweist, der die o.g. Abweichung erklärt. Es zeigt sich damit, dass die Aufnahme­rate ab der kritischen Ionenkonzentration  $I_{\text{crit}}$  schnell zunimmt und das theoretische Maximum eines diffusionsgehemmten Zustands erreicht.

### 5.2.2. Einfluss der Partikelkonzentration

Wir haben gesehen, dass in den bisher beschriebenen Experimenten die Partikel­aufnahme hauptsächlich durch die begrenzte Diffusion von Partikeln hin zur Membran beschränkt wird. Erhöht man nun aber die Partikel­konzentration, so ist anzunehmen, dass die „Konkurrenz“ eindringender Partikel und damit die Permeabilität der Vesikelmembran an Bedeutung gewinnt. Der hier betrachtete Aufnahme­prozess erfordert die Umordnung größerer Membranbereiche, die aufgrund einer nicht verschwindenden Membranviskosität Zeit benötigt. Ist diese Zeit länger als die mittlere „Anklop­fzeit“ von ankommenden Partikeln, so ist zu erwarten, dass der Aufnahme­prozess beeinflusst wird, die effektive Membranpermeabilität also einen messbaren Effekt hat. Um dies zu prüfen, wurden Aufnahme­experimente bei verschiedenen Partikel­konzentrationen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde die Aufnahme von Partikeln mit  $r = 30 \text{ nm}$  bei einer Ionenstärke  $I = 50 \text{ mM}$  vermessen.

Wie in Abbildung 5.8 zu ersehen, nimmt die Aufnahme­rate ab  $C \approx 1 \text{ m}^2/\text{l}$  in der Tat immer schwächer mit der eingesetzten Partikel­konzentration zu, was die o.g. Hypothese bestätigt. Bis zu diesem Wert kann davon ausgegangen werden, dass die Membranpermeabilität gegenüber den Diffusionseigenschaften der Partikel eine untergeordnete Rolle für die Aufnahme­kinetik spielt. Interessanterweise könnten in Zukunft über diesen Schwellwert Rückschlüsse auf die relevanten Zeitskalen der beteiligten Membranrelaxationsprozesse gezogen werden.

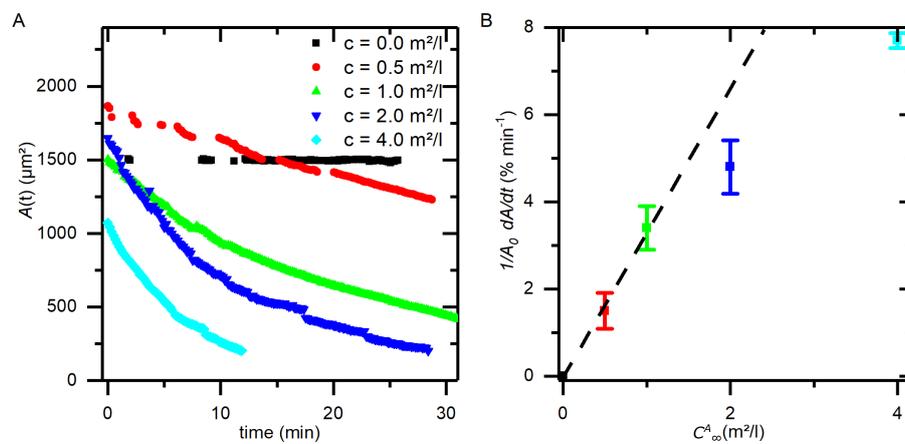


Abbildung 5.8. Abhängigkeit der Membranpermeabilität  $P_{\max}$  von der Konzentration  $C_\infty^A$ . A) Beispielhafte Entwicklung der Vesikelgröße während der Partikelaufnahme. B) Verlauf der Aufnahmezeit über der Partikelkonzentration. Die gestrichelte Linie zeigt an, dass die Aufnahmezeit bis zu einer Oberflächenkonzentration von  $1 \text{ m}^2/\text{l}$  linear zunimmt. Ab diesem Wert wird ein Abweichen von diesem Trend hin zu kleineren Raten beobachtet.

### 5.3. Diskussion

Insgesamt bestätigen sich experimentell die Erwartungen, die sich aus der Theorie ergeben. Eine Erhöhung der Ionenkonzentration führt zu einer stärkeren Adhäsion und diese zu einer Überschreitung der Schwelle zur unbegrenzten Aufnahme von Nanopartikeln durch Riesenvesikel. Die Aufnahme rate erreicht dabei für moderate Partikelkonzentrationen Werte, die nahe am theoretischen Limit liegen, das durch die Diffusion von Partikeln zur Vesikeloberfläche gegeben ist. Bei hohen Partikelkonzentrationen scheinen die Vesikel jedoch nicht mehr schnell genug relaxieren zu können und dieses Limit wird nicht mehr erreicht. Die Schwellwerte für eine Partikelaufnahme sind stark größenabhängig und entsprechen damit grundsätzlich den Erwartungen aus dem numerischen Modell: Kleine Partikel werden schon bei sehr viel kleinerer Adhäsion aufgenommen als größere. Allerdings werden auch große Partikel noch aufgenommen, obwohl wir bereits gezeigt haben, dass die Adhäsionsstärke für das hier untersuchte System vermutlich nie größer werden kann als  $g_{\text{ad}} < 1.5 \text{ mJ/m}^2$ . Das Modell würde bei diesen Adhäsionsstärken selbst unter extremen Annahmen eine Aufnahme vom Partikelgrößen  $r > 50 \text{ nm}$  ausschließen, insbesondere dann, wenn eine „echt“ unlimitierte Aufnahme gefordert wird. Für große Partikel scheint das bisherige Modell die Wirklichkeit also noch nicht ausreichend abzubilden.

Sowohl bei der Entwicklung des Modells, als auch in dessen theoretischen Grundlagen wurden wichtige Vereinfachungen vorgenommen, die Prozesse analytisch beschreibbar machen oder die Komplexität der numerischen Berechnung reduzieren oder aber von physikalischen Effekten absehen, deren Stärke und Auswirkung unklar ist. Die wichtigsten sollen hier zumindest genannt und in ihrer Bedeutung eingeordnet werden.

**Vernachlässigung von thermischen Undulationen** Die Lipidmembran ist in Realität niemals flach, sondern „wabert“ aufgrund ihrer thermischen Anregung auf verschiedenen Längenskalen. Die effektive Flächenelastizität der Membran bei sehr kleinen Spannungen ist daher nicht durch die tatsächliche Flächenelastizität der Lipiddoppelschicht dominiert, sondern durch die Energie, die überwunden werden muss um die thermischen Unebenheiten (Undulationen) „glatt zu ziehen“.

Was außerdem unberücksichtigt blieb, ist ein Umstand auf den Helfrich bereits in [6] hinwies: Die Undulationen erzeugen auch einen Druck auf sich nähernde Oberflächen, der zu einer Repulsion zwischen Membran und z.B. der Partikeloberfläche führen dürfte. Da umso mehr Undulationsmoden zu diesem Druck beitragen können, je größer die Kontaktfläche ist, würde man aber erwarten, dass der abstoßende Effekt sich auf große Partikel stärker auswirkt als auf kleine.

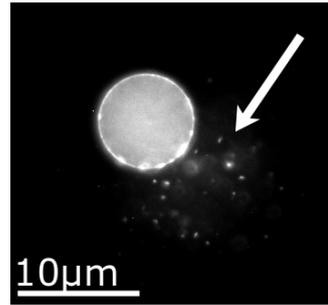
**Vernachlässigung metastabiler Bereiche im Phasendiagramm** Unser Modell berücksichtigt bisher lediglich eine scharfe Phasengrenze zwischen einer partiellen und einer vollständigen Umhüllung eines Partikels. Wie in [73] gezeigt, existiert aber ein breiter Übergangsbereich, in dem die partielle Umhüllung lediglich metastabil ist und bei Überwindung einer signifikanten Energiebarriere bereits eine vollständige Umhüllung das globale Gleichgewicht darstellt. Dieser Aspekt kann insbesondere im Übergangsbereich zur unbegrenzten Aufnahme einen signifikanten Einfluss auf die Beobachtungen haben. Die qualitativen Aussagen des Modells sollten aber auch dadurch nicht grundsätzlich verändert werden, da auch in diesem Falle eher eine positive Wirkung auf die Aufnahmerate kleiner Partikel zu erwarten ist.

**Annahme einer konstanten Porengröße** Die beschriebenen experimentellen Beobachtungen lassen sich nur erklären, wenn das Vesikel während des Aufnahmevorgangs einen Volumenverlust durch Membranporen erfährt, da die Aufnahme andernfalls nach kurzer Zeit zum Erliegen käme. Obwohl, wie oben beschrieben, eine permanente Partikelaufnahme beobachtet werden kann, die sowohl eine Schrumpfung von Vesikeln als auch eine Erhöhung der Membranspannung verursacht, können wir in der Regel keine Partikel beobachten, die das Vesikel wieder verlassen. Es muss also ein Verlust von Vesikelmedium stattfinden, gleichzeitig werden aber Partikel zurückgehalten. Dieses Verhalten ist nur erklärbar, wenn die entstehenden Poren nie wesentlich größer werden als die verwendeten Partikel. Interessanterweise ändert sich dieses Bild bei sehr hohen Partikel- und Ionenkonzentrationen. In entsprechenden Experimenten kann dann, wie in Abbildung 5.9 gezeigt, das Ausströmen von Partikeln aus dem Vesikel beobachtet werden. Eine wahrscheinliche Erklärung ist eine lokale Ruptur bzw. eine transiente Vergrößerung von Poren.

Dass das Vesikel unter den gegebenen Bedingungen in der Regel nicht völlig kollabiert könnte dadurch erklärt werden, dass die Membranspannung ab einer gewissen Porengröße so effektiv abgebaut wird, dass eine weitere Vergrößerung der Pore energetisch ungünstig wäre. Es bildet sich also irgendwann ein Gleichgewicht zwischen dem durch die Partikelaufnahme ausgelösten Membranflächenverlust und dem Volumenverlust durch Poren aus. Deren Größe ist durch die aktuelle Lateralspannung der Membran bestimmt. Es ist weiterhin naheliegend, anzunehmen, dass jede Partikelaufnahme zunächst zur Nukleation in Form eines hydrophilen Defekts und somit zur Entstehung einer metastabilen Pore führt, die sich dann aufgrund hoher Spannung vergrößert. Ob diese Pore sich nach kurzer Zeit wieder schließt oder stabilisiert wird und weiter anwächst, hängt von der Oberflächenspannung des Vesikels ab.

Es scheint also so zu sein, dass die Annahme einer konstanten Porengröße unter bestimmten experimentellen Bedingungen falsch ist. Insbesondere für größere Partikel könnte dieser Aspekt eine unbegrenzte Aufnahme bei deutlich

Abbildung 5.9 DOPC-Vesikel während der Aufnahme von 60 nm-Partikeln bei  $I = 50$  mM. Die Partikelkonzentration ist hier 4 mal so hoch gewählt wie üblich. der Pfeil markiert eine Wolke von Partikeln, die an einer Stelle aus dem Vesikel entkommen, was auf eine transiente Membranruptur hindeutet. Das Vesikel zeigt dabei einen schnellen Volumenverlust.



geringeren Ionenkonzentrationen ermöglichen als bisher angenommen. Ist dies der Fall, so wäre die bisherige Annahme, dass die Beobachtung der Aufnahme größerer Partikel ein Artefakt durch die begrenzte Beobachtungszeit ist (vgl. 5.6(B)), hinfällig.

## 6. Verfeinerung des Modells

Die größte Schwäche des in Kapitel 3 beschriebenen Modells dürfte die extrem vereinfachende Annahme homogener partikelinduzierter Poren mit einer festen Lebensdauer zu sein. Die zuvor gemachten Überlegungen legen eine realistischere Beschreibung der Porendynamik nahe. Bei jeder Partikelaufnahme soll nun eine Relaxation der entstandenen Poren hin zum Gleichgewichtszustand zugelassen werden. Eine weitere Unzulänglichkeit des Modells zeigt sich in der Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit für eine bestimmte Partikelspezies von der Ionenkonzentration des Mediums bzw. von der Adhäsionsstärke. Die bisherigen Annahmen sagen einen relativ scharfen Übergang von keiner Aufnahme hin zu einer Aufnahme mit maximaler Rate voraus. Der Grund hierfür ist, dass evtl. vorhandene Energiebarrieren innerhalb des Vorgangs der Partikelaufnahme nicht berücksichtigt wurden. In diesem Abschnitt soll das bisherige Modell um diese Aspekte erweitert werden.

### 6.1. Dynamik transienter Poren

Bisher waren wir davon ausgegangen, dass jede Partikelaufnahme die Entstehung einer Pore induziert und dass dieser Prozess die Entstehungsrate von Poren gegenüber anderen Prozessen (z.B. Thermodynamische Fluktuationen) in der Regel dominiert. Diese Hypothese soll zunächst weiter aufrecht erhalten werden. Allerdings sollen nun für die Entwicklung des Porendurchmessers, sowie für die Lebensdauer einzelner Poren realistischere Annahmen gemacht werden als konstante Werte.

Die Entstehung von Poren in gespannten Lipiddoppelschichten wurde in der Vergangenheit sowohl experimentell als auch theoretisch detailliert untersucht. Quantitativ kommen die verschiedenen Modelle zu teils sehr unterschiedlichen Aussagen. Einen sehr guten Überblick über die einschlägige Literatur sowie eines der aktuellsten numerischen Modelle bieten Akimov et al.[56], [57]. Einige grundsätzliche Aussagen sind den meisten Modellen gemein:

- Hydrophile Poren entstehen in der Regel durch den Umweg über hydrophobe Defekte. Diese Defekte sind jedoch instabil. Überschreitet die Pore allerdings einen kritischen Durchmesser  $2r_p^* \approx 1 \text{ nm}$ , so kann die Pore in einen metastabilen hydrophilen Zustand übergehen. Beide Zustände sind durch eine relativ niedrige Energiebarriere voneinander getrennt [55]. Ohne die Existenz dieser metastabilen Zustände sind die experimentell beobachteten Dynamiken nicht zu erklären.
- Die typischen Lebenszeiten dieser Poren variiert mit der Lipidzusammensetzung und ist stark vom thermodynamischen Zustand der Membran abhängig. Typische Lebenszeiten liegen aber im Bereich von  $\tau \approx 100 \text{ ms}$  [74].
- Metastabile hydrophile Poren haben typische Radien  $r_p$  von wenigen Nanometern. Dieser Radius ist nur schwach abhängig von der Lateralspannung der Membran. Sowohl für ihren Verschluss, als auch für ihre Vergrößerung müssen Energiebarrieren überwunden werden. Zunehmende Membranspannung führt zu einer Abnahme der Energiebarriere hin zu größeren Poren und letztendlich zu einer Ruptur, d.h. zu einem Versagen der Membran [75], [76].
- Poren, die unter Spannung stehen und von Flüssigkeit durchströmt werden, werden dynamisch stabilisiert und können so mehrere Sekunden stabil bleiben, ohne dass eine Membranruptur auftritt [77]

Vernachlässigt man die Porenentstehung durch thermodynamische Fluktuationen, was ausreichend weit entfernt vom Phasenübergang der Membran gerechtfertigt sein dürfte, so wird die mittlere Anzahl der metastabilen Poren durch deren Lebenszeit und die Defekterzeugung durch Aufnahme einzelner

Partikel gegeben sein, solange sie nicht durch Membranspannung anwachsen. Eben dieser Fall soll im Weiteren berücksichtigt werden.

### 6.1.1. Theorie zur Porendynamik

Um die Dynamik der Membranporen zu modellieren, wollen wir uns hier auf ein Modell mit thermodynamischem Ansatz von Brochard-Wyart et al. stützen [75], [78]. Die treibenden Kräfte für Porenwachstum bzw. -verkleinerung sind die Oberflächenspannung  $\sigma$  und die Linienspannung  $T$ .

Typische Werte für die Linienspannung von Poren in DOPC-Membranen wurden aus der Beobachtung der Porendynamik bei Elektroporation gewonnen und werden mit  $T \approx 1 \text{ pN} \dots 10 \text{ pN}$  angegeben [77], [79]. Experimentelle Literaturwerte für reines DOPC liegen im Bereich  $T \approx 3,9 \text{ pN} \dots 25 \text{ pN}$ . Die gefundenen Werte streuen stark und hängen sowohl vom Hersteller als auch von der gewählten Analysemethode ab. Insbesondere können Verunreinigungen (z.B. Fluoreszenzfarbstoffe) die Linienspannung signifikant reduzieren [80]. Theoretische Überlegungen legen außerdem nahe, dass die Linienspannung schwach von der Lateralspannung der Membran abhängt [57]. Dieser Aspekt soll aber nicht weiter berücksichtigt werden.

Für die Gesamtkraft, die pro Längeneinheit auf den Porenrand wirkt, gilt:

$$f = \sigma_0 \left( 1 - \frac{r_p^2}{r_{c2}^2} \right) - \frac{T}{r_p} \quad (6.1)$$

Dabei ist  $r_{c2}$  derjenige Porenradius, der zu einer vollständigen Relaxation der Membran führt. Bei Annahme von  $N_p$  miteinander im Gleichgewicht stehenden Poren gilt:

$$r_{c2}^2 \cong 4R^2 \frac{\sigma_0}{E} \stackrel{\sigma \ll K_b/A}{\cong} \frac{R^4 \sigma_0 kT}{12\pi K_b^2} \quad (6.2)$$

Die zweite Gleichheit gilt für kleine Membranspannungen, bei denen der laterale Elastizitätsmodul  $E$  durch die Helfrich–Undulationen dominiert wird [81].

Gilt  $\sigma r_p \gtrsim T$ , so ist  $f$  positiv und die Pore wird anwachsen, gilt  $\sigma r_p \lesssim T$  so wird sie sich schließen. Bei gegebener Spannung existiert also ein kritischer Porenradius  $r_{c1} \cong T/\sigma_0$ , oberhalb dessen Poren weiterwachsen bis zum Radius  $r_{c2}$ .

Umgekehrt gilt, dass metastabile Poren mit  $r_p = r_p^*$  anwachsen, sobald eine kritische Membranspannung  $\sigma^*$  erreicht ist:

$$\sigma^* = T/r_p^* \quad (6.3)$$

Sobald die Poren soweit gewachsen sind, bzw. soviel Volumen aus dem Vesikel ausgeströmt ist, dass die Membranspannung abgebaut ist, beginnt sich

die Pore zu schließen. Die Geschwindigkeit des Porenwachstums (bzw. des Schließen einer Pore) ist wiederum gegeben durch die effektive Linienspannung, sowie durch die Oberflächenviskosität der Lipidmembran:

$$\frac{dr_p}{dt} = f/\eta_s. \quad (6.4)$$

Brochard-Wyart et al. entwickeln davon ausgehend ein Modell für den Lebenszyklus einzelner spannungsinduzierter Poren in Lipid-Vesikeln [78]. Es werden zwei unterschiedliche Grenzfälle betrachtet, die anhand einer dimensionslosen Kenngröße unterschieden werden:

$$\tilde{r} = \frac{3\pi\eta_0 R_0^2}{8\eta_s r_{c2}} \text{ mit } r_{c2} = 4R_0^2 \frac{\sigma}{K_A} \quad (6.5)$$

Ist  $\tilde{r} < 10$  (fast leak-out limit), so wird die Porendynamik von der Viskosität der Lipidmembran dominiert. Die Membran steht dabei dauerhaft unter Spannung. Es zeigt sich, dass in den für uns relevanten Fällen hingegen gilt  $\tilde{r} \gg 10$  (slow leak-out limit). In diesem Falle wird die Porendynamik von der Viskosität des ausströmenden Fluids bestimmt. Überschreitet die Pore den kritischen Radius zum Porenwachstum, so wächst sie solange, bis die Membranspannung nahezu vollständig abgebaut ist  $r_p \approx r_{c2}$  und es findet ein quasistatisches Ausströmen von Flüssigkeit statt, bis die Membranspannung soweit reduziert ist, dass sich die Pore wieder schließt.

Der maximale Porenradius ist dabei gegeben durch:

$$r_p^{\max} = r_{c2} - \frac{\Gamma}{2\sigma} = r_{c2} - \frac{r_p^*}{2} \stackrel{\tilde{r} \gg 10}{\approx} r_{c2} \quad (6.6)$$

### 6.1.2. Implementierung im Aufnahme-Modell

Die wichtigsten Eigenschaften der Porendynamik sollen nun in das numerische Modell integriert werden. Wir gehen dazu von folgenden Annahmen aus:

- Bei jeder erfolgten Partikelaufnahme entsteht eine metastabile Pore mit  $r_p = r_p^*$
- Bei kleiner Membranspannung  $\sigma < \sigma^*$  haben diese Poren eine mittlere Lebensdauer  $\tau$ , die durch die Materialeigenschaften der Membran und damit auch deren thermodynamischen Zustand bestimmt ist. Vereinfacht gehen wir aber davon aus, dass die exakte Membranspannung hier zu vernachlässigen ist und die Poren im metastabilen Zustand verharren.
- Überschreitet die Membranspannung den kritischen Wert  $\sigma^*$ , so wachsen alle Poren mit einer Wachstumsrate entsprechend Gleichung 6.4. Dabei

beeinflussen sich die Poren gegenseitig nicht, insbesondere findet keine Koaleszenz statt. Diese Annahme ist strenggenommen natürlich nur bei ausreichend großen Porenabständen und Membranviskosität eine gute. Insbesondere bei hohen Aufnahmezeiten ist also fraglich, ob das Modell die Porendynamik realistisch widerspiegeln kann.

- Das Schließen der Poren bei Abbau der Spannung wird ebenfalls durch Gleichung 6.4 bestimmt, bis der metastabile Porenradius wieder erreicht ist und die Lebensdauer der Poren wiederum durch  $\tau$  bestimmt wird.
- zu jedem Zeitschritt der Dauer  $\Delta t$  entweicht aus jeder Pore ein Volumen der Größe  $\Delta V = \frac{\sigma}{\eta_0 r_p^3 R} \Delta t$

Die entsprechende Programmstruktur ist in Abbildung 6.1 gezeigt; der entsprechende Quellcode findet sich in Anhang A.4.2.

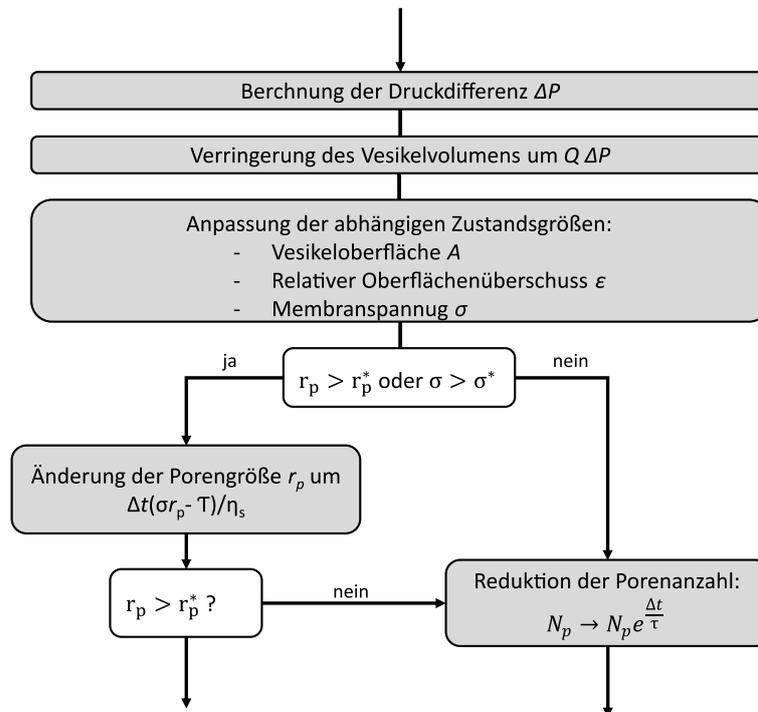


Abbildung 6.1. Ablaufschema der Methode "Relaxation", die die Porendynamik und den Volumenverlust des Vesikels während eines Simulationsschritts beschreibt.

## 6.2. Thermodynamische Aspekte der Partikelaufnahme

Wie bereits angedeutet, hat das in Kapitel 3 beschriebene Modell neben der zu stark vereinfachten Darstellung der Porendynamik eine weitere wichtige Unzulänglichkeit. Die Aufnahmefähigkeit von Vesikeln wird darin sozusagen „binär“ beschrieben. D.h., sobald ein System die vollständige Umhüllung eines Partikels zulässt, sich also in der Phase „unlimitierter“ Aufnahme befindet, geht das Modell davon aus, dass jeder Partikel unmittelbar bei Kontakt aufgenommen wird. Es wird nicht berücksichtigt, dass der Übergang vom freien Partikel zur vollständigen Umhüllung einen diskontinuierlichen Phasenübergang darstellt und dabei im Allgemeinen eine nicht verschwindende Energiebarriere überwunden werden muss, die aus der Lateralspannung der Membran resultiert.

Diese Vernachlässigung äußert sich in einem sehr scharfen Übergang der Aufnahme­rate von keiner zu maximal möglicher Aufnahme bei steigender Adhäsionsenergie. Dies deckt sich nicht mit den experimentellen Ergebnissen, in denen ein kontinuierlicher Übergangsbereich der Aufnahme­raten klar erkennbar ist. Im Folgenden soll unser theoretisches Modell um genau diese Aspekte erweitert werden.

Um das Phasendiagramm der Partikel­aufnahme um den Aspekt von Energiebarrieren zu erweitern, die während der Umhüllung eines Partikels auftreten, stützen wir uns abermals auf den Theoriekomplex von Deserno et al.: In [73] wird der diskontinuierlich Phasenübergang zur vollständigen Umhüllung eines Partikels unter der Randbedingung konstanter Membranspannung genauer untersucht. Hierzu werden unter anderem die folgenden beiden dimensionslosen Größen definiert:  $\tilde{g}_{\text{ad}} := \frac{2g_{\text{adr}}}{K_{\text{b}}}$  repräsentiert die relative Adhäsionsstärke,  $\tilde{\sigma} := \frac{\sigma r^2}{K_{\text{b}}}$  die Lateralspannung der Membran. Abbildung 6.2 wurde der eben genannten Publikation entnommen und zeigt die dort analysierten Verhältnisse sehr anschaulich.

Die Höhe der Energiebarriere kann in der Nähe der Phasengrenze unter realistisch hohen Spannungen  $\Delta E \cong 66k_{\text{B}}T$  betragen. Somit kann sie die vollständige Aufnahme sehr effektiv unterdrücken.

Es wird außerdem gezeigt, dass die skalierte Energiebarriere  $\Delta\tilde{E}(\sigma) := \frac{\Delta E}{\pi K_{\text{b}}}$  durch exponentielle Ausdrücke approximiert werden kann:

$$\Delta\tilde{E}_{<}(\tilde{\sigma}) \cong 1.54\tilde{\sigma}^{0.86} \quad \text{für niedrige Lateralspannungen} \quad (6.7)$$

$$\Delta\tilde{E}_{>}(\tilde{\sigma}) \cong 3.5\tilde{\sigma}^{1/3} \quad \text{für hohe Lateralspannungen} \quad (6.8)$$

Ihre Superposition  $(\Delta\tilde{E}_{<}^{-1} + \Delta\tilde{E}_{>}^{-1})^{-1}$  approximiert die Energiebarriere mit einem Fehler von <10%.

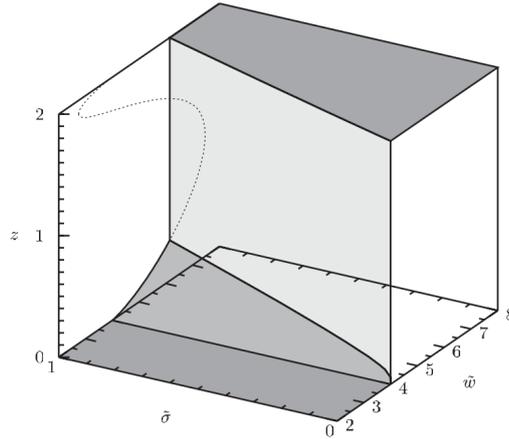


Abbildung 6.2. [übernommen aus [73]] Phasendiagramm für die Umhüllung eines Partikels. Bei einer Adhäsionsstärke  $g_{\text{ad}} = 4$  wird zunächst die partielle Umhüllung möglich. Die Eindringtiefe  $z$  des Partikels nimmt zunächst weiter zu, bevor bei  $g_{\text{ad}} = 4 + 2\tilde{\sigma}$  ein diskontinuierlicher Phasenübergang zu vollständiger Umhüllung (Sprung auf  $z$ ) eintritt. Allerdings muss hier eine Energiebarriere überwunden werden und es existieren metastabile Zustände partieller Umhüllung mit  $g_{\text{ad}} > 4 + 2\tilde{\sigma}$ , was durch die gestrichelte van-der-Waals-Kurve angedeutet wird. Lediglich für  $\tilde{\sigma} = 0$  existiert keine solche Barriere. Bei sehr hohen Adhäsionsstärken kann die Energiebarriere natürlich immer Überwunden werden (Spinoidale).

Bei einer Erhöhung der Adhäsionsenergie  $\tilde{g}_{\text{ad}}$  wird die Energiebarriere kleiner und verschwindet schließlich bei der Spinodalen vollständig, die grob approximiert werden kann (vgl. [48]) durch:

$$g_{\text{ad}} \approx 2\sigma + 2\frac{K_{\text{b}}}{r^2} \quad (6.9)$$

Eine tragende Rolle für die Ergebnisse zur unbegrenzten Aufnahme kann die Energiebarriere insbesondere dann spielen, wenn die Oberflächenspannung der Membran einerseits so groß ist, dass eine weitere Partikelaufnahme gehemmt wird ( $\Delta\tilde{E} > k_{\text{B}}T$ ) und andererseits so klein, dass noch kein Porenwachstum stattfindet, das zu einer Entspannung der Membran führt ( $\sigma < \sigma^*$ ). Um zu prüfen, ob diese Energiebarriere in den für uns relevanten Bedingungen zu einer wesentlichen Veränderung der modellierten Partikelaufnahme beitragen kann, werden in Abbildung 6.3 die Lagen der relevanten Kennlinien für einen typischen Wert von  $\sigma^*$  gezeigt, der sich aus den gefundenen Literaturwerten für die Linienspannung der Poren, sowie der Größe metastabiler Poren ergibt. Diese werden verglichen mit der bisherigen Modellannahme für geschlossene Vesikel.

Es wird außerdem die Höhe der Energiebarriere abgeschätzt, wobei wir vereinfachend annehmen, dass die Höhe der Energiebarriere zwischen Spinodale und Binodale für geschlossene Vesikel linear auf Null absinkt.

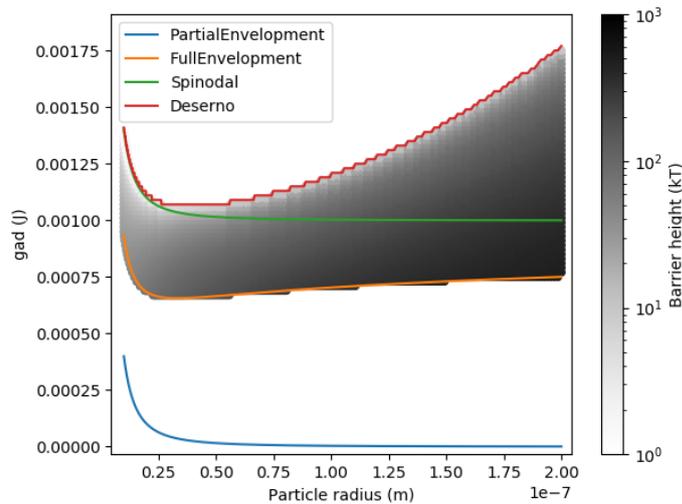


Abbildung 6.3. Lage der Phasengrenze nach dem Modell für konstantes Vesikelvolumen (rot), die der Binodalen bei konstanter Spannung (orange), die der Spinodalen (grün), sowie für die erwartete Grenze für partielle Umhüllung (blau) bei einer Membranspannung  $\sigma^* = 5 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$ . Die logarithmische Graustufenskala gibt eine Abschätzung der Höhe der Energiebarriere in Einheiten von  $k_B T$  im metastabilen Gebiet an.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, ist die Energiebarriere in beiden Fällen in nahezu dem gesamten metastabilen Gebiet so groß, dass eine Partikelaufnahme extrem unwahrscheinlich ist. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Berücksichtigung der metastabilen Zustände lediglich für sehr kleine Partikel eine kleine Korrektur bei der Modellierung des unbegrenzten Wachstums darstellt. Viel wichtiger bleibt die Berücksichtigung des begrenzten Vesikelvolumens für die Phasengrenze bei großen Partikeln. An dieser Stelle wird das Modell trotz alledem angepasst.

### 6.3. Ergebnisse und Diskussion im Lichte der Experimente

Abbildung 6.4 zeigt das Ergebnis einer Simulation mit dem angepassten Modell, wobei die Darstellung so gewählt wurde, dass eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit den experimentellen Ergebnissen in 5.6 gegeben ist. Tabelle 6.1 gibt die Simulationsparameter an, die im Wesentlichen denen der bisher gezeigten Simulationen entspricht. Zusätzlich wird hier aber die Linienspannung von Membranporen berücksichtigt, die innerhalb der gefundenen Literaturwerte so gewählt wurde, dass eine möglichst gute Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen erzielt wird.

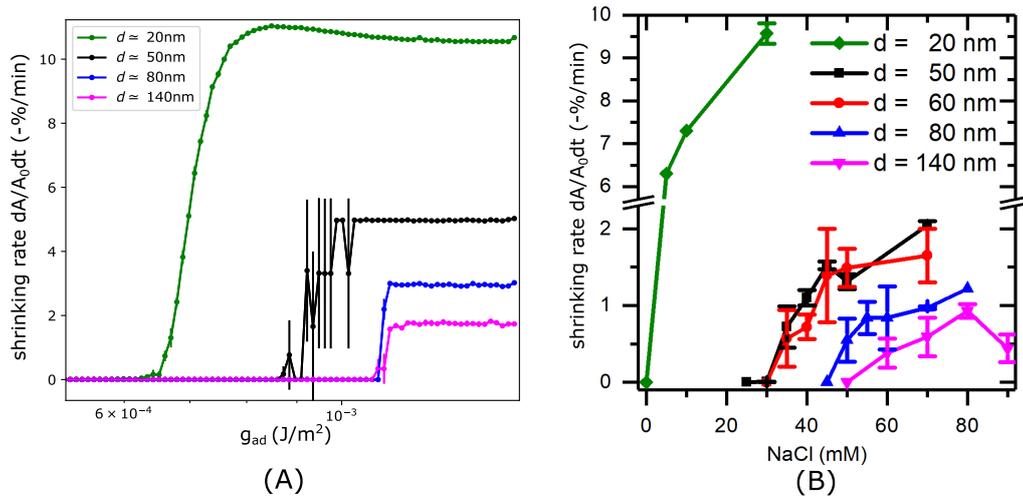


Abbildung 6.4. (A) Simulationsergebnisse der verfeinerten Simulation (je 3 Simulationsläufe pro Parameterset). Zu beachten ist, dass hier auf der Abszisse nicht die Adhäsionsstärke, sondern die Ionenkonzentration angegeben ist. Der exakte Zusammenhang dieser Werte bleibt unbekannt. Unter der Annahme dass sich die Adhäsionsstärke im Bereich um  $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$  kontinuierlich von  $g_{\text{ad}} \approx 0 \text{ mJ}$  zu  $g_{\text{ad}} \approx 1 \text{ mJ}$  ändert, passen die Größenordnungen aber gut mit den in Abschnitt 4 gezeigten experimentellen Ergebnissen (B) zusammen. Auffallend ist die starke Streuung der Schrumpfrate für Partikel mit  $r = 24 \text{ nm}$ . Diese hängt vermutlich mit dem Übergang zwischen einer Aufnahme mit und ohne Porenwachstum zusammen, der in der Simulation in diesem Größenbereich stattfindet. In den experimentellen Daten ist dieser Effekt, wenn überhaupt, sehr viel weniger ausgeprägt.

Tabelle 6.1 gibt die Simulationsparameter an, die im Wesentlichen denen der bisher gezeigten Simulationen entspricht. Zusätzlich wird hier aber die Linienspannung von Membranporen berücksichtigt, die innerhalb der gefundenen Literaturwerte so gewählt wurde, dass eine möglichst gute Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen erzielt wird. Die entsprechenden Werte werden in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1. Den Simulationen zugrunde gelegte Parameterwerte. Die Linienspannung  $T$  wurde als zusätzlicher Parameter aufgenommen.

Parameter	Wert
Biegesteifigkeit $K_b$	$4 \times 10^{-20}$ J [58]
Flächenkompressionsmodul $K_A$	230 mN/m [59]
Membrandicke $d$	2,8 nm [60]
Porenlebenszeit $\tau$	500 ms
Linienspannung $T$	5 pN/m [80]

Es fällt sofort auf, dass im Gegensatz zu den in Abschnitt 3 gezeigten Ergebnissen nun auch für große Partikel eine unlimitierte Aufnahme möglich ist, ohne dabei unrealistisch hohe Werte für die Adhäsionskraft annehmen zu müssen. Weiterhin zeigt sich wie erwartet die Annäherung aller Aufnahmezeiten an den durch die Partikeldiffusion vorgegebenen Grenzwert für starke Adhäsion und ein Ansteigen der kritischen Adhäsionsenergie mit der Partikelgröße.

Betrachtet man die einzelnen Simulationsläufe genauer (siehe Anhang A.4.1), so erreicht das System für kleine Partikel ( $r \leq 25$  nm) bereits ohne das oben beschriebene Porenwachstum seinen quasistabilen Zustand der unbegrenzten Aufnahme. D.h. bereits durch die zahlreichen entstehenden metastabilen Poren kann ausreichend viel Spannung abgebaut werden um eine weitere Partikelaufnahme zu gewährleisten. Dieses Verhalten entspricht der bisherigen Simulation. Bei größeren Partikeln ( $r \geq 45$  nm) öffnen sich dagegen ab einer gewissen Adhäsionsstärke immer wieder Poren bis zu einer Größe von wenigen hundert Nanometern. Während dieser Events entleert sich das Vesikel stoßartig. Der Übergang zwischen beiden Regimen hängt natürlich von der exakten Wahl der Simulationsparameter ab. Es liegt also die Vermutung nahe, dass sich die Partikelaufnahme von großen Partikeln in dieser Hinsicht fundamental von der kleiner Partikel unterscheidet. Diese Vorhersage wäre durch eine Wiederholung entsprechender Experimente mit geeigneten optischen Methoden (Hellfeld, Hochgeschwindigkeitskamera) leicht zu überprüfen. Es wäre zu erwarten, dass für große Partikel pulsartige Volumenverluste erkennbar sind, während die Volumenabnahme bei kleinen Partikeln gleichmäßig verläuft.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die verfeinerte Simulation die experimentellen Ergebnisse hervorragend widerspiegelt, ohne dabei unplausible Annahmen für die Materialparameter machen zu müssen. Alle wichtigen qualitativen Zusammenhänge werden reproduziert, unter der Annahme, dass es zulässig ist, im Bereich um  $g_{ad} = 1$  mJ/m<sup>2</sup> von einem „gutmütigen“ Zusammenhang zwischen Ionenkonzentration und Adhäsionsenergie auszugehen, d.h. einer kontinuierlichen Zunahme der Adhäsionsstärke mit steigender Ionenkonzentration im experimentell betrachteten Bereich. Die Ergebnisse in Abschnitt 4 unterstützen diese Vermutung, lassen aber keine exakten quantitativen Aus-

sagen über diesen Zusammenhang zu. Eine genauere Untersuchung dieses Aspekts an freistehenden Lipidmembranen wäre sehr aufschlussreich für eine weitergehende Validierung des hier vorgestellten Modells.



## **7. Partikelaufnahme und thermodynamischer Membranzustand**

Im Vorangegangenen wurde festgestellt, dass die passive Aufnahme von Partikeln durch Lipidvesikel stark durch die mechanischen Eigenschaften der Membran bestimmt ist. Insbesondere Biegesteifigkeit und Flächenelastizität der Membran sowie die Stabilität von gebildeten Poren spielen eine wichtige Rolle. Alle diese Eigenschaften sind, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, wiederum vom thermodynamischen Zustand des Bilayers bestimmt. In diesem Kapitel soll nun untersucht werden, wie diese Abhängigkeiten zu einer gezielten Steuerung der Partikelaufnahme genutzt werden können.

## 7.1. Steuerung der Partikelaufnahme durch den Membranzustand

### 7.1.1. Einleitung

Wie bereits in den Grundlagen beschrieben, können Lipidmembranen in unterschiedlichen Phasenzuständen existieren. Verschiedene biologische Untersuchungen legen nahe, dass die Regulierung des thermodynamischen Zustands eine wichtige Rolle bei unterschiedlichsten Funktionen von biologischen Membranen spielen. Insbesondere wird angenommen, dass sog. „Rafts“, also Membranbereiche in einem flüssig geordneten Zustand, als Zentren für Aufnahmeprozesse wirken [82]. Es ist offensichtlich, dass die mit einem Phasenübergang verbundenen mechanischen Veränderungen der Membran relevante Einflüsse auf die Aufnahmewahrscheinlichkeit in unserem Modell haben können.  $K_b$  und  $K_A$  unterscheiden sich typischerweise um eine Größenordnung zwischen Gel- und fluider Phase [3]. Eine Sonderstellung nimmt der Bereich nahe des Phasenübergangs ein, in dem die Suszeptibilitäten der Membran divergieren, was aus der mechanischen Perspektive einer „Aufweichung“ der Membran gleich kommt. Hinzu kommt, dass die rüctreibenden Kräfte, die zum Verschluss entstandener Membranporen führen, im Phasenübergang deutlich reduziert sind. Diese Zusammenhänge sind, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, für alle thermodynamischen Systeme zu erwarten und wurden vielfach experimentell gezeigt. In diesem Kapitel soll nun der Versuch unternommen werden, die genannten Effekte zu nutzen, um die Aufnahme von Partikeln in Modellsysteme zu steuern.

Im Gegensatz zu DOPC-Membranen, die bei üblichen Umgebungsbedingungen ausschließlich in der fluiden Phase vorliegen, weisen DMPC-Doppelschichten bei ca.  $T = 23\text{ °C}$  einen Haupt-Übergang zwischen gelartiger und fluider Phase auf [3] (siehe u.a. Abschnitt 1.3). Bei etwa  $T = 18\text{ °C}$  tritt zunächst eine Umwandlung von  $L_\alpha$  (Gelpase) zu  $P_{\beta'}$  (Rippelpase) ein, bevor schließlich die Hauptumwandlung nach  $P_\beta$  erfolgt.

Typischerweise liegen die Suszeptibilitäten in der ungeordneten Phase etwa um eine Größenordnung höher als in der geordneten. Dazwischen existiert ein ausgeprägtes Maximum das die Phasenübergangstemperatur  $T^*$  markiert (siehe auch Abbildung 7.2).

In der Nähe eines Phasenübergangs wird das thermodynamische Potential des Systems (der Membran) flach und die rüctreibenden Kräfte für Auslenkungen aus dem Gleichgewichtszustand klein. Gleichzeitig nehmen die thermodynamischen Fluktuationen der Zustandsgrößen zu. Die Suszeptibilitäten lassen sich deshalb in der Nähe des Gleichgewichts durch die zweite Ableitung des thermodynamischen Potentials beschreiben [4], [11]. Weiterhin wurde mehrfach gezeigt, dass verschiedene Materialparameter (Suszeptibilitäten) von Lipidmembranen in der Nähe dieses Übergangs sich proportional zueinander verhalten und sich auf Extremwerte zubewegen [3], [13]. Für die weiteren Überlegungen folgen wir der Hypothese, dass wir einen solchen

Verlauf auch für die relevanten Kenngrößen des von uns untersuchten Systems annehmen können. Folglich sollte für den Flächenkompressionsmodul und die Biegesteifigkeit, bzw. bei konstanten geometrischen Verhältnissen auch für Biege- und Spannungsenergiegedichte in der Nähe des Phasenübergangs die indirekte Proportionalität zur spezifischen Wärmekapazität gelten:

$$g_A \propto K_A \propto g_b \propto K_b \propto \frac{1}{c_p} \quad (7.1)$$

Betrachtet man nun die Wärmekapazität von DMPC-Vesikeln in Abbildung 7.2, so kann der dort dargestellte Verlauf als Grundlage dienen, um aus dieser Beziehung Annahmen für die relevanten Materialparameter zu machen und Rückschlüsse auf das erwartete Aufnahmeverhalten zu ziehen. DMPC bietet sich aufgrund seiner gut zugänglichen Phasenübergangstemperatur von  $T^* = 23,6^\circ\text{C}$  und seiner hinsichtlich der Kopfgruppe mit DOPC vergleichbaren chemischen Eigenschaften besonders als Modellsystem für solche Versuche an. Die exakte Phasenübergangstemperatur wurde für die konkret verwendete Lipidzubereitung mittels DSC-Messung bestimmt.

### 7.1.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Annahme 7.1 kann ohne weiteres in die in Abschnitt 3 vorgestellte Simulation eingearbeitet werden. Konkret gehen wir davon aus, dass sowohl  $g_b$  als auch  $g_A$  in unmittelbarer Nähe der Phasenumwandlung entsprechend der Wärmekapazität  $c_p(T)$  mit der Temperatur skalieren. Für die beiden reinen Phasen werden die in [3] aufgeführten Werte angenommen. Abbildung 7.1 zeigt das Simulationsergebnis für eine Partikelgröße von  $r = 25\text{ nm}$ . Die Adhäsionsstärke wurde so gewählt, dass in der fluiden Phase eine deutliche gehemmte Aufnahme zu verzeichnen war.

Der Hypothese folgend wäre also anzunehmen, dass bei tiefen Temperaturen, in denen die Lipiddoppelschicht vollständig in der Gelphase vorliegt, keine Aufnahme, bzw. lediglich eine Aufnahme von vereinzelt Partikeln zu erwarten ist. Im Bereich der Phasenumwandlung wird ein starker Anstieg der Aufnahmerate erwartet, die bei  $T^*$  ihr Maximum erreicht und für die fluide Phase wieder abnimmt, jedoch auf relativ hohem Niveau verbleibt. Das hier erwartete Maximum ist dabei sehr viel weniger scharf als man es für die direkte Messung der Materialsuszeptibilitäten beobachtet. Der Grund dafür ist, dass die Aufnahmerate im Bereich des Maximums durch die Partikeldiffusion „gedeckelt“ ist.

In dem hier relevanten Temperaturbereich wurden im Rahmen der Arbeit weitere Aufnahmeexperimente nachdem in Abschnitt 5.1 beschriebenen Schema durchgeführt [83], wobei fluoreszenzmarkierte Silica-Partikel mit  $r \approx 40\text{ nm}$  verwendet wurden. Zunächst wurde die Temperaturabhängigkeit

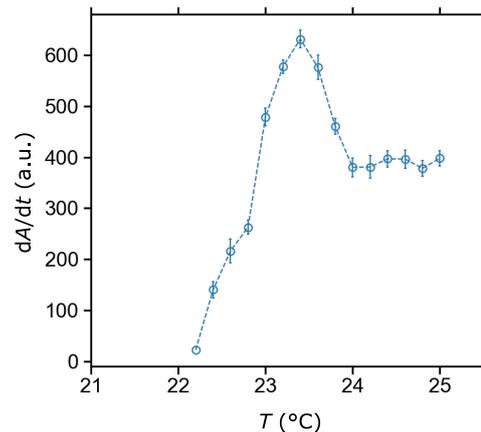


Abbildung 7.1. Phänomenologische Abbildung der erwarteten Aufnahme rate (beliebige Einheiten) in Abhängigkeit der Temperatur. Dabei wurde angenommen, dass sich alle Suszeptibilitäten der Membran im Phasenübergang proportional zur gemessenen Wärmekapazität des reinen Lipids verhalten. Abseits der Umwandlungen wurden Literaturwerte für Gel- und fluide Phase verwendet. Die Adhäsion wurde so eingestellt, dass eine Hemmung der Aufnahme rate im fluiden Bereich beobachtet wird. Es zeigt sich in diesem Fall, dass in der Gelphase abseits des Phasenübergangs keine Aufnahme möglich ist. In der Phasenumwandlung wird dagegen ein Maximum der Aufnahme erwartet, in dem die Aufnahme rate lediglich durch die Partikeldiffusion limitiert ist.

der kritischen Ionenkonzentration  $I_{\text{crit}}$  untersucht. Hierzu wurde die Temperatur der Kapillarkammer auf die jeweilige zu untersuchende Temperatur geregelt. Aufgrund des hohen experimentellen Aufwands wurde zunächst nur eine beschränkte Anzahl von unterschiedlichen Zieltemperaturen untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 aufgelistet. Wir beobachten keine relevante Aufnahme für Temperaturen deutlich unterhalb der Vorumwandlung bei ca. 13 °C. Die kritische Ionenkonzentration liegt hier oberhalb der Koagulationsgrenze des Kolloids. Wird die Ionenkonzentration höher gewählt als bei den abgebildeten Experimenten, so verklumpen die Nanopartikel innerhalb kurzer Zeit zu großen Agglomeraten. Aussagekräftige Ergebnisse sind in diesem Bereich nicht möglich. Ab einer Temperatur von ca. 22 °C tritt eine unlimitierte Aufnahme ein, mit einer minimalen kritischen Ionenkonzentration von 28 mM. Die kritische Ionenkonzentration liegt im eindeutig fluiden Zustand ( $T = 25$  °C) etwas höher.

Im selben Temperaturbereich wurde außerdem die Aufnahme rate bei einer konstanten Ionenstärke des Puffers qualitativ untersucht. Abbildung 7.2 stellt die so erhobenen Befunde dar. Nach einsetzen der Partikelaufnahme erreicht die Aufnahme rate schnell ihr Maximum (im Bild erkennbar durch die hohe Partikelkonzentration nach gleicher Beobachtungszeit) und sinkt dann allmählich auf einen etwas niedrigeren Wert ab, der für die fluide Phase des Vesikels typisch ist.

Tabelle 7.1. Kritische Ionenkonzentrationen für DMPC-Vesikel bei unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur	kritische Ionenkonzentration $I_{\text{crit}}$
$18 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	lediglich Adhäsion
$20 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	lediglich Adhäsion
$22.5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$28 \pm 5 \text{ mM}$
$25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$37 \pm 5 \text{ mM}$

Sowohl der Verlauf der kritischen Ionenkonzentration, als auch der der Aufnahmerate entsprechen also prinzipiell den Erwartungen: Die Nähe zur Phasenumwandlung begünstigt die Partikelaufnahme. Auffällig ist jedoch, dass das Maximum der Partikelaufnahme ca.  $1,1 \text{ }^\circ\text{C}$  unterhalb des Maximums der Wärmekapazität erreicht wird. Bei der eigentlichen Phasenübergangstemperatur und darüber steigt die kritische Ionenkonzentration wieder an. Auch die Aufnahmerate sinkt bei der Phasenübergangstemperatur bereits wieder leicht ab.

Wie bereits diskutiert, ist dieses Verhalten bei einer rein mechanischen Betrachtung äußerst erstaunlich, da man eigentlich in der fluiden Phase eine etwa 10-fach geringere Biegesteifigkeit und damit eine deutlich effektivere Aufnahme erwarten würde als in der Gelphase. Um die angedeutete Abhängigkeit genauer zu charakterisieren und eine Verschiebung der Übergangstemperatur durch veränderliche Salzkonzentration auszuschließen, wurde eine weitere Messreihe durchgeführt, bei der die Aufnahme von ungelabelten, käuflichen  $\text{SiO}_2$ -Partikeln bei einer konstanten Ionenstärke von  $I = 50 \text{ mM}$  bei unterschiedlichen Temperaturen vermessen wurde. Das zuvor beschriebene Bild bestätigt sich auch hier: Die Partikelaufnahme erreicht ihr Maximum bei einer Temperatur zwischen  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , also sogar ca.  $1,5 \text{ K}$  bis  $3 \text{ K}$  unterhalb der eigentlichen Phasenübergangstemperatur.

Das legt die Vermutung nahe, dass die tatsächliche Phasenübergangstemperatur in den beobachteten Experimenten bei niedrigeren Temperaturen liegt als zunächst angenommen. Diese Beobachtung passt hervorragend zu Untersuchungen im Rahmen vorausgegangener Arbeiten [2], [84], in denen bereits der Einfluss von Nanopartikeln auf die Phasenübergangstemperatur von Lipiden untersucht wurde. Diese sollen im Folgenden kurz rekapituliert werden.

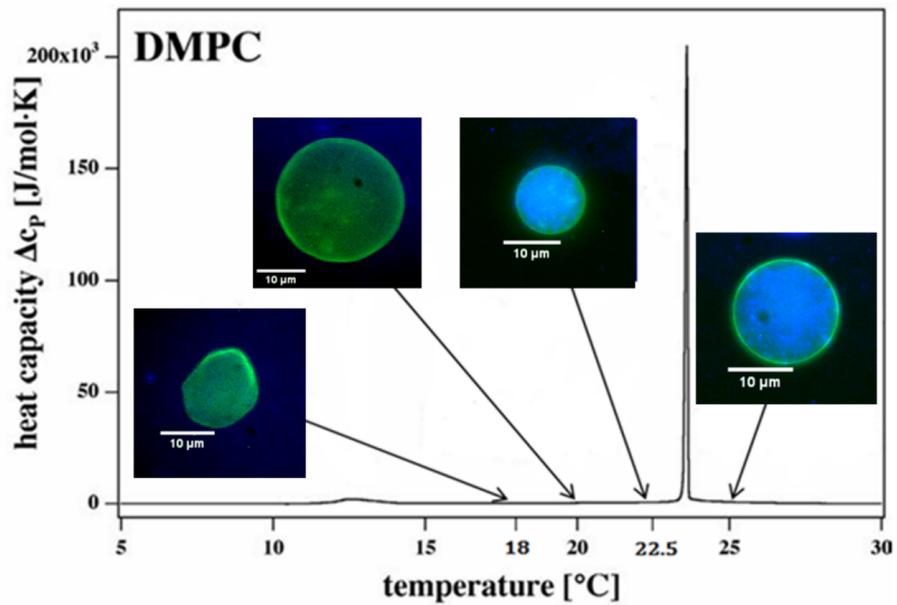


Abbildung 7.2. [übernommen aus [83]] Qualitative Beurteilung der Aufnahme­rate bei unterschiedlichen Temperaturen: Die Vesikel (grün) wurden jeweils 10 Minuten nach Partikelzugabe aufgenommen. Während in der Gelphase keine Interaktion mit Partikeln (blau) zu erkennen ist, findet bei höheren Temperaturen eine Aufnahme statt. Die Aufnahme­rate (zu erkennen in der Helligkeit des Blau-Kanals) erreicht ihr Maximum kurz vor der eigentlichen Phasenumwandlung, die durch das Maximum in der Wärmekapazität markiert ist und fällt leicht auf einen annähernd konstanten Wert in der fluiden Phase.

## 7.2. Beeinflussung des thermodynamischen Membranzustands durch Partikelkontakt

In [84] und [2] wurde bereits die Beeinflussung des thermodynamischen Zustands von Lipidmembranen durch Silica-Nanopartikel im Detail untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit vervollständigt und in [85] veröffentlicht. Sie sollen deshalb im folgenden Abschnitt noch einmal rekapituliert werden.

### 7.2.1. Einleitung

Bereits 1992 wurde gezeigt, dass DPPC-Doppelschichten auf kugelförmigen Partikeln ein deutlich anderes Phasenverhalten zeigen als im freien Zustand [86]. Dort wird zwar noch eine Umwandlung gefunden, die Vorumwandlung zur Rippelphase wird jedoch vollständig unterdrückt. Später wurde gefunden, dass die Phasenumwandlungstemperatur  $T^*$  solcher Membranen von der Krümmung der Festkörperoberfläche abhängen kann [87], [88]. In den hier beschriebenen Experimenten wurde dieser Effekt nun mittels Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC) systematisch untersucht und der Versuch unternommen, eine theoretische Erklärung dafür zu liefern. Dafür wurden sowohl unterschiedliche Partikelgrößen, als auch verschiedene Phospholipide mit unterschiedlich langen hydrophoben Ketten untersucht. Es zeigte sich eine systematische Abhängigkeit von  $T^*$ . Die Ausprägung dieses Effekts ist wiederum anhängig von der Wahl des Lipids. Für die Experimente wurden Silica-Partikel der Durchmesser **16 nm**, **18 nm**, **85 nm**, **250 nm** und **305 nm** hergestellt [72] und verwendet. Zur Herstellung von Vesikeln wurden die gesättigten Lipide DMPC (Kettenlänge 14 C-Atome: 14:0PC), DPPC (Kettenlänge 16 C-Atome: 16:0PC), sowie deren verwandte 13:0PC und 15:0PC und 20:0PC verwendet (Lieferant: Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). All diese Lipide weisen aufgrund unterschiedlicher Längen ihrer Alkanketten unterschiedliche Phasenübergangstemperaturen auf, wobei ihre chemische Struktur ansonsten identisch ist. Es wurden GUV nach dem zuvor beschriebenen Verfahren hergestellt und mit Nanopartikeln in Kontakt gebracht. Die so hergestellten Proben wurden mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht. Die Arbeiten lieferten zwei zentrale Erkenntnisse:

1. Die Partikel stehen in einem Lösungsgleichgewicht mit gelöster Kieselsäure. Diese Kieselsäure erzeugt eine leichte Erhöhung der Phasenübergangstemperatur aller verwendeten Lipide.
2. Nach einer Ultraschallbehandlung der Proben lagern sich Lipidbilayer an die Nanopartikel an. Die entstehenden Komplexe ähneln denen, die bei den bisher betrachteten Aufnahmeprozessen entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Lipidanteile, die in Kontakt mit den Partikeln

stehen, eine deutliche Verschiebung der Phasenübergangstemperatur hin zu niedrigeren Temperaturen zeigen. Diese Verschiebung ist in komplexer Weise von der induzierten Membrankrümmung abhängig.

Im Weiteren soll lediglich auf den zweiten Aspekt genauer eingegangen werden, da dieser eine hohe Relevanz für die Beobachtungen zur Partikelaufnahme hat.

### 7.2.2. Experimentelle Ergebnisse

Abbildung 7.3 fasst die wichtigsten experimentellen Ergebnisse aus [85] zusammen. Grundsätzlich erzeugt der Kontakt zur Silica-Oberfläche offensichtlich eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur von  $\Delta T^* \approx 2,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zusätzlich zeigt sich aber auch eine Abhängigkeit von der Partikelgröße, die für unterschiedliche Kettenlängen der Lipide unterschiedliche Trends aufweist.

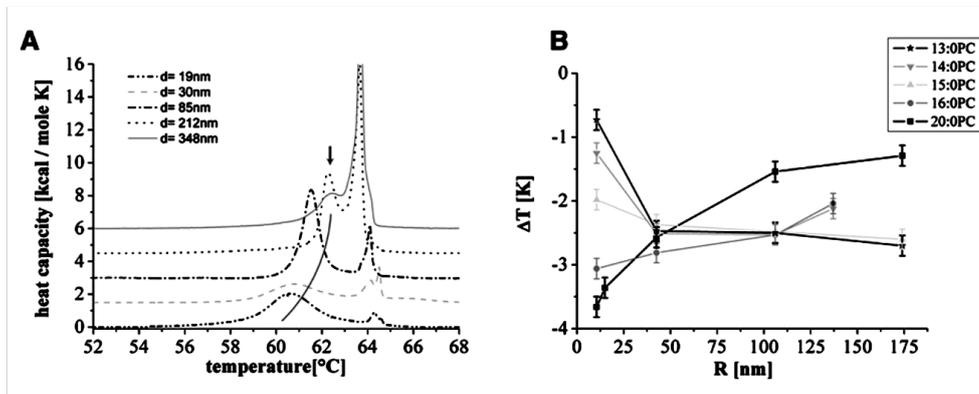


Abbildung 7.3. [übernommen aus [85]] Verschiebung der Phasenübergangstemperatur von Lipid-Bilayern durch Kontakt zu Silica-Nanopartikeln. (A) Wärmekapazitätsprofile von 20:0PC-Proben (langkettiges Lipid) mit Nanopartikeln unterschiedlicher Durchmesser. Der markierte erste Peak markiert den Phasenübergang der festkörpergestützten Membrananteile, der zweite Peak den Übergang der freien Lipidmembran. Für alle Partikel gilt, dass die Phasenübergangstemperatur im Kontakt zum Festkörper deutlich zu niedrigeren Temperaturen verschoben ist. Die Verschiebung fällt umso stärker aus, je kleiner die Partikel sind. (B) Vergleich die Lage der Umwandlung in Festkörperkontakt für unterschiedlich Partikelgrößen (hier mit Radius  $R$  bezeichnet) und Lipidkettenlängen. Es ergibt sich ein komplexes Bild für unterschiedliche Lipide.

### 7.2.3. Theoretische Interpretation

Die gefundenen Ergebnisse wurden im Rahmen der Landau-Theorie für Phasenübergänge 1. Ordnung interpretiert. Es ist zu erwarten, dass durch den Festkörperkontakt die freie Enthalpie, wie in Abbildung 7.4 skizziert,

für alle thermodynamischen Zustände der Membran verändert wird. Bei der Phasenübergangstemperatur  $T^*$  muss für die jeweils um  $\Delta G$  veränderten Enthalpien gelten:

$$G_{\text{gel}}(T^*) + \Delta G_{\text{gel}} = G_{\text{fluid}}(T^*) + \Delta G_{\text{fluid}} \quad (7.2)$$

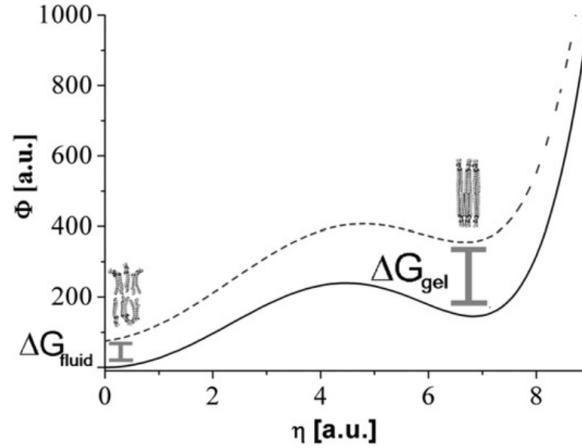


Abbildung 7.4. [übernommen aus [85]] Verallgemeinerte Darstellung des Landau-Potentials. Der Festkörperkontakt erzeugt einen zusätzlichen Energiebeitrag, d.h. eine Verschiebung des Potentials nach oben. Die phänomenologischen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass diese Verschiebung im Bereich des Minimums, das die Gelphase repräsentiert, größer ist als im Bereich der fluiden Phase.

Unter Annahme eines konstanten Oberflächendrucks können die Enthalpien der beiden Phasen um die ursprüngliche Phasenumwandlungstemperatur wie in [85] gezeigt, mit einer Taylor-Reihe erster Ordnung approximiert werden. Für die Verschiebung der Phasenübergangstemperatur  $\Delta T^*$  von der ursprünglichen zur „festkörpergestützten Übergangstemperatur“  $T_s^*$  gilt dann:

$$\Delta T^* := T_s^* - T^* = - \frac{\Delta G_{\text{gel}} - \Delta G_{\text{fluid}}}{\left. \frac{\partial G_{\text{gel}}}{\partial T} \right|_{T^*} - \left. \frac{\partial G_{\text{fluid}}}{\partial T} \right|_{T^*}} =: - \frac{\Delta G_{\text{gel}} - \Delta G_{\text{fluid}}}{\Delta \left( \frac{\partial G}{\partial T} \right)} \quad (7.3)$$

$\Delta(\partial G/\partial T)$  kann dabei den Ausführungen in 1.3.2 folgend, direkt aus den experimentellen Daten zum Wärmekapazitätsprofil des freien Lipids abgeleitet werden:

$$\Delta \left( \frac{\partial G}{\partial T} \right) = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} dT = - \frac{1}{T} \int_{T_1}^{T_2} c_p dT \approx \frac{\Delta H}{T^*} \quad (7.4)$$

$\Delta H$  ist die latente Wärme des Phasenübergangs. Somit kann also aus der Veränderung der freien Enthalpie beider Zustände durch den Kontakt

zur Partikeloberfläche eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur hergeleitet werden.

Offensichtlich begünstigt der Kontakt zur Silica-Oberfläche, wie in Abbildung 7.4 skizziert, die fluide Phase, was zu einer Verschiebung von  $T^*$  zu niedrigeren Temperaturen führt. Phänomenologisch wäre das auch zu erwarten, da sich die Kopfgruppen in der fluiden Phase frei bewegen und somit besser an die Ladungsverteilung der amorphen Silica-Oberfläche anpassen können, als in der Gelphase, in der eine Fernordnung der Kopfgruppen existiert.

Darüber hinaus begünstigt eine Biegung der Membran ebenfalls zunächst die fluide Phase aufgrund der Minimierung der auftretenden Biegeenergie. Man würde also erwarten, dass die Absenkung von  $T^*$  mit abnehmender Partikelgröße zunimmt. Interessanterweise finden wir diesen Zusammenhang nur bei langkettigen Lipiden (16:0PC und 20:0PC), während für die kurzkettigeren Lipide eher der entgegengesetzte Trend zu beobachten ist. Prinzipiell gilt für beide Phasen, dass die Änderung  $\Delta G$  der Enthalpie sich aus einem geometrieunabhängigen und einem krümmungsabhängigen Beitrag zusammensetzt:  $\Delta G = \Delta G^0 + G_B(1/r)$ . Da die Biegesteifigkeit der Membran in der Gelphase um typischerweise eine Größenordnung größer ist als in der fluiden Phase, kann der Biegebeitrag der letzteren in guter Näherung vernachlässigt werden. Somit ergibt sich durch Kombination der obigen Gleichungen und der Biegeenergie nach Helfrich (siehe Abschnitt 1.2.3):

$$\Delta T^* = -T^* \frac{\frac{1}{2} \left( \frac{2}{r} - C_0 \right)^2 A_{\text{KG}} K_b + \frac{1}{r^2} K_G A_{\text{KG}} + \Delta G_{\text{gel}}^0 - \Delta G_{\text{fluid}}^0}{\Delta H} \quad (7.5)$$

Dabei ist  $r$  wie bisher der Partikelradius,  $A_{\text{KG}}$  die mittlere Fläche einer Kopfgruppe eines Lipidmoleküls,  $C_0$  die spontane Krümmung und  $K_G$  der Gaußsche Biegemodul. Die letzten beiden müssen in diesem Fall berücksichtigt werden, da zum einen durch den Partikelkontakt eine Asymmetrie der Lipidmembran erzeugt wird und zum anderen im Moment der vollständigen Umhüllung eines Partikels eine Änderung der Membrantopologie eintritt.

Die obige Gleichung stellt also einen direkten Zusammenhang zwischen den mechanischen und calorimetrischen Eigenschaften der Membran und einer Änderung der Phasenübergangstemperatur unter Partikelkontakt her. In [85] wird gezeigt, dass dieses Modell bei geeigneter Wahl der Materialparameter die beobachteten zunächst erstaunlich erscheinenden Effekte der Partikelgröße wiedergegeben werden (siehe Abbildung 7.5). Da die Details hier jedoch nicht weiter von Belang sind, sei dazu auf die entsprechende Publikation verwiesen.

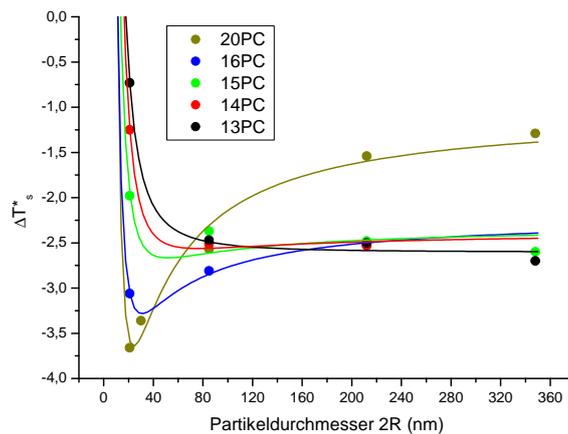


Abbildung 7.5. [adaptiert aus [85] bzw. [2]] Darstellung eines Fits des oben beschriebenen Modells an die Messdaten. Bei geeigneten Parametern werden die lipidabhängigen Trends der Verschiebung des Phasenübergangs mit dem Partikelradius zutreffend vorhergesagt.

#### 7.2.4. Diskussion

Betrachten wir die experimentellen Ergebnisse zur Partikelaufnahme in DMPC-Vesikeln im Lichte der zuvor beschriebenen Erkenntnisse zur Änderung der Phasenübergangstemperatur bei Partikelkontakt, so kann man festhalten, dass beide Themenkomplexe in guter Übereinstimmung stehen. Die DSC-Daten legen nahe, dass DMPC-Membranen in Kontakt mit Silica-Partikeln mit einem Radius  $r \gtrsim 25 \text{ nm}$  eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur um  $\Delta T^* \approx -2,5 \text{ K}$  erfahren. Unter der Annahme, dass dieser Effekt lokal auch während der Aufnahme von Partikeln in GUVs auftritt, so würde man das Maximum der Partikelaufnahme ebenfalls bei einer entsprechend verschobenen Temperatur erwarten. Genau diese Beobachtung wurde in Abschnitt 7.1.2 gemacht. Die dort beschriebene Verschiebung des Maximums gegenüber des Phasenübergangs freier Membranen ist zwar tendenziell etwas kleiner als im idealen Modell erwartet, allerdings muss beachtet werden, dass die relativ grobe Auflösung der Aufnahmeexperimente auf der Temperaturachse zu einer entsprechenden Unsicherheit führt. Außerdem stehen in diesem Fall festkörpergebundene Membrananteile weiterhin in Kontakt zu freien Membrananteilen. Man würde deshalb erwarten, dass die Temperaturverschiebung in der Tendenz geringer ausfällt als bei unabhängigen partikelgestützten Membranen, die in den DSC-Messungen untersucht wurden.

Es soll nicht verschwiegen werden, dass aktuelle Untersuchungen am DMPC-ähnlichen Lipid 15:0PC Fragen hinsichtlich der hier beschriebenen Interpretation aufwerfen [89]. Dort wurde die Temperaturabhängigkeit der Partikelauf-

nahme für 15:0PC-Vesikel mit hoher Temperaturauflösung untersucht und ein prominentes Maximum bei  $\Delta T^* + 3 \text{ k}$  gefunden. Dieser Befund widerspricht zunächst den eben geschilderten Beobachtungen, wie auch den Erwartungen für die Phasenübergangstemperatur. Es wird argumentiert, dass eine massive Verringerung der Adhäsionsstärke in der Nähe des Phasenübergangs für diese erstaunlichen Befunde verantwortlich ist. Kraftspektroskopische Untersuchungen, ähnlich zu den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen, weisen auf genau einen solchen Effekt hin. Eine mögliche Erklärung für den Verlust der Adhäsion um  $T^*$  könnte die Eskalation von Membranundulationen sein, die man für Zustände in der Nähe einer Umwandlung erwarten würde. Wie Helfrich zeigte, erzeugen diese Undulationen abstoßende Kräfte zwischen Lipidmembranen und anderen Oberflächen [90]. Leicht unterschiedliche experimentelle Bedingungen hinsichtlich der Membranspannung bzw. des osmotischen Drucks können die Stärke der Undulationen und damit auch die ihrer Auswirkung auf die Adhäsion massiv beeinflussen, was eine Erklärung für die widersprüchlichen Befunde bieten könnte. Die Untersuchung des Einflusses von Membranundulationen auf die Aufnahme von Partikeln wäre nicht nur deshalb ein möglicher nächster Schritt, um das theoretische Bild dieser Prozesse zu vervollständigen.

In der Gesamtschau ergibt sich jedoch ein konsistentes Bild, in dem nicht nur der thermodynamische Zustand der Membran die Aufnahme von Partikeln beeinflussen kann, sondern umgekehrt auch der thermodynamische Zustand der Membran durch den Partikelkontakt signifikant geändert wird.

## 8. Fazit

Zusammenfassend ergibt sich aus den bisher geschilderten Erkenntnissen folgendes Bild:

- Einfache Lipidvesikel sind in der Lage, Partikel vollständig aufzunehmen. Es existiert dabei ein großer, biologisch relevanter Parameterraum, in dem die vollständige Aufnahme vieler Nanopartikel und deren Anreicherung entgegen einem massiven Konzentrationsgradienten möglich ist. Insbesondere existiert ein Parameterraum, in dem die Aufnahme nicht durch den Verlust von Membranfläche und die daraus folgende Oberflächenspannung beschränkt wird.
- Ein theoretisches Modell, das mindestens die Einflüsse Adhäsionsstärke, Biegeenergie, Oberflächenspannung in Betracht zieht, ermöglicht die Ableitung von qualitativen (und potentiell auch quantitativen) Grenzen für einen derartigen Aufnahmemechanismus. Die qualitativen Aussagen konnten experimentell bestätigt werden, unter der Voraussetzung, dass die Adhäsionsenergie in einem systematischen Zusammenhang mit der Ionenstärke der Pufferlösung steht.
- Wird die Dynamik von Membranporen mit in das Modell einbezogen, so verbessern sich die Modellvorhersagen im Bereich großer Partikel deutlich und die in den Experimenten beobachtete größenabhängige Aufnahmerate wird korrekt vorhergesagt. Das Modell, ebenso wie die experimentellen Ergebnisse, weisen auf einen großen Einfluss der Partikelgröße auf zelluläre Aufnahmeprozesse hin. Insbesondere scheint eine optimale Partikelgröße für die endozytoseähnliche Aufnahme von Partikeln in biologischen Systemen zu existieren, die bei etwa  $r = 15 \text{ nm}$  liegt. Dieser Wert deckt sich mit Beobachtungen für lebende Zellen, wo Optima im Bereich  $10 \text{ nm}$  bis  $r40 \text{ nm}$  berichtet werden [91]–[93]. Für größere Partikel sind deutlich stärkere Adhäsionskräfte nötig um eine Aufnahme zu ermöglichen. Auch für kleinere Partikel wird durch den zunehmenden Beitrag der Biegeenergie ein schnelles Ansteigen der kritischen Adhäsionsenergie erwartet. Dieses Verhalten konnte für das hier untersuchte System jedoch nicht überprüft werden, da runde Silica-Partikel mit  $r < 10 \text{ nm}$  leider nicht zur Verfügung standen.
- Innerhalb seiner Phasengrenzen ist der Aufnahmeprozess so effektiv, dass die Aufnahmerate bei moderaten Partikelkonzentrationen im Wesentlichen durch die Diffusion der Partikel bzw. deren Verfügbarkeit an

der Grenzfläche beschränkt ist. Zwischen dem Einsetzen der Partikelaufnahme und der Annäherung an die maximale Aufnahme­rate wird ein relativ scharfer Übergang beobachtet.

- Veränderungen des thermodynamischen Zustands der Lipidmembran können die Partikel­aufnahme stark beeinflussen. Die Aufnahme­rate wird in der Nähe einer Phasenumwandlung maximal. In der Gelphase, weit entfernt von der Phasenumwandlung ist unlimitierte Partikel­aufnahme nicht möglich.
- Umgekehrt verändern der Kontakt zur Partikeloberfläche sowie die dadurch induzierte Membrankrümmung den thermodynamischen Zustand der Membran. Das äußert sich in Experimenten darin, dass das Aufnahmemaximum und die Phasenumwandlung der freien Membran nicht exakt übereinstimmen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Partikel­aufnahme nicht immer mit energieverbrauchenden Prozessen verbunden sein muss. Diese Erkenntnis ist nicht nur von akademischem Interesse für die Untersuchung von hybriden Partikel–Lipid–Systemen [33] sondern legt auch nahe, dass die zelluläre Aufnahme von Partikeln maßgeblich durch die physikalischen Eigenschaften der Lipidkomponente und deren Wechselwirkung mit Festkörperoberflächen bestimmt sein kann. Aus dieser Perspektive ist es nicht verwunderlich, dass der Einfluss der Partikelgröße auf den Aufnahme­prozess qualitativ und quantitativ mit denen übereinstimmt, die für biologische Systeme beobachtet werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der thermodynamische Zustand der Lipidmembran deren Fähigkeit zur Aufnahme von Partikeln effektiv modulieren kann, insbesondere in der Nähe eines Phasenübergangs. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass solche Zustände auch in lebenden Zellen existieren [4]. Deshalb wäre es nicht verwunderlich, wenn die Thermodynamik der Membran auch bei der Steuerung von zellulären Aufnahme­prozessen eine tragende Rolle spielt. Dieser Aspekt kann auch gezielt bei der Entwicklung neuer therapeutischer Nanopartikel genutzt werden. Sowohl die Partikelgröße, als auch die Oberflächeneigenschaften können so optimiert werden, dass die Membran lokal in die Nähe eines kritischen Zustands versetzt wird, was die Partikel­aufnahme erleichtert. Diese physikalische Denkweise bietet auch eine Erklärung für die extrem effektive Aufnahme von kationischen Partikeln. Für diese Partikel existiert gegenüber den typischerweise negativ geladenen biologischen Membranen eine verstärkte Adhäsion angenommen werden. Außerdem kann man sich vorstellen, dass die Membran durch den Einfluss positiver Oberflächenladungen kondensiert und somit weiter in die Nähe ihres kritischen Zustands gebracht wird.

---

Es soll hier natürlich nicht in Abrede gestellt werden, dass bei der zellulären Aufnahme in der Regel viele aktive Prozesse beteiligt sind. Ebenso werden hier Einflüsse vernachlässigt, die die Proteinkorona auf die Wechselwirkung zwischen Membran Partikel hat, die sich in biologisch relevanten Systemen sehr häufig um Partikel anlagert [94].

Die hier gezeigten Ergebnisse machen aber dennoch deutlich, dass bei der Untersuchung von zellulären Aufnahmeprozessen der Einfluss fundamentaler physikalischer Phänomene mit Bedacht gezogen werden sollte. Prinzipiell scheinen sogar passive Lipid-kontrollierte Aufnahmeprozesse möglich. Die Untersuchung derartiger Phänomene an lebenden Zellen erscheint deshalb als einer der nächsten Schritte geboten. In den folgenden beiden Kapiteln werden Ausblicke auf zwei mögliche Modellsysteme gegeben. Internodale Zellen der Armleuchteralge *Chara australis* sind experimentell sehr gut zugänglich und ermöglichen die Untersuchung elektrophysiologischer Phänomene. Sie zeigen ein bistabiles Verhalten bei dem sich auch die Mechanik der Zellmembran ändert. Dieses System ist potentiell geeignet, um die bisher gewonnenen Erkenntnisse näher an lebende Systeme heran zu tragen. Der erste Ausblick beschreibt initiale Versuche zur Auswirkung von Ionen auf das bistabile Verhalten dieser Zellen, die als Grundlage für solche Experimente dienen können. In einem zweiten Ausblick wird in Proof-of-Concept-Versuchen gezeigt, dass menschliche Endothelzellen der Zelllinie HMEC-1 geeignet sind, um die Aufnahme von Nanopartikeln an einem medizinisch und pharmazeutisch hoch relevanten Modellsystem zu erforschen. Es ist dabei jedoch erforderlich, die Strömungsbedingungen bei solchen Experimenten gut zu kontrollieren, weshalb ein entsprechendes mikrofluidisches System entwickelt wurde.



## **9. Ausblick: Kontrolle der zellulären Erregbarkeit von Chara australis durch ein- und zweiwertige Ionen**

Wie bereits betont, wäre es in Zukunft wichtig, die im Modellsystem behandelten Prozesse auch an lebenden Systemen zu untersuchen und entsprechende Ergebnisse abzugleichen. Um den Einfluss des thermodynamischen Membranzustands auf biologische Prozesse zu untersuchen, ist es wünschenswert, ein möglichst einfaches lebendes Modellsystem zu finden, das jedoch bereits die Eigenschaft der „Erregbarkeit“ aufweist, die, wie im Weiteren ausgeführt, auch als Ausdruck einer thermodynamischen Zustandsänderung (bzw. Bistabilität) betrachtet werden kann. Dieses Kapitel befasst sich mit Experimenten, die den Einfluss von Ionen auf die Reizleitung in Armleuchteralgen *Chara australis* untersuchen. Die Zellen dieser Algen sind aufgrund ihrer Größe von mehreren cm Länge und der Langsamkeit ihrer Aktionspotenziale (AP) ein extrem einfaches Modellsystem für die gesamte Klasse erregbarer Zellen. Es ist darüber hinaus bereits bekannt, dass diese Zellen während eines Aktionspotentials starke mechanische Reaktionen ihrer Zellmembran erfahren [95]. In Zukunft könnten diese Zellen somit auch für Aufnahmeexperimente hochinteressant sein. Zunächst ist jedoch ein genaues Verständnis ihres bistabilen Charakters und der Wirkung von Ionen auf ihren thermodynamischen Zustand und die Weiterleitung von Reizen wichtig. Erste Schritte zur Beleuchtung dieser Aspekte werden hier beschrieben.

## 9.1. Einleitung

Die biologischen Funktionen von Zellmembranen stark von ihren thermodynamischen Eigenschaften beeinflusst werden. Es existieren verschiedene Hinweise darauf, dass die Existenz von Phasenübergängen in solchen Membranen auch fundamentale Bedeutung für die Ausbildung von Aktionspotentialen haben, die die Grundlage für die Nervenreizleitung bilden.

Aktionspotentiale wurden die Zellen unterschiedlichster Lebewesen nachgewiesen, u.a. für Pflanzenzellen [96]. Es konnte auch verschiedentlich gezeigt werden, dass es möglich ist, Aktionspotentiale in Zellen zu erzeugen, die vollständig vom Zellplasma befreit wurden, was die Vermutung nahelegt, dass das Aktionspotential ein Phänomen ist, das an die Zellmembran gebunden ist [97], [98].

Eine zentrale charakteristische Eigenschaft von Aktionspotentialen ist ihre ausgeprägte Nicht-Linearität: Bei schwacher Anregung entsteht zunächst kein Potential, bis ab der Überschreitung einer spezifischen Reizstärke ein Aktionspotential Höhe entsteht, dessen Stärke (Membranpotentialänderung) sich auch bei weiterer Erhöhung der Anregungsintensität nicht mehr ändert („Alles-oder-nichts-Verhalten“). Dieses Potential kann sich dann entlang einer Zelle mit konstanter Stärke ausbreiten. Dieses Verhalten wird üblicherweise durch Reizleitungsmodelle beschrieben, die auf dem 1952 von Hodgkin und Huxley beschriebenen Modell [99] basieren.

Die physikalischen Ausbreitungseigenschaften führten aber parallel auch zur Entwicklung von Reizleitungsmodellen, die eine adiabatische Ausbreitung von Druckschwankungen (Schallwellen) auf der Zellmembran annehmen. Das nichtlineare Verhalten des Systems erklärt sich in dieser Theorie durch die Nähe des Systems zu einer Phasenumwandlung [3], [100], [101]. Ein Abriss über die Entwicklung der entsprechenden physikalischen Theorie zur Nervenreizleitung ist in [102] zu finden. Dieser Theorie folgend hängt nicht nur die Erregbarkeit der Zellmembran, sondern auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit mechanischer Pulse von der Entfernung zur Phasenumwandlung ab [103]. Für reine Lipidmonolagen konnten die adiabatische Ausbreitung von Schallwellen ebenso nachgewiesen werden wie die Existenz eines Schwellwertes für die Erzeugung von nichtlinearen Pulsen, wenn diese so präpariert wurden, dass Sie sich in der Nähe des Hauptphasenübergangs befinden [104]. All dies legt die Vermutung nahe, dass die Ausbildung von Aktionspotentialen nicht alleine an spezifische Moleküle (Ionenkanäle) gebunden ist, sondern vielmehr der thermodynamische Zustand der gesamten Membran eine zentrale Rolle spielt.

Eine Annahme ist dabei, dass das Ruhepotential auch in lebenden Zellen einem Zustand nahe eines Übergangs zwischen geordneter und ungeordneter Phase der Membranlipide entspricht. In der Regel befinden sich lebende Systeme auf der „ungeordneten“ Seite des Übergangs. Ein geeigneter Impuls kann das System nun in den Übergang schieben, was der Auslösung eines

Tabelle 9.1. Vorhersagen des physikalischen Modells zur Nervenreizleitung über die Auswirkungen von einer Veränderung unterschiedlicher Zustandsvariablen. Die ersten drei Zeilen wurden aus [102] und um die Erwartungen für die Auswirkung von Ionen (in Klammern) erweitert.

	Geschwindigkeit des AP	Verlust der Erregbarkeit
Temperatur	$c \downarrow$ mit $T \downarrow$	$T \downarrow$
Druck	$c \downarrow$ mit $p \uparrow$	$p \uparrow$
pH	$c \downarrow$ mit $pH \downarrow$	$pH \downarrow$
monovalente Kationen	( $c \downarrow$ mit $C^+ \downarrow$ )	( $C^+ \downarrow$ )
divalente Kationen	( $c \downarrow$ mit $C^{++} \uparrow$ )	( $C^{++} \uparrow$ )

Aktionspotentials entspricht. Präpariert man nun das System so, dass die geordnete Phase begünstigt wird, nähert man sich dem Übergang, die Suszeptibilitäten steigen und infolge dessen nimmt die Schallgeschwindigkeit für mechanische Impulse ab. Überschreitet man den Phasenübergang, ist keine Erregung mehr möglich. Eine Bewegung entlang des Ordnungsparameters kann durch verschiedene Zustandsvariablen getrieben werden, wodurch sich ein mehrdimensionales Zustandsdiagramm ergibt, das beliebig komplex werden kann. Insbesondere können Veränderungen in einer Variable durch gleichzeitige Veränderung einer anderen Variable ausgeglichen werden.

Um den thermodynamischen Zustand von Lipid- oder Zellmembranen zu variieren, gibt es prinzipiell unzählige Möglichkeiten, wobei sich eine Reihe gut kontrollierbarer Umgebungsbedingungen anbietet. Die Armleuchteralge *Chara australis*, ist ein beliebtes pflanzliches Modell für elektrophysiologische Untersuchungen, da sie extrem große internodale Zellen besitzt, die bei geeigneter Präparation erregbar werden und Aktionspotentiale zeigen. Fillafer et al. untersuchten sowohl die Erregbarkeit, als auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Aktionspotentialen an *Chara*-Zellen, wobei die Temperatur  $T$  und pH-Wert experimentell variiert wurden. Darüber hinaus werden dort Literaturdaten zu den Auswirkungen von Druck und die Wirkung von Anästhetika untersucht. Für diese Umgebungsvariablen werden dort Vorhersagen für die Erregbarkeit von Zellen abgeleitet, die in Tabelle 9.1 zusammengefasst sind.

Ziel der Versuche, die hier vorgestellt werden war es, diese Vorhersagen auf die Auswirkung von Veränderungen von Ionenkonzentrationen zu erweitern. Träuble et al. zeigten, dass einwertige und zweiwertige Ionen antagonistische Wirkung auf anionische Lipidmembranen haben [105]. Während einwertige Kationen die negativen Ladungen der Lipid-Kopfgruppen abschirmen und damit Protonen verdrängen, gehen zweiwertige Kationen eine schwache Verbindung mit den Kopfgruppen ein. Somit bewirken einwertige Kationen eher eine Ausdehnung der Membran (ähnlich einer Temperaturerhöhung) während zweiwertige Kationen die Membran kondensieren und Richtung geordnete

Phase treiben. Damit ergeben sich aus der oben beschriebenen Sichtweise folgend zusätzlichen Vorhersagen, die in Tabelle 9.1 ergänzend aufgeführt werden. Die Auswirkung von ein- und zweiwertigen Ionen wurden nun durch Zugabe von LiCl bzw. CaCl<sub>2</sub> zum Zellmedium als jeweilige Vertreter untersucht. Lithiumchlorid wurde unter anderem deshalb gewählt, da dieses Salz als sehr potentes Therapeutikum für psychiatrische und neurologische Krankheiten (Depression, Bipolare Störung, Kopfschmerz-Syndrome) eingesetzt wird. Bekannt ist auch sein sehr schmales therapeutisches Fenster [106]. Bereits bei geringen Überdosierungen entwickeln sich schwere Nebenwirkungen wie Zittern Krämpfe und Bewusstlosigkeit. Der Wirkungsmechanismus von Lithium ist bisher nicht verstanden. Vor dem Hintergrund des hier vorgestellten Gedankengebäudes ist es aber offensichtlich, dass Lithiumionen den thermodynamischen Zustand von Zellmembranen und damit die Nervenreizleitung prinzipiell beeinflussen können.

## 9.2. Experimentelle Methoden

*Chara australis* wurden kultiviert wie in [102] beschrieben. Vor den Versuchen wurden möglichst große internodale Zellen isoliert und für mindestens 12 h in eine definierte Salzlösung überführt (0,1 mM NaCl, 0,1 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) um sie in einen erregbaren Zustand zu versetzen und einen leichten osmotischen Überdruck in den Zellen aufzubauen, was die spätere Handhabung erheblich erleichtert. Für spätere Experimente wurde künstliches Süßwasser (KSW) hergestellt (0,1 mM NaCl, 0,1 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 190 mM D-Sorbitol, 5 mM HEPES) und mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

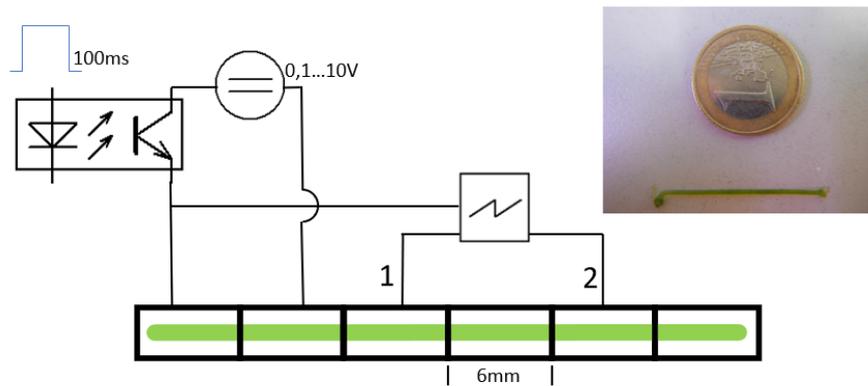
Die Zellen wurden sodann in eine Versuchskammer aus PMMA eingebracht, die es ermöglicht einzelne Abschnitte der Zelle mittels Paraffinwachs elektrisch gegeneinander zu isolieren. Die einzelnen Abschnitte wurden mit dem KSW befüllt und mit Silberchlorid-Elektroden elektrisch kontaktiert. Die Temperatur wurde durch großflächigen Kontakt mit einem wasserbadgeführten Metallblock konstant gehalten (soweit nicht anders beschrieben  $T \approx 20^\circ\text{C}$ ). Die äußerste Kammer auf einer Seite der Zelle wurde davon abweichend mit 110 mM KCl befüllt, um eine virtuelle intrazelluläre Elektrode zu schaffen (KCl-Anästhesie nach Lühring [107]). Die Spannung zwischen dieser virtuellen Elektrode und den externen Elektroden in anderen Kompartimenten wurden mit zwei Ladungssensoren PS-2132 von PACO scientific (Roseville, CA) aufgenommen. Die Messtellen befanden sich so weit von einander entfernt, wie es die Länge der Zelle erlaubte, mindestens jedoch 6 mm

Für die Versuche wurden dem KSW LiCl bzw. CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. Der Puffer wurde in diesem Fall in allen Kammern mindestens zweimal ausgetauscht. Vor Beginn der Messungen wurde die Zelle für mindestens 10 Minuten bei den neuen Bedingungen äquilibriert und der osmotische Druck dabei durch eine entsprechende Verringerung der D-Sorbitol-Konzentration ausgeglichen. Da die *Chara*-Zellen grundsätzlich ein negatives Membranpotential ausbilden, kann angenommen werden, dass die Anionen gelöster Salze (hier Chlorid) keine, oder lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Beeinflussung der Membran spielen.

## 9. Kontrolle der zellulären Erregbarkeit durch ein- und zweiwertige Ionen

Die Anregung der Zellen erfolgte über elektrische DC-Pulse mit einer Pulsdauer von  $\tau = 100 \text{ ms}$ . Dafür wurde wie in Abbildung 9.1 skizziert, ein Labornetzteil mit regelbarer Spannung  $U$  zwischen der virtuellen Elektrode und der benachbarten Kammer verbunden. Die Pulsdauer wurde durch das Schließen eines Arduino-gesteuerten Optokopplers realisiert, um Einflüsse eventueller Masseverbindungen zu vermeiden und eine genaue Steuerung der Pulsdauer zu gewährleisten. Die Puls-Spannung wurde bei jedem Experiment so angepasst, dass eine zuverlässige Erregung erreicht wurde (typischer Wert  $0,5 \text{ V}$ ). Der gesamte Aufbau ist in Abbildung 9.1 skizziert.

Abbildung 9.1. Skizze des Versuchsaufbaus. Rechts oben: Fotografie einer präparierten Chara-Zelle.



### 9.3. Ergebnisse und Diskussion

Es wurde sowohl die Auswirkung von Lithium, als auch die Auswirkung von Kalzium auf die Erregbarkeit der Zellen untersucht. Aufgrund der sehr individuellen Erregbarkeitsschwellen und AP-Formen einzelner Zellen können immer nur Werte innerhalb einer Zelle oder Relativwerte gut miteinander verglichen werden. Da sich die hier gezeigten Ergebnisse auf eine relativ geringe Anzahl von Messungen stützen, werden im Folgenden nur Ergebnisse für Einzelzellen gezeigt. Es sei aber angemerkt, dass die qualitativen Befunde gut reproduzierbar waren. Quantitative Aussagen zu Schwellwerten und AP-Geschwindigkeiten können jedoch nur bedingt gezogen werden.

#### 9.3.1. Veränderung des Aktionspotentials durch Kalziumionen

Wie oben angerissen, erwarten wir, ausgehend von den theoretischen Überlegungen in [105], dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine kondensierende Wirkung auf biologische Membranen haben. Dieser Effekt ist phänomenologisch vergleichbar mit einer Absenkung von pH oder Temperatur (siehe dazu auch einen Vergleich von  $\text{Ca}^{2+}$  und pH auf anionische Lipidmembranen in Anhang A.3). Abbildung 9.2 fasst die entsprechenden Ergebnisse für die Ausbildung von APs in Chara-Zellen zusammen.

Zunächst entspricht die Wirkung der zweiwertigen Ionen prinzipiell diesen Erwartungen. Die Leitungsgeschwindigkeit der APs nimmt mit steigender Konzentration ab, was gut vereinbar mit der Vorstellung ist, dass das System näher an die Phasenumwandlung „geschoben“ wird. Allerdings ist dieser Effekt nur schwach ausgeprägt. Ab einer Konzentration von **20 mM** verliert die Zelle schließlich ihre Fähigkeit zur Weiterleitung von APs. Während in Segment 1 noch ein vollständiges AP beobachtet wird, ist in Segment 2 bereits nur noch eine deutlich kleinere Auslenkung des Potentials zu beobachten.

Dieser Effekt wird in Abbildung 9.3 genauer beleuchtet. Mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann zwar noch eine gewisse Anregung der Membran erreicht werden; diese zeigt dann aber eine Abschwächung des Signals mit dem Laufweg, die typisch für eine lineare Pulsausbreitung ist (Dissipation). Mit zunehmender Anregungsspannung  $U$  nimmt die Auslenkung des Membranpotentials zu, erreicht aber selbst bei sehr hohen Anregungsspannungen nicht die Höhe des ursprünglichen Aktionspotentials. Die Abbildung zeigt darüber hinaus, dass der Effekt der Ionen durch eine Absenkung der Temperatur verstärkt, bzw. durch Temperaturerhöhung aufgehoben werden kann. Ab einer Temperaturerhöhung um  $\Delta T = 26\text{ °C}$  ist die Zelle wieder in einem ähnlichen Maße erregbar wie vor der Zugabe von Ionen. Dieses antagonistische Verhalten von  $\text{Ca}^{2+}$  und Temperaturerhöhung konnte qualitativ mehrfach reproduziert werden und folgt direkt aus dem oben beschriebenen Modell.

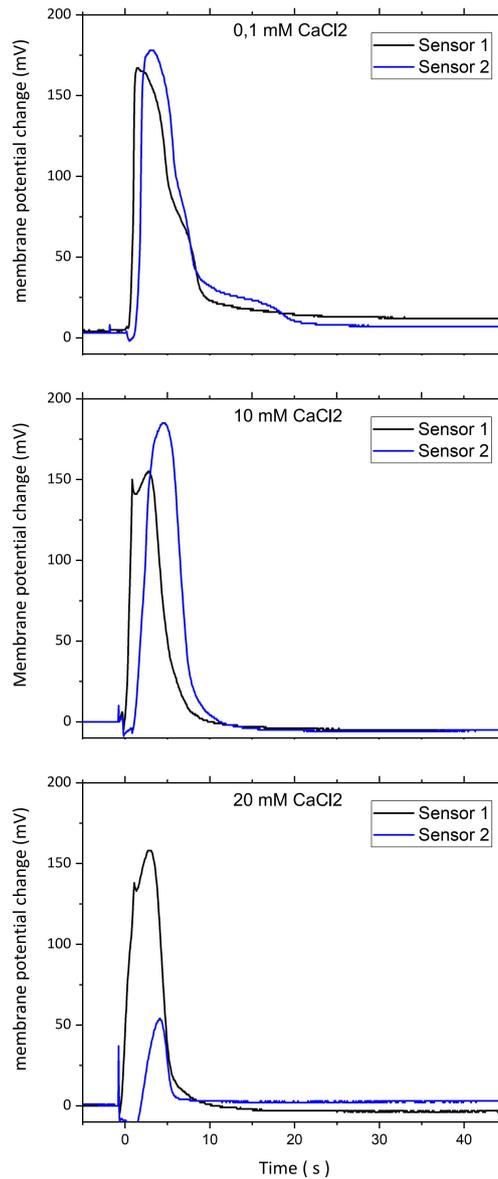


Abbildung 9.2 Induzierte Aktionspotentiale einer (individuellen) Chara-Zelle. Mit zunehmender Konzentration von Kalziumchlorid nimmt die Ausbreitungsgeschwindigkeit (gemessen an der Laufzeit zwischen den ansteigenden Flanken) leicht ab. Ab etwa 20 mM verliert das AP seine Propagationsfähigkeit bis schließlich die Erregbarkeit insgesamt deutlich abnimmt.

### 9.3.2. Veränderung des Aktionspotentials durch Lithium-Ionen

Eine Schrittweise Erhöhung der LiCl-Konzentration führte zu hochinteressanten Veränderungen der Aktionspotentiale, die in Abbildung 9.4 dargestellt sind.

Die leichte Erhöhung der Ausbreitungsgeschwindigkeit entspricht der Vorhersage aus Tabelle 9.1. Monovalente Kationen sind in der Lage, Protonen aus der Lipid-Wasser-Grenzfläche zu verdrängen und erzeugen somit eine leichte Erhöhung des lokalen pH-Werts [105]. Dass diese zu einer Erhöhung

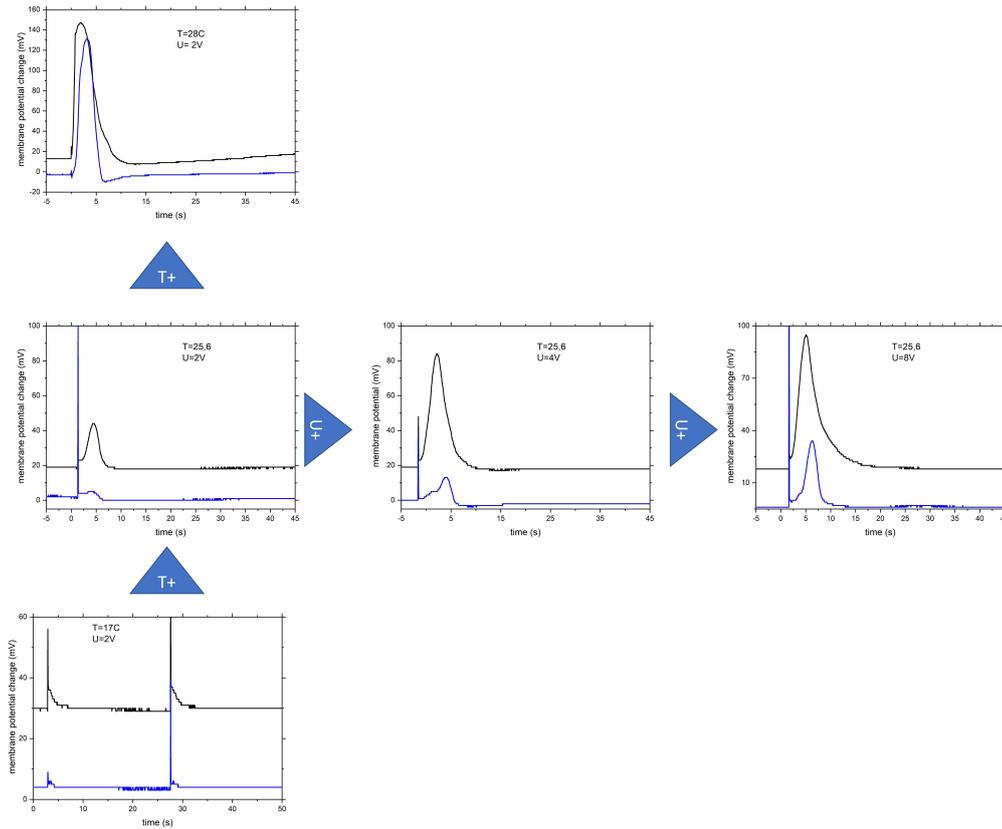
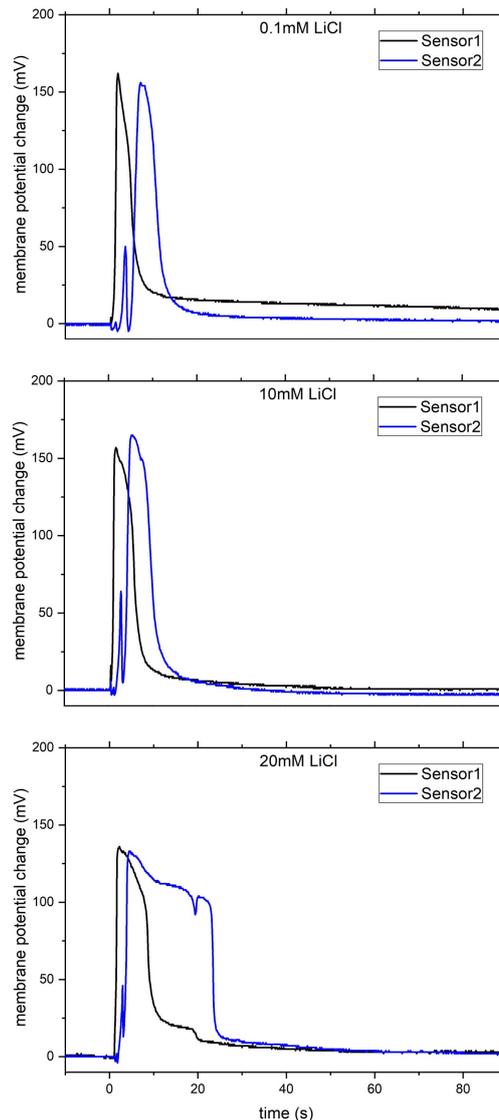


Abbildung 9.3. Chara-Zelle bei einer Kalziumionenkonzentration von 20 mM. Eine Erregbarkeit ist bei Raumtemperatur nicht mehr gegeben. Auch eine Erhöhung der Anregungsspannung erzeugt lediglich kleine, mit Entfernung schnell abnehmende Pulse. Eine Absenkung der Temperatur verstärkt diesen Effekt, wohingegen eine Temperaturerhöhung den erregbaren Zustand wieder herstellt.

der Ausbreitungsgeschwindigkeit von APs in biologischen Membranen führt, wurde verschiedentlich gezeigt.

Was die Erregbarkeit der Zelle betrifft, so passen die Resultate weniger gut ins Bild. Bei Lithiumkonzentrationen von bis zu 10 mM kann eine leichte Verringerung des Spannungsschwellwerts für eine Erregung beobachtet werden. Ab 20 mM tritt zusätzlich eine sehr deutliche Verbreiterung der Aktionspotentiale ein. AP-Dauern von bis zu 100 s werden beobachtet, was dem 20-fachen der typischen AP-Dauer entspricht. Wird die Lithiumkonzentration noch etwas weiter erhöht, so geht die Zelle häufig in einen Zustand der Selbsterregung über, in dem periodische Aktionspotentiale ohne externe Anregung entstehen (Abbildung 9.5). Es scheint also so zu sein, dass einwertige Ionen hier den depolarisierten Zustand der Zelle stabilisieren, was zunächst der Vorstellung einer „verflüssigenden“ Wirkung widerspricht. Kontrollexperimente mit NaCl zeigen Ergebnisse, die qualitativ und, soweit eine Beurteilung zulässig ist,

Abbildung 9.4 Induzierte Aktionspotentiale einer (individuellen) Chara-Zelle. Sensor 1 liegt näher zum Ort der Anregung, Sensor 2 weiter davon entfernt. Mit zunehmender Konzentration von Lithiumchlorid nimmt die Ausbreitungsgeschwindigkeit (gemessen an der Laufzeit zwischen den ansteigenden Flanken) leicht zu. Sehr viel auffälliger ist aber die massive Verbreiterung der Aktionspotentials ab einer Konzentration von typischerweise 15 mM.



auch quantitativ mit den Ergebnissen zu LiCl übereinstimmen, was die Vermutung nahelegt, dass sie grundsätzlich auf kleine Ionen der Alkali-Gruppe übertragbar sind.

### 9.3.3. Diskussion

Während einige der beobachteten Effekte von Ionen durch das einfache thermodynamische Bild gut erklärt werden, weisen andere darauf hin, dass darüber hinaus Effekte eine Rolle spielen. Weder die AP-Verbreiterung noch das Auftreten der Selbsterregung wurden im Rahmen des oben beschriebenen

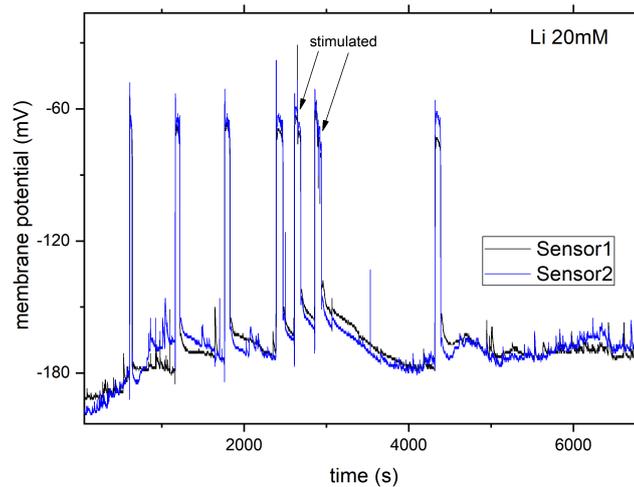


Abbildung 9.5. Spontane verbreiterte Aktionspotentiale einer weiteren Chara-Zelle bei 20 mM Lithiumchlorid. Die Potentiale treten in regelmäßigen Abständen spontan und in beiden Kompartments nahezu gleichzeitig auf. Zwischen zwei spontanen APs sind weitere externe Stimulationen möglich. Diese depolarisieren die Zelle allerdings zunehmend (Anstieg des Ruhepotentials).

Gedankenmodells bisher eingehend betrachtet, sind aber allgemein bekannte Phänomene in der Elektrophysiologie.

Beide Phänomene, spontane Spikes, wie auch die AP-Verbreiterung, sind jedoch mögliche Zustände des van-der-Pol-Oszillators bzw. seiner Erweiterung im Fitzhugh-Nagumo-Modell erregbarer Zellen [108]–[110]. Letzteres wurde als eine zweidimensionale Vereinfachung bzw. Verallgemeinerung des mehrdimensionalen Hodgkin-Huxley-Modells entwickelt und beschreibt oscillatorische Bewegungen in einem zweidimensionalen Phasenraum. Vor diesem Hintergrund soll hier eine kurze Stabilitätsanalyse einer Lipidmembran nahe ihres Phasenübergangs durchgespielt werden.

Wie in den Grundlagen 1.3.3 bereits beschrieben, kann der Hauptphasenübergang in erster Näherung als Phasenübergang erster Ordnung beschrieben werden, was wir hier auch auf den Übergang der Chara-Zellen zwischen Ruhezustand und Erregung annehmen wollen. Wir wählen den Unterschied der Kopfgruppendichte ( $\Delta\rho$ ) als Ordnungsparameter. Es ist zu beachten, dass die Dichte der Kopfgruppen bei geladenen Lipiden automatisch das Oberflächenpotential bestimmt.

Weiterhin nehmen wir an, dass sich der Oberflächendruck  $\Pi$  (genauer: seine Abweichung vom Ruhezustand „ $\Pi = 0$ “) beispielsweise durch ankommende Druckpulse ändern kann.  $\Pi$  kann somit als externes Feld betrachtet werden. In diesem Fall verschwinden die ungeraden Beiträge in der Entwicklung des Landau-Potentials nicht und Übergänge erster Ordnung treten auch

für positive Koeffizienten zweiter Ordnung auf. Vernachlässigen wir das Vorhandensein des trikritischen Punkts, so können wir die Reihenentwicklung in diesem Fall bereits nach der vierten Ordnung abbrechen, wie es z.B. auch bei der Behandlung des Übergang eines van-der-Waals-Gases von flüssig zu gasförmig üblich ist. Weiterhin vernachlässigen wir den konstanten Term  $G_0$ :

$$G((\Delta\rho), \Pi, T, ) = -\Pi A_1(\Delta\rho) + \frac{A_2}{2}(\Delta\rho)^2 - \frac{A_3}{3}(\Delta\rho)^3 + \frac{A_4}{4}(\Delta\rho)^4 \quad (9.1)$$

Die entsprechenden Koeffizienten  $A_x$  können prinzipiell experimentell bestimmt werden [111]. Wir nehmen an, dass  $A_1$  in der Nähe der Umwandlung als Funktion der Temperatur  $A_2 = a(T - T^*)$  entwickelt werden kann und dass die übrigen Koeffizienten positiv und nur schwach von  $\Pi$  und  $T$  abhängen.

Die treibende Kraft für eine Zustandsänderung abseits des Gleichgewichts kann nun nach Onsager als Ableitung des Potentials nach dem Ordnungsparameter beschrieben werden:

$$\frac{1}{\lambda} \frac{d(\Delta\rho)}{dt} = -\frac{dG}{d\rho} = -(-\Pi A_1 + A_2(\Delta\rho) - A_3(\Delta\rho)^2 + A_4(\Delta\rho)^3) \quad (9.2)$$

Für die weitere Behandlung wird  $\lambda$  in die Koeffizienten  $A_x$  integriert. Für Fixpunkte des Systems, in denen der Zustand stabil ist, muss damit gelten („ $(\Delta\rho)$ -Nullkline“):

$$\frac{d(\Delta\rho)}{dt} = 0 \Rightarrow \Pi = -\left(\frac{A_2}{A_1}(\Delta\rho) - \frac{A_3}{A_1}(\Delta\rho)^2 + \frac{A_4}{A_1}(\Delta\rho)^3\right) \quad (9.3)$$

Das bisher entwickelte Model beschreibt ein bistabiles System, das bei äußeren Einflüssen zwischen zwei Zuständen "kippen" kann. Um den beobachteten zusätzlichen Effekten Rechnung zu tragen, müssen wir davon ausgehen, dass ein weiter schwacher Einfluss auf  $\Pi$  existiert, der das System auf Dauer auf den ursprünglichen Ruhezustand  $\Pi = 0$  zurück treibt und diesen wieder herstellt. Wir begreifen nun  $\Pi(\Pi_{\text{ext}}(t), C^+(t), C^{++}(t))$  hier als eine effektive Lateraldruckabweichung, die nicht nur von externen Pulsen bestimmt ist, sondern auch von Ladungsträgern in der Nähe der Membran, die die Repulsion zwischen den geladenen Kopfgruppen beeinflussen. Leicht vorstellbar ist, dass ein eine langsame Anpassung der Ionenkonzentrationen im Bereich der Grenzschicht durch Austausch mit dem Bulk stattfindet, die in erster Näherung linear vom Konzentrationsgefälle zur Membranoberfläche bestimmt ist, un somit  $\Pi$  selbst bestimmt ist. Zusätzlich muss eine schwache „Rückkopplung“ zwischen dem Ordnungsparameter (Membrandichte) und  $\Pi$  angenommen werden:

$$\frac{d\Pi}{dt} = -\epsilon((\Delta\rho) + B\Pi) \quad (9.4)$$

mit  $\epsilon \ll 1$ . Für Fixpunkte des Systems muss dann ebenso gelten („ $\Pi$ -Nullkline“):

$$\frac{d\Pi}{dt} = 0 \Rightarrow B\Pi = -(\Delta\rho) \quad (9.5)$$

Das resultierende Modell kann als zweidimensionales Zustandsdiagramm in der  $(\Pi, \Delta\rho)$ -Ebene dargestellt werden und weist große formale Ähnlichkeit zum zuvor erwähnten FitzHugh-Nagumo-Modell auf. Dessen Gleichungen im  $(v, w)$ -Phasenraum lauten:

$$\frac{dv}{dt} = v - \frac{1}{3}v^3 - w + I_{\text{ext}} \quad (9.6)$$

und

$$\tau \frac{dw}{dt} = v - a - bw \quad (9.7)$$

Das abgeleitete System entspricht also dem FitzHugh-Nagumo-Modell unter den Annahmen  $\lambda = -1$ ,  $A_1 = 1$ ,  $A_2 = 1$ ,  $A_3 = 0$ ,  $A_4 = -1/3$ , sowie  $B = b$ , und  $\epsilon = -1/\tau$ . Auf die weiteren Parameter  $a$  und  $I_{\text{ext}}$  wurde in unserer Behandlung zunächst verzichtet. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Parameter  $A_x$  nicht frei sind, sondern experimentell aus thermodynamischen Messgrößen der Membran ermittelt werden können (siehe oben).

Ein entsprechendes Skript zur Darstellung der entstehenden Systemtrajektorien wurde erstellt (siehe Anhang A.4.3), wobei ein bestehendes Python-Programm von John D. Murray [112] weiterentwickelt wurde. Abbildung 9.6 zeigt verschiedene typische Trajektorien dieses Modells.

Es sind alle experimentell relevanten Zustandsklassen vorhanden: Nicht-Erregbarkeit, normale APs, verbreiterte APs und Oszillation. Insbesondere die letzten beiden Zustandsklassen werden in diesem Modell nur durch die zusätzliche Annahme der oben beschriebenen  $\Pi$ -Nullkline erreicht und entsprechen den typischen Zuständen des FitzHugh-Nagumo-Modells. Nur so existiert eine physikalisch sinnvolle Interpretation der  $(\Delta\rho)$ -Nullkline, die qualitativ korrekte Vorhersagen der Temperaturabhängigkeit der Zellerregbarkeit liefert.

In Anbetracht der experimentellen Ergebnisse scheint die eindimensionale thermodynamische Betrachtung daher an ihre Grenzen zu stoßen, wenn die spezifische Wirkung von (einwertigen) Ionen auf Zellen beschrieben werden soll. Die dargestellte Ableitung könnte eine interessante Möglichkeit sein, das thermodynamische Bild und die phänomenologische Beschreibung von FitzHugh-Nagumo zukünftig zu integrieren. Die interessante Frage, die sich dabei stellt ist die nach der Rolle der Impulserhaltung bei der räumlichen Propagation von Aktionspotentialen. Die Impulserhaltung liegt den in der Einleitung angesprochenen physikalischen Modellen zur Nervenreizleitung

## 9. Kontrolle der zellulären Erregbarkeit durch ein- und zweiwertige Ionen

---

durch die Existenz von zweidimensionalen Schallwellen auf der Membran zugrunde und wird auch in der hier dargestellten Behandlung noch nicht berücksichtigt.

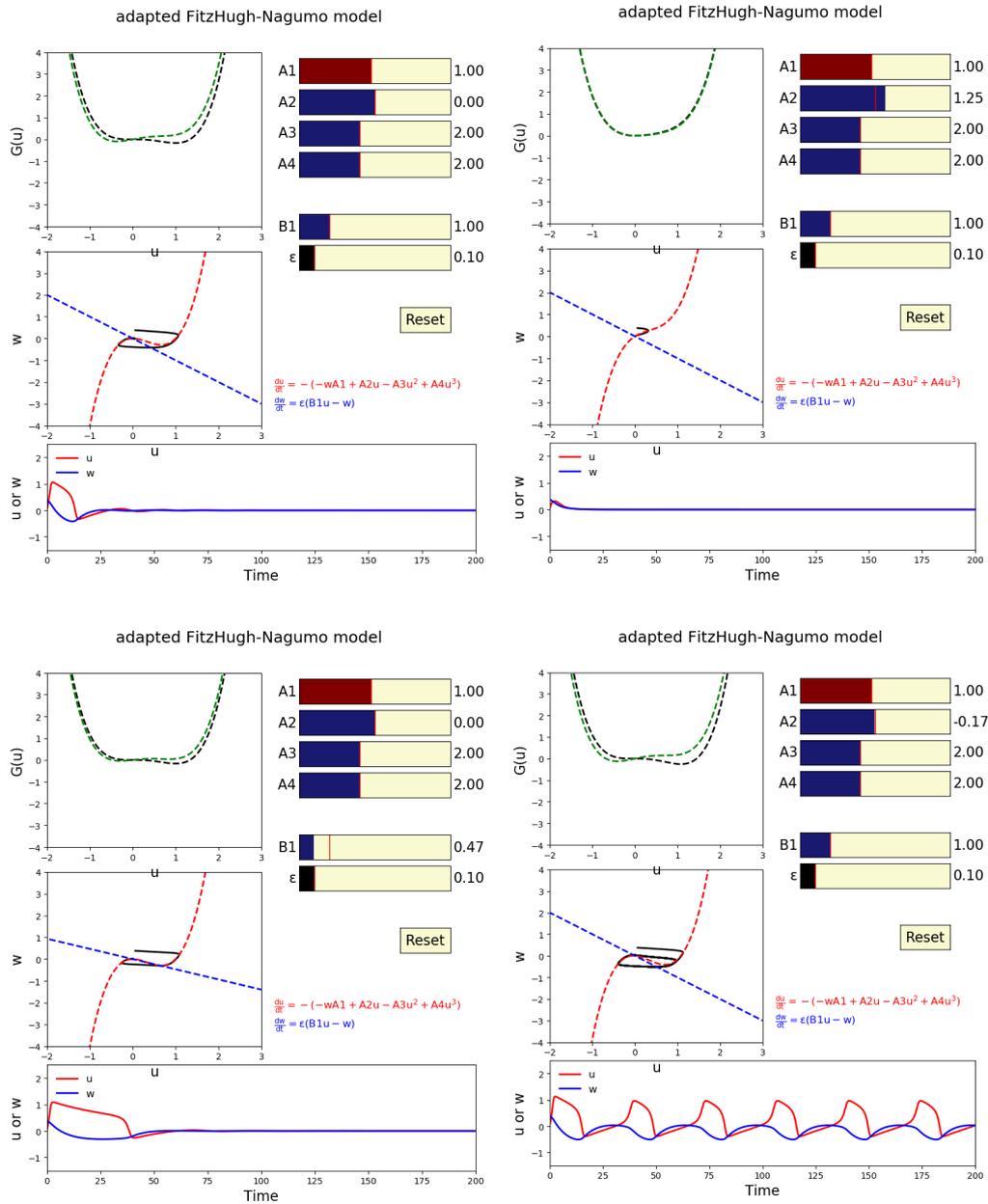


Abbildung 9.6. Output des abgeleiteten Modells ( $u \hat{=} \Delta\rho, w \hat{=} \Pi$ ). Die Graphen zeigen jeweils (i) das Landau-Potential (Anfangszustand: schwarz, Maximale Variation: grün), (ii) die Nullklinen mit der Systemtrajektorie und (iii) den Zeitverlauf der Variablen. Die Erregung des Systems ist jeweils durch einen Startzustand leicht oberhalb der Nullklinen abgebildet. *Links oben:* Normale Erregbarkeit/AP. *Rechts oben:* Durch Erhöhung der Temperatur ( $A2$ ) über den kritischen Punkt ist die Bistabilität aufgehoben. Das System ist nicht mehr erregbar. *Links unten:* Verbreitertes AP durch Änderung des Kopplungsparameters  $B_1$ . *Rechts unten:* Oszillation bei leichter Absenkung der Temperatur.

#### 9.4. Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Kalziumionen mit dem in der Kapiteleinleitung physikalischen Modell der Reizleitung vereinbar ist, wenn man, wie es Experimente an reinen Lipidmembranen nahelegen, von einer kondensierenden Wirkung von zweiwertigen Ionen auf anionische Lipidmembranen ausgeht. Ähnlich wie bei einer Absenkung der Temperatur oder des pH-Werts reduziert sich zunächst die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale - wenn auch in relativ geringem Maße. Für dahingehende quantitative Aussagen ist die Anzahl der durchgeführten Versuche bisher leider zu gering und sollte in der Zukunft erhöht werden. Ebenfalls im Einklang mit den Erwartungen existiert eine Schwelle, ab der die Erregbarkeit der Zellen schnell abnimmt. Im theoretischen Bild ist hier der Übergang zur kondensierten Phase überschritten. Dieser Effekt lässt sich durch ausreichende Temperaturerhöhung kompensieren.

Deutlich komplexer stellt sich die Wirkung von  $\text{Li}^+$ -Ionen dar. Zwar kann zunächst eine Erhöhung der AP-Geschwindigkeit beobachtet werden, was gut in das theoretische Bild passt. Die Erregbarkeit der Zelle nimmt dabei jedoch eher zu und mündet bei hohen Ionenkonzentrationen in spontan entstehende Aktionspotentiale, die zumindest auf den ersten Blick, nicht zu einer gedachten Verschiebung des Systems weg vom Phasenübergang passen wollen.

Mögliche Erklärungsansätze könnten die Annäherung an einen kritischen Punkt (ähnlich wie für Temperaturerhöhungen erwartet) oder die Existenz eines weiteren Phasenübergangs sein, der bereits zuvor ins Spiel gebracht wurde [102]. Insgesamt deutet sich aber an, dass eine korrekte Beschreibung der Wirkung von Ionen eine Erweiterung des Modells erfordert. Insbesondere die variable Länge von Aktionspotentialen lässt sich gut durch die Einführung einer „Recovery-Variable“ ähnlich wie bei FitzHugh-Nagumo oder verwandten Modellen erklären. Es wurde deshalb gezeigt, dass ein bistabiles System, als das Lipidmembranen oft beschrieben werden, wichtige Grundvoraussetzungen besitzt um eine Dynamik zu zeigen, die klassischen Reizleitungsmodellen entspricht, sofern eine zweite Dimension des Phasenraums zugelassen wird. In einem geeignet präparierten Lipidsystem würde man in diesem Fall entsprechend die volle Bandbreite der Erregungszustände von Zellen erwarten. Es sei hier angemerkt, dass in Verbindung mit äußeren Störungen (z.B. Lösungsmitteldämpfe) auch in reinen Lipidmembranen bereits oszillatorisches Verhalten beobachtet wurde [113]. Es wäre hochinteressant zu untersuchen, in wieweit sich solche Ansätze zukünftig in das physikalische Modell zur Nervenreizleitung integrieren lassen.

Abschließend sei gesagt, dass *Chara australis* auch für die Untersuchung der „thermodynamischen Steuerung“ der Partikelaufnahme ein sehr geeignetes Modell sein kann. Die Zellen sind experimentell sehr leicht zugänglich und

können, wie hier gezeigt wurde, gezielt zwischen zwei Zuständen wechseln. Es wäre daher sehr spannend zu sehen, ob durch diesen Prozess die Aufnahme von Partikeln wie erwartet beeinflusst werden kann.



## **10. Ausblick: Entwicklung einer Mikropumpe zur Durchführung von Aufnahmeexperimenten in lebenden Zellen**

Dieses Kapitel beschreibt die Entwicklung einer Mikropumpe zur Durchführung von Zellexperimenten zur Partikelaufnahme unter realistischen Flussbedingungen, die in [114] veröffentlicht wurde. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden Proof-of-Concept-Versuche zur Partikelaufnahme in lebenden Zellen durchgeführt, die die Wichtigkeit von Flussbedingungen für die Aufnahme von Partikeln unterstreichen. Insbesondere bei der Entwicklung von Drug-Delivery-Systemen und in der Wirkstoffforschung spielt die Partikelaufnahme durch Gefäßepithel eine herausragende Rolle. Gerade in diesen Fällen ist der Einfluss von Strömung von hoher Relevanz. Wie sich zeigt, ist die Erzeugung von Flüssigkeitsbewegung jedoch auch grundsätzlich vorteilhaft für Versuche zur Partikelaufnahme, um die Einflüsse von Sedimentation und Diffusion während des Experiments zu kontrollieren.

### 10.1. Einleitung

Es wurde bereits beschrieben, dass auch bei der Partikelaufnahme durch lebende Zellen Größenabhängigkeiten zu beobachten sind, die gut zu den Ergebnissen im Modellsystem passen. All diese Aufnahmeexperimente finden zumeist in ruhenden Flüssigkeitsreservoirs statt, was insbesondere bei größeren Partikeln zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch Partikel-Sedimentation führt. Die Sedimentation kann insbesondere zu einer Überschätzung der Aufnahmeraten für große Partikel und Agglomerate führen, da sich deren lokale Konzentration über die Dauer des Experiments entsprechend der Stokes-Gleichung erhöht. Für die Anzahl der Partikel auf einer halbkugeligen Zelle mit Radius  $R$  gilt im einfachsten Fall:

$$\frac{dN}{dt} = \pi R^2 C_\infty v_{\text{sed}} = \pi R^2 C_\infty \frac{g(\rho_p - \rho_m)}{9\eta} 2r^2 \quad (10.1)$$

wobei  $v_{\text{sed}}$  die Sedimentationsgeschwindigkeit bezeichnet,  $C_\infty$  die Partikelkonzentration im Medium,  $\eta$  dessen Viskosität und  $\rho_p$  bzw.  $\rho_m$  die Dichten von Partikel und Medium.

Für kleine Partikel und geringe Partikelkonzentrationen wiederum, kann die limitierte Partikeldiffusion, wie in Abschnitt 5.1.2 ausgeführt, zu einer Verarmungszone an der Vesikeloberfläche führen, die im physiologischen System durch ständige Durchmischung ausgeschlossen ist.

Abbildung 10.1 skizziert die relevanten Kräfte, die die Partikelaufnahme unter realen Bedingungen beeinflussen können.

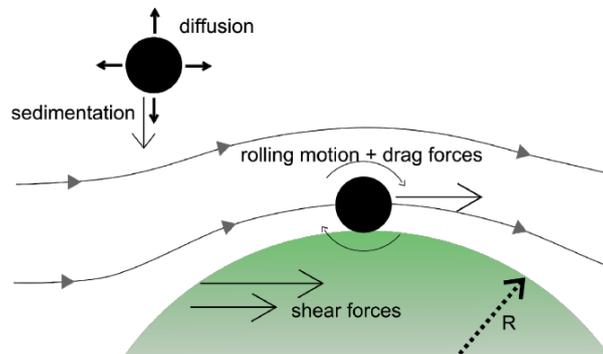


Abbildung 10.1. [übernommen aus [114]] Verschiedene Einflüsse von Strömung auf die zelluläre Aufnahme von Nano- und Mikropartikeln. Diffusion und Sedimentation bestimmen in Ruhe die maximal verfügbare Partikelmenge pro Zeiteinheit. Bei realistischer Strömung werden diese Einflüsse irrelevant. Dafür entstehen Zugkräfte und Rollbewegungen, die die Aufnahme von Partikeln behindern. Zusätzlich erfährt die Zellwand Scherkräfte, die zu erhöhter Membranspannung führen.

Hinzu kommt, dass insbesondere bei Untersuchung von Gefäßepithelzellen, die bei Aufnahmeexperimenten häufig von besonderem Interesse sind,

Scherkräfte eine wichtige Rolle spielen. In Blutgefäßen ist die Zelloberfläche Scherraten von bis zu  $3000 \text{ s}^{-1}$  ausgesetzt [115]. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Scherkräfte die zellulären Aufnahmeprozesse signifikant beeinflussen können [116]–[118]. Auch vor dem Hintergrund der vorherigen Kapitel scheint es offensichtlich, dass eine Scherung der Zellmembran und die damit verbundene Erhöhung der Membranspannung die Aufnahme von Partikeln erschweren dürfte. Darüber hinaus wirken die Scherkräfte nicht nur auf die Epitheloberfläche, sondern zusätzlich auf die anhaftenden Partikel. Eine Abschätzung mithilfe der Stokes-Gleichung legt nahe, dass die natürlich auftretenden Kräfte, die an in Blutgefäßen an Partikeln einer Größe von  $r \approx 50 \text{ nm}$  angreifen, mit einigen Piconewton etwa eine Größenordnung schwächer sind als die typischen Kräfte von selektiven Rezeptor–Ligandenbindungen. Nichts desto trotz können diese Kräfte bei deutlich schwächeren unspezifischen Wechselwirkungen oder bei größeren Partikeln eine relevante Rolle spielen. Die Zugkraft, die auf ein Partikel an der Zellwand wirkt skaliert mit  $r^2$  [119]! Hinzu kommt die Tatsache, dass die Kontaktzeit zwischen einer Bindungsstelle und einem Partikel durch dessen Rollbewegung mit typischen Geschwindigkeiten von  $100 \mu\text{m/s}$  auf der Zelloberfläche deutlich reduziert sind, was eine Bindung erschweren kann [120].

In Zusammenarbeit mit der Fakultät für Chemie an der LMU München wurden Aufnahmeexperimente in Zellkulturen durchgeführt, die nur in sehr geringen Mengen verfügbar waren. Um die Problematik der Sedimentation zu umgehen und realistische Bedingungen für die Aufnahmeexperimente zu schaffen, musste das verwendete Zellmedium für die Dauer der Versuche auf engstem Raum durchmischt und bewegt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Mikropumpe realisiert die auf dem Prinzip des „acoustic streaming“ basiert, das bereits für verschiedenste mikrofluidische Anwendungen ausgenutzt wurde [121], [122], unter anderem in unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung der Interaktion von Arzneistoffträgern [123] und der Zelladhäsion an Implantatmaterialien [124]. Das Verfahren beruht auf der Erzeugung hochfrequenter Oberflächenwellen (Rayleigh-Wellen) in piezoelektrischen Substraten, die in das flüssige Medium eingekoppelt werden. Aufgrund nichtlinearer Effekte werden die entstehenden Longitudinalwellen in Flüssigkeiten sehr schnell gedämpft. Die verlorene Schwingungsenergie erzeugt einen akustischen Strahlungsdruck, der die Flüssigkeit antreibt [125].

Eine Herausforderung im konkreten Anwendungsfall ist dabei, dass die gesamte Bandbreite physiologischer Scherraten in Blutgefäßen von bis zu  $3000 \text{ s}^{-1}$  abgedeckt werden sollte, ohne dabei eine kritische Erwärmung des Zellmediums durch Verlustleistung zu erzeugen. Dieses Ziel erreichten die bis dato entwickelten Systeme leider noch nicht.

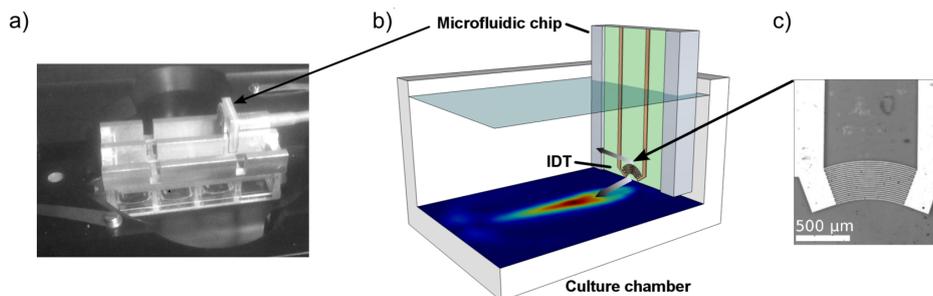
## 10.2. Aufbau und Charakterisierung des Systems

Um die oben beschriebenen Anforderungen zu erfüllen, wurden zwei grundlegende Ansätze verfolgt:

- Das piezoelektrische Substrat wird senkrecht zur Beobachtungsebene, bzw. zum Zellrasen angebracht. Diese Anordnung sorgt für einen günstigeren Einkopplungswinkel von ca.  $22^\circ$  zur Zelloberfläche, der durch das Verhältnis der Schallgeschwindigkeiten von Piezo-Substrat und Zellmedium vorgegeben ist (vgl. Rayleigh-Winkel [125]). Außerdem wird der Strahlengang des Mikroskops durch die Anordnung nicht beeinflusst.
- Es wird eine fokussierende Anordnung der Anregungselektroden (focused interdigital transducer FIDT) gewählt, die für ein konzentrierteres Strömungsbild sorgt. Der akustische Strahlungsdruck skaliert quadratisch mit der Amplitude der eingekoppelten Schallquellen [126]. Eine Fokussierung der Schallwellen führt damit zu einer nicht-linearen Verstärkung der Strömungsenergie im Fluid [127]. Die erreichbaren lokalen Scherraten können so bei konstanter elektrischer Leistung um mehrere Größenordnungen gesteigert werden.

Abbildung 10.2 zeigt das Gesamtsystem in Kombination mit einer kommerziellen Zellmedienkammer Nunc<sup>tm</sup> Lab-Tek<sup>tm</sup>.

Abbildung 10.2. [übernommen aus [114]] a) Zellmedienkammer mit aufgesetztem IDT-System auf einer Mikroskop-Stage. b) Schematische Zeichnung des Aufbaus. Der FIDT steht senkrecht zum Objektträger. Die Hauptkomponente des eingekoppelten Schalls trifft die Oberfläche unter einem Winkel von  $22^\circ$  und erzeugt dort ein charakteristisches Strömungsmuster. c) Mikroskopische Aufnahme des FIDTs.



Der verwendete piezoelektrische Chip wurde auf  $\text{LiNbO}_3$  ( $128^\circ$ -Y-cut) gefertigt. Eine zirkulär fokussierende Interdigitalelektrode mit 20 Fingern und einem mittleren Fokusabstand von  $750\ \mu\text{m}$  wurde durch die Abscheidung von  $5\ \text{nm}$  Ti und  $50\ \text{nm}$  Au mittels Elektrodenstrahlverdampfung hergestellt. Zur mechanischen und chemischen Stabilisierung wurde abschließend eine

Siliziumoxid-Schicht durch reaktive thermische Verdampfung von SiO abgedeckt. Die Resonanzfrequenz des Systems wurde zu **126 MHz** bestimmt.

Der Betrieb des FIDT erfolgte über einen HF-Verstärker. Die Betriebsleistung des FIDT wurde aus der Differenz der Ausgangsleistung des Verstärkers und der rückreflektierten Leistung im Bereich der Resonanzfrequenz ermittelt und betrug typischerweise **19 dBm**.

Die Charakterisierung des erzeugten Scherratenfelds erfolgte mittels Scanning Particle Image Velocimetry (SPIV) in mehreren Fokusebenen. **3  $\mu\text{m}$** -Polystyrenkugeln wurden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera bei verschiedenen Ausgangsleistungen des HF-Verstärkers aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte mit einem 20x-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0.45 womit eine Schärfentiefe von ca. **5  $\mu\text{m}$**  erreicht wurde. Die Kammer wurde entlang aller Raumachsen gescannt, wobei die Schrittweite entlang der z-Achse **25  $\mu\text{m}$**  betrug. An jeder Position wurden 50 Einzelbilder bei einer Bildrate von **3000 fps** aufgenommen wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte über ein Matlab-Skript unter Verwendung des PIVlab-Toolkits von William Thielicke [128]. Im Anschluss an die PIV-Analyse wurden die Daten zusammengefügt und interpoliert, wodurch für jede Schicht ein vollständiges x-y-Strömungsprofil erzeugt wurde. Wo diese von Interesse ist, kann die Geschwindigkeitskomponente entlang z können über die lokale Divergenz  $\nabla(v_x, v_y)$  des Strömungsfelds errechnet werden. Für unsere Zwecke ist lediglich die Scherrate in der untersten (zellnächsten) Schicht (Höhe **10  $\mu\text{m}$** ) von Interesse:  $S = \frac{d|v|}{dz} \approx \frac{|v|}{10 \mu\text{m}}$ .

Abbildung 10.3 Zeigt sowohl das Geschwindigkeitsfeld, als auch das Scherratenfeld am Boden einer Zellkammer bei einer Leistung von **19 dBm**.

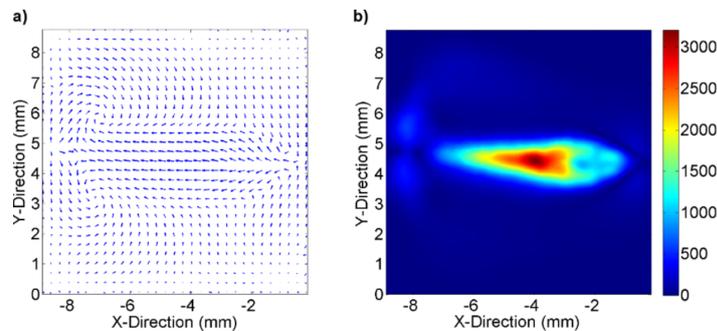


Abbildung 10.3. [übernommen aus [114]] a) Strömungsprofil in einem Abstand von **10  $\mu\text{m}$**  vom Kammerboden. Die Länge der Vektoren skaliert mit dem Logarithmus der Geschwindigkeit. b) Die Farbskala veranschaulicht die entsprechende Scherrate am Kammerboden in  $\text{s}^{-1}$ .

Der gesamte Bereich physiologisch relevanter Scherraten bis **3000  $\text{s}^{-1}$**  ist abgedeckt, wobei nahezu die gesamte Kammer vom Strömungsfeld erfasst

wird und auch in Bereichen sehr geringer Strömung eine effektive Durchmischung des Fluids gewährleistet ist [129]. Eine Messung der Temperatur des Zellmediums ergab, dass über einen Zeitraum von 1 h keine signifikante Temperaturerhöhung erreicht wurde.

### 10.3. Untersuchung des Einflusses von Strömung auf die Partikelaufnahme von Zellen

Das zuvor beschriebene System wurde eingesetzt, um den Einfluss von Strömung auf die zelluläre Aufnahme von Pt-dekorierten  $\text{CeO}_2$ -Partikeln zu untersuchen. Die Herstellung und Charakterisierung dieser Partikel erfolgte durch Rudolf Herrmann im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP1313 und ist im Detail beschrieben in [130]. (Siehe auch Abbildung 10.4)

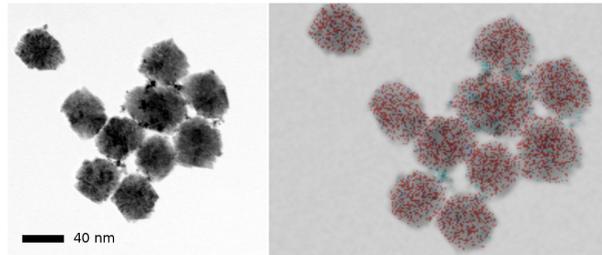


Abbildung 10.4. [übernommen aus [130]] STEM-Aufnahme (links) und EDX-Profil (rechts) der verwendeten Pt-dekorierten  $\text{CeO}_2$ -Partikeln. Ce ist in rot dargestellt, Pt in blau. Die Herstellung der Partikel wird in [130] beschrieben.

Diese Partikel sind von besonderer biologischer Relevanz, da Sie eine größenabhängige Mitochondriengängigkeit aufweisen [131] und damit sowohl für pharmazeutische Anwendungen von Interesse sind, als auch für die Prüfung der zuvor beschriebenen Erwartungen für physikalische Größenabhängigkeiten der Membrangängigkeit. Eine Größenabhängigkeit der zellulären Aufnahme dieser Partikel konnte ebenfalls gezeigt werden (siehe auch [132]). Während Partikel und Agglomerate  $r > 50 \text{ nm}$  durch Endozytose aufgenommen werden, wobei eine Bevorzugung kleinerer Objekte beobachtet werden kann, können sehr kleine Partikel biologische Membranen offensichtlich sogar direkt durch transiente Poren durchdringen. Eine Rolle könnte hier die katalytische Aktivität des Platins an der Partikeloberfläche spielen.

$\text{CeO}_2$ -Partikel mit einem Radius von  $r \approx 25 \text{ nm}$  wurden bei den Versuchen in einer finalen Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Als Zellmodell wurde die HMEC-1 Zellen verwendet (humanes mikrovaskuläres Epithel), deren Kultivierung in den o.g. Kammern in [132] beschrieben ist. Die Zellen wurden mit Zellmedium inkubiert, das Partikel in der entsprechenden Menge enthielt und mit den entsprechenden Flussbedingungen beaufschlagt. Nach festen Zeitabschnitten wurden jeweils 5 Zellen in zwei unterschiedlichen ROIs (d.h. in unterschiedlichen Flussbedingungen) mit einem Fluoreszenz-Konfokalmikroskop gescannt und das Signal mit dem ImageJ-plugin Particle in Cell 3D [133] analysiert. Abbildung 10.5 fasst die Ergebnisse zusammen.

Sowohl bei geringer ( $S = 100 \text{ s}^{-1}$ ) Scherung, als auch bei hoher ( $S = 2000 \text{ s}^{-1}$ ) Scherung nimmt die Anzahl der aufgenommenen Partikel ungefähr

### 10.3. Untersuchung des Einflusses von Strömung auf die Partikelaufnahme von Zellen

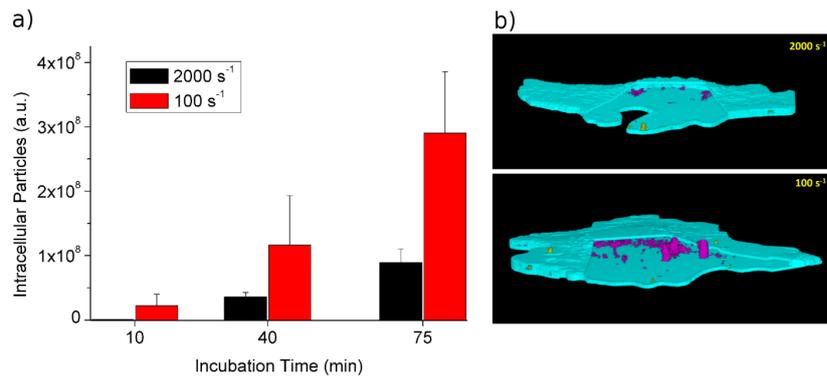


Abbildung 10.5. a) Anzahl internalisierter Partikel bei unterschiedlichen Scherraten  
b) Darstellung des analysierten Fluoreszenzsignals zweier repräsentativer Zellen. Die internalisierten Partikel sind in pink dargestellt, Partikelagglomerate in Kontakt mit der Membran in gelb und die Zellmembran selbst in cyan.

mit konstanter Rate zu. Diese Rate ist jedoch, wie erwartet, bei hohen Flussgeschwindigkeiten deutlich reduziert (ca. Faktor 7). Zu beachten ist, dass eine Sedimentation von Partikeln an der Zelloberfläche nicht zu beobachten ist und aufgrund der ständigen Mischung auch die Diffusion keine Rolle spielt. Somit sind die beobachteten Unterschiede auf den Aufnahmeprozess selbst zurückzuführen.

### 10.4. Schlussfolgerung

Es wurde ein Konzept für Mikropumpen vorgestellt, welches, basierend auf dem Prinzip SAW-getriebener akustischer Strömung, die gesamte Bandbreite physiologisch relevanter Scherkräfte in sehr kleinen Probenvolumina erzeugen kann. Es konnte im Rahmen von Proof-of-Concept-Versuchen gezeigt werden, dass physiologische Flussbedingungen bzw. Scherkräfte die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln signifikant beeinflussen können. Schon geringe Strömungsgeschwindigkeiten könnten den Einfluss der Sedimentation von Partikeln ausschließen, während eine gezielte Erhöhung der Scherkräfte einen Möglichkeit sein könnten die Membranspannung von lebenden Zellen zu variieren. Eine sehr spannende Frage, die in entsprechenden Versuchen ebenfalls angegangen werden könnte, ist, ob die durch Fluss induzierten Schubspannungen auch wiederum den Zustand der Membran beeinflussen. Eine Herausforderung wäre hier sicherlich die Trennung dieses Effekts von direkten Auswirkungen von z.B. Zugkräften auf die Partikel und der daraus folgenden Variation der mittleren Kontaktzeiten. Auch im Hinblick auf die Untersuchung der biologischen Relevanz des in den vorigen Kapiteln entwickelten Modells der größenabhängigen Partikelaufnahme, wären entsprechende Experimente zur Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch lebende Zellen in Zukunft von hohem Wert.

Es sei hier noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die eben besprochenen Aspekte bei allen Aufnahmeexperimenten bedacht werden sollten. Insbesondere der Ausschluss von Sedimentationseffekten sollte dabei immer gewährleistet sein um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Das hier vorgestellte Pumpenprinzip kann dabei ein wertvolles Hilfsmittel sein, insbesondere dann, wenn die experimentellen Gegebenheiten die Verwendung sehr kleiner Probenvolumina erfordern.

## Literatur

- [1] D. Boal, *Mechanics of the Cell*, 2. Aufl. Cambridge University Press, 2012, ISBN: 978-0-521-11376-2.
- [2] F. G. Strobl, „Zur Interaktion von Lipidmembranen und Nanopartikeln,“ Universität Augsburg, 2011.
- [3] T. Heimburg, *Thermal biophysics of membranes*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2007, ISBN: 9783527404711.
- [4] S. Nuschele, „The role of interfaces in enzyme activity and cell adaptation,“ Universität Augsburg, 2010.
- [5] B Alberts u. a., *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2004, ISBN: 3527304924.
- [6] W Helfrich, „Elastic properties of lipid bilayers. Theory and possible experiments,“ *Zeitschrift für Naturforschung C*, Jg. 28, S. 693–703, 11 1973. DOI: 10.1515/znc-1973-11-1209.
- [7] L. D. Landau u. a., *Lehrbuch der Theoretischen Physik*, 6. Aufl., H.-G. Schöpf, Hrsg. Akademie-Verlag, 1989, Bd. 7 (Elastizitätsth.)
- [8] J. L. V. Hemmen, „Theoretische Membranphysik : vom Formenreichtum der Vesikel,“ Technische Universität München, 2001.
- [9] W Helfrich, „Pathways of vesiculation,“ *Prog. Colloid Polym. Sci.*, Jg. 95, S. 7–13, 1994. DOI: 10.1007/BFb0115701.
- [10] B. Fichtl, „Enzyme an weichen Grenzflächen,“ Universität Augsburg, 2011.
- [11] L. Landau u. a., *Course of Theoretical Physics*, 3. Aufl. Elsevier Limited, 2013, Bd. 5 (Stat. Phys I).
- [12] L. Boltzmann, „Über die mechanische Bedeutung des zweiten Hauptsatzes der Wärmetheorie,“ *Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften*, Jg. 53, S. 195–220, 1866.
- [13] D Steppich u. a., „Thermomechanic-electrical coupling in phospholipid monolayers near the critical point,“ *Phys. Rev. E*, Jg. 81, S. 061 123, 6 2010. DOI: 10.1103/PhysRevE.81.061123.
- [14] L. D. Landau u. a., *Lehrbuch der Theoretischen Physik*, 6. Aufl., H.-G. Schöpf, Hrsg. Akademie-Verlag, 1989, Bd. 5 (Stat. Phys. I).
- [15] O Albrecht u. a., „Polymorphism of phospholipid monolayers,“ *Le Journal de Physique*, Jg. 39, S. 301–313, 1978.

- [16] P. G. de Gennes, „General features of lipid organization,“ *Physics Letters A*, Jg. 47, S. 123–124, 2 1974, ISSN: 0375-9601. DOI: DOI : 10.1016/0375-9601(74)90376-4.
- [17] B. Alberts u. a., *Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl. Garland Science, 2002.
- [18] G. J. Doherty u. a., „Mechanisms of endocytosis,“ *Annual review of biochemistry*, Jg. 78, S. 857–902, 2009, ISSN: 1545-4509. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- [19] M. Kafshgari u. a., „Insights into Cellular Uptake of Nanoparticles,“ *Current Drug Delivery*, Jg. 12, S. 63–77, 1 2015, ISSN: 15672018. DOI: 10.2174/1567201811666140821110631.
- [20] H. Pülat u. a., „Chondrosarcoma located in the Costa: A case report,“ *Surgical Chronicles*, Jg. 21, S. 148–150, 3 2016, ISSN: 11085002. DOI: 10.1039/c0cs00003e.
- [21] L. Treuel u. a., „New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles,“ *Journal of the Royal Society, Interface*, Jg. 10, S. 20120939, 82 2013, ISSN: 1742-5662. DOI: 10.1098/rsif.2012.0939.
- [22] J Rejman u. a., „Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes,“ *Molecular Therapy*, Jg. 12, S. 468–474, 3 2005, ISSN: 15250016. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.03.038.
- [23] W. Römer u. a., „Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells,“ *Nature*, Jg. 450, S. 670–5, 7170 2007, ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature05996.
- [24] K. Yamashita u. a., „Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice,“ *Nature Nanotechnology*, Jg. 6, S. 321–328, 5 2011, ISSN: 17483395. DOI: 10.1038/nnano.2011.41.
- [25] E. C. Cho u. a., „Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I 2 / KI Etchant 2009,“ *Nano Lett.*, Jg. 9, S. 1080–1084, 3 2009.
- [26] K. Gao u. a., „Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles,“ *International Journal of Pharmaceutics*, Jg. 310, S. 213–219, 1-2 2006, ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.11.040.

- 
- [27] S. Hanada u. a., „Cell-Based in Vitro Blood–Brain Barrier Model Can Rapidly Evaluate Nanoparticles’ Brain Permeability in Association with Particle Size and Surface Modification,“ *International Journal of Molecular Sciences*, Jg. 15, S. 1812–1825, 2 2014, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms15021812.
- [28] V. Mamaeva u. a., „Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, Jg. 65, S. 689–702, 5 2013, ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2012.07.018.
- [29] P. Luisi u. a., Hrsg., *Giant Vesicles*. Wiley Sons, 1999, ISBN: 978-0-471-97986-9.
- [30] K. Jaskiewicz u. a., „Incorporation of nanoparticles into polymersomes: size and concentration effects,“ *ACS Nano*, Jg. 6, S. 7254–62, 8 2012, ISSN: 1936-086X. DOI: 10.1021/nn302367m.
- [31] O. L. Bihan u. a., „Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome,“ *Journal of Structural Biology*, Jg. 168, S. 419–425, 3 2009, ISSN: 10478477. DOI: 10.1016/j.jsb.2009.07.006.
- [32] F. G. Strobl u. a., „Intake of Silica Nanoparticles by Giant Lipid Vesicles : Influence of Particle Size and Thermodynamic Membrane State,“ *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Jg. 5, S. 2468–78, 2014, ISSN: 21904286. DOI: 10.3762/bjnano.5.256.
- [33] R. Michel u. a., „Experimental aspects of colloidal interactions in mixed systems of liposome and inorganic nanoparticle and their applications,“ *International journal of molecular sciences*, Jg. 13, S. 11 610–42, 9 2012, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms130911610.
- [34] R. Michel, *Liposomes in Contact and Interacting with Silica Nanoparticles: From Decorated Vesicles to Internalized Particles*. Cuvillier Verlag, 2013.
- [35] R. Michel u. a., „Internalization of Silica Nanoparticles into Fluid Liposomes: Formation of Interesting Hybrid Colloids,“ *Angewandte Chemie*, Jg. 126, S. 12 649–12 653, 46 2014, ISSN: 1521-3773. DOI: 10.1002/ange.201406927.
- [36] J. Lin u. a., „Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles : Insights into Cellular Uptake, cytotoxicity, and their relationship,“ *ACS nano*, Jg. 4, S. 5421–5429, 9 2010.
- [37] J. Lin u. a., „Cell membranes open "doors"for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics,“ *ACS nano*, Jg. 7, S. 10 799–808, 12 2013, ISSN: 1936-086X. DOI: 10.1021/nn4040553.

- [38] Y. Roiter u. a., „Interaction of nanoparticles with lipid membrane,“ *Nano Letters*, Jg. 8, S. 941–4, 3 2008, ISSN: 1530-6984. DOI: 10.1021/nl0800801.
- [39] A. Verma u. a., „Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles,“ *Nature Mat.*, Jg. 7, S. 588–95, 7 2008, ISSN: 1476-1122. DOI: 10.1038/nmat2202.
- [40] F. G. Strobl u. a., „Ion controlled passive nanoparticle uptake in lipid vesicles in theory and experiment,“ *Journal of Physics D: Applied Physics*, Jg. 52, 29 2019, ISSN: 13616463. DOI: 10.1088/1361-6463/ab1994.
- [41] R Lipowsky u. a., „Vesicles in contact with nanoparticles and colloids,“ *Europhysics Letters (EPL)*, Jg. 43, S. 219–225, 2 1998, ISSN: 0295-5075. DOI: 10.1209/epl/i1998-00343-4.
- [42] B. D. Chithrani u. a., „Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes,“ *Nano Letters*, Jg. 7, S. 1542–1550, 6 2007.
- [43] B. D. Chithrani u. a., „Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells,“ *Nano Letters*, Jg. 6, S. 662–668, 4 2006.
- [44] F. Osaki u. a., „A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake . On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region,“ *J. Am. Chem. Soc.*, Jg. 126, S. 6520–6521, 2004.
- [45] M. Desai u. a., „The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells is Size Dependent,“ *Pharmaceutical research*, Jg. 14, S. 1586–1573, 11 1997.
- [46] C. Dietrich u. a., „Adhesion of Latex Spheres to Giant Phospholipid Vesicles: Statics and Dynamics,“ *Journal de Physique II*, Jg. 7, S. 1651–1682, 11 1997, ISSN: 1155-4312. DOI: 10.1051/jp2:1997208.
- [47] M. Deserno u. a., „Adhesion and Wrapping in Colloid Vesicle Complexes,“ *The Journal of Physical Chemistry B*, Jg. 106, S. 5543–5552, 21 2002, ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp0138476.
- [48] M. Deserno, „Wrapping of a spherical colloid by a fluid membrane Related content When do fluid membranes engulf sticky colloids?“ *Europhys. Lett.*, Jg. 62, S. 767–773, 5 2003.
- [49] T. H. Anderson u. a., „Formation of supported bilayers on silica substrates,“ *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, Jg. 25, S. 6997–7005, 12 2009, ISSN: 0743-7463. DOI: 10.1021/1a900181c.
- [50] J Gregory, „Interaction of Unequal Double-Layers At Constant Charge,“ *J. Colloid and Interface Sci.*, Jg. 51, 1 1975.

- 
- [51] R. Hogg u. a., „Mutual coagulation of colloidal dispersions,“ *Transactions of the Faraday Society*, Jg. 62, S. 1638, 615 1966, ISSN: 0014-7672. DOI: 10.1039/tf9666201638.
- [52] S. H. Behrens u. a., „Electrostatic Interaction of Colloidal Surfaces with Variable Charge,“ *Journal of Physical Chemistry B*, Jg. 103, S. 2918–2928, 15 1999, ISSN: 15206106. DOI: 10.1021/jp984099w.
- [53] R. Pericet-Camara u. a., „Interaction between charged surfaces on the poisson - Boltzmann level: The constant regulation approximation,“ *Journal of Physical Chemistry B*, Jg. 108, S. 19467–19475, 50 2004, ISSN: 15206106. DOI: 10.1021/jp0473063.
- [54] I. Popa u. a., „Importance of charge regulation in attractive double-layer forces between dissimilar surfaces,“ *Physical Review Letters*, Jg. 104, S. 1–4, 22 2010, ISSN: 00319007. DOI: 10.1103/PhysRevLett.104.228301.
- [55] E. Evans u. a., „Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes,“ *Biophysical journal*, Jg. 85, S. 2342–2350, 4 2003, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74658-X.
- [56] S. A. Akimov u. a., „Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore,“ *Scientific reports*, Jg. 7, S. 12152, 1 2017, ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-12127-7.
- [57] S. A. Akimov u. a., „Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress,“ *Scientific Reports*, Jg. 7, S. 12509, 1 2017, ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-12749-x.
- [58] I. Anas, „What are the true values of the bending modulus of simple lipid bilayers?“, *Chem Phys. Lipids*, Jg. 20, S. 113–130, 5 2015, ISSN: 17381460. DOI: 10.1016.
- [59] W Rawicz u. a., „Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers,“ *Biophysical journal*, Jg. 79, S. 328–339, 1 2000, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76295-3.
- [60] J. F. Nagle u. a., „Temperature Dependence of Structure , Bending Rigidity , and Bilayer Interactions of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers,“ *Biophysical Journal*, Jg. 94, S. 117–124, 1 2008, ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1529/biophysj.107.115691.
- [61] W. Hanke u. a., *Planar Lipid Bilayers*. Elsevier, 1993. DOI: 10.1016/c2009-0-03331-5.
- [62] B. Wunderlich, „Role of thermodynamics for the pore formation in membranes,“ *Universität Augsburg*, 2007.

- [63] C. G. Wittmann u. a., „Ionic Strength and the Supporting Material Strongly Influence the Adhesion of Silica to Supported Lipid Bilayers,“ *Advanced Biosystems*, Jg. 2, S. 1800087, 8 2018, ISSN: 23667478. DOI: 10.1002/adbi.201800087.
- [64] T. Hamada u. a., „Size-dependent partitioning of nano/microparticles mediated by membrane lateral heterogeneity,“ *J. Am. Chem. Soc.*, Jg. 134, S. 13990–6, 34 2012, ISSN: 1520-5126. DOI: 10.1021/ja301264v.
- [65] K. J. Seu u. a., „Effect of surface treatment on diffusion and domain formation in supported lipid bilayers,“ *Biophysical Journal*, Jg. 92, S. 2445–2450, 7 2007, ISSN: 00063495. DOI: 10.1529/biophysj.106.099721.
- [66] T. E. Starr u. a., „Formation and Characterization of Planar Phospholipid Bilayers Supported on TiO<sub>2</sub> and SrTiO<sub>3</sub> Single Crystals,“ *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, Jg. 75, S. 10301–10308, 33 2000.
- [67] M. Tanaka u. a., „Polymer-supported membranes as models of the cell surface,“ *Nature*, Jg. 437, S. 21–23, September 2005. DOI: 10.1038/nature04164.
- [68] R. Tero, „Substrate Effects on the Formation Process, Structure and Physicochemical Properties of Supported Lipid Bilayers,“ *Materials*, Jg. 5, S. 2658–2680, 12 2012. DOI: 10.3390/ma5122658.
- [69] B. A. Todd u. a., „Probing the limits of the Derjaguin approximation with scanning force microscopy,“ *Langmuir*, Jg. 20, S. 4892–4897, 12 2004, ISSN: 07437463. DOI: 10.1021/1a035235d.
- [70] S. Rentsch u. a., „Probing the validity of the Derjaguin approximation for heterogeneous colloidal particles,“ *Physical Chemistry Chemical Physics*, Jg. 8, S. 2531–2538, 21 2006, ISSN: 14639076. DOI: 10.1039/b602145j.
- [71] M. I. Angelova u. a., „Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications,“ *Trends in Colloid and Interface Science VI*, Jg. 89, C Helm u. a., Hrsg., S. 127–131, 1992, ISSN: 0340255X. DOI: 10.1007/BFb0116295.
- [72] J. Blechinger u. a., „Perylene-Labeled Silica Nanoparticles: Synthesis and Characterization of Three Novel Silica Nanoparticle Species for Live-Cell Imaging,“ *Small*, Jg. 6, S. 2427–2435, 21 2010, ISSN: 1613-6829. DOI: 10.1002/sm11.201000762.
- [73] M. Deserno, „When do fluid membranes engulf sticky colloids?“, *J. Phys. Cond. Matter*, Jg. 16, S2061–S2070, 22 2004, ISSN: 0953-8984. DOI: 10.1088/0953-8984/16/22/004.

- 
- [74] K. C. Melikov u. a., „Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer,“ *Biophysical Journal*, Jg. 80, S. 1829–1836, 4 2001, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76153-X.
- [75] O. Sandre u. a., „Dynamics of transient pores in stretched vesicles,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 96, S. 10591–10596, 19 1999, ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.96.19.10591.
- [76] E. Karatekin u. a., „Transient pores in vesicles,“ *Polymer International*, Jg. 52, S. 486–493, 4 2003, ISSN: 0959-8103. DOI: 10.1002/pi.1007.
- [77] D. V. Zhelev u. a., „Tension-stabilized pores in giant vesicles : determination of pore size and pore line tension,“ *Jg. 1147*, S. 89–104, 1993.
- [78] F. Brochard-Wyart u. a., „Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out,“ *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, Jg. 278, S. 32–51, 1 2000, ISSN: 03784371. DOI: 10.1016/S0378-4371(99)00559-2.
- [79] W. Harbich u. a., „Alignment and Opening of Giant Lecithin Vesicles by Electric Fields,“ *Zeitschrift für Naturforschung - Section A Journal of Physical Sciences*, Jg. 34, S. 1063–1065, 9 1979, ISSN: 18657109. DOI: 10.1515/zna-1979-0905.
- [80] T. Portet u. a., „A new method for measuring edge tensions and stability of lipid bilayers: Effect of membrane composition,“ *Biophysical Journal*, Jg. 99, S. 3264–3273, 10 2010, ISSN: 15420086. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.09.032.
- [81] E. Evans u. a., „Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes,“ *Physical Review Letters*, Jg. 64, 17 1990.
- [82] I. Ripa u. a., „Membrane Rafts: Portals for Viral Entry,“ *Frontiers in Microbiology*, Jg. 12, 2021, ISSN: 1664302X. DOI: 10.3389/fmicb.2021.631274.
- [83] D. Czubak, „Transport von Nanopartikeln durch Lipidmembranen,“ Universität Augsburg, 2014.
- [84] C. Westerhausen, „On the role of soft interfaces for the understanding of blood clotting,“ Universität Augsburg, 2012.
- [85] C. Westerhausen u. a., „Chemical and mechanical impact of silica nanoparticles on the phase transition behavior of phospholipid membranes in theory and experiment,“ *Biophysical Journal*, Jg. 102, S. 1032–1038, 5 2012, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.004.

- [86] C. Naumann u. a., „Phase transition behavior of single phosphatidylcholine bilayers on a solid spherical support studied by DSC, NMR and FT-IR,“ *Biophys. J.*, Jg. 63, S. 1314–1319, 1992.
- [87] T. Brumm u. a., „The effect of increasing membrane curvature on the phase transition and mixing behavior of a dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/ distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid mixture as studied by fourier transform infrared spectroscopy and,“ *Biophysical Journal*, Jg. 70, S. 1373–1379, 3 1996, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79695-9.
- [88] S. Ahmed u. a., „Effect of High Surface Curvature on the Main Phase Transition of Supported Phospholipid Bilayers on SiO<sub>2</sub> Nanoparticles,“ *Langmuir*, Jg. 25, S. 3682–3691, 6 2009, doi: 10.1021/la803630m, ISSN: 0743-7463.
- [89] A. Kamenac u. a., „Phase-State Dependent Silica Nanoparticle Uptake of Giant Unilamellar Vesicles,“ *Scientific Reports*, DOI: 10.21203/rs.3.rs-754056/v1.
- [90] W. Helfrich u. a., „Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes,“ *Il Nuovo Cimento D*, Jg. 3, S. 137–151, 1 1984, ISSN: 0392-6737. DOI: 10.1007/BF02452208.
- [91] O. Betzer u. a., „Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells,“ *Nano Letters*, Jg. 19, S. 662–668, 1 2009, ISSN: 15306984. DOI: 10.1002/adma.200801393. **Size-Dependent.**
- [92] L. Shang u. a., „Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters,“ *Journal of nanobiotechnology*, Jg. 12, S. 5, 1 2014, ISSN: 1477-3155. DOI: 10.1186/1477-3155-12-5.
- [93] S. Zhang u. a., „Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis,“ *ACS Nano*, Jg. 9, S. 8655–8671, 9 2015, ISSN: 1936086X. DOI: 10.1021/acsnano.5b03184.
- [94] E. Rascol u. a., „The relevance of membrane models to understand nanoparticles–cell membrane interactions,“ *Nanoscale*, Jg. 8, S. 4780–4798, 9 2016, ISSN: 2040-3364. DOI: 10.1039/C5NR07954C.
- [95] C. Fillafer u. a., „Cell Surface Deformation during an Action Potential,“ *Biophysical Journal*, Jg. 114, S. 410–418, 2 2018, ISSN: 15420086. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.3776.
- [96] R. Wayne, „The excitability of plant cells: With a special emphasis on characean internodal cells,“ *The Botanical Review*, Jg. 60, S. 265–367, 3 1994, ISSN: 00068101. DOI: 10.1007/BF02960261.

- 
- [97] I Tasaki, „A macromolecular approach to excitation phenomena: mechanical and thermal changes in nerve during excitation,“ *Physiological chemistry and physics and medical NMR*, Jg. 20, S. 251–68, 4 1988, ISSN: 0748-6642.
- [98] I. Tasaki, „Evidence for phase transition in nerve fibers, cells and synapses,“ *Ferroelectrics*, Jg. 220, S. 305–316, 1999, ISSN: 0015-0193. DOI: 10.1080/00150199908216221.
- [99] A. L. Hodgkin u. a., „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve,“ *The Journal of physiology*, Jg. 117, S. 500–44, 4 1952, ISSN: 0022-3751.
- [100] K. Kaufmann, *Action potentials and electromechanical coupling in the macroscopic chiral phospholipid bilayer*. 1989.
- [101] M. Mussel u. a., „It sounds like an action potential: Unification of electrical, chemical and mechanical aspects of acoustic pulses in lipids,“ *Journal of the Royal Society Interface*, Jg. 16, 151 2019, ISSN: 17425662. DOI: 10.1098/rsif.2018.0743.
- [102] C. Fillafer u. a., „The living state: How cellular excitability is controlled by the thermodynamic state of the membrane,“ *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Jg. 162, S. 57–68, 2021, ISSN: 00796107. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2020.10.003.
- [103] J. Griesbauer u. a., „Simultaneously propagating voltage and pressure pulses in lipid monolayers of pork brain and synthetic lipids,“ *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, Jg. 86, S. 061909, 6 2012, ISSN: 15393755. DOI: 10.1103/PhysRevE.86.061909.
- [104] S. Shrivastava u. a., „Solitary shock waves and adiabatic phase transition in lipid interfaces and nerves,“ *Physical Review E*, Jg. 91, S. 012715, 1 2015, ISSN: 1539-3755. DOI: 10.1103/PhysRevE.91.012715.
- [105] H. Trauble u. a., „Electrostatic Effects on Lipid Phase Transitions: Membrane Structure and Ionic Environment (triggering factors/cation binding/pH-dependence/ionic strength/double layer energy),“ 1974, S. 214–219.
- [106] R. Haussmann u. a., „Correct treatment of mood disorders with lithium,“ *Der Nervenarzt*, Jg. 88, S. 1323–1334, 2017.
- [107] H. Lühring, „Algen unter strom: Das experiment,“ *Biologie in Unserer Zeit*, Jg. 36, S. 313–321, 5 2006, ISSN: 1521415X. DOI: 10.1002/biuz.200610311.

- [108] R. FitzHugh, „Mathematical models of threshold phenomena in the nerve membrane,“ *The bulletin of mathematical biophysics*, Jg. 17, S. 257–278, 4 1955, ISSN: 00074985. DOI: 10.1007/BF02477753.
- [109] R. FitzHugh, „Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane,“ *Biophysical Journal*, Jg. 1, S. 445–466, 6 1961, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(61)86902-6.
- [110] J. Nagumo u. a., „An Active Pulse Transmission Line Simulating Nerve Axon,“ *Proceedings of the IRE*, Jg. 50, S. 2061–2070, 10 1962, ISSN: 00968390. DOI: 10.1109/JRPROC.1962.288235.
- [111] J. C. Owicki u. a., „Theoretical study of protein-lipid interactions in bilayer membranes,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 75, S. 1616–1619, 4 1978, ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/pnas.75.4.1616.
- [112] J. D. Murray, „Interactive module for FitzHugh-Nagumo model,“ 2022, [www.johndmurray.org/materials/teaching/fitzhugh-nagumo.py](http://www.johndmurray.org/materials/teaching/fitzhugh-nagumo.py) (22/01/16).
- [113] S. Bössinger, „Coupling the thermodynamic state with the dynamics of lipid interface layers - and its possible role for biology,“ Universität Augsburg, 2012.
- [114] F. G. Strobl u. a., „A surface acoustic wave-driven micropump for particle uptake investigation under physiological flow conditions in very small volumes,“ *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014.
- [115] S. Silbernagl u. a., *Taschenatlas Pathophysiologie*, 8. Aufl. Thieme, 2012, ISBN: 9783131021939.
- [116] P. F. Davies u. a., „Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells,“ *Journal of Clinical Investigation*, Jg. 73, S. 1121–1129, 4 1984, ISSN: 00219738. DOI: 10.1172/JCI111298.
- [117] G. Apodaca, „Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli,“ *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, Jg. 282, 2 51-2 2002, ISSN: 03636127. DOI: 10.1152/ajprenal.2002.282.2.f179.
- [118] S. P. Samuel u. a., „Multifactorial determinants that govern nanoparticle uptake by human endothelial cells under flow,“ *International Journal of Nanomedicine*, Jg. 7, S. 2943–2956, June 2014 2012, ISSN: 11769114. DOI: 10.2147/IJN.S30624.
- [119] A. J. Goldman u. a., „Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-II Couette flow,“ *Chemical Engineering Science*, Jg. 22, S. 653–660, 4 1967, ISSN: 00092509. DOI: 10.1016/0009-2509(67)80048-4.

- 
- [120] P. Bongrand, „Ligand-Receptor Interactions,“ *Reports on Progress in Physics*, Jg. 62, S. 921–968, 1999. DOI: 10.1088/0034-4885/62/6/202.
- [121] T. D. Luong u. a., „Surface Acoustic Wave Driven Microfluidics – A Review,“ *Micro and Nanosystems*, Jg. 2, S. 217–225, 3 2010, ISSN: 18764029. DOI: 10.2174/1876402911002030217.
- [122] J. Friend u. a., „Microscale acoustofluidics: Microfluidics driven via acoustics and ultrasonics,“ *Reviews of Modern Physics*, Jg. 83, S. 647–704, 2 2011, ISSN: 00346861. DOI: 10.1103/RevModPhys.83.647.
- [123] C. Fillafer u. a., „An acoustically-driven biochip - Impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers,“ *Lab on a Chip*, Jg. 9, S. 2782–2788, 19 2009, ISSN: 14730189. DOI: 10.1039/b906006e.
- [124] A. Hartmann u. a., „A novel tool for dynamic cell adhesion studies - the De-Adhesion Number Investigator DANI,“ *Lab on a chip*, Jg. 14, S. 542–6, 3 2014, ISSN: 1473-0189. DOI: 10.1039/c31c50916h.
- [125] A. Wixforth, „Acoustically driven planar microfluidics,“ *Superlattices and Microstructures*, Jg. 33, S. 389–396, 5-6 2003, ISSN: 07496036. DOI: 10.1016/j.spmi.2004.02.015.
- [126] S. J. Lighthill, „Acoustic streaming,“ *Journal of Sound and Vibration*, Jg. 61, S. 391–418, 3 1978, ISSN: 10958568. DOI: 10.1016/0022-460X(78)90388-7.
- [127] R. Singh u. a., „Focused Inter-Digital Transducers in a Surface Acoustic Wave Device : Fluid-Structure Interaction Study,“ 2009, S. 538–541, ISBN: 9781424453351.
- [128] W. Thielicke u. a., „PIVlab - Time-Resolved Digital Particle Image Velocimetry Tool for MATLAB,“ 2005. DOI: 10.6084/M9.FIGSHARE.1092508.V5.
- [129] K. Sritharan u. a., „Acoustic mixing at low Reynold’s numbers,“ *Applied Physics Letters*, Jg. 88, S. 054102, 5 2006, ISSN: 00036951. DOI: 10.1063/1.2171482.
- [130] R. Herrmann u. a., „Synthesis and characterization of fluorescence-labelled silica core-shell and noble metal-decorated ceria nanoparticles,“ *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Jg. 5, S. 2413–2423, 1 2014, ISSN: 21904286. DOI: 10.3762/bjnano.5.251.
- [131] A. A. Torrano u. a., „Cell membrane penetration and mitochondrial targeting by platinum-decorated ceria nanoparticles,“ *Nanoscale*, Jg. 8, S. 13352–13367, 27 2016, ISSN: 20403372. DOI: 10.1039/c5nr08419a.

- [132] A. A. Torrano u. a., „Precise quantification of silica and ceria nanoparticle uptake revealed by 3D fluorescence microscopy,“ *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Jg. 5, S. 1616–1624, 1 2014, ISSN: 21904286. DOI: 10.3762/bjnano.5.173.
- [133] A. A. Torrano u. a., „A fast analysis method to quantify nanoparticle uptake on a single cell level,“ *Nanomedicine*, Jg. 8, S. 1815–1828, 11 2013, ISSN: 17486963. DOI: 10.2217/nmm.12.178.

## A. Anhang

## A.1. Experimentelle Details

### A.1.1. Herstellung von Riesenvesikeln

Die in dieser Arbeit verwendeten Riesenvesikel wurden nach dem Verfahren der Elektroformierung hergestellt, die erstmals in [71] beschrieben wurde. Dabei wird eine dünne Schicht der gewünschten Lipidmischung auf zwei elektrisch leitende Oberflächen aufgebracht, die zu einer Kammer zusammengefügt und mit dem gewünschten internen Medium befüllt werden. An den so gebildeten Kondensator wird eine kleine Wechselspannung angelegt, die die Bildung von unilamellaren Strukturen begünstigt. Dieses Verfahren ermöglicht damit die Herstellung von GUV auch für zwitterionische Lipide, bei denen keine spontane Bildung von GUV stattfindet. Das konkrete in dieser Arbeit verwendete Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

1. Lipide und ggf. Fluoreszenzfarbstoffe werden im gewünschten Mengenverhältnis in Chloroform gelöst. Typischerweise wird eine Gesamtkonzentration von **1 mg/ml** angestrebt.
2. Zwei mit fluordotiertem Zinnoxid (FTO) beschichtete Glasblättchen werden gründlich mit Wasser, Isopropanol und Chloroform gereinigt. Alle weiteren Hilfsmittel werden ebenfalls immer gründlich gereinigt!
3. **5  $\mu$ l** der Lipidlösung werden auf den FTO-Blättchen ausgestrichen und zunächst im  $N_2$ -Strom getrocknet. Um alle Lösemittelreste zuverlässig zu beseitigen, erfolgt eine weitere Trocknung im Exsikkator bei einem Maximaldruck von  **$1 \times 10^{-2}$  mbar** für eine Dauer von mindestens **3 h**. Dieser Schritt ist extrem wichtig, da auch kleinste Lösungsmittelreste die thermodynamischen Eigenschaften von Lipidmembranen beeinflussen.
4. Beide Blättchen werden zusammen mit einem Rahmen aus PTFE (Höhe **3 mm**) zu einer geschlossenen Kammer verpresst, die lediglich zwei kleine Zugänge für die Befüllung aufweist. Beide FTO-Schichten werden mit Kontaktklammern elektrisch kontaktiert.
5. Die Kammer wird nun vorsichtig mit dem internen Medium befüllt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde hier **150 mM** Glucoselösung verwendet. Deren Herstellung erfolgte aus  $D^+$ -Glucosemonohydrat (Merck, Deutschland) und Reinstwasser (pureAqua, Deutschland) mit einem spezifischen Widerstand von  $\geq$  **18 M $\Omega$ cm**. Um späteren osmotischen Stress zu vermeiden ist es wichtig, den effektiven osmotischen Druck genau zu erfassen. Die Kontrolle erfolgte hier mit einem Osmomat 030 (Gonotec, Deutschland).
6. Die Kammer wird über einem Wasserbad auf  $T \approx T^* + 5K$  temperiert, wobei  $T^*$  die Phasenübergangstemperatur der Lipidmischung unter

den gegebenen Bedingungen bezeichnet. An die FTO-Schichten der Gläser wird eine Sinus-Spannung mit einer Frequenz  $f = 10 \text{ Hz}$  und eine Spannung  $V_p = 1,8 \text{ V}$ , bzw. einer Feldstärke von  $E_p = 0,6 \text{ V/mm}$  angelegt. Die Spannung wird dabei zunächst über eine Stunde in  $0,5 \text{ V}$ -Schritten erhöht. Die Bedingungen werden dann typischerweise über Nacht, mindestens jedoch  $4 \text{ h}$  gehalten. Abschließend kann die Frequenz für eine weitere Phase von  $30 \text{ min}$  auf  $3 \text{ Hz}$  reduziert werden, um noch an der Oberfläche anhaftende Vesikel abzulösen.

7. Nach Entfernung der Spannungsquelle und langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Vesikel-Suspension vorsichtig mit einer Eppendorff-Pipette aus der Kammer entnommen. Dabei ist es von größter Wichtigkeit, keine hohen Scherkräfte wirken zu lassen, indem die Entnahme langsam und mit gekürzter Pipettenspitze erfolgt!
8. Die Lösung kann für wenige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, sollte aber vor der Benutzung lichtmikroskopisch auf die Beschaffenheit der GUVs hin untersucht werden.

#### **A.1.2. Herstellung von Nanopartikelsuspensionen für Aufnahmeexperimente**

Die Partikelsuspensionen, die als externes Medium für Aufnahmeuntersuchungen verwendet wurden, wurden nach folgendem Verfahren hergestellt:

1. Die verwendeten Partikel sind in Tabelle A.2.2 gelistet. Die Partikel werden zunächst mehrfach in Reinstwasser dispergiert, abzentrifugiert und redispersiert. Der Überstand wird jeweils ausgetauscht, um eventuelle Verunreinigungen in der Flüssigen Phase zu beseitigen. Die Konzentration wird durch abwiegen der Partikel bestimmt und so eingestellt, dass sie mindestens eine Größenordnung oberhalb der im Experiment gewünschten Endkonzentration liegt.
2. Eine  $15 \text{ mM}$  Pufferlösung von HEPES-Na-Salz sowie den gewünschten Menge NaCl und Partikelsuspension wird hergestellt. (Anmerkung: In den ersten qualitativen Experimenten mit fluoreszierenden Partikeln wurde Phosphatpuffer anstelle von HEPES eingesetzt.)
3. Die Osmolarität der Pufferlösungen wird durch die Zugabe von Glucose auf den Wert der entsprechenden oben beschriebenen Vesikelsuspension angepasst. Der Osmolaritätsunterschied wird dabei auf maximal  $1 \%$  beschränkt, um osmotischen Stress der Vesikelmembran zu verhindern.
4. Suspensionen mit neuer Zusammensetzung wurden vor Ihrer Verwendung grundsätzlich auf Ihre kolloidale Stabilität sowohl unter experimentellen Bedingungen als auch unter Lagerbedingungen geprüft. Hierfür

wurden nach verschiedenen Lagerzeiten DLS-Messungen (dynamic light scattering) durchgeführt. Dazu wurde ein 90Plus Particle Analyzer von Brookhaven Instruments verwendet.

### **A.1.3. Herstellung von beschichteten Deckgläsern**

Um die Wechselwirkung zwischen Kammerboden und darauf liegenden Vesikeln so gering wie möglich zu halten, wurden die verwendeten Deckgläser mit einer Agaroseschicht beschichtet, deren sterischen Eigenschaften einen direkten Kontakt zur Glasoberfläche verhindern und so die Wechselwirkung auf ein Minimum reduzieren.

1. Die Deckgläser werden zunächst mit Aceton, Isopropanol und Reinstwasser gründlich gereinigt. Etwaige organische Rückstände werden abschließend mittels  $O_2$ -Plasma entfernt. Diese Behandlung reduziert darüber hinaus die Oberflächenspannung für die spätere Beschichtung. Die Plasmabehandlung sollte daher kurz vor der Beschichtung erfolgen.
2. Eine Agarose-Lösung mit einer Konzentration von **25 mg/ml** wird hergestellt, wobei die Agarose hierfür in knapp siedendem Reinstwasser vollständig gelöst wird.
3. Die noch heiße Lösung wird mittels Spincoater auf die vorbereiteten Gläser bei **1000 rpm** aufgeschleudert.
4. Die Gläser werden abschließend für wenige Minuten auf einer Heizplatte bei **60 °C** getrocknet und sind damit für die spätere Verwendung bereit. Die getrocknete Agaroseschicht sollte nach Befüllung der Kammer noch einige Minuten Zeit zur Quellung haben.

### **A.1.4. Herstellung von AFM-Cantilevern mit Silica-Mikrokugel**

Für die Untersuchung der Adhäsion zwischen Silica und Lipidmembranen können spitzenlose AFM-Cantilever mit Silica-Mikrokugeln versehen werden, die dann als Kontaktfläche dienen. Folgende Materialien wurden verwendet:

- Cantilever des Typs MLCT-O10 (Bruker AFM probes, Camarillo, USA). Für die obigen Experimente wurden, je nach zu erwartenden Kräften, Cantilever mit Federhärten von **0,03 Nm<sup>-1</sup>** bzw. **0,1 Nm<sup>-1</sup>** verwendet.
- Silica-Mikrokugeln mit einem Durchmesser von  $d = 7 \pm 0,2 \mu\text{m}$  (micro-Particles GmbH, Berlin, Deutschland)
- UV-härtender Klebstoff BONDIC (VIKO UG, München, Deutschland)

Ein kleiner Tropfen verdünnte Partikelsuspension wird auf einen Glasobjektträger aufgegeben und getrocknet, sodass einzelne Partikel auf der Glasoberfläche auffindbar sind. In unmittelbarer Nähe wird ein kleiner Tropfen des Klebers platziert. Nun wird die Cantilever-Spitze mit der AFM-Stage vorsichtig in Kontakt mit dem Tropfen gebracht, sodass eine möglichst kleine Klebstoffmenge aufgenommen wird. Nun wird eine Silica-Kugel aufgenommen und der Cantilever von der Oberfläche entfernt. Der Klebstoff wird sodann für 1 h unter UV-Strahlung ausgehärtet.

## A.2. Materialien

### A.2.1. Verwendete Lipide und andere Chemikalien

Alle verwendeten Lipide wurden bei Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) erworben. Die folgende Tabelle führt die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen, sowie die wissenschaftlichen Bezeichnungen und die jeweilige Phasenübergangstemperatur laut Hersteller auf:

Abkürzungen	Langname	$T^*$ (°C)
18:1PC (DOPC)	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	-17
20:0PC	1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	66
16:0PC (DPPC)	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	41
14:0PC (DMPC)	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	24
13:0PC	1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	14

Weiterhin spielten folgende Substanzen eine wichtige Rolle bei den Versuchen:

Abkürzungen	Langname	Bezugsquelle
DiOC <sub>14</sub>	3,3'-ditetradecylcycloxacarbocyanin	Biotum Inc. (Hayward, USA)
Sucrose	Saccharose	Merck (Darmstadt, Germany)
Glucose	D <sup>+</sup> -Glukosemonohydrat	Merck (Darmstadt, Germany)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure-Natriumsalz	Merck (Darmstadt, Germany)

### A.2.2. Verwendete Nanopartikel

Für quantitative Versuche zur Auswertung der Aufnahmezeit wurden käufliche amorphe Silica-Nanopartikel von nanoComposix (Prag, Tschechien) ohne Fluoreszenzlabel verwendet:

Abkürzung	Radius (nm)	$\zeta$ -Potential (mV)
20 nm	11,4 ± 2,8	-16,1
50 nm	24,1 ± 5,3	-53,2
60 nm	28,9 ± 3,5	-44,7
80 nm	41,3 ± 4,7	-32,7
140 nm	71,2 ± 8,1	-42,6

Für qualitative Versuche, in denen die Partikel sichtbar sein sollten, wurden angepasste fluoreszenzmarkierte Partikel hergestellt und charakterisiert [72]. Die Herstellung der Partikel erfolgte durch Rudolf Herrmann, die Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit.

Abkürzung	Radius (nm)	$\zeta$ -Potential (mV)	Fluoreszenzmarker
WMIT0.7R	9 ± 2	-27 ± 10	Perylen
WMIT1.0R	32 ± 3	-45 ± 12	Perylen
CD70	42 ± 10	-52 ± 18	Cy <sub>3</sub>
WMIT3.0R	115 ± 10	-50 ± 8	Perylen

### A.3. Vergleich der Auswirkung von Protonen und zweiwertigen Kationen auf anionische Membranen

Um die Auswirkung von Protonen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf anionische Lipidmembranen zu vergleichen wurden Versuche mit Lipidmonolagen auf der Filmwaage durchgeführt. Aus den Ableitungen der erhaltenen Isothermen wurden die Kompressibilitäten der Monolage bestimmt. Als Modellsystem diente eine Mischung von DPPC und DMPS (anionisch) im Verhältnis 80/20. Abbildung A.1 zeigt, dass die kondensierende Wirkung von Protonen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei gleicher Konzentration vergleichbar ist.

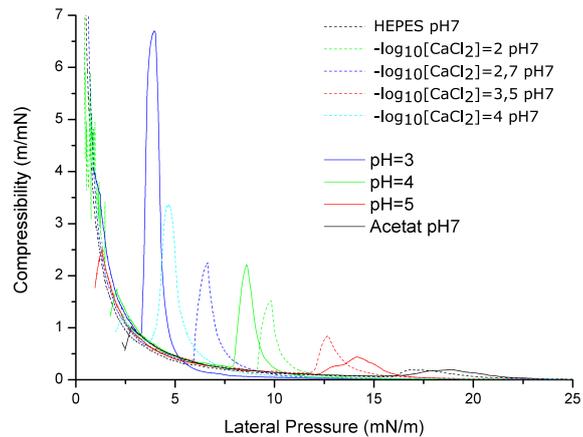


Abbildung A.1. Kompressibilitäten von DPPC/DMPS-Monolagen als Funktion des Oberflächendrucks für verschiedene Konzentrationen von Protonen (pH) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

## A.4. Simulation

### A.4.1. Beispiel Simulationsergebnis

Bei der Wahl ausreichend langer Simulationszeit kann auch die zeitliche Entwicklung eines individuellen Vesikels simuliert werden. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Ergebnisse für eine Langzeit-Simulation für Partikel mit  $r = 11$  nm (siehe Abbildung A.2) und  $r = 100$  nm (siehe Abbildung A.3).

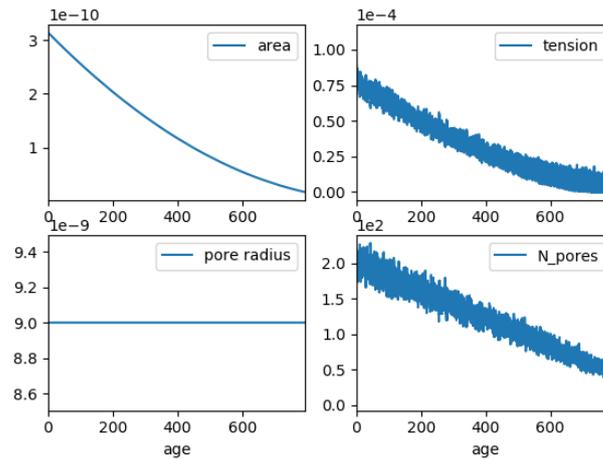


Abbildung A.2. Simulation eines Vesikels bei der Aufnahme von kleinen Partikeln ( $r = 11$  nm). Gezeigt sind die Vesikeloberfläche  $A$ , die Membranspannung  $\sigma$ , die Größe der Poren  $r_p$  und die Anzahl der Poren  $N_p$

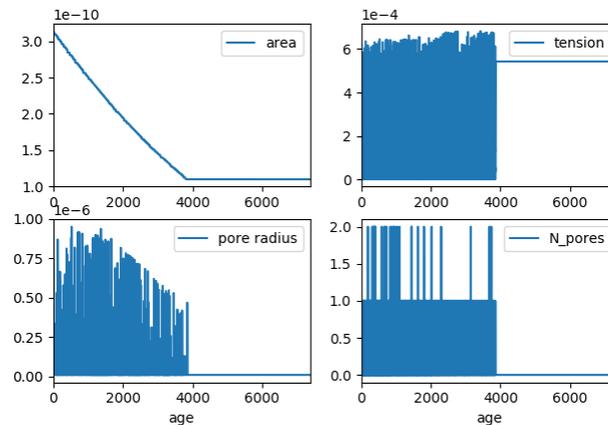


Abbildung A.3. Simulation eines Vesikels bei der Aufnahme von großen Partikeln ( $r = 100$  nm).

Wir beobachten zwei grundlegend unterschiedliche Aufnahmeregime. Kleine Partikel erzeugten viele Poren deren Größe im metastabilen Radius mit  $r_p = 9$  nm

verharrt. die Spannung und Porenanzahl nehmen mit der Schrumpfung des Vesikels ab. Das Vesikel zeigt unlimitierte Aufnahme bis zum theoretischen Endpunkt  $R \rightarrow 0$ . Große Partikel erzeugen hingegen nur wenige Poren, deren Größe durch die Lateralspannung der Membran auf bis zu ( $1 \mu\text{m}$ ) anwachsen kann. Die Spannung fluktuiert dabei stark. Die Schrumpfung des Vesikels und damit die unlimitierte Aufnahme stoppt vor Erreichen des völligen Kollaps, im gezeigten Fall bei  $R \approx 1,7 \mu\text{m}$ . Der Zeitpunkt des Abbruchs schwankt von Simulation zu Simulation jedoch stark.

## A.4.2. Auszüge Quelltext Partikelaufnahme

```

# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Mon Nov 15 21:54:18 2021

@author: fstrobl
"""

import numpy as np
import pandas as pd
import time as time
boltzmann = 1.38e-23 #Boltzmann constant
pi = 3.141592653589793
np.seterr('raise')

class particle_simulation():
    """ Klasse für ein System von Vesikeln und NP """

    def __init__(self,
                 temperature = 300, #temperature (K)
                 solute_viscosity = 1e-3, #viscosity of medium (Pa s)
                 AConcentration = 500, #surface area concentration particles (1/m)
                 kappa=4.0e-20, #membrane bending modulus (J=Nm)
                 KA =0.23, #membrane area elastic modulus (J/m^2)
                 line_tension = 5e-12, #typical line tension of a pore in the lipid membrane (N)
                 surface_viscosity = 3.4e-7, #typical surface viscosity of the used lipid (Ns/m)
                 r=25e-9, #mean particle radius (m)
                 gad=1e-3, #adhesion strength between particle and membrane (J/m^2)
                 density = 2200, #density of the particle material (kg/m^3)
                 rp_meta = 9e-9, #metastable pore radius
                 tau = 0.5, #lifetime of metastable pores
                 Tstep = 0.02,
                 area_access=0,

                 R0= 5e-6 #initial vesicle radius (m)
                 ):
        self.kappa=kappa
        self.gad=gad
        self.KA=KA
        self.solute_viscosity=solute_viscosity
        self.density=density
        self.r=r
        self.r_m=r
        self.r_std=0.1*r
        self.temperature=temperature
        self.Tstep=Tstep
        self.Tstep_max=Tstep
        self.R=R0
        self.diffusion_coefficient = boltzmann*temperature/(6*pi*solute_viscosity*r)
        self.AConcentration=AConcentration
        self.NConcentration = AConcentration/(4*pi*r**2)
        self.SConcentration = AConcentration/(4*pi*r**2) #particle concentration at vesicle surface
        self.start_time=time.time()
        self.line_tension=line_tension
        self.A = 4*pi*self.R**2
        self.V = 4/3*pi*self.R**3
        self.A_lip = self.A #initialize equilibrium membrane area
        self.area_excess = area_access
        self.rp = rp_meta
        self.rp_meta=rp_meta #initial pore radius
        self.surface_viscosity = surface_viscosity
        self.age = 0
        self.N_internalized = 0
        self.N_impacted = 0
        self.sigma=(9.81*162.2*0.15*self.R**2) #surface tension strats with approximated tension due to weight
        self.uptake_probability = 0 #probability of particle uptake
        self.N_pores = 0
        self.time=0
        self.tau=tau

    def tension_eff(self):
        """returns surface tension with regard to area access and obeying Helfrich fluctuations
        Parameters:
        float:KA: lipid elasticity modulus
        float:kappa: bending stiffness
        float:sigma: lateral tension
        float:temperature
        float:A: whole vesicle area
        """

        crossover=self.KA*boltzmann*self.temperature/8/pi/self.kappa
        C=self.KA/(8*pi*self.kappa/boltzmann/self.temperature*np.exp(8*pi*self.kappa/boltzmann/self.temperature*crossover))

        if self.area_excess>0:

```

```

        tension = 0
    elif self.area_excess < crossover:
        tension = C * (np.exp(-8 * pi * self.kappa / boltzmann * self.temperature * self.area_excess) - 1)
    else:
        tension = C * (np.exp(-8 * pi * self.kappa / boltzmann * self.temperature * crossover) - 1) + (self.area_excess - crossover) * self.KA
    return tension

def KAeff(self):
    """returns effective area elasticity modulus float:KAeff with regard to Helfrich fluctuations
    Parameters:
    float:KA: lipid elasticity modulus
    float:kappa: bending stiffness
    float:sigma: lateral tension
    float:temperature
    float:A: whole vesicle area
    """
    KAeff = self.KA / (1 + self.KA * boltzmann * self.temperature / (8 * pi * self.kappa * self.sigma))
    return KAeff

def Deserno1(self):
    test = False
    gad_eff = self.gad - 2 * self.kappa / self.r ** 2
    S = gad_eff / self.KA
    if self.V > 0:
        x = (S / 2 + self.area_excess) / (1 - self.area_excess)
        if x >= 0:
            a = x * (0.5) - x / 3 + (5 / 18) * x ** 1.5
            if (self.r / self.R) < a:
                test = True
            else:
                test = False
        else:
            test = False
    else:
        test = False
    return test

def Boundary_approx(self):
    A = 5.650
    gamma = 0.5772
    s1 = 0.31440354715915003
    s2 = 13826.221737646536
    s = self.sigma * self.r ** 2 / self.kappa

    if s <= s1:
        ba = 2 / (1 + (1 / 8 * (2 * gamma + np.log(((4 + 2 * s) - 4) / 8))) ** -1))
    elif s >= s2:
        ba = 4 - 3 * A ** (2 / 3) * s ** (-1 / 3)
    else:
        ba = 2 / (1 + (1 / 8 * (2 * gamma + np.log(((4 + 2 * s1) - 4) / 8))) ** -1) + ((4 - 3 * A ** (2 / 3) * s2 ** (-1 / 3)) - 2) / (1 + (1 / 8 * (2 * gamma + np.log(((4 + 2 * gamma) - 4) / 8)))

    gad = ba * self.sigma / 2 + 2 * self.kappa / self.r ** 2

    return (gad)

def PartialEnvelopmentBoundary(self):
    """returns the adhesion strength float:gad at which the transition to partial envelopment takes place.
    Parameters:
    float:kappa: bending stiffness
    float:r: particle radius """
    gad = 2 * self.kappa / self.r ** 2
    return gad

def FullEnvelopmentSpinodal(self):
    """returns the Spinodal adhesion strength float:spinodal at which the energy barrier to full envelopment vanishes in the high ten
    Parameters:
    float:r: particle radius
    float:kappa: bending stiffness
    float:sigma: lateral tension"""
    spinodal = 2 * self.kappa / self.r ** 2 + self.sigma / 0.54
    return spinodal

def MaxEnvelopmentBarrier(self):
    """returns the energy barrier float:Maxbarrier to overcome for full envelopment transition at transition boundary
    Parameters:
    float:r: particle radius
    float:kappa: bending stiffness
    float:sigma: lateral tension"""

    if self.sigma <= 0:
        Maxbarrier = 0

    else:

```

```

Maxbarrier=pi*self.kappa/(1/(1.54*(self.sigma*self.r**2/self.kappa)**0.86)+1/(3.5*(self.sigma*self.r**2/self.kappa)**(1/3)))
#
return Maxbarrier

def FullEnvelopmentBoundary(self):
    """returns the adhesion strength float:gad at wich the transition to full envelopment takes place.
    Parameters:
    float:kappa: bending stiffness
    float:r: particle radius
    float:sigma: lateral tension"""
    gad=2*self.kappa/self.r**2+self.sigma
    gad=2*self.kappa/self.r**2+self.sigma
    def Boundary_approx(s):
        A=5.650
        gamma=0.5772
        s1=0.31440354715915003
        s2=13826.221737646536
        if s<s1:
            ba=2/(1+(1/8*(2*gamma+np.log(((4+2*s)-4)/8))**(-1)))
        elif s>s2:
            ba=4-3*A**(2/3)*s**(-1/3)
        else:
            ba=2/(1+(1/8*(2*gamma+np.log(((4+2*s1)-4)/8))**(-1)))+(4-3*A**(2/3)*s**(-1/3))-2/(1+(1/8*(2*gamma+np.log(((4+2*gamma)-4)
        return(ba)
    s=self.sigma*self.r**2/self.kappa
    ba=Boundary_approx(s)
    gad=ba*self.sigma/2+2*self.kappa/self.r**2
    return gad

def FullEnvelopmentBarrier(self):
    """returns the energy barrier float:Ebarrier to overcome for full envelopment transition linearized between Boundary and Spinodal
    Parameters:
    float:r: particle radius
    float:kappa: bending stiffness
    float:sigma: lateral tension"""
    Boundary = self.FullEnvelopmentBoundary() #old
    Spinodal = self.FullEnvelopmentSpinodal()
    MaxEnvelopmentBarrier=self.MaxEnvelopmentBarrier()
    if self.gad >= Boundary and self.gad <= Spinodal:
        Ebarrier = MaxEnvelopmentBarrier*(1-(self.gad-Boundary)/(Spinodal-Boundary))
    elif self.gad > Spinodal:
        Ebarrier = 0
    else:
        Ebarrier = 1
    return Ebarrier

def adjust_Tstep(self):
    relative_rp_change=(self.sigma*self.rp-self.line_tension)/self.surface_viscosity*self.Tstep/self.rp_meta
    if (abs(relative_rp_change) > 0.2 and relative_rp_change > 1) or (abs(relative_rp_change) > 0.2 and self.rp > self.rp_meta):
        self.Tstep=self.Tstep/2
    elif relative_rp_change < 0.1 and self.Tstep < self.Tstep_max:
        self.Tstep=self.Tstep*2
    else:
        self.Tstep = self.Tstep_max

def particle_uptake(self):
    self.r = np.random.normal(self.r_m, self.r_std) #identify particle diameter
    if self.Desernoi()==True:
        self.uptake_probability = 1
    elif self.gad>self.FullEnvelopmentBoundary() and self.r<30e-9:
        self.uptake_probability = np.exp(-self.FullEnvelopmentBarrier()/boltzmann/self.temperature)
    else:
        self.uptake_probability=0
    if self.SConcentration>0:
        N_impact = self.Tstep*np.sqrt(pi*boltzmann*self.temperature*self.SConcentration*(4*pi*self.R**2)/(32*4.0/3.0*pi*self.r**3)
        if N_impact-int(N_impact)>np.random.random():
            N_impact=np.ceil(N_impact)
        else:
            N_impact=np.floor(N_impact)

```

```

self.N_impacted = N_impact

if N_impact*self.uptake_probability-int(N_impact*self.uptake_probability) > np.random.random():
    N_int = np.ceil(N_impact*self.uptake_probability)
else:
    N_int = np.floor(N_impact*self.uptake_probability)

self.N_internalized=N_int
self.N_pores=self.N_pores+N_int

self.V = self.V + N_int*(4/3*pi*self.r**3)
self.R = (3.0/4.0/pi*self.V)**(1.0/3.0)
self.A = 4*pi*self.R**2
self.A_lip = self.A_lip - N_int*(4*pi*self.r**2)
self.area_excess = (self.A_lip + self.N_pores*pi*self.rp**2 - self.A) / self.A_lip
self.sigma = max(self.tension_eff(),(9.81*162.2*0.15*self.R**2))

self.SConcentration = self.SConcentration - N_int/(4*pi*self.R**2*((self.diffusion_coefficient*2*self.Tstep)**0.5+self.r)
else:
    pass

self.SConcentration = self.SConcentration + 4*pi*self.diffusion_coefficient*(self.NConcentration-max(self.SConcentration,0))*

def relaxation(self):
if self.V > 0 and self.N_pores > 0:
    P = 2.0 * self.sigma / self.R
    self.V = self.V - self.Tstep*P/(3*self.solute_viscosity)*self.rp**3*self.N_pores

    self.R = (3.0/4.0/pi*self.V)**(1.0/3.0)
    self.A = 4*pi*self.R**2

    self.area_excess = (self.A_lip + self.N_pores*pi*self.rp**2 - self.A) / self.A_lip

    self.sigma = max(self.tension_eff(),(9.81*162.2*0.15*self.R**2))
    self.rp = max(self.rp+(self.sigma*self.rp-self.line_tension)/self.surface_viscosity*self.Tstep,self.rp_meta)

if self.rp == self.rp_meta:
    rand=np.random.random() for i in range(int(self.N_pores))
    closing_Pores=0

    for i in rand:
        if i<=(1-np.exp(-self.Tstep/self.tau)):
            closing_Pores+=1
        self.N_pores=int(self.N_pores-closing_Pores)

self.area_excess = (self.A_lip + self.N_pores*pi*self.rp**2 - self.A) / self.A_lip
self.sigma = max(self.tension_eff(),(9.81*162.2*0.15*self.R**2))

def simulation(self, simulation_time):
start_time = time.time()
print('starting simulation')
data=pd.DataFrame()
try:
    while time.time() < start_time + simulation_time:
        self.adjust_Tstep()
        self.age=self.age+self.Tstep
        self.particle_uptake()
        self.relaxation()

        if self.V<=0:
            break

        if self.N_pores*self.rp**2*pi >= 0.1*self.A_lip:
            print('PENGL')
            self.V=0
            self.R = (3.0/4.0/pi*self.V)**(1.0/3.0)
            self.A = 4*pi*self.R**2
            break

        data=data.append({'age':self.age, 'area':self.A, 'success ratio':self.uptake_probability, 'tension':self.sigma, 'N_pores'
except Exception as e:
    print(e)

return data

```

## A.4.3. Quelltext FitzHugh-Nagumo

```

# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Tue Feb  1 21:27:39 2022

@author: fstrobl
...
Adapted Script based on "Interactive module for FitzHugh-Nagumo model."
by John D. Murray (john.david.murray@gmail.com)
...

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.widgets import Slider, Button
import matplotlib as mpl

dt = 0.1 # Integration dt

# Define dynamics of of the model

def dyn_fn(xinit, tmax, dt, args): # Integrates trajectory for FitzHugh-Nagumo
    x = np.zeros((int(tmax/dt), len(xinit)))
    x[0] = xinit
    for i in range(1,int(tmax/dt)):
        x[i] = x[i-1] + dt*eqs_fn(x[i-1],args) # Forward Euler
    return x

def eqs_fn(x,args): # Dynamical equations for FitzHugh-Nagumo, returns derivatives
    A1, A2, A3, A4, B1, eps = args[0], args[1], args[2], args[3], args[4], args[5]
    u = x[0]
    w = x[1]
    dudt = -(-w*A1 + A2*u - A3*u**2 + A4*u**3) #A1>0, 0<=u<=1, A2=A2(T-T*),
    dwdt = eps*(-B1*u - w)
    z = np.array([dudt, dwdt])
    return z

def u_nullcline(u, A1,A2,A3, A4):
    return (A2/A1*u - A3/A1*u**2 + A4/A1*u**3)

def w_nullcline(u,B1, eps):
    return -B1*(u)

def potential(u, A1, A2,A3,A4,w):
    return -w*A1*u+A2/2*u**2-A3/3*u**3+A4/4*u**4

# Set plotting properties
params = {'axes.labelsize': 16,
          'font.size': 16,
          'legend.fontsize': 12,
          'xtick.labelsize': 10,
          'ytick.labelsize': 10}
mpl.rcParams.update(params)
mpl.rc('mathtext', fontset='stixsans',default='regular')

# Make figure
fig = plt.figure(figsize=(8,10))
ax = fig.add_axes([.1,.1,.85,.17])
ax1 = fig.add_axes([.1,.300,.425,.280])

```

```

ax2 = fig.add_axes([.1,.620,.425,.280])
ax.set_ylim(-1.5,2.5)
ax1.set_xlim(-2,3)
ax1.set_ylim(-4,4)
ax2.set_xlim(-2,3)
ax2.set_ylim(-4,4)
ax.set_xlabel('Time')
ax.set_ylabel('u or w')
ax1.set_xlabel('u')
ax1.set_ylabel('w')
ax2.set_xlabel('u')
ax2.set_ylabel('G(u)')
axcolor = 'lightgoldenrodyellow'
axsA1 = plt.axes([0.6, 0.85, 0.3, 0.04], facecolor=axcolor)
axsA2 = plt.axes([0.6, 0.8, 0.3, 0.04], facecolor=axcolor)
axsA3 = plt.axes([0.6, 0.75, 0.3, 0.04], facecolor=axcolor)
axsA4 = plt.axes([0.6, 0.7, 0.3, 0.04], facecolor=axcolor)
axsB1 = plt.axes([0.6, 0.6, 0.3, 0.04], facecolor=axcolor)
axseps = plt.axes([0.6, 0.55, 0.3, 0.04], facecolor=axcolor)
axsT = plt.axes([-1,-1,1,1])
axh = plt.axes([-1,-1,1,1])

# Make sliders that control parameters
sA1 = Slider(axsA1, r'$A1$', 0.1, 2.0, valinit=1,color='maroon')
sA2 = Slider(axsA2, r'$A2$', -10.0, 10.0, valinit=0,color='midnightblue')
sA3 = Slider(axsA3, r'$A3$', 0, 5.0, valinit=2,color='midnightblue')
sA4 = Slider(axsA4, r'$A4$', 0, 5.0, valinit=2,color='midnightblue')
sB1 = Slider(axsB1, r'$B1$', 0.01, 5.0, valinit=1,color='midnightblue')
seps = Slider(axseps, r'$\epsilon$', 0.001, 1.0, valinit=0.1,color='k')

sT = Slider(axsT, r'$T$', 0, 200.0, valinit=200,color='k')
sxinit = Slider(axh, 'x', -5,5,valinit=0)
syinit = Slider(axh, 'y', -5,5,valinit=0)
swselect = Slider(axh, 'x', -5,5,valinit=0)

# Plot trajectories and nullclines and potential
l, = ax.plot(0,0, lw=2, color='r',label='u')
lb, = ax.plot(0,0, lw=2, color='b',label='w')
l1 = ax.legend(loc=2,frameon=False)
l1, = ax1.plot(0,0, lw=2, color='k')
us = np.linspace(-2,7,1000)
l1n1, = ax1.plot(us,u_nullcline(us,sA1.val,sA2.val,sA3.val,sA4.val),lw=2,color='r',ls='--',label='u nullcline')
l1n2, = ax1.plot(us,w_nullcline(us,sB1.val,seps.val),lw=2,color='b',ls='--',label='w nullcline')
l1p0, = ax2.plot(us,potential(us,sA1.val,sA2.val,sA3.val,sA4.val, 0),lw=2,color='k',ls='--',label='potential')
l1p, = ax2.plot(us,potential(us,sA1.val,sA2.val,sA3.val,sA4.val, 0),lw=2,color='g',ls='--',label='potential')

# Add figure text
fig.text(.5,.95,'adapted FitzHugh-Nagumo model',ha='center',size=18)
fig.text(.55,.36,r'$\frac{du}{dt} = -( -w A1 + A2 u - A3 u^2 + A4 u^3 )$',size=12,color='r')
fig.text(.55,.33,r'$\frac{dw}{dt} = \epsilon ( B1 u - w )$',size=12,color='b')

# Update initial condition and parameters
def update(val):
    xinit = [sxinit.val,syinit.val]
    wselect = [swselect.val]
    T = sT.val
    A1 = sA1.val
    A2 = sA2.val
    A3 = sA3.val

```

```

A4 = sA4.val
B1 = sB1.val
eps = seps.val
args = (A1, A2, A3, A4, B1, eps)
m = dyn_fn(xinit,T,dt,args)
t = np.arange(0,T,dt)
l.set_xdata(t)
lb.set_xdata(t)
l.set_ydata(m[:,0])
lb.set_ydata(m[:,1])
ax.set_xlim(0,T)
us = np.linspace(-3,3,500)
l1n1.set_xdata(us)
l1n2.set_xdata(us)
l1n1.set_ydata(u_nullcline(us,A1,A2,A3,A4)) # u nullcline
l1n2.set_ydata(w_nullcline(us,B1,eps)) # w nullcline
l1.set_xdata(m[:,0])
l1.set_ydata(m[:,1])
l1p.set_xdata(us)
l1p0.set_xdata(us)
l1p0.set_ydata(potential(us,A1,A2,A3,A4,0))
l1p.set_ydata(potential(us,A1,A2,A3,A4,m[(np.abs(t - wselect)).argmin(),1]))
print((np.abs(t - wselect)).argmin())
plt.draw()
sA1.on_changed(update)
sA2.on_changed(update)
sA3.on_changed(update)
sA4.on_changed(update)
sB1.on_changed(update)
seps.on_changed(update)
sT.on_changed(update)

# Make reset button
resetax = plt.axes([0.8, 0.45, 0.1, 0.04]) # Reset button
button = Button(resetax, 'Reset', color=axcolor, hovercolor='0.975')
def reset(event):
    sA1.reset()
    sA2.reset()
    sA3.reset()
    sA4.reset()
    sB1.reset()
    seps.reset()
    sT.reset()
button.on_clicked(reset)

# Make mouse event to set initial conditions for trajectory
def onpick4(event):
    if event.inaxes == ax1:
        sxinit.val = event.xdata
        syinit.val = event.ydata
        update(0)

def onpick42(event):
    if event.inaxes == ax:
        swselect.val = event.xdata
        print(swselect.val)
        update(0)

fig.canvas.mpl_connect('button_press_event', onpick4)
fig.canvas.mpl_connect('button_press_event', onpick42)
plt.show()

```

## B. Danksagung

Nun bleibt mir noch, den vielen Menschen zu danken, die alle auf ihre Weise mitgeholfen haben, dass ich diese Arbeit nach langer Zeit doch tatsächlich fertigstellen konnte.

**Prof. Dr. Achim Wixforth:** Vielen Dank dafür, dass ich an deinem Lehrstuhl mit extrem großer Freiheit an meinem Thema arbeiten durfte und du jederzeit ein offenes Ohr hattest. Dass ich mich über so lange Zeit auf deine fachliche und moralische Unterstützung bauen konnte, ist alles andere als selbstverständlich und hat letztendlich den Ausschlag gegeben, dass dieses Werk nun doch vollendet wurde. Ganz grundsätzlich kann deine Art „Chef“ zu sein jedem als Vorbild dienen und hat mir jetzt schon des Öfteren geholfen, wenn es um das Thema Personalführung ging. Am EPI arbeiten zu dürfen war ein großes Privileg, an das ich mich immer mit Freude und Wehmut erinnern werde.

**Prof. Matthias Schneider:** Du hast in mir schon während des Studiums die Begeisterung für die Biophysik geweckt. Dein oft unkonventioneller physikalischer Blick auf die Lebenswissenschaften war eine große Bereicherung. Nicht zuletzt die grandiosen Maßbach-Sessions haben dafür gesorgt dass der Spaß dabei nie auf der Strecke blieb. Ich hoffe doch, dass es nach der Pandemiezeit wieder eine Neuauflage mit Externen geben wird? Die endlosen nächtlichen Diskussionen mit dir und Konni zur Biophysik und allen anderen Themen der Welt würde ich ansonsten sehr vermissen. Eine ganz besondere Horizonterweiterung auf vielen Ebenen war natürlich auch die Zeit in deiner Gruppe an der Boston University. Ich hoffe dass mir die gedankliche Freiheit, die ich während meiner Zeit in deiner Gruppe genießen konnte auf Dauer erhalten kann. Herzlichen Dank dafür!

**Dr. Christoph Westerhausen:** Auch du trägst einen großen Anteil daran, dass ich mich schlussendlich doch noch aufrufen konnte, das Kapitel Doktorarbeit abzuschließen. Dein Input während der Zeit am EPI, die Unterstützung bei der Korrektur und die vielen Aufmunterungen waren mir eine große Hilfe. Außerdem bist du der lebende Beweis dafür, dass man Karriere, Familie, Bauernhof, Hausbau, VW-Bus und jede Menge Blödsinn sehr wohl unter einen Hut bringen kann. Auch wenn ich manchmal nur staunend auf dieses Talent blicke, so war es doch auch immer eine Ermutigung.

**„Meine“ Studis:** Ich danke euch für eure Arbeit in den Experimenten, Auswertungen und Diskussionen, die in diese Arbeit eingeflossen sind. Christoph Wittmann, dein Durchhaltevermögen am AFM hat geholfen der Adhäsion von Partikeln an

Lipidmembranen auf die Schliche zu kommen. Florian Seitz und insbesondere Dietmar Czubak, ihr habt mit euren zahllosen Vesikelversuchen zum experimentellen Rückgrat dieser Arbeit beigetragen. Kevin, dir danke ich für Unterstützung bei den Filmwagenexperimenten. Euch allen ein großes Dankeschön! Euch zu betreuen war mir eine Freude! Sharonya, as a student intern you helped me to torture algae and created a documentation that is comprehensible even after 8 years - this is impressing!

**Dr Rudolf „Rudi“ Herrmann:** Dir danke ich zunächst für die Fließbandproduktion von Nanopartikeln nach Wunsch, ohne die einige Experimente nie möglich gewesen wären und für wertvollen Input in chemischen Fragen. Nicht zuletzt soll aber auch dein Einsatz für die Organisation der SPP1313-Nachtreffen erwähnt werden. Es war immer wieder schön, die alte „Fulda-Connection“ wiederzusehen und deine kulinarischen Kreationen zu genießen. Ich hoffe es ergibt sich mal wieder eine Gelegenheit.

**Dr. Shamit Shrivastava und Dr. Christian „Fiff“ Fillafer:** Thank you for your hospitality and support at the BU lab. The work in this multicultural environment with long South Park and endless cricket sessions combined with discussions on the Austrian naval force have been a lot of fun! Fiff, speziell dir Danke ich für die faszinierenden Einblicke in die Elektrophysiologie von Chara-Algen, die mir noch einmal einen ganz neuen Blickwinkel eröffnet haben. Gerne hätte ich die begonnenen Experimente in diesem Bereich noch weiter geführt.

**Dominik Breyer, Bernhard Fichtl und Andreas „Haggi“ Hartmann:** Euch, meinen Mitstreitern in der „Schneider’schen Biophysik-Exilgruppe“, danke ich für gemeinsame Experimente, Diskussionen und gegenseitige Unterstützung aller Art. Es hat viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten! Vor allem danke ich dir, Dominik, für die Unterstützung am AFM und der PIV-Analyse.

**Raum 308:** Lieber Raum, ich danke dir dafür, dass du mich und alle anderen wechselnden Insassen (Judith, Mella, Marcin, Haggi, Dominik, Matthias, Benni, Daniel) beherbergt hast und deinen Sinn für Schabernack und Aktionskunst! Die Zeit am EP1 wurde nicht zuletzt durch dich zu einem Highlight!

**Sidonie Lieber, Alexander Hupfer, Andreas Spörhase und Funda Cevik:** Ohne euch wäre es mir wohl anders ergangen, denn ohne gut ausgestattete Labore, IT, sonstige Infrastruktur und Verwaltung geht eben nichts. Danke, dass ihr den EP1 unter Kontrolle und am Laufen gehalten habt!

**Alle anderen Mitarbeiter am EP1:** Mit Sicherheit habe ich jetzt jemanden vergessen, der es verdient hätte hier explizit genannt zu werden. Ich bitte euch, das zu entschuldigen und danke euch für eine tolle Zeit! Ihr wart ein toller Haufen!

---

Zu guter Letzt haben mich viele Personen in meinem privaten Umfeld unterstützt und haben damit ebenso Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit.

**Alte und neue Freunde** Ich hatte sowohl in Augsburg während Schule und Studium als auch in Mannheim bei Vibrosonic immer das große Glück, auf gute Freunde und Kollegen bauen zu können und so Ausgleich zu finden. Das ist extrem viel Wert!

**Meine Eltern und meiner Familie:** Danke ich dafür, dass ihr mir das Rüstzeug, die Freiheit und den Rückhalt gegeben habt meinen Weg zu gehen und dass ihr mir immer ein Stachel im Fleisch wart, wenn es darum ging dieses Projekt hier zu Ende zu bringen.

**Meine Schwiegereltern Harald und Helga:** Ihr habt uns in unserer Augsburger Zeit immer zur Seite standen und wir konnten uns jederzeit auf eure liebevolle Kinderbetreuung verlassen, wenn wir sie brauchten. Ohne euch hätte ich diesen Weg mit drei Kindern nicht gehen können!

**Angi und Uwe Rupp:** Dasselbe gilt für euch, seit wir in Heddesheim wohnen. Dass ihr jederzeit zur Stelle seid und euch um Kinder Haus und Hof kümmert wann immer es nötig ist, ist eine riesige Entlastung und ich denke euch von Herzen dafür!

**Andrea, Ronja, Nele und Lotta:** Last but not least: Die wichtigsten Menschen in meinem Leben. Was ich für ein Glück habe, euch zu haben, kann ich manchmal gar nicht fassen, geschweige denn hier niederschreiben. Ohne die Motivation und die Lebensfreude, die ihr mir schenkt, wäre ich nicht der, der ich bin. Andrea danke, dass du mich jetzt schon so zwanzig Jahre lang begleitest und stützt und mir während dieser Arbeit auch durch so manchen frustrierten Moment geholfen hast. Ich liebe euch!

**Finanzielle Unterstützung** Ohne Moos nix los - das gilt auch in der Forschung. Ich danke daher zunächst für vielfältige finanzielle Unterstützung:

- Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanzierte die Arbeiten im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1313 „Biologische Wirkung von Nanopartikeln“
- Die Nano Initiative München (NIM) unterstützte mich im Rahmen des Graduiertenprogramms mit diversen Workshops und bereichernden Veranstaltungen bei der Kinderbetreuung, sowie mit der Teilfinanzierung meines Forschungsaufenthalts in Boston.
- Das Center for Nanoscience (CeNS) gab für die Möglichkeit im Rahmen des Junior Nanotech Network für einen Austausch an die UCSB in Kalifornien.