

# Dynamik und Struktur in der Phasenkoexistenz von Lipidmembranen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
mathematisch naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Universität Augsburg  
vorgelegt von

**CHRISTIAN T. LEIRER**

aus Friedberg in Bayern

Lehrstuhl für Experimentalphysik I  
Institut für Physik  
Universität Augsburg  
November 2008



Erster Gutachter: Prof. Dr. Achim Wixforth  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Armin Reller  
Tag der Einreichung: 19.11.2008  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>II. Von Lipiden, Membranen und Vesikeln</b>	<b>17</b>
<b>1. Lipidmembranen</b>	<b>19</b>
1.1. Lipidsysteme aus Phospholipiden . . . . .	20
<b>2. Experimentelle Methoden</b>	<b>27</b>
2.1. Fluoreszenz-Mikroskopie . . . . .	27
2.2. Differenz-Wärmestrom-Kalorimetrie . . . . .	28
2.3. Präparation großer Vesikel . . . . .	28
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>3. Struktur auf Vesikeln und Tethern</b>	<b>34</b>
3.1. Phasenseparation in Vesikeln und Tethern . . . . .	34
3.2. Domänen als thermodynamische Ordnungsparameter . . . . .	38
3.3. Dimensionalität der Domänenstruktur . . . . .	41
3.3.1. Eindimensionale Phasenseparation . . . . .	41
3.3.2. Helikale Domänenstrukturen - Spiegel der molekularen Symmetrie . . . . .	44
<b>4. Domänendiffusion in Lipidmembranen</b>	<b>45</b>
4.1. Formulierung des hydrodynamischen Problems . . . . .	45
4.2. Experiment und Auswertungsmethoden . . . . .	47
4.3. Mobilität in der flüssig-flüssig-Koexistenz . . . . .	49
4.3.1. Einfluss der Viskosität des Mediums . . . . .	50
4.3.2. Vergleich mit den Beschreibungen . . . . .	52
4.3.3. Diffusion als aktivierter Prozess . . . . .	54
4.4. Diffusion in quasi 1d-Systemen . . . . .	55
<b>5. Entmischung und Domänenwachstum in der flüssig-flüssig Koexistenz</b>	<b>57</b>
5.1. Entmischungsübergänge . . . . .	57

5.2. Experimentelles . . . . .	60
5.3. Domänenwachstum durch Kollision und Verschmelzung . . . . .	60
5.4. Simulation des Wachstumsverhaltens . . . . .	64
5.5. Spinodale Entmischung . . . . .	66
5.6. Einfluss von Konzentrationsgradienten auf das Domänenwachstum . . . . .	71
5.7. Homogener Konzentrationsgradient . . . . .	73
5.8. Bewegung an der Phasengrenze . . . . .	74
5.9. Domänenwachstum auf Tethern - quasi 1d-System . . . . .	75
<b>6. Struktur und Dynamik in geladenen Membranen</b>	<b>78</b>
6.1. Die Bedeutung der Ladung in Membranen . . . . .	78
6.2. Vorbereitende Anmerkungen zur Phasenseparation in geladenen Membranen . . . . .	78
6.3. Ladungsphasendiagramm der Domänenstrukturen . . . . .	79
6.4. Zweidimensionaler Elektrorheologischer Effekt in Phospholipid Membranen . . . . .	81
6.5. Zweidimensionale hexagonale Gitter . . . . .	85
<b>7. Exkurs in Strömungsphänomene auf 2d-Membranen</b>	<b>88</b>
7.1. Strömungen in zwei Dimensionen . . . . .	88
7.2. Zweidimensionale Tropfen . . . . .	91
7.2.1. Verschmelzungskinetik von 2d-Tropfen . . . . .	91
7.2.2. Benetzung von 2d-Tropfen . . . . .	92
<b>8. Gestaltübergänge von Vesikeln</b>	<b>94</b>
8.1. Domänenstruktur und Budding . . . . .	95
8.1.1. Budding von Domänen in der flüssig-flüssig Koexistenz . . . . .	95
8.1.2. Budding von Domänen in der flüssig-gel Koexistenz . . . . .	96
8.1.3. Ablösung von Buds . . . . .	97
8.2. Thermodynamik der Gestalt von Vesikeln . . . . .	98
8.2.1. Gleichgewichtsprozesse - Am Beispiel Adhäsion . . . . .	100
8.2.2. Nichtgleichgewichtsprozesse - Am Beispiel Expulsion . . . . .	104
8.3. Gestaltänderungen: Gleichgewicht und Nichtgleichgewicht . . . . .	109
8.3.1. Gestaltänderungen - Gleichgewicht . . . . .	109
8.3.2. Gestaltänderungen - Nichtgleichgewicht . . . . .	110
<b>IV. Zusammenfassung</b>	<b>117</b>
<b>V. Anhang</b>	<b>123</b>
<b>A. Experimente</b>	<b>124</b>
A.1. Spontane Bildung von GUV's in geladenen Membranen . . . . .	124
A.2. Wärmekapazität Ladungsphasendiagramm . . . . .	126
A.3. Invarid Budding . . . . .	127
A.4. Relaxation bei Reintegration . . . . .	128

---

A.5. Permeabilität in der Phasenumwandlung . . . . .	129
<b>B. Herleitungen</b>	<b>136</b>
B.1. Dynamische Bud Bildung . . . . .	136
B.2. Kritische Membranspannung . . . . .	139
B.3. Adhäsion . . . . .	140
<b>C. Methoden</b>	<b>141</b>
C.1. Monte-Carlo Simulationen . . . . .	141
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>142</b>



## Abkürzungen

D <sub>13</sub> PC	.....	1,2-Ditridecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
D <sub>15</sub> PC	.....	1,2-Dipentadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DLPC	.....	1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DMPC	.....	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DOPC	.....	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPPA	.....	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphat
DPPC	.....	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPPG	.....	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]



**Teil I.**

**Einleitung**

Die Zelle stellt den wichtigsten Grundbaustein des Lebens dar. Wesentliches Charakteristikum ist dabei die Bildung eines separierten Systems. Die Barrierefunktion zur Bildung dieses abgeschlossenen Systems übernimmt dabei die Zellmembran.

Integrale Bestandteile der Membran sind Lipide, Proteine und Zucker. Das Grundgerüst bilden die Lipide, die als Doppelschicht zur Membran organisiert sind. Die Rolle der Lipide in der Membran wurde lange Zeit darauf reduziert, eine fluide Matrix zu bilden, in der die eingebetteten Proteine und deren Dynamik die wesentlichen Aufgaben in der Kontrolle zellulärer Prozesse übernehmen.

In letzter Zeit wird zunehmend deutlich, dass die Membran und damit die Lipide wesentlich vielfältigere Funktionen wahrnehmen [1]. Daher fokussierte sich die wissenschaftliche Aufmerksamkeit in diesem Feld in den letzten Jahren auf die Funktion von Lipiden in der Membran. Insbesondere ihre laterale Organisation scheint bedeutend für biologische Prozesse zu sein. Es wurde beobachtet, dass die Zellmembran Mikrodomänen aufweist, die als „Rafts“ bezeichnet wurden. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion, Endozytose, Proteintransport und einigen anderen biologisch relevanten Prozessen zu spielen [2, 3, 4]. Diese Rafts konnten bisher nicht direkt optisch nachgewiesen werden, so waren Erkenntnisse nur über indirekte Methoden möglich [5].

Es wurde gezeigt, dass Rafts eine nicht mischbare flüssige Phase in der ebenfalls flüssigen Membran bilden [6]. Dies motivierte zahlreiche Wissenschaftler zur Untersuchung des isolierten Einflusses der Lipide auf solche Entmischungsprozesse der Membran [7, 8, 9, 10]. Dabei konnte in künstlichen Membranen aus gesättigten Lipiden, ungesättigten Lipiden und Cholesterol, die Koexistenz zweier flüssiger Phasen, mit der Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie, direkt optisch beobachtet werden [11]. Aufgrund der einfachen Zusammensetzung macht dies ein grundlegendes Verständnis des Systems, insbesondere des isolierten Einflusses der Lipide, möglich. Einen guten Überblick über die Thematik und die relevanten Referenzen, die über diese Arbeit hinausgehen, gibt hier die Publikation von Veatch und Keller [11].

Neben der Struktur, ist auch die Dynamik der Membran relevant für biologische Prozesse. Die Reizverstärkung im Auge basiert beispielsweise auf einer Erregungskaskade in der Membran. Dabei bestimmt die Diffusion des Proteins Rhodopsin die Dynamik des Prozesses [12]. Dabei ist die Diffusion durch die Größe des Objekts, die Viskosität der Membran, geometrischer Randbedingung, sowie eine mögliche Domänenstruktur der Membran bestimmt. Eine Kontrolle dieser Eigenschaften ermöglicht dann auch die Steuerung solcher Prozesse.

Experimentell kann durch die Untersuchung der Diffusion von Lipiden, Domänen oder Proteinen viel über die Viskosität oder die Struktur einer zellulären Membran abgeleitet werden. Allerdings ist für eine zuverlässige Aussage eine genaue Kenntnis des Diffusionsverhaltens nötig.

Künstliche Lipidmembranen stellen hier aufgrund ihrer einfachen Zusammensetzung ein gut kontrollierbares Modellsystem dar. Theoretisch wird die Situation durch den zweidimensionalen Charakter der Membran und zusätzlich die Kopplung an das 3d-Medium aber äußerst komplex. Eine rein zweidimensionale, inkompressible Flüssigkeit stellt bezüglich der translatorischen Bewegung eingebetteter Objekte einen Grenzfall dar. Bei einer Dimensionalität  $\leq 2$  kann das Geschwindigkeitsfeld als Reaktion auf eine Kraftwirkung, weit entfernt von der Kraft nicht auf Null abfallen. Einzige Lösung der hydrodynamischen Gleichungen ist die gesamte Flüssigkeit

mit der selben Geschwindigkeit mitzubewegen. Somit verschwindet die Relativgeschwindigkeit des eingebetteten Objektes (Stokes Paradoxon [13]). Jedoch haben in realen Systemen sowohl eine endliche Kompressibilität und Ausdehnung als auch die Ankopplung an das umliegende dreidimensionale Medium remobilisierende Wirkung.

Gerade die Kopplung an das 3d-Medium kompliziert die Situation aber, da Energie in beiden Medien dissipiert wird. Dies führt zu einer natürlichen Längenskala, die dann die Diffusion charakterisiert. In den Grenzfällen, in denen Dissipation in der Membran [14, 15] bzw. im Medium [15, 16] überwiegt, konnten experimentell anwendbare Näherungen gegeben werden. Eine homogene theoretische Beschreibung der Grenzfälle und des Übergangsbereichs des hydrodynamischen Problems präsentierten Huges, Pailthorp und White [15]. Kürzlich erst wurde eine analytische Näherung dieses Modells gegeben, die auch experimentell anwendbar ist [17]. Die Grenzfälle konnten experimentell dargestellt werden [18], kürzlich auch der Übergangsbereich [19].

Die Dimensionalität eines Systems hat offensichtlich großen Einfluss auf sein Verhalten. Lipidmembranen eröffnen hier eine weitere, auch biologisch relevante Möglichkeit zur Reduzierung der Dimensionalität. Eine allgegenwärtige Struktur in biologischen Systemen sind schlauchförmige Membranstrukturen, welche als „Tether“ bezeichnet werden. Sie fungieren als Zell-Zell-Verbindungen zur direkten Zellkommunikation und zum Austausch von Organellen [20]. Auch die Form des endoplasmatischen Retikulums wird durch die ständige Bildung und Rückbildung tetherförmiger Strukturen aufrechterhalten [21] und sie dienen im Golgi Apparat als Vorstufe für Transportvorgänge [22]. Die meisten publizierten Studien an Tethern beschränken sich dabei bisher auf die mechanischen<sup>1</sup> Eigenschaften oder die Kräfte, die zur Tetherbildung notwendig sind [23, 24, 25, 26, 27, 28].

Neben den erwähnten Funktionen stellen künstlich erzeugte Tether ein einfaches Modell für Nerven dar. Dies ist insbesondere im Licht aktueller Forschungsergebnisse interessant. Heimburg und Jackson [29] schlugen kürzlich vor, die Signalausbreitung in Nerven als solitäres akustisches Ausbreitungsphänomen zu verstehen. Wichtig ist dabei die Kenntnis des Phasenverhaltens der Membran, da die vorgestellte solitäre Lösung und damit die Ausbreitung nur in der Nähe eines Phasenübergangs stattfinden kann.

In biologischen Membranen scheint die Existenz eines Phasenübergangs grundsätzlich wichtig zu sein. Bakterienmembranen (E.Coli) zeigen einen Phasenübergang stets leicht unterhalb ihrer Wachstumstemperatur [30]. Bei Veränderung dieser Temperatur, verändern sie ihre Lipidzusammensetzung derart, dass der Phasenübergang wieder leicht unterhalb der neuen Wachstumstemperatur liegt.

Eingangs haben wir bereits die Entmischung der Membran in zwei flüssige Phasen als Phasenübergang vorgestellt. Membranen aus reinen Phospholipiden, die kein Cholesterol enthalten, entmischen dagegen in eine flüssige und eine gelförmige Phase, die eher glasartige Eigenschaften aufweist. Bei diesem Übergang verändern sich Eigenschaften der Membran wie Elastizität und Fläche massiv. Die Rolle dieser Veränderungen in biologischen Prozessen wird derzeit diskutiert, wie beispielsweise bei der Signalausbreitung im Nerven oder der Permeabilität von Membranen [29, 31, 32].

---

<sup>1</sup>Sowohl statische als auch dynamische, mechanische Eigenschaften.

In dieser Arbeit werden wir die Phasenseparation selbst und Struktur und Dynamik in der Phasenumwandlung untersuchen. Wir werden in der Membran viele Eigenschaften einer zweidimensionalen, binären Flüssigkeit beobachten. Sie bietet so auch eine schöne Möglichkeit zur Untersuchung des Verhaltens solcher Systeme. Dabei stellen wir das Verhalten insbesondere im Hinblick auf den Einfluss der Dimensionalität des Systems dar. Unsere Untersuchungen werden wir an Vesikeln als 'flache' Membran und Tethern als quasi 1d-Strukturen durchführen. Vesikel stellen zudem, als Membranhüllen, einfache Zellmodelle dar, die häufig genutzt werden, um Eigenschaften von Zellen zu modellieren.

Wir beginnen im ersten Kapitel mit einer Untersuchung der statischen Domänenstruktur auf Vesikeln und Tethern in der flüssig-gel Koexistenz. Die optisch sichtbaren, flüssigen bzw. gel-förmigen Phasenanteile werden wir als Ordnungsparameter für den thermodynamischen Zustand des Systems identifizieren. Dies bestätigen komplementäre Monte-Carlo Simulationen. Die Einschränkung der Dimensionalität von der 2d-Membran auf den quasi 1d-Tether führt zu einem Übergang der Domänenstrukturen zu ebenfalls quasi 1d-Phasenseparation. Wir werden die Kopplung zwischen der Geometrie des Systems und der Domänenstruktur darstellen.

Im zweiten Kapitel behandeln wir dann die Diffusion von Domänen auf Vesikeln und auf Tethern. Zu Beginn wird kurz der Charakter des gekoppelten hydrodynamischen Problems erläutert und ein Überblick über die hydrodynamische Beschreibung niederdimensionaler Filme gegeben. Experimentell bestimmen wir dann die Mobilität von Domänen in der flüssig-flüssig Phasenkoexistenz. In diesem System kann der angesprochene Übergang von einer durch die Membran dominierten auf eine durch das Medium dominierte Diffusion dargestellt werden. Der Vergleich unserer experimentellen Ergebnisse mit den theoretischen Beschreibungen zeigt sowohl die Gültigkeit der Grenzfälle als auch eine sehr gute Übereinstimmung mit der kürzlich gegebenen analytischen Näherung für die Grenzfälle und den Übergangsbereich. Wir leiten dann aus der Diffusion der Domänen die Viskosität der Membran ab und finden ein Arrheniusverhalten in der geordneten Phase.

Im dritten Kapitel dieses Teils untersuchen wir die Kinetik der Entmischung in die flüssig-flüssig Koexistenz des Systems selbst. Die Separation scheint durch das Verhalten einer binären Flüssigkeit beschrieben werden zu können. Dies zeigt die gute Übereinstimmung mit numerischen Simulationen der Entmischung solcher Systeme. Wir werden die Bedeutung des diffusiven und konvektiven Materialtransports für die Entmischung solcher Lipidsysteme aufzeigen. Der Wachstumsprozess von Domänen kann in Zusammenhang mit der vorliegenden Diffusion gebracht werden. Das Auftreten lamellarer Domänenstrukturen können wir mit einer spinodalen Entmischung in Zusammenhang bringen, was ein Vergleich mit numerischen Simulationen binärer Flüssigkeiten bestätigt.

Im vierten Kapitel dieses Teils nutzen wir dann die flüssige Membran als 2d-Templat, um ein wechselwirkendes 2d-Ladungssystem zu modellieren. Das Einbringen von geladenen Lipiden wird einen erheblichen Einfluss auf die Domänenstruktur im System haben. Es zeigen sich mit zunehmender Ladung zwei Übergänge der Domänenstruktur. Während das System sich bei geringen Ladungsanteilen gleich dem ungeladenen verhält, tritt bei mittlerer Ladung eine hochgeordnete, hexagonale Überstruktur der Domänen auf. Diese geht dann wieder bei höheren Ladungsanteilen in eine ungeordnete über. Zudem zeigt sich eine deutliche Zunahme der Vis-

kosität. Dies werden wir phänomenologisch über ein „frei Flächen Modell“, auf die zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung zurückführen. Abschließend stellen wir erste Ergebnisse der Untersuchung des Potentials und der Dynamik der hexagonalen Domänenstruktur vor.

Das fünfte Kapitel stellt einen Exkurs in makroskopische Strömungsphänomene auf der Membran dar. Die Kopplung einer externen Strömung des umgebenden Mediums an die Membran, kann direkt durch die Bewegung von Domänen dargestellt werden. Dies führt sowohl zu einer Durchmischung der Membran, als auch, aufgrund der Kopplung, zur Durchmischung des Mediums im Inneren des Vesikels. Eine zweite Beobachtung, die aufgrund des 2d-Charakters der Membran und der selektiven Anfärbung von Phasen möglich war, ist die Darstellung der Materialverteilung bei dem Verschmelzungsprozess zweier Domänen. Die hohe Viskosität der Membran ermöglicht zudem eine Untersuchung der Kinetik der Verschmelzung zweier Domänen, die als 2d-Tropfenmodell dienen können.

Wir schließen die Arbeit im sechsten Kapitel mit der Untersuchung des Einflusses der Phasenumwandlung und der damit verbundenen Domänenmikrostruktur der Membran auf die Gestalt von Vesikeln als Zellmodelle. Die Phasenumwandlung als scharfer Schalter zwischen stark unterschiedlichen Eigenschaften wie Elastizität und Fläche, führt zu Übergängen in der Gestalt der Vesikel, die grundlegenden Übergängen in Zellen, wie Endo- und Exozytose oder Adhäsion, ähneln. Wir werden dabei die Verbindung zwischen Gestaltveränderung und Thermodynamik des einzelnen Vesikels aufzeigen können.

Die Arbeit beginnt im folgenden Teil II mit einer Einführung in die grundlegenden Eigenschaften von Membranen und den experimentellen Möglichkeiten ihrer Untersuchung.



## **Teil II.**

# **Von Lipiden, Membranen und Vesikeln**

Dieser Teil der Arbeit gibt zu Beginn einen Überblick über die Architektur und die Eigenschaften von Lipidmembranen. Dem Leser werden sowohl die verwendete Terminologie als auch grundlegenden Ideen der Membranphysik näher gebracht. Für eine eingehende Lektüre seien 'Structure and Dynamics of Membranes' herausgegeben von R. Lipowsky und E. Sackmann [33] und 'Thermal Biophysics of Membranes' von Heimburg [34] empfohlen, die einen schönen Überblick über Eigenschaften von Membranen und deren Physik geben. Das zweite Kapitel beschreibt kurz die verwendeten experimentellen Methoden. Es wird zudem die Präparation großer Vesikel beschrieben, da wir diese für die meisten hier vorgestellten Studien verwenden. Wir verwenden für die Bezeichnung der Lipide in der Arbeit Abkürzungen, deren Bedeutung im Abkürzungsverzeichnis zu Beginn der Arbeit angegeben ist.

# 1. Lipidmembranen

Das Grundgerüst nahezu jeder biologischen Membran ist eine Doppelschicht aus Lipiden. Im Rahmen des Fluid-Mosaik-Modells [35] wird die Membran als zweidimensionale Flüssigkeit gesehen. In ihr bewegen sich Proteine und Mikrodomänen als funktionelle Einheiten nahezu frei und steuern so verschiedene Zellfunktionen. Die als „Rafts“ bezeichneten Mikrodomänen werden wir später genauer vorstellen. In Abb. 1.1 ist der Aufbau einer Membran schematisch dargestellt.

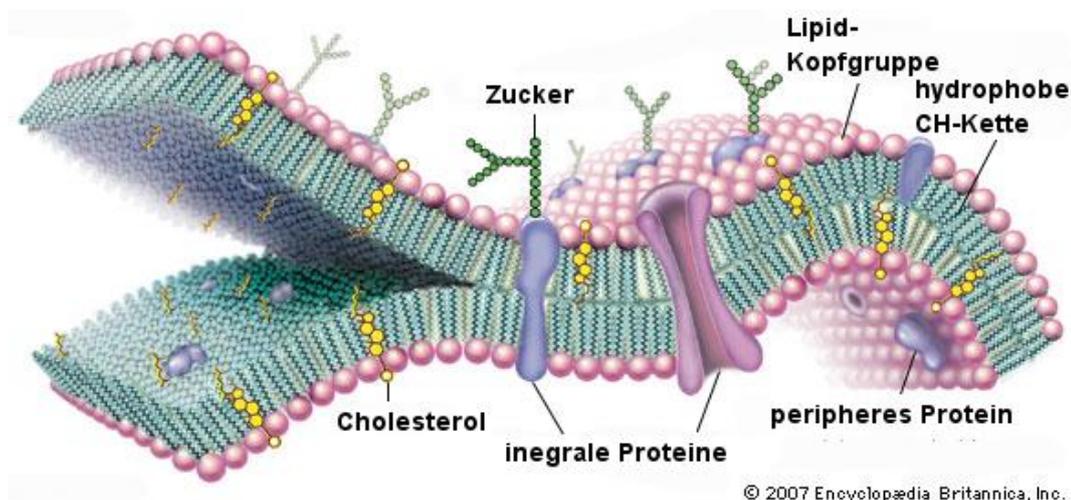


Abbildung 1.1.: Schemazeichnung einer Lipidmembran. Im Grundgerüst der fluiden Lipid-doppelschicht bewegen sich Proteine und Zucker. Bild aus der „Encyclopædia Britannica“.

Die Membran selbst besteht aus zwei Lipidmonolagen, die wir im Text als Monolayer bezeichnen werden. Diese bilden in einer spiegelsymmetrischen Anordnung dann als Doppellage (Bilayer) die Membran.

Die Lipide als integrale Bestandteile sind in der Regel amphiphil, chirale Moleküle bestehend aus einer polaren Kopfgruppe und einer apolaren Kohlenwasserstoffkette, wie Abb. 1.2 a) zeigt. So sind die Kopfgruppen meist stark hydrophil. Die Kohlenwasserstoffe der Kette bedingen dagegen eine starke Hydrophobizität, was so den amphiphilen Charakter der Lipide begründet.

Eine Exposition der Lipide gegenüber Wasser führt daher, aufgrund des hydrophoben Effekts, zu einer Selbstordnung. Bei geringen Lipid-Konzentrationen finden sich Mizelle, bei mittleren

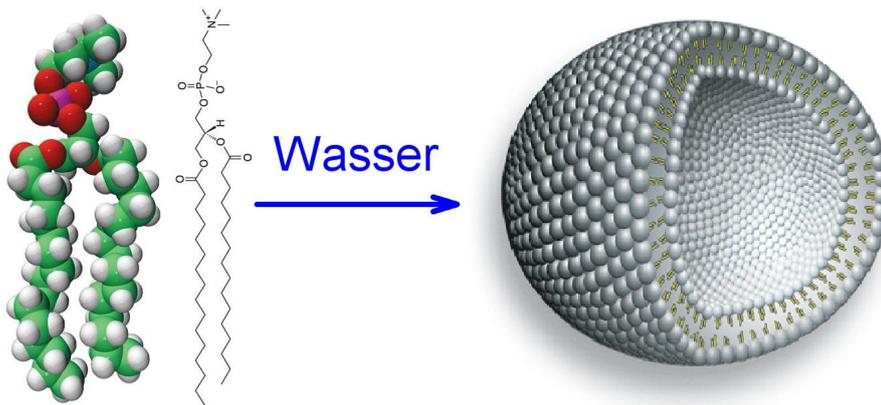


Abbildung 1.2.: Links die Darstellung der Struktur eines Lipides (DPPC). Die Exposition unter geeigneten Bedingungen führt zur Bildung einer geschlossenen Hülle aus einem Lipid-Bilayer. Solche Strukturen werden als Vesikel bezeichnet (Bilder aus „[www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)“ und „[www.miesman.com](http://www.miesman.com)“)

bilamellare und bei hohen Konzentrationen dreidimensional geordnete Strukturen. Da für diese Arbeit aber nur bilamellar Strukturen von Bedeutung sind, wollen wir uns auf diese beschränken. Eine mögliche Repräsentation bilamellarer Strukturen sind, wie Abb. 1.2 zeigt, unilamellare Vesikel. Solche Vesikel mit einem Durchmesser von etwa  $30\mu\text{m}$  werden sehr häufig als Zellmodelle eingesetzt, da sie als reine Membranhülle eine Untersuchung der isolierten Eigenschaften der Membran erlauben. An solchen GUV's (Giant Unilamellar Vesicles) wurden die meisten Untersuchungen dieser Arbeit durchgeführt. Allerdings entstehen solch große Vesikel nicht spontan. Spontan bilden sich meist nur Vesikel die wie eine „Zwiebel“, aus mehreren Lipidschichten (multilamellare Vesikel) aufgebaut sind. Die Präparation von GUV's wird im nächsten Abschnitt (II 2.3) beschrieben.

## 1.1. Lipidsysteme aus Phospholipiden

Die Membran selbst verhält sich ähnlich einem Flüssigkristall. So beobachtet man stark unterschiedliche Eigenschaften die mittels ausgeprägter Phasenübergänge ineinander übergehen. Ursache ist die Ordnung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide (Abb. 1.3). Bei sehr tiefen Temperaturen zeigt sich eine nahezu kristalline Ordnung ( $L_c$ ), welche aber in der Regel bei den zugänglichen Temperaturen nicht zu beobachten ist und somit keine Relevanz für die hier untersuchten Phänomene hat. Die meist beobachtbare und relevante Phase bei tiefen Temperaturen ist die gelförmige ( $L_{\beta'}$ ) Phase. Hier ordnen die Lipide auf einem trigonalen Gitter [36]. Diese Phase wird aufgrund der glasartigen Eigenschaften als gelförmige Phase bezeichnet. Zu hohen Temperaturen hin geht die geordnete Phase in eine ungeordnete Phase über ( $L_\alpha$ ). In der ungeordneten Phase kann die Membran als eine zweidimensionale Flüssigkeit betrachtet werden.

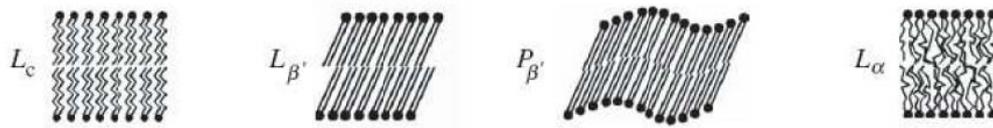


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung der Ordnung der Kohlenwasserstoffketten in den jeweiligen Phasen.

Hier ist keine laterale Ordnung der Lipide zu beobachten. Daher wird diese Phase als flüssige Phase bezeichnet. Der korrespondierende Phasenübergang weist eine deutliche Analogie zu bekannten Schmelzübergängen auf und wird im Kontext als flüssig-gel Übergang, oder wenn die Bedeutung klar ist, schlicht als Phasenübergang bezeichnet. Zwischen der gelförmigen und der flüssigen Phase beobachtet man die sog. Rippelphase ( $P_{\beta'}$ ). Diese hat weitestgehend gelförmige Eigenschaften, ist aber durch eine langreichweitige Überstruktur der Membran gekennzeichnet. Ursache des globalen Membranübergangs ist der Ordnungsübergang der Kohlenwasserstoffketten, der durch eine Konformationsänderung der Atome in der Kette charakterisiert ist, was Abb. 1.4 verdeutlicht.

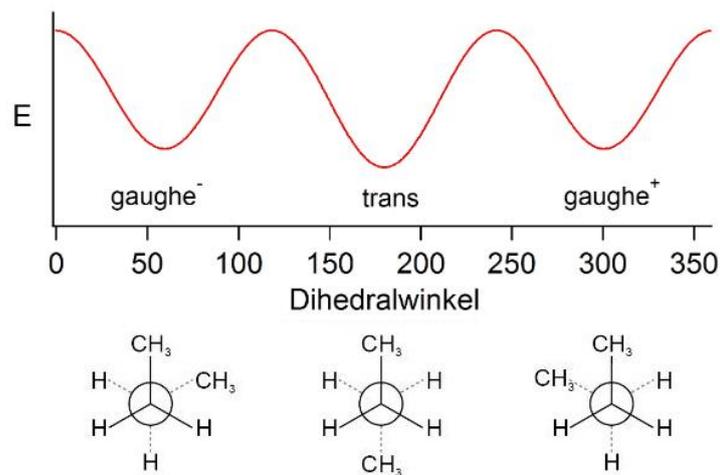


Abbildung 1.4.: Enthalpie der C-C Bindung als Funktion des Torsionswinkels im Bezug auf die Bindungsachse (nach [37]).

Ist ein Kohlenwasserstoffatom in einer Kette von C-Atomen einfacher C-C-Bindungen angeordnet, hat es aufgrund sterischer Wechselwirkung minimale Enthalpie bei einem Dihedral-Winkel (Torsionswinkel) von 180° relativ zu den Nachbaratomen (trans) im Bezug auf die Bindungsachse. Nebenminima mit etwas höherer Enthalpie existieren bei 60° und 120° (gauche  $\pm$ ). Auf-

grund der Rotationsisomerie besitzt diese Konfiguration allerdings eine höhere Entropie. Bei tiefen Temperaturen liegen die C-C-Bindungen hauptsächlich in der trans-Konformation vor. Diese wird zudem im Membran-Ensemble wegen sterischer Wechselwirkungen mit den Nachbaratomen bevorzugt. Zu hohen Temperaturen hin nimmt die Unordnung der Ketten zu und es entwickelt sich zunehmend eine trans-gauche-Isomerie. Der Ordnungsübergang der Kohlenwasserstoffketten fällt nicht notwendig mit einem globalen Ordnungsübergang der Membran zusammen. Dies bedingt die Existenz gemischter Phasen, wie sie in Mischungen mit Cholesterin zu beobachten sind. In reinen Phospholipid-Mischungen ist der globale Übergang der Membran jedoch durch die Kettenordnung bestimmt.

Betrachtet man Lipide mit ungesättigten Kohlenwasserstoffketten, die also eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten, so ist aufgrund der höheren Flexibilität der Bindung eine starke Verschiebung des Phasenübergangs zu niedrigeren Temperaturen zu beobachten.

Durch die zunehmende Unordnung der Kette nimmt die Fläche  $a_l$  eines Lipid-Moleküls beim Übergang von der geförmigen zur flüssigen Phase um ca. 25% zu. Damit verändert sich auch die gesamte Fläche  $A$  der Membran um diesen Wert. Das Volumen bleibt nahezu erhalten und daher nimmt die Dicke der Membran entsprechend ab. Man beobachtet bei vielen Lipiden eine Proportionalität der Flächenänderung der Membran  $\Delta A(T) = \gamma_A \Delta H(T)$ , und der Enthalpieänderung  $\Delta H$ , mit einer phänomenologischen Konstante  $\gamma_A = 0.89 \text{ m}^2/\text{J}$  [29].

Ein gutes Maß für Übergänge dieser Systeme sind die zugehörigen Antwortfunktionen gegenüber Veränderungen einer oder mehrerer Parameter wie Druck oder Temperatur. Die Antwortfunktion gegenüber Temperaturveränderung bei konstantem Druck ist die isobare Wärmekapazität  $c_p = (dH/dT)_p$ . Diese wird oft zur Charakterisierung des Phasenverhaltens des flüssig-gel Übergangs genutzt. In Abb. 1.5 sind Wärmekapazitätsprofile für die reinen Lipide DPPC (Abb.

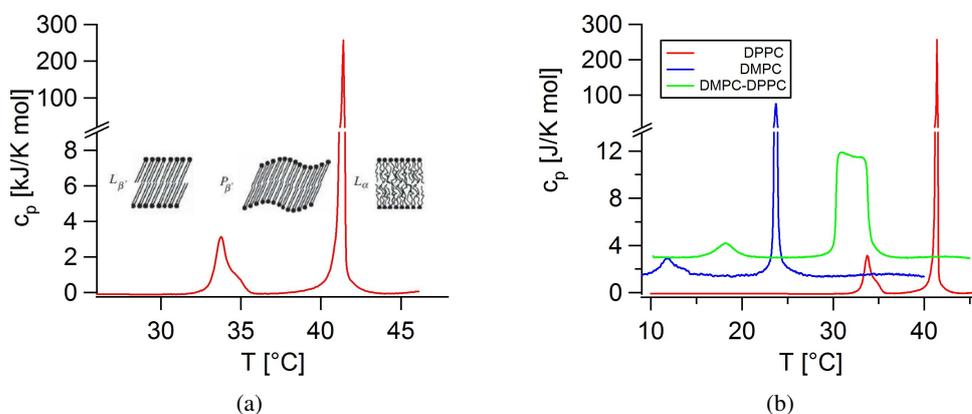


Abbildung 1.5.: a) Wärmekapazitätsprofil des reinen Lipids DPPC. Deutlich sind eine Vorumwandlung bei  $T = 34^\circ\text{C}$  und die ausgeprägte Hauptumwandlung bei  $T = 41^\circ\text{C}$  zu erkennen. Zusätzlich sind die korrespondierenden Phasen eingezeichnet. b) Wärmekapazitäten der reinen Lipide DMPC (blau) und DPPC (rot) sowie der äquimolaren Mischung beider (grün).

1.5(a) rot) und DMPC (Abb. 1.5(b) blau) und einer äquimolaren Mischung beider (Abb. 1.5(b) grün) dargestellt.

Das reine Lipid zeigt einen sehr scharfen Phasenübergang bei der Umwandlungstemperatur  $T_c = 41^\circ\text{C}$ , dessen Breite etwa  $\Delta T_c = 0.05^\circ\text{C}$  beträgt. Die endliche Breite ist Folge der endlichen Clustergröße des Systems. Der Phasenübergang weist somit wesentliche Eigenschaften eines Übergangs erster Ordnung auf. Die Vorumwandlung bei  $T = 34^\circ\text{C}$  markiert den Übergang von der rein gelförmigen Phase in die Rippelphase. Allerdings trägt sie bezüglich ihrer Schmelzenthalpie nur sehr wenig zum gesamten Übergang bei. Zur Verdeutlichung der Bedeutung des Wärmekapazitätsprofils als Indikator für den Phasenzustand ist dieser in Abb. 1.5(a) für die verschiedenen Bereiche des Profils eingezeichnet.

Abb. 1.5(b) zeigt den Einfluss der Kettenlänge auf die Umwandlungstemperatur. DPPC (rot) weist mit 16 C-Atomen der Kette eine Umwandlung bei  $T_c = 41^\circ\text{C}$  auf. Die Umwandlung von DMPC (blau), mit 14 C-Atomen liegt mit  $T_c = 24^\circ\text{C}$  deutlich tiefer. Generell findet sich eine nichtlineare Abnahme der Umwandlungstemperatur mit der Kettenlänge, gleichzeitig nimmt aber die Schmelzenthalpie nahezu linear ab [37]. Durch Mischungen von Lipiden lassen sich so nahezu beliebig Gestalt und Breite der Phasenkoexistenz einstellen, was hier am Beispiel der äquimolaren Mischung (grün) von DMPC und DPPC demonstriert ist.

Der Phasenübergang kann nicht nur durch Temperatur induziert werden, so können sich Umwandlungen bezüglich jeder Veränderung eines thermodynamischen Parameters zeigen.

Das eingangs erwähnte Fluid-Mosaik-Modell wurde 1984 von Mouritsen und Bloom [38] erweitert. Sie entwickelten das Matress-Modell, das eine Clusterbildung von Lipiden und Proteinen aufgrund hydrophober Wechselwirkung beachtet.

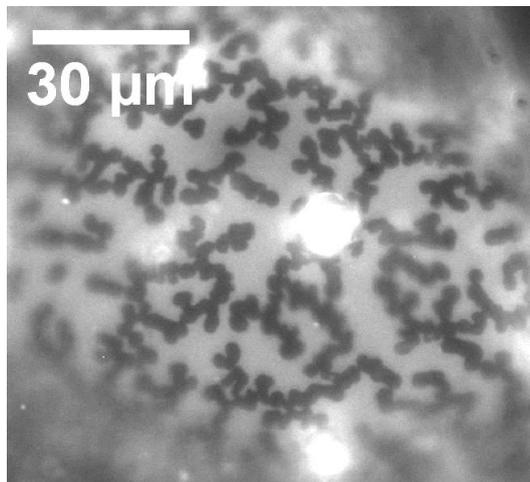


Abbildung 1.6.: Domänenstruktur auf einem DMPC-DPPC (1-1) Vesikel. Gelförmige Bereiche erscheinen dunkel, flüssige Bereiche hell. (Farbstoff: Texas red)

Als Modellsystem für solche Cluster werden Domänen in der Phasenkoexistenz bemüht. In unilamellaren Membranen lässt sich die Phasenkoexistenz im Phasenübergang mittels Fluores-

zenzmikroskopie darstellen. Hierzu werden der Lipidmischung kleine Mengen fluoreszenzmarkierter Lipide (etwa 0.2% der gesamten Lipide) zugesetzt. Diese bevorzugen in der Regel die ungeordnetere, hier also die flüssige Phase, und ermöglichen so eine selektive Anfärbung der Phasen, wie Abb. 1.6 beispielhaft zeigt. Die Abbildung stellt typische Domänenstrukturen in der flüssig-gel Koexistenz dar. Die Domänen haben hier meist eine relativ zerklüftete Gestalt und erscheinen als nahezu kristalline Bereiche in der sonst flüssigen Membran.

**Lipidsysteme mit Cholesterol** In den letzten Jahren wurde das Konzept von Rafts als funktionelle Einheiten in der Zellmembran diskutiert. Rafts scheinen eine wichtige Rolle in Exo- und Endozytose, Adhäsion, Signaling und vielen weiteren biologischen Prozessen zu spielen [2, 39, 4, 3]. Es wird angenommen, dass Rafts Mikrodomänen mit einer Strukturgröße von etwa 100nm der Zellmembran sind, worin sich Proteine und bestimmte Lipide anreichern [1]. Dabei stellen die Matrixphase und die Rafts zwei nicht mischbare flüssige Phasen dar [6].

Um diese flüssig-flüssig Unmischbarkeit in Membranmodellen zu simulieren, wurden in den letzten Jahren ternäre Lipid-Systeme aus gesättigten, ungesättigten Lipiden und Cholesterol diskutiert. In diesen Systemen konnte fluoreszenzmikroskopisch direkt die Koexistenz flüssiger nicht mischbarer Phasen auf GUV's beobachtet werden [40, 41, 42, 11, 43]. Die Anwesenheit von Cholesterol führt bei mittleren Konzentrationen unterhalb einer charakteristischen Temperatur  $T_m$  zu einer Entmischung in zwei flüssige Phasen. Das schematische Phasendiagramm [11] eines gängigen Modellsystems, DOPC-DPPC-Cholesterol, unterhalb der Entmischungstemperatur  $T_m$ , ist in Abb. 1.7 dargestellt.

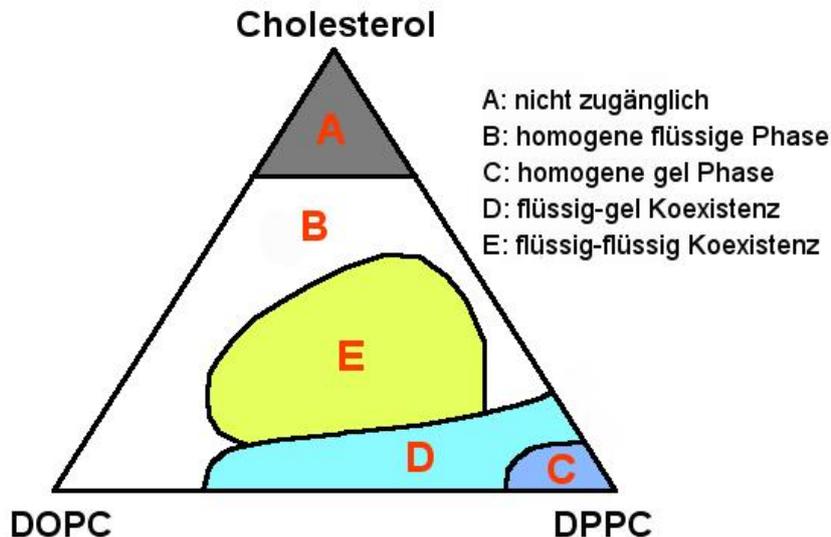


Abbildung 1.7.: Schematisches ternäres Phasendiagramm des Systems DOPC-DPPC-Cholesterol unterhalb der Entmischungstemperatur (nach [11]).

Es beinhaltet fünf Bereiche: A: Sehr hohe Konzentrationen von Cholesterol werden von den Vesikeln nicht angenommen B: Bei hohen Konzentrationen von Cholesterol und/oder DOPC ist über den gesamten zugänglichen Temperaturbereich ausschließlich eine homogene Phase zu beobachten. C: Hohe Konzentrationen des gesättigten Lipides (DPPC) und geringe Cholesterol-Konzentrationen führen zu einer homogenen gelförmigen Phase. D: Diese geht für höhere Konzentrationen von Cholesterol und/oder des ungesättigten Lipids (DOPC) in die bekannte flüssig-gel-Koexistenz über. E: In diesem Bereich ist die Koexistenz zweier flüssiger Phasen zu beobachten.

Die beiden flüssigen Phasen unterscheiden sich durch ihre Ordnung und werden daher als flüssig ungeordnete Phase (liquid disordered: ld) und flüssig geordnete Phase (liquid ordered: lo) bezeichnet. Ursache für die Fluidität beider Phasen ist die Anreicherung von Cholesterol in der an gesättigtem Lipid reichen Phase. Wie in der gelförmigen Phase sind die Ketten hier geordnet, jedoch bildet sich durch die Einlagerung von Cholesterol keine laterale Ordnung der Lipide aus. Die Cholesterol-arme, flüssig ungeordnete Phase verhält sich ähnlich der flüssigen Phase in der flüssig-gel-Koexistenz.

Die unterschiedliche Fluidität der flüssig ungeordneten und geordneten Phasen wird offenkundig anhand der Beobachtung der Diffusion von Domänen in der jeweiligen Phase. In der ungeordneten Phase sind diese wesentlich mobiler im Vergleich zur geordneten Phase. Die explizite Untersuchung der Diffusion und damit die Bestimmung der Viskosität beider Phasen wird Gegenstand von Kapitel III 4 sein.

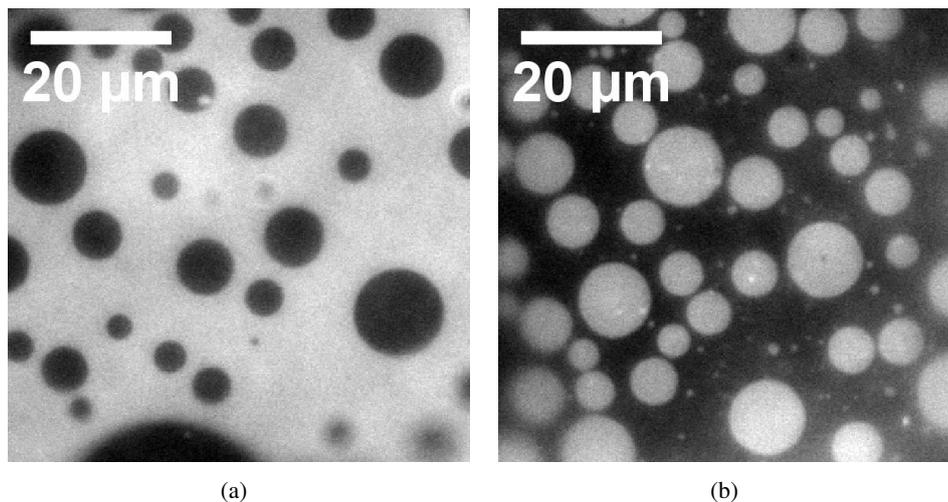


Abbildung 1.8.: *Fluoreszenzaufnahmen der Domänenstruktur in der Phasenkoexistenz des Systems a) (1)DOPC-(1)DPPC+20%Cholesterol b) (1)DOPC-(1)DPPC+40%Cholesterol. Die flüssig geordnete Phase erscheint dunkel, die flüssig ungeordnete hell.*

Die optische Repräsentation der Phase ist ebenfalls abhängig vom Cholesterol-Gehalt. Cholesterol lagert sich bevorzugt in der an gesättigtem Lipid reichen Phase an. Diese verdrängt den

zur Darstellung zugesetzten Fluoreszenzfarbstoff und erscheint daher in der Fluoreszenzaufnahme dunkel. Wie Abb. 1.8 demonstriert, ist bei niedrigen Cholesterolkonzentrationen die helle Cholesterol-arme Phase als Matrixphase zu beobachten.

Bei zunehmendem Cholesterolgehalt invertiert sich dies und die dunkle Phase wird zur Matrixphase. Der Übergang findet bei einem Cholesterol-Gehalt von etwa 30 – 40% statt [42].

Domänen diffundieren in beiden Phasen frei und wachsen durch Kollision und Verschmelzung [11]. Nach einer Verschmelzung relaxieren die Domänen schnell wieder in eine zirkuläre Gestalt, was die Dominanz der Linienspannung der Domäne impliziert. Die Linienspannung ist Folge der unterschiedlichen Zusammensetzung der beiden Phasen. Dabei wird die Linienspannung  $\gamma$  durch die Energie der Grenzlinie  $E_G = \gamma l$  der Länge  $l$  definiert.

Eine Schwierigkeit der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Membranen die Cholesterol enthalten, ist die photochemische Oxidation von Cholesterol [11, 44, 45]. Dadurch wird die Konzentration von Cholesterol in der Membran kontinuierlich verändert, was zu einer Verschiebung der Entmischungstemperatur führt. Die Reaktionsprodukte beeinflussen zudem die Phasenseparation in der Membran, was oft erst das Entstehen großer Domänen ermöglicht [44, 45]. Dies lässt sich auf die Anlagerung der Produkte in der Phasengrenze und die daraus resultierende Erhöhung der Linienspannung zurückführen [46].



Quecksilberdampflampe (Lichtquelle) erzeugten breiten Spektrum wird durch den Anregungsfilter die gewünschte Anregungswellenlänge selektiert. Der anschließende dichroide Spiegel wirkt als zusätzlicher Monochromator und lenkt die Anregungsstrahlung von unten durch das Objektiv auf die Probe. Die von der Probe emittierte Fluoreszenzstrahlung höherer Wellenlänge wird dann wieder durch das Objektiv aufgenommen. Höhere numerische Aperturen ermöglichen hier eine Steigerung der Auflösung bei allerdings geringer werdendem Arbeitsabstand. Folgendes Passieren des dichroiden Spiegels und des Detektionsfilters, trennt die emittierte Fluoreszenzstrahlung von der restlichen Anregungsstrahlung. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird dann durch eine Fluoreszenzkamera detektiert (Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching am Ammersee). Die Darstellung der Aufnahmen erfolgt durch das Softwarepaket OpenBox (Informationssysteme Schilling).

## 2.2. Differenz-Wärmestrom-Kalorimetrie

Die Differenz-Wärmestrom-Kalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry: DSC) stellt eine Methode dar, um Lipide thermodynamisch zu charakterisieren. Dabei wird die Differenz der Heizleistungen bestimmt um die Probe, und eine Referenz des selben Mediums wie das der Probe, auf die gleiche Temperatur zu bringen. Der Unterschied in der Wärme entspricht gerade der Wärmekapazität des Materials. Die Wärmekapazitäten von Lipiden wurden an wässrigen Vesikelsuspensionen mit Hilfe eines „Differential Scanning Calorimeters“ (DSC) der Firma Microcal (Avestin, Min., USA) bestimmt. Hierzu wurden in Chloroform gelöste Lipide in der gewünschten Zusammensetzung gemischt und aus der Chloroformlösung heraus getrocknet. Vesikelsuspensionen entstanden durch Versetzen mit dem gewünschten Medium und regelmäßiges Schütteln über 3h oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipides. Dies erzeugt multilamellare Vesikel (MUV's). Kleine unilamellare Vesikel (Small Unilamellare Vesicles: SUV'S) können dann durch die Ultraschallbehandlung dieser Suspension erzeugt werden (etwa  $10\text{min} @ T > T_c$ ).

## 2.3. Präparation großer Vesikel

Die Untersuchung isolierter physikalischer Eigenschaften von Membranen birgt einige Schwierigkeiten für die Präparation der Proben und stellt explizite Anforderungen an das System. Bei der Untersuchung der Diffusion von Domänen oder der Separationskinetik der Membran, die wir später durchführen werden, ist es nötig, einen ausreichend großen 'flachen' Bereich der Membran optisch beobachten zu können. Daher wurden zahlreiche Methoden entwickelt, um nahezu freitragende, flache Membranen zu präparieren [47, 48]. Sämtliche dieser Methoden beeinflussen die Membran durch Wechselwirkung mit dem Substrat oder durch Lösungsmittelrückstände, die bei der Präparation in der Membran verbleiben [49].

Ein System, bei dem die Wechselwirkungen mit dem Substrat einfach vermieden werden kann, sind die unilamellare Riesenvesikel (Giant Unilamellar Vesicles: GUV's). Diese Vesikel werden wir später zur Untersuchung der Bedeutung des Phasenübergangs bei zellulären Prozessen

verwenden, da sie als geschlossene Membranhülle das einfachste Modell einer Zelle darstellen. Für Experimente zur Diffusion und Phasenseparation muss allerdings ein fester Bereich der Membran längere Zeit beobachtet werden. Die klassischen GUV's sind im Volumen frei beweglich und können dadurch auch rotieren. Somit kann ein fester Bereich der Oberfläche nur sehr kurz betrachtet werden. Zur Vermeidung dieses Problems werden wir hier GUV's verwenden, die sich nicht von der Oberfläche ablösen. Diese Vesikel sind als Halbschalen fest auf dem unteren Deckglas adhärirt. So erfährt der obere Teil der Vesikel keine Wechselwirkung mit dem Substrat, bleibt aber aufgrund der Fixierung am Boden ortsfest. Auf diese Weise ist eine sehr lange Beobachtungszeit dieses oberen, „flachen“ Bereichs der Membran möglich. Diese Vesikel werden wir in der Folge als „Oberflächen adhärirt Vesikel“ OAV's bezeichnen.

**Elektroformierung** Die Präparation der Vesikel erfolgte nach der Elektroformierungs-Methode, nach Angelova et al. [50]. Zunächst wird das in organischem Lösungsmittel gelöste Lipid auf ein ITO (Indium Tin Oxide) beschichtetes Deckglas aufgebracht. Dabei wird versucht, eine möglichst homogene Lipidbedeckung der Oberfläche zu erreichen. Das Lösungsmittel wird dann durch Aufbewahrung im Vakuum ( $\sim 3h$ ) vollständig entfernt. Anschließend werden die Schichten oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipides mit dem gewünschten Medium versetzt. Nach Anlegen einer Wechselspannung ( $V \sim 1V/mm$ ,  $f \sim 10Hz$ ) mittels eines weiteren ITO-Deckglases entstehen Vesikel bis zu  $100\mu$  Durchmesser. Dies ist schematisch in Abb.2.2 dargestellt.

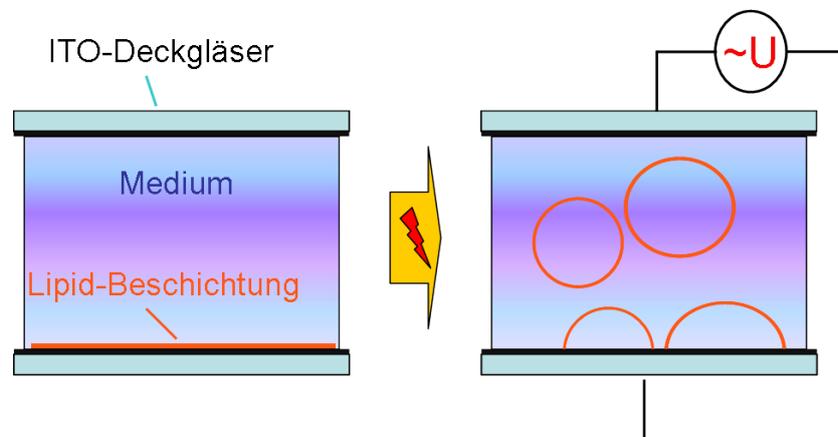


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der Präparation von GUV's mittels Elektroformierung.

Im Laufe der Präparation lösen sich die Vesikel vom ITO-Deckglas ab und bewegen sich frei im Medium. Das Medium wird dann abgezogen und die Vesikellösung kann verwendet werden. Die Präparation frei suspensierter Vesikel fand ausschließlich nach dieser Methode statt.

**Oberflächen-adhäririerte Vesikel (OAV's)** Die Bildung von OAV's kann durch die Kontrolle der auf die Deckgläser aufgetragenen Lipidmenge gesteuert werden. Bei einer geringen homogenen Oberflächenbelegung wird der Ablösungsprozess verhindert, und es bleiben halb-schallige, vesikuläre Strukturen auf der Deckglasoberfläche adhäririert. Dabei ist ein Größenwachstum durch Fusion zu beobachten, solange die Wechselspannung angelegt bleibt.

Um eine homogene definierte Belegung der Oberfläche zu erreichen, wird das Lipid in einem Lösungsmittel (TFE, Pentan) suspendiert, das aufgrund der Wechselwirkung mit dem Substrat einen homogenen Film auf der Deckglasoberfläche bildet. Auf diese Weise kann eine äußerst definierte und reproduzierbare Belegung mit Lipid erreicht werden. Die Lipidmenge pro Fläche lässt sich dann leicht durch die Lipidkonzentration im Lösungsmittel steuern.

Durch sensible Variation der Amplitude der Wechselspannung unter gleichzeitiger Beobachtung gelang es uns so Vesikel bis zu einem Durchmesser von ca.  $200\mu\text{m}$  zu präparieren. Diese Größe war wichtig, um einen großen Bereich auf der Vesikeloberfläche als nahezu flache Membran untersuchen zu können.

**Messungen an Vesikeln** Messungen an frei schwimmenden Vesikeln wurden in einer seitlich offenen Kammer, ganz ähnlich wie in Abb. 2.2 dargestellt, durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Temperaturkontrolle ist in [51] gegeben. Die Messungen an OAV's erfolgte in einer geschlossenen Kammer. Das Prinzip ist identisch dem gerade beschriebenen Aufbau, jedoch ist die Kammer seitlich geschlossen, aber weiterhin optisch von oben und unten zugänglich. Die Temperatur kann hier mit Hilfe eines Standard-Wärmebades (Julabo, Seelbach, Deutschland) kontrolliert werden, was eine sehr akkurate Temperatureinstellung erlaubt. Eine Temperaturmessung kann durch ein Typ-K-Thermoelement in der Kammer erfolgen. Da die Temperaturen in der Kammer immer von der Temperatur des Wärmebades abhängen, wurde, gemäß einer Kalibrierung, die Temperatur meist aus der des Wärmebades ermittelt. Nach einem Temperaturwechsel stabilisiert sich die Temperatur der Kammer innerhalb von etwa 5 Minuten. Messungen bei konstanter Temperatur erfolgten stets nach Equilibrierung über diesen Zeitraum. Dabei wurden die Vesikel in dieser Kammer nach der beschriebenen Elektroformierungs-Methode gewachsen, was eine optische Kontrolle des Wachstumsprozesses ermöglicht. Messungen fanden dann direkt nach dem Wachstumsprozess statt.

**Spontane Bildung von Vesikeln in geladenen Membranen** Eine weitere Steigerung der Größe der Vesikel war durch die Verwendung geladener Lipide möglich. Hier ist zudem die erstaunliche spontane Bildung von GUV's zu beobachten. Die Präparation der Vesikel erfolgt dabei wie oben beschrieben. Ab einem Ladungsanteil von mehr als 4% war in sämtlichen Präparationen die spontane Bildung, ohne das Anlegen einer Wechselspannung, direkt nach Zugabe des bidestillierten Wassers zu beobachten. Die Vesikel wuchsen dann durch Fusion auf der Oberfläche in der Größe. So waren spontan Durchmesser von etwa  $200\mu\text{m}$  zu erreichen. Durch Anlegen der Wechselspannung waren sogar Durchmesser bis ca.  $1\text{mm}$  möglich. Zudem erwiesen sich diese Vesikel als mechanisch sehr stabil.

Verblüffend ist auch der Vergleich mit aus Zellen extrahierten Lipiden. Auch hier zeigte sich die spontane Bildung von GUV's. Da wir diese spontane Bildung nur in geladenen Membranen

modellieren konnten, weist dies auf die Ladung als ursächlich für die spontane Bildung hin.

Wir nutzten solche Vesikel, und den Vorteil ihrer Größe, in dieser Arbeit zu Untersuchung der Eigenschaften der Membran selbst. Dennoch ist die spontane Bildung solch großer Strukturen auch biologisch sehr interessant. Daher ist eine ausführliche Beschreibung dieses Prozesses in Anhang A.1 gegeben.

**Teil III.**  
**Ergebnisse**

Im Folgenden werden wir einige verschiedene Membranzusammensetzungen benutzen. Wir wollen daher einleitend klären, worauf, im Kontext dieser Arbeit, bei den verschiedenen Lipidzusammensetzungen geachtet werden muss. Grundsätzlich untersuchen wir zwei verschiedene Systeme.

Zum einen betrachten wir Membranen aus reinen Phosphatidylcholinen oder Mischungen von Phosphatidylcholinen. Entscheidend dabei ist, dass hier die Koexistenz einer flüssigen und einer gelförmigen Phase auftritt. Die gelförmige Phase ist sehr starr, was die Beobachtung quasi statischer Domänenstrukturen erlaubt.

Zum anderen untersuchen wir Mischungen von gesättigten Lipiden (DPPC, DPPG), ungesättigten Lipiden (DOPC) und Cholesterol. Entscheidend dabei ist, dass hier eine Koexistenz zweier flüssiger Phasen vorliegt und die Membran somit als binäre 2d-Flüssigkeit betrachtet werden kann.

Durch das Einbringen geladener, gesättigter Lipide (DPPG) in das flüssig-flüssig System konnten wir einige Vorteile für unsere Untersuchungen erreichen. Insbesondere bei der Untersuchung der Separationskinetik in Kapitel III 5 werden wir dies nutzen. Für all diese Untersuchung ist der entscheidende Punkt der fortbestehende Flüssigkeitscharakter der beiden Phasen. Dieser ist in allen hierfür verwendeten Zusammensetzungen zu beobachten, unabhängig von sicherlich sonst veränderten Eigenschaften<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Einige Effekte, die die geladenen Lipide auf das Phasenverhalten der Membran haben, werden wir in Kapitel III 6 vorstellen.

## 3. Struktur auf Vesikeln und Tethern

Wir beginnen diesen Teil mit einem Studium der statischen Domänenstruktur auf Vesikeln und Tethern.

### 3.1. Phasenseparation in Vesikeln und Tethern

Wir werden im Folgenden zunächst aus dem optisch sichtbaren Anteil der fluiden bzw. gelförmigen Phase den thermodynamischen Zustand des Systems in der Phasenkoexistenz ableiten. Hierzu betrachten wir die Phasenseparation in Vesikeln und Tethern im System DLPC-D<sub>15</sub>PC (2.5 – 7.5).

**Experimentelles** Die Untersuchungen werden an „Oberflächen adhärirten Vesikeln“ durchgeführt. Tether werden hydrodynamisch erzeugt. Eine Temperaturveränderung des externen Wärmebads führt bei der Anpassung der Temperatur in der Kammer zu einer konvektiven Strömung. Diese verläuft in der Nähe des unteren Deckglases parallel zum Deckglas. Die Strömung kann adhärirte Vesikel oder Teile der Vesikel mit sich reißen. Dabei bleibt in der Regel ein Teil der Vesikel adhärirt und es bildet sich ein Tether. Auf diese Weise entstehen sehr viele Tether verschiedenen Durchmessers. Ein großer Teil besitzt einen Durchmesser unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops. Diese Tether sind aufgrund der Fluoreszenz (Farbstoff: Dil<sub>18</sub>) weiterhin sichtbar, es kann aber kein Durchmesser angegeben werden.

Das Experiment wird wie folgt durchgeführt: Vesikel werden bei etwa  $T = 40^\circ\text{C}$  oberhalb der Schmelztemperatur des höchstschmelzenden Lipids (D<sub>15</sub>PC:  $T_c = 33,9^\circ\text{C}$ ) gewachsen (Kapitel II 2.3). Durch Temperaturveränderung, stets oberhalb der Phasenumwandlung werden dann, wie beschrieben, Tether gebildet. Es bleibt jedoch eine ausreichende Zahl großer Vesikel intakt, um auch hier die Phasenanteile zu bestimmen.

**Phasendiagramm** Den thermodynamischen Zustand des Systems erhalten wir durch das Ausmessen des Phasendiagramms der Mischung. Gleichzeitig modellieren wir das System durch eine „Monte Carlo Simulation“ (Anhang C.1). Diese dient zur Evaluation des thermodynamischen Gleichgewichts. Aus der Simulation lassen sich dann bequem relevante Größen, wie die Anteile fluiden und gelförmiger Phase ablesen. Die Simulation geschieht auf einem starren, hexagonalen Gitter mit periodischen Randbedingungen. Durch graphische Darstellung (Softwarepaket: Povray) der Zustände der Lipide können dann die simulierten Domänenstrukturen dargestellt werden. Dies ermöglicht auch visuell einen direkten Vergleich mit dem Experiment. Die flache Membran wurde dabei auf einer Matrix von  $A_{VS} = 100 \times 100$  Lipiden modelliert. Durch

Elongierung der Simulations-Matrix auf  $A_{TS} = 10 \times 1000$  modelliert wir Tether-förmige Strukturen<sup>1</sup>. Die periodischen Randbedingungen in beiden Richtungen liefern die Geometrie eines Torus mit dem Radius  $r = \sqrt{A/\pi}$ , also eines ringförmigen Tethers. Details der Simulation sind im Anhang C.1 angegeben.

Es gilt zunächst die Güte der Simulation anhand des Vergleiches des modellierten und des kalorimetrisch bestimmten Phasendiagramms zu bestimmen. Beide in Abb.3.1 dargestellten Diagramme zeigen eine gute Übereinstimmung<sup>2</sup>.

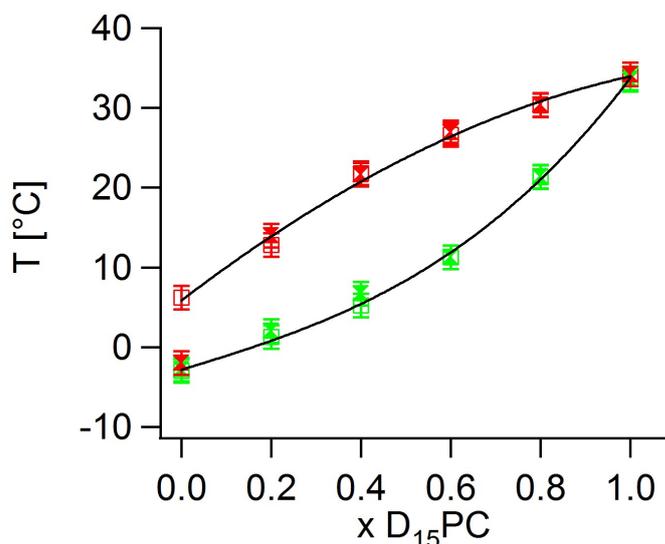


Abbildung 3.1.: Phasendiagramm des Systems DLPC-D<sub>15</sub>PC. Leere Quadrate zeigen die experimentell bestimmten liquidus (rot) und solidus (grün) Grenzen. Entsprechend repräsentieren gefüllte Keulen die aus der Simulation erhaltenen Punkte.

Zu diskutieren ist die erkennbare Abweichung bei niedrigen Temperaturen. DLPC weist als relativ kurzketziges Lipid keine ausgeprägte Phasenumwandlung auf. Es sind in den kalorimetrischen Daten einige ausgedehnte Strukturen neben einem deutlichen Maximum bei  $T_c = -2,4^\circ\text{C}$  zu erkennen. Dies führt zu einem insgesamt ca.  $\Delta T = 7^\circ\text{C}$  breiten Übergangsbereich. Diese Eigenschaft lässt sich in der hier angesetzten Simulation nicht berücksichtigen. Wir finden daher in der simulierten Wärmekapazität von DLPC einen einzelnen Peak bei ca.  $T_c = -2,4^\circ\text{C}$ <sup>3</sup>.

Die makroskopische Repräsentation des fluiden und gelförmigen Phasenanteile ist die Fläche fluiden und gelförmiger Domänen. Das untersuchte System DLPC-D<sub>15</sub>PC (2.5-7.5) zeigt einen

<sup>1</sup>cp-Profil:  $50 \times 50$ -Matrix

<sup>2</sup>Die Phasengrenzen wurden nach der Tangentenmethode (z.B. [52]) aus den simulierten und experimentellen Wärmekapazitätprofilen bestimmt.

<sup>3</sup>Es ist anzunehmen, dass die Simulation daher auch nicht den exakten Zustand aller Mischungen wiedergibt, jedoch soll mit der Simulation lediglich das Prinzip gezeigt werden.

Koexistenzbereich zwischen etwa  $T = 19^{\circ}\text{C}$  und  $T = 30^{\circ}\text{C}$ , wie aus dem Phasendiagramm abzulesen ist.

In Abb. 3.2 stellen wird zunächst typische Erscheinungsbilder der Phasenseparation auf Vesikeln dar.

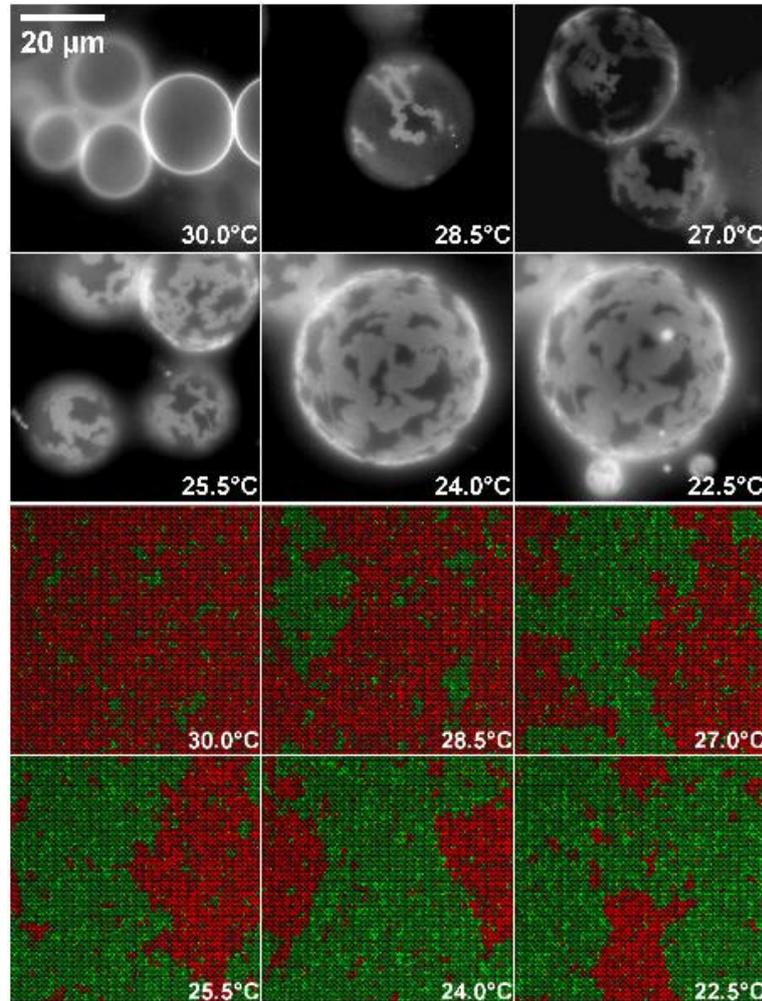


Abbildung 3.2.: *Obere Reihe: Phasenseparation auf Vesikeln mit abnehmender Temperatur.  
Untere Reihe: Graphische Darstellung der Simulation.*

Unter etwa  $T = 29^{\circ}\text{C}$  ist die Separation in eine gelförmige (hell) und eine fluide (dunkel) Phase zu beobachten. Der Anteil der gelförmigen Phase nimmt mit abnehmender Temperatur zu. Vesikel sind nicht über den gesamten Übergangsbereich dargestellt, da unterhalb von  $T = 22,5^{\circ}\text{C}$  keine Zuwachs an gelförmiger Fläche mehr zu beobachten war. Ein ähnliches Aussehen der Domänenstruktur erhalten wir auch in der Simulation (Untere Reihe). Dabei sind fluide Bereiche rot dargestellt und gelförmige grün.

Nun betrachten wir in Abb. 3.3 die Phasenseparation auf Tethern.

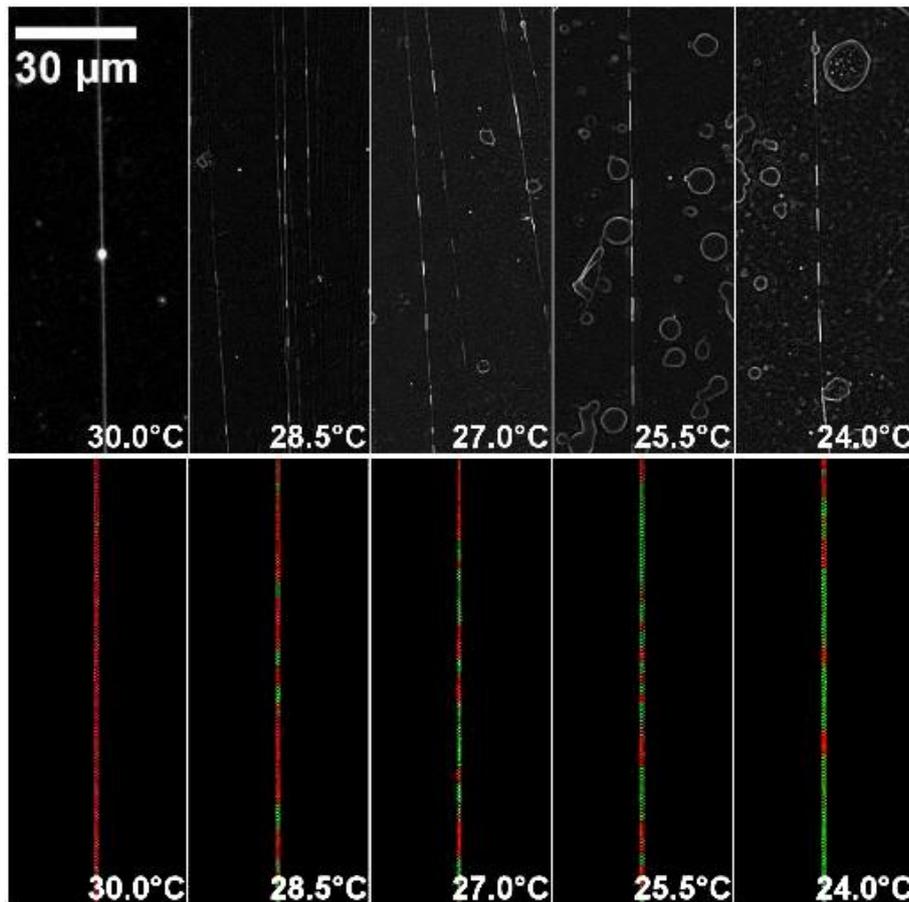


Abbildung 3.3.: Obere Reihe: Phasenseparation auf Tethern mit abnehmender Temperatur.  
Untere Reihe: Graphische Darstellung der Simulation.

Wieder wird unter etwa  $T = 29^\circ\text{C}$  die Separation erstmals sichtbar. Auf den Tethern tritt dabei ein Ordnungsübergang zu quasi eindimensionaler Separation auf. Dünne Tether separieren ausschließlich in fluide und gelförmige Abschnitte. Diesen Effekt werden wir später ausführlich diskutieren (Kapitel III 3.3.1). Der Anteil gelförmiger Abschnitte nimmt auch hier mit sinkender Temperatur zu. Wohl aufgrund zunehmender Spannung im Tether und konsequentem Riss der Tether, waren bei abnehmender Temperatur unterhalb  $T = 24^\circ\text{C}$  nicht mehr ausreichend Tether vorhanden.

Die Simulation zeigt ebenfalls den Ordnungsübergang in der Domänenstruktur auf Tethern<sup>4</sup>. Die

<sup>4</sup>Obwohl mit der Simulation nur ein System aus wenigen Lipiden modelliert wird, zeigt sich, dass im thermodynamischen Gleichgewicht, der Ordnungsübergang dann auftritt, wenn Domänenstrukturgrößen in den Bereich der Systemgröße kommen. Im realen System entstehen aufgrund von z.B. Linien- und Oberflächenspannung wesentlich größere Domänen und daher kann der Übergang auch bei einer größeren Systemgröße beobachtet werden.

experimentell beobachteten Domänenstrukturen stellen (diese Simulation als Maß nehmend) also tatsächlich einen thermodynamisch stabilen Zustand dar.

### 3.2. Domänen als thermodynamische Ordnungsparameter

Aus den Anteilen der jeweiligen Phasen wollen wir den thermodynamischen Zustand des Systems ableiten. Die gesamte Fläche der fluiden bzw. gelförmigen Domänen stellt den fluiden  $N_f$  bzw. gelförmigen Phasenanteil  $N_g$  dar. Der Vergleich zur Gesamtfläche bzw. Gesamtlänge,  $N_{ges}$  ergibt den relativen Anteil fluiden und gelförmiger Phase  $\theta_{f,g} = N_{f,g}/N_{ges}$ . Dabei betrachten wir in Vesikeln nur den obersten fokussierten Teil ausreichend großer Vesikeln. Damit muss eine Projektion der Flächen aufgrund der Krümmung der Vesikel nicht mitberücksichtigt werden<sup>5</sup>. Die resultierenden Werte für Vesikel (grüne Kreise) und Tether (rote Vierecke) und der Vergleich zu den simulierten Werten<sup>6</sup> (blaue Linie) sind in Abb.3.4 dargestellt.

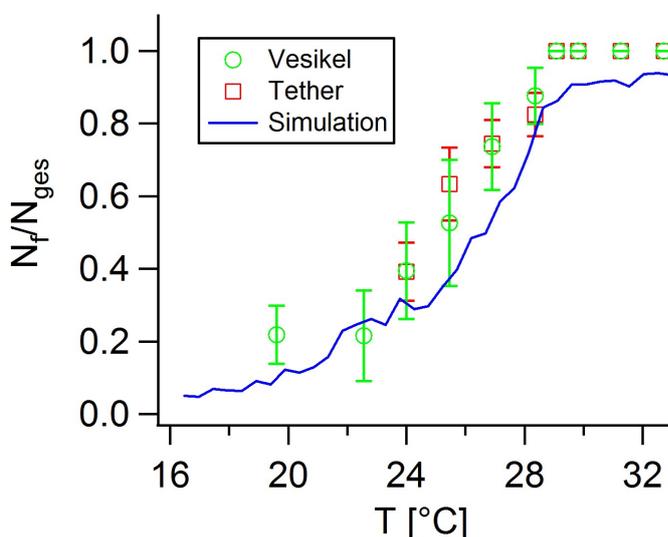


Abbildung 3.4.: Relativer Anteil fluiden Phase in Vesikeln (grüne Kreise), Tethern (rote Vierecke) und aus der Monte-Carlo-Simulation (blaue Linie).

Die Werte für Tether und Vesikel stimmen innerhalb der Fehler überein. Wir sehen die oben erwähnten Einschränkungen bezüglich des Messbereichs in den Tethern. Zudem ist in Vesikeln auch unterhalb von  $T = 22,5^\circ\text{C}$  ein endlicher Anteil ( $\theta \approx 0.22$ ) fluiden Phase zu erkennen<sup>7</sup>.

<sup>5</sup>Für das Ergebnis berücksichtigen wir mindestens  $n = 14$  Vesikel bzw. Domänen auf Tethern (für Tether bei  $T = 24^\circ\text{C}$ ,  $n = 7$ ) bei einer Temperatur zur Bestimmung der Phasenanteile.

<sup>6</sup> $50 \times 50$ -Matrix

<sup>7</sup>Diese ist wohl darauf zurückzuführen, dass zu Ende des Prozesses meist kleine fluide Bereiche von einer gelförmigen Matrix eingeschlossen sind. Diese wirkt als starre Randbedingung und verhindert eine weitere Umwandlung der fluiden in die gelförmige Phase.

Weder die Krümmung im hier experimentell zugänglichen Bereich, noch der strukturelle Übergang zu quasi eindimensionaler Phasenseparation beeinflussen in unserem Experiment also das makroskopische Phasenverhalten wesentlich. Möglich wäre jedoch eine Veränderung der Phasenumwandlung bzw. eine Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur  $T_c$  durch die Spannung im Tether gewesen. Wir schätzen diesen Effekt ab.

Die Temperatur der Phasenumwandlung  $T_c$  ist als Funktion der Enthalpie  $H_0$  und der Entropie  $S$  gegeben durch [37]

$$T_c = \frac{\Delta H_0}{\Delta S} \quad (3.1)$$

Bei einer Veränderung der Enthalpie um  $\Delta(\Delta H_0)$  ergibt sich eine Verschiebung der Umwandlungstemperatur um  $\Delta T_c$ . Betrachtet man nur Veränderungen die durch eine Veränderung der Fläche  $\Delta A$  entstehen, wird die Veränderung der Enthalpie  $\Delta H_0 = \Pi \Delta A$ . Mit G. 3.1 ergibt sich die Verschiebung der Temperatur der Phasenumwandlung zu

$$\Delta T_c = \frac{\Delta(\Pi \Delta A)}{\Delta S} = \Delta \Pi T_c \frac{\Delta A}{\Delta H_0} \quad (3.2)$$

Den Oberflächendruck  $\Pi$  im Tether kann aus dem Umfang  $R_{Te}$  und der Biegesteifigkeit  $\kappa$  des Tethers abgeschätzt werden [53, 54]

$$R_{Te} = \sqrt{-\frac{\kappa}{2\Pi}} \quad (3.3)$$

Für typische Werte der Biegesteifigkeit  $\kappa \approx 10^{19} J$  (z.B. [33]) ergibt sich für einen Tether mit einem Radius von  $R = 500 nm$  für die Verschiebung der Umwandlungstemperatur

$$\Delta T_c \approx 10^{-6} K \quad (3.4)$$

Diese verschwindend kleine Verschiebung begründet die Vergleichbarkeit der Phasenanteile in Vesikeln und Tethern.

Um die Gültigkeit der makroskopischen Phasenanteile als thermodynamischen Ordnungsparameter zu prüfen, leiten wir die Überschuss-Wärmekapazität aus den Phasenanteilen ab. Mit der phänomenologischen Proportionalität von Enthalpie- und Flächenveränderung [29]

$$\Delta A = \gamma \Delta H \quad (3.5)$$

ergibt sich die Wärmekapazität zu

$$c_p = \left( \frac{dH}{dT} \right)_p = \left( \frac{dA}{\gamma dT} \right)_p \quad (3.6)$$

Nun ist die Verbindung zwischen der Flächenänderung  $\Delta A$  und dem fluiden Phasenanteil zu bestimmen. Für ein einkomponentiges System ist die Flächenänderung gerade

$$\Delta A = n_f \left( \frac{a_f}{a_g} - 1 \right) A_{ges} \quad (3.7)$$

mit dem fluiden Phasenanteil  $n_f$ , der molekularen Flächen des Lipids in der fluiden  $a_f$  und gelförmigen  $a_g$  Phase und der Gesamtfläche  $A_{ges}$  des betrachteten Systems.

Für ein mehrkomponentiges System stellt sich dieser Zusammenhang komplizierter dar. Es muss die Abhängigkeit der molekularen fluiden und gelförmigen Fläche von der Kettenlänge beachtet werden. Die Flächenänderung einer Membran ist nach Gl. 3.5 linear proportional zur Schmelzenthalpie  $\Delta H$  [29]. Gleiches gilt natürlich für die entstehende molekulare Flächenänderung  $\Delta a = (a_f - a_g)/a_g$  während der Phasenumwandlung. Nun ist zudem zu berücksichtigen, dass zu Beginn der Phasenumwandlung hauptsächlich das niedrigschmelzende Lipid in die fluide Phase übergeht. Bei höheren Temperaturen schmilzt dann zunehmend die höherschmelzende Komponente. Dem tragen wir in erster Näherung durch eine lineare Gewichtung  $f(T) = (T - T_u)/(T_o - T_u)$  im Koexistenzbereich Rechnung, wobei  $T_u$  die Temperatur des Beginns der Phasenumwandlung bezeichnet und  $T_o$  die Temperatur des Endes der Phasenumwandlung<sup>8</sup>. Weiter ist der Anteil von DLPC  $m_{DL} = 0.25$  und D<sub>15</sub>PC  $m_{D15} = 0.75$  zu berücksichtigen und die tatsächliche Flächenänderung wird.

$$\Delta A(T) = [n_f(T)\Delta a_{DL}m_{DL}(1 - f(T)) + f(T)n_f(T)\Delta a_{D15}m_{D15}] A_{ges} \quad (3.8)$$

Daraus erhalten wir die in Abb. 3.5 dargestellte Wärmekapazität<sup>9</sup>. Der Verlauf stimmt qualitativ

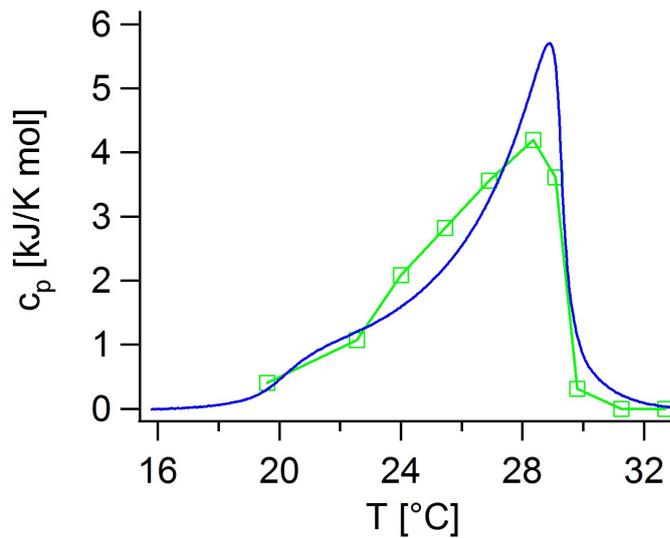


Abbildung 3.5.: Wärmekapazitätsprofil des Systems DLPC-D<sub>15</sub>PC: Vergleich des aus der Entwicklung des fluiden Phasenanteils berechneten (grüne Quadrate) und des kalorimetrisch bestimmten (blaue Linie) Verlaufs.

gut mit der kalorimetrisch bestimmten überein, was die Gültigkeit des fluiden bzw. gelförmigen

<sup>8</sup>Extrahiert aus dem kalorimetrischen cp-Profil.

<sup>9</sup>Die Daten des fluiden Flächenanteils wurden für die Berechnung interpoliert und geglättet und dann auf die ursprüngliche Temperaturskala rückprojiziert.

Phasenanteils als Ordnungsparameters nahelegt. Somit kann aus den makroskopischen Repräsentationen der Phasen der thermodynamische Zustand des Systems abgeleitet werden.

### 3.3. Dimensionalität der Domänenstruktur

#### 3.3.1. Eindimensionale Phasenseparation

Die beobachtete eindimensionale Phasenseparation auf Tethern trat auf, sobald typische Strukturgrößen von Domänen mit dem Radius des Tethers vergleichbar wurden. Im Folgenden versuchen wir die quasi eindimensionale Phasenseparation auf eine Minimierung der Grenzlinie der Domäne, und damit ihrer Gesamtenergie zurückzuführen. Ein wichtiger Punkt ist dabei die Adaption der Domänengestalt aufgrund des Beitrages der Energie der Grenzlinie. Diese freie Adaption kann allerdings streng nur dann erfolgen, wenn kein signifikanter Beitrag der Scherviskosität eine Anpassung verhindert.

In der flüssig-gel Koexistenz kann diese Betrachtung nicht unkommentiert übernommen werden. Hier besitzt die gelförmige Phase eine nahezu kristalline Ordnung. Daher haben die beobachteten Domänen eine eher zerklüftete Gestalt. Dennoch führt wohl ein signifikanter Beitrag der Energie der Grenzlinie dazu, dass die Domänen eher weiche Ränder zeigen und nicht beliebig lang und dünn werden können. Die folgenden Argumente für die theoretische Beschreibung der quasi eindimensionalen Phasenseparation gelten daher streng nur für die flüssig-flüssig Koexistenz. Experimentell werden wir dies auch in einem solchen System zeigen. Grundsätzlich gelten jedoch identische Argumente.

Durch die Monte-Carlo-Simulation konnten wir Hinweise finden, dass die Entstehung von den Tether umgreifenden Domänen auch im thermodynamischen Gleichgewicht zu beobachten ist. Offensichtlich stellt eine den Tether umgreifende Domäne ein Minimum der Energie der Domäne dar. Die differenzielle freie Helmholtzsche Energie einer Domäne bei konstanter Temperatur und Partikelzahl  $dT = dN = 0$  ist

$$dF = \Pi dA + \gamma dl \quad (3.9)$$

Wobei  $\Pi$  den Oberflächendruck,  $A$  die Fläche der Domäne,  $\gamma$  die Linienspannung und  $l$  die Länge der Domänengrenze bezeichnet. Wir betrachten eine Domäne konstanter Fläche  $A$  und damit reduziert sich Gl. 3.9 zu

$$dF = \gamma dl \quad (3.10)$$

Auf einer flachen Geometrie wird sich daher stets, aufgrund der Minimierung der Länge und damit der Energie der Grenzlinie, eine zirkuläre Gestalt einstellen. Die Energie einer solchen zirkulären Domäne ist dann

$$E_{L,F}(A) = 2\gamma\sqrt{A\pi} \quad (3.11)$$

Dies ändert sich auf einem Tether, also einer zylinderförmigen Geometrie. Eine den Zylinder (Tether) mit Radius  $R_{Te}$  umgreifende Domäne der Fläche  $A$  besitzt stets die konstante Energie

$$E_{L,Zy}(A) = 4\pi\gamma R_{Te} = konst. \quad (3.12)$$

Die Energie der den Tether umgreifenden Domäne ist nur bestimmt durch den Radius des Tethers  $R_{Te}$  und bleibt für beliebige Domänenflächen konstant. Auf der flachen Membran dagegen, nimmt die Energie für eine zirkuläre Domäne mit der Wurzel der Fläche zu (Gl. 3.11). In erster Näherung wird daher die Energie einer den Tether umgreifenden Domäne kleiner, als die der zirkulären Domäne, wenn der Radius einer Domäne etwa den Umfang des Tethers erreicht<sup>10</sup>.

$$E_F(A) = E_{Zy}(A) \quad (3.13)$$

also für

$$\frac{1}{2} \sqrt{\frac{A}{\pi}} = R_{Te} \quad (3.14)$$

Um diesen Effekt detaillierter experimentell darstellen zu können, präparierten wir Tether im beschriebenen fluid-fluid System (1)DOPC-(1)DPPC+20/40%Cholesterol bzw. (1)DOPC-(1-x)DPPC-(xDPPG)+20/40%Cholesterol. Die Domänengestalt ist hier dominiert durch die Linienspannung [11] und Domänengestalten sollten sich nach dieser Randbedingung einstellen.

In Kapitel II 1.1 haben wir beschrieben, dass durch Photooxidation in Lipidsystemen die Cholesterol enthalten, eine Phasenseparation durch Beleuchtung induziert werden kann [44, 45]. Im Folgenden nutzen wir diesen Effekt positiv und lösen die Phasenseparation in Tethern auf diesem Weg aus. Anschließend beobachten wir die Entwicklung der Gestalt der Domänen. In Abb.3.6

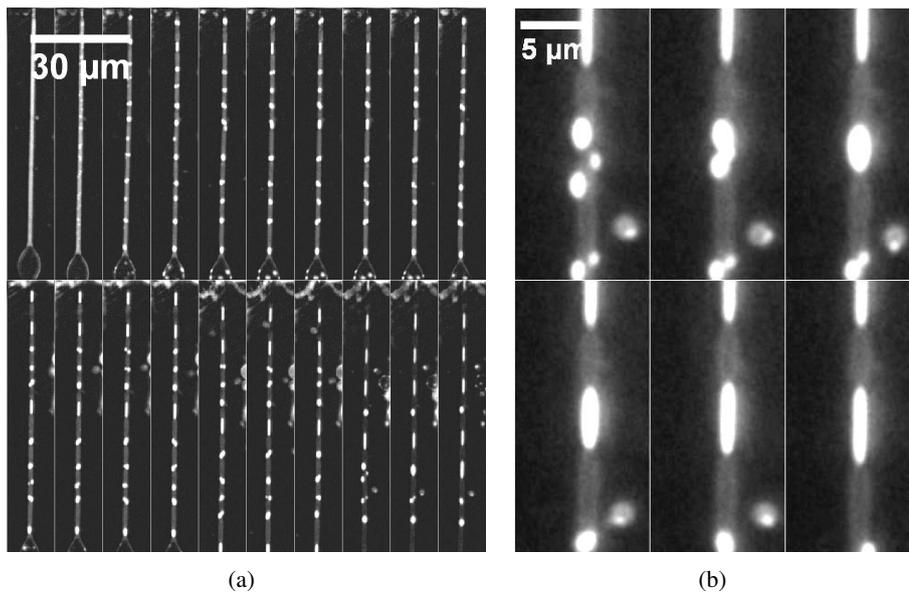


Abbildung 3.6.: Photooxidativ induzierte Phasenseparation auf Tethern in der fluid-fluid-Koexistenz (System (1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG-40% Cholesterol).

ist die Bildung und der folgende Wachstumsprozess von flüssig ungeordneten Domänen auf einem Tether mit einem Durchmesser von ca.  $d = 2\mu m$  zu beobachten. Zu Beginn zeigt der Tether

<sup>10</sup>Im Detail müsste natürlich die Geometrie berücksichtigt werden, da wir aber nicht direkt am Übergangsbereich interessiert sind, genügt diese erste Näherung der Beobachtung.

eine homogene Phase. Beleuchtung initiiert die fluid-fluid Phasenseparation, was sich zu Beginn durch ein gebrochenes Aussehen der Oberfläche darstellt. Es erscheinen dann zahlreiche Domänen auf der Tetheroberfläche, die zunächst frei diffundieren. Durch fortlaufende Kollision und Verschmelzung, in Abb. 3.6(b) detailliert dargestellt, wachsen die Domänen in der Größe. Sobald die Domänen eine Größe vergleichbar mit dem Tetherradius erreichen, bildet sich eine den Tether umgreifende Domäne. Nach einiger Zeit ist der gesamte Tether in Bereiche alternierender Phasen unterteilt (Abb. 3.6(a))<sup>11</sup>.

In Abb. 3.6(b) ist auch der Einfluss der Linienspannung der Domänengrenze und die höherer Biegesteifigkeit der flüssig geordneten (dunkel) Phase zu erkennen. Es bildet sich an der Phasengrenze eine Einschnürung des Tethers. Die Biegesteifigkeit ist an der Wölbung der flüssig geordneten Bereiche gegenüber keiner erkennbaren Wölbung der flüssig ungeordneten Bereiche (hell) zu erkennen.

Die Kopplung zwischen Domänenstruktur und Geometrie aufgrund der Minimierung der Energie wird nochmals in Abb. 3.7 deutlich. Hier manifestiert sich die Kopplung zwischen Geometrie und Struktur der Oberfläche in der Ausrichtung verschiedener Phasen bezüglich der vorhandenen Krümmung. Es ist eine große, spindelförmige Vesikel auf einem Tether zu erkennen. Wiederum wird die Phasenumwandlung durch Photooxidation induziert.

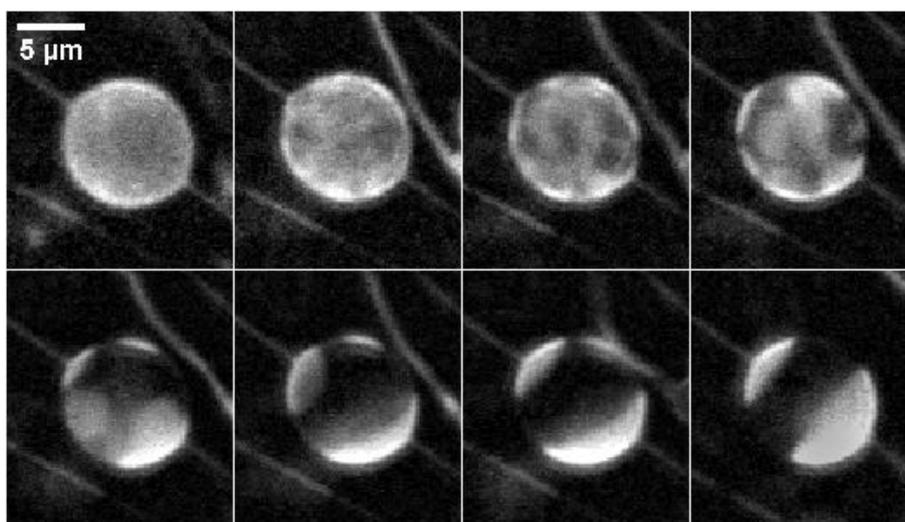


Abbildung 3.7.: *Phasenseparation in einer großen spindelförmigen Vesikel auf einem Tether (System: (1)DOPC-(0.8)DPPC-(0.2)DPPG-40% Cholesterol).*

Domänen wachsen wieder durch Verschmelzung in der Größe. Dabei bevorzugt die geordnete Phase Bereiche niedriger Krümmung, in diesem Fall die Taille des Vesikels. Die ungeordnete Phase dagegen reichert sich bevorzugt in Bereichen hoher Krümmung, also dem Übergang vom Vesikel auf den Tether, an.

<sup>11</sup>Es können in diesen Systemen auch andere Erscheinungsformen des Domänenwachstums beobachtet werden, was wir in Kap. III 5.5 vorstellen.

### 3.3.2. Helikale Domänenstrukturen - Spiegel der molekularen Symmetrie

Im Übergangsbereich der Systemgröße, zwischen der ungeordneten Domänenstruktur auf der flachen Membran und der quasi 1d-Separation auf dünnen Tethern fanden wir in der flüssig-gel Koexistenz helikale Domänenstrukturen, was in Abb.3.8(a) dargestellt ist.

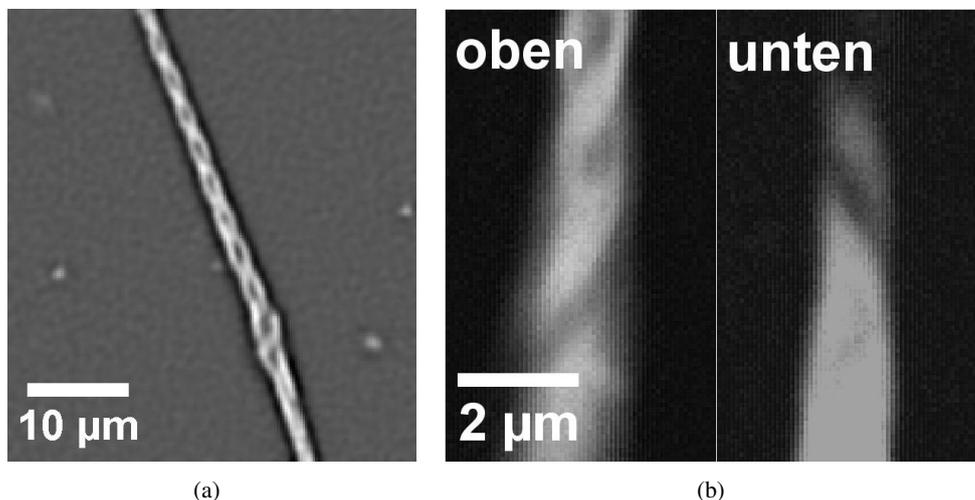


Abbildung 3.8.: a) Helikale Domänenstruktur auf einem Tether in der fluid-gel Koexistenz (System: DLPC-D<sub>15</sub>PC (2.5-7.5)). b) Der Drehsinn ist stets rechtshändig, was die Richtung der Lamellen bei Fokussierung auf den oberen und unteren Teil des Tethers zeigt.

Dabei konnten wir den Drehsinn solcher Strukturen in unseren Experimenten stets als rechtshändig nachweisen. Dies war an der Ausrichtung der Domänenstruktur bei Fokussierung auf den oberen und unteren Teil des Tethers festzustellen (Abb. 3.8(b)). Dieser globale Drehsinn scheint ein Resultat der molekularen Chiralität der Lipide zu sein. Die hier verwendeten Lipide waren Enantiomere der rechtshändigen Chiralität (L(+)). Offensichtlich drückt sich also die molekulare Chiralität in der makroskopischen Domänenstruktur aus.

Auf Monolayern wurden chirale Domänen als makroskopische Repräsentation der Chiralität der beteiligten Moleküle beobachtet [55, 56, 57]. Da nur eine Monolage vorliegt, kann sich hier die molekulare Chiralität ausprägen. In der Doppellage der Vesikelmembran ist dies dagegen erstaunlich, da Domänen nicht einer Monolage zugeschrieben werden können, sondern stets in beiden Monolagen der Membran gekoppelt sind. Wir vermuten, dass die Krümmung des Tethers zu einem Symmetriebruch führt, der die Ausprägung des chiralen Charakters ermöglicht.

## 4. Domänendiffusion in Lipidmembranen

Soweit haben wir den Einfluss der Dimensionalität auf die statische Domänenstruktur untersucht. Nun erweitern wir hier die Beschreibung auf die Dynamik der Domänen als freie Brownsche Partikel, woraus sich dann die Viskosität der Membran ableiten lässt.

### 4.1. Formulierung des hydrodynamischen Problems

Die diffusive Bewegung eines Partikel ist fundamental durch die Einsteinbeziehung beschrieben

$$D = \mu k_B T \quad (4.1)$$

Sie verknüpft eindeutig den Diffusionskoeffizienten  $D$  mit einer Mobilität  $\mu$  des Partikels und mit der Temperatur. Die Mobilität ist dabei das Verhältnis der Geschwindigkeit des Partikels  $v_p$  zur verursachenden Kraft  $F$ , also  $\mu = \frac{v}{F}$ .

Für kleine Reynoldszahlen ist die Mobilität gerade das Inverse des Reibungskoeffizienten  $f$ . Eine theoretische Beschreibung der Diffusion eines Partikels beschränkt sich also stets darauf, die Mobilität bzw. dessen Reibungskoeffizienten zu bestimmen. Für die Diffusion in einer 3d-Flüssigkeit bei verschwindenden Reynoldszahlen ist der Diffusionskoeffizient stets invers proportional zum Radius  $a$  des Partikels  $D(a) \sim 1/a$ .

Diese fundamentalen Zusammenhänge ändern sich entscheidend bei einer Veränderung der Dimensionalität. Der hydrodynamische Widerstand eines sich translatorisch in einer zweidimensionalen Flüssigkeit bewegendem Partikel ist grundsätzlich nichtlinear in der Geschwindigkeit [58]. Ursprung der Nichtlinearität ist die Instabilität der linearisierten Navier-Stokes-Gleichung in zwei Dimensionen, gegenüber der Erfüllung der Randbedingung des hydrodynamischen Flusses an der Partikeloberfläche und in unendlicher Entfernung vom Partikel. Es stellt sich heraus, dass es in einer inkompressiblen, zweidimensionalen Flüssigkeit das Geschwindigkeitsfeld weit entfernt vom Partikel nicht mehr auf Null abfallen kann. Einzige stationäre Lösung ist die Bewegung der gesamten Flüssigkeit mit derselben Geschwindigkeit. Damit verschwindet die Relativgeschwindigkeit des Partikels. Dieser Effekt wird als „Stokes Paradoxon“ bezeichnet [13]. Endliche Abmessungen und die Kompressibilität realer Systeme wirken jedoch remobilisierend.

Lösbar ist das hydrodynamische Problem der quasi 2d-Membran umgeben von einer 3d-Flüssigkeit. Jedoch ist die mathematische Behandlung aufgrund der Inhomogenität äußerst komplex. Durch die Kopplung der Membran an das Medium wird Impuls von der 2d-Membran auf die 3d-Flüssigkeit übertragen, was zu einer inhärenten Längenskala  $l_0$  führt. Die Längenskala ist gerade definiert durch das Verhältnis der 3d-Viskositäten des Mediums auf beiden Seiten der Membran  $\eta_1, \eta_2$  und der 2d-Viskosität der Membran  $\eta_M$ . Diese Längenskala wirkt effektiv auf

den scheinbaren Radius des Partikels  $a$  und wird in den Beschreibungen durch das Einführen eines reduzierten Radius  $\epsilon$  berücksichtigt.

$$\epsilon = a \cdot l_0 = a \frac{\eta_1 + \eta_2}{\eta_M} \quad (4.2)$$

Das gesamte gekoppelte hydrodynamische Problem für alle Werte von  $\epsilon$  wurde von Hughes, Pailthorpe und Withe (HPW) [15] gelöst. Die Autoren geben den Diffusionskoeffizienten als Ausdruck der Mobilität  $\mu(\epsilon)$  an.

$$D(\epsilon) = \frac{4\pi}{\epsilon\eta_M} \mu(\epsilon) \quad (4.3)$$

Allerdings ist die exakte Lösung als System gekoppelter Integralgleichungen aufgrund ihrer Komplexität nicht direkt auf experimentelle Ergebnisse anwendbar. Für die Grenzfälle lassen sich aber explizite Lösungen finden

$$\mu(\epsilon) = \begin{cases} \frac{2}{\pi} & \text{für } \epsilon \gg 1 \\ \left[ \epsilon \left( \ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) - \gamma + \frac{4}{\pi}\epsilon - \frac{1}{2}\epsilon^2 \ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) + O(\epsilon^2) \right) \right]^{-1} & \text{für } \epsilon \ll 1 \end{cases} \quad (4.4)$$

Der Ausdruck für kleine  $\epsilon$  ist vergleichbar mit dem von Safmann und Delbrück [14] im Rahmen eines störungstheoretisch erhaltenen Ergebnisses. Für  $\epsilon \ll 1$  überwiegt bei einer Bewegung des Partikels die Dissipation in der Membran. Dies führt zu einer logarithmischen Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Radius. Für  $\epsilon \gg 1$  dagegen überwiegt die Dissipation im Medium und man findet einen Diffusionskoeffizienten, der sich, ähnlich dem im 3d-System, invers proportional zum Partikelradius verhält

$$D(R) = \frac{k_B T}{16\eta a} \quad (4.5)$$

Allerdings ergibt sich aus Gl. 4.5 ein zum 3d-Problem verschiedener Vorfaktor. Nun fehlt eine auf experimentelle Daten anwendbare Näherung für den Übergangsbereich. Kürzlich wurde hierzu von Petrov et al. [17] durch analytische Extrapolation der Grenzfälle des HPW-Modells eine Näherung für alle Werte von  $\epsilon$  vorgeschlagen. Die Autoren separieren den Diffusionskoeffizienten, wie auch in [15], in einen konstanten Beitrag  $D_0 = k_B T / 4\pi\eta_M$ , der durch eine reduzierte Mobilität  $\Delta$  skaliert ist.

$$D(\epsilon) = D_0 \Delta \quad (4.6)$$

mit

$$\Delta = \left[ \ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) - \gamma + \frac{4\epsilon}{\pi} - \left(\frac{\epsilon^2}{2}\right) \ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) \right] \times \left[ 1 - \left(\frac{\epsilon^3}{\pi}\right) \ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) + \frac{c_1 \epsilon^{b_1}}{(1 + c_2 \epsilon^{b_2})} \right]^{-1} \quad (4.7)$$

Diese Grenzfälle und Näherungen und deren experimentelle Eignung werden wir später prüfen und diskutieren.

Als Maß für die Charakterisierung der Diffusion wird später das mittlere Abstandsquadrat  $\langle x^2 \rangle$  dienen. Dieses ist direkt mit dem Diffusionskoeffizienten  $D(a)$  und der Zeit  $t$  verbunden und ist in zwei Dimensionen

$$\langle x^2 \rangle (t) = 4D(a)t \quad (4.8)$$

Dies lässt sich sowohl aus einer Diffusionsgleichung als auch über ein Fluktuations-Dissipation-Theorem erhalten [59, 60].

## 4.2. Experiment und Auswertungsmethoden

Wir bestimmen den Diffusionskoeffizienten  $D(a, T)$  aus dem mittleren Abstandsquadrat  $\langle x^2 \rangle$  der thermischen Bewegung von Domänen verschiedener Größe bei unterschiedlichen Temperaturen. Dazu werden Serien von Fluoreszenzbildern der Oberfläche von phasenseparierten OAV's bei konstanter Temperatur aufgenommen. Der Bildabstand entspricht der zeitlichen Auflösung der Kamera ( $dt = 161ms$ ). Aufgrund der Größe der Vesikel konnten wir zahlreiche Domänen ohne Kollision länger als 400 Bilder ( $\equiv 64s$ ) verfolgen. Sehr kleine Domänen konnten aufgrund ihrer hohen Mobilität meist nur wesentlich kürzer verfolgt werden. In der Regel wurden aber meist nur Domänen, die länger als etwa 100 Bilder verfolgt werden konnten, in die Auswertung mit einbezogen. So war eine hohe Genauigkeit der bestimmten Diffusionskoeffizienten zu erreichen. Fehler erwachsen systembedingt aus der Größenungenauigkeit ( $\Delta d \leq 500nm$ ) aufgrund der optischen Auflösungsgrenze und aus der Ungenauigkeit der Verfolgung. Die Fehler des linearen Fits an das Anwachsen von  $\langle x^2 \rangle$  mit der Zeit, waren so meist  $< 3\%$ . Der wesentlich größere Fehler entsteht aus der Größenungenauigkeit, was insbesondere bei kleinen Radien ins Gewicht fällt. Zusätzlich entstehen Ungenauigkeiten durch hydrodynamische Kopplung in der Membran. Dies versuchten wir auszuschließen indem wir nur Domänen, die über den Zeitraum der Verfolgung eine ausreichende Entfernung zu benachbarten Domänen hatten berücksichtigten.

**Software** Eine verlässliche Bestimmung des Diffusionskoeffizienten und damit der Viskosität ist aufgrund des statistischen Charakters der Diffusion nur durch eine große Anzahl von Domänen verschiedenen Durchmessers oder eine zeitlich ausreichend lange Verfolgung der einzelnen Domäne zu erreichen. Durch die entwickelte Präparation von großen OAV's konnten wir dafür die experimentellen Voraussetzungen schaffen. Es bleibt nun die Position und Größe der Partikel aus den erstellten Bilderserien zu bestimmen. Daraus müssen dann zusammenhängende Trajektorien abgeleitet werden, um das mittlere Abstandsquadrat der einzelnen Partikel zu errechnen.

Der größte Teil der Trajektorien wurde mit Hilfe des Software-Pakets OpenBox erstellt. Dabei ist nur die Verfolgung jeweils einer einzelnen Domäne möglich. Die Größe der Domäne muss manuell bestimmt werden. Daher war es äußerst zeitintensiv eine große Anzahl von Experimenten auf diese Weise auszuwerten.

Daher wurde gegen Ende der Arbeit in Zusammenarbeit mit O. Klinck (Universität Stuttgart) eine Software auf der Basis eines Mustererkennungsalgorithmus in Labview entwickelt. Damit können in einem Film beliebig viele Domänen erkannt und die Partikel-Trajektorien errechnet werden<sup>1</sup>. Diese nutzten wir bei der Untersuchung der Dynamik, der in den in Kapitel 6.5 vorge-

<sup>1</sup>Filme können im unkomprimierten avi-Format geladen werden. Das Originalbild wird zunächst in eine binäres Bild umgewandelt. Durch eine implementierte, adaptive Schwellwertfunktion können auch Bilder äußerst schlechter Qualität bearbeitet werden. Von erkannten Domänen wird dann in jedem Bild Position und Größe, mit Hilfe einer bereits in LabView implementierten Routine, bestimmt. Um Schritte des Programms nachvollziehen zu können, wird ein weiterer Film erstellt, in dem erkannte Domänen mit Quadraten und einer Nummer markiert werden. Ändert sich die Größe einer Domäne oder das Längenverhältnis mehr als ein einstellbarer Schwellwert, wird diese Domäne nicht mehr oder als neue Domäne erkannt. Dies ist eine erste Absicherung, um eine spätere falsche Berechnung von Trajektorien zu vermeiden. Gleichzeitig wird die relative Orientierung der Domäne als Winkelwert ausgegeben.

In einem zweiten Programm-Schritt werden dann zusammenhängende Partikel erkannt und deren Trajektorien

stellten hexagonalen Domänenüberstrukturen.

**Bestimmung der Diffusionskoeffizienten aus den Trajektorien** Sowohl manuell als auch automatisch erhaltene Trajektorien wurden dann mit Hilfe eines entwickelten Skriptes in Igor (WaveMetrix) ausgewertet um den Diffusionskoeffizienten zu erhalten. In Abb. 4.1 sind beispielhaft die erhaltenen Trajektorien von zwei Domänen unterschiedlichen Durchmessers dargestellt.

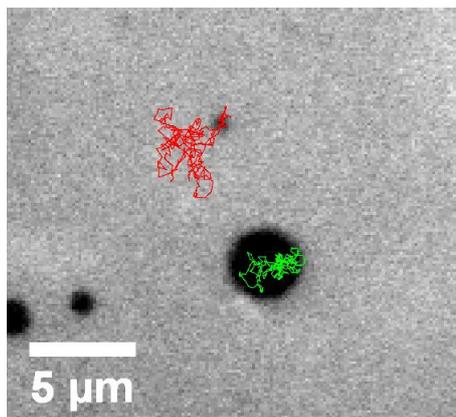


Abbildung 4.1.: Trajektorien der thermischen Bewegung zweier Domänen unterschiedlicher Größe. Deutlich ist der größere, diffusiv abgetastete Bereich der kleineren Domäne zu erkennen.

Es ist bereits deutlich zu erkennen, dass die diffusiv abgetastete Fläche der kleineren Domäne wesentlich größer ist im Vergleich zur großen Domäne. Das Histogramm der Verteilung der Sprünge (rot) für die X- und Y-Richtung zeigt eine Gaußsche Form (Abb.4.2) in beiden unabhängigen Koordinaten.

Beide Verteilungen haben vergleichbare Breite und Höhe. Somit ist die Annahme eines Brownschen Partikels wohl gerechtfertigt. Damit ist der Diffusionskoeffizient wohl definiert und kann aus dem mittleren Abstandsquadrat bestimmt werden.

Mit Hilfe des entwickelten Igor-Skriptes wird aus der Partikelbewegung das mittlere Abstandsquadrat aus der Summe der Quadrate der Sprünge in jedem Zeitintervall errechnet. Die Positionen eines Teilchens in aufeinanderfolgenden Bildern  $\mathbf{x}_n(t)$  ergeben die Sprungweite  $d_n(t)$  im Zeitintervall  $dt$

$$d_n(t) = |\mathbf{x}_n(t) - \mathbf{x}_{n-1}(t + dt)| \quad (4.9)$$

So finden wir für das mittlere Abstandsquadrat, wenn die Trajektorie der Domäne über  $N$  Bilder

---

bestimmt. Hierzu werden in aufeinander folgenden Bildern die Positionen aller erkannten Partikel verglichen. Zwei Partikel in aufeinander folgenden Bildern werden als identisch erkannt, wenn sich die Position um weniger als einen einstellbaren Schwellwert verändert. Es erfolgt wieder eine optische Kontrolle. Selbst bei hohen Partikeldichten waren so zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

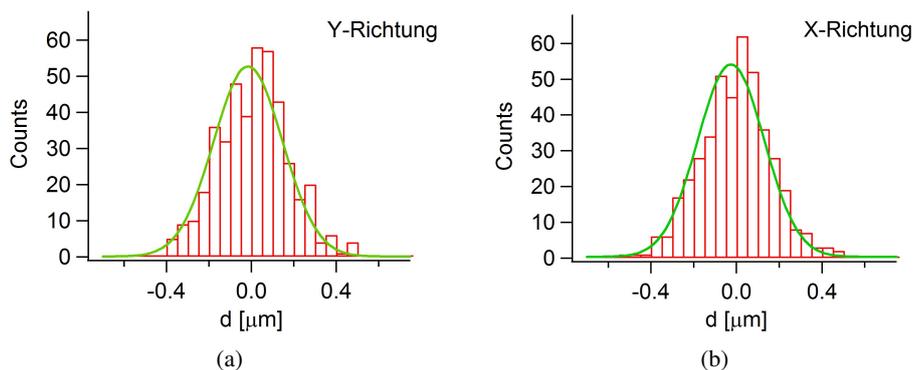


Abbildung 4.2.: Verteilung der Sprünge in jedem Zeitschritt in a) x- und b) y-Richtung der thermischen Partikelbewegung. In beiden Richtungen ist eine vergleichbare Gaußsche Verteilung (grün) zu erkennen, was einen freien Brownschen Partikel bestätigt.

bestimmt wurde.

$$\langle x^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{t=0}^N d_n(t)^2 = 4D(a)t \quad (4.10)$$

Diese Definition ersetzt die Zeitmittelung durch eine Mittelung über die Anzahl der Sprünge. Dies ist gerechtfertigt, solange normale Diffusion vorliegt. Wir wählen diese Mittelung, da die klassische Bestimmung des mittleren Abstandquadrates eine wesentlich größere Anzahl von Partikeln und Zeitschritten benötigt.

### 4.3. Mobilität in der flüssig-flüssig-Koexistenz

Das Lipid-System DOPC-DPPC-(DPPG)-Cholesterol erweist sich aufgrund der existierenden Koexistenz zweier unterschiedlich viskoser flüssiger Phasen ideal zum Studium der Viskosität und der Gültigkeit der vorgestellten Modelle. Aufgrund des flüssigen Charakters und der Dominanz der Linienspannung haben Domänen stets zirkuläre Gestalt. Somit müssen geometrische Einflüsse nicht mit einbezogen werden.

Wir bestimmen also die Mobilität zirkulärer Domänen in Abhängigkeit vom Radius  $a$  der Domäne und der Temperatur, in der flüssig ungeordneten Phase und in der flüssig geordneten Phase<sup>2</sup>.

<sup>2</sup>Die hier dargestellten Daten wurden an Vesikeln mit einem kleinen Anteil DPPA erhoben. Die geschah aus dem Grund, da diese aufgrund ihrer Größe und Stabilität eine gute Auswertung möglich machten. Wie wir später zeigen werden, findet man lediglich eine erhöhte Viskosität der geordneten Phase bei der Anwesenheit von geladenen Lipiden. In allen anderen Punkten bezüglich der Diffusion zeigten sich „geladene“ und „ungeladene“ Vesikel identisch. Insbesondere beobachteten wir, dass in unseren Experimenten das prinzipielle diffusive Verhalten und damit der Vergleich mit den theoretischen Beschreibungen nicht beeinflusst wird. Die spätere Darstellung der Aktivierungsenergie erfolgt aber, um einen Vergleich mit publizierten Daten [19] zu ermöglichen, am „ungeladenen“ System (1)DOPC-(1)DPPC+40%Cholesterol.

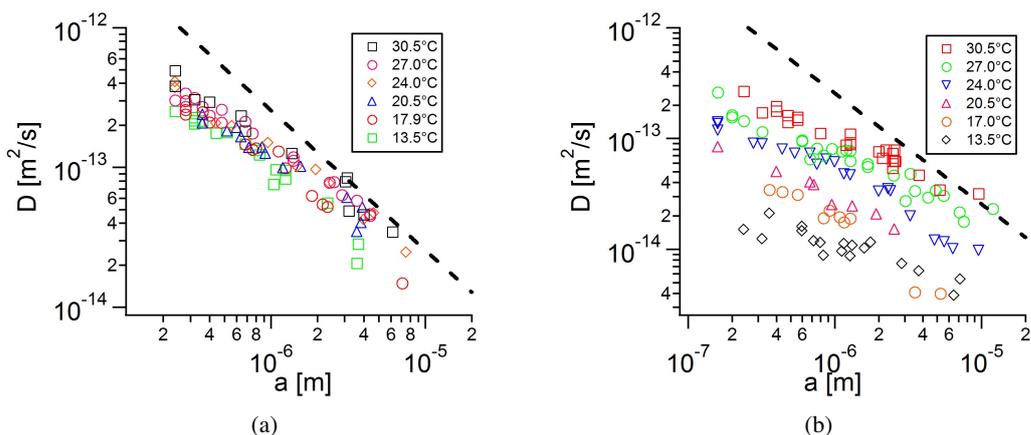


Abbildung 4.3.: Diffusionskoeffizienten der thermischen Bewegung von Domänen in Abhängigkeit vom Radius der Domänen bei  $T = 13.5^\circ\text{C}$ ,  $17^\circ\text{C}$ ,  $20.5^\circ\text{C}$ ,  $24^\circ\text{C}$ ,  $27^\circ\text{C}$ ,  $30.5^\circ\text{C}$ . a) für Domänen in der ungeordneten Phase b) für Domänen in der geordneten Phase.

In Abb. 4.3 sind die Diffusionskoeffizienten in beiden Phasen für verschiedene Temperaturen dargestellt.

Abb. 4.3(a) zeigt den Diffusionskoeffizient  $D(a)$  für Domänen in der ungeordneten Matrixphase für Temperaturen zwischen  $T = 13.5^\circ\text{C}$  und  $T = 30.5^\circ\text{C}$ . Die gestrichelte Linie repräsentiert als einfaches Potenzgesetz die HPW-Näherung  $D(a) \sim 1/a$  für den Grenzfall  $\epsilon \gg 1$  bei  $T = 24^\circ\text{C}$ . Für sämtlichen Temperaturen folgt die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Radius einem vergleichbaren Verlauf. Dieser ist bei großen Radien gut durch die Näherung gegeben. Bei kleinen Radien weichen die Kurven von einem einfachen Potenzgesetz ab. Hier wird wohl der Einfluss der Membran deutlich und das System erreicht den Grenzfall  $\epsilon \gg 1$  nicht mehr.

Wesentlich deutlicher wird das Abweichen von diesem Grenzfall bei der Beobachtung der Diffusion von Domänen in der geordneten Matrixphase wie in Abb. 4.3(b) gezeigt. Die Diffusionskoeffizienten sind für die selben Temperaturen wie zuvor in der ungeordneten Phase dargestellt. Es zeigt sich eine starke Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Temperatur. Der Diffusionskoeffizient verändert sich um mehr als eine Größenordnung über einen Temperaturbereich von ca.  $20^\circ\text{C}$ . Zunehmend weichen die Daten massiv vom  $D(a) \sim 1/a$ -Verhalten ab. Offensichtlich wird die Diffusion zunehmend von der Membran dominiert und das System tritt in den  $\epsilon \ll 1$ -Grenzfall ein.

#### 4.3.1. Einfluss der Viskosität des Mediums

Bis jetzt haben wir den Einfluss veränderlicher Viskosität der Membran auf das hydrodynamische Verhalten der Membran untersucht. Als zweiter Parameter betrifft die Viskosität des Mediums die intrinsische Längenskala  $l_0$  und damit das diffusive Verhalten. Dies ist biologisch

relevant, da sowohl die Plasma-Membran als auch die Membranen von Organellen an das hochviskose Cytosol im Zellinneren gekoppelt sind.

Wir modellieren dies im Folgenden durch Veränderung der Viskosität des Mediums. Diese konnte durch Zugabe von Glukoselösung um nahezu zwei Größenordnungen variiert werden. Der Wert der Viskosität der Glukoselösung wurde nach [61] berechnet. In Abb.4.4 stellen wir den Diffusionskoeffizienten für Diffusion in Glukoselösung der molalen Konzentrationen  $c \sim 0 \text{ mol/kg}$ ,  $c \sim 1 \text{ mol/kg}$  und  $c \sim 3 \text{ mol/kg}$  dar.

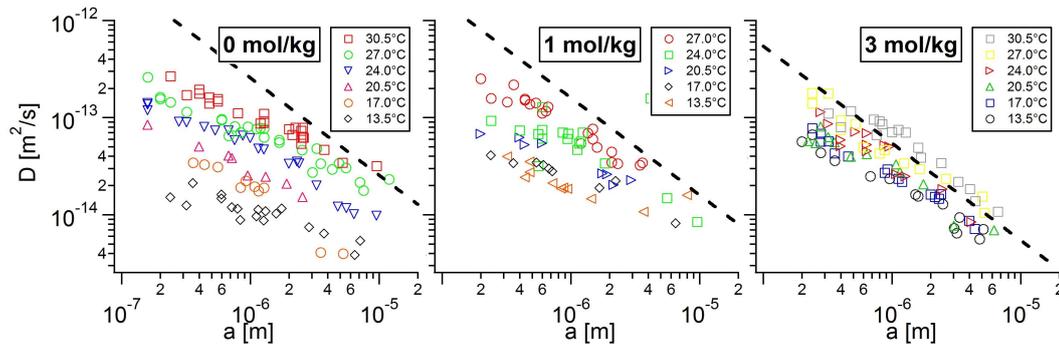


Abbildung 4.4.: Diffusionskoeffizienten der thermischen Bewegung von Domänen in der geordneten Phase in  $c = 0,1,3 \text{ mol/kg}$  Glukoselösung. Die Daten kollabieren mit zunehmender Viskosität des Mediums auf den Grenzfalle  $\epsilon \gg 1$ .

Die gestrichelten Linien zeigen den Grenzfalle  $\epsilon \gg 1$  für die entsprechenden Viskositäten  $\eta$  des Mediums  $D(a) = (k_B T)/(16\eta a)$ . Deutlich zeigt sich bei immer tieferen Temperaturen der Kollaps auf das  $D(a) \sim 1/a$ -Verhalten. Dies entspricht der Erwartung, da durch die Zunahme der Mediumviskosität  $\eta = \eta_1 = \eta_2$  auch der reduzierte Radius  $\epsilon = a \cdot (\eta_1 + \eta_2)/\eta_M$  zunimmt. Somit erreicht das System auch bei immer höherer Membranviskosität den  $D(a) \sim 1/a$  Grenzfalle, für  $\epsilon \gg 1$ . Dies führt schön den Charakter des gekoppelt hydrodynamischen Problems vor Augen.

Auch in der ungeordneten Phase konnten wir bei kleinen Radien ein Abweichen vom  $D(a) \sim 1/a$ -Verhalten beobachten. Dies ist wohl auf den Einfluss der Membran und somit das nicht vollständige Erreichen des Grenzfalles zurückzuführen. Um diesen für eine Betrachtung des reinen Grenzfalles auszuschließen, untersuchen wir die Diffusion in der flüssig-gel Koexistenz im System DOPC-DPPC (7-3). Die flüssige Phase sollte sich aufgrund der Abwesenheit des ordnenden Einflusses des Cholesterols als weniger viskos im Vergleich zur ungeordneten Phase im Cholesterol-haltigen System darstellen. Es gelang in dieser Mischung nahezu zirkuläre, gelförmige Domänen zu beobachten<sup>3</sup>.

In Abb. 4.5(a) präsentieren wir so die Diffusionskoeffizienten gelförmiger Domänen in der flüssigen Membran unter zunehmender Mediumviskosität bei  $T \sim 20^\circ\text{C}$ . Die Mediumviskosität

<sup>3</sup>Hier zeigte sich ein Einfluss der Glucose auf die Domänengestalt. Ohne Glucose sind hier meist nicht zirkuläre Domänen zu beobachten. Jedoch bereits bei kleinen Mengen Glucose ( $c \sim 0.5 \text{ mol/kg}$ ) waren die Domänen meist zirkulär.

wurde wieder durch Zugabe von Glucose zwischen  $\eta_0 \sim 1 \cdot 10^{-3} \text{Ns/m}^2$  bei ( $c = 0 \text{mol/kg}$  Glucose) und  $\eta_{10} \sim 46 \cdot 10^{-3} \text{Ns/m}^2$  ( $c = 10 \text{mol/kg}$  Glucose) variiert.

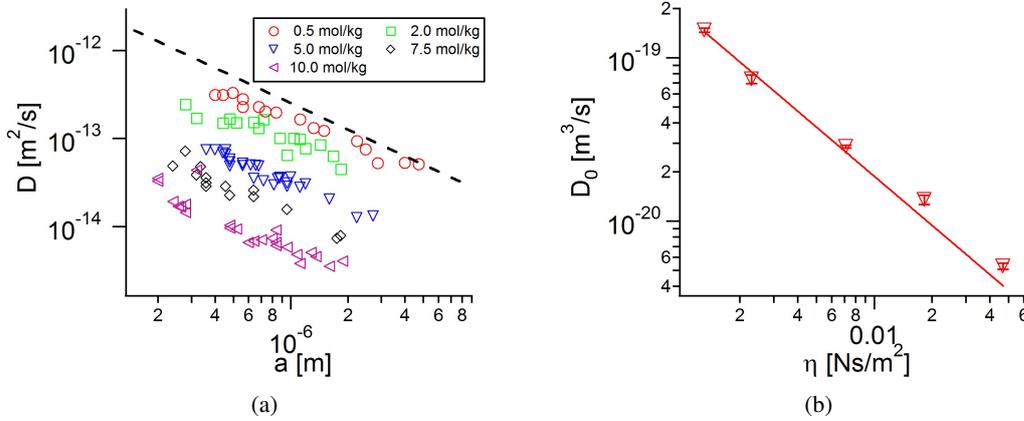


Abbildung 4.5.: a) Diffusionskoeffizienten der thermischen Bewegung von gelförmigen Domänen in der flüssigen Phase im System DOPC-DPPC (7-3) bei variierender Glucosekonzentration ( $c = 0 \dots 10 \text{mol/kg}$ ). b)  $D_0$  als eine Funktion der Viskosität des Mediums  $\eta$ .  $D_0$  verläuft gemäß  $D_0(\eta) \sim 1/\eta$ .

Die Größenabhängigkeit folgt einem einzelnen Potenzgesetz, nahezu identisch für sämtliche Viskositäten des Mediums. Hier war für kleine Radien kein Abweichen vom  $D(a) \sim 1/a$  Verhalten zu beobachten. Damit ist diese Phase wohl tatsächlich fluider als die flüssig geordnete Phase und eignet sich somit besser für die Darstellung des reinen  $\epsilon \gg 1$  Grenzfall.

### 4.3.2. Vergleich mit den Beschreibungen

Mit den beiden vorgestellten Systemen habe wir zwei gut geeignete Kandidaten gefunden, um sie mit den vorgestellten theoretischen Beschreibungen zu vergleichen. Wir konnten sowohl die Grenzfälle  $\epsilon \gg 1$  und  $\epsilon \ll 1$  als auch den Übergangsbereich beobachten. Es gilt nun zunächst die Gültigkeitsbereiche der Grenzfälle zu evaluieren. Dann muss eine für alle Bereiche homogene Beschreibung identifiziert werden, um eine konsistente Analyse, beispielsweise der Viskosität, zu ermöglichen.

Beginnen wir in Abb. 4.5(b) mit dem reinen Grenzfall der durch das Medium dominierten Diffusion im System DOPC-DPPC (7-3). Um diesen darzustellen wurde die Viskosität des Mediums stark variiert ( $\eta : 1 - 46 \cdot 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ ). Der Fit an einzelnes Potenzgesetz gemäß

$$D = \frac{k_B T}{16\eta} \frac{1}{a} = D_0 \frac{1}{a} \quad (4.11)$$

liefert  $D_0$ . Die Auftragung von  $D_0$  gegenüber der Viskosität des Mediums  $\eta$  in Abb. 4.5(b) offenbart sehr gut den erwarteten  $D(a, \eta) \sim 1/\eta$ -Zusammenhang. Die Diffusion im Medium-dominierten Grenzfall kann somit entsprechend der Theorie durch die Betrachtung des Mediumsbeitrages beschrieben werden.

Wesentlich komplizierter stellt sich die Situation für die Diffusion in der flüssig geordneten Phase dar. Es war ein signifikantes Abweichen vom  $D(a) \sim 1/a$ -Verhalten zu erkennen (Abb. 4.3(b)). Wir prüfen die Anwendbarkeit der zu Beginn vorgestellten Näherungen anhand ausgewählter Daten in Abb. 4.6(b).

Es sind Diffusionskoeffizienten von Domänen in der geordneten Phase bei  $T = 7^\circ\text{C}$  (rote Quadrate<sup>4</sup>) und bei  $T = 30.5^\circ\text{C}$  (grüne Kreise<sup>5</sup>) dargestellt<sup>6</sup>.

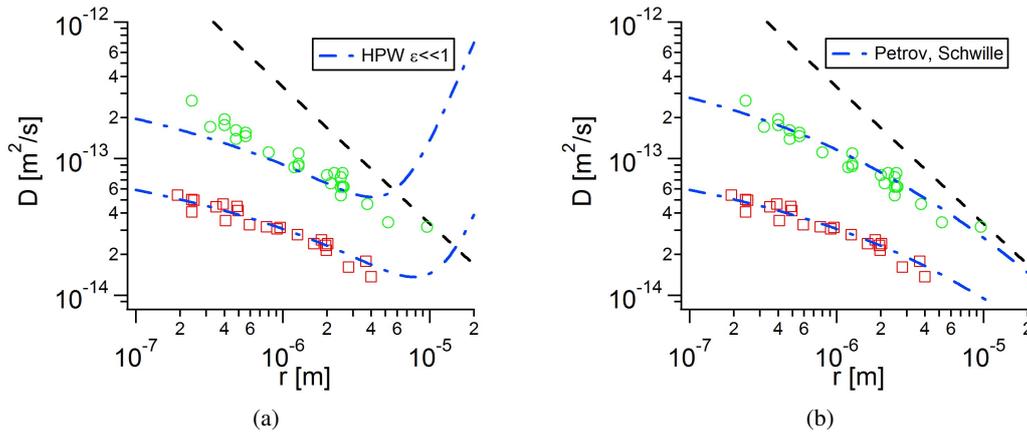


Abbildung 4.6.: Fits an die Diffusionskoeffizienten in der geordneten Phase bei  $T = 30.5^\circ\text{C}$  (grüne Kreise) und  $T = 7^\circ\text{C}$  (rote Vierecke). Die gestrichelte schwarze Linie zeigt den Grenzfall des HPW-Modells für  $\epsilon \gg 1$  bei  $T = 30.5^\circ\text{C}$  ohne freien Parameter. a) Gepunktet-gestrichelte Linien repräsentieren den Fit der HPW-Näherung für  $\epsilon \ll 1$  b) Fits an die Petrov-Schwille-Näherung der HPW-Beschreibung für alle  $\epsilon$  (blaue gepunktet-gestrichelte Linien).

Wie bereits zuvor beschrieben, weicht der Verlauf beider Kurven signifikant von der HPW-Näherung  $D(a) = k_b T / 16 \eta a$  für  $\epsilon \gg 1$  ab. Dieser Grenzfall ist ohne freien Parameter als gestrichelte Linie dargestellt. Für die Daten bei  $T = 30.5^\circ\text{C}$  (grün) ist bei großen Radien allerdings der Kollaps auf diesen Grenzfall zu erkennen. Dies entspricht der physikalischen Realität, da für große Radien, also großes  $\epsilon$ , zunehmend die Dissipation im Medium überwiegt.

Die Daten bei  $T = 7^\circ\text{C}$  (rot) lassen bei großen Radien diesen Kollaps gerade noch erahnen, weichen aber für kleine Radien massiv ab. Dies indiziert hier die Dominanz der Dissipation in der Membran.

Der Fit an die HPW-Näherung für  $\epsilon \ll 1$  (Gl 4.4) in Abb. 4.6(a) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der  $T = 7^\circ\text{C}$ -Daten (rot)<sup>7</sup>.

<sup>4</sup>Ungeladenes System: DOPC-DPPC+40%Cholesterol.

<sup>5</sup>Geladenes System wie oben.

<sup>6</sup>Entscheidend für die Demonstration ist, dass die Daten wenig bzw. stark von dem reinen Potenzgesetz abweichen.

<sup>7</sup>Wir verzichten hier auf die Darstellung der Fits an die Saffman-Delbrück-Näherung, da diese vergleichbar mit der HPW-Näherung ist. Einzig weist die SD-Beschreibung ein Singularität auf, bei der Ungültigkeit der Annahme  $\epsilon \ll 1$ . Dies wird in der HPW-Näherung vermieden durch die Berücksichtigung von Termen höherer Ordnung.

Bei hoher Temperatur  $T = 30.5^\circ C$  (grün) versagt der Fit jedoch, beschreibt mit gutem Willen noch den qualitativen Verlauf für kleine Radien. Somit ist der Einfluss der Membran bei kleinen Temperaturen groß genug, um dem Grenzfall  $\epsilon \ll 1$  zu genügen. Für Temperaturen bzw. Domänengrößen im intermediären Bereich befinden wir uns offensichtlich im Übergangsbereich der Gültigkeit beider Grenzfälle.

Die Autoren des HPW-Modells [15] geben Werte, an bis zu jenen die Grenzfälle gültig sind. Wir schätzen den Punkt an dem die Fits von der Kurve abzuweichen beginnen, als den Punkt der Ungültigkeit der Näherung. Wir finden bei der Näherung für  $\epsilon \ll 1$  ein kritisches  $\epsilon_c = 0.39 \pm 0.28$  und für die Näherung  $\epsilon \gg 1$  wird  $\epsilon_c = 6.4 \pm 4.1$ . Dies stimmt gut mit den von den Autoren angegebenen Gültigkeitsbereichen überein.

Es bleibt festzustellen, dass beide Näherungen keine konsistente Beschreibung liefern und somit eine Extraktion homogener Größen bis hier nicht möglich ist.

Die kürzlich vorgestellte analytischen Näherung des HPW-Modelles (Gl. 4.7) für alle  $\epsilon$  von Petrov und Schwille [17] sollte gerade diese Forderung erfüllen, und eine homoge Beschreibung geben. In Abb. 4.6(b) zeigt sich tatsächlich diese Gültigkeit durch eine hervorragende Beschreibung der Daten<sup>8</sup>. So lässt sich mit Hilfe dieser Beschreibung homogen die Viskosität für alle  $\epsilon$  bestimmen.

Parallel zu unseren Untersuchungen erschien eine Publikation von Cicuta et al. [19] über eine vergleichbare Studie. Qualitativ kommen die Autoren zu einem vergleichbaren Ergebnis. Es konnte aber kein so exakter Vergleich mit den Beschreibungen erfolgen, wie er in unserer Studie aufgrund der präzisen Daten möglich war. Gleiches gilt für die Auswertung in der Beschreibung von Petrov et al. [17], die anhand der Daten dieser Autoren ihre Beschreibung prüften.

### 4.3.3. Diffusion als aktivierter Prozess

Da wir nun eine, für alle Daten anwendbare Beschreibung identifiziert habe, können wir die Viskosität der geordneten Phase im System (1)DOPC-(1)DPPC+40%Cholesterol gemäß der Näherung von Petrov und Schwille [17] in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmen. Die Viskosität der Membran in der geordneten Phase folgt, wie Abb. 4.7 zeigt, einem Arrhenius-Verhalten. Ein derartiges exponentielles Verhalten wird häufig bei Flüssigkeiten beobachtet und es kann die Viskosität mit Hilfe einer Arrhenius-Gleichung [63], als aktivierter Prozess dargestellt werden

$$\eta(T) = \eta_0 \exp \left[ \frac{E_A}{RT} \right] \quad (4.12)$$

Hierbei bezeichnet  $E_A$  die Aktivierungsenergie die für den Platzwechsel zweier Moleküle der Flüssigkeit aufgebracht werden muss. Aus dem Verlauf der Membranviskosität mit der Temperatur in Abb. 4.7 lässt sich dann eine Aktivierungsenergie von  $E_A = 77 \pm 4 kJ/mol$  errechnen. Die Beobachtung eines reinen Arrhenius-Verhaltens entspricht nicht dem von Petrov und Schwille

<sup>8</sup>Anzumerken ist, dass manchmal ein Abweichen für große Radien erkennbar ist. Dies ist könnte auf einen Höhenunterschied zwischen Domäne und Matrixphase und daraus entstehenden zusätzlichen hydrodynamischen Widerstand zurückzuführen sein. Dies könnte mit dem von Naji et al. [62] vorgeschlagenen Vorgehen berücksichtigt werden.

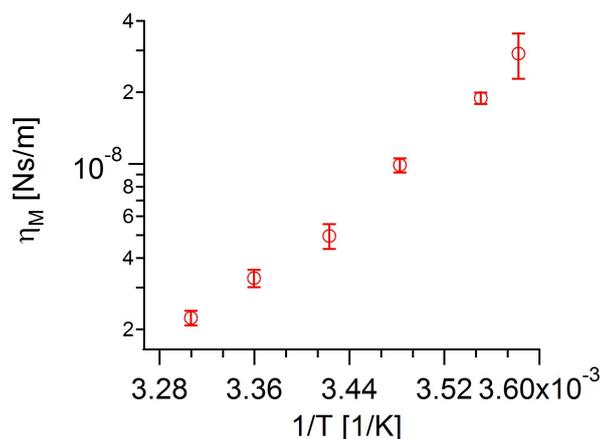


Abbildung 4.7.: Arrhenius-Darstellung der Viskosität in der lo-Phase.

[17] an den Daten von Cicutta et al. [19] in einem ähnlichen System gefundenen zwei Regimes mit unterschiedlicher Aktivierungsenergie.

#### 4.4. Diffusion in quasi 1d-Systemen

Reduzieren wir nun die Dimensionalität noch einmal, indem wir die Diffusion auf Tethern als quasi 1d-System untersuchen. Im vorherigen Kapitel (III 3) hatten wir auf Tethern eine quasi eindimensionale Phasenseparation vorgestellt. Für Domänengrößen vergleichbar mit dem Umfang der Tether, waren diese in Bereiche alternierender Phasen segmentiert. Dies hat natürlich erheblichen Einfluss auf die Mobilität der Domänen. Während Domänen die den Tether nicht vollständig umgreifen weiterhin als freie Brownsche Partikel auf der Oberfläche diffundieren, sind umgreifende Domänen vollständig immobilisiert.

Im Ladungs-enhaltenden System DOPC-DPPC-DPPG+Cholesterol sind oft linsenförmige Domänen der geordneten (dunklen) Phase auf den Tethern zu beobachten. Dabei umgreift die Domäne den Tether nicht vollständig. Dagegen bilden sich zwei symmetrische Domänen, die durch einen dünnen Rand von einander getrennt bleiben<sup>9</sup>. Damit wird die kontinuierliche Matrixphase nicht unterbrochen. Oft kommt es zum Brechen des Randes und es bildet sich eine den Tether umgreifende Domäne. Einige Linsen zeigen sich aber über lange Zeit stabil, was auch mit steigendem Ladungsanteil zunimmt. So kann die in Abb. 4.8(a) dargestellte Situation auftreten, dass eine Linse von zwei den Tether umgreifenden Domänen eingeschlossen wird.

Betrachtet man nun die Diffusion der Linse ist diese frei auf dem Tether beweglich, da ein Fluss der Matrixphase über den dünnen Rand stattfinden kann. Tatsächlich kann diese Diffusion aber nur entlang der Tetherachse stattfinden. Zwei sich treffende Linsen können kollidieren und

<sup>9</sup>Die Linsenform resultiert wohl aus dem Zusammenspiel erhöhter Biegesteifigkeit der geordneten Phase und der Linienspannung. Der Entstehungsprozess wird in Kap. III 5.5 dargestellt.

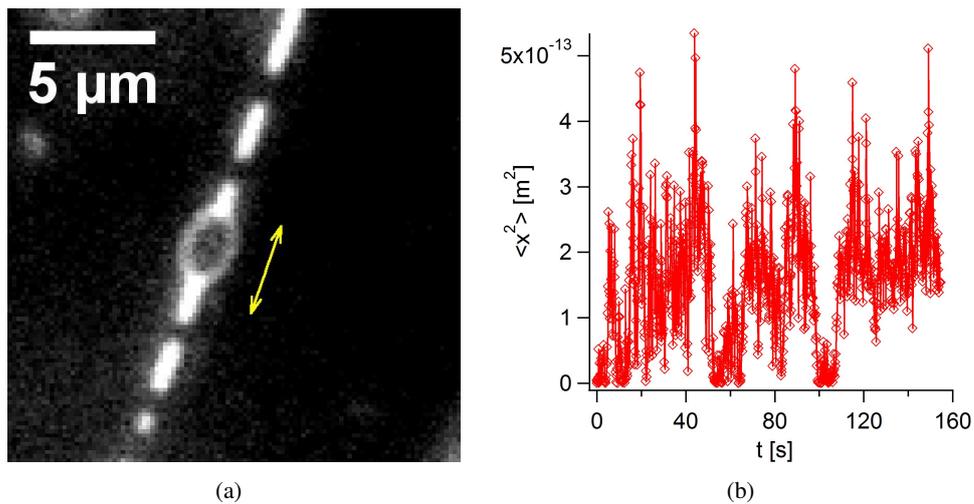


Abbildung 4.8.: a) *Linsenförmige Domäne auf einem Tether, eingeschlossen von zwei den Tether umgreifenden Domänen.* b) *Das mittlere Abstandsquadrat der Linse zeigt anormale Diffusion an (System: (1)DOPC-(0.6)DPPC-(0.4)DPPG+20%Cholesterol).*

verschmelzen, können sich aber nicht ausweichen. Damit ist die Diffusion unter diesem Aspekt tatsächlich eindimensional.

Sehr deutlich wird diese Eigenschaft durch das Auftreten der Immobilisierung einer den Tether umgreifenden Domäne. Da kein Fluss der Matrixphase um diese Domäne erfolgen kann, findet keine diffusive Bewegung statt. Aus dieser Randbedingung ergibt sich auch die Limittierung der Diffusion einer Linse die von zwei den Tether umgreifenden Domänen eingeschlossen ist (Abb. 4.8(a)). Der quadrierte mittlere Abstand in Abb. 4.8(b) der Linse vom Mittelpunkt zwischen den zwei umgreifenden Domänen wächst nie über den durch die Begrenzung vorgegebenen Wert. Ohne diese Randbedingung diffundiert die Domäne frei.

Die Möglichkeit der Immobilisierung einer Domäne stellt auch einen äußerst scharfen Schalter dar. Durch Bildung einer den Tether umgreifenden Domänen lässt sich Diffusion entlang der Tetherachse vollständig unterbinden. Dies beinhaltet unter Umständen auch biologische Relevanz. Es ist bekannt, dass Zellen über sog. „tight junctions“, die prinzipiell ebensolche Tether darstellen, Membrankomponenten austauschen [64]. Dies kann durch solch einen Mechanismus durchaus gesteuert werden.

## 5. Entmischung und Domänenwachstum in der flüssig-flüssig Koexistenz

Bisher haben wir aus der Koexistenz mehrerer Phasen einige Eigenschaften des Systems abgeleitet, jedoch noch nicht die Kinetik der Entmischung behandelt. Aufgrund der Existenz zweier nicht mischbarer flüssiger Phasen im Koexistenzgebiet ist die Membran ein gutes Modellsystem einer binären 2d-Flüssigkeit. Großer Vorteil ist die 2d-Eigenschaft der Membran, die einen guten optischen Zugang ermöglicht.

### 5.1. Entmischungsübergänge

Das Unterschreiten der kritischen Temperatur im System (1)DOPC-(1)DPPC+(20/40%)Cholesterol hat, wie wir bereits wissen, die Entmischung in eine geordnete und die ungeordnete flüssige Phase zur Folge [11]. Da dann die Koexistenz zweier flüssiger Phasen zu beobachten ist, kann man das System als binäre Flüssigkeit verstehen.

In einer idealen binären Mischung existiert oberhalb einer Entmischungstemperatur  $T_m$  eine homogene Phase, wie wir in Abb. 5.1 illustrieren.

Dabei ist  $T_m$  eine Funktion der Konzentrationen  $c_{A,B}$  der Komponenten  $A$  und  $B$ , mit einem Maximum bei der kritischen Konzentration  $c_{krit}$ . Unterhalb der Koexistenzkurve (binodale) entmischt das System in zwei Phasen mit der jeweiligen Gleichgewichtskonzentration. Die Kinetik der Entmischung ist nun dadurch bestimmt, ob das System in den metastabilen oder den instabilen Bereich der Koexistenzgebietes abgekühlt wird. Im metastabilen Bereich ist die Entmischung durch Keimbildung und Wachstum gekennzeichnet. Hier existieren verschiedene Wachstumprozesse, wie Wachstum durch Kollision und Verschmelzung, oder Ostwaldreifung. Bei Abkühlen in den instabilen Bereich zerfällt die Mischung spontan, was als spinodale Entmischung bezeichnet wird (Einen guten Überblick hierzu gibt [65]).

Bedingung für die Unterscheidung zweier Gebiete innerhalb der Phasenkoexistenz ist die Betrachtung des thermodynamischen Faktors

$$\tau = \frac{\partial^2 f}{\partial c_B^2} \quad (5.1)$$

wobei  $f$  die freie Energiedichte bezeichnet. Für  $\tau > 0$  muss eine ausreichend große Konzentrationsfluktuation auftreten, bevor diese ungehindert wachsen kann. Dies ist eine Folge der Energie der gebildeten Grenzfläche, die von der Energieerniedrigung durch Entmischung kompensiert werden muss.

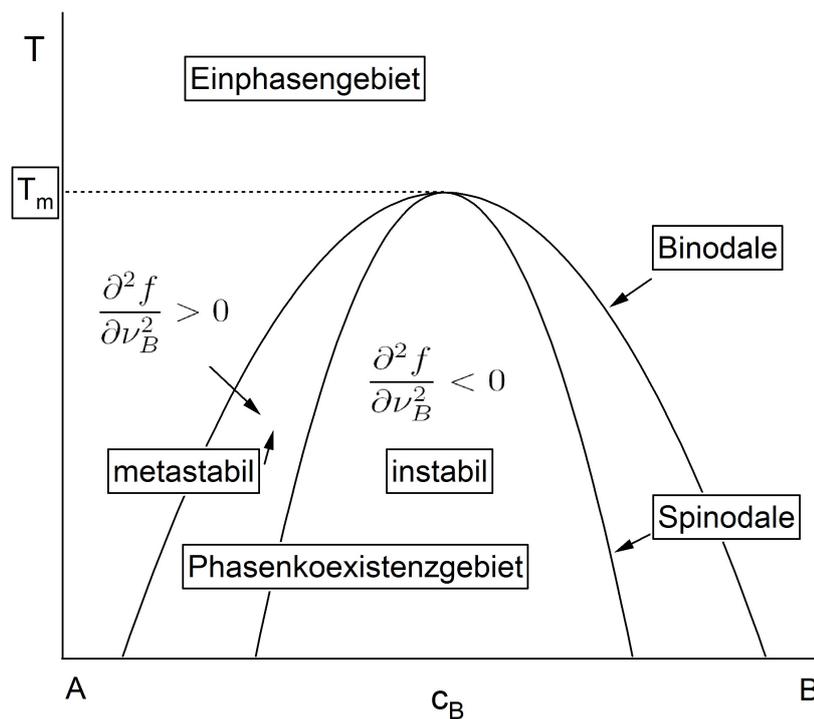


Abbildung 5.1.: Schematisches Phasendiagramm einer binären Mischung

Ist aber bei höherer Übersättigung oder größerer Unterkühlung  $\tau$  kleiner Null, so kann jede infinitesimale Fluktuation ungehindert wachsen, was zum spontanen Zerfall der Mischung führt. Obwohl Keimbildung und Wachstum und spinodale Entmischung zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen sind, ist die tatsächliche praktische Unterscheidung meist schwierig. In experimentellen Arbeiten wurde gezeigt, dass nach einer sehr schnellen ( $\sim ms$ ) anfänglichen spinodalen Entmischung, die entstanden Mikrodomänen durch Diffusion und Verschmelzung weiter wachsen, was dann die Vorgänge ununterscheidbar macht [66, 67, 68].

Die spinodale Entmischung binärer Flüssigkeiten wurde theoretisch auf der klassischen Grundlage der Cahn-Hilliard Theorie [69, 70, 71] beschrieben, die eine Generalisierung des ursprünglichen Ansatzes von van der Waals darstellt [72]. In der linearisierten Cahn-Hilliard Theorie wird in diesem instabilen Bereich ein exponentielles Wachstum der Konzentrationsfluktuationen mit einer ausgezeichneten Wellenlänge erwartet [69, 73]. Daher sollte das optische Erscheinungsbild bei spinodaler Entmischung durch lamellare, periodische Domänenstrukturen mit eben der ausgezeichneten Wellenlänge gekennzeichnet sein.

In Flüssigkeiten beeinflussen sowohl der diffusive Beiträge als auch hydrodynamische Beiträge das Wachstumsverhalten bei spinodaler Entmischung. Generell wird ein Potenzgesetz  $a \sim t^\phi$  für die Zeitabhängigkeit des Domänenwachstums erwartet [74] und beobachtet [75]. Ist die Diffusi-

on der dominierende Beitrag, wird der Exponent  $\phi = 1/3$ , werden hydrodynamische Beiträge wichtig, ergibt sich  $\phi \sim 1$ . Als hydrodynamische Beiträge wirken konvektive Mechanismen [76, 77]. Welche Mechanismus das Domänenwachstum dominiert, hängt vom Verhältnis viskoser und diffusiver Beiträge ab [76] und kann damit über die Peclet-Zahl angegeben werden.

Für die numerische Analyse der spinodalen Entmischung, die sowohl die diffusiven als auch hydrodynamischen Beiträge berücksichtigt, wird oft das sog. „Modell H“ verwendet, benannt nach den beiden Autoren Hohenberg und Halperin [78]. Dabei wird die Massen- und Impulserhaltung über den konvektiven Term der Konvektions-Diffusions-Gleichung gekoppelt.

Die Simulationen des Modells ergeben für die zeitliche Entwicklung der Konzentration der beiden Phasen eine Abweichung vom exponentiellen Wachstum der linearisierten Cahn-Hilliard Gleichungen. In Abb. 5.2 ist dies für die Konzentration  $c$  einer Phase  $\phi$  gegen die Zeit dargestellt.

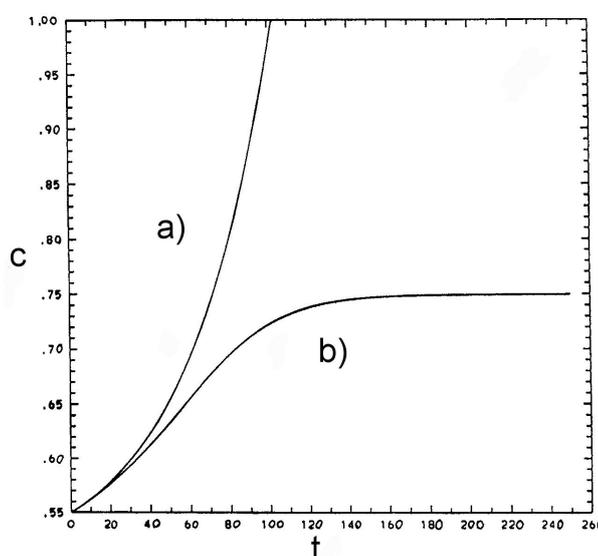


Abbildung 5.2.: Zeitliche Entwicklung der Konzentration  $c$  einer Phase bei spinodaler Entmischung, für die linearisierte Cahn-Hilliard Theorie (a) und die beschriebenen Simulationen (b) aus [79].

Während die Konzentration in der linearisierten Cahn-Hilliard Theorie exponentiell über alle Grenzen wächst, ist bei der Simulation des Modells aus [79] eine sigmoidale Form des Erreichens der Gleichgewichtskonzentration zu erkennen.

Veatch et al. [11, 80] haben vorgestellt, dass das Lipidsystem (1)DOPC-(1)DPPC+(20/40%)-Cholesterol ebenfalls ein Koexistenzgebiet aufweist. Dabei sind zwei verschiedene Entmischungsprozesse zu beobachten. Zum Einen tritt ein Prozess ähnlich einem Keimbildungs und Wachstumsprozess auf. Die Domänen haben hier von Beginn an eine zirkuläre Gestalt. Sie wachsen dann durch Kollision und Verschmelzung in der Größe [81, 11, 82, 83]. Im zweiten Fall entmischt das System in lamellare Strukturen, die sich dann, mit der Zeit ebenfalls in zirkuläre

Domänen entwickeln. Hier wurde eine spinodale Entmischung vermutet [11].

In diesem Kapitel wollen wir prüfen, inwieweit sich die vorgestellten Modelle für binäre Flüssigkeiten auf die Phasenseparation im flüssig-flüssig Lipidsystem anwenden lassen.

## 5.2. Experimentelles

Wir beobachteten oft, dass es möglich war, die Vesikel zu unterkühlen. Die Phasenseparation ließ sich dann durch photooxidative Prozesse auslösen, wie bereits erwähnt [44, 45]. Die Abbauprodukte der Photooxidation destabilisieren dann das System, so dass ein Wachstum großer Domänen erst möglich wird. Dennoch ist keine Koexistenz von mehr als zwei Phasen zu beobachten [11], was das Konzept einer binären Flüssigkeit weiterhin tragbar macht. Durch die Möglichkeit das System zu unterkühlen, und dann erst die Phasenseparation auszulösen, sollte es gelingen, den instabilen Bereich des Koexistenzgebietes auch außerhalb des kritischen Punktes zu erreichen, und dann spinodale Entmischung auszulösen.

Eine signifikante Unterkühlung ist im reinen System DOPC-DPPC-Cholesterol schwierig. Daher verwenden wir für viele Versuche Vesikel, die einen Anteil an geladenen Lipiden enthalten (System: DOPC-DPPC-DPPG-Cholesterol). Eine Charakterisierung dieses Systems stellen wir in Kapitel III 6 vor. Für kleine Ladungsanteile separieren Vesikel dieser Komposition weiterhin in zwei unmischbare flüssig erscheinende Phasen. Es zeigt sich aber eine Zunahme der Viskosität der ladungsreichen Phase (Kapitel III 6.4). Zudem ist hier von großem Vorteil, dass sich diese Vesikel wesentlich stärker unterkühlen lassen. Eine Separation ist oft nur nach Beleuchtung zu erzielen. Zudem konnten wir hier wesentlich größere Vesikel präparieren, was die Beobachtung eines größeren 'flachen' Ausschnittes der Vesikeloberfläche ermöglichte. Dies kann in zukünftigen Studien eine detaillierte Untersuchung des Wachstumverhaltens in einem großen Bereich von Membranviskositäten ermöglichen. Da wir keinen Unterschied bezüglich der vorgestellten Ergebnisse zwischen „ungeladenen“ und „geladenen“ Vesikeln feststellen konnten, führten wir die meisten Versuche, an geladenen Vesikeln durch.

## 5.3. Domänenwachstum durch Kollision und Verschmelzung

Wir untersuchen zuerst das Größenwachstum von Domänen, das durch Kollision und Verschmelzung geschieht. Hierbei versuchen wir einen direkten Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient und der zeitlichen Entwicklung der Domänengröße herzustellen.

Im vorherigen Kapitel haben wir für die Diffusion von Domänen in zwei Grenzfällen, dem Membran dominierten und dem Medium dominierten, eine grundsätzlich verschiedene Abhängigkeit vom Radius  $a$  der Domäne gefunden. Charakterisiert war die Diffusion durch den reduzierten Radius  $\epsilon$ . Für Diffusion die durch das Medium dominiert ist ( $\epsilon \gg 1$ ), ergab sich ein einfaches Potenzgesetz für die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Radius  $D(a) \sim 1/a$ . Für Diffusion die durch die Membran dominiert ist ( $\epsilon \ll 1$ ), fanden wir eine logarithmische Abhängigkeit  $D(a) \sim \ln(1/a)$ .

Daher wollen wir das Wachstum von Domänen in diesen beiden Grenzfällen  $\epsilon \gg 1$  und  $\epsilon \ll 1$  vergleichen, da hier ein signifikant unterschiedliches Diffusionsgesetz vorliegt und wir so eine ebenso signifikant unterschiedliche Entwicklung der mittleren Domänengröße  $\langle a \rangle$  mit der Zeit vermuten. Wir untersuchen die Entwicklung der Domänengröße deswegen in der ungeordneten Phase bei hohen Temperaturen (z.B.:  $T \approx 24^\circ C$ ) und in der geordneten Phase vorzugsweise im geladenen System bei niedriger Temperatur (z.B.:  $T \approx 12^\circ C$ ). Diese beiden Fälle sollten den Grenzfällen ( $\epsilon \gg 1$ ) und ( $\epsilon \ll 1$ ) ausreichend genügen<sup>1</sup>.

Um das Wachstum bei konstanter Temperatur zu untersuchen, nutzen wir, dass ein signifikanter Anteil der Vesikel unterkühlt werden kann, ohne Phasenseparation zu zeigen. Wir induzieren also Phasenseparation nach Abkühlen auf die gewünschte Temperatur durch Beleuchtung des ausgewählten Vesikels [44, 45]. Dabei ist bei stärkerer Unterkühlung zunehmend eine spinodale Entmischung der Vesikel zu beobachten, was wir später detailliert untersuchen werden. Hier berücksichtigen wir zur Darstellung der Abhängigkeit des Domänenwachstums von der Diffusion der Domänen, nur Vesikel die keine spinodale Entmischung präsentieren.

Später werden wir zeigen, dass konvektive Einflüsse aufgrund von Konzentrationsgradienten, die durch die Beleuchtung der Membran entstehen, einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten haben. Es wird eine schnelle gerichtete Bewegung der Domänen entlang eines Konzentrationsgradienten zu beobachten sein, was zu beschleunigtem Wachstum führt. Wir versuchen, bei der Untersuchung des diffusiven Wachstums diese Effekte durch eine minimale Beleuchtung zu vermeiden. Wir betrachten daher auch nur Vesikel, nachdem sie vollständig separiert scheinen, d.h. sich keine neuen Domänen bilden. Weiter werden nur Vesikel berücksichtigt, die 'normales' Diffusionsverhalten zeigen, also auch keine gerichtete Bewegung der Domänen aufweisen<sup>2</sup>.

In Abb. 5.3 sind beispielhaft zwei Bilderserien eines typischen Wachstumsprozesses für Domänen in der flüssig ungeordneten kontinuierlichen Phase (5.3(a):  $T \sim 24^\circ C$ ) und flüssig geordneten kontinuierlichen Phase (5.3(b):  $T \sim 12^\circ C$ ) dargestellt.

Die Domänen diffundieren frei auf der Vesikeloberfläche. Das Größenwachstum findet durch Kollision und anschließende Verschmelzung statt<sup>3</sup>. Beim Fortschreiten des Prozesses wachsen die Domänen dabei solange, bis eine vollständige Separation des Vesikels in zwei Phasen stattfindet. Da aber zu Ende des Prozesses die endliche Größe des System Einfluss auf das Wachstum haben sollte, beobachteten wir das Wachstum nur solange noch einige Domänen ( $\sim 10$ ) sichtbar waren.

Das Anwachsen der mittleren Domänengröße  $\langle a \rangle$  charakterisiert die Entwicklung des Systems. In beiden Phasen in Abb. 5.3 ist eine deutliche Zunahme der Größe über die Dauer der Beobachtung festzustellen. Die Entwicklung der mittleren Domänengröße  $\langle a \rangle$  ist in Abb. 5.4, für eine niedrige Viskosität<sup>4</sup> und hohe Viskosität<sup>5</sup> der Membran dargestellt.

Damit stellen wir den Grenzfall, Medium- und Membran-dominierter Diffusion dar. Mit den

<sup>1</sup>Der Grenzfall  $\epsilon \gg 1$  wird in der ungeordneten Phase nicht ganz erreicht, wie Kap. III 4.3 nahelegt. Generell ist nicht von einem vollständigen Erreichen der Grenzfälle auszugehen.

<sup>2</sup>Ist solch eine Bewegung vorhanden fanden wir oft ein abweichendes Wachstumsverhalten.

<sup>3</sup>Der zeitliche Abstand zwischen den Bildern beträgt etwa 3.2s für Abb. 5.3(a) und etwa 8s für Abb. 5.3(b).

<sup>4</sup>System: (1)DOPC-(1)DPPC+20%Cholesterol,  $T \sim 24^\circ C$ .

<sup>5</sup>System: (1)DOPC-(0.8)DPPC-(0.2)DPPG+40%Cholesterol,  $T \sim 12^\circ C$ .

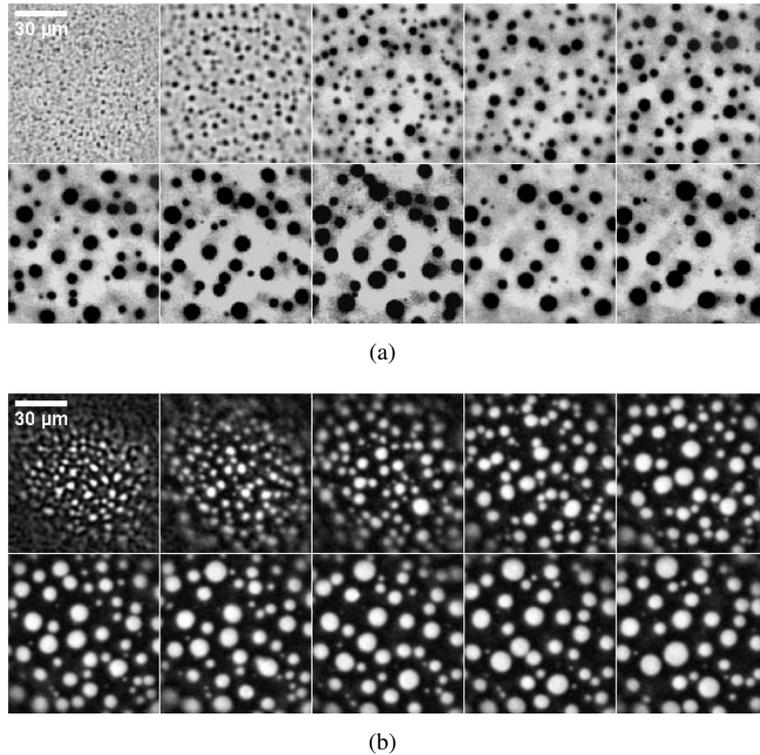


Abbildung 5.3.: Größenwachstum von Domänen in der (a) ungeordneten und (b) geordneten Matrixphase im System (1)DOPC-(1)DPPC-20/40%Cholesterol. Domänen wachsen in beiden Phasen durch Kollision und Verschmelzung in der Größe.

Erkenntnissen aus Kap. 4 sollte in der ungeordneten Phase bei hohen Temperaturen bei allen berücksichtigten Domänengrößen  $\epsilon > 4$  und die Diffusion im Wesentlichen durch das Medium bestimmt sein. In der geordneten Phase bei niedrigen Temperaturen sollte dann  $\epsilon < 0.5$  und die Diffusion im Wesentlichen durch die Membran bestimmt sein. Damit verhält sich dann die Größenabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten, wie wir in Kap. III 4 gezeigt haben gemäß  $D(a) \sim 1/a$  für  $\epsilon > 4$  und gemäß  $D(a) \sim \ln(1/a)$  für  $\epsilon < 0.5$ <sup>6</sup>.

Wir finden ein Potenzgesetz für das Anwachsen der mittleren Domänengröße  $\langle a \rangle$  in beiden Phasen, wie die doppelt-logarithmische Auftragung in Abb. 5.4 beispielhaft zeigt. Es ergeben sich gemittelt über mehrere ausgewertete Experimente ( $n = 6$  in der ungeordneten Phase und  $n = 7$  in der geordneten Phase), Exponenten von  $\langle \phi_{\epsilon \gg 1}^e \rangle = 0.36 \pm 0.08$  für  $\epsilon > 4$  und  $\langle \phi_{\epsilon \ll 1}^e \rangle = 0.44 \pm 0.1$  für  $\epsilon < 0.5$ . Die Extraktion des Exponenten hängt allerdings empfindlich von der Auswertung ab. Die vorgestellte Tendenz zu unterschiedlichen Exponenten scheint vorhanden und entspricht zudem der Erwartung, jedoch kann aufgrund der großen Streuung erst eine wesentlich größere Statistik letztendlich Klarheit bringen, ob sich diese Tendenz bestätigt.

<sup>6</sup>Mit der Einschränkung des nicht vollständigen Erreichens der Grenzfälle.

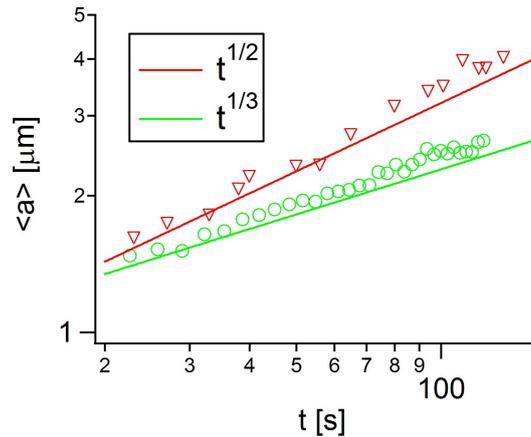


Abbildung 5.4.: Zeitliche Entwicklung der mittleren Domänengröße in der niedrigviskosen Matrixphase  $\epsilon \gg 1$  (grüne Kreise) und in der hochviskosen Matrixphase  $\epsilon \ll 1$  (rote Dreiecke). Die Kurven sind künstlich verschoben um beide Kurven in einem Graphen darzustellen.

**Modellierung** Für ein Verständnis der Verbindung von Größenwachstum und Diffusionskoeffizient nehmen wir an, dass Domänen ausschließlich durch Kollision und Verschmelzung in der Größe wachsen. Wir adaptieren die Annahme einer Ratengleichung für das Größenwachstum der Domänen [83].

$$\frac{dn}{dt} \sim n(1/\tau) \quad (5.2)$$

Dabei sei  $\tau$  die mittlere Kollisionszeit und  $n$  die Anzahl der Domänen. Für die konservierte Gesamtfläche der Domänen ist die Anzahl dann gerade invers proportional zur Fläche der Domänen  $n \sim 1/A$ . Weiter ist die mittlere diffusiv abgetastete Fläche, wie bekannt, proportional zum Diffusionskoeffizienten  $D$  und der Zeit  $t$ :  $\langle x^2 \rangle \sim D\tau$ . Zudem existiert die Proportionalität zwischen dem mittleren Abstandsquadrat und der Domänenzahl  $x^2 \sim 1/n$ . Fügt man all dies zusammen, ergibt sich [83]

$$\frac{dn}{dt} \sim n(D(a)/\langle x^2 \rangle) \quad (5.3)$$

Es ist deutlich, dass die Entwicklung der Domänenfläche durch den Diffusionskoeffizienten der Domänen  $D(a)$  bestimmt ist<sup>7</sup>. Für ein strenges  $D(a) \sim 1/a$ -Verhalten im Grenzfall  $\epsilon \ll 1$  ergibt sich wie theoretisch erwartet [83, 84]

$$\langle a \rangle \sim t^{\frac{1}{3}} \quad (5.5)$$

<sup>7</sup>Für ein beliebiges Potenzgesetz der Größenabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D \sim a^{-\lambda}$  kann Gl. 5.3 analytisch gelöst werden und wir finden eine einfache Abhängigkeit des mittleren Radius als Potenz  $\phi$  der Zeit

$$\langle a \rangle \sim t^{\phi} = t^{\frac{1}{\lambda+2}} \quad (5.4)$$

Dieser Exponent stimmt gut mit dem im Experiment gefundenen überein (Abb. 5.4: grüne Kurve). Allerdings zeigt sich für  $\epsilon \gg 1$  (grün) ein etwas größerer Exponent bei den experimentellen Daten. Hier wird wohl der Grenzfall nicht vollständig erreicht. Dies ist aber im Einklang mit dem Experiment. Hier fanden wir stets eine etwas schwächere Abhängigkeit vom Radius (Kapitel III 4). Für den Grenzfall  $\epsilon \gg 1$ , mit einer logarithmischen Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D(a) \sim \ln(1/a)$  vom Radius, erwartet man [82]

$$\langle a \rangle \sim t^{\frac{1}{2}} \quad (5.6)$$

Die oben beschriebene Tendenz unterschiedlicher Exponenten in den beiden Grenzfällen folgt diesen theoretisch errechneten Exponenten.

Für komplexe Abhängigkeiten des Diffusionskoeffizienten vom Radius, wie sie die Näherung des HPW-Modells von Peterov und Schwille [17] für alle  $\epsilon$  liefert, muss diese Gleichung jedoch numerisch behandelt werden. Es ergeben sich auch hier recht vergleichbare Werte.

Die Kinetik des Größenwachstums von Domänen wurde kürzlich in zwei uns bekannten Publikationen untersucht [83, 82], jedoch konnte das theoretisch erwartete, durch die Diffusion bestimmte Wachstumsverhalten [84, 85] nicht beobachtet werden. Die Autoren führen dies auf geometrische Randbedingungen oder gar den Zusammenbruch der Annahme eines Brownschen Partikels zurück.

Da nun aber die Annahme einer Ratengleichung stets eine Annahme bleibt und sich zudem Aussagen über Größenverteilungen nicht einfach aus ihr erhalten lassen, setzen wir eine Simulation auf die auf der Annahme freier Brownscher Partikel basiert.

## 5.4. Simulation des Wachstumsverhaltens

Um eine allgemeine Beschreibung des Wachstumsverhaltens für beliebige Formen des Diffusionsgesetzes zu erhalten, simulieren wir das System als Ensemble Brownscher Partikel. Damit können auch Effekte der Domänengrößenverteilung, also u.U. stark unterschiedlicher Mobilitäten berücksichtigt werden. Für die Mobilität der Domänen werden wir die Grenzfälle des HPW-Modells verwenden [15].

Die Brownsche Bewegung eines Partikel in einem Potential  $U(\mathbf{x})$  kann durch eine Langevin-Gleichung beschrieben werden [60, 86].

$$m\ddot{\mathbf{x}} = \mathbf{U}(\mathbf{x}) - \frac{1}{\mu}\dot{\mathbf{x}} + \mathbf{F}_{th}(t) \quad (5.7)$$

Sie vergleicht die Trägheit des Partikels der Masse  $m$  mit der viskosen Reibung charakterisiert durch die Mobilität  $\mu$ . Gleichzeitig befindet sich der Partikel unter Einfluss einer stochastischen thermischen Kraft  $\mathbf{F}_{th}(t)$ . Diese ergibt sich aus einem Fluktuations-Dissipations-Theorem für die fluktuierende Kraft

$$\mathbf{F}(t) = \sqrt{\frac{2k_B T}{\mu}} \boldsymbol{\xi}(t) \quad (5.8)$$

Wobei  $\xi(t)$  normales thermisches Rauschen bezeichnet. Aufgrund der Eigenschaft als stochastische Kraft verschwindet  $\xi(t)$  im Mittel  $\langle \xi(t) \rangle = 0$ , ist  $\delta$ -korreliert und gaußverteilt.

$$\langle \xi_i(t) \xi_j(t') \rangle = \delta_{i,j} \quad (5.9)$$

mit  $i, j = x, y$  als Raumdimensionen im 2d-System.

Für ein überdämpftes System kann der Trägheitsterm in Gl. 5.7 vollständig vernachlässigt werden. Gl. 5.7 reduziert sich dann ohne äußeres Potential in der Smoluchovsky-Näherung [60] zu

$$\frac{1}{\mu} \dot{\mathbf{x}} = \mathbf{F}_{th}(t) \quad (5.10)$$

Die Dynamik eines einzelnen Partikels ist dann zusammen mit Gl. 5.9 gegeben durch

$$\dot{\mathbf{x}} = \sqrt{2k_B T \mu} \xi(t) \quad (5.11)$$

Es folgt daraus direkt die Bewegung in einem Zeitschritt  $dt$

$$d\mathbf{x}, d\mathbf{y} = u \cdot \mathbf{e}_{x,y} \sqrt{2k_B T \mu} \sqrt{dt} \quad (5.12)$$

Wobei  $u$  eine unabhängige gaußverteilte Zufallszahl mit Mittelwert  $\langle u \rangle = 0$  und Varianz  $\langle u^2 \rangle = 1$  darstellt. Damit kann die Entwicklung der Domänengröße als Ensemble von Partikeln, die sich gemäß Gl. 5.12 bewegen, simuliert werden.

Die Simulation verläuft dann wie folgt: Initial werden Domänen der Fläche  $A$  zufällig<sup>8</sup> auf der Simulationsfläche mit periodischen Randbedingungen verteilt. Im ersten Schritt jedes Simulationszyklus wird gemäß Gl.5.12 die Domänenbewegung in  $x$ - und  $y$ -Richtung  $\mathbf{e}_x, \mathbf{e}_y$  im Zeitintervall  $dt$  berechnet. Für den Diffusionskoeffizienten verwenden wir die Ausdrücke für die beiden Grenzfälle  $\epsilon \ll 1$  und  $\epsilon \gg 1$  des HPW-Modells (Gl. 4.4 [15]). Die Zufallszahl  $u$  wird nach der Box-Müller-Methode ermittelt. Die Sprungweiten im Zeitintervall  $dt$  sind dann

$$d\mathbf{x}, d\mathbf{y} = u \cdot \sqrt{2D(a)dt} \cdot \mathbf{e}_{x,y} \quad (5.13)$$

Im zweiten Schritt werden dann die Positionen aller Domänen verglichen. Ist der Abstand

$$d = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2} - \sqrt{A_i/\pi} - \sqrt{A_j/\pi} \leq 0 \quad (5.14)$$

werden beide Domänen zu einer Domäne mit der Summe der Flächen der Domänen  $A_i, A_j$  an der Position des Schwerpunktes beider Domänen zusammengefasst. In jedem Zyklus werden dann mittlere Fläche und die Anzahl der Domänen extrahiert.

In Abb. 5.5 stellen wir die simulierte Entwicklung der mittleren Domänengröße für  $\epsilon \gg 1$  (grüne Punkte) und  $\epsilon \ll 1$  (blaue Punkte), im Vergleich mit experimentellen Daten (Symbole) dar. Wir finden ein einfaches Potenzgesetz für die Entwicklung der Domänengrößen<sup>9</sup>. In guter

<sup>8</sup>Eine initial periodische Anordnung der Domänen relaxiert nach sehr kurzer Zeit in das Verhalten einer zufälligen Anordnung der Domänen, so dass es das globale Verhalten kaum beeinflusst.

<sup>9</sup>Fläche und Zeit sind ohne Einheit angegeben, da wir hier nur die Vergleichbarkeit der Exponenten darstellen wollen.

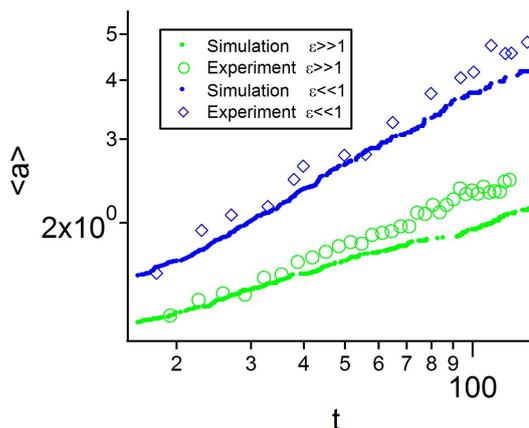


Abbildung 5.5.: Simulierte zeitliche Entwicklung der mittleren Domänengröße für die niedrig viskose Matrixphase (grün) und die hochviskose Matrixphase (blau).

Übereinstimmung mit der theoretischen Erwartung aus der Ratengleichung finden wir hier für  $\epsilon \gg 1$  einen Exponent von  $\phi = 1/3$  und für  $\epsilon \ll 1$  von  $\phi = 0.5^{10}$ . Das Simulationsergebnis lässt sich auch mit experimentellen Daten vergleichen<sup>11</sup>.

## 5.5. Spinodale Entmischung

Bei stärkerer Unterkühlung dieses Systems beobachtet man zunehmend eine Entwicklung der Domänenstruktur, die der einer spinodalen Entmischung gleicht [11], wie Abb. 5.6 zeigt<sup>12</sup>. Zu Beginn sind Dichtefluktuationen zu erkennen. Diese wachsen in einem perkulierenden Muster in der Größe, bis sich schließlich runde Domänen bilden. Das Aufbrechen des perkulierenden Musters und die folgende Entwicklung in zirkuläre Domänen ist wohl eine Folge der Dominanz der Linienspannung und der Fluidität des Systems. Wir vermuten daher, dass hier im Falle einer „spinodalen“ Entmischung deren Langzeitverlauf von dem Effekt der Minimierung der Grenzlinie überlagert ist.

**Konzentrationsentwicklung bei der Entmischung** Um diesen Entmischungsvorgang tatsächlich als spinodale Entmischung zu identifizieren, ist bei der Koexistenz zweier Phasen in einer binären Mischung die Entwicklung der Konzentration einer Komponente in beiden Phasen zu betrachten. So sollte hier wie eingangs vorgestellt die Konzentration  $c_A$  der Komponente

<sup>10</sup>Über dieses prinzipielle Simulationsergebnis hinausgehende Aussagen, könnten durch detaillierter Untersuchungen von z.B. Randbedingungen oder Konvergenz der Simulation erhalten werden.

<sup>11</sup>Die Daten wurden bezüglich der Größe verschoben, da wir die Vergleichbarkeit der Exponenten demonstrieren wollen.

<sup>12</sup>System: (1)DOPC-(0.8)DPPC-(0.2)DPPG+40%Cholesterol,  $T \sim 12^\circ C$ .

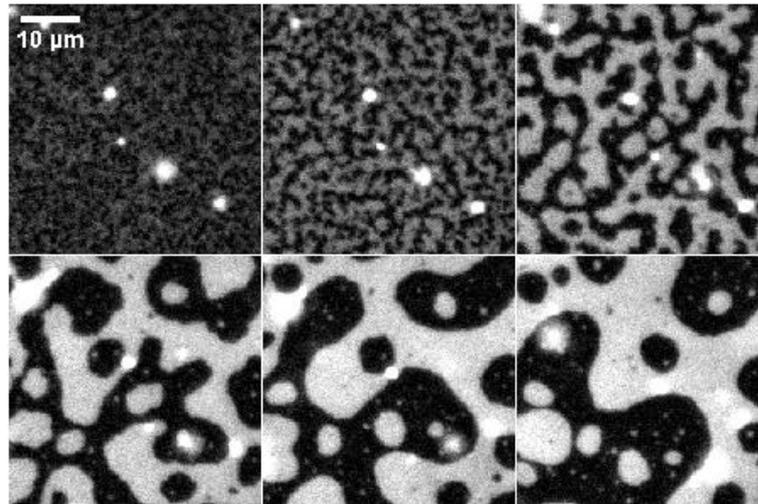


Abbildung 5.6.: Zeitliche Entwicklung der Domänenstruktur bei „spinodaler“ Entmischung.

A in der A-reichen Phase im Vergleich zur Gleichgewichtskonzentration des gesamten Systems  $c_0$  exponentiell anwachsen [73].

Es ist also die Konzentration von DPPC bzw. DOPC in der jeweiligen Phase zu analysieren. Dies kann über die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Phase geschehen. Die Separation des Fluoreszenz-Farbstoffs und damit die Fluoreszenzintensität kann dabei als direkter Indikator für die Konzentration verwendet werden [87].

Daher untersuchen wir in Abb. 5.7 die Entwicklung der Grauwertverteilung während einer spinodalen Entmischung<sup>13</sup>. Deutlich zu erkennen ist bereits nach kurzer Zeit in Abb. 5.7(a) die Aufspaltung des anfänglich einzelnen Peaks in zwei Maxima etwa gleicher Intensität. Dies reflektiert die optischen Beobachtung des Auftretens zweier Phasen unterschiedlicher Helligkeit. Die Grauwerte unterscheiden sich mit Fortschreiten des Prozesses zunehmend.

Der Fit an eine Gaußsche Verteilung liefert in Abb. 5.7(b) die mittlere Fluoreszenz-Intensität der beiden Phasen. Der zeitliche Verlauf ist durch eine sigmoidale Funktion beschrieben. Diese ist von der Form her absolut vergleichbar mit dem eingangs vorgestellten Verlauf der Konzentration bei Simulation spinodaler Entmischung (Abb. 5.2 [79]). Dies ist ein starker Hinweis, dass es sich in diesem Lipidsystem tatsächlich um spinodale Entmischung handelt.

**Entwicklung der Strukturgröße** Weiterer Aufschluss über den Prozess, bzw. ob diffusiver oder konvektiver Materialtransport dominiert, kann die Entwicklung der mittleren Domänengröße  $a$  geben.

Bei solchen von uns in der Membran beobachteten Entmischungsvorgängen ist tatsächlich ein rasches Anwachsen der Domänengrößen zu beobachten. Aus den Fluoreszenz-Aufnahmen er-

<sup>13</sup>System: (1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG+40%Cholesterol,  $T \sim 12^\circ C$ .

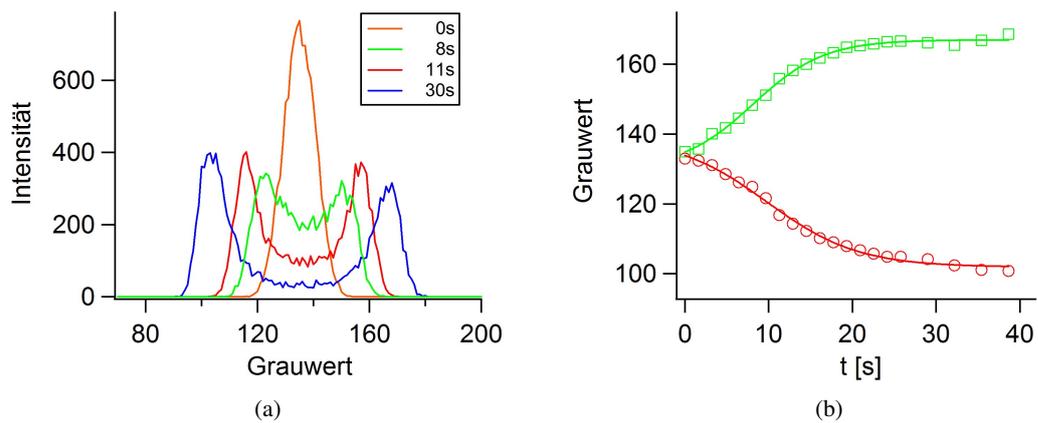


Abbildung 5.7.: a) Histogramm der Grauwerte bei einem Entmischungsvorgang. b) Zeitliche Entwicklung der mittleren Grauwerte.

halten wir die Information über die Strukturgröße durch die 2d-Fouriertransformierte<sup>14</sup>. Durch radiale Integration des Streubildes mit Hilfe des Softwarepaketes ImageJ<sup>15</sup>, lässt sich dann der Amplitudenverlauf in Abhängigkeit von der Frequenz in jedem Zeitschritt in Abb. 5.8(a) darstellen.

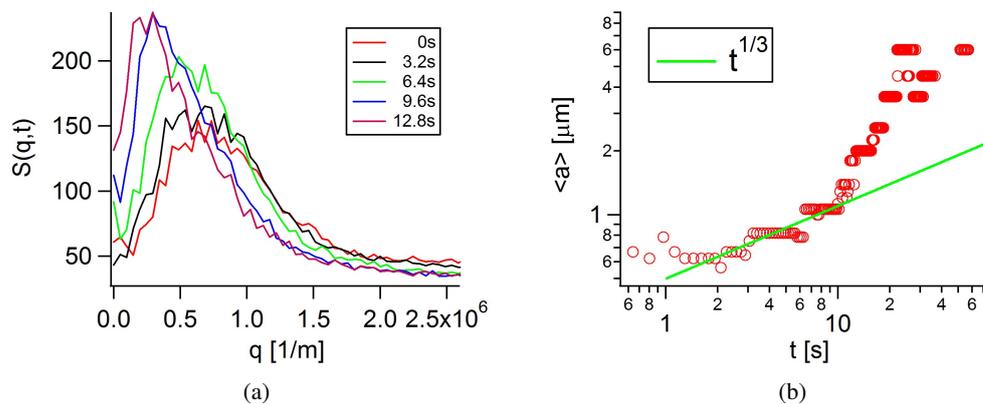


Abbildung 5.8.: a) Typische zeitliche Entwicklung des Strukturfaktors bei „spinodaler“ Entmischung. b) Zeitliche Entwicklung der mittleren Strukturgröße. (System: (1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG+40%Cholesterol,  $T \sim 12^\circ\text{C}$ )

Eine gute Beschreibung der Gestalt der Verteilung gibt eine logarithmische Normalverteilung

$$S(q) = a_0 \cdot \exp[\ln(q/q_0) / \sigma]^2 \quad (5.15)$$

<sup>14</sup>Diese bestimmen wir mit einer von O. Klinck entwickelten Software aus der Serie der Fluoreszenzaufnahmen.

<sup>15</sup><http://rsbweb.nih.gov>

Aus  $q_0$  ergibt sich dann die mittlere Strukturgröße  $\langle a \rangle$  und wir können den zeitlichen Verlauf von  $\langle a \rangle$  in Abb.5.8(b) angeben<sup>16</sup>. Das Größenwachstum zeigt in der doppelt logarithmischen Auftragung zwei Regime. Zu Beginn finden wir ein Wachstum mit der Zeit gemäß  $\langle a \rangle \sim t^{1/3}$  (grün). Dieses geht dann bei etwa  $t = 10s$  in ein stärkeres Wachstum über<sup>17</sup>.

Das  $\langle a \rangle \sim t^{1/3}$  Verhalten wird theoretisch [74] für die Dominanz des diffusiven Verhaltens vorhergesagt. Hydrodynamische Beiträge, die zu einem größeren Exponenten führen, dürften aber nur in der Anfangsphase des Wachstums eine Rolle spielen [76, 77].

Wir vermuten, dass hier kein neuer Wachstumsprozess zu beobachten ist, vielmehr eine geometrische Vergrößerung der Struktur stattfindet. Am Zeitpunkt an dem die Entwicklung der Strukturgröße deutlich vom  $\langle a \rangle \sim t^{1/3}$  Verhalten abweicht (Abb. 5.8(b)) sind zahlreiche dunklen Bereiche miteinander verbunden, wie in Abb. 5.9 dargestellt ist.

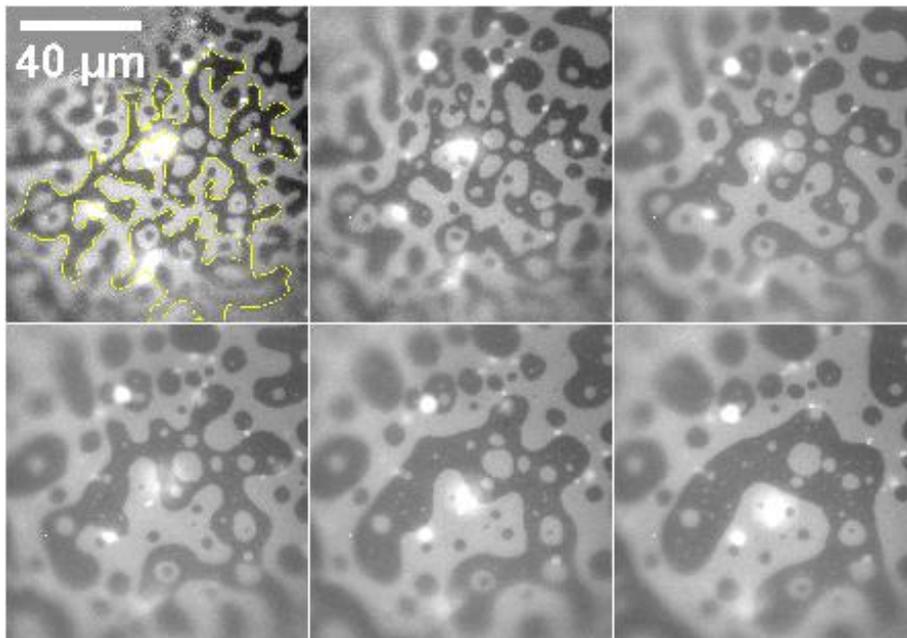


Abbildung 5.9.: *Entwicklung einer 'fraktalen Domäne'.*

Die Domänengestalt ist nahezu fraktal, weist aber eine einzige Grenzlinie auf, wie in Abb. 5.9 durch die gestrichelte Linie angedeutet wird. Die Grenzlinie zieht sich dann im zeitlichen Verlauf zusammen. Schließlich relaxiert solch eine Struktur immer in eine zirkuläre Gestalt. Treibende Kraft hierfür ist die Linienspannung der Grenzlinie, die wohl ursächlich für das beschleunigte Wachstum ist. Obwohl die „fraktale“ Domäne eine große Gesamtfläche besitzt, wird im Streubild die mittlere Strukturbreite der Lamellen dominieren.

Es ist an diesem Punkt anzumerken, dass eine einfach logarithmische Auftragung von  $\langle a \rangle$  auch

<sup>16</sup>Das gleiche Ergebnis erhalten wir aus der Paarkorrelationsfunktion des Systems, die über die Fouriertransformierte ermittelt wurde.

<sup>17</sup>Ähnliche Verläufe konnten wir auch in den anderen ausgewerteten Experimenten ( $n=3$ ) beobachten.

die Interpretation eines exponentiellen Anwachsens erlaubt. Die Streuung der Daten ermöglicht alleine aus der Betrachtung der zeitlichen Entwicklung von  $\langle a \rangle$  keine eindeutige Zuordnung zu einem Verhalten. Mit dem oben beschriebenen Potenzgesetz, dass sich mit theoretischen Erwartungen vergleichen lässt und der beobachteten Vergrößerung durch Relaxation der lamellaren Domänen in die zirkuläre Gestalt die im Bereich des stärkeren Wachstum erfolgt, existieren Argumente für die oben gegebene Interpretation. Klarheit können letztendlich erst detailliertere Untersuchungen bringen.

Wir schätzen nun in erster Näherung den Beitrag der Vergrößerung zum Wachstum ab. Habe eine derartig verbundene Domäne ein Gesamtfläche  $A_D$ . Das Streubild misst hauptsächlich die mittlere Strukturbreite  $2r$  der Lamellen einer solchen Domäne. Es sollte also zu keinem qualitativen Unterschied führen, eine gesamte, verbundene Domäne in erster Näherung zusammengesetzt aus  $n$  Domänen des Durchmessers der mittleren Strukturbreite  $2r$ , mit der Fläche  $a$  anzunehmen. Dabei ist  $n = A_D/a$  und die Länge der Grenzlinie einer Domäne wird  $s_D = 2\pi r$ . Die gesamte Länge der Grenzlinie  $s_{ges}$  aller  $n$  Domänen ergibt sich dann zu  $s_{ges} = s_D \cdot n$ . Fügt man all das zusammen folgt

$$s_{ges} = 2 \cdot s_D \cdot r^{-1} \quad (5.16)$$

Nun betrachten wir die zeitliche Bewegung der Länge der Grenzlinie. Diese ist durch die Energie der Grenzlinie  $U_G = \gamma s_{ges}$  bestimmt, wobei  $\gamma$  die Linienspannung bezeichnet. Das System erfährt viskose Reibung  $f_{\eta_M}$  durch den Membranfluss und ist nach unserer Erfahrung überdämpft. Es ergibt sich somit die Bewegungsgleichung für die Länge der Grenzlinie

$$\dot{s}_{ges}(t) = -\frac{\gamma}{f_{\eta_M}} s_{ges} \quad (5.17)$$

mit der Lösung

$$s_{ges}(t) = s_0 \cdot \exp\left[-\frac{\gamma \cdot t}{f_{\eta_M}}\right] \quad (5.18)$$

wobei  $s_0$  die anfängliche Länge der Grenzlinie bezeichnet. Mit Gl. 5.16 folgt dann direkt für die mittlere Strukturgröße

$$r(t) = \frac{s_0}{2A_D} \cdot \exp\left[\frac{\gamma \cdot t}{f_{\eta_M}}\right] \quad (5.19)$$

Dieser Prozess ist dann kein Wachstumsprozess, da die Domänenfläche dadurch nicht zunimmt. Allerdings nimmt die Vergrößerung des Systems zu, was dann das Streubild und die mittlere Strukturbreite bestimmt. Dieser Prozess erscheint also im Streubild zusätzlich zum diffusiven Wachstum. Damit beobachten wir eine größere Steigung ab diesem Zeitpunkt. In Abb. 5.8(b) zeigte sich ein deutlich beschleunigtes Wachstum an dem Punkt, an dem die Linienspannung begann den Relaxationsprozess der Domäne zu dominieren. Dieses Modell beschreibt somit rein phänomenologisch die Ursache für das „beschleunigt Wachstum“<sup>18</sup>.

<sup>18</sup>Dieser Prozess könnte auch schon zu Beginn der Domänenbildung die Entmischung beeinflussen.

## 5.6. Einfluss von Konzentrationsgradienten auf das Domänenwachstum

**Lokalisierte Beleuchtung** Um die Existenz von Kapillarkräften bzw. Konvektionen direkt darzustellen, schaffen wir eine Inhomogenität durch Beleuchtung eines Teils des Vesikels. Bei Vesikeln ausreichenden Durchmessers ( $d > 100\mu m$ ) kann durch „Zuziehen“ der Hellfeldblende nur ein lokalisierter Bereich des Vesikels beleuchtet werden, wie es in Abb. 5.10: a) dargestellt ist.

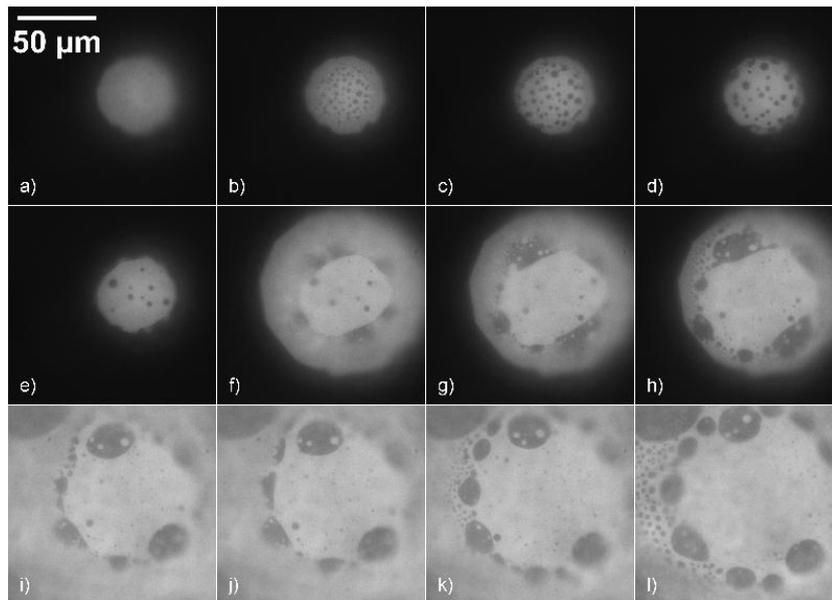


Abbildung 5.10.: *Entmischungsprozesses bei lokalisierte Beleuchtung.*

Der Vesikel hat in diesem Fall einen Durchmesser von etwa  $d = 200\mu m$ . Der beleuchtete Teil befindet sich in der Mitte am obersten Punkt des Vesikels. Im beleuchteten Bereich findet dann Phasenseparation statt (5.10: b)). Deutlich zu erkennen sind bereits große Domänen in der Mitte, während am Rand des beleuchteten Bereichs die Phasenseparation noch nicht weit fortgeschritten ist. Dies ist wohl auf den diffusiven Austausch mit der angrenzenden nicht beleuchteten Membran zurückzuführen. Die Phasenseparation schreitet dann wie gewohnt fort (Abb. 5.10: c)-e)). Bemerkenswert ist, wie wir später detailliert darstellen, dass die geordneten Domänen (dunkel) eine relativ schnelle, radiale Bewegung zu den Grenzen des beleuchteten Bereichs ausführen. Dies lässt auf eine Bewegung in einem Konzentrationsgradienten schließen.

In Abb. 5.10: f) wird die Blende weiter geöffnet, so dass der umliegende Bereich betrachtet werden kann (aber auch beleuchtet wird). Deutlich erscheint der zuvor beleuchtete zentrale Bereich heller als der umliegende nicht beleuchtete Bereich, der noch keine Phasenseparation aufweist. Gut zu erkennen ist ein Phasengrenze, die die bereits entmischte ungeordnete Phase von der umliegenden noch gemischten Phase trennt. An der Grenze sind sehr diffuse Domänen die den

Farbstoff ausschließen zu erkennen. Diese weisen wohl schon eher die Zusammensetzung der geordneten Phase auf.

Es ist nun ein schnelles Wachstum und eine klare Separation dieser dunkeln Bereiche zu erkennen (5.10: f-h)). Gleichzeitig separiert auch die umliegende Matrix. Dabei dehnt sich die Phasengrenze, bzw. die Separations-Front schnell aus. Vollständiges Aufziehen zeigt nochmals den selben Prozess (5.10: i-l)). Das Ausdehnen der Separations-Front geschieht wieder schnell. Sehr große Domänen wandern mit der Front nach außen. Am Ende des Prozesses befinden sich nahezu sämtliche Domänen am Rand des Vesikels (5.10: l)). Zudem wuchsen diese Domänen an der „Phasengrenze“ wesentlich schneller, als es bei einer homogenen Beleuchtung zu beobachten ist. Dies zeigt sehr deutlich, dass die Phasenseparation massiv von Konzentrationsgradienten in der Membran beeinflusst sein kann.

**Domänenbewegung im Konzentrationsgradienten** Wir wollen die Domänenbewegung in einem Konzentrationsgradienten isoliert darstellen. Wieder wird in Abb. 5.11(a) nur ein Teil des Vesikels beleuchtet. Es bildet sich die bekannte Phasengrenze aus, angedeutet durch die grünen Striche in Abb. 5.11(a). Zwei Domänen, die sich weit in der ungeordneten Phase befinden (Pfeile) bewegen sich auf die Phasengrenze zu, bis sie schließlich in diese integrieren.

In Abb. 5.11(b) stellen wir beispielhaft den Abstand einer Domänen von der Phasengrenze bei einem solchen Prozess dar (rote Symbole).

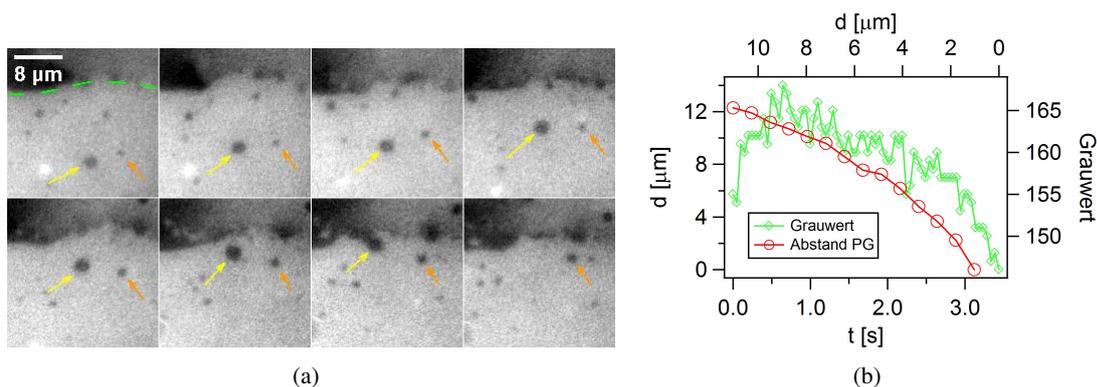


Abbildung 5.11.: a) Domänenbewegung auf eine Phasengrenze zu. Bildabstand etwa 540ms. b) Abstand der Domäne von der Phasengrenze (PG)(rot) und Grauwerte entlang der Trajektorie der Domäne (grün).

In diesem Experiment ist eine zunehmende Geschwindigkeit der Domäne mit der Annäherung an die Phasengrenze zu erkennen. Gleichzeitig bestimmen wir den Grauwert, als Indikator für die Zusammensetzung der Phase entlang der Trajektorie der Domäne, in Abb. 5.11(b) durch die grünen Symbole symbolisiert. Offensichtlich existiert ein Gradient senkrecht zur Phasengrenze. In diesem wird die Domäne zunehmend schneller.

Bemerkenswert ist die hohe Geschwindigkeit der Domäne, die weit über der des diffusiven Transports liegt. Die hier experimentell gefundenen Ergebnisse können mit Simulationen von

Jasnow und Vinals [88] verglichen werden, die die thermo-kapillare Bewegung eines Tropfen aufgrund eines Oberflächenspannungsgradienten untersuchen. Der hier diskutierte Temperaturgradient erfüllt nach unserer Auffassung eine ähnliche Funktion, wie in unserem Experiment der Cholesterolgegradien bzw. der Gradient der photooxidativen Abbauprodukte.

## 5.7. Homogener Konzentrationsgradient

Diese Analogie kann auch bei einer inhomogenen Beleuchtung der Vesikeloberfläche, und damit Erzeugung eines Konzentrationsgradienten, der homogen über den Vesikel abfällt, gezeigt werden. Eine Inhomogenität wurde durch Dejustage der Fluoreszenzlampe erreicht. Dies führt zu einer inhomogenen Ausleuchtung des Gesichtsfeldes. Die Inhomogenität wurde versucht, so einzustellen, dass eine linear abfallende Beleuchtungsintensität von einer Seite des Gesichtsfeldes zur gegenüberliegenden entsteht. In Abb. 5.12 ist die spinodale Entmischung eines nach diesem Vorgehen inhomogen beleuchteten Vesikels dargestellt.

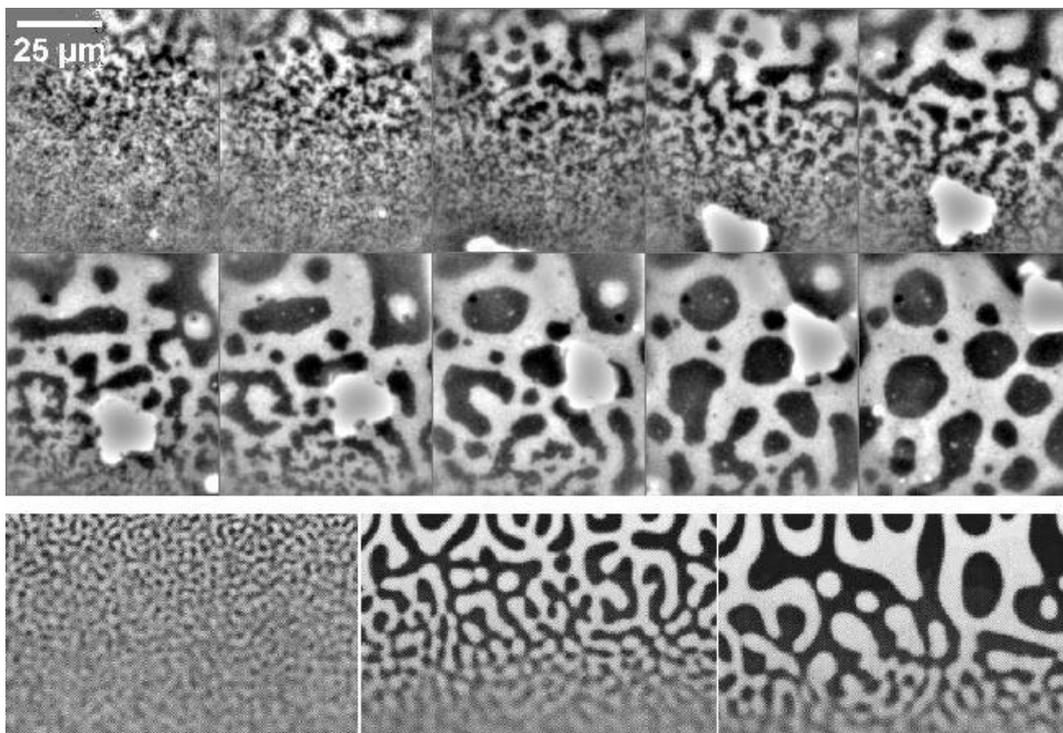


Abbildung 5.12.: *Entmischungsprozess bei inhomogener Beleuchtung der Vesikel. Die Beleuchtungsintensität ist am oberen Rand am höchsten (Bildabstand etwa 4.5s). In der unteren Reihe sind Ergebnisse numerische Simulationen der spinodalen Entmischung in einem Temperaturgradienten aus [88] dargestellt.*

Die Beleuchtungsintensität fällt vom oberen Bildrand zum unteren hin ab. Die Phasenseparation beginnt so im oberen Teil schneller und schreitet entsprechend fort. Ein ähnlicher Prozess wird in den numerischen Simulationen unter Einfluss eines Temperaturgradienten beobachtet [88]. Hier ist die Temperatur am oberen Bildrand am niedrigsten. Der so erhaltene Verlauf der Phasenseparation zeigt sich nahezu identisch mit dem von uns experimentell beobachteten. Die Vergleichbarkeit der beobachteten Phänomene zu den numerischen Simulationen unterstützt die Annahme, dass hier tatsächlich ein derartiger Prozess vorliegt

## 5.8. Bewegung an der Phasengrenze

Die Kopplung eines Konzentrationsgradienten in der Membran an eine bestehende Domänenstruktur kann ganz bemerkenswerte Folgen haben. Domänen wachsen, wie beschrieben, nach der Phasenseparation in der flüssig-flüssig Koexistenz, bis der gesamte Vesikel in zwei Phasen unterteilt ist. Bei geeigneter Zusammensetzung ist meist eine Teilung in zwei Hälften zu beobachten. Auf Oberflächen-adhärierten Vesikeln verläuft die Phasengrenze oft über den Scheitel der Vesikel. Bei Beleuchtung bilden sich wieder in beiden Phasen kleine Domänen der jeweils anderen Phase. Beleuchtet man nun einen kleinen Bereich der Phasengrenze, führt dies zu einer Strömung entlang der Phasengrenze auf den beleuchteten Bereich zu, wie in Abb.5.13 dargestellt.

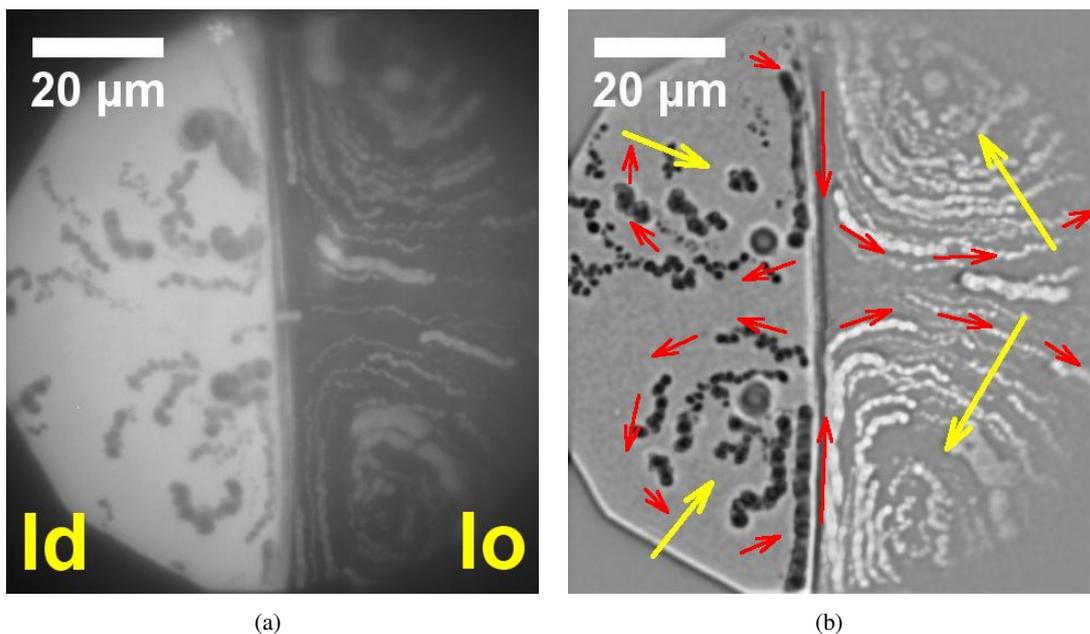


Abbildung 5.13.: *Strömung nach Beleuchtung des zentralen Bereichs der Phasengrenze.*

Beleuchtung eines anderen Teils der Phasengrenze führt zum Wandern des Treffpunkts beider entgegengesetzter Strömungen wieder in den Fokusmittelpunkt. Dabei dauert es ca. 2 min, bis

sich dieses Gleichgewicht einstellt. Dies lässt uns auf einen nicht thermische Ursache der Strömung schließen, da durch die gute Ankopplung und die kleine Systemgröße Temperaturunterschiede schneller ausgeglichen werden sollten.

Aufgrund der Randbedingungen des halbschaligen Vesikels ergibt sich eine kleeblattförmige Struktur der Strömung, wie in Abb.5.13(b) schön zu sehen ist. Offensichtlich ist die treibende Strömung in der Phasengrenze lokalisiert, da Domänen in den angrenzenden Halbräumen mitgerissen werden, und die Geschwindigkeit mit dem Abstand von der Phasengrenze abfällt. Der Geschwindigkeitsabfall bzw. das gesamte Strömungsmuster ist dabei durch die Geometrie der Vesikel bestimmt. Da die Strömung auf einen Punkt zuläuft, existiert offensichtlich eine die Strömung treibende Kraft entlang der Phasengrenze.

Wieder vermuten wir einen Konzentrationsgradienten aufgrund der Photooxidation als Ursache, der allerdings hier auf die Phasengrenze lokalisiert scheint. Esposito et al. [46] konnten beobachten, dass bei Beleuchtung einer Domäne ihre Linienspannung zunimmt. Dies ist wohl auf die Anreicherung der photooxidativen Abbauprodukte in der Phasengrenze zurückzuführen [44, 45]. Bei lokaler Beleuchtung der Phasengrenze bzw. der umliegenden Membran, wird wohl ein Gradient der Linienspannung entlang der Phasengrenze erzeugt. Dieser Gradient verursacht dann die Strömung auf diesen Punkt erhöhter Linienspannung, ganz ähnlich einem „Marangonieffekt“. Zusammenfassend zeigt dieser Abschnitt, dass konvektiver Transport im Phasenseparationsprozess dieser Lipidmischungen einen erheblichen Einfluss haben kann.

Unabhängig von der Ursache hat der Effekt aber weitreichende Konsequenzen für Transportprozesse in Membranen. Äußerst bemerkenswert ist, dass die beobachteten Geschwindigkeiten mit ca.  $v = 3\mu\text{m}/\text{s}$  um etwa vier Größenordnungen über denen diffusiver Prozesse liegen. Die treibende Kraft bleibt nicht allein auf Photooxidation beschränkt. Die Etablierung eines beliebigen Konzentrationsgradienten in der Phasengrenze sollte eine Strömung hervorrufen. Zudem ermöglicht die Lokalisierung auf die Phasengrenze eine selektive Wahl des Weges. Ein derartiger Transportweg kann dann durch die Domänenstruktur gesteuert werden.

## 5.9. Domänenwachstum auf Tethern - quasi 1d-System

Numerische Simulationen zeigen, dass in einer binären Flüssigkeit im eindimensionalen Fall bei spinodaler Entmischung kein Wachstum der Domänen stattfinden kann [76]. Die Domänengröße sollte dann tatsächlich die Wellenlänge der am schnellsten wachsenden Fluktuation widerspiegeln. Da wir mit den Tethern ein quasi 1d-System vorliegen haben, untersuchen wir also Phasenseparation in diesen Tethern.

In Kapitel III 5 haben wir bereits das Domänenwachstum durch Kollision und Verschmelzung auf einem Tether vorgestellt. Bei einer Größe der Domänen, die vergleichbar mit dem Radius des Tethers war, führte dies zu einer den Tether umgreifenden Domäne. Waren alle Domänen derart separiert, führte dies zu einer Immobilisierung und damit zum Stopp des weiteren Domänenwachstums.

Auch in Tethern ist, vor allem bei stärkerer Unterkühlung und Induzierung der Phasenumwandlung durch Beleuchtung, ein von diesem Verhalten abweichendes Wachstum zu beobachten. Wir

fanden zwei mögliche Ausprägungen, die in Abb. 5.14 dargestellt sind.

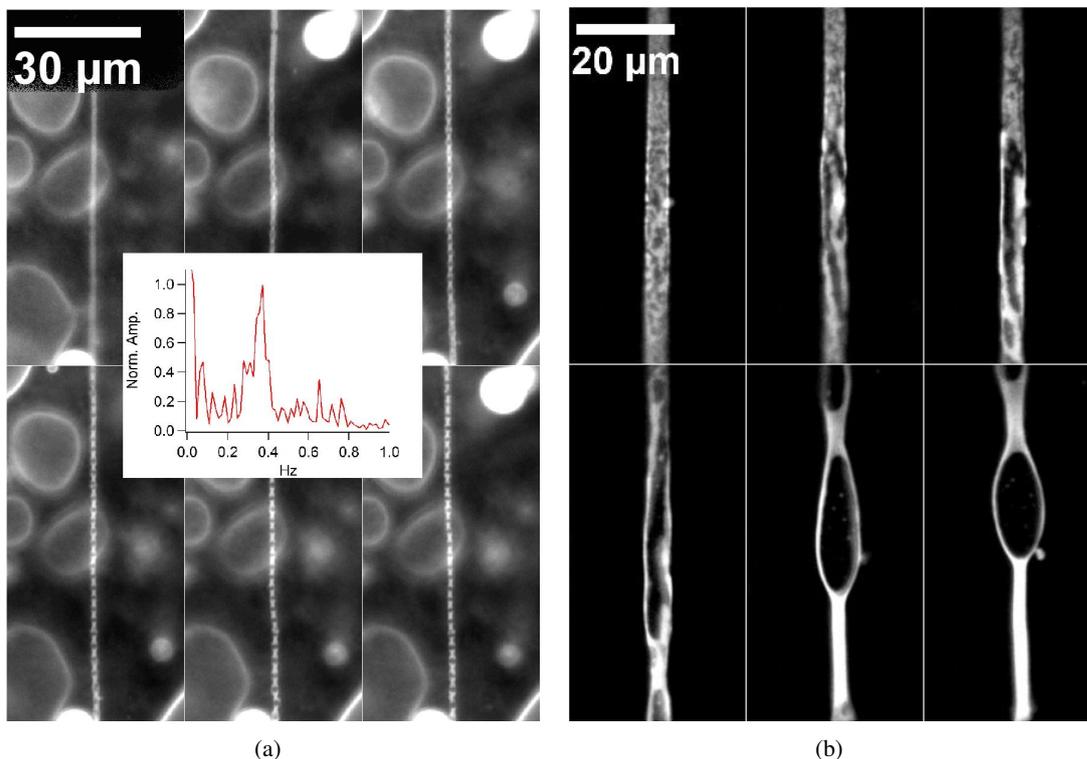


Abbildung 5.14.: a) Entmischung auf einem unterkühlten Tether zeigt den Zerfall in Abschnitte nahezu identischer Länge, wie die Fouriertransformierte entlang der Tetherachse zeigt. b) Entmischung auf einem unterkühlten Tether die zur Bildung einer großen Linse führt (Bildabstand etwa 3.5s).

Zu Beginn erscheinen die auch auf Vesikeln beobachteten Fluktuationen auf der Tetheroberfläche. Im ersten Fall (Abb. 5.14(a)), bilden sich sehr schnell fluide und gelförmige Abschnitte, die nicht weiter wachsen. Diese haben eine relativ homogene Längenverteilung, was die Fouriertransformation des Intensitätsprofils entlang der Tetherachse zeigt (Inset Abb. 5.14(a)). Dies gleicht dem Verhalten, das für spinodale Entmischung in einem 1d-System erwartet wird [76]. Die Längenskala der entstehenden Domänen sollten gerade die bevorzugt wachsende Wellenlänge darstellen. Scheinbar beobachten wir dies in der Tat bei dieser Art der Phasenseparation auf dem Tether.

Dieses sehr schnelle Zerfallen in Abschnitte vergleichbarer Länge wurde öfters beobachtet. Dabei scheint die Häufigkeit mit abnehmendem Durchmesser des Tethers zuzunehmen. Eine andere Ausprägung der Entmischung auf Tethern führt zu den, in Kapitel III 5 bei der Analyse der Diffusion, vorgestellten Linsen, wie wir in Abb. 5.14(b) darstellen. Zu Beginn bildet sich eine Domäne entlang der Achse des Tethers. Diese kann unter Umständen sehr lang werden. Der zunehmende Einfluss der Linienspannung der Domänen strebt dann die Grenzlinie zu verkürzen.

Diese Linsen diffundieren dann frei auf dem Tether. Nach einiger Zeit reißt dann meist der Domänenrand, und es formt sich wieder eine den Tether umgreifende Domäne. Die resultierenden Längen von Domänen bei diesem Prozess sind dann nicht mehr von vergleichbarer Länge.

Auch scheint der Durchmesser des Tethers die typische Länge zu beeinflussen. Generell waren deshalb die Domänenlängen auf verschiedenen Tethern nicht vergleichbar, was eine statistische Auswertung hier nicht möglich machte.

Sehr schön zeigt sich dennoch hier wieder der Übergang zum quasi 1d-Verhalten. Domänen können nur wachsen solange sie frei auf dem Tether diffundieren können. Ist keine freie Diffusion mehr möglich, da alle Domänen den Tether umschließen wird das Wachstum gestoppt und es bildet sich ein stabile Heterogenität aus. So kann hier der Gleichgewichtszustand einer Separation in zwei große Domänen im Gegensatz zur 2d-Membran nicht erreicht werden.

## 6. Struktur und Dynamik in geladenen Membranen

### 6.1. Die Bedeutung der Ladung in Membranen

Durchschnittlich enthalten biologische Membranen einen Anteil geladener Lipide von ca. 10%. Dabei sind in biologischen Systemen ausschließlich negativ geladene Lipide zu finden. Positive geladene Lipide wurden synthetisiert, um sie als Gen-Transporter zu verwenden oder Wechselwirkung von DNA und Membranen zu untersuchen [89, 90]. Der Anteil der Ladung hängt stark vom Zelltyp ab, so enthalten Mitochondrien beispielsweise eine sehr hohe Konzentration von Cardiolipin [91]. Die Ladung spielt in Prozessen wie der Aggregation von Proteinen [92] eine wichtige Rolle. Häufig tragen die Proteine, die an Membranen binden, wie Cytochrom c, eine positive Ladung.

Die Eigenschaften der Membran selbst, wie Biegesteifigkeit [93, 94] und die Temperatur des Phasenübergangs [37] sind erheblich beeinflusst durch die Elektrostatik. Es wird eine Zunahme des Biegemoduls vorhergesagt, und die Gaußsche Krümmung kann negativ werden [94]. Zudem kann sich, aufgrund der Wechselwirkung zwischen den Ladungen, der Phasenübergang verschieben bzw. verändern [95]. Dabei wirkt die Coulombwechselwirkung abstoßend, gleichzeitig können aber attraktive Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen oder hydratisierte Ionen auftreten [96]. Dies kann zu äußerst komplexen Phasenübergängen führen [95].

### 6.2. Vorbereitende Anmerkungen zur Phasenseparation in geladenen Membranen

Wir werden den Einfluss der Ladung im Folgenden auf das System  $(1-x)\text{DOPC}-(1-x)\text{DPPC}-(x)\text{DPPG}+\text{Cholesteroll}$  untersuchen. Aufgrund des Flüssigkeitscharakters der ungeladenen Membran hoffen wir, dass die Membran eine flüssige Matrix bildet, in der sich die Ladungen frei, entsprechend ihrer Wechselwirkung anordnen können. Wir wollen ausschließlich den Effekt der Ladung darstellen. Daher wird bei gleichbleibender Kohlenwasserstoffkette die ungeladene Phosphatidylcholin Kopfgruppe des gesättigten Lipides (DPPC) durch die einfach geladene kationische Phosphatidylglycerol Kopfgruppe (DPPG) substituiert. Dabei bezeichnet  $x$  den relativen Anteil des geladenen Lipides DPPG bezüglich des Lipides mit der identischen Kette (DPPC).

Wir beobachten in diesem System in einigen Aspekten ein ganz analoges Verhalten zu dem ungeladenen System  $\text{DOPC}-\text{DPPC}-\text{Cholesteroll}$ . So tritt auch hier bei einem Cholesteroll-Anteil

von 20% eine flüssig erscheinende wenig viskose Phase als Matrixphase auf, in der sich der Fluoreszenzfarbstoff anreichert. Bei einem Cholesterol-Anteil von etwa 40% invertiert sich das Phasenverhältnis und eine flüssig erscheinende Phase höherer Viskosität bildet die Matrixphase. Diese nimmt analog zur geordneten Phase im ungeladenen System den Farbstoff nicht an. Aufgrund dieser Ähnlichkeit werden wir hier auch von flüssig geordneter und flüssig ungeordneter Phase sprechen.

Das geladene Lipid (DPPG) besitzt dieselbe Kette wie das gesättigte Lipid (DPPC). Diese ist in der geordneten Phase angereichert. Somit gehen wir davon aus, dass sich auch das DPPG in der geordneten Phase anreichert. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestärkt, dass sämtliche auf die Ladung zurückzuführende Effekte in dieser Phase zu beobachten sind.

Wir können nicht ausschließen, dass das Einbringen einer geladenen Komponente zu einer Koexistenz mehrere Phasen führt. Tatsächlich war dies in einem System, das DPPA als geladenes Lipid enthielt, zu beobachten. Hier ist unter Abkühlung bei einer ersten oberen Temperaturen  $T_{mo} \sim 45^\circ C$  das Auftreten von kristallin erscheinenden Domänen zu beobachten, die den Farbstoff ausschließen. Diese Domänen verhalten sich wie gelförmige Domänen.

Bei einer zweiten, tieferen Temperatur  $T_{mu}$  zeigt sich dann das Auftreten von Domänen, die wie in der flüssig flüssig Koexistenz stark fluktuieren und bei Kollision verschmelzen. Diese Phase schließt ebenfalls den Farbstoff aus. Beide Arten von Domänen diffundieren frei auf der Oberfläche. Bei der Kollision einer flüssig erscheinenden Domänen mit einer gelförmigen findet eine Verschmelzung der beiden Domänen statt. Dies führt zu einem 'Aufweichen' der zerklüfteten Struktur. Je mehr solche Verschmelzungsprozesse stattfinden, desto weicher wird Kontur der gelförmigen Domänen. Dies lässt vermuten, dass sich diese beiden Phase mischen. Das 'Aufweichen' könnte mit einem größeren Abstand der geladenen Lipide zu erklären sein.

Enthielt die Membran DPPG als geladenes Lipid, war dieser Effekt nur in Ausnahmefällen zu beobachten. Es waren hier keine zwei unabhängigen Entmischungsprozesse zu beobachten. Daher entschieden wir uns für die Verwendung von DPPG bei den folgenden Untersuchungen.

Wir werden im Folgenden die Domänenstruktur von Domänen der geladenen Phase untersuchen. Hierzu präparieren wir die ungeladene Phase bei einem Cholesterolanteil von 20% als Matrixphase ((1)DOPC-(1-x)DPPC-(x)DPPG+20%Cholesterol). Die Bestimmung der Viskosität der ladungsreichen Phase erfolgt, dann wieder durch die Bestimmung der Domänendiffusion in dieser Phase. Daher werden wir für diese Untersuchungen die geladene Phase bei einem Cholesterol-Anteil von 40% als Matrixphase präparieren.

### 6.3. Ladungsphasendiagramm der Domänenstrukturen

In Abb.6.1 präsentieren wir das phänomenologische Phasendiagramm für die Domänenstruktur in Abhängigkeit von der relativen Ladung im System DOPC(1)-DPPC(1-x)-DPPG(x)+20%-Cholesterol<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Es sind die bei Abkühlung resultierenden Domänenstrukturen dargestellt. Qualitativ bleibt beim Aufheizen die prinzipielle Gestalt erhalten, es zeigen sich jedoch einige nichtlineare Effekte, die das Maß dieser Arbeit übersteigen.

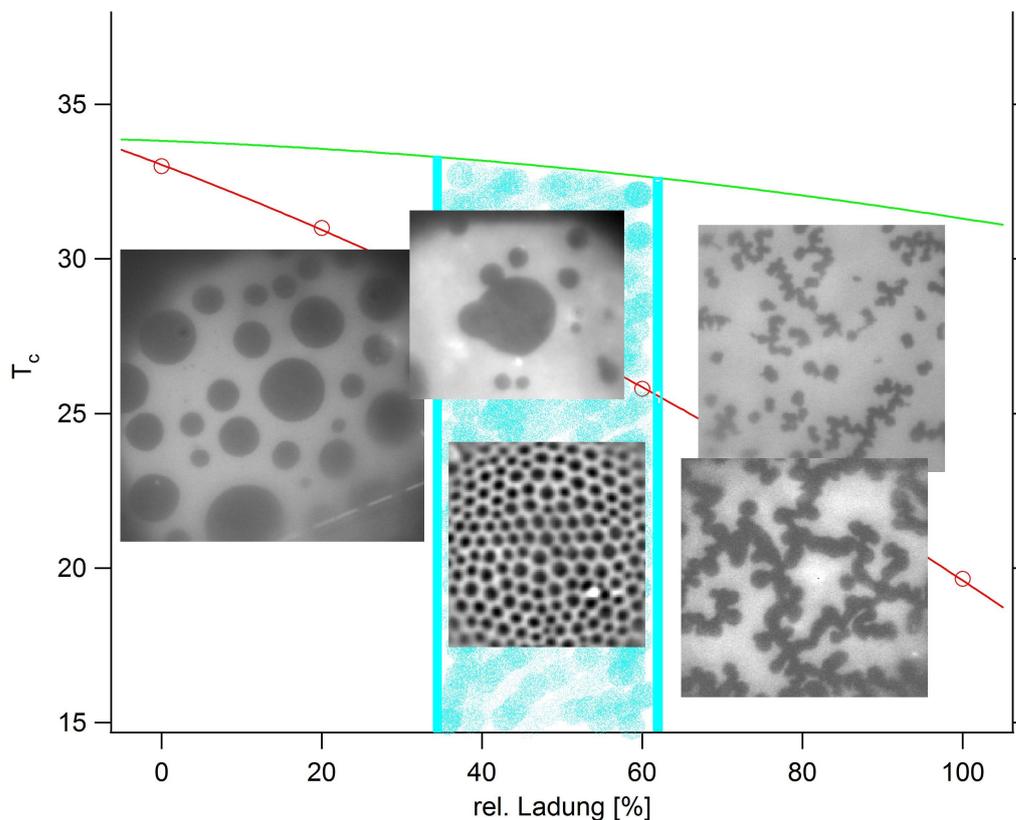


Abbildung 6.1.: Phänomenologisches Phasendiagramm der Domänengestalten in Abhängigkeit von der relativen Ladung  $x$  im System (1)DOPC-(1- $x$ )DPPC-( $x$ )DPPG+20%Cholesterol. Die rote Kurve markiert das kalorimetrisch bestimmte Maximum der Wärmekapazität, die grüne die Temperatur bei der Domänen sichtbar werden.

Es sind drei Bereiche zu diskutieren:

- **0-30% relative Ladung** Unterhalb der Entmischungstemperatur von ca.  $T_m = 34^\circ\text{C}$ , treten im ungeladenen System Domänen der flüssig geordneten Phase (dunkel) in der flüssig ungeordneten Phase (hell) auf. Die Domänen wachsen nach dem beschriebenen Kollisions- und Verschmelzungsverhalten. Dieses Verhalten bleibt auch bei Zunahme der relativen Ladung bis ca. 30% bestehen. Bei der Verschmelzung zweier Domänen ist jedoch eine Zunahme der Relaxationszeiten in die zirkuläre Gleichgewichtsgestalt zu beobachten. Dies führen wir auf die erhöhte Viskosität der geordneten Phase der Domänen zurück, was wir im nächsten Abschnitt detailliert untersuchen werden (Kapitel III 6.4).
- **30-60% relative Ladung** Hier zeigt sich eine Bifurkation im Verhalten der Domänen. Auf einem Teil der Vesikeln ist weiterhin ein Kollision- und Wachstumsverhalten von Domänen zu beobachten. In den verbleibenden Vesikeln erscheinen hexagonal langreichweitig

geordnete Überstrukturen der Domänen. Bei etwa 50% relativem Ladungsanteil präsentieren in unseren Untersuchungen ca. 50% der Vesikel diese Ordnung.

Bei dem Teil der Vesikel, der weiterhin kollidiert und verschmilzt, wird die Erhöhung der Viskosität der geordneten Phase sehr deutlich. Die typische Relaxationszeit in eine zirkuläre Gestalt nach Verschmelzung liegt hier im Minutenbereich. Dies unterstützt nochmals die beschriebene Zunahme der Viskosität bei Erhöhung des Ladungsanteils.

Die Ausbildung der hexagonal-geordneten Phase zeigt allerdings Nichtgleichgewichtseigenschaften, die sich in einer Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Abkühlung offenbaren. Bei schnellerem Abkühlen bildet sich die hexagonale Phase wesentlich häufiger aus im Vergleich zu moderatem Abkühlen. Es offenbart sich zudem ein Symmetriebruch in der Reversibilität des Prozesses. Während wie beschrieben bei langsamen Abkühlen wesentlich mehr Domänen kollidieren und verschmelzen, zeigt sich die hexagonale Ordnung bei Erhöhung der Temperatur stabil. Die Ursache der Bifurkation war experimentell nicht aufzulösen.

- 60-100% **relative Ladung** Bei weiter zunehmendem Ladungsanteil zeigt sich ab ca. 60% relativer Ladung ein zweiter struktureller Phasenübergang. Domänen präsentieren sich zunehmend in elongierter Gestalt und bilden bei tiefen Temperaturen netzartig verbundene Strukturen.

Wie angesprochen war der Übergang zu einer hexagonalen Ordnung nicht in allen Präparationen zu beobachten. Dies veranlasst uns, diesen Bereich im Phasendiagramm „blau schattiert“ darzustellen. Stabil dagegen zeigt sich stets der Übergang in die elongierten Domänenstrukturen, die auf den Zeitskalen unseres Experimentes keine Relaxation in eine runde Gestalt zeigen. Diese Strukturen und das Verhalten erinnert an das in der flüssig-gel Koexistenz. Die ungeordnete eher fraktale Domänenstruktur weist Ähnlichkeit mit dem Aussehen gelförmiger Domänen auf.

Wir versuchten zusätzlich zum optischen Erscheinungsbild das System kalorimetrisch zu charakterisieren. In der Mischung ohne Ladung zeigte sich ein schwer zu bestimmender Phasenübergang. Die Mischungen die Ladung enthielten, wiesen eine sehr breite Phasenumwandlung auf (Wärmekapazitätsprofile in Anhang A.2). Das Maximum der Umwandlung verschob sich mit zunehmender Ladung zu tieferen Temperaturen. Die Temperatur des Maximums ist in Abb. 6.1 durch rote Symbole dargestellt. Die Temperatur bei der optisch erstmals Domänen sichtbar wurden, schien sich nicht zu verschieben, wie in Abb. 6.1 durch die grüne phänomenologische Linie angedeutet ist. Allerdings ist dies sehr stark von der Beleuchtung abhängig, so dass diese Linie nur als Hilfslinie verstanden werden darf.

## 6.4. Zweidimensionaler Elektrorheologischer Effekt in Phospholipid Membranen

Der Elektrorheologische Effekt beschreibt eine Zunahme der Viskosität einer Flüssigkeit in Abhängigkeit eines externen Feldes (z.B. [97]). Einen ähnlichen Effekt konnten wir in Lipidmembranen identifizieren. Im vorher untersuchten System (1)DOPC-(1-x)DPPC-(x)DPPG+20%Cholesterol beobachteten wir mit zunehmender Ladung eine zunehmend langsamere Relaxation

der Domänengestalt bei der Verschmelzung zweier Domänen. Dies deutet auf eine Zunahme der Viskosität der geladenen Phase bei Erhöhung der relativen Ladung hin.

Um den Effekt der Ladung auf die Viskosität der (vermutlich) ladungsenthaltenden Phase auflösen zu können, bestimmten wir, wie zuvor ((Kapitel IV 4)), die Viskosität dieser Phase anhand der thermischen Bewegung von Domänen in ihr. Dazu wurde diese Phase im System (1)DOPC-(1-x)DPPC-(x)DPPG+40%Cholesterol als Matrixphase präpariert<sup>2</sup>.

Wieder fanden wir für sämtliche Ladungsanteile ein Arrhenius-Verhalten der Viskosität<sup>3</sup>.

$$\eta_M = \eta_{M0} \exp \left[ \frac{E_A}{k_B T} \right] \quad (6.1)$$

In Abb. 6.2 stellen wir die erhaltenen Aktivierungsenergien  $E_A$  in Abhängigkeit von der relativen Ladung  $x$  dar.

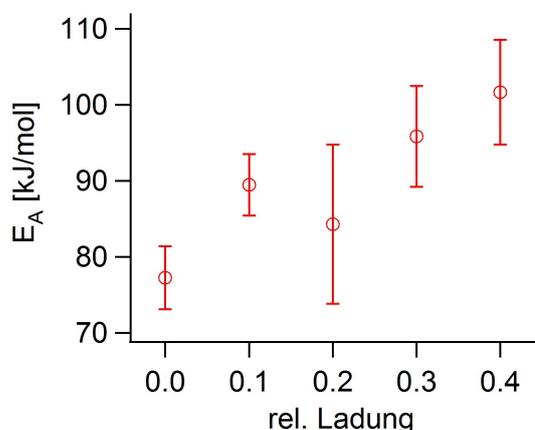


Abbildung 6.2.: Aktivierungsenergie  $E_A$  in Abhängigkeit von der relativen Ladung.

<sup>2</sup>Vesikel dieser Zusammensetzung die Ladung enthielten, konnten mit zunehmendem Ladungsanteil zunehmend stärker unterkühlt werden, ohne Phasenseparation zu zeigen. Die Phasenseparation konnte hier stets nur durch Beleuchtung induziert werden. Ab  $x = 40\%$  relativer Ladung war selbst durch lange Beleuchtung keine Phasenseparation zu erreichen. Daher wurden nur Vesikel mit relativem Ladungsanteil  $x$  zwischen  $x = 0\%$  und  $x = 40\%$  untersucht. Als Ursache dieses Effektes vermuten wir eine Zunahme der Energie der ladungsreichen Domänen, was dann eine Reduzierung der effektiven Linienspannung bewirkt. Entsprechend der Beschreibung von Frolov et al. [98] sind Domänen bei kleiner Linienspannung 'entropisch gefangen'. Es kann sich keine makroskopische Phasenseparation ausbilden, obwohl zu diesem Zeitpunkt vermutlich eine nanoskopische Separation existiert. Erst die Beleuchtung und die damit verbunden Entstehung der photooxidativen Abbauprodukte von Cholesterol steigert dann die Linienspannung [45] und ermöglicht eine makroskopische Phasenseparation. Es fand stets eine Entmischung in zwei flüssig erscheinende Phasen statt.

<sup>3</sup>Bei hohem Ladungsanteil und tiefen Temperaturen wird die Viskosität sehr hoch. Dies führt zu einer starken hydrodynamischen Kopplung. Viele Domänen diffundieren dann nicht mehr unabhängig. Zusätzlich wird die diffusive Bewegung zunehmend von den Fluktuationen des gesamten Vesikels überlagert. Daher berücksichtigten wir bei einem Ladungsanteil von  $x = 30\%$  und  $x = 40\%$  nur Messungen bei  $T > 18^\circ\text{C}$ , da bei Temperaturen darunter die Werte abwichen.

Mit steigendem Ladungsanteil war eine Zunahme der Aktivierungsenergie  $E_A$  zu beobachten. Wir versuchen im Folgenden diesen Anstieg über ein „freie Flächenmodell“ phänomenologisch auf das zusätzliche elektrostatische Potential zurückzuführen.

**„Freie Flächen Modell“** Eine Beschreibung des exponentiellen Verhaltens der Viskosität, bzw. des Diffusionskoeffizienten von Flüssigkeiten wird häufig im Rahmen eines „freie Volumen Modells“ gegeben [99]. In der ursprünglichen Theorie von Cohen und Turnbull [100] ist der Diffusionskoeffizient direkt mit dem verfügbaren thermisch angeregten Volumen  $v_f$  und dem Volumen  $v_0$  bei  $0K$  verbunden

$$D = w \cdot \exp \left[ -\frac{v_0}{v_f} \right] \quad (6.2)$$

mit einer Normierungskonstante  $w$ . Zusätzlich kann eine Aktivierungsenergie für den Platzwechsel eingeführt werden, um Experimente besser zu beschreiben [99]. Dieses freie Volumenmodell wurde dann auf die Beschreibung der Diffusion in Membranen übertragen [101, 102]. Die Vorgehensweise ist identisch, lediglich wird das freie Volumen hier durch ein freie Fläche ersetzt oder es werden einige Modifikationen, die Situation der Membran betreffend, vorgenommen [102]. Mit diesem „freie Flächen Modell“ lässt sich die Diffusion in Membranen qualitativ beschreiben [102, 103, 104, 105, 106] allerdings, was auch ein Hauptkritikpunkt dieses Modells ist, können die Parameter nicht exakt bestimmt werden.

Die Beschreibung von Cohen und Turnbull wurde durch Methoden der Statistischen Mechanik erhalten und ist identisch mit der von Dolittle [107] empirisch gefundenen Beschreibung. Dem Modell liegt jedoch keine molekulare Theorie der Flüssigkeit zugrunde. Dies erlaubt keine Vorhersagen über das Verhalten beliebiger Flüssigkeiten, auch bei Kenntnis des molekularen Potentials.

Eine wesentlich natürlichere Definition des freien Volumens ist durch eine van der Waalsche Zustandsgleichung möglich [108]

$$[p + A(n, T) n^2] [1 - B(n, T) n] = nk_B T \quad (6.3)$$

hierbei bezeichnet  $p$  den Druck,  $A(n, T)$  als ersten van der Waals Parameter den Binnendruck und als zweiten das Kovolumen  $B(n, T)$ . Damit kann das mittlere freie Volumen wie folgt angegeben werden

$$v_f = v [1 - B(n, T) n] \quad (6.4)$$

Die van der Waalsparameter  $A(n, T)$  und  $B(n, T)$  sind dabei durch das tatsächliche intermolekulare Potential bestimmt und, in dieser Erweiterung der klassischen van der Waals Theorie, abhängig von der Temperatur [108]. Mit dieser Definition des freien Volumens wird der Diffusionskoeffizient

$$D = 1,0019 \frac{3}{8n\sigma} \sqrt{\frac{k_B T}{\pi M}} \exp \left[ -\frac{\alpha v_0}{v [1 - B(n, T) n]} \right] \quad (6.5)$$

mit den Parametern  $M$  und  $\sigma$ , die durch das Potential bestimmt sind und einem freien Parameter  $\alpha$ . Um die Diffusion als aktivierten Prozess zu beschreiben, kann die Arbeit, ein freies Volumen  $\alpha v_0$  gegen den effektiven Druck  $p_{eff} = p + A(n, T) n^2$  zu schaffen, berechnet werden

$$W_c = \alpha v_f p_{eff} = \alpha v_0 [p + A(n, T) n^2] \quad (6.6)$$

und der Diffusionskoeffizient wird dann

$$D = 1,0019 \frac{3}{8n\sigma} \sqrt{\frac{k_B T}{\pi M}} \exp \left[ -\frac{W_c}{k_B T} \right] \quad (6.7)$$

Der erhebliche Vorteil dieser Definition des freien Volumens ist, dass alle Parameter aus dem tatsächlichen molekularen Potential bestimmt werden können. Eine Kenntnis dieses Potentials ermöglicht dann akkurate Vorhersagen über die Diffusion. Dieses Modell kann so auch für die Membran und dann das Schaffen einer „freien Fläche“ adaptiert werden. Die Arbeit  $W_c$  um ein freies Volumen  $v_f$ , bzw. Fläche  $a_f$  zu schaffen hängt nach Gl 6.6 direkt vom effektiven Druck  $P_{eff}$  ab. Der Einfluss der Ladung in der Membran kann auch als elektrostatischer Druck verstanden werden [37]

$$\Pi_{el} = \left( \frac{dF_{el}}{dA_L} \right)_{T,p} \quad (6.8)$$

mit der freien elektrostatischen Energie  $F_{el}$  und der Fläche  $A$  der Membran.

Der effektiver Druck  $p_{eff}^{ge}$  in der geladenen Membran ist dann gerade  $p_{eff}^{ge} = p_{eff} + \Pi_{el}$ . Es ist nun, auch ohne Kenntnis des genauen Ausdrucks, gerechtfertigt eine zusätzliche Arbeit  $W_{el}$  einzuführen die gerade diesen elektrostatischen Beitrag berücksichtigt

$$D = 1,0019 \frac{3}{8n\sigma} \sqrt{\frac{k_B T}{\pi M}} \exp \left[ -\frac{W_c + W_{el}}{k_B T} \right] \quad (6.9)$$

Damit könnte sich phänomenologisch die Erhöhung der Viskosität der Membran  $\eta \sim 1/D$  durch das Einbringen von Ladung verstehen lassen.

Um das elektrostatischen Potential als tatsächlich ursächlich für die Veränderung der Viskosität darzustellen, vergleichen wir die Viskosität einer geladenen Membran ((1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG+40%Cholesterol) in bidestilliertem Wasser und elektrolytischer Lösung. Hierzu wird zunächst die Viskosität, wie beschrieben, ohne Elektrolyt bestimmt. Dann wird in die selbe Präparation *NaCl*-Lösung gegeben, wobei eine entgültige Konzentration von ca.  $c = 10 \text{ mmol/l}$  erreicht wird. Nach Elektrolytzugabe und ausreichender Equilibration wird wieder die Viskosität bestimmt.

Bei  $T = 22^\circ \text{C}$  finden wir für die Viskosität der geladenen Membran in Abwesenheit eines Elektrolyten  $\eta_M = 4.98 \cdot 10^{-9} \pm 0.54 \cdot 10^{-9} \text{Ns/m}$ . Nach der Elektrolytzugabe verringert sich dies auf  $\eta_M = 3.00 \cdot 10^{-9} \pm 0.30 \cdot 10^{-9} \text{Ns/m}$ . Dieses einzelne vorläufige Ergebnis gibt eine Hinweis darauf, dass die Erhöhung der Viskosität der geladenen Phase wohl tatsächlich auf die zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung zurückzuführen ist. Wohl aufgrund der Abschirmung des Potentials durch den Elektrolyten nimmt die Viskosität signifikant ab. Nach Gl. 6.9 wäre eine solche Abnahme allerdings zu erwarten gewesen. Durch die Abschirmung wird das elektrostatische Potential kleiner und damit der Diffusionskoeffizient größer. Dies entspricht exakt unserer Beobachtung.

## 6.5. Zweidimensionale hexagonale Gitter

Wir haben im Phasendiagramm beobachtet, dass in einem intermediären Ladungsbereich zwischen etwa 30% und 60% relativer Ladung, im System (1)DOPC-(1-x)DPPC-(x)DPPG+20%Cholesterol hexagonal geordnete Strukturen in etwa 50% der Vesikel erscheinen.

Beispielhaft ist dies in Abb. 6.3(a) dargestellt. Die 2d-Fouriertransformierte des Bildes in Abb. 6.3(b) zeigt deutlich die langreichweitige hexagonale Ordnung.

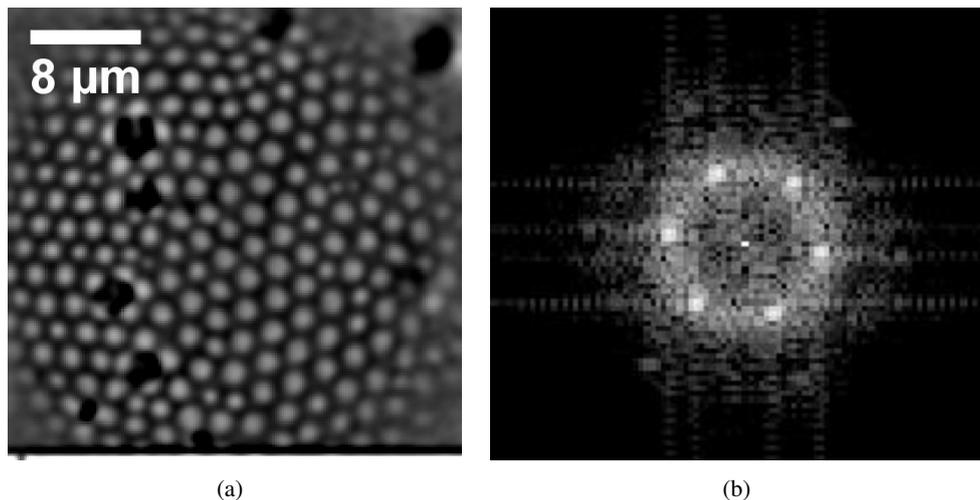


Abbildung 6.3.: a) Hexagonale Domänenstruktur im System (1)DOPC-(0.5)DPPC-(0.5)DPPG+20%Cholesterol. b) Die langreichweitige Ordnung ist hervorragend im Streubild zu erkennen.

Wenn einmal entstanden, sind die hexagonalen Strukturen äußerst stabil und werden erst bei hohen Temperaturen, vornehmlich durch Bud-Bildung, zerstört. Wunderschön weist die Ordnung alle strukturellen Eigenschaften eines Kristalls auf. Auch sind zahlreiche Arten von Gitterdefekten zu erkennen.

Theoretisch wurden hexagonale Domänenstrukturen aufgrund elastischer Kopplungen in der Membran postuliert [109]. Experimentell konnte dies auch beobachtet werden [43, 110]. In unserem System vermuten wir die Ladung als Ursache für die Strukturbildung. Sie wirkt zudem stabilisierend für die hexagonal Struktur. Auch durch osmotisch induzierte Spannung in der Membran ließ sich die Ordnung nicht zerstören. Der osmotische Druck wurde dabei durch Glucoselösung erzeugt, um Abschirmeffekte auszuschließen. Eine Zugabe eines ionischen Elektrolyten (*NaCl*) führt dagegen zur Zerstörung der Struktur. Dies weist auf die Elektrostatik als dominierende Wechselwirkung hin.

**Gitterpotential** Eine erste Beschreibung der Dynamik der Struktur gibt die Betrachtung der Abstände zweier Domänen  $g(t) = \mathbf{r}_1(t) - \mathbf{r}_2(t)$  zu jeder Zeit  $t$ . Wie Abb. 6.4(a) zeigt, hat die Verteilung der Abstände Gaußsche Form, und so können wir ein zugrunde liegendes harmoni-

ches Potential annehmen. Dieses ergibt sich dann gemäß  $U(d) = \ln[g(t)] k_B T$  und ist, wie Abb. 6.4(b) zeigt, in der Tat harmonisch.

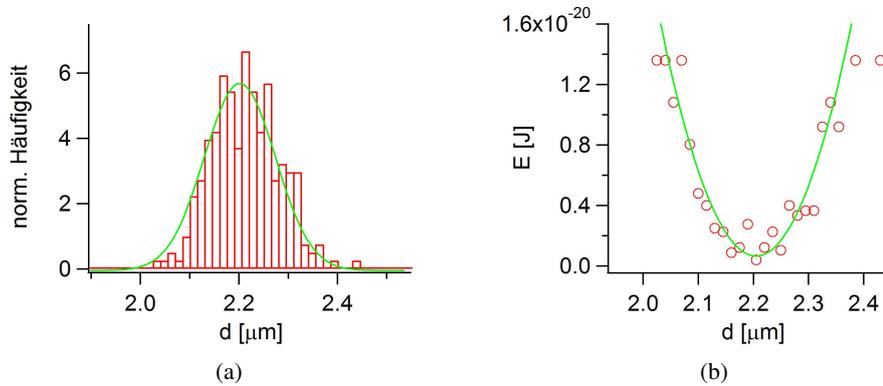


Abbildung 6.4.: a) Die Verteilung der Abstände zweier benachbarter Domänen mit der Zeit zeigt eine Gaußsche Form b) Daraus abgeleitetes Potential.

**Gitterdynamik** Interessant wäre nun, ob sich Anregungen in diesem hexagonalen Gitter identifizieren lassen. Hierzu konnten wir einige vorläufige Ergebnisse erhalten, die eine „phononische“ Anregung erahnen lassen. Abb. 6.5 zeigt die Bewegung einer Domäne relativ zu einer der

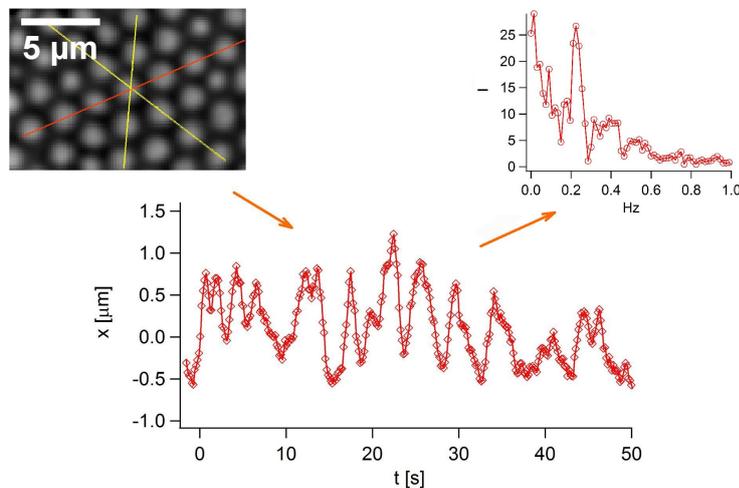


Abbildung 6.5.: Zeitliche Entwicklung der Position einer Domäne relativ zur rot eingezeichneten Kristallachse und die resultierende Fouriertransformierte der Trajektorie.

Kristallachsen (rot). In der zeitlichen Trajektorie ist eine periodische Bewegung zu erkennen, was durch die Fourier-Transformierte bestätigt wird.

Dieses letzte Ergebnis soll hier auch nicht mehr weiter vertieft werden, aber als Ausblick für zukünftige Untersuchungen dienen. Über eine Modulation der elektrostatischen Umgebung sollte es zum Beispiel auch möglich sein, die Kopplungskonstante und die Dämpfung der hier im Ansatz beobachteten mechanischen Schwingungsmoden zu studieren.

## 7. Exkurs in Strömungsphänomene auf 2d-Membranen

Im Folgenden wollen wir drei Experimente vorstellen, die wir an den „Oberflächen adhärten Vesikeln“ als Modellsystem für ein zweidimensionales, mikrofluidisches System durchführen konnten. Die nahezu beliebig einstellbare Viskosität der Membran, eröffnet dabei ein weites Feld für die Untersuchung, aber auch die Manipulation der mikrofluidischen Charakteristika. Die 2d-Eigenschaft der Membran und die Existenz von makroskopischen Domänen erlaubt dabei eine sehr gute Darstellung der Strömungsverhältnisse in der Membran.

### 7.1. Strömungen in zwei Dimensionen

Die geschlossene Halbschale eines „Oberflächen adhärten Vesikels“ lieferte eine Zwangsbedingung für eine Strömung auf der Membran, da kein Material aus der Membranebene „herausfließen“ kann. Wir regen eine Strömung in der Membran durch eine externe Strömung im Medium an.

Die Vesikel wurden, wie beschrieben (Kapitel II 2), bei ca.  $45^{\circ}\text{C}$  präpariert. Ein Absenken der Temperatur führt zu Strömungen in der Kammer, die in der Nähe des Bodens parallel zu diesem verläuft<sup>1</sup>. Wir wählen einen Bereich der Kammer, in dem die Strömung nicht stark genug ist, um die Halbschalen signifikant zu deformieren.

Um die Strömung im betrachteten Volumen zu beobachten, verwenden wir einfach die in der Lösung vorhandenen kleineren Vesikel und Membranfragmente. Die Membranbewegung selbst wird anhand der Bewegung von Domänen in der Membran sichtbar. Eine graphische Darstellung der Strömungen im Medium und der Membran geschieht durch Überlagerung mehrerer aufeinander folgender Bilder (Software: Helicon Focus (Helicon Soft)). Bewegte Partikel erscheinen so als Trajektorie. In Abb. 7.1(a) ist ein einer externen Volumenströmung ausgesetzter Vesikel abgebildet.

Die Strömung des Mediums verläuft in Richtung des grünen Pfeils. Diese externe Strömung führt zu einer Bewegung der Domänen am obersten Teil des Vesikels in Richtung der externen Strömung. Nun ist die Membranfläche konserviert und der 2d-Charakter der Membran lässt keinen Fluss normal zur Membran zu. Daher muss aufgrund der Geometrie des Vesikels die bewegte Membran im Boden-nahen Bereich des Vesikels zurückfließen. Dies führt zu dem in Abb. 7.1(a) erkennbaren Strömungsmuster.

---

<sup>1</sup>Bei sehr schnellem Absenken der Temperatur entstehen am Rand sehr starke Strömungen, die in der Lage sind Vesikel fortzureißen und dabei Tether zu erzeugen, was wir in Kapitel III 3 ausgenutzt haben.

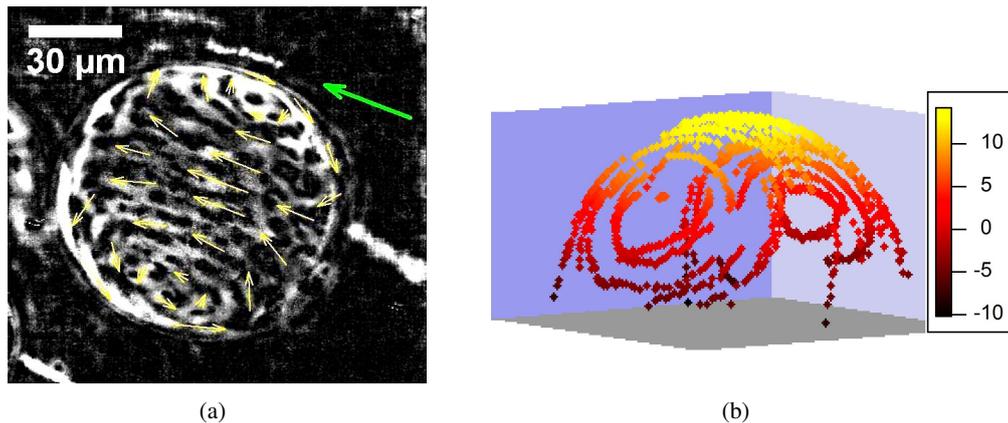


Abbildung 7.1.: a) Die Kopplung der externen Volumenströmung (grüner Pfeil) an die Membran führt zu einer 2d-Strömung in der Membran. Aufgrund der Randbedingung bilden sich Wirbel an den Seiten des Vesikels. b) Darstellung der Strömung anhand der Domänenbewegung.

Die Positionbestimmung der Domänen macht eine Darstellung der Membranströmung in Abb. 7.1(b) möglich. Schön sind die an den Seiten des Vesikels lokalisierten Wirbel zu erkennen. Die Farbskala stellt phänomenologisch die Geschwindigkeit der Membranströmung in Richtung der Volumenströmung dar.

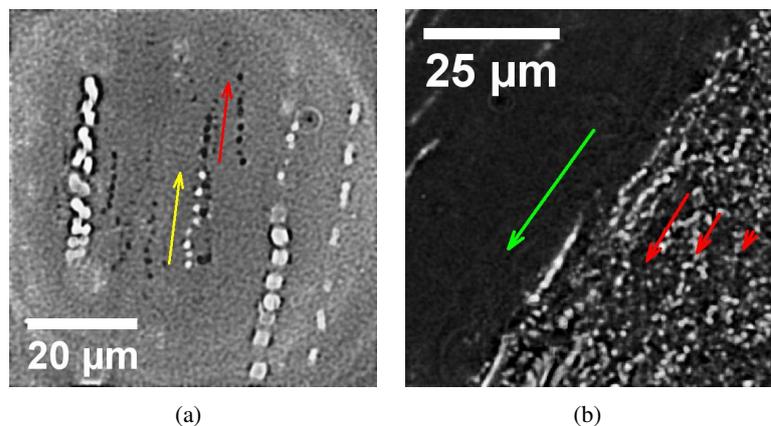


Abbildung 7.2.: a) Kopplung der externen Volumenströmung (gelber Pfeil) an die Strömung in der Membran (roter Pfeil). b) Kopplung der Membranströmung (grüner Pfeil) an das Medium im Vesikel (roter Pfeil).

Die Kopplung des Flusses im Medium an die Membran zeigt, dass an der Oberfläche Non-Slip-Randbedingungen vorliegen müssen. Dies lässt sich durch den Vergleich der Geschwindigkeiten der Membranströmung und der Volumenströmung belegen. Die Strömung stellen wir in Abb. 7.2(a) anhand der Bewegung von Partikeln im Medium (weiße Partikel) und Domänen (schwarze

Partikel) in der Membran dar. Der gelbe und der roten Pfeil verdeutlicht die Bewegung eines Partikels im Medium (gelb) und einer Domäne in der Membran (rot). Es ist deutlich, dass die zurückgelegte Distanz beider Partikel vergleichbar ist. Dies indiziert eine Kopplung zwischen Medium und Membran.

Gleichzeitig koppelt die Strömung in der Membran an das Medium im Inneren des Vesikels und führt auch hier zu einer Strömung. Dies stellen wir in Abb. 7.2(b) dar. Die Strömung in der Membran ist durch den grünen Pfeil angedeutet, hier im statischen Bild aber nicht direkt darstellbar. Die Strömung im Inneren des Vesikels zeigt die Bewegung von Partikeln an. Sie folgt der Strömung der Membran (rote Pfeile). Dabei sind, wie bei der Strömung auf der Membran, zwei Wirbel zu beobachten.

Da die Strömung in der Membran stark durch deren Fluidität beeinflusst wird, bewirkt eine Veränderung der Fluidität der Membran auch eine Veränderung der Strömung. Beispielsweise für ein Netzwerk gelförmiger Domänen kommt die Strömung zum Erliegen (Abb. 7.3(a)).

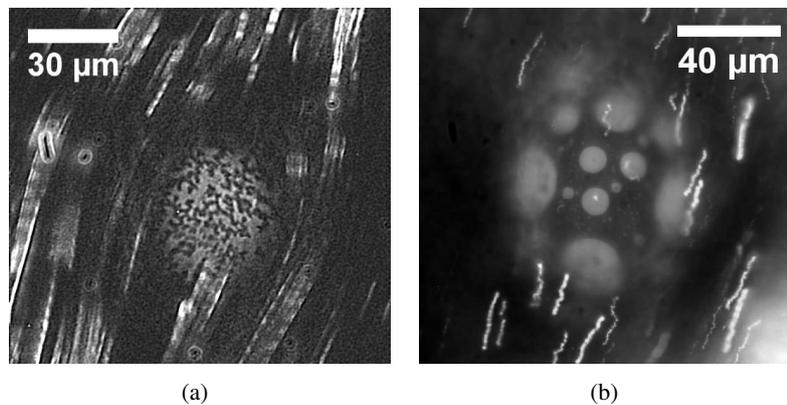


Abbildung 7.3.: Immobilisierung der Membranoberfläche durch a) geschlossene Domänenstruktur ((1)DOPC-(0.3)DPPC-(0.7)DPPG+20%Cholesterol,  $T \sim 24^\circ\text{C}$ ) und b) hohe Viskosität der Matrixphase ((1)DOPC-(0.6)DPPC-(0.4)DPPG+40%Cholesterol,  $T \sim 6.5^\circ\text{C}$ ).

Gleiches gilt für die zuvor vorgestellten hexagonalen Gitter, da hier die Wechselwirkung im Gitter offensichtlich keine Verschiebung zulässt. Auch eine sehr viskose Matrix, wie sie durch die Zugabe von Ladung zu erreichen war, hemmt die Strömung (Abb. 7.3(b)).

Gleichzeitig wird aber auch der Fluss des externen Mediums von diesen Eigenschaften der Membran beeinflusst. Da Non-Slip Bedingungen vorliegen, hat der externe Fluss an einer mobilen Oberfläche die Geschwindigkeit dieser Oberfläche. Für eine immobile Oberfläche muss die Geschwindigkeit auf Null abfallen.

## 7.2. Zweidimensionale Tropfen

### 7.2.1. Verschmelzungskinetik von 2d-Tropfen

Eine weitere hydrodynamische Fragestellung ist die Verschmelzungskinetik zweier Flüssigkeitstropfen [111, 112, 113]. Die Verschmelzung zweier flüssiger Domänen in einer flüssigen Membran ist ganz analog zu diesem Prozess. Wir präsentieren erste vorläufige Messungen, um evtl. detailliertere Untersuchungen anzuregen. Die hohe Viskosität der geordneten Phase in geladenen Membranen ermöglicht dabei den Verschmelzungsprozess sehr langsam darzustellen.

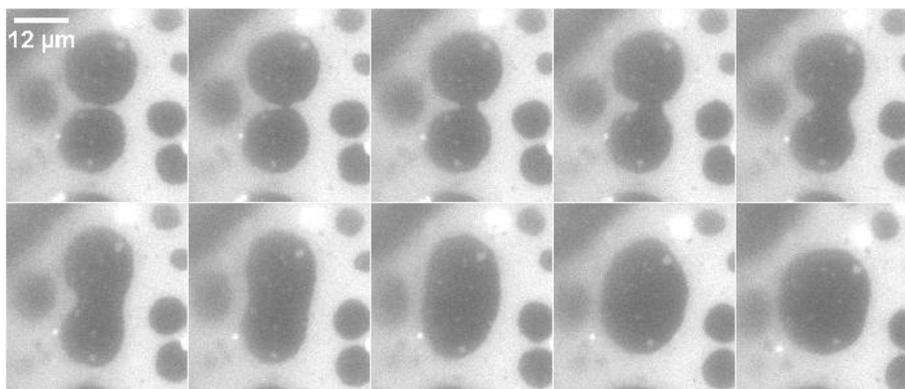


Abbildung 7.4.: Verschmelzung zweier geordneter Domänen in der ungeordneten Matrixphase im System (1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG+20%Cholesterol.

Abb.7.4 zeigt die zeitliche Entwicklung des „Halses“ bei der Verschmelzung zweier flüssig geordneter Domänen. Man erkennt eine schnelle Anfangsphase, die dann in eine zunehmend langsamere Entwicklung des Halsdurchmessers übergeht.

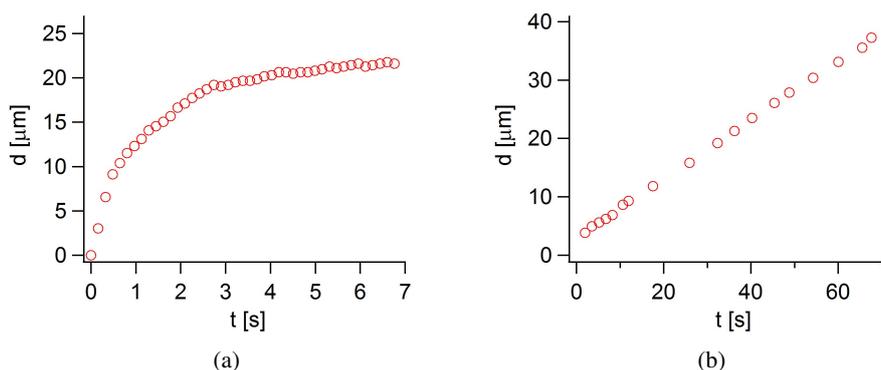


Abbildung 7.5.: a) Entwicklung des Durchmessers des Halses bei der Verschmelzung zweier Domänen bei a) niedriger Viskosität b) hoher Viskosität.

Eine Analyse des Halsdurchmessers in Abb. 7.5, zeigt die Entwicklung für eine niedrige (Abb. 7.5(a)) und eine hohe Viskosität (Abb. 7.5(b.)) der Domäne. Theoretisch wird für verschiedene Viskositäten der Tropfen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten des Halses erwartet. Für eine niedrige Viskosität sollte der Durchmesser des Halses mit  $d \sim t^{1/2}$  wachsen, für eine hohe Viskosität mit  $d \sim t$  [111, 112]. In den hier vorgestellten Experimenten fanden wir erste vorläufige Hinweise, dass sich dies u.U. auch bei der Verschmelzung von zwei Domänen beobachten lässt.

In Abb. 7.5(a) ist der Durchmesser des Halses bei der Verschmelzung zweier Domänen niedriger Viskosität dargestellt. Der Durchmesser entwickelt sich zu Beginn mit einem Potenzgesetz  $d \sim t^{0.7}$ . Dann folgt ein nahezu linearer Anstieg. Abb. 7.5(b) zeigt analog die Verschmelzung zweier Domänen mit hoher Viskosität. Hier entwickelt sich der Durchmesser mit  $d \sim t$ . Man beachte hier auch die wesentlich längere Dauer des Prozesses. Diese Systeme stellen also eine ausgezeichnete Möglichkeit dar, in weiteren Studien die Verschmelzungskinetik zweidimensionaler Tropfen detailliert zu untersuchen.

### 7.2.2. Benetzung von 2d-Tropfen

Durch eine selektive Beleuchtung von Domänen ist es möglich den Materialtransport bei der Verschmelzung zweier Domänen darzustellen. In Abb. 7.6 ist auf der rechten Seite des Bildes

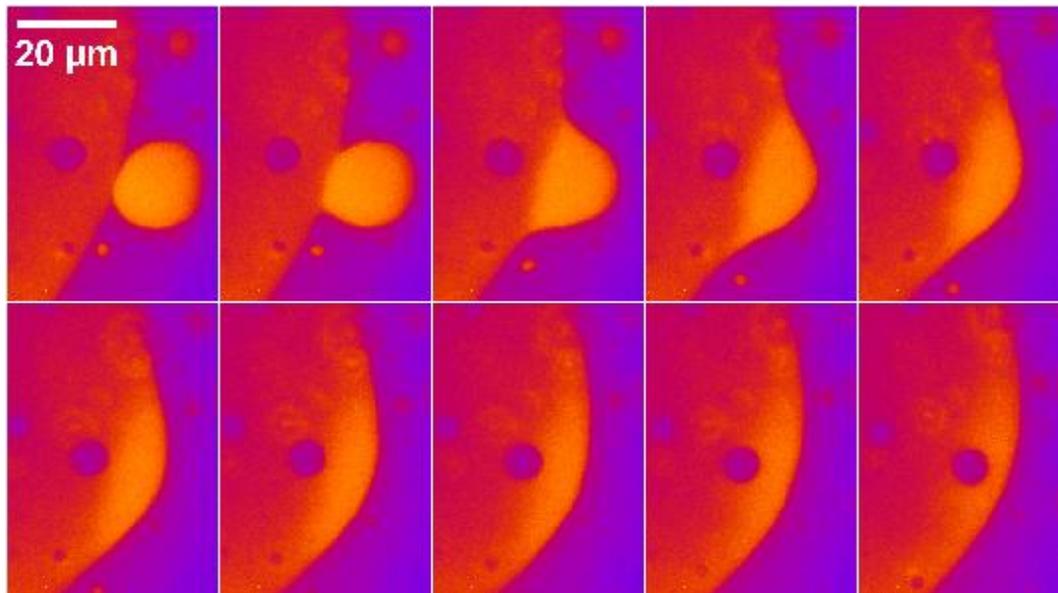


Abbildung 7.6.: Verschmelzung zweier Domänen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität.

ein Teil einer sehr großen flüssig ungeordneten Domäne auf einem Vesikel dargestellt. Die Darstellung erfolgt mit Falschfarben, da dies den späteren Prozess besser sichtbar macht. Die Domäne wurde längere Zeit beleuchtet, um den Fluoreszenzfarbstoff zu bleichen und damit eine

geringere Fluoreszenzintensität der Domäne zu erreichen. Von der rechten Seite nähert sich eine ebenfalls flüssig ungeordnete Domäne: Diese wurde zuvor nicht beleuchtet und ist somit heller. Beim Verschmelzen der beiden Domänen „benetzt“ die kleine Domäne die Große. Das helle Material fließt vornehmlich am Rand der großen Domäne entlang. Diese schnelle Materialbewegung ist von einer langsamen diffusiven Bewegung des Materials radial ins Innere der großen Domäne überlagert. Eine in der großen Domäne eingeschlossene flüssig geordnete Domäne (dunkel) indiziert sehr schön die hydrodynamische Situation bei diesem Vorgang. Durch den Fluss von Material entlang der Phasengrenze entsteht wohl ein „Unterdruck“, der zu einer nach außen gerichteten Bewegung dieser kleinen Domäne führt.

## 8. Gestaltübergänge von Vesikeln

In diesem Kapitel wollen wir zeigen, wie mit Hilfe der Phasenumwandlung auch topologisch Übergänge in biologischen Systemen modelliert werden können. Die Teilung von Zellen oder das Abschnüren kleiner Vesikel bei Endo- und Exozytose erfordert eine Veränderung der Gestalt der Zelle bzw. der Membran. Häufig werden Vesikel als einfaches Zellmodell für die Modellierung solcher Prozesse verwendet (z.B. [114, 115, 116]).

So konnte beispielsweise die Bildung von Ausstülpungen, eine Teilung oder die Adhäsion von Vesikeln dargestellt werden [117]. Aufgrund der stark veränderlichen Eigenschaften der Membran in der Phasenumwandlung wurden die meisten Experimente stets weit entfernt (bezüglich der Temperatur) von einer Phasenumwandlung durchgeführt. Im Hinblick auf die Relevanz der Phasenumwandlung in biologischen Systemen wollen wir in dieses Kapitel zeigen, dass sowohl lokale als auch globale Umwandlungen der Vesikelgestalt durch eine Phasenumwandlung ausgelöst werden können.

Wir beginnen mit der Bildung lokalisierter Ausstülpungen, die den Prozessen bei Endo- und Exozytose gleichen. Dann wird die Betrachtung auf das Verhalten eines ganzen Vesikels erweitert. Wir finden Teilung, Adhäsion und Bildung großer Poren in der Vesikelmembran. Dabei versuchen wir die Charakteristika der Phasenumwandlung aus dem einzelnen Vesikel abzuleiten. Insbesondere zeigen wir, dass die Relaxation der Vesikelgestalt nach einem Temperatursprung als thermodynamische Relaxation verstanden werden kann. Die Kopplung zwischen Mikrostrukturierung und einer Nichtgleichgewichtssituation wird dann zu einer vom Gleichgewicht verschiedenen Strukturgebung führen.

Im Rahmen der Modellierung von zellulären Prozessen versuchten wir auch die elektrische Permeabilität der Membran in Abhängigkeit vom Phasenzustand der Membran darzustellen. Es ist bereits bekannt, dass sich in der Phasenumwandlung reiner Membranen stufenförmige Strom-Fluktuationen zeigen. Diese weisen bemerkenswerte Ähnlichkeit mit Strom-Fluktuationen auf, die in den Zusammenhang mit Ionenkanälen gebracht wurden [118, 119]. Im Rahmen unserer Experimente haben wir versucht, diese Stromfluktuationen in Zusammenhang mit den Membraneigenschaften zu bringen. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass diese Art von Experimenten nur schwer reproduzierbar sind. Der Vollständigkeit halber sind sie allerdings dennoch im Anhang A.5 beschrieben worden.

## 8.1. Domänenstruktur und Budding

### 8.1.1. Budding von Domänen in der flüssig-flüssig Koexistenz

Die Bildung lokalisierter Ausstülpungen (Budding) einer Domäne in der flüssig-flüssig Koexistenz wurde theoretischen von Lipowsky et al. [120, 121, 122] als Folge der Linienspannung vorhergesagt. Ein ähnliches Ergebnis ergaben auch „Molekular Dynamik Simulationen“ [84]. Die Modelle betrachten dabei flüssige Domänen in einer flüssigen Phase. Hier dominiert die Energie der Grenzlinie  $E_l$  die Gestalt der Domäne. Dies führt zu einer zirkulären Domäne, da diese eine minimale Grenzlinie und damit minimale Energie hat. Eine weitere Verkürzung der Grenzlinie kann durch eine Ausstülpung der Domäne aus der Membranebene heraus erfolgen, wie es in Abb. 8.1 schematisch dargestellt ist. Für die Ausstülpung muss aber die Membran „gebogen“ werden, wofür zusätzliche Biegeenergie aufgewandt werden muss. Der Vergleich der Energien der Grenzlinie und der Biegung wird also bestimmen, wie weit sich die Domäne ausstülpt.

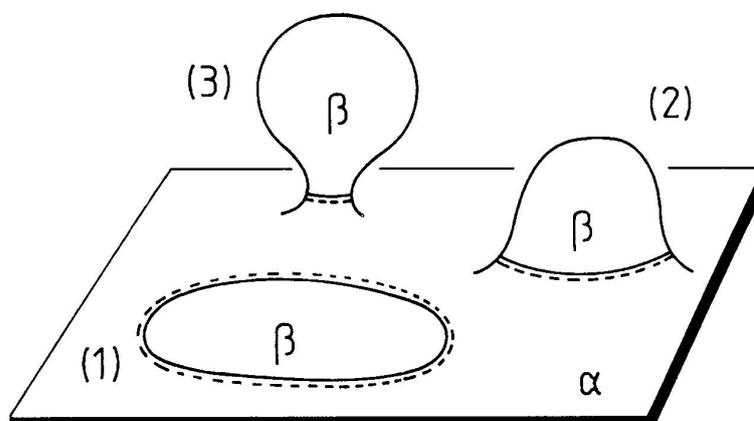


Abbildung 8.1.: Schematischer Buddingprozess einer Domäne der Phase  $\beta$  in einer Matrixphase  $\alpha$ . Beide Phasen werden als flüssig angenommen. Bild aus [120]

Das System DOPC-DPPC+Cholesterol erfüllt alle Voraussetzungen dieses Modells, und ist geeignet, den beschriebenen Prozess experimentell darzustellen. So gelang es dann auch tatsächlich an diesem System eine Buddbildung geordneter Domänen bei Zugabe von Detergenzien zu beobachten [123]. Die Autoren führen die Bildung von Buds hier allerdings auf eine erzeugte Asymmetrie der Membran zurück.

Bekannt ist auch, dass die Linienspannung einer Domäne zu einer Ausstülpung von Domänen und einem Buddingprozess führen kann [43, 124]. Anhand der von uns durchgeführten Untersuchungen können wir im Folgenden zeigen, dass sich die Bildung eines Buds durch die Variation der Linienspannung steuern lässt.

Da wir in der Lage sind sehr große Vesikel zu präparieren, spielt die Veränderung des Volumens beim Budding einer kleinen Domäne eine untergeordnete Rolle. So ist es möglich, zahlreiche vollständige Budding-Prozesse zu beobachten, wie beispielhaft in Abb. 8.2 gezeigt ist.

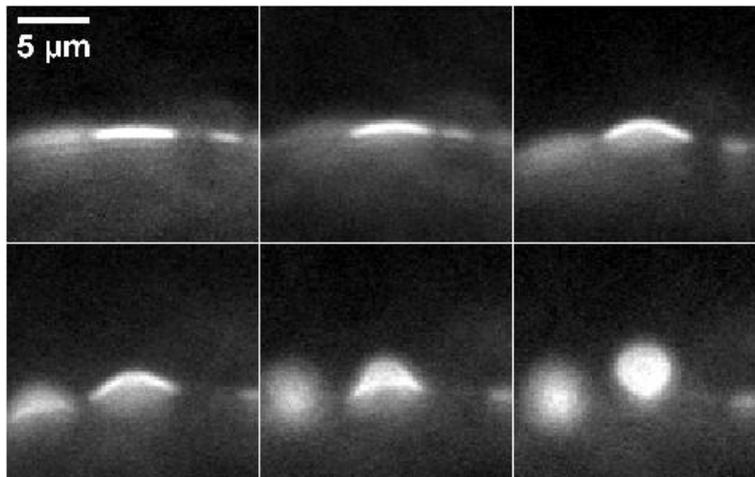


Abbildung 8.2.: Membran eines (1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG+40%Cholesterol Vesikels im Schnitt. Bei Beleuchtung formt eine flüssig ungeordneten Domäne (hell) einen vollständigen Bud.

Die Fluoreszenzaufnahme zeigt die Membran eines großen (1)DOPC-(0.7)DPPC-(0.3)DPPG+40%Cholesterol Vesikels im Schnitt. Eine flüssig ungeordnete Domäne (hell) hat zu Beginn die Krümmung der flüssig geordneten Matrixphase. Bei andauernder Beleuchtung bildet sich langsam eine haubenförmige Gestalt, die dann schnell in einen vollständigen Bud übergeht. Als Ursache vermuten wir die Erhöhung der Linienspannung der Domäne unter Beleuchtung [46]. Zu Beginn ist die Energie der Grenzlinie nicht groß genug, um die Membran der Domäne zu biegen. Die fortlaufende Erhöhung der Energie der Linie durch die Zunahme der Linienspannung ermöglicht dann eine zunehmende Biegung der Membran. So bildet sich schließlich ein vollständiger Bud. Dies stellt experimentell den von Lipowsky et al. [120] beschriebenen Effekt dar.

Die Steuerung der Linienspannung erlaubt also eine Kontrolle von lokalisierter Buddbildung. Insbesondere wurde hier die Buddbildung tatsächlich chemisch ausgelöst, da die Erhöhung der Linienspannung auf die Anreicherung der photooxidativ erzeugten Abbauprodukte in der Grenzlinie zurückzuführen ist. Somit ist es denkbar diesen Prozess durch beliebige, die Grenzlinien beeinflussende Stoffe, zu kontrollieren. Auch sollte durch die Entfernung solcher Stoffe dann eine Reversibilität erreicht werden können.

### 8.1.2. Budding von Domänen in der flüssig-gel Koexistenz

Einen ähnlichen Prozess wie den oben Beschriebenen konnten wir auch in der flüssig-gel Koexistenz beobachten. Das System DLPC-DPPC (25-75) besitzt eine sehr breite Phasenumwandlung von  $\Delta T_c \sim 20^\circ C$ . Dies ermöglicht es, bei langsamer Temperaturveränderung<sup>1</sup>, den fluiden bzw.

<sup>1</sup>Siehe hierzu Kap. III 8.2.1

gelförmigen Phasenanteil in der Phasenkoexistenz gut zu kontrollieren. Vesikel dieser Zusammensetzung zeigen eine zerklüftete Domänenstruktur, wie Abb. 8.3 zeigt.

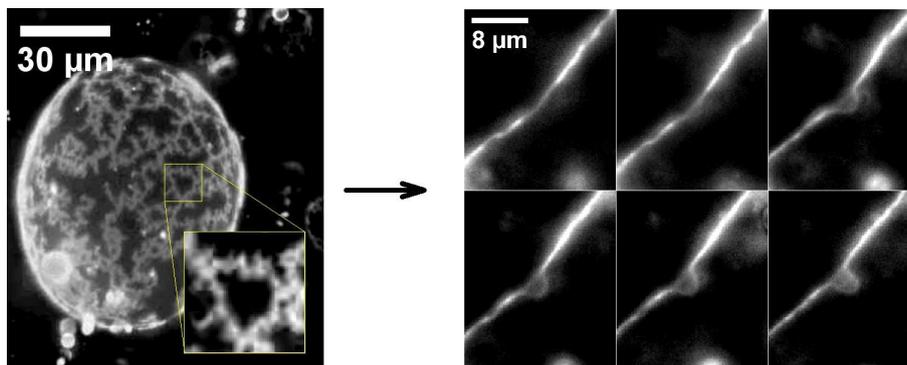


Abbildung 8.3.: Domänenstruktur in der gel-flüssig Koexistenz im System DLPC-DPPC (25-75). Gelförmige Bereiche erscheinen dunkel, flüssige hell. In der zerklüfteten Domänenstruktur sind zahlreiche fluide Domänen von gelförmiger Matrix eingeschlossen (Ausschnittsvergrößerung).

Es existieren zahlreiche fluide Bereiche (dunkel) die komplett von gelförmiger Matrix eingeschlossen sind (Ausschnittsvergrößerung). Aufgrund der Inkompressibilität der gelförmigen Phase liefert dies eine starre Randbedingung für die fluide Phase.

Die Temperatur wird nun von anfänglich  $T_s \sim 20^\circ\text{C}$  mit einer Heizrate von ca.  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  erhöht. Mit zunehmender Temperatur beginnen sich initial flache, fluide Bereiche (dunkel), die von gelförmigen Bereichen (hell) umschlossen sind, auszustülpfen. Die Entwicklung einer solchen Ausstülpung ist in Abb. 8.3 dargestellt. Mit zunehmender Temperatur entwickelt sich die Ausstülpung fortschreitend in einen etwa hemisphärischen Bud ( $\Delta T \propto 5^\circ\text{C}$ ). Dieser bleibt dann stabil.

Grund hierfür ist vermutlich das Aufschmelzen der gelförmigen Phase und die damit verbundene Flächenausdehnung ( $\sim 25\%$ ). Da die fluiden Bereiche von den gelförmigen eingeschlossen sind, muss sich die fluide Domäne ausstülpfen.

### 8.1.3. Ablösung von Buds

Die Bildung einer Ausstülpung ist der erste Schritt, um ein separiertes System zu schaffen. Für eine vollständige Separation muss die Integrität der Membran unterbrochen werden. Dieser Ablösungsprozess wird als „Fission“ bezeichnet.

Gewöhnlich wird Fission und der topologisch analoge Fusions-Prozess in zweikomponentigen Membranen die Cholesterol enthalten beobachtet [125]. Die Experimente legen nahe, dass ein Zusammenspiel zwischen Krümmung und lokaler Lipidzusammensetzung den Fissionsprozess fördert. Theoretisch wurde dies ebenfalls vorgeschlagen [126].

In diesem Abschnitt werden wir zeigen, dass die flüssig-gel Phasenumwandlung in Systemen

die kein Cholesterol enthalten, zu einer Fission von Vesikeln führen kann.

In Abb.8.4 zeigt ein Vesikel nach Durchlaufen des Phasenübergangs von der gelförmigen in die fluide Phase zahlreiche schlauch-förmige und vesikuläre Strukturen an der Oberfläche. Die Strukturen sind mit dem Muttervesikel verbunden. Unter Abkühlung, beim Eintritt in die Phasenumwandlung, beginnen sich diese Strukturen zuerst in den Vesikel zu reintegrieren, lösen sich dann aber zunehmend ab. Dies ist durch die freie Diffusion der Strukturen zu erkennen. Gleichzeitig werden Domänen sichtbar, wie im Inset von Abb.8.4 verdeutlicht ist. Diese Gleichzeitigkeit legt die Phasenseparation als treibende Kraft für die Fission nahe.

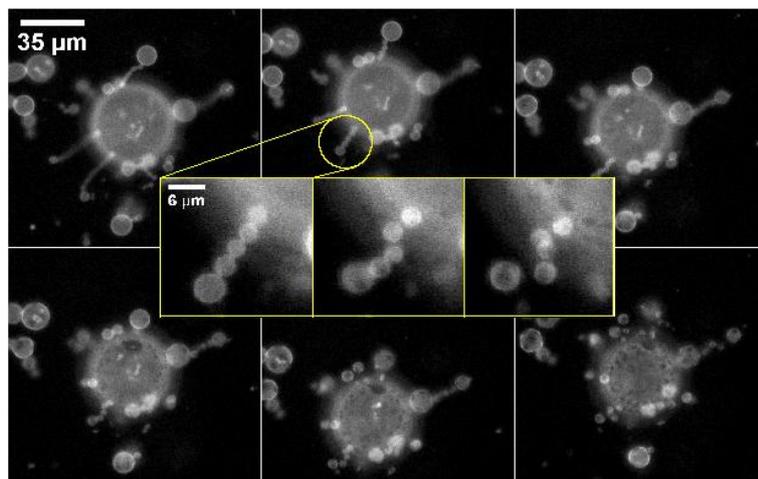


Abbildung 8.4.: *Fission beim Abkühlen durch die Phasenumwandlung eines DPPC Vesikels. Im Inset ist deutlich zu erkennen, dass sich die Vesikel vollständig voneinander lösen und frei diffundieren.*

## 8.2. Thermodynamik der Gestalt von Vesikeln

Biologische Membranen weisen eine bemerkenswerte Vielfalt verschiedener bisweilen komplexer Gestalten auf. Während beispielsweise die Form der Plasmamembran und des Zellkerns schlicht einfach gekrümmte Schalen sind, sind insbesondere Formen von Organellen, wie des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgiapparates äußerst komplex. Zusätzlich zu diesen durch intrinsische Eigenschaften der Membran bestimmten statischen Formen, treten in biologischen Systemen Gestaltumwandlungen wie bei der Zellteilung auf.

Grundlegende Aspekte dieser morphologischen Veränderungen, insbesondere auf Membranebene, lassen sich ausgezeichnet an Vesikeln als denkbar einfachstem Zellmodell untersuchen. Die Gleichgewichtsformen von Vesikeln und Übergängen zwischen diesen sind sowohl theoretisch als auch experimentell gut verstanden [127, 128, 129, 130, 131, 114].

Auch die Adhäsion von Zellen als wichtiger Schritt in zahlreichen biologischen Prozessen wie intrazellulärem Transport oder Wundheilung [132] konnte mit vergleichbaren Mitteln beschrie-

ben werden. Hier wurde ebenfalls die Bedeutung der mechanischen Eigenschaften der Membran deutlich [133, 134].

Das theoretische Verständnis der Gleichgewichtsformen von Vesikeln basiert auf der Betrachtung ihrer Biegeenergie und deren Minimierung unter der Randbedingung des Volumens und der Fläche des Vesikels. Im Wesentlichen wird, analog zur Behandlung von Landau, die Energie der Vesikel als Funktion der Krümmungen betrachtet [128].

$$E = \frac{\kappa}{2} \oint dA (c_1 + c_2 + c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2 \quad (8.1)$$

Wobei  $c_1, c_2$  die Krümmungen der Membran, entsprechend der zweiten Fundamentalform der Fläche, bezeichnen. Der zweite Term in Gleichung 8.1 ist der Beitrag der Gaußschen-Krümmung. Für Vesikel, die kein Loch enthalten, kann dieser Beitrag vernachlässigt werden. Als zusätzlicher Parameter, der eine Asymmetrie der Membran berücksichtigt, wird eine spontane Krümmung  $c_0$  eingeführt<sup>2</sup>. Damit kann der Zustand minimaler Energie als Gleichgewichtsform auch gekrümmt sein.

Die ursprüngliche Behandlung von Canham und Helfrich [127, 128] wurde im Laufe der Zeit modifiziert, um Eigenschaften der Membran selbst, bzw. ihrer Architektur als Doppellage, mit einzubeziehen [129, 130].

Im Rahmen dieser Theorien können dann Phasendiagramme, wie in Abb. 8.5 für die Gleichgewichtsgestalten, angegeben werden. Parameter sind dabei das reduzierte Volumen des Vesikels  $v$  und die reduzierte, skalierte Flächendifferenz  $\overline{\Delta a}$ . Dabei wird in  $\overline{\Delta a}$  sowohl eine spontane Krümmung als auch die Flächendifferenz, die zwischen äußerer und innerer Monolage der Membran bei einer Biegung entsteht, berücksichtigt. Der Wert von  $\overline{\Delta a}$  ist bei der Vesikelpräparation nicht einstellbar.

Der für unsere Experimente wichtige Parameter ist das reduzierte Volumen. Es vergleicht das tatsächliche Volumen des Vesikels  $V$  mit dem Volumen  $V_K = 3/4\pi R_A^3$ , das eine Kugel mit der gleichen Oberfläche  $A = 4\pi R_A$  beinhalten würde.

$$v = \frac{V}{V_K} = \frac{3V}{4\pi R_A^3} \quad (8.2)$$

Da die Kugel stets das maximale Verhältnis von Volumen zu Oberfläche besitzt, hat jede von einer sphärischen Gestalt abweichende Form ein reduziertes Volumen kleiner als 1. Somit findet man für ein reduziertes Volumen  $v < 1$  im Phasendiagramm stets eine nicht sphärische Gestalt. Das genaue Aussehen ist durch die reduzierte, skalierte Flächendifferenz bestimmt.

Analog wurde die Adhäsion von Vesikeln an einer Oberfläche beschrieben. Hier ist zusätzlich die Wechselwirkung mit der Oberfläche zu berücksichtigen [135, 136, 137, 116].

<sup>2</sup>Im Wesentlichen ist eine spontane Krümmung immer auf eine Asymmetrie zwischen den beiden den Bilayer bildenden Monolayern zurückzuführen. Besitzt z.B. ein Lipid eine stark kegelförmige Form wird dies eine spontane Krümmung der Membran bewirken. Auch chemisch unterschiedliche Bedingungen auf beiden Seiten der Membran können zu einer spontanen Krümmung führen. Ein Unterschied in der Lipidzahl des Inneren und äußeren Monolayers wird aufgrund der vorgegebenen Fläche eines einzelnen Lipides eine Flächendifferenz bewirken und damit eine spontane Krümmung. Gerade dies ist bei der Präparation von Vesikeln nicht kontrollierbar und führt zu einem breiten Spektrum an spontanen Krümmungen in einer Präparation. Wie sich später zeigen wird, beeinflusst dies die Richtung morphologischer Übergänge.

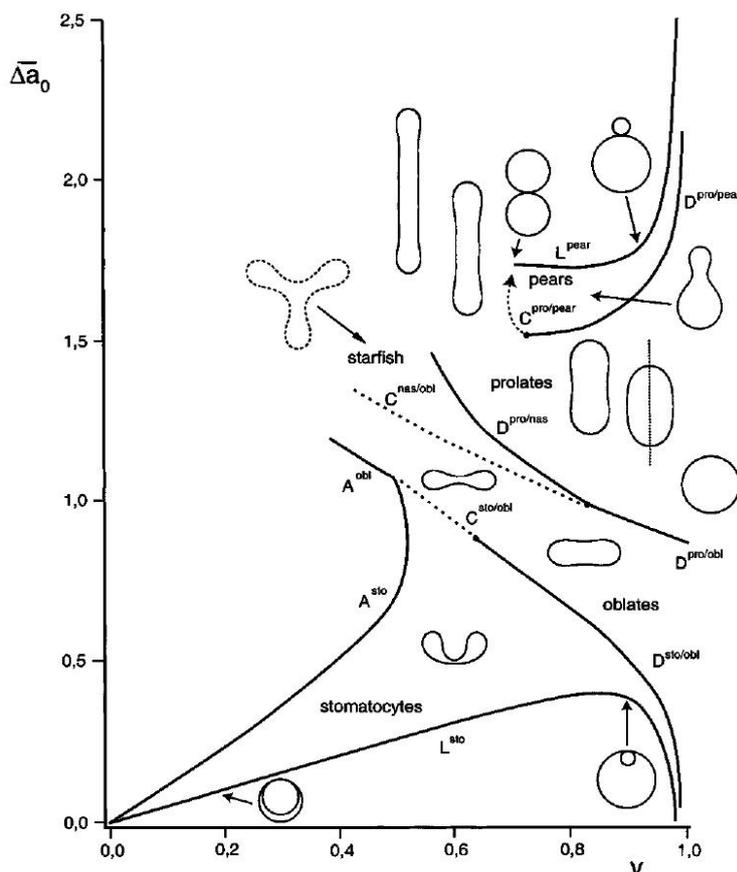


Abbildung 8.5.: Phasendiagramm der Gleichgewichtsformen von Vesikeln nach [130].

### 8.2.1. Gleichgewichtsprozesse - Am Beispiel Adhäsion

So beginnen wir diese Betrachtung mit der Adhäsion. In Abb.8.6 präsentieren wir das Adhäsionsverhalten eines DPPC Vesikel an einer unbehandelten Glaswand.

Der Vesikel wurde im gelförmigen Zustand mit Hilfe einer Mikropipette an einer senkrechten Glaswand in der Kammer, ca.  $20\mu\text{m}$  oberhalb des unteren Deckglases, platziert. Durch leichten Druck gegen die Wand war der Vesikel leicht zu immobilisieren ohne eine wesentliche Deformierung aufzuweisen. Offensichtlich ist initial eine attraktive Wechselwirkung zwischen Vesikel und Wand vorhanden. Nun wird die Temperatur von ca.  $T \sim 35^\circ\text{C}$  auf ca.  $T \sim 45^\circ\text{C}$  erhöht. Der Übergang von der fluiden in die gelförmige Phase führt zur einer Zunahme der Adhäsionsfläche. Vollständig in der fluiden Phase stellt sich eine haubenförmige Gestalt ein. Dies ist Folge der Flächenausdehnung ( $\sim 25\%$ ) beim Übergang von der gelförmigen in die fluide Phase. Da das Volumen konstant bleibt, muss der Vesikel, aufgrund der vergrößerten Fläche, keine sphärischen Gestalt mehr einnehmen. Die überschüssige Fläche erlaubt dann, aufgrund der attraktiven Wechselwirkung mit der Wand, eine Vergrößerung der Adhäsionsfläche.

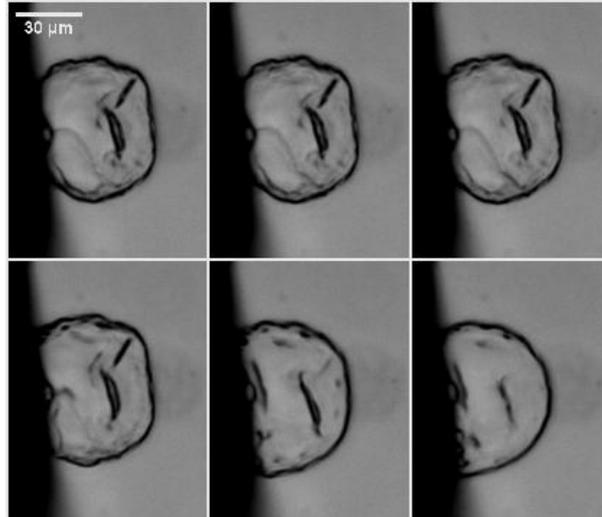


Abbildung 8.6.: *Adhäsionsprozess eines an einer senkrechten Glaswand adhärenen Vesikels beim Durchlaufen der Phasenumwandlung.*

Experimente von Gruhn et al. [138, 139] zeigen ein ähnliches Phänomen. Von den Autoren wurde das Fläche zu Volumenverhältnis der Vesikel osmotisch verändert.

Die geometrisch gut definierte Gestalt des haubenförmigen Vesikels erlaubt die Betrachtung der zeitlichen Entwicklung der Oberfläche des Vesikels. Durch die seitliche Beobachtung des Vesikels kann aber die Adhäsionsfläche schlecht angegeben werden. Daher bestimmen wir die Entwicklung der Adhäsionsfläche bei der Adhäsion auf dem unteren Deckglas der Kammer. Hier kann natürlich nicht gleichzeitig von der Seite beobachtet werden, so dass wir eine Haubenform des Vesikels nur annehmen können.

Eine große Herausforderung ist die Kontrolle und Messung der Temperatur am Vesikelort. Da das untere Deckglas direkten Luftkontakt hat und der Vesikel direkten Kontakt zu diesem Deckglas, wird hier eine zum Medium in der Kammer verschiedene Temperatur vorliegen.

Dieser Effekt kann allerdings auch genutzt werden, um eine sehr langsame Temperaturänderung zu ermöglichen. Diese ist insbesondere wichtig, da wir Vesikel eines reinen Lipides (DPPC) beobachten, das eine sich über einen sehr schmalen Temperaturbereich erstreckende Phasenumwandlung aufweist ( $\Delta T \approx 1^\circ C$ ). Durch die Beobachtung mittels eines Ölobjectivs wird dieser kühlende Effekt noch verstärkt. Durch Immersionsöl entsteht ein sehr guter thermischer Kontakt zum nicht geheizten Objektiv.

Durch diese „Gegenkühlung“ war es möglich, die Temperatur am Ort des Vesikels sehr langsam zu verändern<sup>3</sup>.

<sup>3</sup>Die Temperatur am Vesikelort und die Temperaturdifferenz über die Höhe des Vesikels muss abgeschätzt werden. Nehmen wir einen linearen Verlauf der Temperatur zwischen dem oberen Deckglas, mit dem aufgesetzten Peltierelement und dem unteren Deckglas mit Kontakt zum Objektiv an. Das untere Deckglas habe stets die unveränderliche Temperatur  $T_U$  und das obere Deckglas die veränderliche Temperatur  $T_O$ . Der Abstand der Deckgläser

Um ein Absinken der Vesikel auf das untere Deckglas zu erreichen, wurden mit Suocrose gefüllte Vesikel ( $c = 0.2 \text{ mmol/l}$ ) in Glucoselösung gleicher Molarität suspendiert. Der Dichteunterschied beider Lösungen fördert die Sedimentation der Vesikel auf das Deckglas, ist aber nicht groß genug, um den Vesikel gravitationell signifikant zu deformieren.

Nachdem die Vesikel im Medium der Kammer suspendiert wurden, sind nach ca.  $10 \text{ min}$  ausreichend viele Vesikel auf den Boden abgesunken. Bei Fokussierung auf die Oberfläche des unteren Deckglases lässt sich die Adhäsionsfläche als helle Fläche erkennen (Abb.8.7). Um den Adhäsionsflächenzuwachs detailliert bestimmen zu können, wird langsam (ca.  $0.1^\circ\text{C/s}$ ) aufgeheizt. Die Bilderserie in Abb.8.7, während der Temperaturerhöhung durch die Phasenumwandlung, zeigt die Entwicklung der Adhäsionsfläche.

Mit Hilfe des Softwarepaketes ImageJ bestimmen wir daraus den zeitlichen Verlauf der Adhäsionsfläche. Die Zunahme der Adhäsionsfläche entspricht jedoch noch nicht der gesamten Flächenzunahme des Vesikels. Um die tatsächliche Flächenentwicklung abzuschätzen, nehmen wir an, dass die Form des Vesikels stets durch eine Kugelkalotte gegeben ist. Dies ist durch die oben beschriebene unabhängige Beobachtung bei seitlicher Betrachtung des Adhäsionsprozesses Abb. 8.6) gerechtfertigt. Nach kurzer Rechnung (Anhang B.3) erhalten wir aus der geometrischen Situation und der Entwicklung der Adhäsionsfläche  $A_{adh}$  die Entwicklung der Gesamtfläche  $A_{ges}$  des Vesikels.

Die Adhäsionsfläche  $A_{adh}$  nimmt über den Schmelzprozess innerhalb von ca.  $\Delta T = 4^\circ\text{C}$  von  $A = 0.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$  auf  $A = 5.9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$  um einen Faktor 10 zu. Der Zuwachs der Gesamtfläche zeigt bei angenommen konstant zunehmender Temperatur eine sigmoidale Gestalt (Abb.8.8). Die Gesamtfläche nimmt dabei um etwa  $\Delta A = 24\%$  zu. Dies rechtfertigt nochmals die Berechnung der Gesamtfläche mit den gemachten Annahmen.

Der Verlauf der Flächenzunahme mit der Temperatur erlaubt es, die Wärmekapazität des einzelnen Vesikels abzuschätzen. Wie schon benutzt, sind Veränderungen der Fläche  $\Delta A(T)$  und der Enthalpie  $\Delta H(T)$  bei Temperaturänderung durch eine Proportionalitätskonstante  $\gamma_A =$

---

ist  $d = 2 \text{ mm}$  und die Vesikel habe eine Höhe von  $h = 50 \mu\text{m}$ . Eine Temperaturdifferenz von  $\Delta T = T_O - T_U$  führt dann zu einer Temperaturdifferenz über den Vesikel  $\Delta T_V = \Delta T \cdot h/d$ . Die mittlere Temperatur am Vesikelort ist dann  $T_V = \Delta T \cdot h/2d$ . Die Temperaturdifferenz am Vesikelort wird sicher zu Fehlern führen, die aber, wie sich zeigen wird, die prinzipielle Aussage des Experiments wohl nicht stark beeinflussen. Mit dieser Abschätzung können wir die Temperaturveränderung am Vesikelort bestimmen. Die Adhäsionsfläche begann bei etwa  $T_u = 45^\circ\text{C}$  zuzunehmen. Ab etwa  $T_o = 74^\circ\text{C}$  war keine weitere Zunahme der Fläche zu erkennen. Mit der linearen Interpretation von oben entspricht dies etwa einer Temperaturveränderung von  $\Delta T_V \approx 1^\circ\text{C}$  am Ort des Vesikels. Dies ist eine sehr optimistische Abschätzung.

In dieser Annahme verändert sich die Temperatur des Deckglases und damit der Adhäsionsfläche nicht. Damit würde der untere Teil nie über die Temperatur des Deckglases geheizt werden können, was es unmöglich macht bei einer höheren Phasenumwandlungstemperatur diese zu durchlaufen. Dies entspricht aber nicht der tatsächlichen experimentellen Situation. Die Temperatur wird sich von Objektiv über das Immersionsöl und das untere Deckglas angleichen. Damit kann die Temperatur am Vesikelort sehr wohl wesentlich höher sein als die des Objektivs. Gleichzeitig bleibt aber der Charakter dieser differentiellen Temperaturregelung erhalten, so dass eine sehr langsame Temperaturänderung am Vesikelort möglich ist.

Da sich deswegen die Temperatur wohl doch etwas stärker ändern wird, ist  $\Delta T_V \approx 4^\circ\text{C}$  eine faire Abschätzung, insbesondere, da für unserer Aussage nur der prinzipielle Verlauf wichtig ist. Weiterhin nehmen wir bei konstant zunehmender Temperatur  $T_O$  auch einen linearen Verlauf der Temperatur am Vesikelort an.

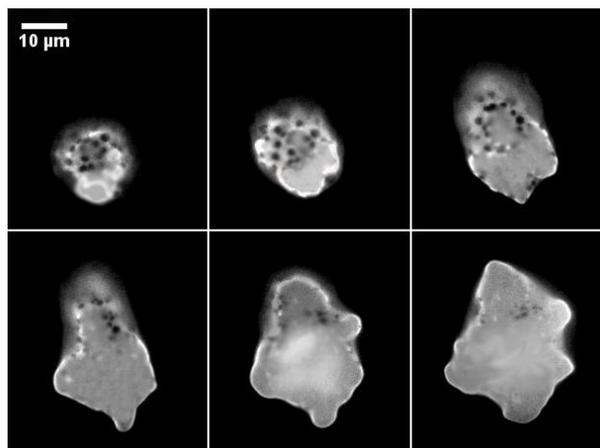


Abbildung 8.7.: Bilderserie von Fluoreszenz-Aufnahmen eines auf dem Deckglas adhären- den DPPC Vesikels. Die sechs Aufnahmen zeigen die Entwicklung der Adhäsionsfläche (hell leuchtende Fläche) bei Temperaturerhöhung. Die Fläche nimmt stark zu.

$0.89m^2/N$  verbunden [29]

$$\Delta A(T) = \gamma_A \Delta H(T) \quad (8.3)$$

Damit lässt sich aus der bestimmten Flächenänderung die Überschuss-Wärmekapazität  $c_p$  des Systems bestimmen

$$c_p = \left( \frac{dH}{dT} \right)_p = \frac{1}{\gamma_A} \left( \frac{dA}{dT} \right)_p \quad (8.4)$$

Wenden wir dies auf die beobachtete Flächenveränderung an, können wir nach Gl.8.4 die Überschusswärmekapazität  $c_p$  berechnen (rote Kreise), die wir in Abb.8.8 mit der kalorimetrisch erhaltenen (grüne Quadrate) vergleichen und finden, dass sie qualitativ dem Verlauf der kalorimetrisch bestimmten folgt<sup>4</sup>. Abweichungen ergeben sich sicher aus den oben beschriebenen Schwierigkeiten der Kontrolle und Messung der Temperatur. Jedoch ist hier der Verlauf entscheidend. Da wir einen linearer Verlauf der Temperatur am Vesikelort anzunehmen, ändert sich die Gestalt der Wärmekapazität nicht.

Eine Größe, die unabhängig von der Temperatur nur aus dem absoluten Flächenzuwachs zu bestimmen ist, ist die Schmelzenthalpie des Systems. Die Proportionalität von Flächenänderung und Enthalpieänderung (Gl. 8.4) ergibt direkt die Schmelzenthalpie der Vesikel. Mit der Abschätzung der Teilchenzahl über die Gesamtfläche und die Fläche eines fluiden Lipides von  $a_f = 0.65nm^2$  erhalten wir für die molare Schmelzenthalpie  $\Delta H = 36,6 \pm 4kJ/mol$ . Dies stimmt außerordentlich gut mit dem Literaturwert von  $36.4kJ/mol$  überein. Im Umkehrschluss

<sup>4</sup>Die Position des Maximums der aus der Flächenänderung extrahierten Wärmekapazität wurde, da die absolute Temperatur am Vesikelort, aus oben genannten Gründen nicht messbar ist, auf die des kalorimetrischen Maximums verschoben. Die Ableitung wurde aus dem geglätteten Flächenverlauf bestimmt.

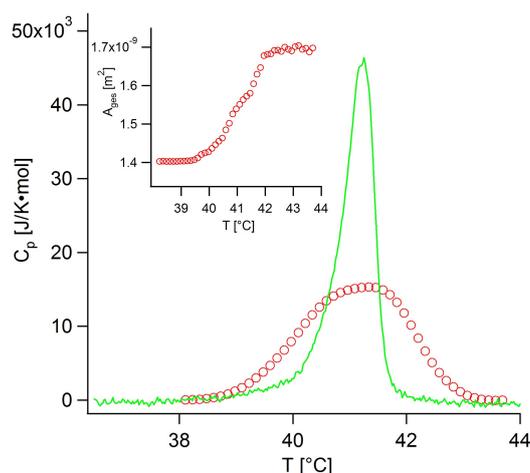


Abbildung 8.8.: Vergleich zwischen kalorimetrisch bestimmter (grüne Linie) und aus der Flächenänderung berechneten Wärmekapazität (rote Kreise).

mit bekannter Schmelzenthalpie ist so die Bestimmung des phänomenologischen Koeffizienten zu  $\gamma = 0.88 \text{ J}/\text{m}^2$  möglich.

Den Adhäsionsprozess auf dem unteren Deckglas konnten wir nur zweimal wiederholen. Schwierig war, dass viele der Vesikel zwar adhärten, dann aber platzten. Zahlreiche andere Vesikel zeigten keine Adhäsion. War allerdings eine Adhäsion zu beobachten, verlief sie durchaus ähnlich.

## 8.2.2. Nichtgleichgewichtsprozesse - Am Beispiel Expulsion

Wir wollen jetzt die Reaktion eines geschlossenen fluiden Vesikels auf ein schnelles Durchlaufen der Phasenumwandlung und damit die Einstellung des Gleichgewichtszustandes nach einem Temperatursprung untersuchen. Wir wählen diese Richtung der Phasenumwandlung, da dann die Fläche abnehmen wird. Der Vesikel besitzt dann ein zu großes Volumen, er wird also stets gespannt sein und damit eine sphärische Gestalt aufweisen. Dies macht eine zuverlässige Bestimmung der Oberfläche möglich. Der Temperatursprung erfolgt von einer Temperatur oberhalb der Phasenumwandlung ( $T \sim 45^\circ\text{C}$ ) durch die Phasenumwandlung auf eine Temperatur unterhalb der Umwandlung ( $T \sim 36^\circ\text{C}$ ). Wir kühlen mit einer Kühlrate von etwa  $10^\circ\text{C}/\text{s}$ <sup>5</sup>. Das

<sup>5</sup>Temperatursprünge zur Erzeugung von Nichtgleichgewichtssituationen führen wir in einer Reihe von Experimenten durch. Eine exakte Bestimmung der „Zieltemperatur“ am Vesikelort gestaltet sich hier aufgrund der hohen Heizrate und zu beachtender Equilibrierung der Temperatur schwierig. Für eine Bestimmung der Heizrate muss die Temperatur des Peltierelementes als Referenz genommen werden. Jedoch, nach unserer Beobachtung, entscheidend für die hier vorgestellten Aussagen ist, dass die Temperatur hinreichend schnell durch die Phasenumwandlung auf eine (beliebige) Temperatur mit nicht zu großem Abstand unterhalb bzw. oberhalb der Umwandlung geändert wird. Veränderungen am Vesikel innerhalb einer Phase mit der Temperatur werden wohl vorhanden sein, sollten aber bei weitem durch die wesentlich größeren Effekte beim Übergang der Phasen übertroffen werden.

untersuchte Systeme DPPC besitzt eine Phasenumwandlung bei  $T = 41^\circ\text{C}$  mit einer Breite von  $\Delta T \sim 1^\circ\text{C}$ . Nach Erreichen der oberen Grenze der Phasenumwandlung wird diese dann theoretisch in etwa  $100\text{ms}$  durchlaufen.

Vor Beginn des Temperatursprungs ist die Membran spannungsfrei, da deutlich Fluktuationen auf der Vesikeloberfläche zu erkennen sind. Der Eintritt in die Phasenumwandlung ist durch das Verschwinden der Fluktuationen der Membranoberfläche zu erkennen. Innerhalb von etwa  $t = 160\text{ms}$  nach dem Verschwinden der Fluktuationen öffnet sich eine Pore, was in Abb. 8.9(a) dargestellt ist. Es ist daher anzunehmen, dass das Öffnen der Pore zu Beginn der Phasenumwandlung stattfindet. Der Öffnungsprozess selbst liegt unterhalb der zeitlichen Auflösung der Kamera ( $81\text{ms}$ ).

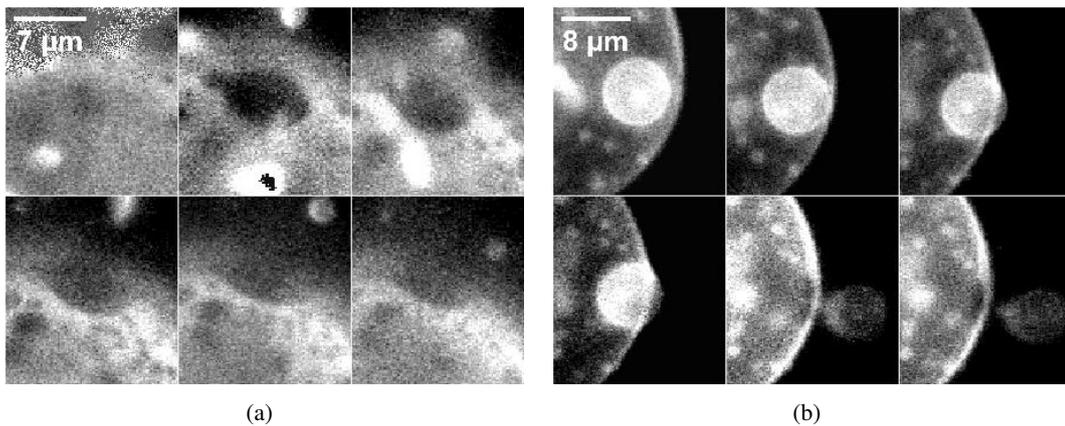


Abbildung 8.9.: a) Öffnen einer großen Pore nach dem Temperatursprung von der fluiden in die gelförmige Phase. b) Expulsion eines großen Vesikels durch eine entstandene Pore, die nach der vollständigen Expulsion sichtbar bleibt.

Durch diese Pore strömt in der Folge Volumen aus. Der Ausstrom von Volumen kann auch größere inkorporierte Strukturen mitreißen. Dies ist in Abb. 8.9(b) an dem Expulsionszenario eines großen Vesikels zu erkennen. Nach dem Temperatursprung wird der innere Vesikel durch die entstandene Pore nach außen gedrückt. Die Pore ist hier nach dem Prozess deutlich sichtbar. Auch nach der abgeschlossenen Expulsion besteht die Pore meist fort, da hier die Membran bereits vollständig in der gelförmigen Phase ist. Bemerkenswert ist, dass die Pore zwischenzeitlich vollständig durch die herausgedrückte Struktur verschlossen wird.

Über ähnliche Prozesse wurden als Folge osmotischer Veränderungen [140, 141, 142, 143], elektrischer Felder [144] oder durch „optische Pinzetten“ [145] berichtet. Insbesondere die Autoren in [142, 143] untersuchen die Dynamik der Pore und des Ausstroms. Wir berichten hier über dieses Phänomen als Folge der Phasenumwandlung. Dabei fokussieren wir uns weniger auf den Prozess an sich, als auf die Möglichkeit, die Relaxation der Fläche nach dem Temperatursprung zu bestimmen, die sich aus der wohl definierten Geometrie des stets sphärischen Vesikels bei diesem Prozess ergibt. Die Dynamik der Pore werden wir im Folgenden nicht explizit betrachten, da wir einen nahezu konstanten Porenradius über den gesamten Prozess beobachten. Eine theo-

retische Arbeit beschäftigt sich mit einem ganz ähnlichen Thema im Hinblick auf das Einfrieren von Zellen [146].

**Relaxation** Der gesamte Prozess vom Zeitpunkt der Porenbildung bis zur vollständigen Expulsion dauert etwa 20s. Allerdings ist nach Erreichen der Temperatur der Umwandlung das System bereits nach äußerst kurzer Zeit auf eine Temperatur unterhalb der Phasenumwandlung abgekühlt. Der thermodynamisch stabile Zustand ist dann die gelförmige Phase. Offensichtlich beobachten wir hier eine Relaxationsprozess aus einem stark gestörtem Zustand - der fluiden Phase - in den thermodynamisch stabilen Zustand - die gelförmige Phase.

Gekennzeichnet ist diese Relaxation durch die Abnahme der Fläche. Wir erwarten eine Flächenabnahme von ca. 25% bei der Umwandlung von der fluiden Phase in die gelförmige Phase. Auf der Zeitskala des Prozesses ( $t \sim 20s$ ) kann die Membran als impermeabel für Wasser betrachtet werden. Zusammen mit der Inkompressibilität des Wassers leuchtet sofort die Ursache der Porenbildung ein: Da der Vesikel zu Beginn des Prozesses eine sphärische Gestalt und damit ein reduziertes Volumen von  $v = 1$  aufweist, kann keine Anpassung durch Übergang in eine neue Gestalt erfolgen. Die Abnahme der Fläche aufgrund der Phasenumwandlung führt also konsequent zum Reißen der Membran und zur Bildung einer Pore.

In der Folge nimmt die Membranfläche weiter ab. Damit muss aber auch das Volumen weiter abnehmen, was den Ausstrom von Volumen bedingt.

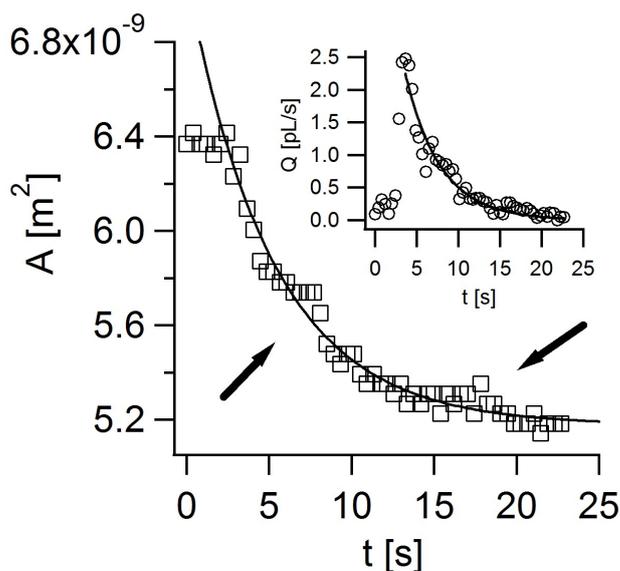


Abbildung 8.10.: Verlauf der aus dem Vesikelradius bestimmten Fläche  $A$  der Vesikel während des Expulsionsprozesses. Deutlich zu erkennen sind stufenförmige Strukturen im Verlauf (Pfeile), die dem Verschließen der Pore durch eine große vesikuläre Struktur und dem Ausstoss dieser Struktur entsprechen.

Eine quantitative Analyse des Prozesses lässt sich durch Betrachtung der Entwicklung der Fläche

der Vesikel erhalten. Unter Annahme eines stets sphärischen Vesikels und der Vernachlässigung der Porenfläche<sup>6</sup> können wir den Verlauf der Fläche nach dem Temperatursprung in Abb. 8.10 darstellen.

Nach Öffnen der Pore nimmt das Volumen zuerst stark, dann zunehmend langsamer ab. Dies wird ebenfalls im Volumenausstrom  $-Q = \frac{dV}{dt}$  deutlich (Inset Abb. 8.10). Einige kleine Stufen im Verlauf der Fläche (indiziert durch Pfeile) kennzeichnen den Verschluss der Pore durch vesikuläre Strukturen. Global ist eine exponentielle Abnahme der Fläche zu beobachten.

**Porenbildung** Die Porenbildung und der folgende Ausstrom von Volumen sind eine Folge der Flächenabnahme der Membran während der Phasenumwandlung. Die resultierende Spannung führt zum Reißen der Membran, da zunächst das Volumen konstant bleibt. Dies führt dann zum Reißen der Membran und zur Bildung einer Pore. Die Porengrößen liegen stets bei etwa 1 – 2% der Vesikelfläche  $A_g$ .

Wir schätzen nun ab, bei welcher Dehnung der Membranfläche  $\Delta A$  die Pore aufreißt. Die kritische Flächendehnung  $\Delta A_{krit}$  lässt sich angeben durch den Vergleich der freien Energie der Membran ohne Pore

$$F_o = \frac{1}{2} \kappa_A^T \frac{(\Delta A)^2}{A_g} \quad (8.5)$$

und der Membran mit Pore [147]

$$F_{MP} = \frac{1}{2} \kappa_A^T A \left( \frac{\Delta A}{A} - \frac{\pi r^2}{A} \right)^2 + 2\pi r \gamma \quad (8.6)$$

dabei ist  $\gamma$  die Linienspannung der Pore,  $\kappa_A^T$  das Dehnungsmodul der Membran,  $\Delta A$  die Flächendifferenz, also die gedehnte Membranfläche,  $A$  die Gesamtfläche der Vesikel und  $r$  der Radius der Pore. Auflösen führt zu einer kritischen Flächendehnung (ähnlich [146]) von

$$\Delta A_{krit} = 4A^{\frac{2}{3}} \pi^{\frac{2}{3}} \left( \frac{\gamma}{\kappa_A^T} \right) \quad (8.7)$$

Für typische Werte [33] der isothermen lateralen Kompressibilität  $\kappa \approx 10^{-1} N/m$  der Linienspannung der Pore  $\gamma \approx 10^{-12} N$  finden wir eine kritischen Flächendehnung von  $\Delta A_{krit} \approx 0.01 A_g$ . Da die Dehnung der Membran beim Öffnen der Poren nahezu vollständig nachlässt, kann die kritische Flächendehnung mit dem Porenradius verglichen werden. Dabei finden wir in beiden Fällen etwa 1% der Gesamtfläche des Vesikels.

**Flächenrelaxation und Volumenausstrom** Nach dem Öffnen der Pore nimmt die Membranfläche weiter ab und es resultiert der beschriebene Volumenausstrom. Offensichtlich geht die Membran nach dem Temperatursprung nicht sofort in die gelförmige Phase als Gleichgewichtszustand über, sondern relaxiert über etwa  $t = 20s$ , wie Abb. 8.10 zeigt. Wir wollen diese Abnahme der Fläche mit einer thermodynamischen Relaxation in den Gleichgewichtszustand in Verbindung zu bringen.

<sup>6</sup>Der Fehler ist klein, da die Pore ca. 1% der Gesamtfläche beträgt.

Die Flächenabnahme folgt nach Abb. 8.10 einem einfachen exponentiellen Abfall (Linie: Gl. 8.10). Die exponentielle Form der Flächenabnahme kann durch Betrachtung der Fläche als thermodynamische Variable verstanden werden. Benutzen wir, analog zu Grabitz et al. ([148]), den Ausdruck für die Relaxation der Enthalpie  $H$  nach einer Störung des Gleichgewichtszustandes. Der gestörte Zustand zu Beginn habe die Enthalpie  $H_{in}$  und der Gleichgewichtszustand die Enthalpie  $H_{gl}$ . Die Relaxation ist dann gegeben durch

$$(H - H_{gl})(t) = (H_{in} - H_{gl})(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (8.8)$$

mit einer typischen Relaxationszeit  $\tau$ <sup>7</sup>. Mit der Proportionalität von Enthalpieänderung  $\Delta H(t)$  und Flächenänderung  $\Delta A(t)$  ([29])

$$\Delta A(t) = \gamma_A \Delta H(t) \quad (8.9)$$

finden wir mit  $\gamma = 0.89 \text{ m}^2/\text{J}$  ein analoges Verhalten der Relaxation der Flächendifferenz  $\Delta A(t)$  aus der initialen Flächendifferenz  $\Delta A_{in}$  in die Gleichgewichtsfläche  $\Delta A_{gl}$

$$\Delta A(t) = \Delta A_{in} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (8.10)$$

Wobei  $\Delta A_{in} = A_a - A_{gl}$  die Flächendifferenz zwischen dem anfänglichen Zustand  $A_a$  und dem thermodynamischen Gleichgewichtszustand der Membran ist. In unserem Fall ist der aktuelle Zustand der komplett fluide Vesikel mit Fläche  $A_f$ . Nach dem Temperatursprung ist der thermodynamisch geforderte Zustand, der gelförmige Vesikel, mit Fläche  $A_g$ . Also ist  $\Delta A_{in} = A_f - A_g$ . Damit ergibt sich für die gesamte Fläche des Vesikels während des Relaxationsvorgangs

$$A(t) = A_g + \Delta A_{in} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (8.11)$$

Dies beschreibt hervorragend den zeitlichen Verlauf der Vesikelfläche wie der Fit in Abb. 8.10 zeigt<sup>8</sup>.

<sup>7</sup>Die initial vollständig fluide Fläche sofort nach dem Temperatursprung, der die gelförmige Phase als thermodynamisch stabil fordert, kann durchaus als große Störung dieses thermodynamisch stabilen Zustandes betrachtet werden.

<sup>8</sup>Der Volumenausstrom kann ebenfalls einfach aus der Entwicklung der Fläche angegeben werden und ergibt sich aus der zeitlichen Entwicklung des Volumens

$$-Q = \frac{dV}{dt} \quad (8.12)$$

Unter Verwendung des Volumens der Vesikel  $V(t) = 1/6\sqrt{\pi}A(t)^{3/2}$  mit der ursächlichen, veränderlichen Fläche während der Phasenumwandlung mit Gl. 8.11 und der 25% größeren Fläche der fluiden Phase gegenüber der gelförmigen  $A_f = \frac{5}{4}A_g$  ergibt sich

$$Q = -\frac{1}{16} \frac{1}{\sqrt{\pi}} \frac{1}{\tau} A_g^{(3/2)} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left[1 + \frac{1}{4} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right]^{\frac{1}{2}} \quad (8.13)$$

Dieser Ausdruck beschreibt den beobachteten Volumenausstrom, wie der Inset in Abb.8.10 zeigt.

Eine Mittelung über mehrere solcher Vorgänge ergibt eine typische Relaxationszeit von

$$\tau = 4.6 \pm 0.8s \quad (8.14)$$

Bei analoger Prozessführung ist diese Relaxation auch bei einer Ausstülpung nach außen festzustellen<sup>9</sup> (Anhang A.4). Die so erhaltene Relaxationszeit fügt sich hier nahtlos ein. Dies impliziert einen grundlegenden Mechanismus.

### 8.3. Gestaltänderungen: Gleichgewicht und Nichtgleichgewicht

In diesem Abschnitt untersuchen wir, wie das Zusammenspiel von Mikrodomänenstruktur und Nichtgleichgewichtssituationen zu einer neuen topologischen Strukturgebung führen kann.

#### 8.3.1. Gestaltänderungen - Gleichgewicht

Wir beginnen mit einer quasi Gleichgewichtssituation. Es wird zunächst ein Vesikel bestehend aus der Lipidmischung DMPC-DPPC (1-1) betrachtet. In diesem System ist ein Phasenübergang bei  $T_c = 35^\circ C$  mit einer Breite von ca.  $\Delta T_c = 5^\circ C$  festzustellen. Eine langsame Heizrate und die Breite des Phasenübergangs erlauben ein langsames Durchlaufen der Phasenumwandlung. In Abb. 8.11 ist die zeitliche Entwicklung (Bildabstand ca. 1.8s) der Gestalt eines freischwim-

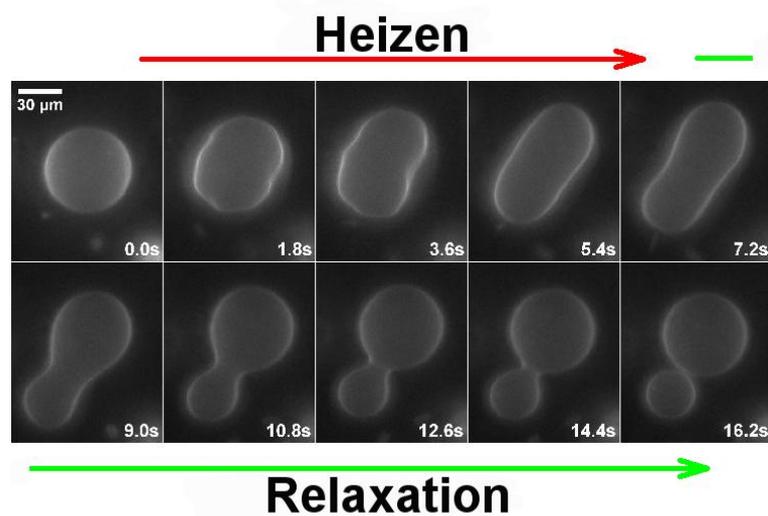


Abbildung 8.11.: *Budding und Abschnürung eines großen DMPC-DPPC (1-1) Vesikels beim Durchlaufen der Phasenumwandlung.*

<sup>9</sup>Wenn keine Ablösung stattfindet, wie in Kapitel III 8.1.3 beschrieben.

menden Vesikels während des Durchlaufens der Phasenumwandlung dargestellt. Zu Beginn ist der Zustand des Vesikels  $T \sim 28^\circ\text{C}$  vollständig gelförmig. Die Temperatur wird dann mit einer Heizrate von ca.  $1^\circ\text{C}/\text{s}$  erhöht. Der Phasenübergang wird so in etwa  $5\text{s}$  durchlaufen. Es resultiert ein morphologischer Übergang des Vesikels, der sich in zwei Abschnitte untergliedert. Im ersten Abschnitt ( $t = 0 \dots 7.2\text{s}$ ) wird die Phasenumwandlung komplett durchlaufen. Die Membran geht von der gelförmigen in die fluide Phase über. Dabei entsteht kontinuierlich Überschuss-Fläche. Aus dem anfänglich sphärischen Vesikel entwickelt sich eine elongierte Form. Der vollständige Flächenzuwachs ( $\sim 22\%$ ) ist nach  $dt = 7.2\text{s}$  erreicht. Es schließt sich eine Relaxation ( $t = 7.2 \dots 12.2\text{s}$ ) der Gestalt aus der elongierten Form in zwei abgeschnürte Vesikel an. Das Volumen bleibt über den gesamten Prozess konserviert, als Folge der Impermeabilität der Membran gegenüber Wasser auf diesen Zeitskalen.

Unter den selben experimentellen Bedingungen ist ein analoger Prozess ins Innere des Vesikels zu beobachten, wobei der Verlauf des Prozesses vergleichbar mit dem zuvor beschriebenen ist (s. Anhang A.3). Die intermediären und finalen Formen beider Prozesse lassen sich im Phasendiagramm nach Miao et al. [130] für Gleichgewichtsgestalten von Vesikeln finden (Abb.8.5). Eine detailliertere Darstellung dieses Prozesses ist in der Arbeit von B. Wunderlich vorgestellt [51].

### 8.3.2. Gestaltänderungen - Nichtgleichgewicht

Um eine Nichtgleichgewichtssituation zu ermöglichen, wählen wir mit DPPC ein einkomponentiges System, das eine äußerst schmale Phasenumwandlung aufweist (ca.  $\Delta T = 1^\circ\text{C}$ ). Die Temperatur wird mit einer hohen Heizrate von etwa  $10^\circ\text{C}/\text{s}$  erhöht<sup>10</sup>. In Abb. 8.12 ist ein frei-

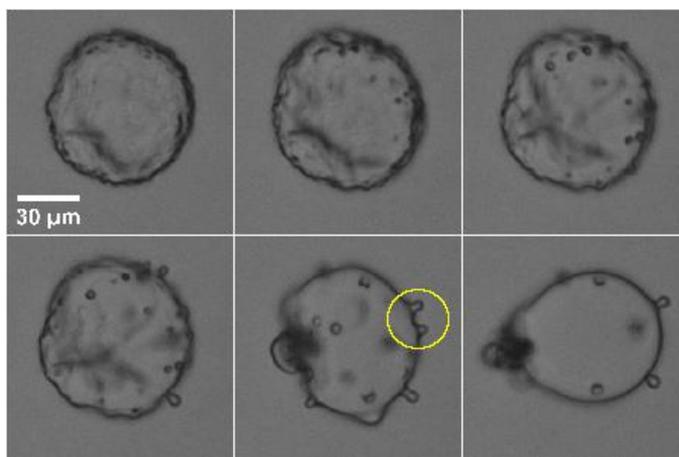


Abbildung 8.12.: Ein DPPC Vesikel zeigt bei schneller Temperaturänderung von der gel in die fluide Phase zahlreiche kleine Ausstülpungen die mit der Zeit in den Muttervesikel reintegrieren (gelber Kreis).

<sup>10</sup>Sicherlich wird eine langsame Anpassung an den Gleichgewichtszustand erfolgen, wie wir im vorherigen Abschnitt III 8.2.2 gezeigt haben. Jedoch verhalten sich die Vesikel verschieden im Vergleich zu einer langsamen Prozessführung.

schwimmender Vesikel (DPPC) in der gelförmigen Phase dargestellt. Die Temperatur wird dann wie beschrieben über die Phasenumwandlung  $T = 41^\circ\text{C}$  erhöht, und es resultiert der abgebildete Prozess. Bei Eintritt in die Phasenumwandlung nukleieren zahlreiche kleine Ausstülpungen. Diese entwickeln sich innerhalb von ca.  $0.3\text{s}$  in kleine, separierte Vesikel mit nahezu monodispersen Durchmesser von ca.  $d = 3\mu\text{m}$ . Dabei bleiben sie stets durch einen Hals mit dem Muttervesikel verbunden. Zunächst zeigen sich die Buds lokalisiert, diffundieren dann aber frei auf der Vesikeloberfläche. Dies zeigt die komplette Fluidität der Membran an. Mit zunehmender Zeit reintegrieren dann die Buds wieder in den Muttervesikel, was auf einen metastabilen Zustand hinweist.

**Metastabilität des mehrfach vesikulierten Zustandes** Erinnern wir uns hier an das Phasendiagramm der Gleichgewichtsgestalten von Vesikeln (Abb. 8.5). Es waren keine mehrfach ausgestülpten Vesikel zu beobachten. Bei dem hier vorgestellten Nichtgleichgewichtsprozess dagegen geht die gesamte während der Phasenumwandlung erzeugte Überschussfläche in die entstehenden kleinen Buds über, und es ist keine globale Gestaltumwandlung des Vesikels zu beobachten. Folgt man der vorherigen Behandlung der Gestalt von Vesikeln als Minimierung ihrer Biegeenergie, stellen zahlreiche kleine Buds einen energetisch eher ungünstigen Zustand dar. Es wäre also zu erwarten, dass mit zunehmender Reintegration der Buds gerade diese globale Umwandlung stattfindet.

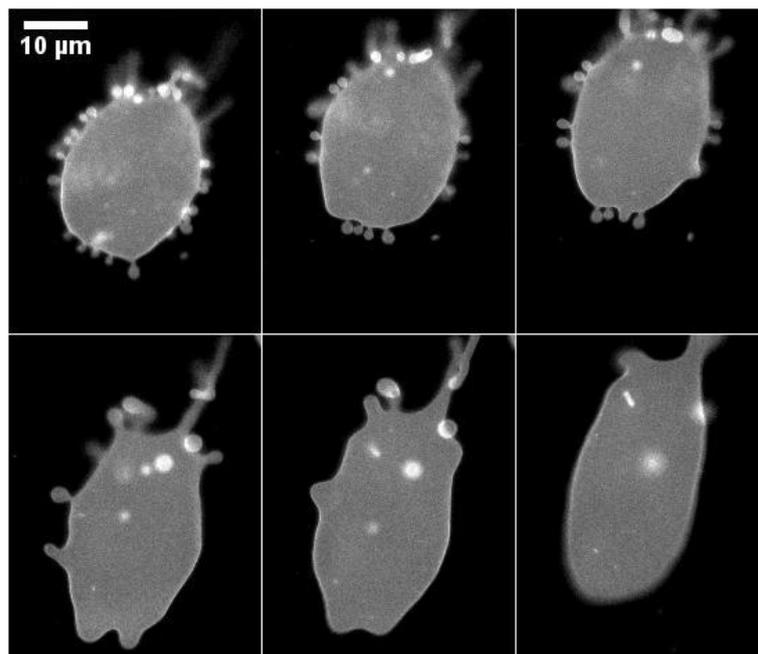


Abbildung 8.13.: *Relaxation aus einem mehrfach vesikulierten Zustand, nach schneller Umwandlung von der gelförmigen in die fluide Phase ( $\sim 10^\circ\text{C}/\text{s}$ ), in eine global elongierte Gestalt.*

In Abb. 8.13 weist ein Vesikel nach schnellem Durchlaufen der Phasenumwandlung zahlreiche Buds auf. Die Temperatur ist stabil bei ca.  $T = 45^\circ\text{C}$ , etwas oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur  $T_c = 41^\circ\text{C}$ . In der Folge reintegrieren die Buds über einen Zeitraum von ca. 35s vollständig in den Muttervesikel. Dieser geht dabei mit zunehmender Reintegration in eine global relaxierte, elongierte Gestalt über. Die elongierte Form zeigt sich stabil und kann als Gleichgewichtsgestalt mit dem Phasendiagramm (Abb. 8.5) verglichen werden. Die beobachtete Reintegration zeigt eindrücklich den Nichtgleichgewichtscharakter der Entstehung kleiner Buds.

**Kopplung von Dynamik und Struktur** In unseren Experimenten wurde deutlich, dass die Bildung vieler kleiner Buds oft von der Geschichte des Vesikels abhängt. Dies offenbart sich bei mehrmaligem schnellem Heizen ein und der selben Vesikel durch die Phasenumwandlung: Bilden sich beim ersten Heizvorgang noch zahlreiche kleine Buds, nimmt deren Anzahl bei wiederholter Prozessführung zunehmend ab, und es bilden sich unter Umständen nur noch wenige unvollständige Buds.

Beispielhaft stellen wir eine derartige Ausprägung des Prozesses in Abb. 8.14 dar. Es entstehen zu Beginn einige Wellen oder unvollständige Buds, die kurzzeitig in zwei vollständige Buds übergehen.

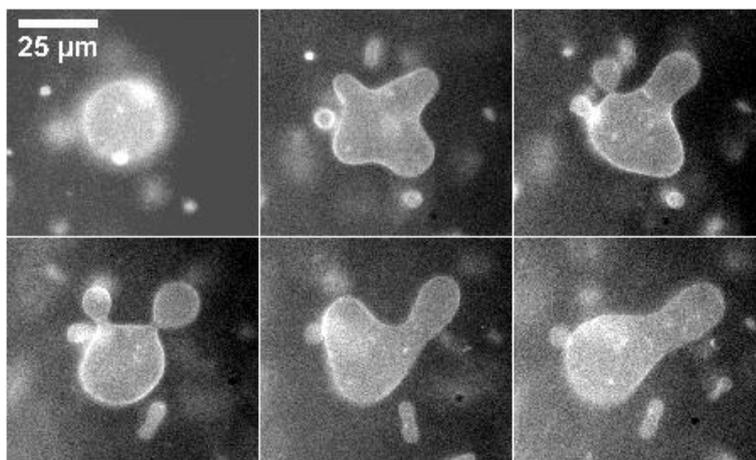


Abbildung 8.14.: *Gestaltveränderung eines DPPC Vesikels der bereits mehrmals durch die Phasenumwandlung geheizt wurde.*

Diese relaxieren dann schnell in eine elongierte Gleichgewichtsgestalt. Bei vielen Prozessen ist selbst dieser Übergang in wenige vollständige Buds nicht zu beobachten. Generell scheint aber eine Tendenz zu mehreren, oft unvollständigen Buds, bei schneller Prozessführung zu existieren.

**Abhängigkeit von der Mediumviskosität** Wir wollen abschließend den Einfluss des Mediums auf den Buddingprozess untersuchen. Den tatsächlichen Einfluss der Viskosität des Mediums isolieren wir, indem wir mit der Lipidmischung DMPC-DPPC ein System mit breiter Phasenumwandlung (ca.  $\Delta T = 5^\circ\text{C}$ ) wählen. Zudem wird die Phasenumwandlung mit

$10^\circ\text{C}/\text{min}$  sehr langsam durchlaufen. Die Viskosität des Mediums wird durch die Verwendung von Glucoselösung ( $c = 10\text{mol}/\text{kg}$ ) auf  $\eta = 0.046\text{Ns}/\text{m}^2$  erhöht. Dies entspricht etwa dem 46-fachen der Viskosität von Wasser bei  $T = 20^\circ\text{C}$ . Wir verwenden hier „Oberflächen adhärierte“ Vesikel.

Wieder beginnen wir mit dem Vesikel in der gelförmigen Phase. Die Temperatur wird dann mit einer Heizrate von ca.  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  erhöht. In Abb. 8.15 ist das Verhalten des Vesikels dargestellt.

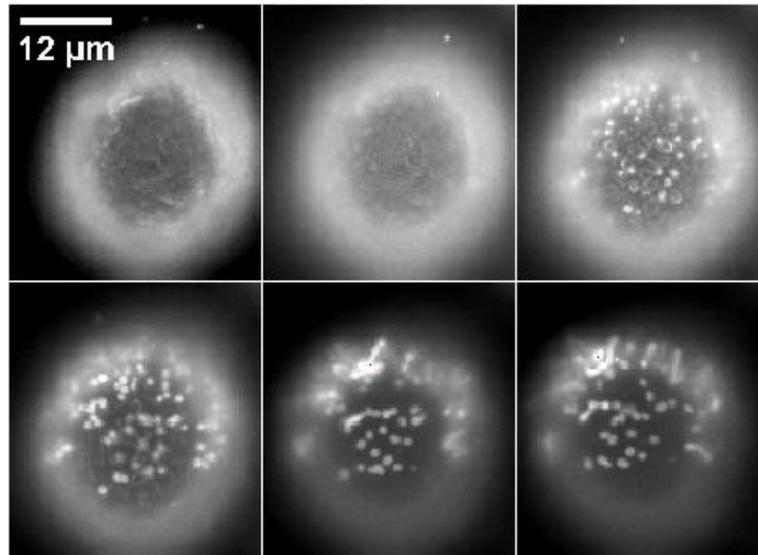


Abbildung 8.15.: *Budbildung in einem DMPC-DPPC (1-1) Vesikel bei hoher Mediumviskosität von  $\eta = 0.046\text{Ns}/\text{m}^2$  und langsamer Prozessgeschwindigkeit. Zahlreiche kleine Buds entstehen gleichzeitig mit dem Auftreten der Phasenseparation.*

Der Eintritt der Phasenumwandlung ist durch das Auftreten von Phasenseparation zu erkennen. Gleichzeitig beginnt sich die Membran zu wellen. Die Strukturgröße der Wellung entspricht in etwa der Strukturgröße der Domänen. Diese Wellen entwickeln sich dann zunehmend in zahlreiche vollständig ausgeprägt Buds (helle Punkte)<sup>11</sup>.

Im Hinblick auf die dynamische Budbildung im Nichtgleichgewicht impliziert dies, dass eine Strukturierung der Membran in der Nukleations- und Wachstumsphase als Precursor für die Budbildung wirken kann. Insbesondere komplettiert sich das Bild, wenn man die Abhängigkeit der Zahl kritischer Keime von der Geschwindigkeit der Temperaturänderung bedenkt. Für ein schnelles Durchlaufen des Phasenübergangs wird eine große Zahl von Keimen erwartet, und damit eine große Anzahl von Precursoren für die Bud-Bildung. Dies ist definitiv auch ein Faktor, der eine große Anzahl von Buds bei schnellen Prozessgeschwindigkeiten verursachen kann.

Dennoch haben wir hier bei langsamer Prozessführung viele kleine Bud erhalten, was im selben System bei einer geringen Viskosität des Mediums nicht der Fall war (Abb. 8.11). Nun muss bei

<sup>11</sup>Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die Glucoselösung hier einen Einfluss auf die Budbildung hat.

der Budentstehung Volumen in den Bud fließen, was einer Dissipation aufgrund der Scherviskosität des Mediums unterworfen ist.

Daher werden wir im Folgenden in einem einfachen Modell den Einfluss der Dissipation auf einen idealisierten Buddingprozess abschätzen.

**Das Dissipations Budding Modell (DB-Modell)** Das in den Bud einströmende Volumen ist wohl die Hauptquelle der Dissipation. Bei gleichbleibendem Gesamt-Flächenzuwachs ist das Gesamt-Volumen von  $n$ -Buds kleiner als das von  $n - 1$ -Buds. Damit nimmt auch die Dissipation aufgrund des Volumenflusses mit zunehmender Anzahl von Buds ab. Allerdings erfordert die Aufteilung der Gesamtfläche  $S_{ges}$  auf  $n$ -Buds eine höhere Krümmung der Membran als bei der Aufteilung auf  $n - 1$  Buds und damit eine höhere Biegeenergie.

Wir betrachten also eine Membran, die aufgrund der Phasenumwandlung von der gelförmigen Phase mit Fläche  $S_{gel}$  in die fluide Phase einen Gesamt-Flächenzuwachs von  $\Delta S_{ges} = 0.25 \cdot S_{gel}$  erfährt. Der Flächenzuwachs sei linear in der Zeit  $S(t) = \zeta \cdot t$  und habe die Geschwindigkeit  $\zeta$ . Die Gesamtzeit zum Durchlaufen des Prozesses ist dann  $t_{ges} = \Delta S_{ges} / \zeta$ . Weiter nehmen wir an, dass der gesamte Flächenzuwachs in  $n$  vollständige, gleichgroße Buds mit der Fläche  $S_n = \Delta S_{ges} / n$  konvertiert wird. Die gesamte benötigte Energie nach Erreichen des gesamten Flächenzuwachses  $\Delta S_{ges}$  setzt sich nun aus dem Zuwachs der elastischen Energie  $E_B$  und dem Integral über die dissipierten Leistungen  $P_{\eta, \eta_M}$  aufgrund des Flusses im Volumen und der Membran zusammen

$$E_{ges} = E_B + \int_0^{t_{ges}} dt P_{\eta, \eta_M} \quad (8.15)$$

Wir nehmen weiter an, dass der Flächenzuwachs eines Buds  $S_n(t)$  in einen Kugelabschnitt mit gleichbleibendem Radius  $R_n = \sqrt{(S_n / 4n\pi)}$  konvertiert wird. Schematisch ist der Vorgang in Abb. 8.16 dargestellt.

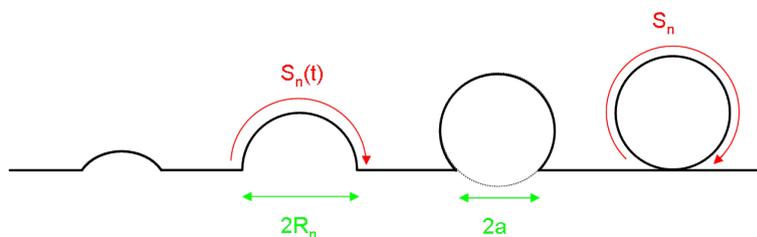


Abbildung 8.16.:

Die gesamte elastische Energie ist dann

$$E_B = \frac{1}{2} n \kappa \oint_{S_n(t)} dS \frac{1}{R_n^2} \quad (8.16)$$

Der Hauptbeitrag des Volumenflusses ist durch die Veränderung des Volumens  $\dot{V}$  im Bud gegeben. Diese Volumenänderung ruft einen Fluss durch den zirkulären Hals des Buds mit Radius

$a$  hervor. Gleichzeitig muss Membranfläche in den Bud fließen, was Dissipation aufgrund der Veränderung der Fläche des Buds  $\dot{S}_n$  zur Folge hat. So findet man, nach Sens et al. [149], für die dissipierte Leistung des Volumen- und Membranflusses

$$P_\eta = \eta \frac{22}{5} \frac{(\dot{V})^2}{\pi a^3}, P_{\eta_M} = \eta_M \frac{(\dot{S}_n)^2}{\pi a^2} \quad (8.17)$$

Wir nehmen zur Vereinfachung an, dass der Hals einen konstanten Radius besitzt, der gleich dem Radius des Buds ist. Dies unterschätzt die Dissipation, da gerade ab dem hemisphärischen Bud die Halsöffnung kleiner als der Radius des Vesikels ist. Für den Zuwachs an Gesamtenergie des Systems nach Durchlaufen des gesamten Prozesse finden wir mit Gl. 8.15 und Gl. 8.17 nach Rechnung (Anhang B.1)

$$E_{ges} = 8n\kappa_B\pi + \frac{176}{90} \eta \frac{\zeta S_{ges}}{\pi^{\frac{1}{2}} n^{\frac{1}{2}}} + 4\eta_M \zeta \quad (8.18)$$

Diesen Ausdruck werten wir in Abb. 8.17 für verschiedene Geschwindigkeiten  $\zeta$  und Mediumviskositäten von  $\eta = 0.001 \text{ N s/m}^2$  (grau) und  $\eta = 0.046 \text{ N s/m}^2$  (schwarz) aus. Die Gesamtfläche wurde entsprechend der Fläche der experimentell beobachteten Vesikel mit  $S_{ges} = 12 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2$  berücksichtigt.

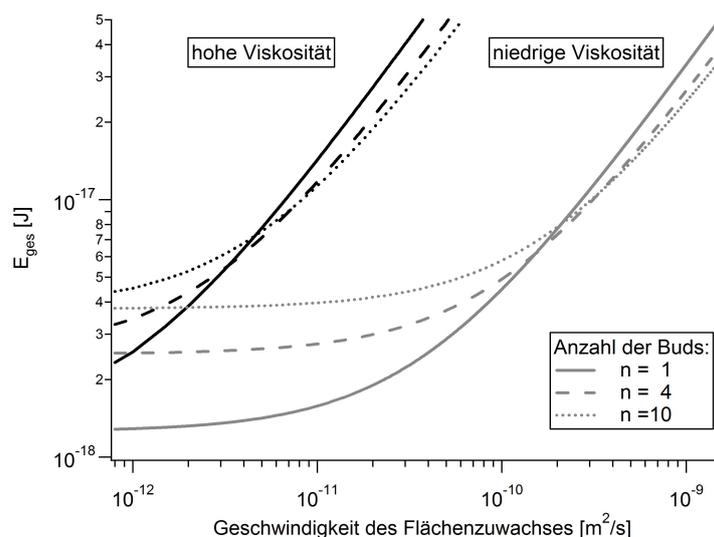


Abbildung 8.17.: Berechnete Gesamtenergie der Membran nach dem DOB-Modell als Funktion der Geschwindigkeit der Flächenausdehnung  $\zeta$ . Dargestellt ist der Verlauf der Energie für hohe  $\eta = 0.046 \text{ N s/m}^2$  (schwarz) und niedrige  $\eta = 0.001 \text{ N s/m}^2$  (grau) Viskosität des Mediums und für  $n = 1$ ,  $n = 4$  und  $n = 10$  Buds.

In Abb. 8.17 ist die Gesamtenergie für  $n = 1$ ,  $n = 4$  und  $n = 10$  Buds in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Flächenzuwachses  $\zeta$  dargestellt. Für kleine Geschwindigkeiten bleibt  $E_{ges}$

nahezu konstant, da der statische, elastische Beitrag dominiert. Wie erwartet, nimmt dieser nach Gl. 8.16 mit der Anzahl der Buds zu. Mit zunehmender Geschwindigkeit beginnt der dissipative Beitrag zu dominieren. Da die Dissipation nach Gl. 8.18 mit wachsender Bud-Anzahl abnimmt, wird auch die Gesamtenergie für die Bildung zahlreicher Buds kleiner gegenüber der, der Bildung weniger Buds. Dies ist in Abb. 8.17 an den Kreuzungspunkten des Energieverlaufs abzulesen. Der Einfluss der Volumen-Dissipation wird nochmals deutlicher bei dem Vergleich kleiner  $\eta = 0.001 \text{Ns/m}^2$  (graue Linien) und hoher Mediumviskosität  $\eta = 0.046 \text{Ns/m}^2$  (schwarze Linien). Im Fall der hohen Mediumviskosität ist die Geschwindigkeit, bei der die Überschneidung und damit Bildung zahlreicher Buds stattfindet, um nahezu zwei Größenordnungen kleiner im Vergleich zum Verhalten bei niedriger Mediumviskosität.

Wichtig ist abschließend zu bemerken, dass die multiple Bildung zahlreicher Buds ein äußerst komplexer Vorgang ist. Dies führt zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, da viele Parameter kaum kontrolliert werden können. Zahlreiche Faktoren beeinflussen den Prozess, hier insbesondere die Domänenstruktur der Membran<sup>12</sup>. Dies schließt aber auch den Kreis zum ersten Abschnitt dieses Kapitels. Hier fanden wir eine lokalisierte Budbildung aufgrund der Domänenstruktur. Wir vermuten daher, dass der hier vorgestellte Prozess durch eine Kopplung von Domänenstruktur und schnellem Aufschmelzen der Membran entsteht.

---

<sup>12</sup>Sicherlich aber auch experimentelle Faktoren, wie die Heizraten am Vesikelort die exakt kaum kontrolliert werden konnten.

## **Teil IV.**

# **Zusammenfassung**

In dieser Arbeit untersuchten wir verschiedene Aspekte von Phasenumwandlungen in Lipidmembranen. Besonderes Interesse galt dem Einfluss der Dimensionalität des Systems auf Struktur und Dynamik in der flüssig-gel und flüssig-flüssig Phasenkoexistenz. Diese Untersuchungen wurden an Gigantischen Unilamellaren Vesikeln als 2d-System und dünnen Membranschläuchen, „Tethern“, als quasi 1d-System, durchgeführt.

Die Domänen in der flüssig-gel Koexistenz reiner Phospholipide sind die optisch sichtbare Repräsentation des fluiden bzw. gelförmigen Phasenanteils. So konnten wir in Kapitel III 3 bei unseren Untersuchungen den optisch sichtbaren Phasenanteil als thermodynamischen Ordnungsparameter sowohl in Vesikeln als auch in Tethern identifizieren. Während die Eignung des Phasenanteils als Ordnungsparameter beim Übergang vom 2d- auf das 1d-System erhalten bleibt, ist der Einfluss der Dimensionalität auf die Domänenstruktur deutlich sichtbar. Der Tether als quasi 1d-System zeigt eine quasi 1d-Phasenseparation in fluide und gelförmige Abschnitte. Vermutlich führt im Übergangsbereich zwischen 1d- und 2d-System ein Symmetriebruch zu einer Ausprägung der molekularen Chiralität, was sich in helikalen Domänenstrukturen niederschlägt.

Die Dimensionalität hat ebenfalls erheblichen Einfluss auf die Hydrodynamik eines Systems [15]. Das zweite Kapitel dieses Teils beleuchtete daher die Diffusion von Domänen in der flüssig-flüssig Phasenkoexistenz. Das System präsentiert sich als hydrodynamisch sehr komplex, da durch die Kopplung der 2d-Membran an das 3d-Medium eine natürliche Längenskala das Verhalten beschreibt. So ist, abhängig von der Viskosität des Mediums und der Membran, die Diffusion von der Dissipation in der Membran bzw. im Medium bestimmt [15].

Anhand der stark veränderlichen Viskosität der flüssig-geordneten Phase in Systemen mit DOPC-DPPC-Cholesterolließe sich sowohl diese beiden Grenzfälle als auch der Übergangsbereich zwischen ihnen darstellen. Durch den Vergleich mit den theoretischen Beschreibungen konnten wir die Gültigkeitsbereiche der Näherungen experimentell auflösen. Eine Analyse der Grenzfälle und des Übergangsbereichs zeigte, dass die von Petrov und Schwille [17] gegebene analytische Näherung des HPW-Modells eine homogene Beschreibung des Systems liefert. Damit ist es gelungen, eine experimentell konsistente Darstellung dieses gemischten hydrodynamischen Problems zu ermitteln. Die aus dem Modell abgeleitete Viskosität zeigt ein reines Arrheniusverhalten. Für eine weitere Reduzierung der Dimensionalität betrachteten wir die Diffusion auf Tethern als quasi 1d-System. Für Domänen, die in etwa die Strukturgröße des Tethers erreichen, ist das System bezüglich der Diffusion quasi eindimensional. Domänen können dann eine den Tether umgreifende Domäne bilden und werden dadurch immobilisiert. Dieser Effekt stellt somit einen scharfen Schalter für die Transporteigenschaften auf einem Tether dar.

Wir untersuchten dann in Kapitel III 5 die Kinetik der Entmischung in die flüssig-flüssig Koexistenz. Es zeigt sich, dass die Separationskinetik und die beobachteten Domänenstrukturen gut mit den Ergebnissen numerischer Simulationen binärer Flüssigkeiten verglichen werden können. Wir konnten eine Entmischung und anschließende Entwicklung der Domänenstruktur durch Kollision und Verschmelzung der Domänen feststellen. Dabei fanden sich Hinweise, dass das Wachstum durch das Diffusionsverhalten der Domänen bestimmt ist. Durch eine Simulation auf Grundlage eines Ensembles Brownscher Partikel gelang es, die experimentellen Ergebnisse gut zu modellieren.

Bei starker Unterkühlung des Systems war eine Entmischung in anfänglich lamellare Domänen-

strukturen zu beobachten, die dann in die bekannten zirkulären Domänen relaxieren. Sowohl der Verlauf der zeitlichen Entwicklung der Konzentration der beiden separierenden Phasen als auch das Verhalten der Domänenstruktur, lassen durch den Vergleich mit numerischen Simulationen auf eine spinodale Entmischung schließen. Den Separationsprozess binärer Flüssigkeiten kennzeichnet, neben einem Beitrag der Diffusion auf das Domänenwachstum, auch ein signifikanter Beitrag konvektiven Materialtransports aufgrund von Oberflächenspannungsgradienten. Daher erwartet man bei spinodaler Entmischung zwei Regimes des Größenwachstums, die durch diese Beiträge bestimmt sind. Wir zeigen, dass bei der Domänenentwicklung in der Membran bei solchen Prozessen auch eine Vergrößerung der Domänenstruktur aufgrund der herrschenden Linien- spannung berücksichtigt werden sollte: Nach Ausbildung der lamellaren Struktur bilden große Bereiche der Membran zusammenhängende Domänen, die aber eine nahezu fraktale Struktur aufweisen. Die Relaxation dieser Domänen führt dann schnell zu sehr großen zirkulären Domänen.

Weiter zeigen wir, dass Konzentrationsgradienten in der Membran aufgrund der Photooxidation von Cholesterol einen erheblichen Einfluss auf die Separationskinetik haben. Wir konnten die Diffusion einzelner Domänen entlang eines solchen Konzentrationsgradienten darstellen und ebenfalls gut mit den Vorhersagen von Simulationen vergleichen.

Wieder erweitern wir die Betrachtung auf Tether als quasi 1d-System. Auch hier ist der Unterschied zwischen einem Wachstum durch Kollision und Verschmelzung und der Entwicklung der Domänenstruktur bei spinodaler Entmischung deutlich. Der 1d-Charakter und die Bildung von den Tether umgreifenden Domänen führt hier zu einer Sättigung des Größenwachstums der Domänen bevor der thermodynamische Gleichgewichtszustand, die Separation in zwei große Domänen, erreicht ist. Bei spinodaler Entmischung im 1d-System wird eine Separation in alternierende Phasen erwartet, deren Länge exakt der dominierend wachsenden Wellenlänge entspricht. Hinweise darauf fanden wir durch die Beobachtung der Entwicklung einer periodischen Domänenstruktur auf dem Tether bei spinodaler Entmischung.

Durch die Möglichkeit der Unterkühlung in nahezu beliebiger Entfernung von der Entmischungstemperatur, ergibt sich ein weites Feld für weiterführende Untersuchungen. So stellen diese Membranen wohl auch ein ausgezeichnetes Modellsystem binärer Flüssigkeiten dar.

Im vierten Kapitel dieses Teils untersuchten wir dann den Einfluss von Ladung auf die Domänenstruktur und die Viskosität der Membran in der flüssig-flüssig Koexistenz. Durch das Einbringen geladener Lipide war bei mittleren Ladungsanteilen teilweise ein Übergang zu einer hochgeordneten hexagonalen Domänen-Überstruktur zu beobachten. Bei weiter zunehmender Ladung zeigt sich ein weiterer Übergang zu wieder ungeordneten Strukturen, deren Eigenschaften mehr denen in einer flüssig-gel Koexistenz gleichen.

Wir beobachteten ein Anwachsen der Viskosität der ladungsreichen Phase. In Lipidmembranen wird oft ein „freie Flächen Modell“, analog zum „freie Volumen Modell“ für Flüssigkeiten, zur Beschreibung der Diffusion verwandt. Nach Eu [108] kann der Diffusionskoeffizient über ein „freie Volumen Modell“ auf eine „Van der Walls Zustandsgleichung“ zurückgeführt werden; und damit auf das intermolekulare Potential. Wir adaptieren dies für den Einfluss der Ladung auf die Diffusion in der Membran. So stellten wir phänomenologisch einen Zusammenhang zwischen dem erniedrigten Diffusionskoeffizienten bzw. der erhöhten Viskosität und dem zusätzlichen elek-

trostatischen Potential in der Membran her.

Am Ende präsentierten wir noch, unserer Intention folgend ein wechselwirkendes 2d-Ladungssystem zu modellieren, eine erste Analyse der hexagonalen Überstruktur. So konnten wir das Potential der Domänen ableiten und sogar erste Hinweise auf eine „phononische“ Anregung in diesen quasi zweidimensionalen Kristallen finden.

Im Exkurs dieses Teils haben wir dann die Membran als mikrofluidisches 2d-System herausgestellt. Wir konnten eine Strömung in der Membran darstellen, die durch eine Strömung im externen Medium entsteht. Aufgrund der Randbedingung der geschlossenen Oberfläche des Vesikels, führt die Strömung zu einer Wirbelbildung in der Membran. Durch die Kopplung der Strömung in der Membran an das interne Medium, wird dieses ebenfalls durchmischt.

Wir konnten weiter in vorläufigen Experimenten die Kinetik der Verschmelzung zweier Domänen darstellen. Diese scheinen als 2d-Tropfenmodell geeignet zu sein, was der Vergleich mit theoretischen Erwartungen und 3d-Experimenten nahelegt. Dabei gelang es, auch die Materialumverteilung bei diesem Prozess aufzulösen. So fanden wir, dass bei der Verschmelzung zweier Domänen diese eher benetzen, was durch den Fluss von Material an der Phasengrenze dargestellt werden konnte.

Abschließend untersuchten wir Gestaltänderungen in Vesikeln aufgrund der Phasenumwandlung. Es gelang Prozesse wie Adhäsion und Teilung zu beobachten. Dabei konnten wir zeigen, dass sich auch vom Vesikel thermodynamische Beziehungen, sowohl im Gleichgewicht als auch im Nichtgleichgewicht, ableiten lassen. Wir zeigten auch, dass durch Nichtgleichgewichtssituationen eine topologischen Strukturgebung möglich ist, die sich vom Gleichgewicht unterscheidet.

Für den Ausblick herausheben möchten wir drei Experimente. Wir haben zwei Strömungsphänomene dargestellt, die zu Wirbeln in der Membran führten (Kapitel III 5.5 und III 7.1). Dies könnte die Möglichkeit der experimentellen Darstellung der von Kostur et al. [150] kürzlich postulierten Separation von chiralen Objekten in Wirbeln eröffnen.

Gleichzeitig bewirkt eine derartige Strömung eine Advektion in der Membran selbst, aber auch im eingeschlossenen Medium. Dies führt aufgrund der großen Peclet-Zahl zu einer wesentlich schnelleren Materialumverteilung, als durch Diffusion möglich wäre. Zellen machen offensichtlich von solchen Transportmechanismen gerade zu diesem Zweck Gebrauch, was in einer kürzlich erschienen Publikation von van de Meent [151] vorgestellt wird.

Neben der biologischen Relevanz stellt die Membran solcher ortsfester Vesikel zusammen mit den gefundenen Möglichkeiten zur Manipulation und Handhabung dieses Systems ein ganz neues mikrofluidisches System dar.

Weiteres großes Potential bietet die Anwendung der Membran als Templat zur Untersuchung wechselwirkender Systeme. Die bereits beschriebenen Effekte, die durch das Einbringen von Ladung entstehen, konnten wir nur beginnen zu verstehen. Großer Vorteil dieses Systems ist die nahezu beliebige Kontrolle sowohl der Wechselwirkungsstärke als auch der Dichte der Ladung. Dabei muss sich die Untersuchung nicht nur auf elektrostatische Wechselwirkung beschränken. So haben wir bereits erste Versuche unternommen, die elektrostatische durch eine paramagnetische Wechselwirkung zu ersetzen. Dies ist analog durch das Einbringen von Lipiden möglich, die an der Kopfgruppe einen Chelatkomplex mit einem Seltenerdatom (hier Yttrium) bilden.

Die Wechselwirkung im System ist dann über ein externes Magnetfeld beliebig einstellbar.

Bei der Untersuchung der Entmischungskinetik konnten wir viele Effekte mit Simulationen vergleichen. Hier haben wir bislang ebenfalls nur eine Tür aufstoßen können. In der Membran der hier untersuchten Vesikel lassen sich u.U. sämtliche Parameter der Simulationen experimentell darstellen. Herausgegriffen sei die Separationskinetik unter einem Scherfluss [152, 153]. Dies kann gerade durch die Kopplung der Strömung an die Membran erfolgen.



**Teil V.**

**Anhang**

## A. Experimente

### A.1. Spontane Bildung von GUV's in geladenen Membranen

Die Bildung großer vesikulärer Strukturen ist biologisch äußerst interessant, da die spontane Bildung eines großen separierten Volumens letztendlich der erste Schritt zur Entstehung von Leben war.

Für den experimentellen Biophysiker ist die einfache Präparation von Giant Unilamellare Vesicles (GUVs), wie wir sie auch verwendet haben, von großen Interesse, da sich an diesen in einem bequem optisch zugänglichen Größenbereich die Gestalt der Vesikel selbst, aber auch Domänenstruktur und -Verhalten an einer nahezu flachen Membran studieren lassen.

Der Nachteil der Elektroformierungs- Methode ist die Notwendigkeit eines Wechselfeldes angelegt an Elektroden im Kontakt mit dem Medium. Für die Präparation Oberflächen-adhärrierter Vesikel in einem integrierten Versuchsaufbau, setzt dies die gute Zugänglichkeit oder erheblichen konstruktiven Aufwand voraus. Zudem ist für physiologische Untersuchungen die Biokompatibilität der Elektroden zu gewährleisten. Die Präparation großer Vesikel erfordert zudem einen erheblichen Zeitaufwand (>2h). Ein Verzicht auf den elektrischen Anteil, die Verkürzung der Präparationszeit und größere Vesikel bringen somit erhebliche Vorteile für die experimentelle Arbeit.

Lipide wurden, wie beschrieben, in der gewünschten Zusammensetzung in TEF gelöst und auf eine Deckglas aufgebracht. Hohe Ladungsanteile erforderten die Zugabe von wenig Methanol um gute Löslichkeit zu erreichen. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum (ca. 3h) werden die Proben in der beschriebenen Kammer mit bidestilliertem Wasser oberhalb der Schmelztemperatur des höchst-schmelzenden Lipides versetzt. Vesikel formen sich spontan innerhalb weniger Sekunden und bleiben an der Oberfläche adhärriert. Bei ausreichender Lipidbelegung der Oberfläche ist dann ein kontinuierliches Größenwachstum durch Fusionsprozesse auf der Oberfläche zu beobachten. Vesikel erreichen so spontan durchschnittliche Durchmesser von 100 – 200 $\mu\text{m}$ . Oft sind Durchmesser bis zu 500 $\mu\text{m}$  zu beobachten. Durch zusätzliches Anlegen der bekannten Wechselfeldspannung lässt sich das Größenwachstum beschleunigen und Größen von 300 $\mu\text{m}$  und darüber sind innerhalb weniger Minuten möglich.

Es wurden Systeme mit 2-6 Lipid-Spezien, sowohl gesättigte als auch ungesättigte, mit und ohne Cholesterol-Zugabe, in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Stets war die spontane Bildung zu beobachten. Ebenfalls bei der Zugabe von PEG-Lipiden fanden wir die spontane Bildung. In den selben Zusammensetzungen ohne Ladung war nie eine spontane Bildung zu beobachten. Dies verdeutlichen wir in Tabelle A.1.

Somit ist hier tatsächlich die Ladung als der treibende Mechanismus für die spontane Bildung

LIPID/MISCHUNG	SPONTANE BILDUNG
$D_xPC$	nein
$D_xPC+D_xPG (>4\%)$	ja
$D_xPC+D_xPA (>4\%)$	ja
$D_xPC+D_xPG(> 4\%)+PEG-Lipid(2, 4, 6\%)$	ja
$DOPC+DMPC/DPPC+x\% Cholesterol (x < 50\%)$	nein
$DOPC+(1-y)DMPC/DPPC+(y)DMPG/DPPG+x\%Cholesterol (x < 50\%)$	ja
$DOPC+(1-y)DMPC/DPPC+(y)DMPA/DPPA+x\%Cholesterol (x < 50\%)$	ja
$(1)DphPC+(1)DMPC+x\%Cholesterol (x < 50\%)$	nein
$(1)DphPC+(1-y)DMPC+(y)DMPG+x\%Cholesterol (x < 50\%)$	ja

Tabelle A.1.: Übersicht der Lipidzusammensetzung für spontane Vesikelbildung. Ausschließlich Mischungen die Ladung ( $> 4\%$ ) enthalten, zeigen spontane Vesikelbildung.

zu identifizieren. Damit konnten wir, nach unserer Kenntnis, zum ersten mal ein spontane Bildung von GUV's beobachten. Die Möglichkeit der Präparation von nahezu allen Lipid-Zusammensetzungen, ebenfalls mit PEG-Kopfgruppen bietet ein breites Anwendungsfeld. Die kurze Präparationsdauer bringt zudem eine erhebliche Zeitersparnis.

Die spontane Bildung von kleinen Vesikeln ( $\propto 100nm$ ) in geladenen Membranen [154] wurde häufig auf eine negative Gaußsche Krümmung bei hohen Ladungsanteilen zurückgeführt [94]. Dies ist auch hier die erste Vermutung, bedarf aber unbedingt eingehender Untersuchung, welche wir hier aber nicht durchführen werden, da wir die Vesikel lediglich für weitere Untersuchungen nutzen wollen.

Bemerkenswert hierbei ist die erhöhte Stabilität der Vesikel die Ladung enthalten. Durch dielektrische Kopplung ist eine Deformation der Vesikel aufgrund des angelegten Feldes zu beobachten. Dies führt bei der Elektroformierung dazu, dass die dem Wechselfeld ausgesetzten Vesikel in der Frequenz dieses Feldes deformiert werden. Bei zu großer Amplitude der Deformation ist ein Reißen der Membran bei oberflächenadhärierten Vesikeln zu beobachten. Dabei sind die Amplituden, bei denen die Vesikel zerstört werden, in ein und dem selben Lipid-System meist vergleichbar.

Es fiel auf, dass Vesikel geladener Membranen wesentlich höheren Amplituden ausgesetzt werden konnten bis sie zerstört wurden.

Eine weitere Beobachtung ist eine offensichtlich erhöhte Permeabilität der geladenen Vesikel. In der Regel führt die Zugabe von Elektrolyten bereits bei äußerst kleinen Konzentrationen, je nach osmolarem Gradienten, zu einem Kollaps oder einem Reißen der Membran. Bei Vesikeln, die Ladung enthalten, ist dieses Verhalten kaum zu beobachten. Selbst bei einer starken Erhöhung der Elektrolytkonzentration und damit eine starken Asymmetrie über die Membran ist keine signifikante Veränderung der Vesikelgestalt zu beobachten. Dies ist offensichtlich Folge einer hohen Permeabilität der geladenen Membran.

**Vergleich mit aus Zellen extrahierten Lipiden** Die biologische Bedeutung der Ladung in der Membran offenbart sich durch den Vergleich mit aus Zellen extrahierten Lipiden. Als Zell-Linie wurden HaCaT verwendet. Die Extraktion erfolgt nach einem, Standard-Protokoll ([155]) durch S. Nuschele. Resuspendierung der extrahierten Lipide in TFE und Präparation nach dem identischen Vorgehen, wie wir es für die spontane Bildung von Vesikeln verwendeten, führte hier ebenfalls zu einer spontanen Bildung von großen unilamellaren Vesikeln. Die typischen Durchmesser waren mit ca.  $100\mu\text{m}$  absolut vergleichbar mit den Modell-Vesikeln die Ladung enthielten. Wir testeten auch hier wieder die Stabilität durch Anlegen einer Wechselspannung ( $10\text{Hz}$ ) mit steigender Amplitude. Auch hier war eine außerordentlich hohe Stabilität der Vesikel zu beobachten.

Fassen wir nochmals die beobachteten Phänomene zusammen. Wir fanden eine spontane Bildung von großen Vesikeln nur im Beisein von Ladung in der Membran. Die Stabilität der Vesikel erhöhte sich enorm im Beisein von Ladung. Spontane Bildung und Erhöhung der Stabilität war nicht auf Cholesterol zurückzuführen. In extrahierten Lipiden aus zellulären Membranen zeigten sich die identischen Phänomene. Wir schließen also, dass die Anwesenheit von geladenen Lipiden einen entscheidenden Faktor für die Formgebung und Stabilität von Zellen darstellt.

Der zugrundeliegende Mechanismus wurde hier nicht näher untersucht, da die Vesikel zur Untersuchung von Membraneigenschaften wie Fluidität und Permeabilität dienen. Eine mögliche Ursache kann aber in der Veränderung der spontanen Krümmung, insbesondere der Gaußschen Krümmung, liegen. Darauf wurde die spontane Bildung von kleinen Vesikeln zurückgeführt. In unserem Fall scheint die Oberfläche des verwendeten Deckglases Einfluss auf die Bildung zu haben. Der beschriebene Effekt war am ausgeprägtesten auf ITO beschichteten Oberflächen. Auf bloßen Glas-Oberflächen war die spontane Bildung auch zu beobachten, allerdings bildeten sich weniger und kleinere Vesikel. Dieser Effekt sollte Gegenstand weiterer Untersuchung sein, da die Oberflächenabhängigkeit wesentlichen Einfluss auf Strukturbildung in biologischen Systemen haben kann. Generell ist diese Entdeckung zunächst von großem praktischen Interesse. Die wesentlich verkürzte Präparationszeit stellt eine enorme Zeitersparnis dar. Die Möglichkeit des Verzichtes auf das Wechselfeld macht den Einsatz in schlecht zugänglichen Experiment-Geometrien möglich.

## A.2. Wärmekapazität Ladungsphasendiagramm

Als Charakterisierung des Phasenübergangs dient auch die Wärmekapazität, wie in Abb. A.1(a) beispielhaft für 0%, 40% und 60% relative Ladung dargestellt.

Das System ohne Ladung präsentiert nahezu einen „Lambda-Übergang“ was auf ein Flüssigkeitsverhalten hindeutet. Allerdings ist die Ausprägung dieses Übergangs stark von der Heizrate abhängig. Bei abnehmender Heizrate geht der Übergang zunehmend in einen Knick über, der immer weniger ausgeprägt wird. Dieses Verhalten wird hier nicht weiter untersucht.

Systeme die Ladung enthalten präsentieren dagegen eine sehr breite Phasenumwandlung  $\Delta T > 30^\circ\text{C}$  mit einem ausgeprägten Maximum der Wärmekapazität. Hier ist keine Veränderung mit der Heizrate zu beobachten. Das Entstehen des ausgeprägten Maximums erinnert an Phasen-

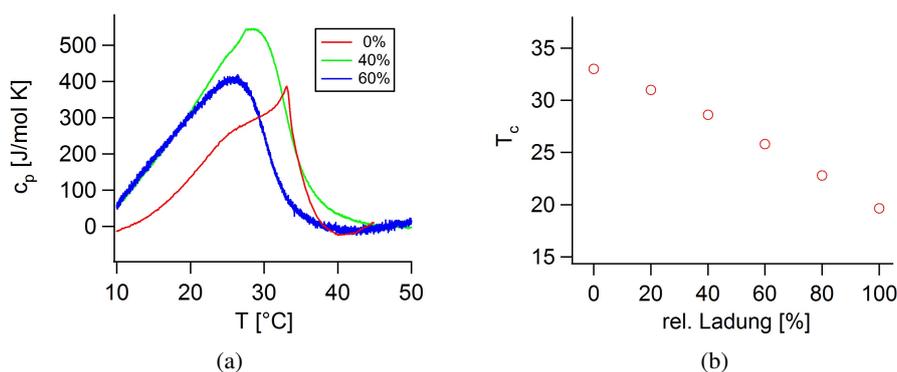


Abbildung A.1.: a) Wärmekapazitäten für 0%, 40% und 60% Ladung im System (1)DOPC-(1-x)DPPC-(x)DPPG+20%Cholesterol. b) Temperatur des Maximums der Wärmekapazität in Abhängigkeit von der relativen Ladung.

übergänge in der flüssig-gel-Koexistenz. Die Position des Maximums  $T_c$  verschiebt sich mit zunehmender Ladung zu tiefen Temperaturen hin, wie Abb. A.1(b) verdeutlicht.

Der Beginn der Phasenumwandlung  $T_s$  scheint sich nicht zu verschieben. Auch die Temperatur, bei der optisch eine Phasenseparation zu erkennen ist, verschiebt sich kaum. Eine definitive Aussage ist hier aber schwierig, da die Bildung von Domänen aufgrund der Photooxidation des Cholesterols eine genaue Bestimmung verhindert.

### A.3. Inward Budding

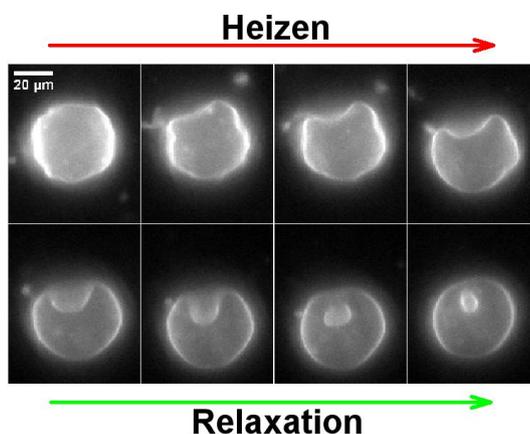


Abbildung A.2.: Budbildung nach Innen. Vergleichbarer Vorgang zu Abb. 8.11.

Der analoge Prozess zu dem in Kapitel 8.3.1 vorgestellten. Die Zusammensetzung der Membran

(DMPC-DPPC1-1) und die Prozessführung sind identisch.

#### A.4. Relaxation bei Reintegration

In Vesikeln, die Buds nach außen zeigen, ist bei identischer Versuchsdurchführung ein ganz analoger Prozess zu beobachten. Allerdings hat sich hier das reduzierte Volumen bei der Ausbildung der Buds von initial  $v = 1$  auf  $v < 1$  aufgrund des Flächenzuwachses während der Phasenumwandlung verändert. Ganz im Unterschied zum vorher vorgestellten Prozess, bei dem durch die Inkorporation der Vesikel das reduzierte Volumen von  $v = 1$  erhalten blieb. Im ersten Bild in Abb. A.3 ist der Vesikel in der gelförmigen Phase dargestellt. Nach dem Aufheizen, wie zuvor beschrieben, bilden sich zwei Ausstülpungen aus (Abb.A.3: 0s). Dabei bleibt das Volumen wieder konstant und die Fläche wächst um etwa 21%. Der Vesikel ist bei ca.  $T = 43^\circ\text{C}$  vollständig in der fluiden Phase. Der beschriebene Temperatursprung senkt die Temperatur unter die Phasenumwandlungstemperatur  $T_c = 41^\circ\text{C}$ . In Abb. A.31s ist der thermodynamische Gleichgewichtszustand die gelförmige Phase. Es schließt ein Relaxationsprozess in die thermodynamisch erzwungene Phase an (Abb. A.3: 1...15s).

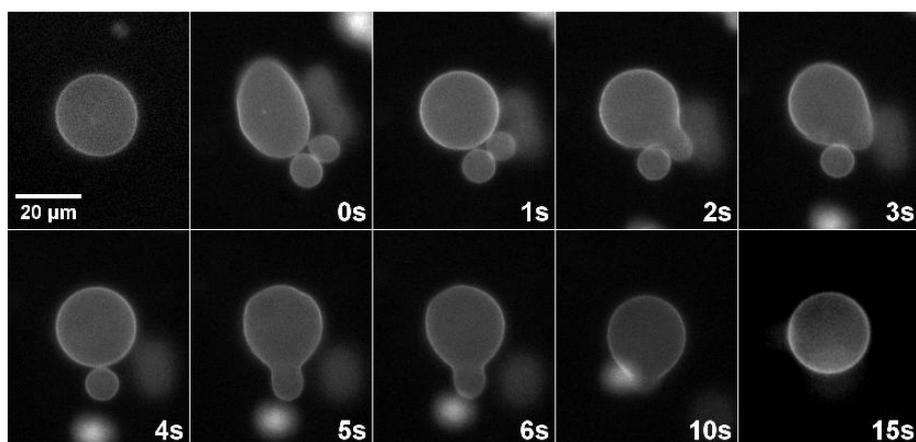


Abbildung A.3.: *Budding und Reintegrationsprozess eines DPPC Vesikels bei zweimaligem Durchlauf der Phasenumwandlung. Der initial sphärische Vesikel entwickelt beim Übergang von der gelförmigen in die fluide Phase zwei Buds. Diese reintegrieren nach einem Temperatursprung durch einen Relaxationsprozess wieder in den Vesikel.*

Die Gestalt relaxiert wieder in die ursprüngliche, sphärische Form. Die Buds bilden sich zurück und zu Ende des Prozesses entsprechen Fläche und Volumen wieder der gelförmigen Ausgangssituation (Abb. A.3: Bild1).

Eine detaillierte Betrachtung des Prozesses offenbart die zugrunde liegende Physik. Zu Beginn, bei vollständiger Fluidität des Vesikels, sind sowohl der Muttervesikel, als auch die separierten Vesikel nicht komplett sphärisch, sondern zeigen eine gewellte Oberfläche. Es sind deutlich Fluk-

tuationen auf der Vesikeloberfläche zu erkennen. Bei Einsetzen der Phasenumwandlung strafft sich zunächst der Vesikel aufgrund der Flächenabnahme (Abb. A.3: 1s). Daraufhin reintegriert die erste Ausstülpung (Abb. A.3: 2s). Im Moment der Reintegration, genauer beim Öffnen der Halsregion, sind wieder Fluktuationen auf der Oberfläche zu erkennen. Das bedeutet, dass hier die Spannung zwischenzeitlich vollständig relaxiert. Zudem ist schön zu sehen, dass die kleinere der beiden Ausstülpungen zuerst reintegriert. Dies ist eine Folge des Laplacedrucks innerhalb des Systems. Da sowohl die Ausstülpungen als auch der Muttervesikel eine einzige Oberfläche besitzen, ist die Oberflächenspannung im gesamten System konstant. Somit ist der Laplacedruck im Inneren der kleinsten Struktur am größten und diese wird, wie beobachtet, zuerst reintegriert.

Im weiteren Verlauf der Relaxation schreitet der Prozess selbständig fort. Wieder strafft sich die Membran und bei ausreichend großer Spannung öffnet sich die Halsregion des zweiten Tochtervesikels und wieder relaxiert die Spannung der Membran. Wieder ist eine Wellung der gesamten Membran zu erkennen.

Die Fläche nimmt bei diesem Prozess wieder um etwa 21% ab. Es zeigt sich wie zuvor ein exponentieller Abfall, was wieder die Relaxation in den gelförmigen Gleichgewichtszustand zeigt. Es ergibt sich auch hier eine vergleichbare Relaxationszeit von

$$\tau = 4.6 \pm 0.3s \quad (\text{A.1})$$

Dies stimmt gut mit der zuvor beobachteten Relaxation bei der Expulsion überein. Da sich in diesen unterschiedlichen Prozessen nahezu identische Relaxationszeiten ergeben, impliziert dies einen grundlegenden Mechanismus.

## A.5. Permeabilität in der Phasenumwandlung

Die Zellmembran ermöglicht als grundsätzlich impermeable Barriere, die zwei Kompartemente, das Zellinnere und das umgebende Medium, trennt, erst die Existenz von Leben. Gleichzeitig erlaubt aber erst die selektive Penetration dieser Barriere Austausch zwischen den beiden Kompartementen und damit Stoffwechsel und Entwicklung. Damit ist die Permeabilität der Zellmembranen gegenüber Ionen, Proteinen und anderen Botenstoffen und deren Regulierung der wichtigste Bestandteil für die Aufrechterhaltung von Zellfunktionen. In diesem Zusammenhang wurden Ionenkanalproteine als die funktionelle Einheit für den Ionentransport in der berühmten Arbeit von Neher und Sakmann ([118]) identifiziert. Die Eigenschaften dieser Kanalproteine wurden sowohl strukturell als auch in ihrer Representation als Ionentransporter intensiv studiert. Dabei fand man eine Vielzahl von Faktoren, wie pH-Wert, Temperatur, Ionenspezies, Druck und Medikamente, die die Funktionalität der Kanäle beeinflussen und steuern. In diesem Zusammenhang fand man auch einen Zusammenhang zwischen der Leitfähigkeit des Kanals, und dem Phasenzustand der einbettenden Membran[156, 157]. Dies motivierte die Untersuchung des Permeabilitätsverhaltens der Membran selbst. Der erste bedeutende Beitrag von Papadopoulos [158] war eine erhöhte Permeabilität für radioaktiv markierte Natriumionen während des Phasenübergangs. Es wurde angenommen, dass die erhöhte Permeabilität während der Phasenumwandlung eine Folge der Domänenbildung und damit der erhöhten Länge

der Phasengrenzen ist[159]; genereller betrachtet eine Funktion der lateralen Kompressibilität. Stromfluktuationen in reinen Membranen wurden das erste Mal von Yasufo et al. [160] berichtet. Bemerkenswerterweise was dies vor der berühmten Entdeckung der Ionenkanäle von Neher und Sakmann. In der Folge wurde von verschiedenen Autoren über quantisierte Stromfluktuationen berichtet[156, 161, 119, 162, 163, 164]. Dabei scheinen diese quantisierten Fluktuationen gehäuft in der Nähe eines Phasenübergangs aufzutreten[119, 164]. Dieses Phänomen wurde als „weiche Elektroporation“ bezeichnet[164].

Der Terminus Elektroporation beschreibt generell die Entstehung von Poren in einer Membran aufgrund eines elektrischen Transmembran-Potentials [165, 166, 167]. Obwohl zahlreiche Berichte über quantisierte Stromfluktuationen existieren, bleibt die Beschreibung recht phänomenologisch. Auch werden die klassische Elektroporation und das Phänomen der quantisierten Fluktuationen nicht gemeinsam behandelt. Vollkommen fehlt eine thermodynamische Beschreibung der beobachteten Effekte und eine Verbindung zwischen dem mikroskopischen Porenbild und einem globalen Bild.

Dieses einfache Elektroporations-Modelle greifen oft zu kurz, um zahlreiche beobachtete Phänomene zu erklären. Beispielsweise wird für ein Transmembranpotential  $V_M > 400mV$  ein sofortiges Reißen der Membran vorhergesagt. Wir fanden Membranen, die bis zu Potentialen von  $V_M > 1000mv$  stabil blieben. Das Fehlschlagen des Modelles resultiert wohl aus den vereinfachten Annahmen wie der Nicht-Beachtung der tatsächlichen Oberflächenspannung der Membran. Mittlerweile wurden verfeinerte Modelle vorgestellt, die dies berücksichtigen [168, 169, 170].

Im Folgenden soll ein Zusammenhang zwischen dem Phasenzustand der Membran und ihrer Leitfähigkeit hergestellt werden. Wir wollen zeigen, dass die erhöhten thermodynamischen Fluktuationen während der Phasenumwandlung ebenfalls zu erhöhten Stromfluktuationen führen. Gleichzeitig sollten die Zeitskalen dieser Fluktuation dann durch die typischen Zeitskalen der thermodynamischen Fluktuation bestimmt sein. Auch wird auf die Verbindung zwischen globaler Permeabilität und Phasenzustand der Membran eingegangen. Aufgrund zahlreiche Einflüsse wird sich der Nachweis dieser Vermutung als schwierig erweisen.

Zu Beginn werden die bisherigen Beiträge verschiedener Autoren zum Phänomen der quantisierten Stromfluktuationen in der Phasenumwandlung nochmals zusammengefasst. Das Auftreten quantisierter Fluktuationen ausschließlich in der Phasenumwandlung können wir in dieser Arbeit nicht bestätigen. Tatsächlich werden wir quantisierte Fluktuationen in allen Phasen finden.

Eine ausführlichere Beschreibung einiger Aspekt dieses Kapitels kann in den Diplomarbeiten von A-l. Idzko [171] und B. Wunderlich [51] erhalten werden.

**Thermodynamik und Leitfähigkeit** Bereits 1973 wurde von Papahadjopoulos et al.[158] eine erhöhte Permeabilität von radioaktiv gekennzeichneten Natrium-Ionen während des Phasenübergangs durch eine DPPG-Membran gefunden. Sie nahmen an, dass die erhöhte Permeabilität auf die Bildung von Domänen und insbesondere auf die Existenz von Domänengrenzen zurückzuführen ist. Diese Bild von Domänengrenzen als Regionen erhöhter Defektdichte und damit Permeabilität wurde von Curziero-Hansson und Mouritsen [159] aufgegriffen und in Computersimulationen bestätigt. Jedoch wurde ein erster Zusammenhang zwischen Permeabilität und der lateralen Kompressibilität  $\kappa_T^A$  als thermodynamische Antwortfunktion des Systems erst 1978

von Nagle und Scott[172] hergestellt.

$$P = C_0 + C_1 \kappa_T^A \quad (\text{A.2})$$

Mit der bereits vorgestellten Relation zwischen Kompressibilität und Wärmekapazität  $c_p$  wird Gleichung A.2

$$P = \alpha_0 + \alpha_1 \Delta c_p \quad (\text{A.3})$$

Die Konstanten  $\alpha_0$  und  $\alpha_1$  werden nicht wesentlich vom Schmelzprozess der Membran beeinflusst. Damit wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Wärmekapazität des Systems und der Permeabilität hergestellt.

Zu Beginn dieses Kapitels wurde erwähnt, dass von verschiedenen Gruppen stufenförmige quantisierte Stromfluktuationen während des Phasenübergangs beobachtet wurden [119, 163, 164]. Insbesondere Antonov et al. berichten von quantisierten Stromfluktuationen ausschließlich in der Nähe des Phasenübergangs von einer DSPC Membran. Zudem konnten sie zeigen, dass die Leitfähigkeit  $g$  der Membran für verschiedene Kationen einer absteigenden Reihe  $g_{Li} < g_{Na} < g_K < g_{Rb} < g_{Cs}$  folgt. Diese Reihe stimmt verblüffend mit der Hofmeister-Reihe überein, die die Wechselwirkung verschiedener Ionen mit Wasser beschreibt. Dies unterstützt weiter das Bild von wassergefüllten Poren als Ursache der Permeabilität von Lipidmembranen.

**Experimentelles Vorgehen** Die Permeabilität wurde an planaren Lipid Doppelschichten gemessen, die nach der Montal-Müller-Methode erzeugt wurden[49]. Die Messanordnung besteht aus zwei Kammern, die durch eine Teflonfolie ( $20\mu m$ ) voneinander getrennt sind. Die Folie enthält ein Loch von  $100\mu m$  bis  $200\mu m$  Durchmesser. Die Löcher wurden entweder schlicht gebohrt oder mit einem fokussierten Ionenstrahl (FIP) erzeugt. Beide Methoden erzielten gleich gute Ergebnisse, allerdings lassen sich mit der Ionenstrahl-Methode genauere Lochgrößen angeben. In Abb.A.4 ist der Aufbau und das Erzeugen der Membran schematisch dargestellt.

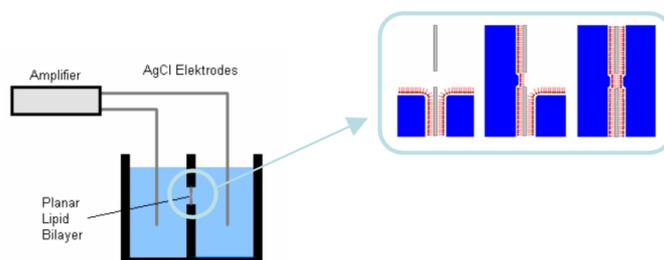


Abbildung A.4.: Schematischer Aufbau der BLM Apparatur und Erzeugung einer porenspannenden Membran.

Lipide werden aus dem Lösungsmittel ( $10mg/ml$  in Chloroform) auf den sich unter dem Loch befindlichen Wasserspiegel aufgebracht. Das sukzessive Anheben des Wasserspiegels in beiden Kammern führt zur Bildung der Membran.

Im Detail erfolgt die Präparation wie folgt: Zunächst wird auf die Teflonmembran  $10\mu l$  einer 5%-tigen Hexadecan-Pentan-Mischung aufgebracht. Nach Verdampfen des Pentanes bleibt ein

dünnen Hexadecanfilm zurück, der die spätere Bildung der Membran unterstützt. Es besteht die Möglichkeit, dass sich Hexadecan später als hydrophobes Molekül in der Membran löst und das Phasenverhalten beeinflusst. Zumal Hexadecan bereits einen eigenen Phasenübergang bei  $T = 18^\circ\text{C}$  aufweist. Zur Abschätzung des zu erwartenden Effekts auf den Phasenübergang der Membran wurden Lipid-Hexadecan-Mischungen kalorimetrisch vermessen (s. Anhang). Es wurde keine Verschiebung des Phasenübergangs des Lipides festgestellt. Der Hexadecan eigene Phasenübergang konnte identifiziert werden. Daraus läßt sich schließen, dass selbst in der Membran gelöstes Hexadecan einen zu vernachlässigenden Einfluss auf den Phasenübergang der Membran und damit auch des thermodynamischen Verhaltens hat. Dennoch wurde für die Experimente ein Lipidsystem gewählt, das einen Phasenübergang deutlich oberhalb  $T = 18^\circ\text{C}$  besitzt, um eventuelle Einflüsse zu vermeiden. Die Kammer wird nun bis unterhalb des Loches mit Elektrolyt befüllt. Bei sämtlichen Messungen wurde als Elektrolyt NaCl-Lösung ( $c = 200\text{mmol/l}$ ) verwendet. Es wird dann Lipid aus der Chloroformlösung (ca.  $10\mu\text{l}$ ,  $10\text{mg/ml}$ ) auf die Elektrolytoberfläche aufgebracht. Nach etwa 15-minütigem Warten sollte das Lösungsmittel verdampft sein. Das Erhöhen des Elektrolytspiegels, sukzessive in beiden Kammern, hat die Bildung einer Membran zur Folge. Parallel hierzu wird der Strom durch das Loch unter Anlegen einer minimalen Spannung ( $5\text{mV}$ ) beobachtet. Bei erfolgreicher Bildung einer Membran sinkt dieser in der Regel auf wenige Pikoamper und es ist eine Abnahme des Stromes über etwa 10min zu beobachten, was eine Relaxieren der Membran andeutet. Es ist möglich, dass sich Membranen aus mehreren Doppelschichten bilden. Dies wurde durch Messen der Kapazität der Membran geprüft. Die Kapazität  $C$  ist gerade das Verhältnis von Ladung  $Q$  und Spannung  $U$  und damit ist

$$Q = CU \quad (\text{A.4})$$

und weiter

$$\frac{d}{dt}Q = \frac{d}{dt}CU + \frac{d}{dt}UC = \frac{d}{dt}UC \quad (\text{A.5})$$

da  $C$  konstant. Wir wählen  $\frac{dU}{dt} = 1$ , also eine Dreiecksspannung und die Kapazität lässt sich direkt aus der Stromantwort ablesen.

**Thermodynamik und Permeabilität** Die Relaxationszeiten in einem Phasenübergang zweiter Ordnung divergieren bei der kritischen Temperatur  $T_c$ . Sie können im realen Lipidphasenübergang als lineare Funktion der Überschuss-Wärmekapazität dargestellt werden ([173, 148])

$$\tau = \frac{T^2}{L} \Delta c_p \quad (\text{A.6})$$

mit der absoluten Temperatur  $T$  und dem phänomenologischen temperaturunabhängigen Koeffizienten  $L^1$ . Die Relation sagt vor allem aus, dass die Zeitskala der Relaxation am Maximum der Wärmekapazität ebenfalls ein Maximum aufweisen, also für ein ausgeprägtes Wärmekapazitätsmaximum äußerst langsam sind. Nun kann nach Onsager [174, 175] jede Fluktuation des Systems als Störung des Gleichgewichtszustands angesehen werden. Somit sind die Zeitskalen von Fluktuationen und Relaxationen direkt verknüpft.

<sup>1</sup>Der Wert von  $L$  beispielsweise ist für multilamellare DMPC Vesikel  $L = 6.7108\text{JK/mols}$  und unilamellare große DMPC Vesikel  $L = 18.0108\text{JK/mols}$ .

**Temperaturabhängigkeit der Permeabilität** Hier werden ausschließlich Messungen am System DMPC-D<sub>15</sub>PC (1 – 1) beschrieben, welches sich aber beispielhaft für sämtliche untersuchte ungeladenen Systeme zeigt. Eine Untersuchung am System DOPC-D<sub>15</sub>PC und D<sub>13</sub>PC-DPPC wird in den Arbeiten von B. Wunderlich [51] und A-L. Idzko [171] vorgestellt.

Zuerst wurde die Permeabilität der Membran als Funktion der Temperatur bestimmt. Die Membranen wurden, wie beschrieben, ausreichend unterhalb bzw. oberhalb des Phasenübergangs präpariert und relaxiert. Bei schrittweiser Erhöhung des Transmembran-Potentials treten bei einer kritischen Spannung  $U_k$  Stromfluktuationen auf. Die Spannung wird daraufhin wieder soweit erniedrigt bis sich die Membran nahezu frei von Fluktuationen präsentiert. Dies dient dazu die Membran zu stabilisieren, aber dennoch nahe einem kritischen Zustand zu halten. Nun wird die Temperatur langsam, mit einer Heizrate von etwa  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  erniedrigt, bzw. erhöht. In Abb.A.5 ist der resultierende mittlere Strom, in Abhängigkeit von der Temperatur, bei einem Heizvorgang dargestellt. Die eingefügte Graphik zeigt das Wärmekapazitätsprofil des Systems.

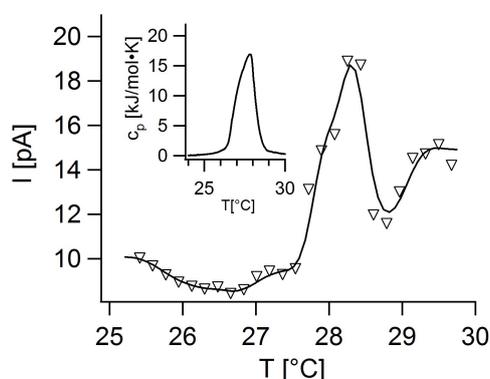


Abbildung A.5.: Temperaturabhängiger gemittelter Strom durch eine DMPC-D<sub>15</sub>PC-(1-1)-Membran. Deutliche Erhöhung des Stromes bei  $T=28^\circ\text{C}$ . Eingefügte Graphik: Wärmekapazitätsprofil der Membran. Eine deutliche Korrelation zwischen Wärmekapazität und Maximum des Stroms ist zu erkennen.

Es ist eine Erhöhung des gemittelten Stromes zwischen  $T = 27^\circ\text{C}$  und  $T = 29^\circ\text{C}$  mit einem Maximum bei etwa  $T = 28^\circ\text{C}$  zu erkennen. Dies korreliert mit der Breite und Position des Maximums der Wärmekapazität. Offensichtlich existiert ein Zusammenhang zwischen dem Phasen-zustand, beziehungsweise der Überschuss-Wärmekapazität, der Membran und der Permeabilität. Dies ist im Einklang mit der postulierten direkten Proportionalität zwischen Permeabilität und Überschuss-Wärmekapazität

Wichtig zu bemerken ist, dass sich solch gute Kurven nur in Ausnahmefällen erreichen ließen und eine Reproduzierbarkeit generell schwierig ist. In den anderen Fällen hängt das Verhalten der Membran empfindlich von der Richtung des Prozesses ab.

- Abkühlen aus der fluiden Phase: Hier traten beim Eintreten in die Phasenumwandlung oft zunehmend größer werdende Fluktuationen auf. Diese wurden so groß, dass die Membran schließlich in den meisten Fällen zerstört wurde.

- Aufheizen aus der gelförmigen Phase: Hier waren zwei unterschiedliche Muster zu beobachten. Entweder die Membran zeigte ein ähnliches Verhalten wie im vorherigen Fall, dies war der häufigere Fall, oder aber es traten über den gesamten Temperaturbereich keine Fluktuationen auf.

Zusammenfassend gab es durchaus Hinweise, dass während der Phasenumwandlung verstärkt Fluktuationen auftraten. Zu bemerken bleibt, dass eine Messung des Verlaufs des Stromes mit der Temperatur der das erwartete Maximum beim Maximum der Wärmekapazität zeigt, empfindlichst davon abhängt, die richtigen Parameter zu treffen und nur selten beobachtet wurde.

**Phasenzustandsabhängige Fluktuationen** Für eine detailliertere Betrachtung untersuchen wir weiter die Charakteristika wie Amplitude und Zeitskalen der Strom-Fluktuationen. Eine Verbindung wollten wir über die Vergleichbarkeit von Zeitskalen thermodynamischer Fluktuationen, deren Proportionalität zur Wärmekapazität und den Zeitskalen von Stromfluktuationen herstellen.

Hierzu verändern wir also den Phasenzustand einer Membran und nehmen die Charakteristik der Fluktuationen auf. Die Membran wurde, wie beschrieben, in der fluiden Phase ( $T = 32^\circ\text{C}$ ) präpariert. Dann wurde das Transmembran-Potential wieder soweit erhöht, bis Fluktuationen auftraten. Das Potential wurde dann wieder erniedrigt, um die Stabilität der Membran zu erhalten. Nach schnellem Abkühlen ( $2^\circ\text{C}/\text{min}$ ) in die Phasenumwandlung ( $T = 28.5^\circ\text{C}$ ) wurde das Transmembran-Potential wieder bis zum Auftreten von Fluktuationen erhöht. In Abb.A.6 präsentieren wir das schönste Ergebnis zahlreicher solcher Versuche.

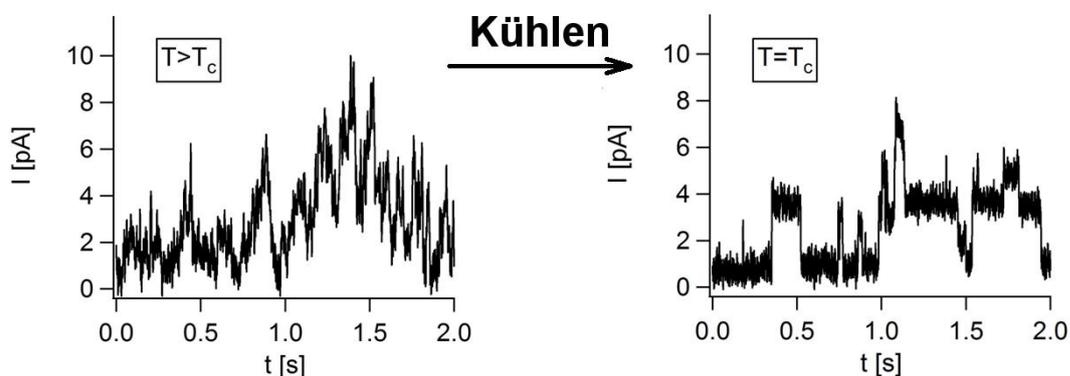


Abbildung A.6.: Veränderung des Charakters der Strom-Fluktuationen unter Kühlen von der fluiden Phase  $T > T_m$  in die Phasenumwandlung  $T_m$ . Dabei gehen ungeordnete Fluktuationen in stufenförmige über.

Es sind schnelle, ungeordnete Fluktuationen in der fluiden Phase zu beobachten<sup>2</sup>. In der Phasenumwandlung dagegen zeigen sich quantisierte stufenförmige Fluktuationen mit wesentlich

<sup>2</sup>Während der Elektroporation stieg die Basislinie an, was hier korrigiert wurde um eine gute Darstellung zu ermöglichen.

längeren Zeitskalen. Dies entspricht unserer Erwartung.

Nun muss klar gesagt werden, dass diese Darstellung nur sehr bedingt repräsentativ ist. Quantisierte Fluktuationen konnten in allen Phasen beobachtet werden. Ebenso zeigten sich auch ungeordnete Fluktuationen in sämtlichen Phasen. Eine statistische Auswertung, wie sie in der Diplomarbeit von A-L Idzko [171] erfolgte, zeigte lediglich eine minimale nicht signifikante Tendenz zu erhöhten Zeitskalen der Fluktuationen in der Phasenumwandlung.

Eine wesentliche Schwierigkeit der Experimente war die Auswertung der ungeordneten Fluktuationen. Oft waren langwellige Fluktuationen zu beobachten, die sich aber einer Auswertung bis hier entzogen. Auch war es, wie bereits angesprochen, schwierig Fluktuationen in einer Membran in beiden Phasen zu analysieren, da die Membranen beim Eintritt in die Phasenumwandlung meist rissen.

Zusammenfassend kann bis hier bezüglich der Zeitskalen festgestellt werden, und es sei erlaubt dies so zu sagen, dass „gefühlsmäßig“ erhöhte Zeitskalen in der Phasenumwandlung festzustellen sind. Ein definitives Ergebnis kann hier leider nicht gegeben werden.

Zu betonen ist jedoch abschließend die verblüffende Ähnlichkeit der beobachteten Stromfluktuationen in reinen Membranen und zellulären Membranen.

Zu Ende dieser Arbeit gelang es, durch die Verwendung geladener Lipide evtl. einen Weg zur wesentlich besseren Untersuchung des Problems zu eröffnen. Diese Membranen erweisen sich als wesentlich stabiler und lassen sich nahezu beliebig durch die Phasenumwandlung führen. Zudem sind in diesen geladenen Membranen nahezu ausschließlich in allen Phasen quantisierte Stromfluktuationen zu beobachten, was wohl auf eine negative Gaußsche Krümmung zurückzuführen ist [176, 94]. Dies erleichtert die Auswertung der Zeitskalen enorm. Jedoch ergab sich diese Lösung erst am Ende dieser Arbeit, und es blieb keine Zeit für eine ausführliche Untersuchung. Dennoch stellt dies wohl das System der Wahl dar, um die Vermutung zu prüfen.

## B. Herleitungen

### B.1. Dynamische Bud Bildung

Wir betrachten eine Membran, die aufgrund der Phasenumwandlung von der gelförmigen Phase, mit Fläche  $S_{gel}$ , in die fluide Phase einen Gesamt-Flächenzuwachs von  $S_{ges} = 0.25 * S_{gel}$  erfährt. Die Geometrie des Prozesses ist in Abb. B.1 illustriert.

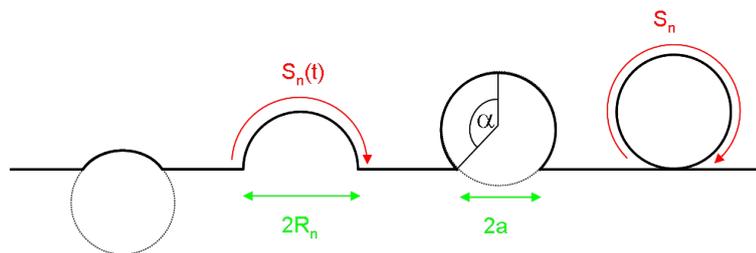


Abbildung B.1.:

Der Gesamt-Flächenzuwachs sei linear in der Zeit und habe die Flächen-Geschwindigkeit  $\zeta$

$$S(t) = \zeta * t \quad (\text{B.1})$$

Die Gesamtzeit zum Durchlaufen des Prozesses ist dann

$$t_{ges} = S_{ges} / \zeta \quad (\text{B.2})$$

Weiter wird angenommen, dass der Gesamtflächenzuwachs in  $n$  vollständige gleichgroße Buds mit der Fläche  $S_n = S_{ges} / n$  konvertiert wird. Mit der konstanten Geschwindigkeit für den Gesamtprozess  $t_{ges}$  (B.2) ist dann die Geschwindigkeit des Flächenzuwachses eines Buds  $\zeta_n = \zeta / n$  und damit der Flächenzuwachs eines Buds

$$S_n(t) = \frac{\zeta}{n} t \quad (\text{B.3})$$

Ein Bud sei stets ein Kugelabschnitt der Fläche  $S_n(t)$  mit gleichbleibendem Radius

$$R_n = \sqrt{(S_n / 4n\pi)} \quad (\text{B.4})$$

Die gesamte benötigte Energie zum Erreichen des Gesamt-Flächenzuwachses  $S_{ges}$  setzt sich nun aus dem Zuwachs der elastischen Energie  $E_B$  und der gesamten dissipierten Leistung  $P$

aufgrund des Flusses im Volumen  $P_\eta$  und der Membran  $P_{\eta_M}$  zusammen

$$E_{ges} = E_B + \int_0^{t_{ges}} dt P_{\eta, \eta_M} \quad (\text{B.5})$$

**Elastische Energie** Zunächst wird die Energie betrachtet, die aufgrund der Krümmung der Buds aufzuwenden ist. Die gesamte relevante elastische Energie einer Kugel ergibt sich aus der Hauptkrümmung  $C = (\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2})^2$  und damit wird die gesamte Biegeenergie für  $n$  Buds

$$\begin{aligned} E_B &= \frac{1}{2} n \kappa \oint_{S_n(t_{ges})} dSC \\ &= \frac{1}{2} n \kappa \oint_{S_n(t_{ges})} dS \frac{4}{R_n^2} \\ &= 2n\kappa \frac{S_{ges}}{n} \frac{1}{R_n} \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

mit B.4

$$E_{ela} = 8n\kappa\pi \quad (\text{B.7})$$

**Volumen Dissipation** Der Fluss von Medium in den Bud, und die Verdrängung von Medium auf der ausgewölbten Seite der Membran unterliegt einer Dissipation aufgrund der Scherspannung im Volumen. Der Gradient des Volumen- bzw. Membran-Geschwindigkeitsfeldes ergibt aufgrund der Mediumviskosität  $\eta$ , bzw. der Membranviskosität  $\eta_M$  die Scherspannung  $\sigma_{i,j} = \eta_M, \eta (\partial_j v_i + \partial_i v_j)$ . Die dissipierte Leistung aufgrund des Volumenflusses ist dann

$$P_\mu = \frac{1}{2\eta} \int dV \sum_{i,j} (\sigma_{i,j})^2 \quad (\text{B.8})$$

Der Hauptbeitrag des Volumenflusses ist durch die Veränderung des Volumens  $\dot{V}$  im Bud gegeben. Diese Volumenänderung ruft einen Fluss durch den zirkulären Hals des Buds mit Radius  $a$  hervor. Das Geschwindigkeitsfeld ist radial [149] und ist in sphärischen Koordinaten  $v_{bulk} = \frac{3\dot{V}}{2\pi r^2} \cos^2\theta$ . Volumendissipation erwächst ebenfalls aus dem Volumenfluss auf der Bud-Seite der Membran durch die Verdrängung von Volumen. Wir nehmen den gleichen Wert der Dissipation auf beiden Seiten an. Dissipation in der Membran erwächst aus dem Fluss von Oberfläche in den Bud. Das radiale Flussfeld ist hier  $-\dot{S}_n/2\pi l$ . Aus Gleichung B.8 ergeben sich die dissipierten Leistungen [149]

$$P_\eta = \eta \frac{22}{5} \frac{(\dot{V})^2}{\pi a^3} \quad (\text{B.9})$$

In der Folge werden wir die Öffnung des Buds  $2a$  konstant mit dem doppelten Radius  $2R_n$  des Buds abschätzen. Diese Annahme unterschätzt die Dissipation, da dies nur im Bereich des hemisphärischen Buds gilt. Da hier gezeigt werden soll, dass die Bildung mehrerer kleiner Buds durch eine Optimierung der Dissipation hervorgerufen wird, führt eine zu klein angenommene Dissipation eher zur Unterschätzung des Effektes, was dann ein positives Ergebnis unterstützt.

Die Volumendissipation auf beiden Seiten der Membran wird mit dem selben Beitrag bewerten. Wir bestimmen das Volumen  $V_n$  des Buds in Abhängigkeit vom Flächenzuwachs, gemäß der Definition in Abb.B.1 Der Öffnungswinkel  $\alpha$  des Buds ist geometrisch gegeben durch

$$\cos\alpha(t) = \frac{2R_n^2\pi - S_n(t)}{2R_n^2\pi} \quad (\text{B.10})$$

Somit findet man für das Volumen durch Integration in Kugelkoordinaten

$$\begin{aligned} V_n &= \int_0^{R_n} dr r^2 \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\alpha(t)} d\theta \sin\theta \\ &= \frac{2}{3} R_n^3 \pi [\cos\theta]_0^{\alpha(t)} \quad \text{mit B.10} \\ &= \frac{2}{3} R_n^3 \pi \left[ 1 - \frac{2R_n^2\pi - S_n(t)}{2R_n^2\pi} \right] \\ \Rightarrow \frac{d}{dt} V_n &= \frac{1}{3} R_n \frac{d}{dt} S_n(t) \\ &= \frac{1}{3} R_n \frac{\zeta}{n} \end{aligned} \quad (\text{B.11})$$

Es folgt die dissipierte Leistung durch Einsetzen in Gl.B.9

$$\begin{aligned} P_\eta &= \eta \frac{22}{5} \frac{(\dot{V})^2}{\pi a^3} \\ &= \eta \frac{22}{5} \frac{R_n^2 \zeta^2}{9n^2} \frac{1}{\pi a^3} \quad \text{mit B.4} \\ &= \eta \frac{22}{5} \frac{S_{ges} \zeta^2}{36\pi n^3} \frac{1}{\pi a^3} \quad \text{mit } a = R_n \text{ und B.4} \\ &= \eta \frac{88}{90} \zeta^2 \left( n^{\frac{3}{2}} S_{ges}^{\frac{1}{2}} \pi^{\frac{1}{2}} \right)^{-1} \end{aligned} \quad (\text{B.12})$$

Die gesamte dissipierte Energie auf beiden Seiten der Membran für einen Bud ist dann durch Integration über die Prozessdauer  $t_{ges}$  gegeben

$$\begin{aligned} E_\eta &= \mu \frac{176}{90} \zeta^2 \left( n^{\frac{3}{2}} S_{ges}^{\frac{1}{2}} \pi^{\frac{1}{2}} \right)^{-1} \int_0^{t_{ges}} dt \quad \text{mit B.2} \\ &= \eta \frac{176}{90} \frac{\zeta S_{ges}^{\frac{1}{2}}}{n^{\frac{3}{2}} \pi^{\frac{1}{2}}} \end{aligned} \quad (\text{B.13})$$

und damit für die Gesamtzahl von  $n$  Buds

$$E_\eta = \eta \frac{176}{90} \frac{\zeta S_{ges}^{\frac{1}{2}}}{n^{\frac{1}{2}} \pi^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{B.14})$$

**Flächen Dissipation** Dissipation entsteht zusätzlich durch den Fluss von Membran in den Bud. Bei der Berechnung der Dissipation aufgrund des Flächenflusses wird ebenfalls von einer Dissipation der Form von Sens et al.[149] ausgegangen. Die Rechnungen und Überlegungen sind analog zur Volumendissipation. Die dissipierte Leistung aufgrund des Flächenflusses ist dann

$$P_{\eta_M} = \eta_M \frac{(\dot{S}_n)^2}{\pi a^2} \quad (\text{B.15})$$

Es folgt die gesamte dissipierte Energie für  $n$  Buds

$$\begin{aligned} E_{\eta_M} &= n\eta_M \frac{\zeta^2}{\pi a^2 n^2} \int_0^{t_{ges}} dt \quad \text{mit } a = R_n \text{ und B.4} \\ E_{\eta_M} &= 4\eta_M \frac{\zeta^2}{S_{ges}} \int_0^{t_{ges}} dt \\ &= 4\eta\zeta \end{aligned} \quad (\text{B.16})$$

Somit finden wir für die Erhöhung der Gesamtenergie mit Gl.B.7, Gl.B.12 und Gl.B.16

$$E_{ges} = 8m\kappa\pi + \eta \frac{176}{90} \frac{\alpha S_{ges}^{\frac{1}{2}}}{n^{\frac{1}{2}} \pi^{\frac{1}{2}}} + 4\eta_M \zeta \quad (\text{B.17})$$

## B.2. Kritische Membranspannung

Die freie Energie einer Pore mit Radius  $r$  ist

$$F_P = 2\pi r \gamma \quad (\text{B.18})$$

mit der Linienspannung der Pore  $\gamma$ . Die Energie der Membran mit Pore ist dann

$$F_{MP} = \frac{1}{2} \kappa_A^T A \left( \frac{\Delta A}{A} - \frac{\pi r^2}{A} \right)^2 + 2\pi r \gamma \quad (\text{B.19})$$

Wobei  $\kappa_A^T$  das Dehnungsmodul der Membran,  $\Delta A$  die gedehnte Membranfläche und  $A$  die Gesamtfläche der Vesikel bezeichnet. Da die Linienspannung der Pore gerade die Spannung in der Membran erzeugt, folgt mit Gl. B.18 und Gl. B.19

$$F_{MP} = 4\pi r \gamma \quad (\text{B.20})$$

Der Vergleich mit der gedehnten Membran ohne Pore

$$F_o = \frac{1}{2} \kappa_A^T \frac{(\Delta A)^2}{A} \quad (\text{B.21})$$

liefert die kritische Membrandehnung

$$\frac{1}{2} \kappa_A^T \frac{(\Delta A_{d,krit})^2}{A} = 4\pi \gamma r \quad (\text{B.22})$$

Beim Öffnen der Pore wird die Membranspannung gerade auf die Linienspannung der Pore relaxiert. Dies bedingt eine äußerst kleine Flächendehnung der Membran da die Linienspannung  $\gamma$  gegenüber dem Dehnungsmodul der Membran  $\kappa_A^T$  äußerst klein ist. Wir schätzen daher die initiale Porenfläche  $A_P$  beim Öffnen der Pore gerade auf die gedehnte Membranfläche  $\Delta A$ . Also wird Gl.B.22

$$\frac{1}{2} \kappa_A^T \frac{(\Delta A_{d,krit})^2}{A_g} = 4\pi\gamma \sqrt{\frac{\Delta A_{d,krit}}{\pi}} \quad (\text{B.23})$$

Es folgt für die kritische Membrandehnung

$$\Delta A_{d,krit} = 4A^{\frac{2}{3}} \pi^{\frac{2}{5}} \left( \frac{\gamma}{\kappa_A^T} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (\text{B.24})$$

### B.3. Adhäsion

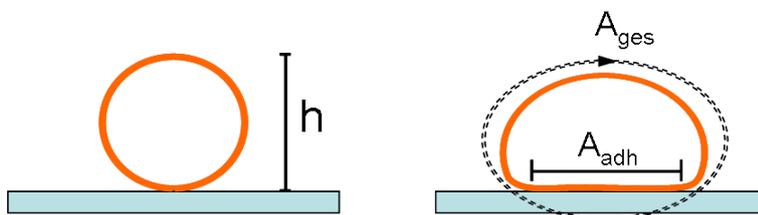


Abbildung B.2.: Schemazeichnung der Adhäsion. Die Geometrie der adhärenzten Vesikel wird über den gesamten Prozess als Kugel-Kalotte angenommen.

Die Mantelfläche einer Kugelkalotte ist entsprechend Abb.B.2 gegeben durch

$$A_{ges} = \pi(h^2 + 2r_{adh}^2) \quad (\text{B.25})$$

wobei  $r_{adh} = \sqrt{A_{adh}/\pi}$  das über die gesamte Prozessdauer konstanten Volumen  $V$  der Vesikel liefert eine Beziehung für die Höhe  $h$

$$0 = h^3 + 3r_{adh}^2 h - \frac{6}{\pi} V \quad (\text{B.26})$$

mit der singulären reellen Lösung nach [177]

$$h = \left( \frac{3}{\pi} V + \sqrt{r_{adh}^6 + \frac{9}{\pi^2} V^2} \right)^{\frac{1}{3}} - \frac{r_{adh}^2}{3} \left( \frac{3}{\pi} V + \sqrt{r_{adh}^6 + \frac{9}{\pi^2} V^2} \right)^{-\frac{1}{3}} \quad (\text{B.27})$$

Damit ist der Gesamtflächenzuwachs mit Gl.B.25 und Gl.B.27 eindeutig bestimmt.

## C. Methoden

### C.1. Monte-Carlo Simulationen

**Annahme und Modell** Zur Beschreibung von Lipidmembranen ist es möglich, das klassische Zwei-Zustands-Ising-Modell zu adaptieren und mit Monte Carlo Simulationen [178] auszuwerten [179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 52, 186]. Für eine eingehende Lektüre seien insbesondere [52, 186] empfohlen. Die Monte Carlo Methode ist nützlich, um den Gleichgewichtszustand eines Systems mit einer großen Anzahl von Teilchen zu bestimmen, ohne den gesamten Konfigurationsraum abtasten zu müssen. Dies ist somit ein eleganter Weg das thermodynamische Gleichgewicht eines Systems, hier einer Phospholipidmembran zu bestimmen [179].

In einer Computersimulation können nicht alle Zustände und Übergänge abgetastet werden. Deswegen wählt man einen zufälligen Weg durch den Konfigurationsraum. Die Kette der durchlaufenen Konfigurationen definieren eine Markovkette. Die Gesamtheit der durchlaufenen Konfigurationen folgt einer Verteilung  $f$ , die im hier vorliegenden Fall durch eine Boltzmannverteilung repräsentiert wird.

Im Detail dieser Simulation werden die zwei Monolayer als symmetrisch gekoppelt angesehen und damit Inter-Monolayer-Wechselwirkungen vernachlässigt. Lipide werden als ein Teilchen, mit diskreter Phasenübergangstemperatur, Schmelzenthalpie und charakteristischen Wechselwirkungen zu den nächsten Nachbarn, platziert auf einem festen Gitter, angenommen. Die beiden, den Schmelzpunkt bestimmenden Kohlenwasserstoffketten werden zusammengefasst und als eine einzelne betrachtet<sup>1</sup>. Die Lipide werden dabei auf einem starren, hexagonalen Gitter angenommen. Dies gilt streng nur für die gelförmige Phase, da die fluide Phase eher als Flüssigkeit zu betrachten ist, und somit keine langreichweitige Ordnung existiert. Dennoch wird das Schmelzverhalten durch die Kettenordnung dominiert, und der Entropiebeitrag des räumliche Ordnungsübergangs kann so vernachlässigt werden [179]. Weiter werden periodische Randbedingungen angenommen.

**Monte-Carlo-Schritte** Ein hexagonales Gitter wird zunächst zufällig mit Lipiden im fluiden und gelförmigen Zustand besetzt. Die Simulation besteht aus zwei Schritten: Zunächst wird im Schmelzschrift die Wahrscheinlichkeit eines Zustandswechsels abgeschätzt und dann durch Vergleich mit einer Zufallszahl angenommen. Die Diffusion in der Membran wird in einem Diffusionsschritt berücksichtigt. Dabei wird analog die Wahrscheinlichkeit des Platzwechsels zweier zufällig ausgewählter Lipide bestimmt und selektiv durchgeführt.

---

<sup>1</sup>Die Ketten können im „Pink Modell“ auch als unabhängig betrachtet werden [187]

### Schmelzschrift

1. Ein Lipid wird zufällig ausgewählt
2. Der Zustand des Lipids wird zunächst gewechselt (gel - fluid)
3. Die freie Enthalpiedifferenz wird berechnet
4. Berechnung der Wechselwahrscheinlichkeit nach dem Glauber-Algorithmus

$$p = \frac{b(T)}{1 + b(T)} \quad (\text{C.1})$$

5. Vergleich der Wechselwahrscheinlichkeit mit einer Zufallszahl  $Z \in [0, 1]$
6. Annehmen des Wechsels wenn  $p > Z$ , Rückwechsel des Zustandes wenn  $p \leq Z$

### Diffusionsschrift

1. Zufällige Auswahl von zwei Lipiden
2. Tausch der Gitterplätze beider Lipide
3. Berechnung der Enthalpiedifferenz zwischen beiden Konfigurationen
4. Berechnung der Tauschwahrscheinlichkeit  $n$  nach dem Glauber-Algorithmus
5. Vergleich der Tauschwahrscheinlichkeit  $n$  mit einer Zufallszahl  $Z$
6. Für  $n > Z$  Akzeptanz des Tausches, für  $n \leq Z$ , Rücktausch der Gitterplätze

Die Wärmekapazität des Systems kann nach dem Fluktuations-Dissipations-Theorem aus der Fluktuation der Enthalpie berechnet werden

$$c_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{k_B T^2} \quad (\text{C.2})$$

Die mittleren Schwankungen der Enthalpie werden aus der Enthalpieänderung in jedem Schritt  $i$   $\Delta H_i = \Delta H_Z + \Delta H_P$  bei einem Zustandswechsel  $\Delta H_Z$  bzw. Platzwechsel  $\Delta H_P$  berechnet, und es ergibt sich

$$\langle H \rangle^2 = \left[ \frac{1}{i} \sum_0^i H_i \right]^2, \quad \langle H^2 \rangle = \left[ \frac{1}{i} \sum_0^i H_i^2 \right] \quad (\text{C.3})$$

Eine Darstellung der Domänenstruktur erfolgt durch Visualisierung der Zustände mit der Hilfe von PovRay.

## Literaturverzeichnis

- [1] Simons, K. and Ikonen, E. FUNCTIONAL RAFTS IN CELL MEMBRANES. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
- [2] Edidin, M. THE STATE OF LIPID RAFTS: FROM MODEL MEMBRANES TO CELLS. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283 (2003).
- [3] Deans, J. P., Li, H., and Polyak, M. J. CD20-MEDIATED APOPTOSIS: SIGNALLING THROUGH LIPID RAFTS. *IMMUNOLOGY*. *Immunology* **107**, 167–182 (2002).
- [4] Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. J. LIPID RAFTS IN NEURONAL SIGNALING AND FUNCTION. *Trends Neurosci.* **25**, 412–427 (2002).
- [5] Thomas, J. L., Holowka, D., Baird, B., and Webb, W. W. LARGE-SCALE CO-AGGREGATION OF FLUORESCENT LIPID PROBES WITH CELL SURFACE PROTEINS. *J. Cell Biol.* **126**, 795–802 (1994).
- [6] Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. H. SPHINGOLIPID-CHOLESTEROL RAFTS DIFFUSE AS SMALL ENTITIES IN THE PLASMA MEMBRANE OF MAMMALIAN CELLS. *J. Cell Biol.* **148**, 997–1007 (2000).
- [7] Anderson, R. G. W. and Jacobson, K. A ROLE FOR LIPID SHELLS IN TARGETING PROTEINS TO CAVEOLAE, RAFTS, AND OTHER LIPID DOMAINS. *Science* **296**, 1821–1825 (2002).
- [8] Brown, D. A. and London, E. FUNCTIONS OF LIPID RAFTS IN BIOLOGICAL MEMBRANES. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111–136 (1998).
- [9] McConnell, H. M. and Vrljic, M. LIQUID-LIQUID IMMISCIBILITY IN MEMBRANES. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 469–492 (2003).
- [10] Radhakrishnan, A. and McConnell, H. CONDENSED COMPLEXES IN VESICLES CONTAINING CHOLESTEROL AND PHOSPHOLIPIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12662–12666 Sep (2005).
- [11] Veatch, S. L. and Keller, S. L. SEPARATION OF LIQUID PHASES IN GIANT VESICLES OF TERNARY MIXTURES OF PHOSPHOLIPIDS AND CHOLESTEROL. *Biophysical Journal* **85**, 3074–3083 (2003).
- [12] Schertler, G. F. X. SIGNAL TRANSDUCTION: THE RHODOPSIN STORY CONTINUED. *Nature* **453**, 292–293 May (2008).
- [13] Stokes, G. G. ON THE EFFECT OF THE INTERNAL FRICTION OF FLUIDS ON THE MOTION OF PENDULUMS. *Trans. Camb. Phil. Soc.* **9 Part II**, 8–106 (1851).
- [14] Saffman, P. G. and Delbrück, M. BROWNIAN-MOTION IN BIOLOGICAL-MEMBRANES.

- Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **72**, 3111–3113 (1975).
- [15] Hughes, B. D., Pailthorpe, B. A., and White, L. R. THE TRANSLATIONAL AND ROTATIONAL DRAG ON A CYLINDER MOVING IN A MEMBRANE. *Journal Of Fluid Mechanics* **110**, 349–372 (1981).
- [16] Happel, J. and Brenner, H. LOW REYNOLDS NUMBER HYDROSYNAMICS. Springer Netherland, (1965).
- [17] Petrov, E. P. and Schwille, P. TRANSLATIONAL DIFFUSION IN LIPID MEMBRANES BEYOND THE SAFFMAN-DELBRUCK APPROXIMATION. *Biophysical journal* **94** March (2008).
- [18] Klinger, J. F. and McConnell, H. M. BROWNIAN-MOTION AND FLUID-MECHANICS OF LIPID MONOLAYER DOMAINS. *Journal Of Physical Chemistry* **97**, 6096–6100 (1993).
- [19] Cicuta, P., Keller, S. L., and Veatch, S. L. DIFFUSION OF LIQUID DOMAINS IN LIPID BILAYER MEMBRANES. *Journal Of Physical Chemistry B* **111**, 3328–3331 (2007).
- [20] Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.-H. NANOTUBULAR HIGHWAYS FOR INTERCELLULAR ORGANELLE TRANSPORT. *Science* **303**, 1007–1010 Feb (2004).
- [21] Lee, C. and Chen, L. B. *Cell* **54**, 37 (1988).
- [22] Polishchuk, E. V., Pentima, A. D., Luini, A., and Polishchuk, R. S. MECHANISM OF CONSTITUTIVE EXPORT FROM THE GOLGI: BULK FLOW VIA THE FORMATION, PROTRUSION, AND EN BLOC CLEAVAGE OF LARGE TRANS-GOLGI NETWORK TUBULAR DOMAINS. *Mol Biol Cell* **14**, 4470–4485 Nov (2003).
- [23] Cuvelier, D., Dere, I., Bassereau, P., and Nassoy, P. COALESCENCE OF MEMBRANE TETHERS: EXPERIMENTS, THEORY AND APPLICATIONS. *Biophysical Journal* **88**, 2714–2726 (2005).
- [24] Evans, E., Bowman, H., Leung, A., Needham, D., and Tirrell, D. BIOMEMBRANE TEMPLATES FOR NANOSCALE CONDUITS AND NETWORKS. *Science* **273**, 933–935 Aug (1996).
- [25] Koster, G., VanDuijn, M., Hofs, B., and Dogterom, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100(15)**, 583 (2003).
- [26] Fygenson, D. K., Marko, J. F., and Libchaber, A. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4497 (1997).
- [27] Roux, A. and et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5394 (2002).
- [28] Waugh, R. E. *Biophys. J.* **38**, 29 (1982).
- [29] Heimburg, T. and Jackson, A. D. ON SOLITON PROPAGATION IN BIOMEMBRANES AND NERVES. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**, 9790–9795 (2005).
- [30] Heimburg, T., Pollokowski, D., Monnerjahn, C., and Possmayer, F. LIPID MELTING IN E-COLI MEMBRANES AND LUNG SURFACTANT. *Biophysical Journal* **84**, 197A–197A (2003).

- [31] Heimburg, T. and Jackson, A. D. THE THERMODYNAMICS OF GENERAL ANESTHESIA. *Biophysical Journal* **92**, 3159–3165 (2007).
- [32] Blicher, A., Wodzinska, K., Fidorra, M., Winterhalter, M., and Heimburg, T. THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF LIPID MEMBRANE PERMEABILITY, ITS QUANTIZED NATURE, AND THE INFLUENCE OF ANESTHETICS. *arXiv:0807.4825v1* (2008).
- [33] Lipowsky, R. and Sackmann, E., editors STRUCTURE AND DYNAMICS OF MEMBRANES. Elsevier Science B.V., (1995).
- [34] Heimburg, T. THERMAL BIOPHYSICS OF MEMBRANES. Wiley-VCH, Berlin, (2007).
- [35] Singer, S. J. and Nicolson, G. L. THE FLUID MOSAIC MODEL OF THE STRUCTURE OF CELL MEMBRANES. *Science* **175**, 720–31 (1972).
- [36] Janiak, M. J., Small, D. M., and Shipley, G. G. TEMPERATURE AND COMPOSITIONAL DEPENDENCE OF THE STRUCTURE OF HYDRATED DIMYRISTOYL LECITHIN. *J Biol Chem.* **254(13)**, 6068–6078 (1979).
- [37] Heimburg, T. THERMAL BIOPHYSICS OF MEMBRANES. Wiley-VCH Verlag Berlin GmbH, (2007).
- [38] Mouritsen, O. G. and Bloom, M. MATTRESS MODEL OF LIPID-PROTEIN INTERACTIONS IN MEMBRANES. *Biophys. J.* **46(2)**, 141–153 (1984).
- [39] Pike, L. J. LIPID RAFTS: BRINGING ORDER TO CHAOS. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667 (2003).
- [40] Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, L. A. LIPID RAFTS RECONSTITUTED IN MODEL MEMBRANES. *Biophys. J.* **80**, 1417–1428 (2001).
- [41] Samsonov, A. V., Mihalyov, I., and Cohen, F. CHARACTERIZATION OF CHOLESTEROL-SPHINGOMYELIN DOMAINS AND THEIR DYNAMICS IN BILAYER MEMBRANES. *Biophys. J.* **81**, 1486–1500 (2001).
- [42] Veatch, S. L. and Keller, S. L. LATERAL ORGANIZATION IN LIPID MEMBRANES CONTAINING CHOLESTEROL. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 268101 (2002).
- [43] Baumgart, T., Hess, S. T., and Webb, W. W. IMAGING COEXISTING FLUID DOMAINS IN BIOMEMBRANE MODELS COUPLING CURVATURE AND LINE TENSION. *Nature* (2003).
- [44] Ayuyan, A. and Cohen, F. S. PRODUCTS OF PHOTO-OXIDATION GREATLY PROMOTE THE FORMATION OF LARGE RAFTS IN BILAYER MEMBRANES. *Biophysical Journal* **88**, 412A–413A (2005).
- [45] Ayuyan, A. G. and Cohen, F. S. LIPID PEROXIDES PROMOTE LARGE RAFTS: EFFECTS OF EXCITATION OF PROBES IN FLUORESCENCE MICROSCOPY AND ELECTROCHEMICAL REACTIONS DURING VESICLE FORMATION. *Biophysical Journal* **91**, 2172–2183 (2006).
- [46] Esposito, C., Tian, A., Melamed, S., Johnson, C., Tee, S.-Y., and Baumgart, T. FLICKER SPECTROSCOPY OF THERMAL LIPID BILAYER DOMAIN BOUNDARY FLUCTUATIONS. *Biophys. J.* , biophysj.107.111922 (2007).

- [47] Sackmann, E. SUPPORTED MEMBRANES: SCIENTIFIC AND PRACTICAL APPLICATIONS. *Science* **271**, 43–48 Jan (1996).
- [48] Sackmann, E. and Tanaka, M. SUPPORTED MEMBRANES ON SOFT POLYMER CUSHIONS: FABRICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS. *Trends Biotechnol* **18**, 58–64 Feb (2000).
- [49] Montal, M. and Mueller, P. FORMATION OF BIOMOLECULAR MEMBRANES FROM LIPID MONOLAYERS AND A STUDY OF THEIR ELECTRICAL PROPERTIES. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3561–3566 (1972).
- [50] Angelova, M. I., Soleau, S., Meleard, P., Faucon, J. F., and Bothorel, P. PREPARATION OF GIANT VESICLES BY EXTERNAL AC ELECTRIC FIELDS. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **89**, 127–131 (1992).
- [51] Wunderlich, B. ROLE OF THERMODYNAMICS FOR THE PORE FORMATION IN MEMBRANES. Master's thesis, Universität Augsburg, (2007).
- [52] Seeger, H. KINETICS OF DOMAIN FORMATION PROCESSES IN LIPID MEMBRANES. PhD thesis, University of Copenhagen, (2006).
- [53] Evans, E. and Yeung, A. *Chem. Phys. Lipids* **73**, 39 (1994).
- [54] Powers, T. R., Huber, G., and Goldstein, R. E. *Phys. Rev. E* **65**, 041901 (2002).
- [55] Krüger, P. and Lösche, M. MOLECULAR CHIRALITY AND DOMAIN SHAPES IN LIPID MONOLAYERS ON AQUEOUS SURFACES. *Phys. Rev. E* **62**, 7031–7043 November (2000).
- [56] Heckl, W. M., Lösche, M., Cadenhead, D. A., and Möhwald, H. ELECTROSTATICALLY INDUCED GROWTH OF SPIRAL LIPID DOMAINS IN THE PRESENCE OF CHOLESTEROL. *European Biophysics Journal* **14**, 11–17 (1986).
- [57] Langer, J. S. CHIRAL SOLIDIFICATION OF A PHOSPHOLIPID MONOLAYER. *Physica Scripta*. **T9**, 119–122 (1985).
- [58] Batchelor, G. AN INTRODUCTION TO FLUID DYNAMICS. Cambridge University Press, (1967).
- [59] Gardiner, C. HANDBOOK OF STOCHASTIC METHODS. Springer Verlag, (1983).
- [60] Risken, H. THE FOKKER-PLANCK EQUATION-METHODS OF SOLUTION AND APPLICATIONS. Haken, H., (1989).
- [61] Viet Bui, A. and Nguyen, M. H. PREDICTION OF VISCOSITY OF GLUCOSE AND CALCIUM CHLORIDE SOLUTIONS. *Journal of Food Engineering* **62(4)**, 345–349 (2004).
- [62] Naji, A., Levine, A. J., and Pincus, P. A. CORRECTIONS TO THE SAFFMAN-DELBRUCK MOBILITY FOR MEMBRANE BOUND PROTEINS. *Biophys J* **93**, L49–L51 Dec (2007).
- [63] Chaussemy, G. J. *Phys. Lett.* **40**, 307 (1979).
- [64] van Meer, G. and Simons, K. THE FUNCTION OF TIGHT JUNCTIONS IN MAINTAINING DIFFERENCES IN LIPID COMPOSITION BETWEEN THE APICAL AND THE BASOLATERAL CELL SURFACE DOMAINS OF MDCK CELLS. *EMBO J* **5**, 1455–1464 Jul (1986).
- [65] Gunton, J. D., San Miguel, M., and Sahni, P. IN PHASE TRANSITIONS AND CRITICAL

- PHENOMENA VOL. 8. Academic, London, (1983).
- [66] Siggia, E. D. LATE STAGES OF SPINODAL DECOMPOSITION IN BINARY MIXTURES. *Physical Review A (General Physics)* **20**, 595–605 (1979).
- [67] Mazenko, G. F. GROWTH KINETICS FOR A SYSTEM WITH A CONSERVED ORDER PARAMETER. *Physical Review E (Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics)* **50**, 3485–3501 (1994).
- [68] White, W. R. and Wiltzius, P. REAL SPACE MEASUREMENT OF STRUCTURE IN PHASE SEPARATING BINARY FLUID MIXTURES. *Physical Review Letters* **75**, 3012–3015 (1995).
- [69] Cahn, J. W. and Hilliard, J. E. FREE ENERGY OF A NONUNIFORM SYSTEM. III. NUCLEATION IN A TWO-COMPONENT INCOMPRESSIBLE FLUID. *The Journal of Chemical Physics* **31**, 688–699 (1959).
- [70] Cahn, J. W. *Acta Metall.* **14**, 1685 (1966).
- [71] Koch, S. W., Desai, R. C., and Abraham, F. F. *Phys. Rev. A* **26**, 1015 (1968).
- [72] van der Waals, J. D. STOECHIOM. VERWANDTSCHAFTL. *Z. Phys. Chem.* **13**, 657 (1894).
- [73] Haasen, P. *PHYSIK METALLKUNDE.* (1984).
- [74] Furukawa, H. DYNAMICS OF PHASE SEPARATION OF A SIMPLE FLUID MIXTURE: COMPARISON BETWEEN MOLECULAR DYNAMICS AND NUMERICAL INTEGRATION OF THE PHENOMENOLOGICAL EQUATION. *Phys. Rev. E* **55**, 1150–1161 Jan (1997).
- [75] Wong, N.-C. and Knobler, C. M. LIGHT-SCATTERING STUDIES OF PHASE SEPARATION IN ISOBUTYRIC ACID + WATER MIXTURES: HYDRODYNAMIC EFFECTS. *Phys. Rev. A* **24**, 3205–3211 Dec (1981).
- [76] Vladimirova, N., Malagoli, A., and Mauri, R. TWO-DIMENSIONAL MODEL OF PHASE SEGREGATION IN LIQUID BINARY MIXTURES. *Phys. Rev. E* **60**, 6968–6977 Dec (1999).
- [77] Vladimirova, N., Malagoli, A., and Mauri, R. DIFFUSION-DRIVEN PHASE SEPARATION OF DEEPLY QUENCHED MIXTURES. *Phys. Rev. E* **58**, 7691–7699 Dec (1998).
- [78] Hohenberg, P. C. and Halperin, B. I. THEORY OF DYNAMIC CRITICAL PHENOMENA. *Rev. Mod. Phys.* **49**, 435–479 Jul (1977).
- [79] Mauri, R., Shinnar, R., and Triantafyllou, G. SPINODAL DECOMPOSITION IN BINARY MIXTURES. *Phys. Rev. E* **53**, 2613–2623 Mar (1996).
- [80] Veatch, S. L., Gawrisch, K., and Keller, S. L. OBSERVING IMMISCIBLE LIQUID PHASES IN LIPID BILAYERS CONTAINING CHOLESTEROL BY FLUORESCENCE MICROSCOPY AND NMR. *Biophysical Journal* **84**, 371A–371A (2003).
- [81] Veatch, S. L. and Keller, S. L. LATERAL PHASE SEPARATION OF DOMAINS (RAFTS) IN MODEL MONOLAYER AND BILAYER SYSTEMS. *Biophysical Journal* **82**, 521A–521A (2002).
- [82] Yanagisawa, M., Imai, M., Masui, T., Komura, S., and Ohta, T. GROWTH DYNAMICS OF DOMAINS IN TERNARY FLUID VESICLES. *Biophysical Journal* **92**, 115–125 (2007).
- [83] Saeki, D., Hamada, T., and Yoshikawa, K. DOMAIN-GROWTH KINETICS IN A CELL-

- SIZED LIPOSOME. *Journal Of The Physical Society Of Japan* **75** (2006).
- [84] Laradji, M. and Sunil Kumar, P. B. DYNAMICS OF DOMAIN GROWTH IN SELF-ASSEMBLED FLUID VESICLES. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 198105 Nov (2004).
- [85] Levine, A. J., Liverpool, T. B., and MacKintosh, F. C. DYNAMICS OF RIGID AND FLEXIBLE EXTENDED BODIES IN VISCOUS FILMS AND MEMBRANES. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 038102 Jul (2004).
- [86] Burada, S. P., Hänggi, P., Marchesoni, F., Schmid, G., and Talkner, P. DIFFUSION IN DEFINED GEOMETRIES. *arXiv:0808.2345v1* (2008).
- [87] Honerkamp-Smith, A. R., Cicuta, P., Collins, M. D., Veatch, S. L., den Nijs, M., Schick, M., and Keller, S. L. LINE TENSIONS, CORRELATION LENGTHS, AND CRITICAL EXPONENTS IN LIPID MEMBRANES NEAR CRITICAL POINTS. *Biophysical Journal* **96**, 236–246 (2008).
- [88] Jasnow, D. and Vinals, J. COARSE-DGRAINED DESCRIPTION OF THERMO-CAPILLARY FLOW. *Phys. Fluids* **8**(3), 660 (1996).
- [89] Rädler, J. O., Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C. R. STRUCTURE OF DNA-CATIONIC LIPOSOME COMPLEXES: DNA INTERCALATION IN MULTILAMELLARE MEMBRANES IN DISTINCT INTERHELICAL PACKING REGIMES. *Science* **275**, 810–814 (1997).
- [90] Salditt, T., Koltover, I., Rädler, J. O., and Safinya, C. R. TWO-DIMENSIONAL SMECTIC ORDERING OF LINEAR DNA CHAINS IN SELF-ASSEMBLED DNA-CATIONIC LIPOSOME MIXTURES. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 2582–2585 (1997).
- [91] Sackmann, E. STRUCTURE AND DYNAMICS OF MEMBRANES. FROM VESICLES TO CELLS. *Amsterdam, Elsevier* (1996).
- [92] Heimburg, T. MONTE CARLO SIMULATIONS OF LIPID BILAYERS AND LIPID PROTEIN INTERACTIONS IN THE LIGHT OF RECENT EXPERIMENTS. *Current Opinion In Colloid & Interface Science* **5**, 224–231 (2000).
- [93] Lekkerkerker, H. N. W. *Physica A* **167**, 384 (1990).
- [94] Winterhalter, M. and Helfrich, W. EFFECT OF SURFACE CHARGE ON THE CURVATURE ELASTICITY OF MEMBRANES. *J. Phys. Chem.* **92**, 6865 (1988).
- [95] Schneider, M. F., Marsh, D., Jahn, W., Kloesgen, B., and Heimburg, T. NETWORK FORMATION OF LIPID MEMBRANES: TRIGGERING STRUCTURAL TRANSITION BY CHAIN MELTING. *PNAS* **96**, 14312–14317 (1999).
- [96] Nagle, J. F. THEORY OF LIPID MONOLAYER AND BILAYER PHASE TRANSITIONS: EFFECT OF HEADGROUP INTERACTIONS. *J Membr Biol* **27**, 233–250 (1976).
- [97] Odenbach, D. S. IN EFFEKTE DER PHYSIK UND IHRE ANWENDUNGEN. Verlag Harri Deutsch.
- [98] Frolov, V. A. J., Chizmadzhev, Y. A., Cohen, F. S., and Zimmerberg, J. 'ENTROPIC TRAPS' IN THE KINETICS OF PHASE SEPARATION IN MULTICOMPONENT MEMBRANES STABILIZE NANODOMAINS. *Biophys J.* **91**, 189–205 (2006).
- [99] Macedo, P. B. and Litovitz, T. A. ON RELATIVE ROLES OF FREE VOLUME AND AC-

- TIVATION ENERGY IN VISCOSITY OF LIQUIDS. *Journal of Chemical Physics* **42(1)**, 245–256 (1965).
- [100] Cohen, M. H. and Turnbull, D. MOLECULAR TRANSPORT IN LIQUIDS AND GLASSES. *The Journal of Chemical Physics* **31(5)**, 1164–1169 (1959).
- [101] Galla, H. J. and Sackmann, E. LATERAL DIFFUSION IN HYDROPHOBIC REGION OF MEMBRANES - USE OF PYRENE EXCIMERS AS OPTICAL PROBES. *Biochimica Et Biophysica Acta* **339(1)**, 103–115 (1974).
- [102] Galla, H. J., Hartmann, W., Theilen, U., and Sackmann, E. TWO-DIMENSIONAL PASSIVE RANDOM-WALK IN LIPID BILAYERS AND FLUID PATHWAYS IN BIOMEMBRANES. *Journal of Membrane Biology* **48(3)**, 215–236 (1979).
- [103] Peters, R. and Beck, K. TRANSLATIONAL DIFFUSION IN PHOSPHOLIPID MONOLAYERS MEASURED BY FLUORESCENCE MICROPHOTOLYSIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80(23)**, 7183–7187 (1983).
- [104] Almeida, P. F., Vaz, W. L., and Thompson, T. E. LATERAL DIFFUSION IN THE LIQUID PHASES OF DIMYRISTOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE/CHOLESTEROL LIPID BILAYERS: A FREE VOLUME ANALYSIS. *Biochemistry* **31**, 6739–6747 Jul (1992).
- [105] Almeida, P. F. F. and Vaz, W. L. C. LATERAL DIFFUSION IN MEMBRANES. Elsevier, Amsterdam., (1995).
- [106] Ke, P. C. and Naumann, C. A. SINGLE MOLECULE FLUORESCENCE IMAGING OF PHOSPHOLIPID MONOLAYERS AT THE AIR-WATER INTERFACE. *Langmuir* **17(12)**, 3727–3733 (2001).
- [107] Doolittle, A. K. STUDIES IN NEWTONIAN FLOW .3. THE DEPENDENCE OF THE VISCOSITY OF LIQUIDS ON MOLECULAR WEIGHT AND FREE SPACE (IN HOMOLOGOUS SERIES). *Journal of Applied Physics* **23(2)**, 236–239 (1952).
- [108] Eu, B. C. TRANSPORT COEFFICIENTS OF FLUIDS. Springer Berlin Heidelberg, (2006).
- [109] Komura, S., Shimokawa, N., and Andelman, D. TENSION-INDUCED MORPHOLOGICAL TRANSITION IN MIXED LIPID BILAYERS. *Langmuir* **22**, 6771–6774 Aug (2006).
- [110] Rozovsky, S., Kaizuka, Y., and Groves, J. T. FORMATION AND SPATIO-TEMPORAL EVOLUTION OF PERIODIC STRUCTURES IN LIPID BILAYERS. *J Am Chem Soc* **127**, 36–37 Jan (2005).
- [111] Kapur, N. and Gaskell, P. G. MORPHOLOGY AND DYNAMICS OF DROPLET COALESCENCE ON A SURFACE. *Phys. Rev. E* **75**, 056315 (2007).
- [112] Menchaca-Rocha, A., Martinez-Davalos, A., and Nunez, R. COALESCENCE OF LIQUID DROPS BY SURFACE TENSION. *Phys. Rev. E* **63**, 046309 (2001).
- [113] Aarts, D. G. A. L., Lekkerkerker, H. N. W., Guo, H., Wegdam, G. H., and Bonn, D. HYDRODYNAMICS OF DROPLET COALESCENCE. *PRL* **95**, 164503 (2005).
- [114] Dobereiner, H. G., Kas, J., Noppl, D., Sprenger, I., and Sackmann, E. BUDDING AND FISSION OF VESICLES. *Biophys. J.* **65(4)**, 1396–1403 (1993).
- [115] Sackmann, E. and Bruinsma, R. F. CELL ADHESION AS WETTING TRANSITION? *Chem-*

- physchem.* **3(3)**, 262–269 (2002).
- [116] Seifert, U. and Lipowsky, R. HANDBOOK OF BIOLOGICAL PHYSICS-STRUCTURE AND DYNAMICS OF MEMBRANES. Elsevier Science B.V., (1995).
- [117] Dobereiner, H. G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U., and Wortis, M. MAPPING VESICLE SHAPES INTO THE PHASE DIAGRAM: A COMPARISON OF EXPERIMENT AND THEORY, (1996).
- [118] Neher, E. and Sakmann, B. SINGLE-CHANNEL CURRENTS RECORDED FROM MEMBRANE OF DENERVATED FROG MUSCLE-FIBERS. *Nature* **260**, 799–802 (1976).
- [119] Antonov, V. F., Petrov, V. V., Molnar, A. A., Predvoditelev, D. A., and Ivanov, A. S. THE APPEARANCE OF SINGLE-ION CHANNELS IN UNMODIFIED LIPID BILAYER MEMBRANES AT THE PHASE TRANSITION TEMPERATURE. *Nature* **283**, 585–586 (1980).
- [120] Lipowsky, R. BUDDING OF MEMBRANES INDUCED BY INTRAMEMBRANE DOMAINS. *J. Phys. II France* **2**, 1825–1840 (1992).
- [121] Lipowsky, R. DOMAIN-INDUCED BUDDING OF FLUID MEMBRANES. *Biophys. J.* **64**, 1133–1138 (1993).
- [122] Jülicher, R. and Lipowsky, R. DOMAIN INDUCED BUDDING OF VESICLES. *Phys. Rev. Lett.* **70**, 2964 (1993).
- [123] Staneva, G., Seigneuret, M., Koumanova, K., Trugnan, G., and Angelova, M. I. DETERGENTS INDUCE RAFT-LIKE DOMAINS BUDDING AND FISSION FROM GIANT UNILAMELLAR HETEROGENEOUS VESICLES A DIRECT MICROSCOPY OBSERVATION. *Chemistry and Physics of Lipids* **136** (1), 55–66 (2005).
- [124] Bacia, K., Schwille, P., and Kurzchalia, T. STEROL STRUCTURE DETERMINES THE SEPARATION OF PHASES AND THE CURVATURE OF THE LIQUID-ORDERED PHASE IN MODEL MEMBRANES. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3272–3277 Mar (2005).
- [125] Allain, J.-M., Storm, C., Roux, A., Amar, M. B., and Joanny, J.-F. FISSION OF A MULTIPHASE MEMBRANE TUBE. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 158104 Oct (2004).
- [126] Chen, C.-M., Higgs, P. G., and MacKintosh, F. C. THEORY OF FISSION FOR TWO-COMPONENT LIPID VESICLES. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 1579–1582 Aug (1997).
- [127] Canham, P. THE MINIMUM ENERGY OF BENDING AS A POSSIBLE EXPLANATION OF THE BICONCAVE SHAPE OF THE HUMAN RED BLOOD CELL. *J. Theor Biol.* **26(1)**, 61–81 (1970).
- [128] Helfrich, W. *Z. Naturforsch.* **28c**, 693 (1973).
- [129] Evans, E. A. BENDING RESISTANCE AND CHEMICALLY INDUCED MOMENTS IN MEMBRANE BILAYERS. *Biophys. J.* **14(12)**, 923–931 (1974).
- [130] Miao, L., Seifert, U., Wortis, M., and Döbereiner, H.-G. BUDDING TRANSITIONS OF FLUID-BILAYER VESICLES: THE EFFECT OF AREA-DIFFERENCE ELASTICITY. *Phys. Rev. E* **49**, 5389–5407 Jun (1994).
- [131] Dobereiner, H. G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U., and Wortis, M. MAPPING VESICLE SHAPES INTO THE PHASE DIAGRAM: A COMPARISON OF EXPERIMENT AND THEORY,

- (1996).
- [132] Bongrand, P. PHYSICAL BASIS OF CELL-CELL ADHESION. CRC Press, (1988).
- [133] Sackmann, E. SUPPORTED MEMBRANES: SCIENTIFIC AND PRACTICAL APPLICATIONS. *Science* **271(5245)**, 43–48 (1996).
- [134] Guttenberg, Z., Lorz, B., and Sackmann, E. FIRST-ORDER TRANSITION BETWEEN ADHESION STATES IN A SYSTEM MIMICKING CELL-TISSUE INTERACTION. *Europhys Lett* **54(6)**, 826–832 (2001).
- [135] Lipowsky, R. and Seifert, U. ADHESION OF MEMBRANES: A THEORETICAL PERSPECTIVE. *Langmuir* **8**, 1867 (1991).
- [136] Lipowsky, R. and Seifert, U. ADHESION OF VESICLES AND MEMBRANES. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **202(1)**, 17 – 25 (1991).
- [137] Seifert, U. ADHESION OF VESICLES IN TWO DIMENSIONS. *Physical Review E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, & Related Interdisciplinary Topics* **43(12)**, 6803–6814 (1991).
- [138] Gruhn, T. and Lipowsky, R. TEMPERATURE DEPENDENCE OF VESICLE ADHESION. *Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics)* **71(1)**, 011903 (2005).
- [139] Gruhn, T., Franke, T., Dimova, R., and Lipowsky, R. NOVEL METHOD FOR MEASURING THE ADHESION ENERGY OF VESICLES. *Langmuir* **23**, 5423–5429 (2007).
- [140] Brochard-Wyart, F., de Gennes, P. G., and Sandre, O. TRANSIENT PORES IN STRETCHED VESICLES: ROLE OF LEAK-OUT. *Physica A* **278**, 32–51 (2000).
- [141] Sandre, O., Moreaux, L., and Brochard-Wyart, F. DYNAMICS OF TRANSIENT PORES IN STRETCHED VESICLES. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **96**, 10591–10596 (1999).
- [142] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P. H., and Brochard-Wyart, F. CASCADES OF TRANSIENT PORES IN GIANT VESICLES: LINE TENSION AND TRANSPORT. *Biophysical Journal* **84**, 1734–1749 (2003).
- [143] Karatekin, E., Sandre, O., and Brochard-Wyart, F. TRANSIENT PORES IN VESICLES. *Polymer International* **52**, 486–493 (2003).
- [144] Portet, T., Camps i Febrer, F., Escoffre, F.-M., Favard, C., Rols, M.-P., and Dean, D. S. VISUALIZATION OF LIPID EXPULSION DURING THE SHRINKAGE OF GIANT VESICLES UNDER ELECTROPULSATION. *arXiv:0805.3600v1* (2008).
- [145] Bar-Ziv, R., Frisch, T., and Moses, E. ENTROPIC EXPULSION IN VESICLES. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 3481–3484 Nov (1995).
- [146] Voinova, M. V. THE THEORY OF MEMBRANE "VITRIFICATION". *Thermochimica Acta* **280**, 465–477 (1996).
- [147] Kozlov, M. M. and Markin, V. S. A THEORY OF OSMOTIC LYSIS OF LIPID VESICLES. *Biologicheskie Membrany* **1**, 73–90 (1984).
- [148] Grabitz, P., Ivanova, V. P., and Heimburg, T. RELAXATION KINETICS OF LIPID MEMBRANES AND ITS RELATION TO THE HEAT CAPACITY. *Biophysical Journal* **82**, 299–309

- (2002).
- [149] Sens, P. DYNAMICS OF NONEQUILIBRIUM MEMBRANE BUD FORMATION. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 108103 Sep (2004).
- [150] Kostur, M., Schindler, M., Talkner, P., and Hänggi, P. CHIRAL SEPARATION IN MICROFLOWS. *Phys Rev Lett* **96**, 014502 Jan (2006).
- [151] van de Meent, J.-W., Tuval, I., and Goldstein, R. E. NATURE'S MICROFLUIDIC TRANSPORTER: ROTATIONAL CYTOPLASMIC STREAMING AT HIGH PÉCLET NUMBERS. *Phys Rev Lett* **101**, 178102 Oct (2008).
- [152] Rapapa, N. P. and Bray, A. J. DYNAMICS OF PHASE SEPARATION UNDER SHEAR: A SOLUBLE MODEL. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 3856–3859 Nov (1999).
- [153] Onuki, A. EFFECTS OF SHEAR FLOW AND VISCOSITY DIFFERENCE ON PHASE SEPARATION. *International Journal of Thermophysics* **16(2)**, 381–390 (2005).
- [154] Lasic, D. D., Joannic, R., Keller, B. C., Frederik, P. M., and Auvray, L. SPONTANEOUS VESICULATION. *Adv Colloid Interface Sci* **89-90**, 337–349 Jan (2001).
- [155] Folch, J., Lees, M., and Stanely, G. H. S. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *J Biol Chem* **226**, 497–509 May (1957).
- [156] Boheim, G., Hanke, W., and Eibl, H. LIPID TRANSITION IN PLANAR BILAYER MEMBRANE AND ITS EFFECT ON CARRIER-ANDPORE-MEDIATED ION TRANSPORT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3403–3407 (1980).
- [157] Cannon, B., M., Hermansson, S., Gyorke, P., Somerharju, J., Virtanen, A., and Cheng, K. H. REGULATION OF CALCIUM CHANNEL ACTIVITY BY LIPID DOMAIN FORMATION IN PLANAR LIPID BILAYERS. *Biophys J.* **85**, 933–942. (2003).
- [158] Papahdjopoulos, D., Jacobsen, K., Nir, S., and Isac, T. PHASE TRANSITIONS IN PHOSPHOLIPID VESICLES. *Biochimica et Biophysica Acta* **311**, 330–348 (1973).
- [159] Cruziero-Hansson, L. and Mouritsen, O. G. PASSIVE ION PERMEABILITY OF LIPID MEMBRANES MODELED VIA LIPID-DOMAIN INTERFACIALAREA. *Biochimica and Biophysica Acta* **944**, 63–72 (1988).
- [160] Yafuso, M., Kennedy, S. J., and Freeman, A. R. SPONTANEOUS CONDUCTANCE CHANGES, MULTILEVEL CONDUCTANCE STATES AND NEGATIVE DIFFERENTIAL RESISTANCE IN OXIDIZED CHOLESTEROL BLACK LIPID MEMBRANES. *J. Membrane Biol.* **17(1)**, 201–212 (1974).
- [161] Kaufmann, K. and Silman, I. THE INDUCTION OF ION CHANNELS THROUGH EXCITABLE MEMBRANES BY ACETYLCHOLINE. *Naturwissenschaften* **67**, 608–610 (1980).
- [162] Gögelein, H. and Koepsell, H. CHANNELS IN PLANAR BILAYERS MADE FROM COMMERCIALLY AVAILABLE LIPIDS. *Pflugers Arch.* **401(4)**, 433–434 (1984).
- [163] Antonov, V., Shevchenko, E., Kozhomkulov, E., Monar, A., and Smirnova, E. CAPACITIVE AND IONIC CURRENTS IN BLM FROM PHOSPHATDIC ACID IN CA<sup>2+</sup>-INDUCEDPHASE TRANSITION. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

- 133**, 1098–1103 (1985).
- [164] Antonov, V. F., Anosov, A. A., Norik, V. P., and Smirnova, E. Y. SOFT PERFORATION OF PLANAR BILAYER MEMBRANES OF DIPLAMITOYLPHOSPHATDYLCHOLINEAT THE TEMPERATURE OF THE PHASE TRANSITION FROM THE LIQUID CHRISTALLINETO THE GEL STATE. *European Biophysics Journal* **34**, 155–162 (2005).
- [165] Chen, C., Syme, S. W., Robinson, M. P., and Evans, J. A. MEMBRANE ELEXTROPORATION THEORIES: A REVIEW. *Med. Biol. Comput.* **44**, 5–14 (2006).
- [166] Glaser, R. W., Leikin, S. L., Chernomordik, L. V., Pastushenko, V. F., and Sokiroko, A. I. REVERSIBLE ELECTRICAL BREAKTDOWN OF LIPID BILAYERS: FORMATION AND EVOLUTION OF PORES. *Biochimica and Biophys. Acta* **940**, 275–287 (1988).
- [167] Weaver, J. C. and Chizmandzhev, Y. A. THEORY OF ELECTROPORATION: A REVIEW. *Bioelectrochem. Bionerg.* **41**, 135–160 (1996).
- [168] Joshi, R. P. and Schoenbach, K. H. MECHANISM FOR MEMBRANE ELECTROPORATION IRREVERSIBILITY UNDER HIGH-INTENSITY, ULTRASHORT ELECTRICAL PULSE CONDITIONS. *Phys. Rev. E* **66**, 052901 (2002).
- [169] Joshi, R. P., Hu, Q., and Schoenbach, K. H. IMPROVED ENERGY MODEL FOR MEMBRANE ELECTROPORATION IN BIOLOGICAL CELLS SUBJECTED TO ELECTRICAL PULSES. *Phys. Rev. E* **65**, 041920 (2002).
- [170] Farago, O. and Oded Farago, C. PORE FORMATION IN FLUCTUATING MEMBRANES. *The Journal of Chemical Physics* **122**, 044901 (2005).
- [171] Idzko, A.-L. PERMEABILITÄTSMESSUNGEN AN LIPIDMEMBRANEN NAHE DER PHASENUMWANDLUNG. Master's thesis, Universität Augsburg, (2007).
- [172] Nagle, J. F. and Scott, H. L. LATERAL COMPRESSIBILITY OF LIPID MONO AND BILAYERS: THEORY OF MEMBRANEPERMEABILITY. *Biochimica et Biophysica Acta* **513**, 236–243 (1978).
- [173] Seeger, H. M., Gudmundsson, M. L., and Heimburg, T. HOW ANESTHETICS, NEUROTRANSMITTERS, AND ANTIBIOTICS INFLUENCE THE RELAXATION PROCESSES IN LIPID MEMBRANES. *Journal Of Physical Chemistry B* **111**, 13858–13866 (2007).
- [174] Onsager, L. RECIPROCAL RELATIONS IN IRREVERSIBLE PROCESSES I. *Phys. Rev.* **37**, 405–426 (1931).
- [175] Onsager, L. RECIPROCAL RELATIONS IN IRREVERSIBLE PROCESSES II. *Phys. Rev.* **38**, 2265–2279 (1931).
- [176] Lekkerkerker, H. N. W. CONTRIBUTION OF THE ELECTRIC DOUBLE LAYER TO THE CURVATURE ELASTICITY OF CHARGED AMBIPHILIC MONOLAYERS. *Physica A* **159**, 319–32 (1989).
- [177] Bronstein, I. N., Semendjajew, K. A., Musiol, G., and Mühlig, H. TASCHENBUCH DER MATHEMATIK. Verlag Harri Deutsch.
- [178] Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., and Teller, A. H. EQUATION OF STATE CALCULATIONS BY FAST COMPUTING MACHINES. *The Journal of Chemical*

- Physics* **21(6)**, 1087–1092 (1953).
- [179] Doniach, S. THERMODYNAMIC FLUCTUATIONS IN PHOSPHOLIPID BILAYERS. *The Journal of Chemical Physics* **68(11)**, 4912–4916 (1978).
- [180] Mouritsen, O. G., Boothroyd, A., Harris, R., Jan, N., Lookman, T., MacDonald, L., Pink, D. A., and Zuckermann, M. J. COMPUTER SIMULATION OF THE MAIN GEL-FLUID PHASE TRANSITION OF LIPID BILAYERS. *The Journal of Chemical Physics* **79(4)**, 2027–2041 (1983).
- [181] Mouritsen, O. G. and Zuckermann, M. J. SOFTENING OF LIPID BILAYERS. *European Biophysics Journal* **12(2)**, 75–86 (1985).
- [182] Ivanova, V. P. and Heimburg, T. HISTOGRAM METHOD TO OBTAIN HEAT CAPACITIES IN LIPID MONOLAYERS, CURVED BILAYERS, AND MEMBRANES CONTAINING PEPTIDES. *Physical Review E* **63** (2001).
- [183] Ivanova, V. P., Makarov, I. M., Schäffer, T. E., and Heimburg, T. ANALYZING HEAT CAPACITY PROFILES OF PEPTIDE-CONTAINING MEMBRANES: CLUSTER FORMATION OF GRAMICIDIN A. *Biophysical Journal* **84**, 2427–2439 (2003).
- [184] Hac, A. E., Seeger, H. M., Fidorra, M., and Heimburg, T. DIFFUSION IN TWO-COMPONENT LIPID MEMBRANES - A FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY AND MONTE CARLO SIMULATION STUDY. *Biophysical Journal* **88**, 317–333 (2005).
- [185] Seeger, H., Fidorra, M., and Heimburg, T. DOMAIN SIZE AND FLUCTUATIONS AT DOMAIN INTERFACES IN LIPID MIXTURES. *Macromolecular Symposia (Wiley)* **219**, 85–96 (2005).
- [186] Blicher, A. PERMEABILITY STUDIES OF LIPID VESICLES BY FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY AND MONTE CARLO SIMULATIONS. Master's thesis, University of Copenhagen, (2007).
- [187] Pink, D. A., Green, T. J., and Chapman, D. RAMAN SCATTERING IN BILAYERS OF SATURATED PHOSPHATIDYLCHOLINES. EXPERIMENT AND THEORY. *Biochemistry* **19(2)**, 349–356 (1980).

## Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Achim Wixforth ganz herzlich bedanken, der mir stets mit Rat und Tat in jeder Situation zur Seite stand und mir half auch schwierige Zeiten zu meistern.

Daneben gilt mein Dank Dr. Matthias Schneider, der mich als Festkörperphysiker für das spannende Thema der Biophysik begeisterte. Ich habe im Verlauf der letzten Jahre viel von ihm lernen können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Armin Reller für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Karl-Heinz Höck, der mir durch viele sehr ergiebige Diskussionen half theoretische Fragestellungen zu lösen, aber auch, weil er mich gerade zum Ende meiner Arbeit darüber hinaus motivierte und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiter möchte ich mich bei Prof. Thomas Heimburg bedanken, der mich während meiner Zeit am Nils-Bohr-Institut begleitete und mir neue Sichtweisen auf die Biophysik eröffnete.

Der „Bayerischen Forschungsstiftung“ möchte ich besonders danken, da sie mir durch das gewährte Stipendium die Promotion zusammen mit dem spannenden Auslandsaufenthalt möglich machte.

Gedankt sei auch Dr. Thomas Franke für eine gute Zusammenarbeit und viele Diskussionen.

Ein großer Dank gilt Dr. Oliver Klink für die Programmierung der Tracking-Software, welche für die Arbeit von großem Wert war.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Dr. Peter Talkner und Dr. Gerhard Schmid, die mir bei theoretischen Fragen immer gerne behilflich waren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Ferdinand Haider für viele produktive Diskussionen.

Ein großer Dank gilt Alexander Hupfer, der mir bei technischen und sonstigen Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch möchte ich mich herzlich bei Andreas Spörhase und Sidonie Lieber bedanken, die mich ebenfalls bei technischen, aber auch bei allen anderen Fragen immer gerne unterstützten. Andreas nahm auch den weiten Weg nach Kopenhagen auf sich um mir ein Stück Heimat zu bringen.

Ebenso möchte ich mich bei Anna-Lena Idzko und Bengt Wunderlich für unseren gemeinsamen Weg in die Geheimnisse der Biophysik bedanken. Ein großer Dank gilt Andreas Schönberger, der mir eine große Hilfe war und mit dem es mir sehr viel Freude gemacht hat zusammen zu arbeiten.

Matthias Knoll und Mike Krispin sei gedankt, dafür dass sie meine Arbeit über *Fettklumpen* gründlich gelesen haben und mir mit produktiver Kritik zur Seite standen. Gleiches gilt für Josef Griesbauer und Stefan Nuschele, für die das Thema nicht ganz so fremd war. Insbesondere möchte ich mich bei Matthias bedanken, als gutem Freund bei meinem Weg durch das Studium.

Mein Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern der Biophysikarbeitsgruppe, namentlich Jürgen Neumann, Jochen Ölke, Daniel Steppich, Kumudesh Sritharan, Stefan Bössinger und zudem den zusätzlichen „Einwohnern“ des Doktorandenzimmers Marcin Malecha und Stefan Völk für eine sehr angenehme Atmosphäre. Dafür auch mein Dank an den gesamten Lehrstuhl für Experimentalphysik I. Es war mir eine Freude.

Sehr bedanken möchte ich mich bei Thomas Wehler für Rettung in letzter Minute.

Ein großer Dank allen die ich hier vergessen haben sollte, Ihr ward nicht weniger wichtig.

Unentbehrlich für das Gelingen dieser Arbeit waren Menschen die mich außerhalb der Uni in meinem Leben begleiten. Zuerst meinen Eltern die mir erst das Studium der Physik ermöglichten und mich stets unterstützten. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Herbert Gerstner, der mir stets ein guter Freund war und der, wenn es angebracht war, auch nicht mit offener und konstruktiver Kritik gespart hat. Ebenso an Stefan Braxmeier und Ekkehardt Donle für ihre Freundschaft die ich sehr schätze. Ein ganz persönlicher und ganz herzlicher Dank ist an Sylvie gerichtet, die mich in den schwierigsten Zeiten mit allen Kräften unterstützt hat. Sie war mir oft ein Stern in dunkler Nacht.