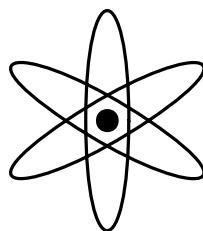


PHYSIK-DEPARTMENT



**Dynamik und Struktur lamellarer Lipidmischungen
als Funktion der Hydratation.**

Eine NMR-Studie

Dissertation

von

Bernhard Steinbauer



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT
MÜNCHEN**

Technische Universität München
Fakultät für Physik
Lehrstuhl für Biophysik E22

**Dynamik und Struktur lamellarer Lipidmischungen
als Funktion der Hydratation.**

Eine NMR-Studie

Bernhard Steinbauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
2. apl. Prof. Dr. K. Beyer,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 29.11.2001 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 10.01.2002 an-
genommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Lipidmembranen	1
1.1	Physiologie von natürlichen Membranen	1
1.1.1	Grundsätzlicher Aufbau	1
1.1.2	Lipidverteilung	3
1.2	Modellmembranen	4
1.2.1	Einfache Membranen als Modell für reales Verhalten	4
1.2.2	Arten von Modellmembranen	4
1.2.3	Temperaturverhalten	5
1.2.4	Problem der Phasendefinition	5
1.2.5	Membranelektrostatik und Wasserorientierung	7
1.3	Untersuchte Lipide	9
1.4	Domänenbildung	14
1.4.1	Lipid-Lipid - Domänen	14
1.4.2	Cholesterol im Bilayer	14
1.4.3	Ein spezieller Fall: <i>lipid rafts</i>	15
1.4.4	Biophysikalische Rolle von Domänen	16
1.5	Proteine an und in Membranen	17
1.5.1	Überblick	17
1.5.2	Art und Funktion der Lipid-Protein-Wechselwirkung	18
2	Wasser	19
2.1	Wasser als Lösungsmittel	19
2.1.1	Wasserstoffbrücken	19
2.1.2	Hydrophober Effekt	20
2.1.3	Aggregationsformen von Lipidmolekülen	20
2.1.4	Unterschiede H ₂ O - D ₂ O	21
2.2	Wasser an der Membranoberfläche	22
2.2.1	Schalenmodell	22
2.2.2	Orte verstärkter Wasserbindung	22

2.2.3	Hydratationsdruck	23
2.3	Protonenleitung längs der Membranoberfläche	24
2.4	Dehydratisierung von Membranoberflächen	25
3	Materialien und Methoden	27
3.1	Materialien	27
3.2	Analytik	27
3.2.1	NMR-Bestimmung	27
3.2.2	Dünnschichtchromatographie	28
3.2.3	Kalorimetrie	28
3.2.4	Filmwaage	29
3.3	Festkörper-NMR an Phospholipid-Membranen	30
3.3.1	Prinzip	30
3.3.2	Festkörper-NMR von Deuterium- und Phosphor-Kernen	31
3.3.3	Gepulste NMR-Spektroskopie	35
3.3.4	Aufbau des NMR-Geräts	37
3.4	Herstellung orientierter Lipidschichten	38
3.4.1	Präparation	38
3.4.2	Orientierung im NMR-Magneten	39
3.4.3	Temperaturkalibrierung	39
3.5	Pulssequenzen in ^2H -NMR	40
3.5.1	<i>Quadrupolar Echo</i>	40
3.5.2	<i>Inversion Recovery</i>	40
3.5.3	Breitband-Jeener-Broekaert-Sequenz	41
3.6	Auswertemethoden	42
3.6.1	Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit $T_{1,z}$	42
3.6.2	Ordnungsparameterprofil und projizierte Acylkettenlänge	43
3.6.3	Spektrale Momente	44
3.6.4	Bestimmung der Hydratation	46
3.7	NMR-Zeitskalen bei der Untersuchung von Lipidmembranen	47
4	Bestimmung von Deuteron-Austauschraten	49
4.1	Problemstellung	49
4.2	Pulssequenz	50
4.3	Berechnung der Austauschraten	50
5	Phosphatidylcholin	53
5.1	Reine Phosphatidylcholin-Membranen	53

5.1.1	Interlamellares Wasser	55
5.1.2	Acylkettenbereich	60
5.1.3	Interpretation der Hydratationsabhängigkeit von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$	62
5.1.4	Hydratationsabhängigkeit der Phasenübergangstemperatur T_m	63
5.1.5	Domänenbildung	65
5.1.6	Diskussion	66
5.1.7	Ausblick und Anregungen	68
5.2	Austausch labiler Deuteronen in POPC/Cholesterol- Systemen	70
5.3	Cardiolipin-Systeme	74
6	Sphingomyelin	81
6.1	Reines Sphingomyelin	82
6.1.1	Hydratisierungsverhalten	84
6.1.2	Austauschraten labiler Deuteronen	90
6.1.3	Relaxationsverhalten des interlamellaren Wassers	94
6.2	Binäre SM/Cholesterol-Systeme	97
6.3	SM/DPPC-Membranen	103
6.3.1	DSC- und Filmwaagenexperimente	103
6.3.2	Vollhydratisierte SM/DPPC(/Chol)-Systeme	104
6.3.3	Dehydratisierung von SM/DPPC(/Chol)-Systemen	107
6.3.4	Kopfgruppendynamik von DPPC	111
6.3.5	Austauschraten labiler Deuteronen	115
6.4	SM/POPC-Membranen	117
6.4.1	Vollhydratisierte Membranen	118
6.4.2	Einfluß der Dehydratisierung	125
6.4.3	Effekt von Cholesterol	130
6.5	Beobachtungen <i>en passant</i>	132
7	Ausblick	133
	Literaturverzeichnis	149

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau einer tierischen Zelle	1
1.2	Aggregation von Lipiden	3
1.3	Phasenverhalten von DMPC	5
1.4	Schema eines binären Phasendiagramms	6
1.5	Elektrostatik von Lipidmembranen	7
1.6	Struktur und Nomenklatur von Glycero-Phospholipiden	9
1.7	Struktur von Cardiolipin	10
1.8	Struktur von Cholesterol	10
1.9	Struktur von Sphingomyelin	11
1.10	Struktur des Interface-Bereichs von Ceramid und Sphingomyelin	12
2.1	Hydrophober Effekt	20
2.2	Abhängigkeit der Lipidphase vom Packungsparameter P	21
2.3	Wechselwirkung von Wasser mit der Zellmembran	26
3.1	^1H -NMR-Spektrum von Cholesterol	28
3.2	Aufspaltung der Kernniveaus von Deuterium im magnetischen Feld	32
3.3	Definition der Orientierung von Lipidsegmenten im Bilayer	33
3.4	^{31}P -NMR Spektren von EYSM	34
3.5	Anregung der Spinniveaus	35
3.6	FID (freier Induktionsabfall)	36
3.7	Prinzipskizze des NMR-Magneten	37
3.8	Probenanordnung für orientierte NMR-Messungen	38
3.9	Pulssequenzen in ^2H -NMR	40
3.10	Frequenzverteilung der Bewegungsmoden	42
3.11	Ordnungsparameterprofil von $d31$ -POPC	43
3.12	NMR-zugängliche Zeitbereiche von Membranbewegungen	47
4.1	Übertrag der magnetischen Invertierung	49
4.2	Austausch von OD-Gruppen an Sphingomyelin	51

5.1	NMR-Spektren von vollhydratisierten <i>d62</i> -DPPC Multilayern	55
5.2	Temperaturabhängigkeit der Quadrupolaufspaltung von PC-Membranen . .	56
5.3	Konzept der reduzierten Temperatur	56
5.4	Wasserordnung an PC-Membranen als Funktion von n_w	57
5.5	Abschätzung von Domänengrößen in dehydratisierten DPPC-Membranen . .	58
5.6	Koexistierende Gel-/Fluiddomänen in DPPC-Membranen	59
5.7	Dehydratisierung von DMPC, DPPC und POPC – Kettenbereich	60
5.8	Exponentialfits der Quadrupolaufspaltung der terminalen Methylgruppen von PC-Membranen	61
5.9	Interpretation der D ₂ O-Quadrupolaufspaltung bei POPC	62
5.10	Hydratationsabhängigkeit von T_m für DMPC	64
5.11	Hydratationsabhängigkeit von T_m für DPPC und POPC	64
5.12	Domänenbildung in dehydratisierten DPPC- und POPC-Membranen . . .	65
5.13	Orientierung von Wasser an geladenen Oberflächen	69
5.14	POPC/Cholesterol: Quadrupolaufspaltungen von D ₂ O und POPC	70
5.15	POPC/Cholesterol: Quadrupolaufspaltungen von Cholesterol	71
5.16	NMR-Spektren für <i>Inversion-Transfer</i> -Anregung von POPC/Cholesterol- Membranen	72
5.17	Austauschraten labiler Deuteronen bei POPC/Chol-Membranen	72
5.18	Hydratisierungsverhalten von CL-Membranen	74
5.19	Vermutete Struktur von CL-Membranen bei niedrigen Hydratationen . . .	75
5.20	Austauschraten labiler Deuteronen bei Cardiolipin-Membranen	76
5.21	Longitudinale Relaxationszeit von Cardiolipin-Membranen	76
5.22	Austauschraten labiler Deuteronen bei POPG-Membranen	77
5.23	Austauschraten und Korrelationszeit τ_s^0 als Funktion der Membranladung .	79
6.1	Parallelen von DSC und NMR bei Sphingomyelin (I)	83
6.2	Parallelen von DSC und NMR bei Sphingomyelin (II)	83
6.3	Gelphasenspektrum von vollhydratisiertem EYSM bei 23 °C	84
6.4	Temperaturabhängigkeit der NMR-Signale von EYSM	85
6.5	Hydratationsabhängigkeit der Quadrupolaufspaltungen von bbSM	86
6.6	Hydratationsabhängigkeit der Quadrupolaufspaltungen von EYSM	87
6.7	NMR-Spektren von teilhydratisierten EYSM-Membranen	87
6.8	NMR-Spektren von austauschenden Deuteronen in EYSM-Membranen . .	90
6.9	Austauschraten labiler Deuteronen bei EYSM-Membranen	91
6.10	Austauschraten labiler Deuteronen bei bbSM-Membranen	91
6.11	Aktivierungsenergie des Deuteron-Austausches	92
6.12	Longitudinale Relaxationszeit von EYSM-Membranen	94

6.13	Aktivierungsenergie des D_2O -Relaxation bei SM-Membranen	95
6.14	2H -Spektrum einer Sphingomyelin/Cholesterol-Membran	97
6.15	Temperaturverlauf der 2H -Aufspaltungen in SM/Chol-Membranen	98
6.16	Relative Änderung der 2H -Aufspaltungen in SM/Chol-Membranen	99
6.17	Dehydratisierung von bbSM/Chol-Membranen	99
6.18	Orientierung von Cholesterol im Bilayer	100
6.19	Austauschraten labiler Deuteronen von SM in bbSM/Chol-Membranen . . .	101
6.20	DSC- und Filmwaagenmessungen von bbSM-enthaltenden Systemen	104
6.21	Wasserorientierung an EYSM/DPPC(/Chol)-Membranen	105
6.22	$\Delta\nu(D_2O)$ für SM/DPPC(/Chol)-Systeme als Funktion der Hydratation . .	107
6.23	Domänenbildung in EYSM/DPPC-Membranen	108
6.24	Analyse der Quadrupolaufspaltung von EYSM/DPPC/Chol-Membranen . .	109
6.25	EYSM/DPPC/Chol-Membranen	109
6.26	NMR-Spektrum der α/β -Signale von $d4$ -DPPC	111
6.27	Verhalten von $d4(\alpha, \beta)$ -DPPC in Anwesenheit von SM und Cholesterol . .	112
6.28	α/β -Plot von $d4(\alpha, \beta)$ -DPPC in SM/DPPC/Chol-Membranen	113
6.29	Deuteron-Austauschraten von SM/DPPC/Chol-Membranen	115
6.30	Quadrupolaufspaltungen von SM/POPC-Membranen	118
6.31	Parameter für einen Fit von $\Delta\nu(D_2O)$ bei bbSM/POPC-Membranen	120
6.32	Kettenordnung von POPC mit/ohne Sphingomyelin bei $42^\circ C$	121
6.33	Kettenordnung von POPC mit/ohne Sphingomyelin bei $21^\circ C$	122
6.34	Relative Ordnungsparameter von SM/POPC-Systemen bei $42^\circ C$	123
6.35	Dehydratisierung von SM/POPC-Membranen	125
6.36	Hydratationsabhängiges Phasendiagramm von bbSM/POPC (2:1-molar) . .	126
6.37	Domänenbildung in SM/POPC-Membranen	127
6.38	Hydratationsabhängiges Phasendiagramm von bbSM/POPC (1:2-molar) . .	127
6.39	Kettenordnung von POPC als Funktion von Hydratisierung und SM-Gehalt	128
6.40	Quadrupolaufspaltungen von SM/POPC/Chol-Membranen	130
6.41	Verdunstungszeiten von Lipidlösungen	132

Tabellenverzeichnis

1.1	Prozentuale Verteilung von Membrantypen	2
1.2	Fettsäureverteilung bei Sphingomyelin	11
3.1	NMR-empfindliche Kerne	30
5.1	Geometrische Eigenschaften von vollhydratisierten PC-Multilayern	54
5.2	Phasenübergangstemperatur von DMPC, DPPC und POPC	54
5.3	Parameter der Exponentialfits an $\Delta\nu(\text{CH}_3)$ vs. n_w	61
5.4	Parameter für Zweiseitenaustausch von verschiedenen Membranen	78
6.1	Untersuchte Sphingomyelin-Systeme	82
6.2	Untersuchte Sphingomyelin/POPC-Membranen	117
6.3	Fitwerte für kritische Exponenten in SM/POPC-Membranen	119

Abkürzungen und Konstanten

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
bb	<i>bovine brain</i> (Rinderhirn)
Chol	Cholesterol
CL	Cardiolipin
CSA	<i>Chemical Shift Anisotropy</i> (Anisotropie der chemischen Verschiebung)
$\Delta\nu$	Frequenzaufspaltung von NMR-Signalen
D ₂ O	deutერიertes (schweres) Wasser
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-Phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-Phosphatidylcholin
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Differenzielle Rasterkalorimetrie)
EY	<i>Egg Yolk</i> (Eigelb)
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (Isotherme Titrationskalorimetrie)
MD	<i>Molecular Dynamics</i> (Molekulardynamik)
\vec{n}	Direktorachse, d. h. Flächennormale von Lipidmembranen
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-Phosphatidylcholin
S_{CD}	Deuterium-Ordnungsparameter einer C-D Bindung
SM	Sphingomyelin
<i>sn</i> -1, <i>sn</i> -2	Bindungsplätze der Acylketten am Glycerol-Rückgrat von Phospholipiden

Konstanten

Symbol	Bezeichnung	Wert
D	Debye	$3,336 \cdot 10^{-30} \text{ C/m}$
k_B	Boltzmann-Konstante	$1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
N_0	Avogadro-Konstante	$6,022 \cdot 10^{23} / \text{mol}$
$R = N_0 \cdot k_B$	molare Gaskonstante	$8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$

Umrechnungsfaktoren für Energieeinheiten

Einheit	Alternative Einheit(en)
1 kcal	4,1868 kJ
1 $k_B T$ /Molekül	0,592 kcal/mol = 2,478 kJ/mol
1 eV/Molekül	23,06 kcal/mol = 96,48 kJ/mol

Zusammenfassung

Die laterale Organisation biologischer Membranen steht gegenwärtig im Vordergrund des biophysikalischen Interesses, besonders im Hinblick auf die Mechanismen der Signaltransduktion. Die Existenz von Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Domänen, die an der Rekrutierung von Proteinen der Signalkaskaden beteiligt sind, ist mittlerweile gut dokumentiert. Die Bedeutung der Lipidzusammensetzung für die Domänenstabilisierung, und dabei besonders die Rolle des Cholesterols, der Beitrag intra- und intermolekularer Wasserstoffbrücken im Bereich der Lipid-Wasser-Phasengrenze sowie der Einfluß der Oberflächenhydratation auf die Domäneneigenschaften werden bisher allerdings weniger gut verstanden.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der Hydratation auf die Eigenschaften von lamellaren Lipidmembranen. Reine Lipide oder definierte Lipidmischungen wurden als Funktion von Temperatur und Hydratation mit Methoden der Festkörper-NMR Spektroskopie untersucht. Die Hydratation biologischer Membranen ist durchaus starken Schwankungen unterworfen; dafür können sowohl die Wasserbindung an komplexe Kohlenhydrate an der Zelloberfläche als auch die Adsorption von Peptiden und Proteinen verantwortlich sein. Eine niedrige Hydratation kann das Phasenverhalten und damit auch die Wechselwirkung zwischen Membran und Proteinen oder Peptiden deutlich verändern.

Die Änderung physikalischer Eigenschaften bei kontrollierter Dehydratisierung wurden zuerst für reine Phosphatidylcholin- (PC-)Systeme eingehend untersucht und diskutiert; der zweite Schwerpunkt lag auf Modellsystemen mit Sphingomyelin (SM). Die Messungen erfolgten überwiegend an orientierten Lipid-Multischichten; diese haben gegenüber nicht-orientierten Membranen den Vorteil einfacher Signalprofile im ^2H -NMR Spektrum (Lorentzlinien). Darüberhinaus ermöglichen sie die Beobachtung chemisch labiler Deuteronen von Hydroxyl- oder Amidgruppen im Bereich der Lipid-Wasser-Grenze und die Messung der Austauschraten. Zu diesem Zweck wurde eine Methode auf der Basis einer *Inversion-Transfer*-Pulsfolge entwickelt und auf Membranen mit Phosphatidylglycerol, Cardiolipin, Cholesterol und Sphingomyelin angewendet.

Im Falle von SM-Multischichten tauschen nach Präparation in deuterierten Lösungsmitteln und anschließender Hydratation mit D_2O die Protonen der Amid- und der Hydroxylgruppe des Moleküls gegen Deuteronen aus und sind so im ^2H -NMR sichtbar. Es wurde unter anderem gezeigt, daß die Austauschraten der labilen Deuteronen von reinen SM-Multischichten sehr unterschiedlich sind: die Raten der Amiddeuteronen sind im NMR-Zeitfenster nicht meßbar, da diese Gruppe vermutlich in starker inter- oder intramolekularer Wechselwirkung mit anderen Gruppen steht. Dagegen steigen die Austauschraten der Hydroxylgruppe monoton mit der Hydratation an und erreichen ein Maximum, das im Bereich der Proton-Austauschraten von reinem Wasser liegt.

In Sphingomyelin/Cholesterol-Mischungen deuten Form und Intensität der NMR-Linien darauf hin, daß ein Teil der SM-Moleküle besonders stark mit Cholesterol wechselwirkt. Aus der Aufspaltung der SM-Hydroxylsignale sowie aus ihrer unterschiedlichen chemischen Verschiebung geht hervor, daß die Wechselwirkung mit Cholesterol die Orientierung des Interface-Bereichs von SM und damit vermutlich dessen Elektrostatik beeinflusst.

Als empirisches Kriterium für die Polarisierung des interlamellaren Wassers wurde die durch Rotationsdiffusion gemittelte Quadrupolaufspaltung von Deuteriumoxid (D_2O) herangezogen, während die Dynamik der Acylketten und des Cholesterols durch Einsatz entsprechend markierter Lipide ermittelt wurde.

Aus dem Verhalten der D_2O -Quadrupolaufspaltung wurde geschlossen, daß die Oberfläche von SM-Membranen deutlich weniger hydrophil ist als bei PC-Membranen, obwohl beide Lipide dieselbe Kopfgruppe besitzen.

In SM/PC-Mischungen führen gesättigte bzw. ungesättigte Acylketten im PC-Anteil aufgrund der unterschiedlichen lateralen Kompressibilität zu einem gegensätzliches Verhalten hinsichtlich der Orientierung des interlamellaren Wassers. In SM/DPPC-Systemen folgt der Verlauf der Quadrupolaufspaltung des Wassers qualitativ dem Verhalten von reinem SM, bei SM/POPC dem von reinem POPC. Diese Unterschiede können mit einer unterschiedlichen Einbindung der beiden Phosphatidylcholone in das komplexe Netzwerk der Wasserstoffbrücken erklärt werden.

Für SM/POPC-Membranen wurde anhand des NMR-Spektrums die Phasenübergangstemperatur als Funktion der Hydratation bestimmt und mit kalorimetrischen Daten verglichen. Im Rahmen der experimentellen Fehler zeigten die beiden Methoden einen hohen Grad an Übereinstimmung. Da eine Variation der Hydratation von Lipid-Multischichten im NMR-Gerät relativ einfach und quasi-kontinuierlich vollzogen werden kann, bietet sich diese Methode gerade auch für Lipidsysteme an, in denen nur geringe kalorimetrische Wärmen beobachtet werden, etwa bei hohem Cholesterolgehalt.

Für ternäre SM/POPC/Chol-Mischungen wurde, ebenfalls aus dem Temperaturverlauf der NMR-Signale, ein Phasenübergang bei Raumtemperatur postuliert. Es konnte allerdings nicht unterschieden werden, ob dieser für die gesamte Mischung gilt, d. h. ob sich SM-reiche Domänen in bestimmten Temperaturbereichen lateral entmischen.

Zusammenfassend läßt sich für die untersuchten Sphingomyelin-Systeme sagen, daß die Hydratisierung der Membranoberfläche stark durch die Anwesenheit von ungesättigten Phosphatidylcholinen und Cholesterol beeinflusst wird. Die veränderte Packungsdichte in diesen Systemen scheint einen starken Einfluß auf Richtung und Stärke des inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes von SM zu haben.

Vorwort

Durch Membranen abgegrenzte Reaktionsbereiche stellten einen Quantensprung in der Evolution des Lebens dar. Als passive Barriere erlauben Membranen die selektive An- oder Abreicherung von Molekülen gegenüber der Umwelt; in die Membran eingebaute aktive Transportmechanismen bilden die Grundlage für die hohe Spezialisierung einzelner Zellen in höheren Organismen. Darüberhinaus laufen chemische Reaktionen an Oberflächen wesentlich schneller und effizienter ab, indem die Reaktionspartner davon abgehalten werden, sich frei im Raum zu bewegen.

Selbstorganisation ist das elementarste Prinzip des Lebens: im genetischen Code ist nur festgelegt, woraus und in welcher Abfolge die Moleküle bestehen – ihre dreidimensionale Anordnung, ihre Funktionalität sowie ihre Verteilung im Zellraum läuft dann oft selbständig ab. Dieses Prinzip: *Vorgabe der Ausgangslage, der Rest organisiert sich selbst* ist auch die Ursache dafür, daß minimale Änderungen der Erbsubstanz sich auf den ganzen Organismus auswirken können.

Wasser mit seinen ungewöhnlichen physikalischen Eigenschaften ist die Triebfeder der Selbstorganisation. Es ist vor allem eine Eigenschaft: die Fähigkeit, mit den benachbarten Wassermolekülen kurzzeitig starke Bindungen einzugehen. Die Anomalien des Wassers gegenüber ähnlich großen Molekülen – vor allem ein wesentlich höherer Schmelz- und Siedepunkt und ein Dichtemaximum bei 4 °C – ergeben sich aus der Temperaturabhängigkeit dieser sogenannten *Wasserstoffbrücken*. Sie bestimmen das Verhalten von Wasser als Lösungsmittel und veranlassen indirekt Lipidmoleküle dazu, sich in einer zweidimensionalen Membran zu organisieren. Der Ladungstransport innerhalb von Enzymkomplexen läuft vermutlich über eine Kette von Wasserstoffbrücken; die molekulare Erkennung von Proteinen wird durch an der Oberfläche orientierte Wasserschichten verstärkt.

Einfache Prinzipien, komplizierte Wirkungen: Obwohl die physikalischen Prinzipien der Selbstorganisation relativ einfach sind, ist ihr Zusammenspiel so kompliziert, daß das Verständnis biologischer Membranen nach jahrzehntelangen Forschungen immer noch mangelhaft ist. Die erst vor kurzem postulierten *lipid rafts*, relativ feste „Flöße“ in der ansonsten flüssigkristallinen Zellmembran, sind ein Beispiel dafür, wie neue Erkenntnisse der Membranstruktur Erklärungen für eine ganze Familie von biochemischen Prozessen (z. B. Signaltransduktion) liefern können.

Kapitel 1

Lipidmembranen

1.1 Physiologie von natürlichen Membranen

1.1.1 Grundsätzlicher Aufbau

Die Voraussetzung für jede Form von Leben war die Abgrenzung chemischer Reaktionsbereiche gegen die Umwelt unter Aufrechterhaltung eines selektiven Stoffaustausches – die Geburt der Zelle (Abb. 1.1). Diese Barrierenfunktion nehmen Doppelschichten aus Lipidmolekülen wahr, die sich aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften spontan zu großen zwei- oder dreidimensionalen Strukturen zusammenfinden.

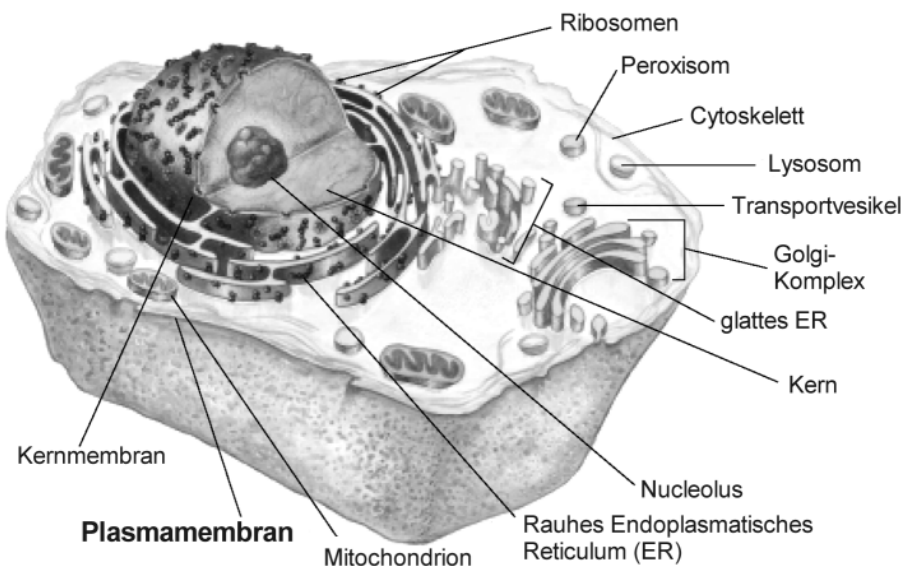


Abbildung 1.1: Aufbau einer tierischen Zelle (nach [137])

Neben der Abgrenzung der Zelle nach außen durch die Plasmamembran sowie der verschiedenen Zellorganellen dienen Membranen vielen Proteinen und Enzymen als Nachrichtenverteiler und „Arbeitsbank“. Die Proteine sind an die Membran gebunden oder in sie eingebettet¹ und geben z. B. hormonelle Signale aus dem Blut an das Zellinnere wei-

¹ Das Gewichtsverhältnis von Proteinen zu Lipiden in der Membran variiert zwischen 1:4 und 4:1 [182].

ter. Ausgedehnte Anordnungen von koordiniert arbeitenden Enzymen nutzen den Vorteil der zweidimensionalen Membranoberfläche: eine wesentlich höhere Effizienz als im dreidimensionalen Raum [136, 161]. Aus diesem Grunde finden sich bei eukaryontischen (= nicht-bakteriellen) Zellen auch im Zellinneren vielfach gestapelte und verzweigte Membranen (z. B. in Mitochondrien, im Golgi-Apparat oder im Endoplasmatischen Retikulum), die zudem effiziente Transportwege für Moleküle oder ganze Zellorganellen darstellen.

Tabelle 1.1 zeigt für zwei unterschiedlich große eukaryontische Zellen, daß die Plasmamembran nur einen Bruchteil der gesamten Membranfläche einer Zelle ausmacht:

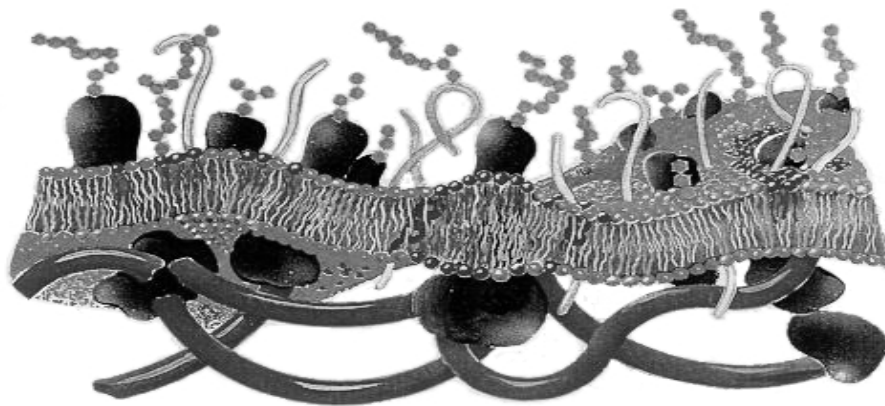
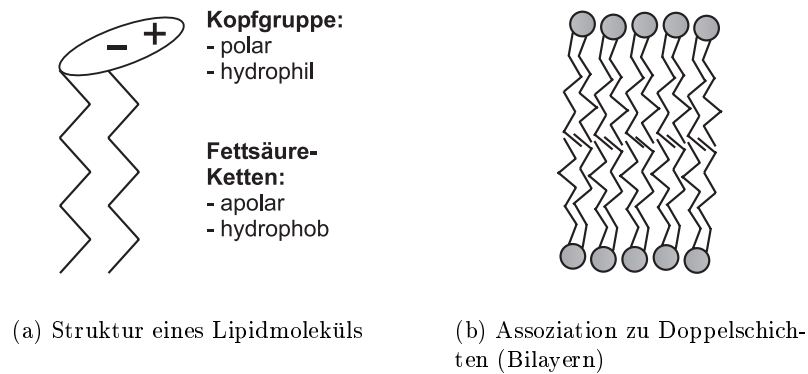
Membrantyp	Anteil an gesamter Membranfläche in %	
	Leber (Hepatozyt)	Pankreas (exokrine Zelle)
Plasmamembran	2	5
Rauhes ER	35	60
Glattes ER	16	< 1
Golgi-Apparat	7	10
Mitochondrien		
Innenmembran	32	17
Außenmembran	7	4
Zellvolumen (μm^3)	5 000	1 000
Membranfläche (μm^2)	110 000	13 000

Tabelle 1.1: Prozentuale Verteilung von Membrantypen bei Leber-Hepatozyten und exokrinen pankreatischen Zellen (nach [1], S. 654)

Erst seit der wegweisenden Veröffentlichung von Singer und Nicolson [179] werden Lipidmembranen als höchst dynamische Gebilde begriffen, die Proteinen nicht nur als passive Matrix dienen, sondern auch deren Verhalten aktiv steuern können. Durch leichte Variationen der chemischen Struktur entstehen aus wenigen Lipidfamilien über 100 in natürlichen Membranen vorkommende Spezies mit sehr verschiedenen physikalischen Eigenschaften. In einer komplexen Mischung gewährleisten sie, daß die Membranen über einen weiten Bereich von Umweltbedingungen (Temperatur, pH, Ionenkonzentration, Druck, Wasseranteil) funktionsfähig bleiben. Die aktive Aufrechterhaltung einer zellspezifischen Lipidzusammensetzung sowie die großen Unterschiede zwischen Zellen verschiedener Körperbereiche deuten aber auch auf eine viel weiter gehende Abhängigkeit der Zellfunktion von der Membranzusammensetzung hin [50].

Lipidmoleküle bestehen aus einem polaren, hydrophilen Kopfgruppenbereich und (meist zwei) hydrophoben Fettsäureketten (Abb. 1.2(a)). Hydrophob heißt: der Kontakt mit Wasser ist energetisch sehr ungünstig; einzelne Moleküle lagern sich spontan zu größeren Strukturen zusammen, die die Lipidketten vom Wasser abschirmen. Die Form dieser Strukturen hängt unter anderem von der Geometrie der Lipide ab (Kap. 2.1.3, S. 20).

Abbildung 1.2(c) zeigt ein Modell für eine reale Plasmamembran: der Bilayer und die ein- und angelagerten Proteine werden auf der Zellinnenseite vom Zytoskelett stabilisiert, einem polymerartigen Netzwerk, das sich über die gesamte Zelle erstreckt. Auf der Außenseite bilden Glykolipide die Glykokalyx, die vor allem der Aufnahme und Weitergabe von biochemischen Signalen dient.



(c) Modell einer realen Membran mit Proteinen, Zytoskelett und Glykokalyx (mit freudl. Genehmigung von O. Mouritsen, MEMPHYS group, Lyngby/DK)

Abbildung 1.2: Aggregation von Lipiden zu makromolekularen Einheiten

1.1.2 Lipidverteilung

Die von der Zelle synthetisierten ca. 100 verschiedenen Lipidspezies können nach der Ladung ihrer Kopfgruppen in zwei Gruppen eingeteilt werden: elektrisch neutrale (meist zwitterionische) und anionische Lipide; kationische Lipide kommen in der Natur nur in Form des seltenen Sphingosin vor. Die äußere Hälfte der Zellmembran (*Exoleaftet*) besteht fast ausschließlich aus den zwitterionischen Lipiden Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) sowie zu geringen Mengen aus dem ebenfalls neutralen Phosphatidylethanolamin (PE). Die dem Zellinneren zugewandte (zytoplasmatische) Seite, das *Endoleaftet*, ist dagegen vor allem aus anionischen Lipiden aufgebaut, deren Ladung von positiven Gegenionen abgeschirmt wird: Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und phosphorylierte Varianten davon sowie Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) [207]. Da die Lipide langsam über die beiden Membranhälften austauschen, bedarf es aktiver Transportprozesse, um die Asymmetrie der Verteilung aufrechtzuerhalten.

Die Fluidität von Membranen kann über einen weiten Temperaturbereich angepaßt werden, indem die Fettsäureketten durch Doppelbindungen modifiziert werden.

Auf die Rolle von Cholesterol im Bilayer wird in Kapitel 1.4 eingegangen.

1.2 Modellmembranen

1.2.1 Einfache Membranen als Modell für reales Verhalten

Reale Membranen sind weitgehend unzugänglich für detaillierte Messungen *in vivo*, da sich bereits bei der Präparation die ursprüngliche Verteilung der Lipide und Proteine verändert und die Fülle an Wechselwirkungen kaum sortiert werden kann.

Modellmembranen aus wenigen Lipidarten reduzieren die Komplexität, erfordern aber bei der Übertragung der Ergebnisse auf biologisch relevante Prozesse besondere Sorgfalt [103]. Untersuchungen an Lipidextrakten aus *Escherichia coli* – Bakterien zeigen allerdings eine weitgehende Übereinstimmung mit ähnlich konstruierten Modellmembranen [19, 58].

1.2.2 Arten von Modellmembranen

Die meisten reinen Phospholipide bilden unter physiologischen Bedingungen lamellare oder hexagonale Phasen (Kap. 2.1.3). Spontane hexagonale Phasen zeigt vor allem PE; zweiwertigen Kationen, z. B. Ca^{2+} , verringern durch Ladungsabschirmung die effektive Kopfgruppenfläche und induzieren dadurch in vielen Lipiden einen Übergang von der lamellaren in eine invertiert hexagonale Phase.

Mizellen und multilamellare Vesikel (MLVs) bilden sich spontan, wenn Lipide in Wasser „gelöst“ werden. Durch Ultraschall-Bestrahlung erhält man daraus kleine unilamellare Vesikel ($\varnothing \approx 100$ nm), während größere unilamellare Vesikel mit definiertem Durchmesser durch Extrusion von MLVs durch eine Polycarbonatfolie hergestellt werden. Mizellen und Vesikel werden z. B. bei kalorimetrischen Messungen verwendet. Da die thermodynamischen Eigenschaften auch von der Präparationsmethode abhängen, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht immer gegeben.

Monolayer, Bilayer und Multilayer entstehen, wenn man gelöste Lipide mit passender Molekülgeometrie auf ein planares Substrat aufträgt und das Lösungsmittel verdampfen läßt. Monolayer von Lipiden auf einer Wasseroberfläche werden z. B. mit Filmwaagenmessungen untersucht und unterscheiden sich von Bilayern in der unterschiedlichen Kopplung der Kopfgruppen und Lipidketten zur Umgebung.

Multilayer mit mehreren 1000 parallelen Lipidschichten können durch Stapelung von Substrathaltern (meist Glasplättchen) stabil hergestellt werden. Wenn die Lipidbewegungen im Zeitbereich der Untersuchungsmethode zu 100 % bewegungsgemittelt sind, können die Daten von Vesikeln und Multilayern ineinander umgerechnet werden. Bei NMR-Messungen heißt dieser Algorithmus *dePakeing* [17]; die berechneten Spektren sind jedoch oft ungenauer als die von orientierten Multilayern.

Black Lipid Membranes (BLMs): Vor allem für elektrophysiologische Untersuchungen gibt es eine einfache Art, große Bilayer-Filme zu erzeugen [196]: eine Lipidlösung wird auf eine kleine Apertur ($\varnothing \approx 2$ mm) gestrichen. Durch die Oberflächenspannung wird die Lösung zum Rand hin gezogen und hinterläßt in der Apertur nach dem Verdunsten des Lösungsmittels einen Bilayer-Film. Auf diese Weise lassen sich auch membranlösliche Proteine in den Film einbauen.

1.2.3 Temperaturverhalten

Abbildung 1.3 zeigt das temperaturabhängige (*thermotrope*) Phasenverhalten von DMPC-Vesikeln² in wässriger Lösung anhand der aus der Lösung entnommenen Wärme: bei niedrigen Temperaturen befinden sich die Vesikel in der Gelphase ($L_{\beta'}$ -Phase)³, in der die Bewegung von Fettsäureketten und Kopfgruppen stark eingeschränkt und deshalb die Membran relativ geordnet ist. Am **Vorübergang** (Temperatur T_{pre}) reorganisieren sich vor allem die Kopfgruppen und das mit ihnen assoziierte Wasser, während am **Hauptübergang** (Temperatur T_m) der Kettenbereich eine locker geordnete, flüssigkristalline Form (L_{α} -Phase) annimmt [36]. Im Übergangsbereich zwischen $L_{\beta'}$ - und L_{α} -Phase liegen viele Lipide, darunter DMPC, in der sogenannten **Ripple-Phase** $P_{\beta'}$ vor: die aufgelockerte Kopfgruppengeometrie bei konstantem Kettenvolumen erfordert eine sägezahnartige Verzerrung der Lipidmoleküle.

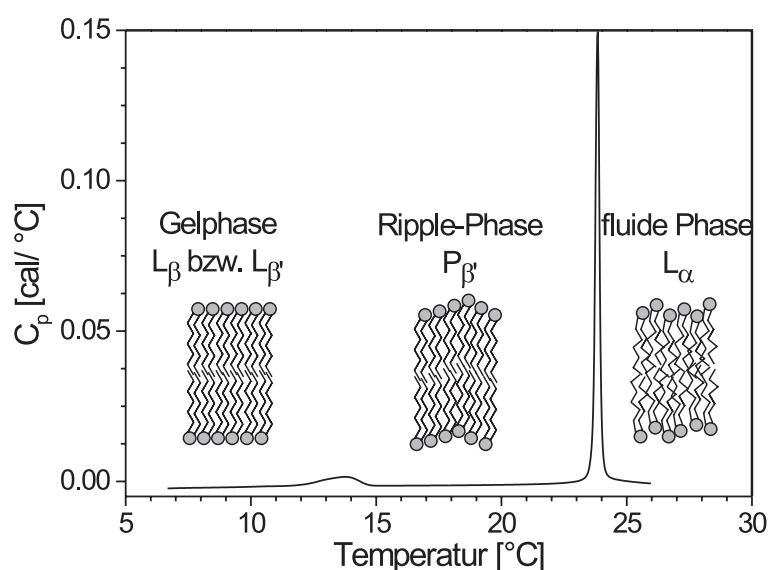


Abbildung 1.3: Phasenverhalten von DMPC (DSC-Messung; siehe Kapitel 3.2.3)

1.2.4 Problem der Phasendefinition

Im folgenden soll gezeigt werden, daß bereits bei Modellmembranen aus nur zwei unterschiedlichen, ideal mischbaren Lipidkomponenten eine Vielzahl von Phasenzuständen des Gesamtsystems möglich ist.

Im thermodynamischen Gleichgewicht muß in einem offenen System mit C verschiedenen Teilchensorten (chemischen Komponenten) das chemische Potential μ_i^A aller Komponenten i in allen Phasen A konstant sein. Daraus ergeben sich bei P verschiedenen Phasen nach der **Gibbs'schen Phasenregel** F Freiheitsgrade [33]:

$$F = C - P + 2 \quad (1.1)$$

Betrachtet man den Druck als konstante Größe, so reduziert sich Gleichung 1.1 auf:

² DMPC: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin

³ Das Apostroph steht für eine Verkippung der Lipidlängsachse gegen die Bilayernormale (*tilt*).

$$F = C - P + 1 \quad (1.2)$$

Für eine vollhydratisierte binäre Lipidmischung wird Wasser als separate Phase definiert, d. h. $C = 2$. Damit können maximal $P = 3 - F$ Phasen *koexistieren*:

- $P = 1, F = 2 \Rightarrow$ Einphasenregion, in der Temperatur und Zusammensetzung frei variieren können (*freie Mischbarkeit*).
- $P = 2, F = 1 \Rightarrow$ Zweiphasenregion; Temperatur und Phasenverteilung hängen voneinander ab (*Koexistenzbereich*).
- $P = 3, F = 0 \Rightarrow$ Dreiphasenregion; die drei Phasen können im Gleichgewicht nur bei einer bestimmten Temperatur und Zusammensetzung existieren (= *eutektischer/peritektischer/monotektischer Punkt*, je nach Lage im Phasendiagramm).

Abbildung 1.4 faßt obige Aussagen in einem Temperatur–Mischungs–Diagramm zusammen: zwei Lipide A und B mit Phasenübergangstemperaturen T_A bzw. T_B liegen oberhalb der *fluidus*- und unterhalb der *solidus*-Linie homogen in der flüssigen bzw. festen Phase vor ($P = 1$). Dazwischen liegt ein Zweiphasengebiet fest/flüssig, in dem sich die Zusammensetzung der koexistierenden Phasen sowohl mit der Temperatur als auch mit dem Mischungsverhältnis ändert.

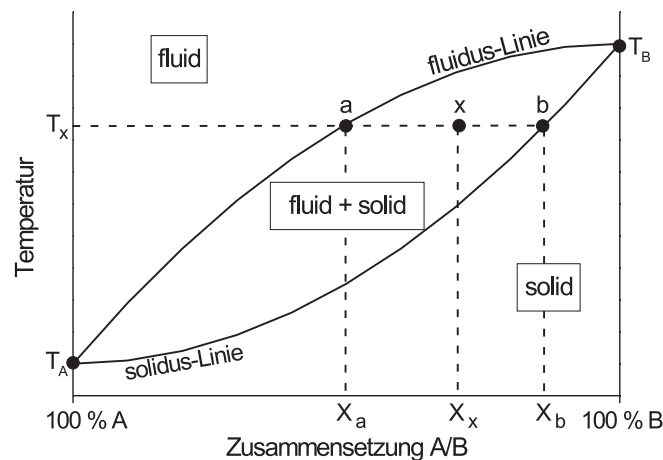


Abbildung 1.4: Binäres Phasendiagramm für zwei Lipide A und B (Schmelztemperatur T_A, T_B), die in der flüssigkristallinen (L_α) Phase und in der Gelphase (L_β) vollständig mischbar sind (nach [33]).

Der relative Anteil f von Komponente B, der im Koexistenzgebiet bei einer bestimmten Temperatur T_x in der flüssigen Phase vorliegt, ergibt sich mit einem Hebelgesetz (*lever rule*) aus den Schnittpunkten a, b der Linie $T = T_x$ mit der *liquidus*-/*solidus*-Linie:

$$f = \frac{X_b - X_x}{X_b - X_a} \quad (1.3)$$

Analog erhält man aus einer Parallele zur Abszisse die Charakteristika einer lateralen Phasentrennung bei konstanter Zusammensetzung der Mischung. Für eine experimen-

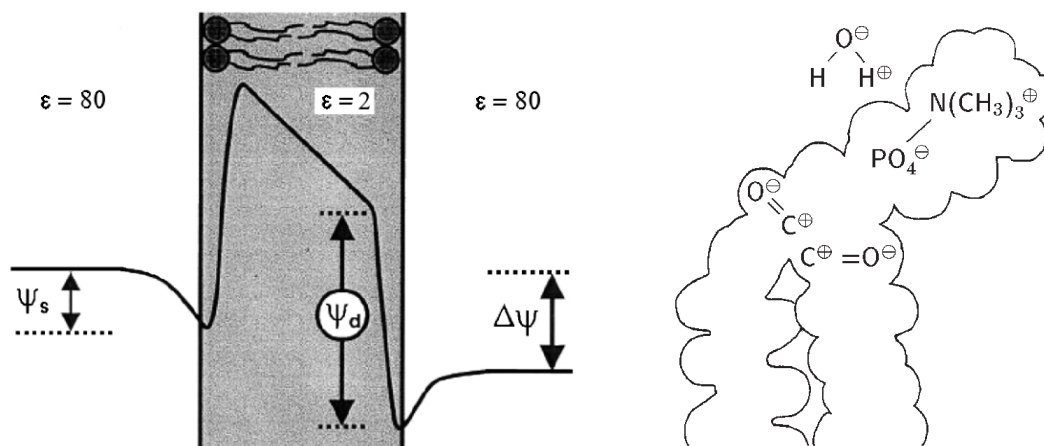
telle Bestimmung der Phasengrenzen muß beachtet werden, daß die Diffusionskonstanten in der festen Phase deutlich niedriger sind, d.h. die Äquilibration eines Zustandes wesentlich länger dauert. Die noch andauernde Diskussion der Ordnung von Phasenübergängen bei Lipiden ist zum Teil auf die unterschiedliche Dauer der Beobachtungszeiträume zurückzuführen [99].

Insbesondere bei stark dehydratisierten Membranen stellt sich zusätzlich die Frage nach der *Abgrenzung der Phasen*: einige Wassermoleküle gehen mit der Kopfgruppe des Lipids kurzzeitige Bindungen ein oder sind im Interface-Bereich zwischen Kopfgruppen und Lipidketten stark in ihrer Bewegung eingeschränkt. Damit kann hier von einer unabhängigen Wasserphase nicht mehr gesprochen werden.

Stark dehydratisierte Systeme werden in Kapitel 5 und 6 untersucht.

1.2.5 Membranelektrostatik und Wasserorientierung

Über der Plasmamembran liegt durch die asymmetrische Verteilung von geladenen Lipiden in den Bilayerhälften und der daraus resultierenden unterschiedlichen Konzentration an Gegenionen eine Potentialdifferenz $\Delta\Psi \approx 70$ mV, das **Membranpotential** (Abb. 1.5(a)). Dies entspricht bei einer mittleren Bilayerdicke von 4 nm einer elektrischen Feldstärke von $2 \cdot 10^7$ V/m.



(a) Zusammensetzung des elektrischen Potentials Ψ : $\Delta\Psi$ aus der Differenz von Anionen- und Kationenkonzentration zwischen den Wasserphasen, Ψ_s durch geladene Residuen im Interface-Bereich, Ψ_d durch Orientierung von polaren Gruppen des Lipids und des Wassers (nach [37])

(b) Beiträge zum Dipolpotential eines Lipidmoleküls (DPPC): polare Gruppen und assoziiertes Wasser (nach [61])

Abbildung 1.5: Elektrostatik von Lipidmembranen

Das aus der Orientierung von polaren Gruppen im Lipid und der Orientierung von Wassermolekülen resultierende **Dipolpotential** Ψ_d zwischen dem Bilayerinneren und der Oberfläche ist mit ca. 220–280 mV (gesättigte PC-Membranen) noch erheblich größer [37]; die resultierenden Feldstärken betragen 10^8 – 10^9 V/m.

Das Dipolpotential eines einzelnen PC-Moleküls (Abb. 1.5(b)) setzt sich vor allem zu-

sammen aus den Beiträgen der Carbonylgruppen, den terminalen Methylgruppen der Fettsäureketten und dem Phosphat in der Kopfgruppe und summiert sich auf 5–10 D⁴ in Richtung der Membrannormalen [103].

Ein einzelnes H₂O-Molekül hat ein Dipolmoment von 1,855 D; durch Orientierung von Wassermolekülen an der Bilayeroberfläche kann sich das Dipolpotential der Membran um bis zu 5–10 D erhöhen [61]. Auf den Beitrag der Wasserorientierung zur Hydratationskraft zwischen Membranen wird in Kapitel 2.2.3 eingegangen.

Durch Hydratisierung der Lipidschichten mit deuteriertem Wasser (D₂O) ist die Orientierung oberflächenassoziierter Wassermoleküle ein leicht zugänglicher Parameter in der Deuterium-NMR Spektroskopie.

Aufgrund der geringen Dielektrizitätszahl $\epsilon \approx 2$ im Inneren von Lipidmembranen fällt das elektrische Feld erst in der angrenzenden Wasserphase ($\epsilon \approx 80$) sowie durch darin assoziierte Gegenladungen über einen Bereich von 2–3 nm weitgehend ab. Lagert sich nun z. B. ein Protein oder Peptid an die Membran an, so wird ein Teil des Wassers verdrängt und damit einerseits das Dipolpotential beeinflusst, andererseits die Abschirmung des elektrischen Feldes herabgesetzt [103, 199].

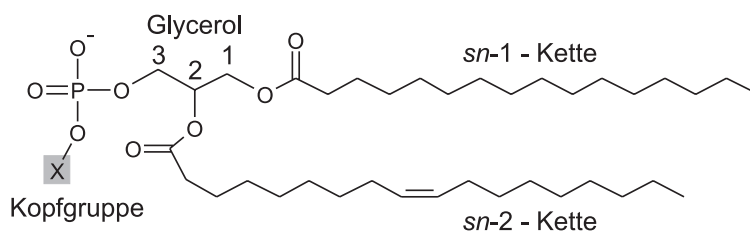
Die obigen Aussagen gelten für *in vitro*-Untersuchungen an weitgehend homogenen Lipidschichten. Diese Ergebnisse können nur begrenzt auf reale Membranen übertragen werden. Wassermoleküle in hydrophilen Taschen von eingebauten Proteinen sowie die relativ hohe Konzentration von gelöstem Sauerstoff [183] oder anderen kleinen Molekülen im Bilayer können die effektive Dielektrizitätszahl deutlich erhöhen und damit die elektrischen Feldstärken reduzieren.

⁴ 1 D = 1 Debye = $3,336 \cdot 10^{-30}$ C/m

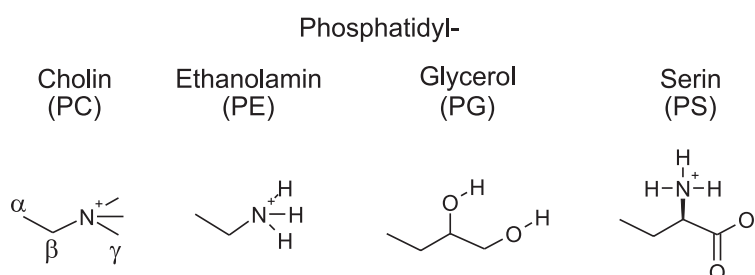
1.3 Untersuchte Lipide

Im folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Lipide kurz vorgestellt. Aufgrund der Relevanz für die Interpretation der Meßergebnisse in Kapitel 6 wird die Geometrie des Interface-Bereichs von Sphingomyelin näher diskutiert.

Phosphatidylcholin (PC) ist das häufigste Lipid in der Eukaryontenmembran. Abbildung 1.6 zeigt die allgemeine Struktur von Glycerol-Phospholipiden sowie die in dieser Arbeit untersuchten Subspezies, die sich nur in der Kopfgruppe unterscheiden.



(a) Kettenbereich (Palmitoyl-/Oleoyl-Ketten)



(b) Kopfgruppenbereich

Abbildung 1.6: Struktur und Nomenklatur von Glycerol-Phospholipiden

An das Glycerolgerüst sind über Esterbindungen die Fettsäureketten angehängt. In natürlich vorkommenden Glycerol-Phospholipiden ist die *sn*-1-Kette zu 90–95 % gesättigt, während die *sn*-2-Kette meist ungesättigt auftritt; nur in weniger als 10 % der Moleküle sind *sn*-1 und *sn*-2-Kette gleichzeitig ungesättigt [180]. Das Glycerolgerüst von aggregierten Glycerophospholipiden steht nahezu senkrecht zur Membranoberfläche, deshalb weist der Beginn der *sn*-2-Kette stets einen „Knick“ auf.

Cardiolipin (CL) ist eine Ausnahme unter den Phospholipiden: zwei Phosphatidsäurereste sind über ein Glycerolgerüst verbrückt, damit hat CL vier Fettsäureketten. Die Verteilung der Kettenlängen ist bei dem hier verwendeten Präparat aus Rinderherzen relativ homogen: 80 % bestehen aus 18:2 $\Delta^{9,12}$ -Ketten [166]. Die beiden Phosphatgruppen sind ionisierbar mit sehr unterschiedlichen pK-Werten ($\text{pK}_1 = 2, 8$; $\text{pK}_2 > 7, 5$). Bei neutralem pH sind also 1–2 Phosphatgruppen negativ geladen [174] und können, gemeinsam mit den Carbonylgruppen der Esterbindungen und der zentralen Hydroxylgruppe, zahlreiche inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden [18, 174].

Cardiolipin kommt nur in Prokaryonten und in der inneren Mitochondrienmembran in größeren Mengen vor, wo es vermutlich eine besondere Rolle bei der Speicherung freier Ladungen bei der oxidativen Phosphorylierung spielt.

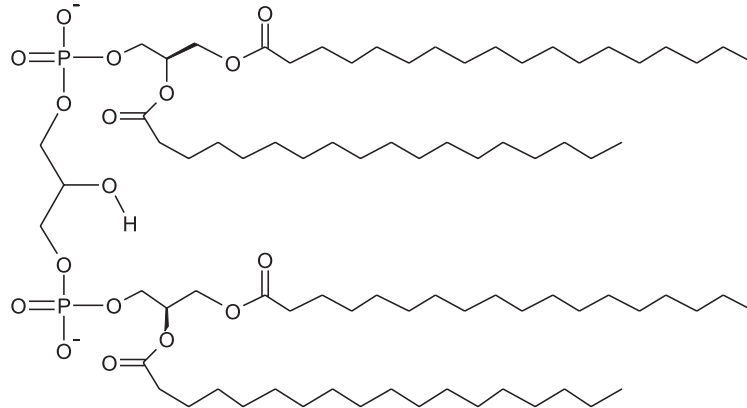


Abbildung 1.7: Struktur von Cardiolipin: 2 Phosphatidsäuren sind über ein Glycerol-Gerüst verbrückt, an dem sich eine labile Hydroxylgruppe befindet

Das Proton der zentralen Hydroxylgruppe (im folgenden als „labile OH-Gruppe“ bezeichnet) ist chemisch labil, d. h. es tauscht schnell mit dem umgebenden Wasser aus.

Cholesterol (Chol) ist ein Sterol, das in größeren Mengen in der Lipidmembran vorkommt und deren physikalische Eigenschaften stark modifizieren kann.

Es besitzt gegenüber anderen Sterolen (z. B. Lanosterol, Ergosterol) eine optimierte Geometrie für van-der-Waals-Wechselwirkungen [16] mit Membranlipiden: die 4 fusionierten Ringstrukturen liegen in einer Ebene und erlauben nur eine geringe Flexibilität; die polare 3β -Hydroxylgruppe richtet das Molekül parallel zu den Fettsäureketten der Lipidmatrix aus. Die Ketten der umgebenden Phospholipide werden in der L_α -Phase durch Reduktion der *trans-gauche*-Isomerisierungen und Erhöhung der *trans*-Anteile geordnet [159].

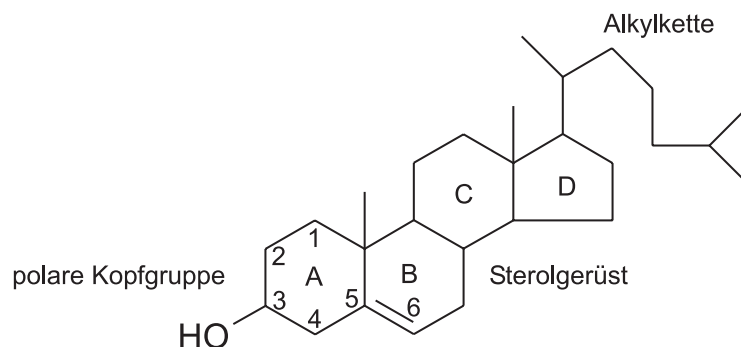


Abbildung 1.8: Struktur von Cholesterol: 4 planar fusionierte Ringstrukturen mit einer polaren Hydroxylgruppe

In Abbildung 1.8 ist die Nomenklatur der Sterolringe sowie der ersten 6 Kohlenstoffe eingetragen. Das Proton der 3β -Hydroxylgruppe tauscht schnell mit dem umgebenden

Wasser aus. Das 3α -Proton wurde in der vorliegenden Arbeit für einige Proben selektiv deuteriert (zur Präparation s. Kap. 3.1).

Sphingomyelin (SM) (*N*-Acylsphingosin-1-Phosphorylcholin) ist PC insofern ähnlich, als beide eine zwitterionische Cholin-Kopfgruppe, einen ausgeprägten Interface-Bereich und einen geometrischen Packungsparameter $P \approx 1$ (Kap. 2.1.3, S. 20) über einen weiten pH- und Ionenstärke-Bereich haben.

Der Unterschied liegt vor allem im Acylketten- und Interfacebereich: in PC-Membranen wird der Knick und die Doppelbindung der *sn*-2-Kette durch eine höhere Kettenlänge kompensiert, so daß beide Ketten effektiv etwa gleich lang sind. Sphingomyelin dagegen besitzt nur eine Acylkette, die über eine Amidbindung an die primäre Aminogruppe des Sphingosin-C2 gebunden ist; die zweite Kette ist bei natürlichem SM ein *D-erythro* (2S, 3R) Sphingosin mit einer *trans*-Doppelbindung zwischen den Positionen C4 und C5 [7]. Daraus resultiert ein zum Teil erheblicher Unterschied in den Kettenlängen: 50% der Acylketten sind sehr lang (\geq C18, s. Tabelle 1.2). Daraus und aus der im Vergleich zu PC wesentlich höheren Sättigung resultieren hohe Phasenübergangstemperaturen T_m im physiologisch relevanten Bereich von 30–45 °C.

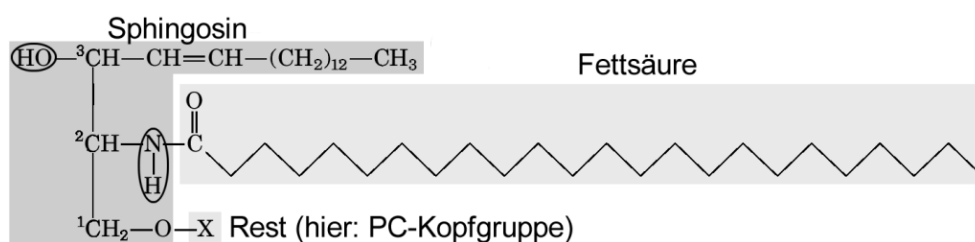


Abbildung 1.9: Struktur von Sphingomyelin; OH- und NH-Gruppe hervorgehoben

Die Verteilung der Acylketten variiert stark nach Hersteller und Präparation; als Demonstration sind in Tabelle 1.2 mehrere Analysen für SM aus Rinderhirn (*bovine brain*) und Eigelb (*egg yolk*) für Präparate desselben Herstellers zusammengefaßt:

Fettsäure	bovine brain SM (Avanti)			egg yolk SM (Avanti)		
	Katalog	nach [109]	nach [157]	Katalog	nach [109]	nach [157]
16:0	1,7	2,4	3–4	83,9	86	68
18:0	45,5	63	43	6,3	4,8	12
20:0	5,1	6,6	6	1,8	1,1	5
22:0	7,2	9,2	8,3	3,8	2,5	5
24:0	6,0	6,1	6	4,2	1,0	10
24:1	6,3	13	28	–	4,2	
andere	28,2	–	6	0,4	–	–

Tabelle 1.2: Fettsäureverteilung bei Sphingomyelin (in %)

Im Interface-Bereich kann die Amidbindung als Donor und Akzeptor, die freie Hydroxylgruppe als Akzeptor von Wasserstoffbrücken fungieren. Damit ist die Fähigkeit zu inner-

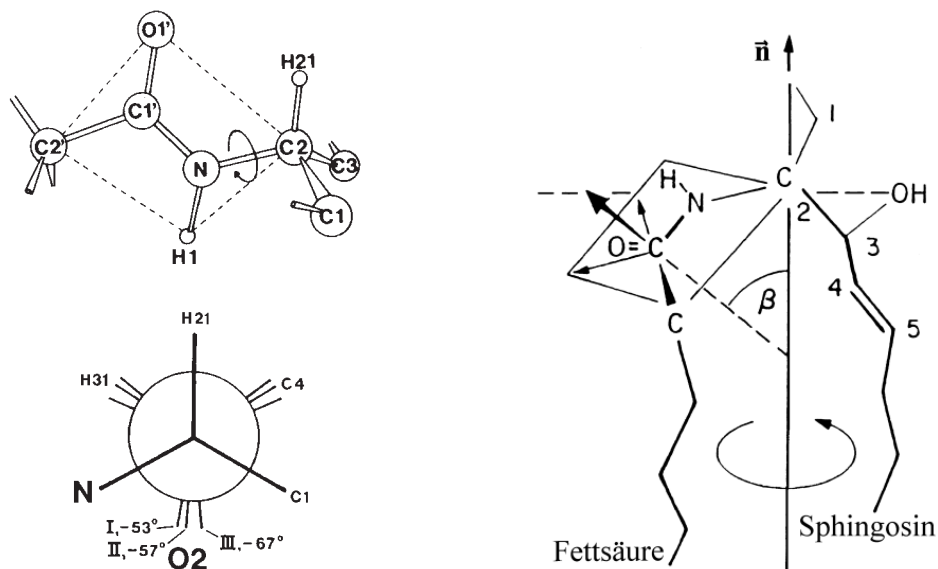
und intermolekularer Verbrückung wesentlich höher als bei PC, wo mit den 2 Ester-Carbonylen und der Phosphatgruppe nur H-Brücken-Akzeptoren vorliegen, die Wasser als Mediator für intra- und intermolekulare Wechselwirkungen benötigen.

Geometrie des Interface-Bereichs von Sphingolipiden

Die außergewöhnlichen Eigenschaften von Sphingolipiden rühren in erster Linie von der Struktur des Interface-Bereichs her; deshalb werden im folgenden Literaturdaten zu dieser Thematik zusammengefaßt:

Aus der Familie der Sphingolipide existieren nur für das **Ceramid** Röntgenstrukturdaten [144]. Bei Ceramid befindet sich anstelle der Cholin-Kopfgruppe von SM nur eine Hydroxylgruppe; dadurch hat das Molekül eine konische Struktur ($P > 1$) und eine starke Tendenz zur Bildung von Nicht-Bilayer-Phasen [53].

Abbildung 1.10(a) zeigt das aus den Strukturdaten abgeleitete Modell für den Interface-Bereich von wasserfreiem Ceramid:



(a) Konformation der Amidgruppe und seine *-syn-clinale* Stellung zur 3-OH-Gruppe nach [144]

(b) Orientierung der Amidebene in Sphingomyelin nach [160]

Abbildung 1.10: Struktur des Interface-Bereichs von Ceramid und Sphingomyelin

Die **Amidgruppe** hat nach Pascher [144] eine zentrale Bedeutung für das ganze Molekül:

- Sie ist Teil einer starren, planaren Struktur aus 6 Atomen (analog einer Peptidbindung), die die beiden Kohlenwasserstoffketten verbindet. Diese stehen senkrecht zur Amidebene, d. h. für eine parallele Kettenausrichtung muß die Fettsäurekette an den Positionen C1–3 (Abb. 1.10(b)) abgknickt sein.
- Sie liegt in einer Resonanzstruktur vor, die zu einem partiellen Doppelbindungscharakter der CO–NH Bindung führt; dadurch sind Rotationen um die Bindungsachsen

energetisch sehr ungünstig. Aus sterischen Gründen nehmen die Atome C2 und C2' in Abbildung 1.10(a) sowie der Carbonyl-Sauerstoff O1' und der Stickstoffgebundene Wasserstoff H1 eine *trans*-Konformation ein.

- Die Orientierung der Amidebene bezüglich der Sphingosinkette wird durch den Torsionswinkel der C2–N Bindung festgelegt. Aus sterischen Gründen ist diese Rotation stark eingeschränkt.
- Laterale Wasserstoffverbrückung zwischen Amid- und Hydroxylgruppen beeinflusst die Stabilität und Permeabilität von Ceramidmembranen. In Membranen mit hohem physikalischen Streß ist der Anteil an Sphingolipiden mit mehr als einer Hydroxylgruppe deshalb deutlich höher.

Die **Hydroxylgruppe** an der C3-Position liegt bezüglich der Amidgruppe bevorzugt in einer *–syn-clinalen* Konformation vor [144]. Die römischen Ziffern in Abbildung 1.10(a) unten beziehen sich auf unterschiedliche Sphingolipide⁵; offensichtlich ist diese Anordnung wenig abhängig von molekularen Details der Lipide.

Ruocco et al. leiteten aus der Anisotropie der chemischen Verschiebung des ¹³C-markierten Carbonyl-Kohlenstoffs die Struktur von Palmitoyl-Cerebrosid bei voller Hydratation mit Festkörper-NMR ab (Abb. 1.10(b)):

Die planare Peptidstruktur O=C–N–H ist um einen Winkel $\beta = 38\text{--}55^\circ$ gegen die Bilayernormale gekippt, zu der die Achse C1–C5 des Sphingosins ungefähr senkrecht steht. Damit ist die Hydroxylgruppe zum hydratisierten Interface orientiert. Die Orientierung vom Molekül weg ist typisch für die natürliche D-*erythro*-Konfiguration⁶ [102] und erleichtert starke Wechselwirkungen mit den Nachbarmolekülen. Bei der L-*threo* Konfiguration sind H und OH an der C3-Position des Sphingosin vertauscht. Damit ist beim L-*threo* Isomer eine volle Rotationsfreiheit um die C1–C2 Bindung möglich, die beim D-*erythro* Isomer sterisch eingeschränkt ist [26].

Im Gegensatz dazu konnten Miller et al. [131] mit Circular dichroismus-Untersuchungen an Cerebrosiden und Sphingomyelinen bestätigen, daß die Amidgruppe fast senkrecht zu den Kohlenwasserstoffketten und damit zur Membrannormale steht. Ähnlich der Anordnung in einem β -Faltblatt alterniert der Winkel β zwischen 81 und 99°.

⁵ I: N-tetracosanoyl-Phytosphingosin; II: Glycosyl-Phytosphingosin-Hydrochlorid; III: Sphingosin-Hydrochlorid

⁶ SM hat im Interface-Bereich 2 optische Zentren, es existieren also 4 Stereoisomere: D/L-*erythro/threo*-SM.

1.4 Domänenbildung

In den letzten Jahren hat die Frage nach Domänenbildung im Bilayer erneut große Beachtung gefunden (siehe [10] für eine Übersicht). Ausgangspunkt war die Entdeckung, daß die Plasmamembran Domänen enthält, die reich an Sphingolipiden und Cholesterol sind. In diesen können sich Proteine anreichern, die mit der Signaltransduktion sowie der Endo- und Exozytose verknüpft sind.

Bei der Diskussion der Domänenbildung geht es aus biophysikalischer Sicht vor allem um folgende Fragen:

- Unter welchen Umständen treten bei reinen Lipidmischungen Koexistenzbereiche von gelförmigen und flüssigen Phasen auf, und welche Rolle hat dies z. B. auf die Konformation von Transmembranproteinen oder die Aktivität von Enzymen?
- Welche Rolle spielt Cholesterol in diesen Aggregaten? Können die von Chol z. B. in DPPC induzierten *liquid ordered* (l_o)-Phasen [198] auch bei anderen Lipiden wie SM oder ungesättigten PCs beobachtet werden?
- Ist die beobachtete Unlöslichkeit von SM/Chol-reichen Membranen in Triton X-100 bei 4 °C ein Artefakt oder zeigen diese Systeme auch bei physiologischen Temperaturen Besonderheiten?
Spielt der Anstieg des Anteils an Sphingolipiden im Alter oder der Gehalt an freiem Cholesterol eine besondere Rolle bei der Entstehung von Krankheiten?
- Welche Zeit- und Größenmaßstäbe regieren diese Domänen?

1.4.1 Lipid-Lipid – Domänen

Gawrisch et al. [59] zeigten, daß sich Lipide durch Dehydratation entmischen können. Bei abnehmender Hydratation ändert sich die Wasseraktivität a_w und damit die Energetik der Wechselwirkung zwischen gleichen und verschiedenen Lipiden. Entmischung tritt dann auf, wenn die Abnahme der Freien Energie ΔF durch stärkere Lipid-Lipid-Wechselwirkung größer ist als der Gewinn an Entropie durch eine stochastische Verteilung. Ähnliches gilt für die Interaktion von Lipiden mit geladenen Peptiden.

Sackmann et al. [163] wiesen darauf hin, daß eine mögliche Phasentrennung von Lipiden ein ganz neues Spektrum von Vesikelgeometrien schafft. Domänen sind in keiner Weise stabil gegen Änderungen der äußeren Bedingungen: so führt eine lokale mechanische Spannung, etwa beim Kontakt zweier Vesikel, dazu, daß vor allem solche Lipide zur Kontaktstelle diffundieren, die dieser Spannung entgegenwirken.

Bisherige Untersuchungen zur Domänenbildung konzentrierten sich vor allem auf binäre PC-Mischungen mit stark unterschiedlicher Kettenlänge (*chain mismatch*) und daraus resultierenden Unterschieden in T_m . Phasenseparation in Membranen mit nur einer Lipidsorte wurde für niedrige Hydratationen beobachtet [87, 93, 192], jedoch nicht systematisch untersucht.

1.4.2 Cholesterol im Bilayer

Cholesterol ist das wohl am häufigsten untersuchte Molekül, das in Lipidschichten wohldefinierte Subphasen induziert. Seine primäre Rolle liegt in der Regulierung der Mem-

branfluidität: es reduziert die Unterschiede von Gel- und L_α -Phase, indem es die erstere flexibler, die letztere fester macht. Das planare Sterolgerüst ist parallel zu den hydrophoben Acylketten der Lipide angeordnet und schränkt ihre *trans/gauche*-Isomerisierung ein, ohne die laterale Beweglichkeit der Lipide zu ändern. Damit wird die Membran im Mittel steifer und dicker [44] und für kleine Moleküle undurchlässiger.

Cholesterol ist nach Molanteilen der am häufigsten auftretende Membranbaustein in der Säugetiermembran (> 20 mol-% in der Plasmamembran, ca. 8 mol-% im Golgiapparat, 6 mol-% im ER [156])⁷; damit liegt es nahe, daß es neben der globalen Kontrolle der Fluidität weitere Aufgaben in der Membran hat.

Die Stärke der Wechselwirkung von Cholesterol mit den verschiedenen Phospholipidklassen nimmt in der Reihenfolge

$$\text{SM} \gg \text{PS, PG} > \text{PC} \gg \text{PE}$$

ab [41]. Damit ergeben sich Möglichkeiten für eine inhomogene Verteilung des Sterols in der Membran, d. h. für Domänen lokal veränderter Fluidität. Da die meisten Proteine Cholesterol-arme Domänen bevorzugen, könnte die laterale Unterteilung in Domänen einen großen Einfluß auf Verteilung und Funktion von Membranproteinen haben [41].

Computersimulationen von DPPC mit und ohne 12,5 mol-% Cholesterol [191] haben ferner gezeigt, daß bereits geringe Mengen des Sterols das Dipolpotential des Bilayers durch eine leichte Umlagerung der Lipidkopfgruppe und eine verstärkte Orientierung der Wasserdipole an der Grenzfläche deutlich erhöhen.

1.4.3 Ein spezieller Fall: *lipid rafts*

Unter *lipid rafts* versteht man Komplexe aus Sphingolipiden und Cholesterol [159]. Sie werden dadurch charakterisiert, daß sie, zusammen mit eingebetteten Proteinen, bei niedrigen Temperaturen (4 °C) nicht durch das Detergens Triton X-100 aufgelöst werden können. *Lipid rafts* werden vor allem in den **Caveolae** gefunden, mit dem Protein Caveolin ausgekleidete Membraneinstülpungen mit einem hohen Anteil an Sphingolipiden und freiem Cholesterol [159]. Caveolae haben einen Durchmesser von 60–80 nm und sind auf der Oberfläche der meisten peripheren Zellen zu finden [54].

Lipid rafts werden in zahlreichen Fällen als Mediator pathogener Veränderungen von Proteinen vermutet:

- In **arteriosklerotischen Plaques** stellen Sphingolipide bis zu 75 % aller Phospholipide [140] und assoziieren dort stark mit Cholesterol.
- Das *Amyloid Precursor Protein* (APP), das eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der **Alzheimer-Krankheit** spielt, reichert sich teilweise in *lipid rafts* an [178]. Nachgewiesen ist auch eine genetische Verbindung von Cholesterol-Metabolismus und Alzheimer-Anfälligkeit sowie eine um 50 % geringere Häufigkeit der Krankheit bei regelmäßiger Einnahme von nicht-steroidalen Entzündungshemmern (z. B. Aspirin), die über ihre Wirkung auf die Synthese von Derivaten der Arachidonsäure den Cholesterolspiegel senken [119].

⁷ In der Bakterienmembran fehlt Cholesterol – ein Hinweis darauf, daß es zur Funktionalität von Zellmembranen ursprünglich nicht benötigt wurde und vielmehr eine evolutionäre Weiterentwicklung darstellt.

- Die Umwandlung des zellulären Prion-Proteins PrP^C in die pathogene Isoform PrP^{Sc} führt zur **Scrapie-Krankheit** bei Schafen, deren Analoga die **bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)** bei Rindern bzw. die **Creutzfeld-Jakob-Erkrankung** beim Menschen sind. Diese Umfaltung der Proteinstruktur wird auf *raft*-Domänen in den sekundären Lysosomen vermutet [135], den Zellorganellen zum Abbau von fremdem oder überschüssigem Material. Eine Erhöhung des SM-Gehalts führt zu einer geringeren Bildung von PrP^{Sc} und umgekehrt. Cholesterol- und SM-Spiegel sind jedoch positiv miteinander korreliert [2, 180].
- Auf der Oberfläche von **HIV-Viren** reichern sich Cholesterol und Sphingomyelin gegenüber der Wirtszelle signifikant an [180].

Sphingolipide, also Sphingomyelin und Glycosphingolipide, werden auf der *cis*- oder *Bildungsseite* des Golgiapparats synthetisiert [1] und dann zur *trans*-Seite transportiert, wo sie vermutlich mit Cholesterol assoziieren. Die Gründe für die Wechselwirkung gerade zwischen Sphingomyelin und Cholesterol sind noch nicht vollständig aufgeklärt; da SM jedoch vorwiegend lange gesättigte Fettsäureketten hat, kann man annehmen, daß die van-der-Waals-Anziehung zwischen den Acylketten des Lipids und dem planaren Sterolgerüst besonders hoch ist [180]. Darüberhinaus kann SM sowohl als Akzeptor (Amidgruppen) als auch als Donor (Hydroxyl-, Carbonyl- und Phosphatgruppen) von Wasserstoffbrücken fungieren; damit sind auch besonders starke Wechselwirkungen zur polaren 3β -OH-Gruppe des Cholesterols möglich [18].

Auffallend ist, daß sich der SM-Gehalt im menschlichen Organismus mit dem Alter auf Kosten von PC zum Teil drastisch erhöht: in der Aorta steigt das Verhältnis SM/PC von 0,4 bei der Geburt auf 2,4 bei 90-jährigen; SM kann hier bis zu 80 % aller Phospholipide ausmachen [6, 140]. Im menschlichen Gehirn wird ebenfalls PC allmählich durch SM und Cerebroside⁸ ersetzt; in den Augenlinsen steigt der SM-Gehalt auf bis zu 70 % der Phospholipide, während PC auf bis zu 5 % abnimmt [140]. Allgemein nimmt bei Membranlipiden mit dem Alter das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäureketten deutlich zu [6].

Da die Phasenübergangstemperatur aller Sphingomyeline bei 30–45°C, d. h. im physiologisch relevanten Bereich, liegt [5], ist mit dem Anstieg des SM-Gehalts ein wesentlich komplexeres Phasenverhalten zu erwarten. Im allgemeinen sind Membranviskosität und SM-Gehalt positiv korreliert [6]; so nimmt beispielsweise bei Erythrozyten die Stabilität der Membranen mit dem SM-Anteil zu und die Permeabilität gegenüber Nicht-Elektrolyten ab.

1.4.4 Biophysikalische Rolle von Domänen

Die höhere Ordnung der Fettsäureketten in Domänen führt zu einer gegenüber dem restlichen Bilayer erhöhten Dicke und mittleren Kettenorientierung. Eine Konsequenz daraus ist ein Ring von Defekten in der Übergangszone zu weniger geordneten Bereichen; diese erzeugen lokal eine hohe Verzerrungsenergie, die die Diffusion von kleinen Molekülen in und an der Membran um Größenordnungen beschleunigt [162]. Enzymatische Prozesse erreichen damit an den Randbereichen von Domänen eine wesentlich höhere Effizienz. Es konnte gezeigt werden, daß die Phospholipase A₂ in DPPC-Membranen entlang der Defektlinien von Gelphasendomänen arbeitet [63].

⁸ Cerebroside sind Ausgangs- und Abbauprodukt von Sphingomyelin.

Eine Änderung ΔA der Enzymoberfläche durch die Verzerrungsspannung entlang von Defektlinien geht quadratisch in den exponentiellen Term der Michaelis-Menten-Gleichung für die Enzymaktivität ein [162], d. h. auch dieser Effekt der Domänenbildung hat ein enormes Steuerungspotential für biochemische Prozesse.

1.5 Proteine an und in Membranen

1.5.1 Überblick

Proteine bilden etwa 50 % der Membranmasse. Sie sind über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Membranoberfläche gebunden oder durchspannen den Bilayer als integrale Membranproteine (IMP). IMPs sind meist über eine hydrophobe polypeptide Transmembrandomäne relativ fest gebunden [142]; die Art der Bindung – hydrophobe Wechselwirkung mit den umgebenden Lipiden – gewährleistet eine hohe Sensibilität für das Mikromilieu. In einzelnen Fällen konnte bereits eine Abhängigkeit der Proteinaktivität von der Lipidzusammensetzung, der Mikroviskosität, dem Phasenzustand oder der lokalen Krümmungsenergie gezeigt werden (in [162]). Aufgrund der Komplexität der Lipidhomöostase ist zu vermuten, daß derartige Regelungsmechanismen weit verbreitet sind und nur bis jetzt *in vivo* selten nachgewiesen werden konnten.

Für die Wechselwirkung von Membranen mit Proteinen können drei sehr unterschiedliche Bereiche definiert werden [70, 142]:

- Der Bereich der Fettsäureketten (*hydrocarbon core*, ca. 25–30 Å) ist eine Newtonsche Flüssigkeit⁹ mit Wechselwirkungsenergien von ca. $k_B \cdot T$. Die Viskosität η ist reziprok zum freien Volumen, d. h. sie ist hoch bei gesättigten Lipiden oder in Anwesenheit von Cholesterol. Die statische dielektrische Permittivität ϵ der Kettenregion liegt bei ca. 2, kleiner also als im Inneren der Proteine ($\epsilon = 3-5$).
- Der Übergangsbereich zu den Kopfgruppen (*interface*) zeigt einen großen Fluiditätsgradienten sowie eine Zunahme von ϵ auf ca. 10–30. Die Wechselwirkungen sind vor allem elektrostatischer und ionischer Natur und damit wesentlich stärker und gerichteter als im *hydrocarbon core*. Wasserstoffbrücken verstärken die Bindungen und stellen Kurzschlußleitungen für den Ladungstransport dar. Über ihren Einfluß auf die Elektrostatik ist wenig bekannt.
- Das freie Volumen (*bulk*) außerhalb der Lipidbilayer ist oft nicht „frei“, sondern z. B. bei der Plasmamembran durch die Glycocalix bzw. das Zytoskelett eingeschränkt. Allerdings konnte nur ein geringer Einfluß dieser Schicht auf die Beweglichkeit des oberflächennahen Wassers festgestellt werden [12].

Die Mikroviskosität hat einen direkten Einfluß auf die Zellphysiologie [142]: eine Erhöhung von η verlangsamt die Zellteilung; Krebszellen haben ein besonders niedriges η . Die Aktivierungsenergie von Proteinen ändert sich in dem Bereich, in dem die Lipidmembran ihre Phaseneigenschaften ändert.

Der Einfluß der spontanen Krümmung ρ_0 konnte bei Alamethin-Kanälen in einer DOPC/DOPE-Mischung gezeigt werden: die Zeit, in der ein Kanal in der geöffneten Stellung bleibt, variiert exponentiell mit ρ_0 [90].

⁹ Die Viskosität η ist für ein gegebenes System nur abhängig von der Temperatur.

1.5.2 Art und Funktion der Lipid–Protein–Wechselwirkung

Lipid–Protein–Wechselwirkungen in der Membran sind beispielhaft für die Interaktion von Ursache und Wirkung in biologischen Systemen: derselbe Mechanismus, der eine Wechselwirkung veranlaßt, wird durch diese selbst solange modifiziert, bis die Freie Energie des Gesamtsystems minimal ist.

Hydrophobic mismatch: Eine Voraussetzung für das Funktionieren von Transmembranproteinen ist die optimale Einbettung in die Lipidmatrix. Ist der hydrophobe Bereich des Proteins länger oder kürzer als der der Lipidmembran, so werden aus der Membran diejenigen Lipide in die Umgebung des Proteins diffundieren, die am ehesten diese Lücke schließen können. Die mittlere Membrandicke in der Umgebung des Proteins paßt sich dessen hydrophobem Bereich an [132]. Andererseits ist die Länge der hydrophoben Bereiche der Proteine in den verschiedenen Zellorganellen der Fähigkeit ihrer Wirtsmembran zum *hydrophobic mismatch* angepaßt [22].

Laterale Phasentrennung: Eine Folge des *hydrophobic mismatch* ist eine lokale Phasentrennung der Lipide. Wie am Fall der *lipid rafts* gezeigt wurde, kann die Phasenseparation aber auch Ursache von (veränderten) Lipid–Protein–Wechselwirkungen sein.

Eine experimentell schwer zugängliche Fragestellung ist die Rolle des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix bei der Domänenbildung. Es ist zu erwarten, daß insbesondere ersteres die Membran lokal ähnlich den *lipid rafts* versteift [75].

Lokale Krümmungsenergie: Die Krümmungsenergie von Lipidmembranen setzt sich aus der Tendenz der Einzellipide zu nicht–planaren Strukturen zusammen und kann sich durch laterale Phasentrennung lokal verändern. Die Konformation und Aktivität von Proteinen kann durch die lokale Krümmungsenergie ebenso reguliert werden wie die Bildung von Membranausstülpungen (Endo-/Exozytose) zum interzellulären Transport [163].

Kapitel 2

Wasser

If there is magic on this planet, it is contained in water.

Loren Eiseley

2.1 Wasser als Lösungsmittel

Wasser verhält sich physikalisch ganz anders, als man aufgrund seiner Molekülgröße erwarten würde: der Siedepunkt sollte bei etwa -93 °C liegen; Oberflächenspannung, Dielektrizitätskonstante, kritische Temperatur, spezifische Wärmekapazität und latente Wärme sind deutlich höher als bei vergleichbaren Substanzen [74]. Im Gegensatz zu allen anderen Flüssigkeiten ist der Volumenausdehnungs-Koeffizient von Wasser teilweise negativ, was zu einem Dichtemaximum bei 4 °C führt.

2.1.1 Wasserstoffbrücken

Diese Anomalien haben ihre Ursache in den verbrückten Struktur des Wassers: durch die kleine Masse des Protons sind quantenmechanische Nullpunktsfluktuationen signifikant; es bilden sich delokalisierte Zustände zu den Nachbaratomen aus [168]. Diese Wasserstoffbrücken haben eine relativ hohe Energie von $10\text{--}40\text{ kJ/mol}$ [80] bei einer sehr kurzen Lebensdauer von einigen ps [68]¹. Im Mittel ist jedes Wassermolekül bei Raumtemperatur mit 3–4 Nachbarn assoziiert.

Die extrem hohe elektrische Leitfähigkeit von Wasser wurde bereits 1806 von de Grotthuis beobachtet [65] und resultiert aus einer Umwandlung von H-Brücken in kovalente Bindungen und umgekehrt, wobei am Ende einer Kette verbrückter Wassermoleküle ein Proton frei wird (*Grotthuis-* oder *hop-and-turn-Mechanismus*, s. Kap. 2.3). Eine hohe Anzahl von Defekten mit hoher Beweglichkeit erleichtert die schnelle Reorientierung der H_2O -Moleküle für den nächsten Leitungsprozeß [74]. Ein ähnlicher Mechanismus kann die hohe Leitfähigkeit von Gramicidin-Kanälen im Bilayer [151] und entlang der Bilayer-Oberfläche [74, 186] erklären.

Die Clusterung von Wassermolekülen führt darüberhinaus zu einem gegenüber den Monomeren deutlich höheren Dipolmoment ($2,4\text{--}2,6\text{ D}$ vs. $1,855\text{ D}$ [64]).

¹ Zum Vergleich: van-der-Waals-Bindung ca. 1 kJ/mol , ionische Bindung ca. 500 kJ/mol ;
 $1 k_B \cdot T/\text{Molekül} = 2,48\text{ kJ/mol}$ bei 298 K

2.1.2 Hydrophober Effekt

Die hohe Selbstkohäsion des Wassers ist die Ursache für eine der wichtigsten Strukturierungskräfte in der belebten Natur: die hydrophobe Wechselwirkung [185]. Sie ist keine Kraft im klassischen Sinne, sondern eine Folge der Entropie: Oberflächen, die nicht in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk eingebunden werden können, etwa Fettsäureketten, unterbrechen dieses und führen so lokal zu einer starken Einschränkung des Konformationsraums (Abb. 2.1(a)), d. h. zu einer geringeren Entropie. Die hydrophobe Wechselwirkung bewirkt, daß gelöste Moleküle so aggregieren, daß der Entropieverlust minimiert wird.

Bei Lipidmolekülen wird die Abschirmung der Kohlenwasserstoffketten vom Wasser oft zusätzlich dadurch begünstigt, daß die Kopfgruppen untereinander und mit dem Wasser durch H-Brücken vernetzt sind [18].

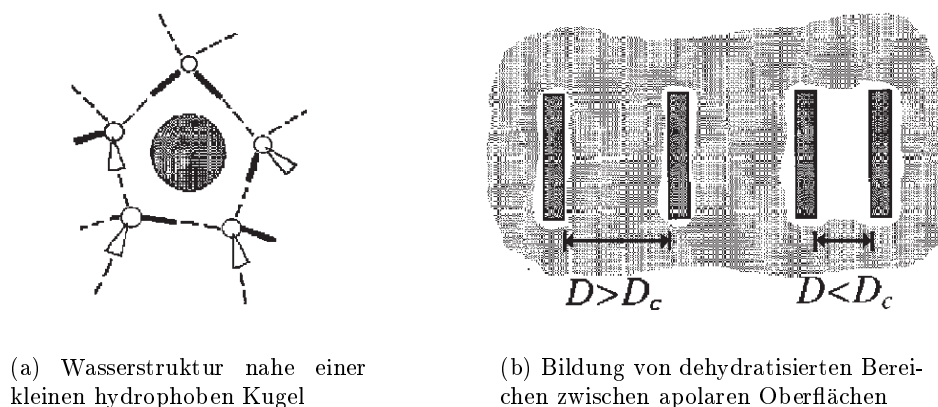


Abbildung 2.1: Hydrophober Effekt: Unterbrechung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes durch apolare Moleküle (nach [115])

Zwischen gegenüberliegenden großen apolaren Oberflächen im Abstand D kann durch den hydrophoben Effekt und durch Fluktuationen dieser Oberflächen die Bewegungsfreiheit der Wassermoleküle so weit eingeschränkt sein, daß bis zu einem Abstand $D_c \approx 100$ nm Wasser aus dem Zwischenraum verdrängt wird [115].

2.1.3 Aggregationsformen von Lipidmolekülen

Welche Formen aggregierte Lipidmoleküle in Lösung ausbilden, hängt auch von geometrischen Faktoren ab (Abb. 2.2). Zu einer groben Abschätzung kann dazu aus der mittleren Kopfgruppenfläche A , der Kettenlänge l_c und dem Volumen v des Kohlenwasserstoffbereichs ein Packungsparameter P definiert werden [80]:

$$P = v / (A \cdot l_c) \quad (2.1)$$

Lipidmoleküle, deren Kopfgruppe und Fettsäuren in etwa den gleichen Radius beanspruchen ($P \approx 1$), bilden lamellare Phasen aus; andernfalls ist eine Vielzahl von mizellären, vesikulären oder anderen Phasen möglich.

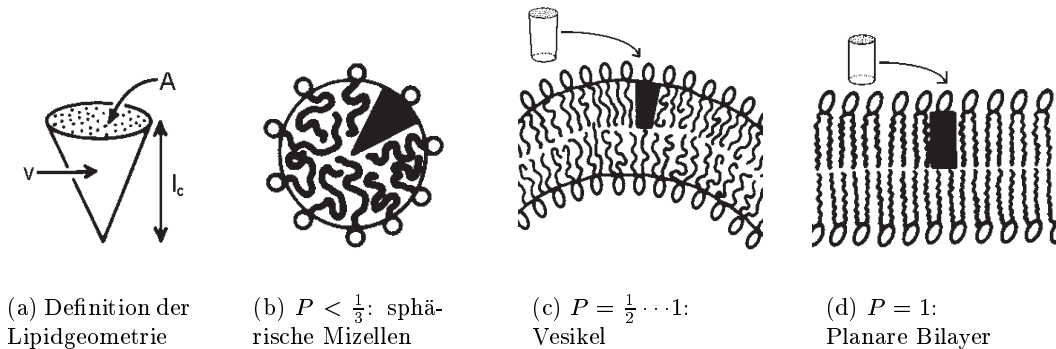


Abbildung 2.2: Abhängigkeit der Lipidphase vom Packungsparameter $P = v/(A \cdot l_c)$ (nach [80])

Die geometrischen Faktoren können von der Wechselwirkung der Kopfgruppen untereinander sowie vom Sättigungsgrad der Ketten modifiziert werden [127].

2.1.4 Unterschiede H_2O – D_2O

D_2O bildet aufgrund seiner höheren Molekülmasse stabilere Wasserstoffbrücken als H_2O [168]. Ein Austausch des Lösungsmittels H_2O gegen D_2O beeinflusst vor allem die Temperatur T_{pre} des Vorübergangs von vollhydratisierten Lipiden: bei DSPC (Distearoyl-Phosphatidylcholin) nimmt T_{pre} in D_2O um 2 K, T_m um 0,5 K ab [36].

Eine Deuterierung der Lipide senkt die Phasenübergangstemperatur T_m z. B. bei DPPC von 41,25° C auf 37,75° C bei $d62$ -DPPC [198]².

Die dielektrische Substruktur von Membranen, insbesondere im Kopfgruppenbereich, wird von einem Austausch von H_2O gegen D_2O in PC und PC/Cholesterol-Mischungen nicht verändert [38].

² $d62$ -DPPC: beide Fettsäureketten sind vollständig deuteriert.

2.2 Wasser an der Membranoberfläche

2.2.1 Schalenmodell

Finer und Darke [55] leiteten anhand von ^2H -NMR Untersuchungen von D_2O -hydratisiertem EYPC, EYPE und PS aus dem Verlauf der Quadrupolaufspaltung $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ des interlamellaren Wassers als Funktion der reziproken Hydratation $1/n_w$ ($n_w = \text{Mol Wasser/Mol Lipid}$) die Existenz verschiedener Hydratationsschalen ab, die sie als „*Bound Water*“, „*Trapped Water*“ und „*Bulk Water*“ bezeichneten:

- *Bound Water* ist kurzzeitig fest an die Membranoberfläche gebunden; dadurch ist der Dipolvektor des Wassermoleküls im Mittel senkrecht zum Bilayer orientiert und trägt zur Quadrupolaufspaltung $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei. Bei PC sind dies ca. 11 Wassermoleküle pro Lipidmolekül.
- *Trapped Water* wird in seiner Bewegung durch die Oberfläche beeinflusst, aber nicht orientiert. Bei PC sind dies weitere 11 Wasser pro Lipidmolekül.
- *Bulk Water* verhält sich wie freies Wasser; die Quadrupolaufspaltung ist aufgrund der isotropen Bewegung zu 0 gemittelt.

Nach diesem Modell werden mit steigendem n_w die Hydratationsschalen nacheinander gefüllt. Obwohl ein ähnliches Verhalten im folgenden oft bestätigt wurde (u. a. [52, 60]), stellt es nur eine Näherung dar. Das Verhalten von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ über n_w wird für $T \gg T_m$ am besten durch eine Exponentialkurve genähert [98, 202]. Eine Auftragung nach Finer und Darke ist damit über einen bestimmten Bereich von n_w automatisch eine gute Näherung, versagt aber, wenn T_m bei niedrigen Hydratationen ansteigt und in die Nähe der Meßtemperatur kommt (s. Kap. 5).

2.2.2 Orte verstärkter Wasserbindung

Die Orientierung oberflächennaher Wassermoleküle an Membranen erfolgt über kurzlebige Wasserstoffbrücken, die sich inner- oder intramolekular organisieren können [18]:

- *Donoren* von Wasserstoffbrücken in Lipiden sind folgende chemische Gruppen: Ammonium(ionen), Alkohole, Aldehyde.
- *Akzeptoren* sind Phosphat- und Carbonylgruppen sowie Etherbindungen.
- Die Stärke von Wasserstoffbrücken nimmt für Donoren mit der Elektronegativität der Nachbaratome ($\text{S} < \text{N} < \text{O}$) und für Akzeptoren in der Reihenfolge Ether $<$ Carbonyle $<$ Amine zu.

Aus Experimenten (u. a. [18, 118]) und Simulationen (u. a. [77, 189]) weiß man, daß bei PC das Wasser vor allem mit der Phosphatgruppe, der Trimethyl-Ammoniumgruppe und den Carbonylen der Esterbindung wechselwirkt.

Obwohl die Lebensdauer intermolekularer Wasserstoffbrücken aufgrund der Bewegung des Lipids deutlich kleiner sein kann als in freiem Wasser, bewirkt die gleichzeitige Ausbildung von mehreren Wasserstoffbrücken einen ausreichend großen Kraftbeitrag, um das Phasenverhalten deutlich zu beeinflussen [18].

2.2.3 Hydratationsdruck

Die Wechselwirkung zwischen Bilayern kann für große Abstände ($d > 10 \text{ \AA}$) gut mit der klassischen Elektrostatik (*double-layer*-Theorie; Gouy-Chapman-Formalismus) beschrieben werden [33]. Für kleinere Abstände treten starke abstoßende Kräfte hinzu: der sogenannte Hydratationsdruck P_h (*hydration pressure*) und sterische Wechselwirkungen der Lipidkopfgruppen.

Der Hydratationsdruck wurde vor allem durch Experimente bei hohem osmotischen Druck bestimmt. Er fällt exponentiell mit d ab mit einer Abfalllänge $\lambda \approx 2\text{--}3 \text{ \AA}$ [143, 158].

$$P_h(d) = P_0 \exp(-d/\lambda) \quad (2.2)$$

Neben der Definition der Referenzebene für $d = 0$ [147, 177] ist vor allem die Natur dieser Kraft strittig:

Marčelja und **Radić** gehen in ihrem *purely-solvent*-Modell [122] davon aus, daß sich der Hydratationsdruck allein aus der Polarisierung der ersten Wasserlagen und nicht aus der Mikrostruktur der Oberfläche ergibt; diese Theorie konnte erst mit einer späteren Berücksichtigung der ortsabhängigen Polarisierung des Wassers [66] die Unterschiede zwischen verschiedenen Lipiden erklären. Das *surface-correlation*-Modell von **Kornyshev** und **Leikin** [95] erweitert obiges Modell um Ladungskorrelationen an der Oberfläche; damit hängt der Hydratationsdruck vor allem von der Natur des Interface-Bereichs ab.

Cevc [32] konnte aus einer Erweiterung der klassischen *double-layer*-Theorie um oberflächenassoziierte Überschußladungen ebenfalls eine exponentiell mit d abfallende Kraft in der beobachteten Größenordnung herleiten.

Israelachvili und **Wennerström** [79] behaupten, daß die Strukturierung des Wassers nur sekundär in den beobachteten Hydratationsdruck eingeht; der Effekt an sich ist rein entropischer Natur: die thermisch aktivierten Kopfgruppen werden in ihrer Bewegungsfreiheit umso mehr eingeschränkt, je näher sich gegenüberliegende Bilayer kommen. Dagegen wurde der Interface-Bereich von Marčelja und Radić sowie von Kornyshev et al. als unendlich dünn betrachtet. Dies kann experimentell [165] und aus Molekulardynamik-Simulationen [77, 120, 147] nicht bestätigt werden: der Bereich, in dem die Wasserkonzentration von 10 auf 90 % des Maximalwertes steigt, hat für PC und PE eine Ausdehnung von ca. 10 \AA .

Nach **Gawrisch et al.** [61] ist der Hydratationsdruck nicht eine Folge der ordnenden Wirkung des Dipolpotentials auf die assoziierten Wassermoleküle; beide Effekte gehen vielmehr auf eine Strukturierung des Wassers durch andere Mechanismen zurück, etwa Wasserstoffbrücken zwischen den Lipidkopfgruppen und Wasser.

Dipolorientierung an Grenzflächen unterschiedlich polarer Flüssigkeiten scheint darüberhinaus ein allgemeines Phänomen zu sein, das sich aus der lokalen Anisotropie des Dipolpotentials ergibt [133].

Das Problem bei der Beschreibung des Hydratationsdrucks liegt vermutlich in der mesoskopischen Skala der Wechselwirkungen: sie sind nicht mehr atomar, aber noch nicht ausreichend gemittelt für klar definierte makroskopische Eigenschaften. Bei mesoskopischen Systemen ist die Zahl der Atome oder Moleküle an der Oberfläche und im Volumen von der gleichen Größenordnung. Unter diesen Bedingungen sind andere thermodynamische Eigenschaften als bei ausgedehnten Körpern möglich, etwa eine negative Wärmekapazität durch einen Wechsel in der thermodynamischen Verteilungsfunktion [203].

Die fraktale Natur der Membranoberfläche steuert eine Unschärfe bei, die in der Größenordnung der charakteristischen Länge λ liegt [120]; allein dieser Effekt führt zu einer entsprechenden Unschärfe des exponentiellen Abfalls. (Die Breite des hydrophilen (Kopfgruppen-)Bereichs in Lipidmembranen liegt bei ca. $5 \pm 2 \text{ \AA}$ [32].)

2.3 Protonenleitung längs der Membranoberfläche

Der Aufbau eines Konzentrationsgradienten von Protonen sowie deren schneller Fluß von membrangebundenen Donoren zu Akzeptoren sind essentielle Eigenschaften der ATP-Synthese in den Mitochondrien [69, 154]. Die Protonen müssen akkumuliert und für eine relativ lange Zeit gespeichert werden. Diese Pufferung ist besonders effizient bei anionischen Lipiden [68, 69], die in energiekonservierenden Membran gehäuft vorkommen, vor allem PG, PA und Cardiolipin.

Die Protonenleitfähigkeit an Membranoberflächen ist experimentell schwer zugänglich; es liegen daher zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vor:

Teissié et al. [153, 187] erhielten für die Ausbreitung von Protonen an der Oberfläche von PE-Monolayern 20-fach höhere Diffusionsraten als im Volumen ($D_{\text{bulk}} = 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D_{\text{surface}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$). Im Vergleich mit anderen Lipiden nahm die Oberflächenleitfähigkeit in der Reihenfolge PE > PG > PS ab.

Gutman und Nachliel [68] stellten die Aussagekraft dieser Monolayer-Messungen prinzipiell in Frage. Sie erklären die Speicherung von Protonen an der Membranoberfläche mit der Elektrostatik von acidischen Membranen: die gegenüber dem freien Wasser verringerte Dielektrizitätszahl von oberflächenassoziierten Wassermolekülen führt zu einem langsameren Abfall der von den Kopfgruppenladungen erzeugten Potentiale. Daraus resultieren bis zu einigen 10 \AA ausgedehnte *Coulomb-cages*, d. h. Bereiche, in denen die elektrostatische Wechselwirkung für ein Ion größer als die thermische Energie ist. Bei einem Abstand benachbarter Phosphatgruppen von $7\text{--}10 \text{ \AA}$ überlappen die *Coulomb-cages* zu einer zusammenhängenden Ladungswolke; Protonen werden mit höherer Wahrscheinlichkeit aus der *bulk*-Phase angezogen und von den acidischen Phospholipiden gebunden.

Heim [74] zeigte mit Rastertunnelmikroskopie³, daß die Leitfähigkeit molekular dünner Wasserschichten auf Glimmerplättchen um bis zu 10^4 -mal höher ist als im Volumen. Erklärt wird dieser Effekt mit der Bildung eines zusammenhängenden Wassernetzwerkes durch die Immobilisierung der Wassermoleküle sowie durch eine hohe Anzahl von *dangling bonds* (nicht maximal koordinierte Wasserstoffbrücken) und anderen Defektstellen an der Oberfläche. Die resultierende hohe Dichte an elektronischen Zuständen erzeugt ein zusammenhängendes Elektronenband; die hohe Dynamik der Defekte erhöht die Elektronenleitfähigkeit zusätzlich.

³ STM, Scanning Tunneling Microscopy

2.4 Dehydratisierung von Membranoberflächen

Der Parameter, der in der vorliegenden Arbeit am leichtesten variiert werden konnte und deswegen am besten untersucht wurde, war die Membranhydratation, also die durchschnittliche Zahl n_w von Wassermolekülen pro Lipid.

Welchen Sinn macht es aber, Lipidmembranen zu dehydratisieren? Sind derartig wasserarme Systeme überhaupt von physiologischem Interesse?

- Die Wechselwirkung von Membranen untereinander und mit Makromolekülen hängt von der Orientierung der ersten Wasserschichten ab [23]; diese wirken als eine Schablone der Oberflächenstruktur auf andere wechselwirkende Moleküle [32].
- Bei der Adsorption von Proteinen an Membranen wird Wasser verdrängt, es entstehen lokal stark dehydratisierte Bereiche [162]. Es erscheint plausibel, daß die Struktur von *lipid rafts* ebenfalls vom Hydratisierungsverhalten der Phospholipide abhängt [86].
- Die Wechselwirkung von Metallionen (z. B. Ca^{2+} , Zn^{2+}) mit Membranen hat einen starken Einfluß auf die Hydratation und zeigt auch sonst Ähnlichkeiten mit starker Dehydratisierung [13].
- Dehydratisierung kann die Aktivität von Enzymen verändern, wie am Beispiel der Phospholipase A₂ gezeigt wurde [141].
- Die innere Mitochondrienmembran oder die Thylakoidmembran der Chloroplasten sind so dicht gestapelt, daß enge Membran-Membran-Kontakte mit einhergehender Verdrängung des Wassers sehr wahrscheinlich sind.
- Viele primitive Organismen können ihre Funktion auch unter extremem Wassermangel aufrechterhalten bzw. bei erneuter Hydratation wieder herstellen; dazu zählen die Austrocknung von Bakterien oder Samen oder das Einfrieren des flüssigen Wassers bei Frost [209]. Für den Gefrierschutz, z. B. in arktischen Meeresorganismen, ist eine eigene Klasse von Glycoproteinen (*Antifreeze-Proteine*) verantwortlich.
- Die lipidabhängigen Relaxationszeiten der ersten Wasserlagen können mit speziellen Pulssequenzen (z. B. *magnetization transfer*) zur Erzeugung von MRI-Kontrasten⁴ im Gehirn genutzt werden [85, 96].
- Die Energie für die Bindung der ersten Wassermoleküle an der Membranoberfläche stellt den Hauptbeitrag für die repulsive Hydratationskraft zwischen Membranen dar [121] (Kap. 2.2.3).
- Aus der hydrationsabhängigen Dynamik der Lipidkopfguppen kann auf die Wechselwirkung bei voller Hydratation geschlossen werden, vor allem auf die Rolle von Wasserstoff-Brückenbindungen [205].

Abbildung 2.3 faßt die möglichen Wechselwirkungen von oberflächennahem (orientiertem) Wasser mit der Zellmembran zusammen.

⁴ MRI: *magnetic resonance imaging* (bildgebende Kernspinresonanz)

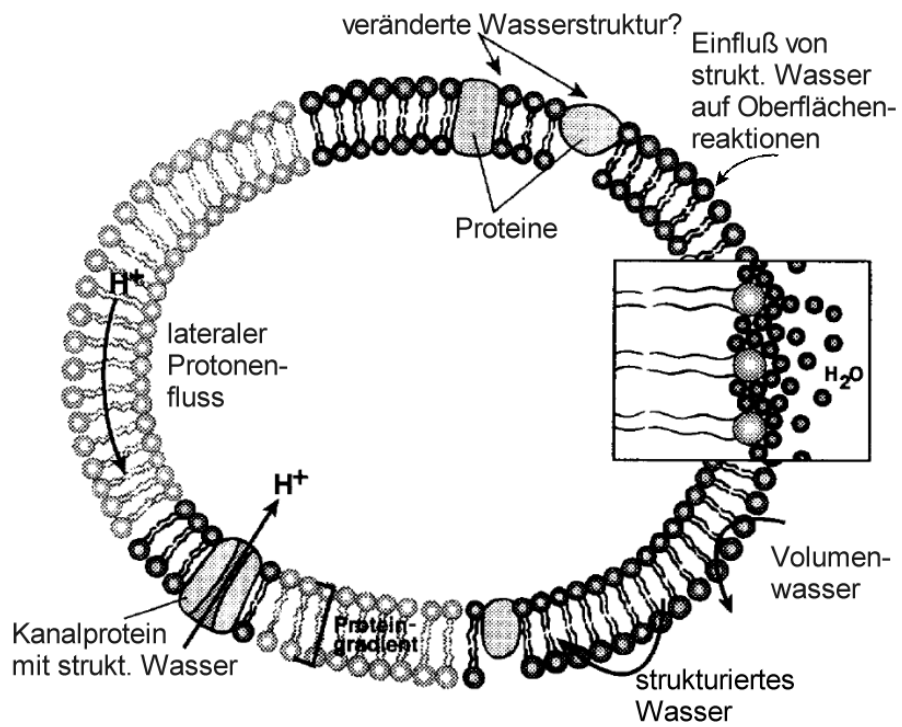


Abbildung 2.3: Mögliche Rollen von strukturiertem Wasser in der Membranmorphologie und der biologischen Funktion (nach [85])

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten deuterierten sowie die meisten protonierten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die ^2H -Markierung lag entweder in den Acylketten oder in der Kopfgruppe vor. Angaben deuterierter Segmente verwenden die *sn*-Notation (Abb. 1.6, S. 9); so sind beispielsweise bei (d_4 - α, β)-DPPC die beiden Methylene der Cholin-Kopfgruppe deuteriert. Mit ^1H -NMR wurde bei allen untersuchten Lipiden ein Deuterierungsgrad von fast 100 % nachgewiesen.

Cardiolipin, Cholesterol, Cholest-5-en-3-on und Sphingomyelin sind Produkte von Sigma-Aldrich Fine Chemicals (Deisenhofen).

Deuteriertes 3- α - ^2H -Cholesterol (*d2-Chol*) wurde aus Cholest-5-en-3-on (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) analog zu der in [206] publizierte Vorschrift synthetisiert. Das an der Position C3 kovalent gebundene Deuteron dient als Referenzsignal zur Bestimmung der Hydratation bei der Messung der Austauschraten der labilen 3- β -Hydroxylgruppe (zur Zählweise der C-Atome von Cholesterol s. Abb. 1.8, S. 10).

Die Qualität der Deuterierung wurde mit hochauflösender Protonen-NMR überprüft (Abb. 3.1).

3.2 Analytik

3.2.1 NMR-Bestimmung

Teildeuterierte Lipide werden zur Bestimmung des Deuterierungsgrades in Deutero-Chloroform gelöst und mittels hochauflösender ^1H -NMR untersucht. Die genaue Kenntnis des Deuterierungsgrades ist für die Bestimmung der Hydratationszahl n_w aus dem Integralverhältnis der Signale von D_2O und Lipid wichtig.

Abbildung 3.1 zeigt ^1H -NMR Spektren von undeutertem Cholesterol im Vergleich mit *d2-Chol*: die spektrale Komponente des 3- α -Protons ist nach der Deuterierung vollständig aus dem Spektrum verschwunden.

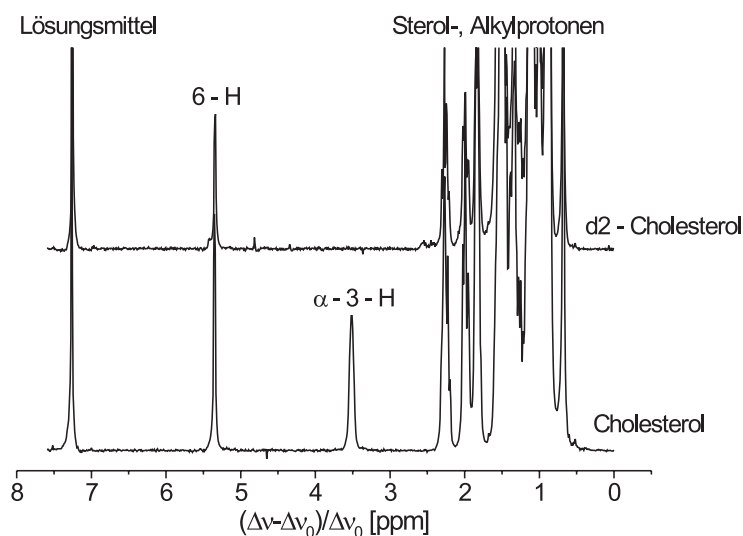


Abbildung 3.1: ^1H -NMR-Spektrum von undeutertem und 3- α - ^2H -Cholesterol

3.2.2 Dünnschichtchromatographie

Die Reinheit der Lipide wurde vor und nach der NMR-Messung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft. Zusätzlich zu herstellungsbedingten Verunreinigungen können im Laufe längerer Messungen durch Oxidation Fettsäureketten abgespalten werden; die entstehenden Lysolipide verändern aufgrund ihrer deutlich anderen Geometrie die Phaseigenschaften der Lipidaggregate (s. Abb. 2.2, S. 21).

Das Lipid wird in einem Lösungsmittelgemisch (Chloroform/Methanol/Wasser, 65:25:4 Vol.-%) gelöst und auf ein Ende einer fertigen DC-Platte (Kieselgel 60; Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die DC-Platte wird (mit dem lipidbedeckten Teil nach unten) in eine Kammer gestellt, deren Boden mit Lösungsmittel derselben Zusammensetzung bedeckt ist.

Abhängig von Molekülgröße und Hydrophobizität steigen die gelösten Stoffe durch Kapillarkräfte im Kieselgel nach oben. Nach etwa 45 min wird die DC-Platte der Kammer entnommen, das Lösungsmittel eingetrocknet und in einer zweiten Kammer mit Dampf von elementarem Iod angefärbt. Iod bindet an organische Moleküle und bildet dabei einen braun-gelben Farbkomplex; dadurch werden die unterschiedlichen Fraktionen der Probe auf der DC-Platte sichtbar. Mit Molybdänlösung können zusätzlich selektiv Fraktionen mit Phosphatgruppen blau angefärbt werden.

3.2.3 Kalorimetrie

DSC

Mit DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) werden Enthalpieänderungen bei Phasenübergängen gemessen. Zwei Zellen mit der Probenflüssigkeit und einer geeigneten Referenzlösung werden synchron erwärmt (Scanrate 5–30 K/h) und der Unterschied in der spezifischen Wärme C_p registriert. An Phasenübergängen 1. Ordnung nimmt die Entropie sprunghaft zu; damit hat $C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_p$ hier die Form einer δ -Funktion [4]. In realen Systemen ist C_p allerdings nicht unstetig, sondern weist am Phasenübergang ein schar-

fes Maximum auf. Integration von C_p über den gesamten Übergangsbereich ergibt die kalorische Enthalpie ΔH_{cal} des Phasenübergangs¹:

$$\Delta H_{cal} = \int C_p dT \quad (3.1)$$

Abbildung 1.3 (S. 5) zeigt ein typisches DSC-Experiment mit DMPC-Vesikeln.

Für die vorliegenden Messungen wurde ein *VP-DSC* der Firma MicroCal (Northampton, USA) verwendet.

ITC

Anders als bei DSC wird mit ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) bei konstanter Temperatur gemessen. In eine Probenzelle wird über eine Mikrospritze der Reaktand kontrolliert zutitriert und schnell verrührt. Die dabei entstehende oder absorbierte Reaktionswärme ΔH_{tit} pro Injektionsschritt wird über einen elektronischen Regelkreis registriert und ausgeglichen. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis $\Delta H_{tit} = 0$ ist. Integration über die Injektionswärmen liefert die Reaktionsenthalpie ΔH sowie die Bindungsaffinität K_a und die Bindungsstöchiometrie n .

Die Messungen erfolgten mit einem *VP-ITC* der Firma MicroCal. Zur Auswertung standen vorgefertigte Routinen in Origin 5.0 zur Verfügung (ebd.).

3.2.4 Filmwaage

Das laterale Kompressionsverhalten von Lipid-Monolayern läßt sich elegant mit einer Filmwaage messen: ein Teflontrog wird mit Wasser gefüllt und das in Chloroform gelöste Lipid vorsichtig auf die Oberfläche getropft. Durch die Oberflächenspannung verteilt sich die Lösung rasch über die gesamte Oberfläche und das Lösungsmittel verdampft. Ein Teflonriegel, der die Lipid-/Wasseroberfläche knapp berührt, schiebt diese computergesteuert zusammen. Ein teilweise eingetauchtes Filterpapier mißt die Oberflächenspannung als Funktion der aktuellen Fläche (*Wilhelmy-Methode*, [8]).

¹ Eine weitere Kenngröße ist die van't Hoff-Enthalpie; sie wird aus dem Verlauf der Scankurve abgeleitet. Der Quotient der beiden Enthalpien ist ein Maß für die Kooperativität der Umwandlung [31].

3.3 Festkörper–NMR an Phospholipid–Membranen

3.3.1 Prinzip

Bei einer Reihe von Atomkernen addieren sich die Bahndrehimpulse der Ladungsverteilungen von Protonen und Neutronen zu einem Kernspin I . Nach den Gesetzen der Quantenmechanik ist dieser durch die Definition einer Vorzugsrichtung \vec{z} , z. B. durch ein äußeres Magnetfeld \vec{B}_0 , in dieser Richtung in Vielfachen von \hbar quantisiert:

$$I_z = m_z \hbar; \quad m_z = -I \dots + I \quad (3.2)$$

$h = 2\pi\hbar = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js ist das Plancksche Wirkungsquantum.

Das magnetische Dipolmoment μ , das für die Wechselwirkung mit einem äußeren Magnetfeld entscheidend ist, ist mit dem Kernspin I über das gyromagnetische Verhältnis γ verknüpft:

$$\mu = \gamma \hbar I \quad (3.3)$$

Die Wechselwirkung von μ mit dem Magnetfeld B_0 hebt die Entartung der Energieeigenzustände auf; es entstehen $2I + 1$ äquidistante Energieniveaus (Zeeman–Aufspaltung):

$$E = m_z \gamma B_0 \hbar \quad (3.4)$$

Es sind nur Übergänge zwischen benachbarten Energieniveaus, also mit der Energiedifferenz $\Delta E = \hbar\omega_0$ möglich; $\omega_0 = \gamma B_0$ ist die Larmorfrequenz. Tabelle 3.1 zeigt die Werte von I , γ und ω_0 sowie die natürliche Isotopenhäufigkeit für die wichtigsten NMR–relevanten Kerne in der organischen Chemie für ein Magnetfeld von 9,36 T^{2,3}.

Isotop	I	γ (rel.)	ω_0 (MHz)	natürl. Häufigkeit (%)
¹ H	$\frac{1}{2}$	1	400	99,984
² H	1	0,154	61,4	0,016
¹³ C	$\frac{1}{2}$	0,251	100	1,1
¹⁴ N	1	0,072	28,9	99,635
¹⁵ N	$\frac{1}{2}$	-0,101	40,5	0,365
³¹ P	$\frac{1}{2}$	0,405	162,4	100

Tabelle 3.1: Übersicht über wichtige Kerne mit magnetischem Moment (nach [21])

Die Besetzung der Energieniveaus beträgt für ein System mit 2 Spinzuständen ($I = \frac{1}{2}$)⁴:

$$\frac{n_\alpha}{n_\beta} = \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) = \exp\left(\frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T}\right) \quad (3.5)$$

² Üblicherweise wird die Feldstärke nicht in Tesla, sondern durch die zugehörige Protonenfrequenz bezeichnet – hier also 400 MHz.

³ Für γ ist die relative Größe im Vergleich zu ¹H angegeben ($\gamma_H = 2,675 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$).

⁴ Der Index α bezieht sich auf das energetisch niedrigere, also höher besetzte Niveau $I_z = -\frac{1}{2}$.

Die Empfindlichkeit einer NMR–Messung ergibt sich aus der relativen Besetzungsdifferenz $\Delta n = (n_\alpha - n_\beta)/(n_\alpha + n_\beta)$; für Protonen ist $\Delta n = 3,2 \cdot 10^{-5}$ bei $B_0 = 9,36$ T.

Zudem hängt die Sensitivität einer NMR–Messung von dem Signal-zu-Rausch–Verhältnis S/N ab, in das neben B_0 und γ die Zahl n der detektierten Kerne sowie die Scanzahl N_S , die Temperatur T und die transversale Relaxationszeit T_2 eingehen [62]:

$$S/N = n \gamma^2 B_0^{3/2} N_S^{1/2} T^{-1} T_2 \quad (3.6)$$

Die Qualität der Messungen läßt sich also vor allem durch ein höheres Magnetfeld signifikant erhöhen.

3.3.2 Festkörper–NMR von Deuterium– und Phosphor–Kernen

Gleichung 3.4 ist nur eine erste Näherung für den Hamilton–Operator der Wechselwirkung von Kernen mit dem magnetischen Feld; in der Regel müssen weitere Terme berücksichtigt werden [112]:

$$H_{Kern} = H_z + H_{CS} + H_{dip} + H_J + H_Q \quad (3.7)$$

Die Indizes bezeichnen:

- z : Zeeman–Term
- CS : Chemische Verschiebung (*chemical shift*): das lokale Magnetfeld B_{loc} im Atomkern hängt von der Abschirmung durch die Elektronen ab.
- dip : Wechselwirkung der magnetischen Dipole untereinander
- J : skalare Wechselwirkung der verschiedenen Spinarten, indirekt vermittelt durch die Bindungselektronen
- Q : Kopplung von Kernen mit Quadrupolmoment ($\Leftrightarrow I \geq 1$) mit dem elektrischen Feldgradienten (EFG) einer Molekülbindung.

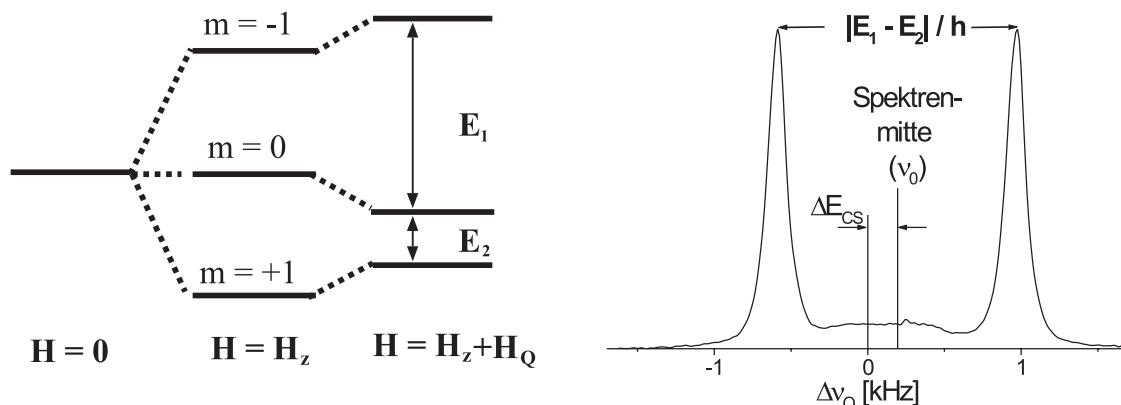
Nur die ersten beiden Terme in Gleichung 3.7 hängen (linear) von B_0 ab, d. h. die relativen Beiträge der restlichen Terme können durch Erhöhung von B_0 reduziert werden.

Bei **Deuterium–NMR** ist vor allem der quadrupolare Beitrag von Bedeutung: das Quadrupolmoment von ^2H ist mit $0,22 R^2$ (R : Kernradius) extrem groß [125], während die anderen Beiträge in Gleichung 3.7 durch das geringe gyromagnetische Moment keine Rolle spielen [172]. Die chemische Verschiebung ist allerdings relativ hoch (ca. 10 ppm) und zeigt sich in Form von Phasenverzerrungen im detektierten Spektrum [48].

$$H_{2H} = H_z + H_Q \quad (3.8)$$

Die Aufspaltung der Energieniveaus von Deuterium ist in Abbildung 3.2(a) skizziert; daraus resultiert ein um die Frequenz ν_0 symmetrisches Spektrum mit 2 Linien im Abstand $\Delta\nu_Q^5$. Durch die chemische Verschiebung liegt die Spektrenmitte nicht exakt bei der Larmorfrequenz ν_0 , sondern ist um einige 100 Hz zu kleineren Feldstärken hin verschoben.

⁵ Auf den Index Q wird in den folgenden Kapiteln aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.



(a) Niveauschema (Effekt von H_Q zur Illustration stark übertrieben)

(b) NMR-Signal

Abbildung 3.2: Aufspaltung der Kernniveaus von Deuterium im magnetischen Feld

In planar orientierten Flüssigkristallen skaliert $\Delta\nu_Q$ in erster Näherung nach dem 2. Legendre-Polynom bezüglich des Winkels θ zwischen Bilayernormale (*Direktorachse*) \vec{n} und Magnetfeld \vec{B}_0 [172]:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3 e^2 q Q}{2 \hbar} \cdot \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \left(S_{33} + \frac{\eta}{3} (S_{11} - S_{22}) \right) \quad (3.9)$$

Die Ordnungsparameter S_{ii} ($i = 1, 2, 3 = x, y, z$) beschreiben die Fluktuationen um die Direktorachse; η ist ein Asymmetrieparameter, der die Abweichung des elektrischen Feldgradienten (EFG) von der Richtung der chemischen Bindung erfasst.

Für C–D Bindungsvektoren in orientierten Phospholipidmembranen ist $\eta \approx 0$ [172] und damit nur der Ordnungsparameter in Bindungsrichtung, $S_{33} = S_{CD}$, relevant:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3 e^2 q Q}{2 \hbar} \cdot \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \cdot S_{CD} \quad (3.10)$$

Für $\theta = 0$ ergibt sich also:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3 e^2 q Q}{2 \hbar} \cdot S_{CD} \quad (3.11)$$

Der segmentale Ordnungsparameter S_{CD} trägt der Tatsache Rechnung, daß in Lipidmembranen die schnellen Bewegungen um die Direktorachse \vec{n} axial gemittelt werden; S_{CD} ist charakteristisch für jede C–D Bindung bzw. jedes deuterierte Segment einer Acylkette (siehe auch Abb. 3.11, S. 43).

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \left\langle (3 \cos^2 \beta - 1) \right\rangle_{\text{schnelle Bewegungen}} \quad (3.12)$$

β ist der zeitabhängige Winkel zwischen dem C–D Bindungsvektor und \vec{n} (Abb. 3.3). Die segmentalen Ordnungsparameter entsprechen der mittleren Ordnung des Systems [24].

Ohne Bewegungsmittelung entspricht $S_{CD} = 1$ einer perfekten Orientierung der C–D – Bindung längs \vec{n} , $S_{CD} = -\frac{1}{2}$ der Richtung senkrecht dazu und $S_{CD} = 0$ dem sogenannten *magischen Winkel* $54,74^\circ$ zwischen \vec{n} und \vec{CD} .

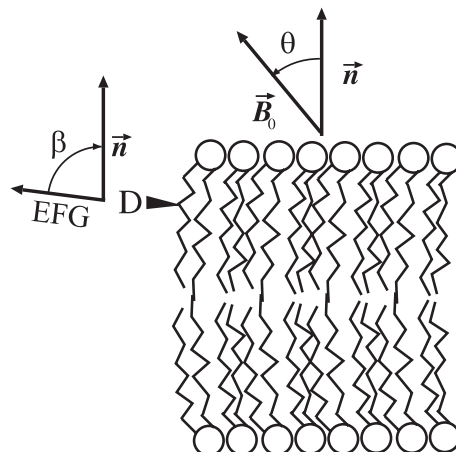


Abbildung 3.3: Definition der Orientierungsachsen \vec{n} (Bilayernormale) und EFG (*electric field gradient*) \approx C–D Bindungsvektor

Unter der Voraussetzung $\eta = 0$ ist $\frac{e^2qQ}{\hbar} = \chi$ die statische Quadrupol–Kopplungskonstante. Der elektrische Feldgradient liegt für C–D, O–D oder N–D Bindungen hinreichend genau längs der Bindungsachse, um ihn skalar nähern zu können [155].

χ beträgt 170 ± 7 kHz für C–D Bindungen, 220 kHz für O–D Bindungen [172] und $(253 - 572/R^3)$ kHz für wasserstoffverbrückte N–D Bindungen mit $R = \text{Abstand D} \cdots \text{O}$ in Å [155].

Der Vorteil von **Phosphor–NMR** ist, daß das Isotop ^{31}P natürlich zu 100 % vorkommt, d. h. es bedarf keiner Markierung. Der Kernspin beträgt $I = \frac{1}{2}$, es existiert also nur ein Übergang, der durch chemische Verschiebung und dipolare Wechselwirkungen mit benachbarten Protonen modifiziert wird:

$$H_{^{31}\text{P}, \text{Membran}} = H_z + H_{CSA} + H_{dip} \quad (3.13)$$

Die chemische Verschiebung ist bei Phosphor richtungsabhängig ($CSA = \text{chemical shift anisotropy}$) und wird im Hauptachsensystem des Moleküls durch einen Tensor 2. Stufe (*shielding tensor* $\bar{\sigma}$) beschrieben:

$$B_{loc} = (1 - \bar{\sigma})B_0 \quad (3.14)$$

Die CSA wird meist als relative, magnetfeldunabhängige Verschiebung bezüglich einer Referenzfrequenz (85 %-ige Phosphorsäure) in ppm ausgedrückt.

$$\bar{\sigma} = \frac{\omega - \omega_0}{\omega_0} \cdot 10^6 \text{ [ppm]} \quad (3.15)$$

Im Falle von Lipidmembranen vereinfacht sich $\bar{\sigma}$: ^{31}P kommt nur in den Phosphatresten der Kopfgruppen vor; diese bewegen sich oberhalb des Phasenübergangs wie uniaxiale Flüssigkristalle mit Rotationssymmetrie längs der Direktorachse [170]:

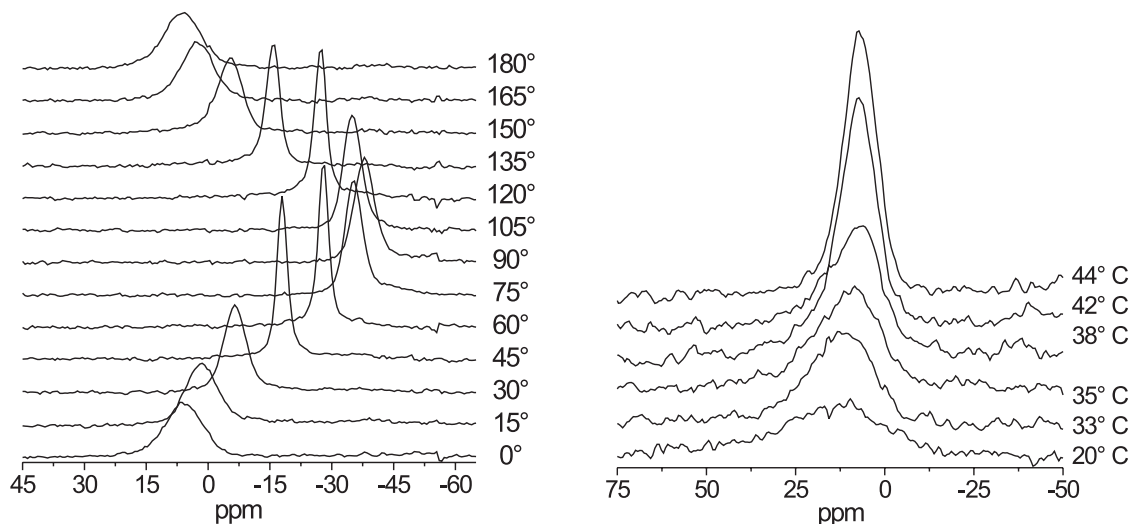
$$\bar{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} \end{pmatrix} \quad (3.16)$$

σ_{\perp} und σ_{\parallel} sind die Tensorelemente senkrecht bzw. parallel zur Rotationsachse des Lipids.

Der isotrope Anteil des *shielding tensor* ist definiert als $\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(2\sigma_{\perp} + \sigma_{\parallel})$, also die Spur des Tensors. Der anisotrope Teil des zeitgemittelten Tensors beträgt $\Delta\sigma = \sigma_{\perp} - \sigma_{\parallel}$ und ist nur geringfügig von der Struktur der Lipid-Kopfgruppe abhängig [173]: -45 ppm bei PC, -40 ppm bei PE, -55 ppm bei PS und -30 ppm bei Cardiolipin.

Abbildung 3.4(a) zeigt die Variation der chemischen Verschiebung des ^{31}P -Signals für eine makroskopisch orientierte Probe bei einer Variation des Winkels θ von 0° – 180° . Durch einen Fit der Peak-Positionen an das 2. Legendre-Polynom erhält man die 0° -Orientierung.

Die Breite des ^{31}P -Signals nimmt unterhalb des thermotropen Phasenübergangs stark zu, wie in Abbildung 3.4(b) am Beispiel von Sphingomyelin gezeigt ist (0° -Orientierung, teilweise dehydratisiert, $T_m \approx 40^{\circ}\text{C}$).



(a) Variation des Winkels θ von 0° – 180° bei $T = 45^{\circ}\text{C}$

(b) 0° -Orientierung, Durchgang durch den Phasenübergang

Abbildung 3.4: ^{31}P -NMR-Spektren von EYSM

3.3.3 Gepulste NMR-Spektroskopie

Anregung

Gleichung 3.5 beschreibt die Spinverteilung im thermischen Gleichgewicht (Abb. 3.5(a)). Um Übergänge zwischen den Energieniveaus nachweisen zu können, muß die thermische Verteilung der Spins mit geeigneten Hochfrequenz-Pulsen gestört werden.

Die Spins präzedieren im Laborsystem (Achsen x, y, z) mit der Larmor-Frequenz ω_0 um die Richtung des äußeren Magnetfeldes \vec{B}_0 . In einem mit ω_0 rotierenden Koordinatensystem (Achsen $x', y', z' = z$) ist die mittlere Spinorientierung \vec{M} ein stationärer Vektor.

Die Bewegung im Laborsystem und im rotierenden Koordinatensystem wird mit den Bloch-Gleichungen beschrieben [21]. Aus diesen ergibt sich, daß die Anregung von Übergängen mit einem im Laborsystem mit ω_0 rotierenden Magnetfeld \vec{B}_1 senkrecht zu \vec{B}_0 erfolgen muß (Abb. 3.5(b)).

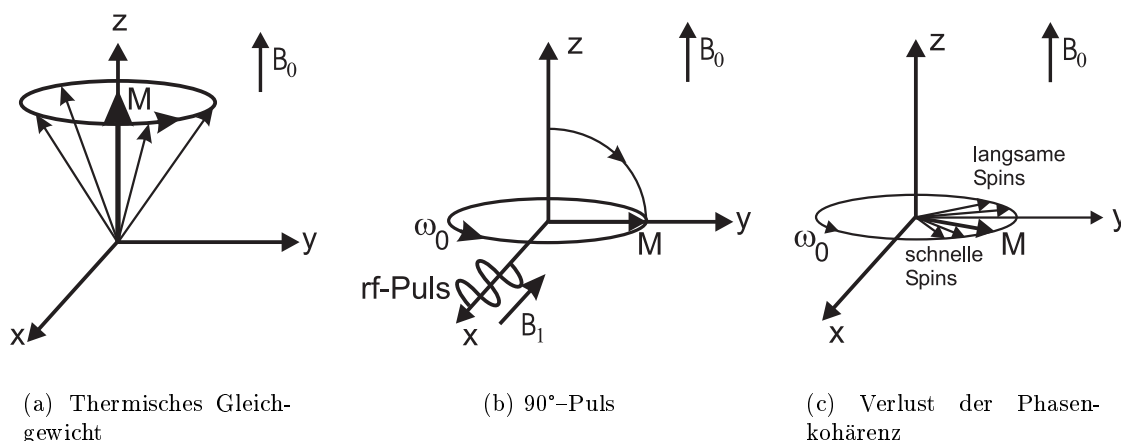


Abbildung 3.5: Anregung der Spinniveaus mit einem rotierenden Magnetfeld $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$

\vec{B}_1 wird mit einem linear polarisierten Hochfrequenz-Signal der Frequenz $\nu_0 = \omega_0/2\pi$ erzeugt: die Polarisation läßt sich in einen links- und einen rechtszirkulierenden Anteil zerlegen; während die eine Komponente die Spinverteilung invertiert, bewegt sich die andere mit einer relativen Geschwindigkeit $-2\omega_0$, die praktisch keinen Einfluß auf die Spins hat.

Die invertierten Spins verlieren durch Feldinhomogenitäten ihre Phasenkohärenz (Abb. 3.5(c)). Durch einen 180° -Puls in der $x'-y'$ -Ebene werden die Spins refokussiert.

Im vorliegenden Versuchsaufbau wird \vec{B}_1 mit einem aus Silber-Flachdraht gefertigten Solenoid erzeugt (Durchmesser 10 mm, Windungszahl 6, Windungsbreite \approx Ganghöhe = 1 mm). Zum Design wurden die Vorgaben aus [57] beachtet. Die Zahl der Windungen legt über Gleichung 3.17 die erreichbare magnetische Feldstärke fest:

$$B_1 \cong 3\mu_0 \sqrt{\frac{QP}{V\nu_0}} \quad [\text{Gauss}] \quad (3.17)$$

P ist die Verstärkerleistung in W, V das Spulenvolumen in cm^3 und ν_0 die Resonanz-

frequenz in MHz. $Q = \omega_0 L/R$ heißt Qualitätsfaktor; hohe Q -Werte bedeuten ein gutes Signal-/Rausch-Verhältnis, aber auch lange Abklingzeiten. R ist der Widerstand in Ω ; die Induktivität L ergibt sich aus Windungszahl n , Durchmesser d und Länge l der Spule:

$$L = \frac{n^2 d^2}{3,5d + 4l} \quad [\mu\text{H}] \quad l, d \text{ in cm} \quad (3.18)$$

Die Anregung erfolgt mit einem Rechteckpuls bei ω_0 , dem im Fourierraum eine breite Frequenzverteilung entspricht. Somit werden auch Kerne angeregt, die nicht exakt mit der Anregungsfrequenz präzedieren.

Pulslänge

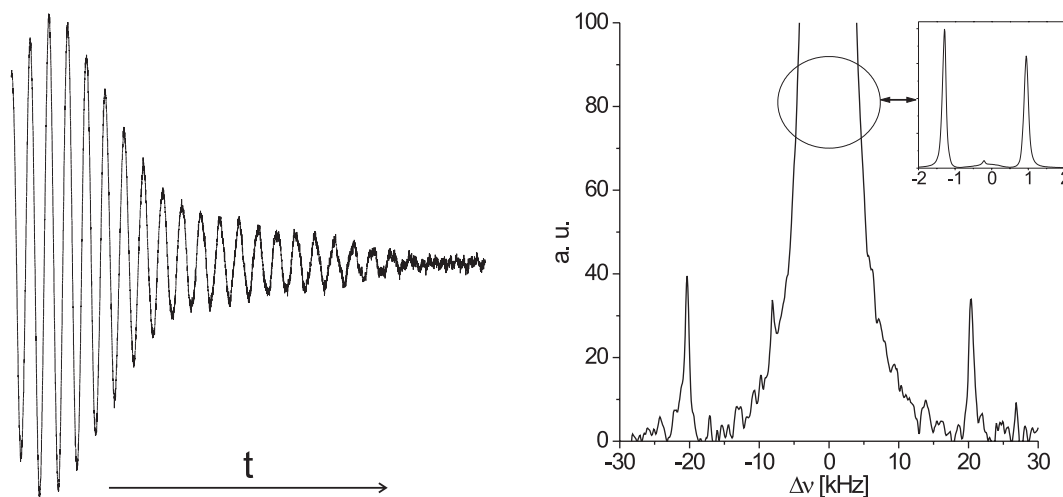
Wie man leicht anhand der Darstellung im rotierenden Koordinatensystem zeigen kann [21], ist die Umorientierung der mittleren Spindichte bezüglich der z -Achse proportional zur Zeit t_p , während der das B_1 -Feld anliegt:

$$\alpha = \gamma B_1 t \quad (3.19)$$

α ist der Kippwinkel der mittleren Magnetisierung bezüglich der z -Achse und beträgt 90° für *Quadrupolar-Echo*- bzw. 180° für *Inversion-Recovery*-Detektion (s. Abschnitt 3.5).

Detektion – FID

Die effektive Magnetisierung der Spins relaxiert nach dem Ende der Anregung exponentiell ins thermische Gleichgewicht (FID, *free induction decay*). Frequenzbeiträge ν abseits der Larmor-Frequenz modulieren den FID mit Sinusschwingungen der Frequenzen $\Delta\nu = \nu - \nu_0$ (Abb. 3.6(a)). Die Fouriertransformation des Zeitsignals ergibt das NMR-Frequenzspektrum (Abb. 3.6(b)).



(a) exponentiell abfallende Magnetisierung im Zeitraum

(b) transformiertes Spektrum im Frequenzraum

Abbildung 3.6: FID (freier Induktionsabfall) der Magnetisierung

3.3.4 Aufbau des NMR-Geräts

Der prinzipielle Aufbau des NMR-Magneten (Oxford Instruments, Oxford, UK) ist in Abbildung 3.7(a) skizziert: in einem doppelt gekühlten Kryostaten liegt eine supraleitende Spule bei 4 K. Dieses Feld wird durch zusätzliche Sattelspulen homogenisiert (*shimming*).

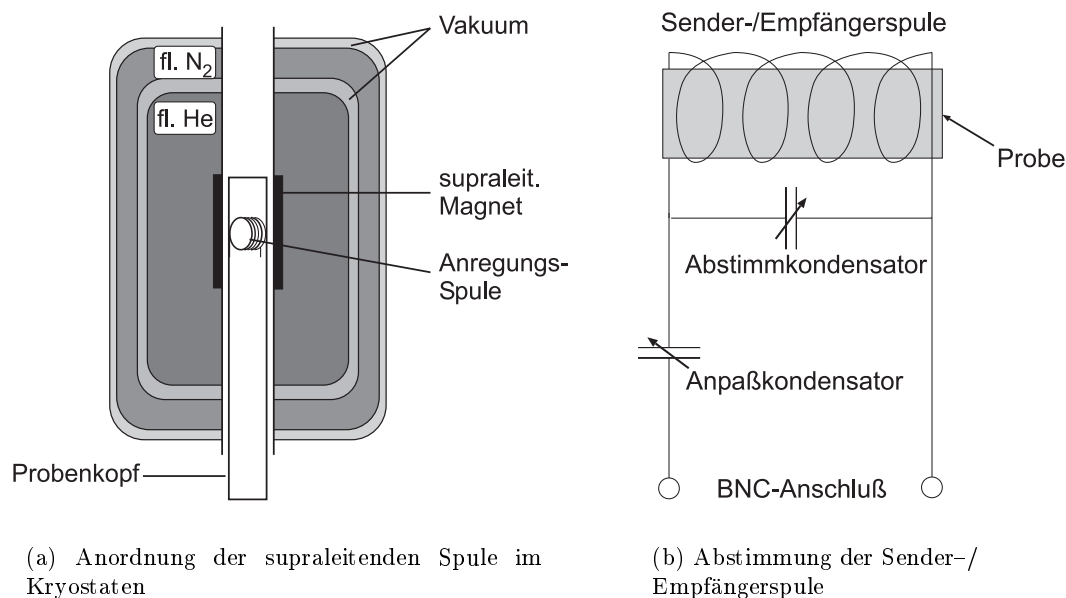


Abbildung 3.7: Prinzipskizze des NMR-Magneten und der Anregungsspule

Das verwendete Gerät ist ein *VXR-400S* der Firma Varian (Palo Alto, USA) und wird von einer *SPARCstation 5* (Sun Microsystems, Palo Alto, USA) gesteuert. Die Magnetfeldstärke von 9,36 T entspricht einer ¹H-Frequenz von 400 MHz.

Die Signalanregung erfolgt in der Reihenfolge Frequenzgenerator – Pulsgenerator – Verstärker; bei ²H-NMR wird wegen der Breite des anzuregenden Frequenzspektrums ein zusätzlicher Breitband-Verstärker (1000 W) nachgeschaltet.

Die Detektion erfolgt mit einem Vorverstärker; danach wird die Trägerfrequenz demoduliert und das Signal über einen Audioverstärker in Quadraturdetektion aufgenommen. Quadraturdetektion bedeutet die getrennte Digitalisierung des Signals und seiner Verschiebung um 90° zum Erhalt der Phaseninformation. Die Signale wurden mit einem schnellen AD-Wandler (Wortlänge 12 bit) digitalisiert.

Die Abstimmung des Probenkopfes (*tuning*) auf die Resonanzfrequenz erfolgt mit einem parallel zur Anregungsspule geschalteten Kondensator (Abb. 3.7(b)); über einen weiteren abstimmbaren Kondensator wird der Wellenwiderstand angepaßt (*matching*).

3.4 Herstellung orientierter Lipidschichten

3.4.1 Präparation

Die verwendeten Lipide liegen meist in Pulverform vor und werden zum Schutz gegen oxidative Abbauprozesse bei -18 °C gelagert. Sie sind in diesem Zustand sehr hygroskopisch, d. h. sie binden bei Kontakt mit Luft schnell Wasser.

Als Lösungsmittel wurde meist am Alkoholrest deuteriertes Methanol (MeOD) verwendet, um einen eventuellen Austausch labiler Protonen gegen Deuteronen bereits vor der Hydratisierung mit D_2O zu erreichen. Circa 25 bis maximal 40 mg Lipid werden in 5 ml MeOD gelöst und rasch auf 50 ultradünne Glasplättchen ($8 \times 19 \times 0,07\text{ mm}^3$, Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen) aufgetragen. Der Großteil des Lösungsmittels verdampft innerhalb weniger Minuten; der Rest wird mittels einer Hochvakumpumpe 18 h lang abgesaugt. Bei keiner Messung wurden anschließend Reste des Lösungsmittels gefunden.

Bei einer Einwaage von $m = 30\text{ mg}$ Lipid beträgt die mittlere Zahl n von Bilayern zwischen zwei Glasplättchen typischerweise etwa 1000:

$$n = \frac{1}{2} \cdot \frac{m \cdot N_0}{49\text{ MW}} \cdot \frac{A_{\text{Lipid}}}{A_{\text{Glas}}} \quad (3.20)$$

Dabei ist MW das Molekulargewicht, A_{Lipid} die Kopfgruppenfläche des Lipids, $A_{\text{Glas}} = 152\text{ mm}^2$ die Fläche eines Glasplättchens und $N_0 = 6,0 \cdot 10^{23}/\text{mol}$ die Avogadro-Konstante. Für DMPC ist $MW = 678\text{ g/mol}$, $A_{\text{Lipid}} \approx 60\text{ Å}^2$ und damit $n \approx 1070$.

Einige Lipide sind nur gering in MeOD löslich; in diesen Fällen wurde eine 1:5-Mischung Chloroform/MeOD verwendet.

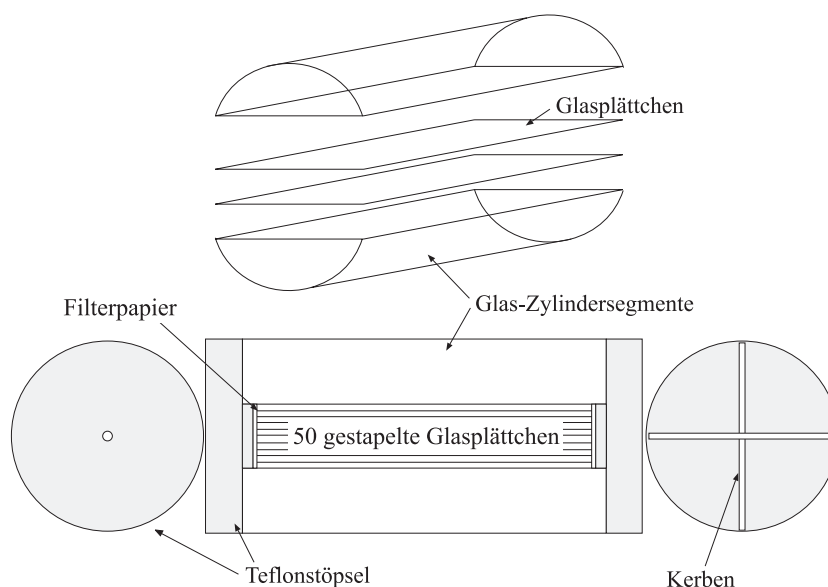


Abbildung 3.8: Probenanordnung für orientierte NMR-Messungen

Nach der Trocknung werden die Plättchen gestapelt und in ein beidseitig offenes Glasröhrchen gegeben, das mit Teflon-Stößeln verschlossen wird (Abbildung 3.8). Zylind-

dersegmente aus Glas fixieren den Plättchenstapel und minimieren Temperaturgradienten in der Probe.

Zwischen dem Plättchenstapel und den Teflonstöpseln liegen die Hydratationsreservoirs: passend zugeschnittene Stückchen Filterpapier, die zuvor in einer D₂O-gesättigten Atmosphäre ausgeheizt wurden, so daß das Filterpapier selbst praktisch kein H₂O mehr enthält.

Die Filterpapierstreifen werden nun mit je maximal 6 µl D₂O getränkt, das Röhrchen verschlossen und in einem Trockenschrank bei 40–50 °C ausgeheizt. Diese Folge wird so lange wiederholt, bis die gewünscht Hydratation erreicht ist. Die Ausheizzeit liegt bei minimal 8 h pro Hydratisierungsschritt.

In der Literatur wurde eine Verbesserung der Qualität der Orientierung nach wiederholter Hydratisierung/Dehydratisierung berichtet [82]; bei eigenen Versuchen konnte dies bestätigt werden.

3.4.2 Orientierung im NMR-Magneten

Bilayer-formende Lipide ordnen sich nach der Hydratisierung spontan zu Multischichten parallel zur Substratebene an; damit muß nur noch die Probe mit dem Stapel von Glasplättchen im NMR-Magneten in die gewünschte Position gedreht werden, um winkelabhängige Messungen durchzuführen. Dazu wurde eine Anordnung entwickelt, die eine auf ± 1° genaue Positionierung ermöglicht [98]: ein abseits des Magneten stehendes Goniometer führt über ein System von unmagnetischen (Messing-)Stangen zur Probe, wo eine kreuzförmiger Stempel in eine entsprechende Ausfräsung in einem der Teflonstöpsel greift; über eine Blattfeder wird der Stempel fixiert.

Der Schrittmotor des Goniometers wird vom Meßrechner aus gesteuert. Über eine Serie von Winkelschritten von 0–180° wird die 0°-Orientierung bestimmt, bei der die Signale des ²H-Spektrums den maximalen Frequenzabstand aufweisen: entweder direkt über eine schrittweise Annäherung oder über einen Fit der winkelabhängigen Quadrupolaufspaltung an das Legendre-Polynom 2. Ordnung (Gleichung 3.10, S. 32).

3.4.3 Temperaturkalibrierung

Die Temperatur im NMR-Magneten kann mit einer separaten Steuereinheit auf beliebige Werte zwischen ca. 10–100 °C mit einer Genauigkeit von ±0,5 °C⁶ eingestellt werden. Da der exakte Wert am Probenort empfindlich von den Voreinstellungen für den Durchfluß der Kühlluft abhängt, muß die Temperatursteuerung regelmäßig kalibriert werden. Dies geschieht mit einem geeichten Pt-100 Widerstand, der in der Längsachse des Probenröhrchens (Abb. 3.8) positioniert ist. Damit sind Temperaturgradienten in den Glasplättchen und -segmenten einer orientierten Probe nicht berücksichtigt; die gemessene Temperatur des Phasenübergangs etwa von d62-DPPC ($T_m = 37,75$ °C, [198]) zeigen jedoch, daß diese Fehlerquelle vernachlässigbar ist.

⁶ Diese Ungenauigkeit ist nur durch die Raumtemperierung bedingt.

3.5 Pulssequenzen in ^2H -NMR

3.5.1 *Quadrupolar Echo*

Üblicherweise wird zur Aufnahme von ^2H -Spektren eine Folge von zusammengesetzten Pulsen verwendet, die die Störungen durch akustisches Übersprechen und Receiver-Totzeiten minimiert und die Invertierung von Signalen abseits der Resonanzfrequenz optimiert (Abb. 3.9(a)):

$$d_1 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_\theta - \tau_1 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_{\theta \pm 90} - \tau_2 - \text{Acqu.}$$

Nach einem Intervall $d_1 \approx 5 \cdot T_{1,z}$ zum vorhergehenden Puls klappt ein $\frac{\pi}{2}$ -Puls die Magnetisierung in die x' - y' -Ebene um. Während der Zeit τ_1 nimmt die Phasenkorrelation der Spins durch transversale Relaxation und Inhomogenitäten von B_0 ab. Der zweite $\frac{\pi}{2}$ -Puls (π für $I = \frac{1}{2}$) sorgt dafür, daß die Magnetisierung nach τ_2 wieder fokussiert wird (*Spin-Echo*). Das Maximum des Echos bei $t = 2\tau_1$ wird als Beginn des FID definiert.

Die Pulszeiten $\frac{\pi}{2}$ lagen für die verwendeten Spulen typischerweise bei 8–11 μs ; τ_1 und τ_2 betragen jeweils 20 μs .

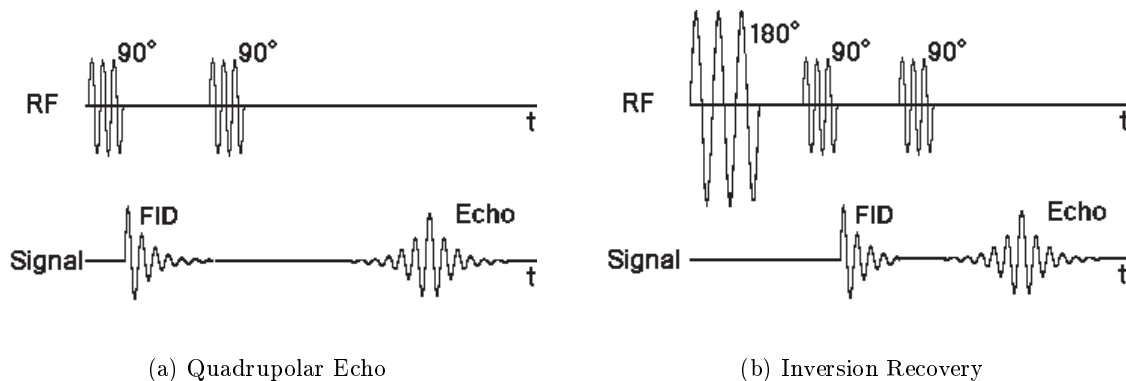


Abbildung 3.9: Pulssequenzen in ^2H -NMR

3.5.2 *Inversion Recovery*

Zur Bestimmung der longitudinalen (Spin-Gitter-) Relaxationszeit $T_{1,z}$ wird die Magnetisierung durch einen 180° -Puls invertiert und die Relaxation der Magnetisierung M_z in den Gleichgewichtswert M_0 beobachtet, die in erster Näherung exponentiell verläuft:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_{1,z}} \quad \text{bzw.} \quad (3.21)$$

$$M_z(t) - M_0 = 2M_0 \cdot \exp(-t/T_{1,z}) \quad (3.22)$$

Die Anregung erfolgt über eine Folge von *Inversion Recovery* Pulsen mit einer exponentiellen Variation der Delayzeit d_2 (Abb. 3.9(b)):

$$d_1 - \pi - d_2 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_\theta - \tau_1 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_{\theta \pm 90} - \tau_2 - \text{Acqu.}$$

Der 180° -Puls klappt die Magnetisierung von M_z nach $-M_z$ um. Die Amplitude von $-M_z$ nimmt durch Spin-Gitter-Relaxation während der Zeit d_2 ab und wird anschließend mit einer Echo-Sequenz detektiert.

3.5.3 Breitband-Jeener-Broekaert-Sequenz

Die Breitband-Jeener-Broekaert (BBJB) Pulsfolge [84, 190] transformiert die Zeeman-Ordnung in eine dipolare oder quadrupolare Ordnung und erlaubt durch Variation der Delay-Zeit t_1 eine Bestimmung der quadrupolaren Relaxationszeit $T_{1,Q}$:

$$d_1 - \frac{\pi}{2} - \tau - \frac{\pi}{4} - t_1 - \frac{\pi}{4} - \text{Acqu.}$$

Quadrupolare Ordnung heißt, daß die Spins nicht mehr bezüglich des äußeren Magnetfeldes geordnet sind (Zeeman-Ordnung), sondern im elektrostatischen Feldgradienten ihrer Nachbaratome. Die Quadrupolordnung ist maximal bei $\tau = \frac{1}{4\Delta\nu_Q}$; die Signalintensität läßt sich durch einen $\frac{\pi}{2}$ -Echopuls am Ende verbessern [190].

Für eine gleichmäßige Anregung über den ganzen Spektralbereich wird eine modifizierte BBJB-Sequenz verwendet, die Wimperis-Pulsfolge [190, 208]:

$$d_1 - \underbrace{\frac{\pi}{2} - 2\tau - \frac{3\pi}{8} - 2\tau - \frac{\pi}{4}}_{\text{composite } \frac{\pi}{2}\text{-Puls}} - \tau - \frac{\pi}{4} - d_2 - \frac{\pi}{4} - \tau_1 - \frac{\pi}{2} - \tau_2 - \text{Acqu.}$$

Die ersten vier Pulse erzeugen die quadrupolare Ordnung, die während der Zeit d_2 zerfällt. Die folgenden Pulse bilden das Spin-Echo.

3.6 Auswertemethoden

3.6.1 Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit $T_{1,z}$

Für eine Folge von Delayzeiten d_2 berechnet die VNMR-Software aus den Signalhöhen die longitudinale Relaxationszeit $T_{1,z}$ nach Gleichung 3.21. Dabei ist zu beachten, daß Phasenfehler und Basisliniendrifts zwischen den Teilmessungen korrigiert werden müssen.

Aus der Frequenzabhängigkeit von $T_{1,z}$ sowie aus dem Abfall der quadrupolaren Ordnung ($T_{1,Q}$, s. u.) und der Spin-Spin-Kohärenz (T_2) können die spektralen Dichten $J_m(m\omega_0)$ der molekularen Bewegungsmoden bestimmt werden. (Eine ausführliche Diskussion der Spektraldichten findet sich in [43, 190]).

$$\frac{1}{T_{1,z}} = \frac{3}{4}\pi^2\chi^2[J_1(\omega_0) + 4J_2(2\omega_0)] \quad (3.23)$$

$$\frac{1}{T_{1,Q}} = \frac{9}{4}\pi^2\chi^2 J_1(\omega_0) \quad (3.24)$$

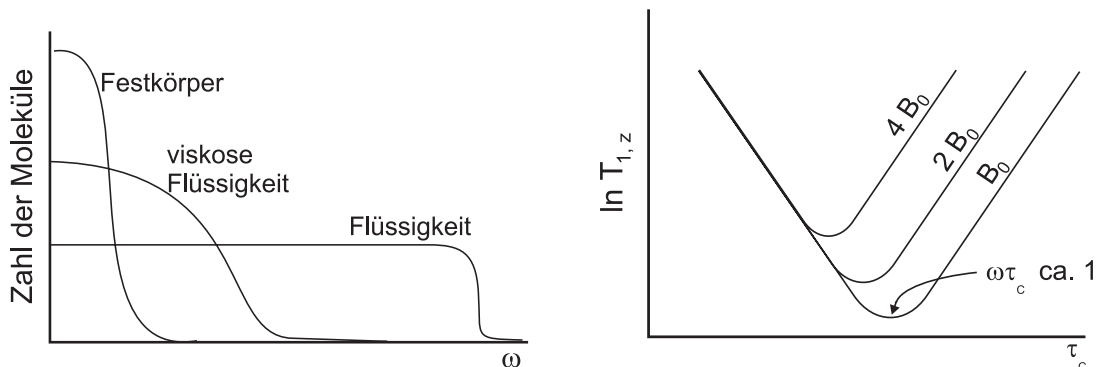
$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{8}\pi^2\chi^2[3J_0(0) + 3J_1(\omega_0) + 2J_2(2\omega_0)] \quad (3.25)$$

$T_{1,z}$ ist also empfindlich für Bewegungsmoden im Bereich von ω_0 und $2\omega_0$, während $T_{1,Q}$ nur bei ω_0 und T_2 zusätzlich im statischen Bereich ($\omega = 0$) sensibel ist. Deshalb ist stets $T_2 \leq T_{1,z}$; in Flüssigkeiten wird durch die hohe Molekülbeweglichkeit die statische Komponente ausgemittelt (*extreme motional narrowing*), d. h. $T_2 \simeq T_{1,z}$.

Die Spektraldichte ist proportional zur Korrelationszeit τ_c :

$$J(\omega) \propto \frac{\tau_c}{1 + \tau_c^2\omega^2} \quad (3.26)$$

Beim Übergang von der flüssigkristallinen in eine gelförmige oder feste Phase sinkt die Spektraldichte vor allem im hochfrequenten Bereich (Abb. 3.10(a)) und $T_{1,z}$ steigt stark an.



(a) Abhängigkeit vom Phasenzustand

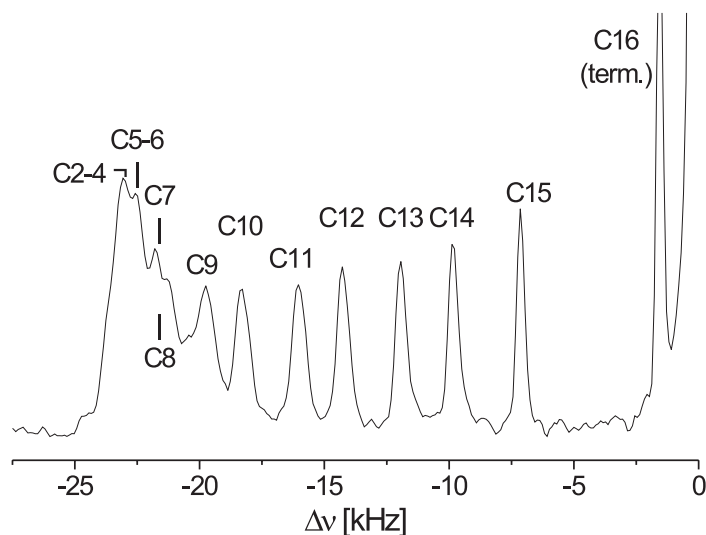
(b) Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke und der Korrelationszeit τ_c

Abbildung 3.10: Frequenzverteilung der Bewegungsmoden

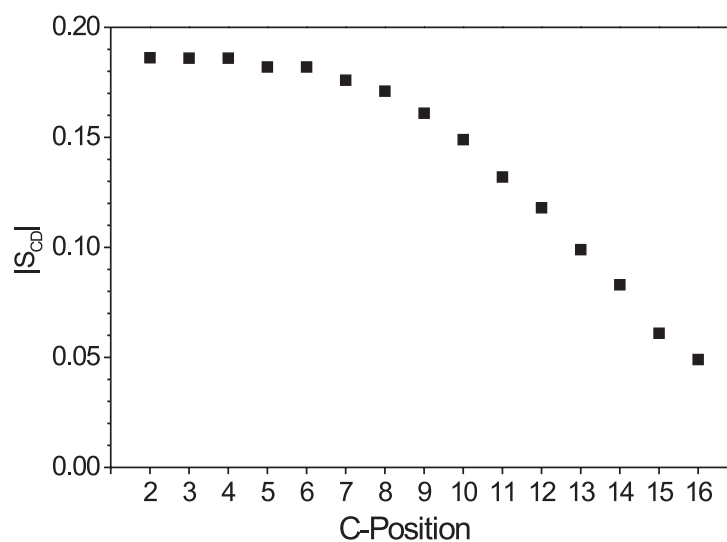
3.6.2 Ordnungsparameterprofil und projizierte Acylkettenlänge

Die Auftragung des Ordnungsparameters $|S_{CD}|$ von kettendeuterten Lipiden über dem Index C_i der Kettensegmente bietet einen kompakten Vergleich des Einflusses beispielsweise von Hydratation, Temperatur oder Sterolzugabe auf den Acylkettenbereich.

Abbildung 3.11 zeigt Spektrum und Ordnungsparameterprofil einer vollhydratisierten POPC-Membran mit einer perdeuterten *sn*-1-Kette (0° -Orientierung).



(a) NMR-Spektrum, Zuordnung der Kettensegmente für eine Spektrenhälfte; der starke Anstieg am rechten Rand ist durch das Signal des interlamellaren D_2O verursacht



(b) Ordnungsparameterprofil

Abbildung 3.11: Ordnung der *sn*-1-Kette von POPC bei $n_w = 28,6$ und $T = 42,4 \pm 0,5^\circ C$

Aus der Quadrupolaufspaltung $\Delta\nu$ berechnet sich der Betrag des Ordnungsparameters nach Gleichung 3.11:

$$|S_{CD}| = \frac{\Delta\nu}{170 \text{ kHz}} \cdot \begin{cases} \frac{2}{3} & \text{für Methylsegmente} \\ 3 \cdot \frac{2}{3} & \text{für die terminale Methylgruppe} \end{cases} \quad (3.27)$$

Das Spektrum ist eine Überlagerung von individuellen Spektren für jedes der 15 Ketten-segmente. In der Nähe des Glycerol-Rückgrats unterscheiden sich die Ordnungsparameter nur noch geringfügig, weshalb die Spektren in einem „Schulter“-Bereich zusammenfallen⁷.

Die Zuordnung der Ordnungsparameter zur Kettenposition erfolgte auf der Basis von Literaturwerten [77]. Im Falle der *sn-1*-Kette nimmt $\Delta\nu$ bzw. $|S_{CD}|$ ausgehend von der terminalen Methylgruppe kontinuierlich zu und damit die Mobilität der Kettensegmente ab.

Für eine rotierende *all-trans* Polymethylen-Kette beträgt S_{CD} minimal $-\frac{1}{2}$; effektiv wird dieser Wert durch zusätzliche innere Freiheitsgrade auf $-0,20$ bis $-0,30$ reduziert [149].

Aus dem Ordnungsparameter $S_{CD}^{(i)}$ des *i*-ten Kettensegments ergibt sich die auf die Membrannormale \vec{n} projizierte Segmentlänge $\langle D_i \rangle$ [173]:

$$\frac{\langle D_i \rangle}{l_0} = \frac{1}{2} + |S_{CD}^{(i)}| \quad (3.28)$$

$l_0 = 1,27 \text{ \AA}$ ist die maximale projizierte Bindungslänge einer *all-trans* Methylenkette [134]. Daraus folgt für die volle Kettenlänge $\langle L_C \rangle$:

$$\langle L_C \rangle = \frac{i_{max} - 1}{2} \sum_{i=2}^{i_{max}} |S_{CD}^{(i)}| \cdot l_0 \quad (3.29)$$

Die Austauschisomerie der Deuteronen in der terminalen Methylgruppe berücksichtigt der Faktor 3 in Gleichung 3.27.

3.6.3 Spektrale Momente

In ²H-NMR-Spektren von perdeutერიerten Lipiden lassen sich nicht immer alle Signale eindeutig den verschiedenen Kettensegmenten zuordnen. Neben der oben genannten Möglichkeit der Ordnungsparameterprofile können die mittleren Ordnungsparameter auch aus den spektralen Momenten abgeleitet werden [44, 190]. Da die ²H-Spektren (fast) symmetrisch um ω_0 sind, definiert man das *n*-te Moment für die halben Spektren als:

$$M_n = \frac{\int_{\omega_0}^{\infty} \omega^n f(\omega) d\omega}{\int_{\omega_0}^{\infty} f(\omega) d\omega} \quad (3.30)$$

⁷ Die kleinen Signalbeiträge zwischen den aufgelösten POPC-Signalen stammen von einem Kettentausch, d. h. von einer geringen Verunreinigung durch OPPC [77, 100].

Anschaulich ist das 0. Moment die Fläche unter dem Spektrum, das 1. Moment der Schwerpunkt usw.

Bei homogen verbreiterten Spektren ist die Kenntnis aller Momente des vollen Spektrums⁸ gleichbedeutend mit der Kenntnis des FID $f(t)$ selbst [57]:

$$f(t) = M_0 \left(1 - M_2 \frac{t^2}{2!} + M_4 \frac{t^4}{4!} - M_6 \frac{t^6}{6!} + \dots \right) \quad (3.31)$$

Für Spektren mit mehreren Quadrupolaufspaltungen, d. h. einer Verteilung von Ordnungsparametern, kann der mittlere Ordnungsparameter $\langle |S_{CD}| \rangle$ sowie $\langle |S_{CD}|^2 \rangle$ aus den ersten beiden Momenten berechnet werden [190]:

$$M_1 = \frac{\pi}{\sqrt{3}} \chi \langle |S_{CD}| \rangle \quad (3.32)$$

$$M_2 = \frac{9\pi^2}{20} \chi^2 \langle |S_{CD}|^2 \rangle \quad (3.33)$$

Die mittlere quadratische Abweichung Δ_2 beschreibt die Breite der Ordnungsparameter-Verteilung:

$$\Delta_2 = \frac{\langle |S_{CD}|^2 \rangle - \langle |S_{CD}| \rangle^2}{\langle |S_{CD}| \rangle^2} = \frac{M_2}{1,35 M_1^2} - 1 \quad (3.34)$$

Bei einem Übergang von der flüssigkristallinen in die Gelphase kommt es durch teilweises Ausfrieren von Bewegungsmittelung zu einem starken Anstieg der Ordnungsparameter und damit von M_1 . Die Streuung Δ_2 ist im Bereich des Phasenübergangs dann maximal, wenn gleichzeitig Gelphasen- und flüssigkristalline Domänen vorliegen.

Das 2. Moment liefert zusätzlich eine Abschätzung für die mittlere Korrelationszeit τ_C der Bewegungen in ^2H -NMR [112]:

$$\tau_C \approx \frac{1}{\sqrt{M_2}} \quad (3.35)$$

Die Berechnung der Momente erfolgte in dieser Arbeit mit einer Mathematica-Routine (Version 3.0, Wolfram Research Inc., Champaign/Il., USA). Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebung der spektralen Komponenten kann die Festlegung des Spektrenmittelpunktes nicht exakt erfolgen; als Maß wurde hier für kettendeuterte Lipide der Mittelpunkt der maximalen Quadrupolaufspaltung (*Plateauwert*) gewählt. Um daraus entstehende Fehler sowie die leichte Asymmetrie der Spektren durch Phasenverschiebungen zu berücksichtigen, wurden die linke und rechte Spektrenhälfte separat ausgewertet und der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung der zwei Werte wurde als Fehlerbalken aufgetragen.

⁸ Aufgrund der Symmetrie des Spektrums verschwinden alle ungeraden Momente.

3.6.4 Bestimmung der Hydratation

Um für die ^2H -NMR-Spektren die Zahl n_w der gebundenen Wassermoleküle pro Lipid bestimmen zu können, muß das Lipid entweder teilweise deuteriert sein oder über labile Hydroxyl-Gruppen verfügen, die in einem festen Verhältnis mit dem Wasser austauschen. Zur Hydratisierung wurde meist reines D_2O verwendet (Isotec, Miamisburg, USA; Isotopenreinheit 99,9 %); $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Mischungen wurden nur verwendet, wenn das Wassersignal andere NMR-Signale maskiert hätte.

Die Hydratationszahl n_w ergibt sich dann aus dem Integralverhältnis der Resonanzen des Wassers und der Lipide:

$$n_w = \frac{I^{\text{D}_2\text{O}} \cdot N_D^{\text{Lipid}}}{I^{\text{Lipid}} \cdot N_D^{\text{D}_2\text{O}}} \cdot p \quad [\text{mol/mol}] \quad (3.36)$$

Dabei bezeichnet I das Integral über der ^2H -Resonanz, N_D die Zahl äquivalenter Deuteronen und p der Molenbruch des deuterierten Lipids bezüglich der Gesamtlipidmenge.

Voraussetzung für eine zuverlässige Bestimmung von n_w ist der Ausschluß von Wasserdampf aus der Probenpräparation und während der Messung; dies wurde durch verschiedene Maßnahmen erreicht:

- Die Filterpapierstreifen, die als Wasserspeicher zur Hydratisierung der Membranstapel dienen (Abb. 3.8, S. 38), wurden in einer D_2O -Atmosphäre ausgeheizt und anschließend in einem abgeschlossenen Behälter mit D_2O -Dampf aufbewahrt.
- Während des Ausheizens wurden die Proben mit Parafilm (Pechiney, Paris) luftdicht verschlossen.
- Während der Messung wurde der Luftstrom, der zur Temperierung der Probe benötigt wird, mit einem CuSO_4 -Filter (W. A. Hammond Drierite, Xenia, USA) getrocknet. Das Trockenmittel wurde nach jeder Messung bei ca. 220°C ausgeheizt.

Zu Kontrollzwecken wurden Proben mehrfach hydratisiert und gemessen sowie mehrere Proben desselben Lipids untersucht; die Abweichung von n_w für gleiche Quadrupolaufspaltungen liegt bei $\Delta n_w < 1$.

Fehler bei der Bestimmung von n_w resultieren vor allem aus der Schwierigkeit, das Echo-Maximum festzulegen. Dies ist der Punkt im Echo-Spektrum, ab dem der FID ausgewertet wird.

3.7 NMR-Zeitskalen bei der Untersuchung von Lipidmembranen

In Abbildung 3.12 sind die Zeitskalen der Bewegungsmoden von Lipidmembranen sowie die dafür empfindlichen NMR-Parameter zusammengefaßt. $M_{2r} < M_2$ ist das residuelle 2. spektrale Moment, das die Linienverschmälerung durch *motional narrowing* berücksichtigt [114].

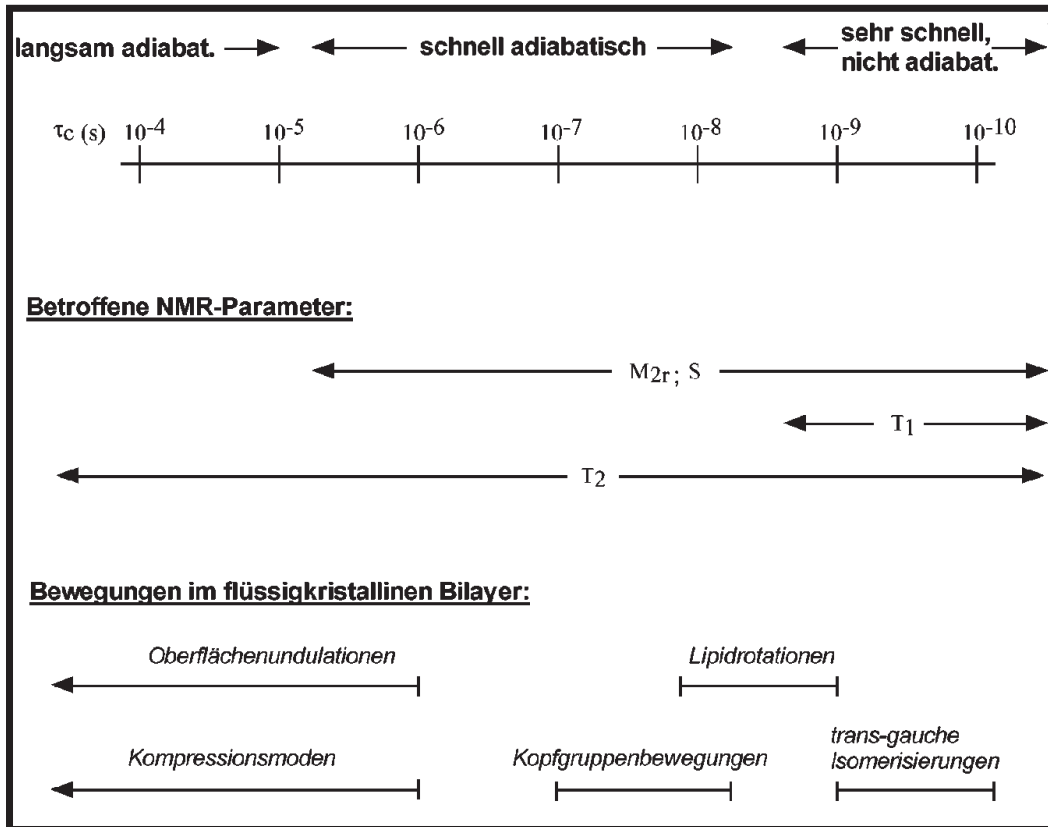


Abbildung 3.12: NMR-zugängliche Zeitbereiche von Membranbewegungen nach [114]. Die genauen Grenzen der Zeitskalen hängen von ω_0 und damit von der Magnetfeldstärke ab sowie von der spektroskopischen Zeitskala $\tau_s \approx 10^{-5}$ s.

Kapitel 4

Bestimmung von Deuteron–Austauschraten

4.1 Problemstellung

In dieser Arbeit wurde für orientierte Multischichten erstmals eine Pulssequenz angewandt, die die Bestimmung der Austauschraten labiler Deuteronen von Lipidmolekülen erlaubt [97].

In die Austauschraten k_{OD}^1 gehen neben einem geometrischen Faktor der Zugänglichkeit der austauschenden Deuteronen für Wasser auch der Grad der inner- und intramolekularen Wasserstoffverbrückung und die Hydratation ein. Unter optimalen Bedingungen sollte der Maximalwert von k_{OD} in etwa gleich der Protonenaustauschrate von reinem Wasser bei neutralem pH und Raumtemperatur, 1100 s^{-1} [129], sein.

Zur Messung der Austauschraten wurde die Magnetisierung des Wassers an der Membranoberfläche invertiert und der Transfer der Inversion auf die austauschenden Deuteronen als Funktion der Zeit Δ zwischen Anregung und Detektion bestimmt. Abbildung 4.1 zeigt für eine PC/Chol–Mischung schematisch den Inversionstransfer vom kopfgruppenassoziierten Wasser auf die labile 3- β -Hydroxylgruppe von Cholesterol.

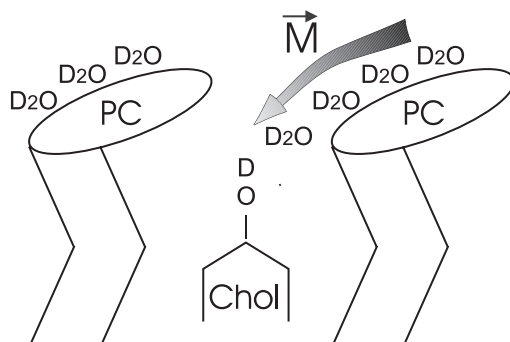


Abbildung 4.1: Übertrag der magnetischen Invertierung von Wasser auf die labile 3- β -Hydroxylgruppe in einer PC/Cholesterol–Membran

¹ Der Index OD bezeichnet im folgenden die das austauschende Deuteron tragende Gruppe.

Es wird davon ausgegangen, daß der Transfer selbst sehr schnell abläuft, etwa über einen Grotthus-Mechanismus (Kap. 2.1.1, S. 19). Damit ist der Austausch am Zielort der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Aus der Übertragungsrate als Funktion von Δ können die Austauschraten über die Simulation eines Zweiseiten-Austausches berechnet werden (s. u.).

Ein weiteres Motiv für die Messung von Austauschraten ist die noch offene Diskussion des Protonenflusses in energiekonservierenden Membranen, die in Kapitel 2.3 skizziert wurde. Es ist unklar, ob sich die Protonen über das freie Wasser (*bulk*) oder längs der hydratisierten Oberfläche bewegen. Aus den Austauschraten kann bei bekannter Geometrie auf die Geschwindigkeit des Protonentransfers in Oberflächennähe rückgeschlossen werden.

4.2 Pulssequenz

Die selektive Anregung des Spektrums erfolgt mit einer modifizierten Quadrupolar-Echo-Sequenz:

$$(\pi)_{sel} - \Delta - \left(\frac{\pi}{2}\right)_x - \tau - \left(\frac{\pi}{2}\right)_y - \tau - Acqu.$$

Der erste Puls $(\pi)_{sel}$, positioniert in der Mitte des Spektrums und mit niedriger Leistung, ist gerade so breit, daß er selektiv das D_2O -Signal invertiert, nicht aber die Lipidsignale. Die Frequenzaufspaltungen der austauschenden Hydroxylgruppen (ca. 30 kHz bei Cholesterol, ca. 55 kHz bei Sphingomyelin; jeweils 0° -Orientierung) sind deutlich höher als die des D_2O (einige kHz).

Pulsstärke und -breite werden für jede Messung angepaßt und liegen etwa bei 36 dB bzw. 240 μs . Für eine schärfere Anregung ist $(\pi)_{sel}$ in mehrere Teilpulse aufgeteilt (*composite*-Pulse).

Die nicht-selektiven Pulse $\left(\frac{\pi}{2}\right)_x$ und $\left(\frac{\pi}{2}\right)_y$ entsprechen der normalen Quadrupolar-Echo-Sequenz.

4.3 Berechnung der Austauschraten

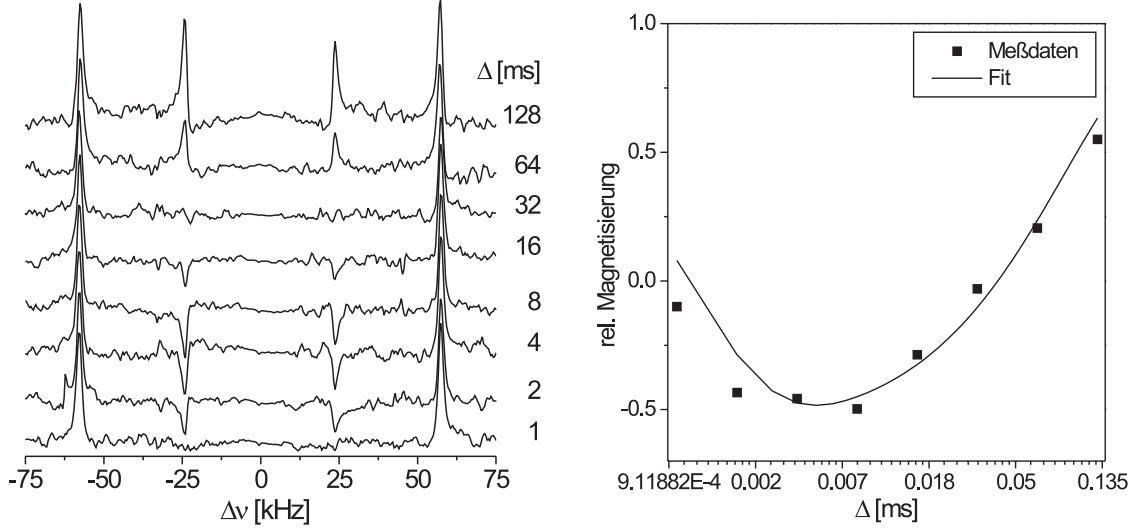
Durch den Inversionstransfer wird das Signal der austauschenden Deuteronen im Idealfall vollständig invertiert.

Abbildung 4.2(a) zeigt typische Spektren austauschender Deuteronen bei Sphingomyelin. Das äußere Signalpaar bei $\Delta\nu \approx 115$ kHz entspricht der Amidgruppe, das innere der Hydroxylgruppe in der C3-Position (Abb. 1.9, S. 11). Die OD-Deuteronen werden für $\Delta = 2 \dots 8$ ms weitgehend invertiert. Für längere Delay-Zeiten relaxiert die Inversion ins thermische Gleichgewicht.

Die Amid-Deuteronen tauschen im Beobachtungszeitraum nicht mit dem Wasser aus.

Das Wassersignal wurde mit digitaler Filterung (*solvent suppression*) unterdrückt; die Breite des Filters `ssfilter` und die Zahl der Koeffizienten `ssntaps` wurden jeweils so angepaßt, daß die Intensität der restlichen Signale unverändert bleibt (hier: `ssfilter` = 1000, `ssntaps` = 39).

Um systematische Veränderungen während der Meßzeit auszuschließen, wurde für jeden Wert Δ ein Referenzspektrum ohne selektive Wasseranregung gemessen. Die relative Magnetisierung in Abbildung 4.2(b) ist also die normierte Intensität des OD-Signals für jeden Einzelwert von Δ .



(a) NMR-Signal austauschender OD-Gruppen (mit Unterdrückung des Wassersignals)

(b) Relative Magnetisierung mit Fit an Gleichung 4.3, logarithmische Zeitachse

Abbildung 4.2: Entwicklung des OD-Signals von vollhydratisiertem EYSM bei Variation der Delayzeit $\Delta = 2^n$ ms, $n = 0 \dots 7$ ($T = 46, 5^\circ\text{C}$, $n_w = 29$)

Die Hin- und Rückraten des Inversionsübertrags, k_w und k_{OD} , sind definiert als:



Der Asterisk steht für eine magnetische Markierung in Form der selektiven Inversion; die entsprechenden Ratenkonstanten 1. Ordnung, k_{\rightarrow} und k_{\leftarrow} , ergeben sich formal aus den Deuteron-Austauschraten:

$$\begin{aligned} k_{OD} &= k_{\rightarrow}[\text{D}_2\text{O}] \quad \text{bzw.} \\ k_w &= k_{\leftarrow}[\text{D}_2\text{O}] \end{aligned} \quad (4.2)$$

Gleichungen 4.3 und 4.4 beschreiben den Zusammenhang von D_2O - und OD-Magnetisierung [104, 105]:

$$\frac{dM^{OD}}{dt} = k_w \cdot M^w - k_{OD} \cdot M^{OD} - (M^{OD} - M_{\infty}^{OD}) \cdot R_1^{OD} \quad (4.3)$$

$$\frac{dM^w}{dt} = -k_w \cdot M^w + k_{OD} \cdot M^{OD} - (M^w - M_{\infty}^w) \cdot R_1^w \quad (4.4)$$

Dabei sind M^{OD} und M^w die relativen Magnetisierungen für die OD-Deuteronen bzw. für das orientierte Wasser und M_∞^{OD} und M_∞^w deren Gleichgewichtswerte.

R_1^{OD} und R_1^w sind die inversen Relaxationszeiten; $R_1^w = 1/T_{1,z}^w$ wird in einer separaten Messung ermittelt, während R_1^{OD} ein Fitparameter ist.

Mit der weiteren Bedingung, daß im chemischen Gleichgewicht der Magnetisierungsübertrag konstant ist, läßt sich der Parameter k_w eliminieren:

$$k_w \cdot M_\infty^w = k_{OD} \cdot M_\infty^{OD} \quad (4.5)$$

mit $M_\infty^w/M_\infty^{OD} = \frac{N_D^{\text{D}_2\text{O}}}{N_D^{\text{Lipid}} \cdot p} \cdot n_w$ analog Glg. 3.36

Die analytische Lösung der gekoppelten Differentialgleichungen 4.3–4.4 hat die allgemeine Form

$$M(t) = C_1 \exp(\lambda_1 t) + C_2 \exp(\lambda_2 t) + M_\infty, \quad (4.6)$$

also die Summe zweier Exponentialfunktionen. Die Abfallängen λ_i sind Funktionen höherer Ordnung der beiden Austauschraten; in die Vorfaktoren C_i gehen neben den Meßgrößen wiederum Funktionen von λ_i ein.

Aufgrund der Komplexität der analytischen Lösung wurden obige Gleichungen numerisch mit *Mathematica* (Version 3.0, Wolfram Research Inc., Champaign/Il., USA) gelöst.

Eingabeparameter sind die Delayzeiten Δ , die zugehörigen relativen Magnetisierungen $M_{OD}(\Delta)$, die inverse Relaxationszeit R_z^w des orientierten Wassers sowie das Verhältnis der Gleichgewichtsmagnetisierungen M_∞^w/M_∞^{OD} . Die Fitprozedur wurde auf die linke und rechte Signalhälfte des NMR-Spektrums separat angewandt und die Ergebnisse unter Beachtung der Fehlerpropagation gemittelt.

Aus Abbildung 4.2(a) geht hervor, daß die Austauschmessungen oft nur mit einem signifikanten Fehler zu machen sind: die Probenmenge ist durch die Versuchsanordnung auf ca. 30 mg limitiert und die Meßzeit kann nicht beliebig lang gewählt werden. Ungeachtet dessen ist der Auswertalgorithmus relativ robust.

Die im folgenden angegebenen Fehlerbalken berechnen sich aus der Ungenauigkeit in der Bestimmung der Austauschraten für die linke und rechte Spektrenhälfte sowie aus deren Abweichungen vom gemeinsamen Mittelwert.

Kapitel 5

Phosphatidylcholin

Anmerkungen:

Die experimentellen Ergebnisse wurden entsprechend der inhaltlichen Schwerpunkte in zwei Kapitel unterteilt:

- In **Kapitel 5** werden die Informationen, die eine kontrollierte Dehydratisierung von Membranen mit Festkörper-NMR liefert, am Beispiel von verschiedenen reinen und gemischten PC-Systemen in makroskopisch orientierten Membranzwischen¹ ausgiebig untersucht. Zur Bestimmung der Hydrationszahl n_w im ²H-NMR-Spektrum wurden die Membranen mit deuteriertem Wasser (D₂O) präpariert (s. Kap. 3.4). Ziel dieser Arbeiten war es, Referenzsysteme für die folgende Untersuchung von Sphingomyelin-Membranen zu erhalten. Am Beispiel von PC/Cholesterol- und Cardiolipin-Systemen wurde die Methode des Inversionstransfers zur Bestimmung von Austauschraten labiler Deuterone etabliert.
- In **Kapitel 6** werden Ergebnisse für orientierte Sphingomyelin-Multilayer diskutiert.

Bei jeder Messung werden meist mehrere Parameter gleichzeitig erfaßt: neben der Orientierung des interlamellaren Wassers und von ²H-markierten Molekülsegmenten als Funktion der Hydratation auch Relaxationszeiten, ggf. Austauschraten labiler Deuterone sowie die Bildung von Domänen in teilhydratisierten Systemen. Da diese Parameter oft miteinander im Zusammenhang stehen, wurden die Ergebnisse nicht thematisch, sondern nach den untersuchten Lipiden geordnet. Eine Zusammenfassung und Interpretation der Resultate erfolgt am Schluß des Kapitels.

5.1 Reine Phosphatidylcholin-Membranen

In diesem Abschnitt wird für orientierte Zwischenschichten von *d*54-DMPC und *d*62-DPPC (jeweils beide Acylketten perdeuteriert) sowie von *d*31-POPC (*sn*-1-Kette deuteriert)² anhand der Quadrupolaufspaltung die Ordnung des interlamellaren Wassers (D₂O) und

¹ Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf senkrecht zum Magnetfeld orientierte Membranen ($\theta = 0$).

² DMPC: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin
DPPC: 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin
POPC: 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin

der Acylketten als Funktion der Hydratation bestimmt. Diese Modellsysteme wurden bereits in der Vergangenheit eingehend untersucht (siehe z. B. [52, 55, 93, 98, 201, 202]).

In der vorliegenden Arbeit sollten sie als Referenzmessungen für Mischungen, z. B. mit Sphingomyelin, sowie zum Vergleich mit einer Molekulardynamik-Simulation von POPC [77] herangezogen werden. Dabei haben sich jedoch neue Ergebnisse aufgetan, die im Hinblick auf aktuelle Untersuchungen zur Energetik von Hydratisierungsprozessen [14, 118] gut verstanden werden können. Bei niedrigen Hydratationen wurde Domänenbildung in orientierten Multischichten beobachtet und daraus die Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur T_m von der Hydratisierung n_w bestimmt.

Die geometrischen Eigenschaften der untersuchten Lipidmembranen bei voller Hydratisierung³ sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt [134]⁴.

Lipid	DMPC (30°C)	DPPC (50°C)	EYPC (30°C)
n_w (mol/mol)	25,6	30,1	34,7
A (Å ²)	59,6	64	69,4
V_C (Å ³)	782	913	942
V_{CH_2} (Å ³ /Gruppe)	28,1	28,7	–
D (Å)	62,7	64	66,3

Tabelle 5.1: Physikalische Eigenschaften von vollhydratisierten PC-Multilayern; A : mittlere Kopfgruppenfläche, V_C : mittleres Volumen der Kohlenwasserstoffketten; V_{CH_2} : Volumen einer einzelnen Methylengruppe, D : Wiederholabstand zwischen zwei Bilayern (*lamellar repeat distance*)

Die Phasenübergangstemperaturen für die untersuchten Lipide in der protonierten und deuterierten Form sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt; soweit nicht anders zitiert, wurden die Daten aus den verfügbaren LIPIDAT-Einträgen [113] gemittelt:

Lipid	DMPC	DPPC	POPC
$T_m^{\text{protoniert}}$ [°C]	23,7	41,25 [198]	-5
$T_m^{\text{deuteriert}}$ [°C]	19,5±0,5 [190]	37,75 [198]	-6 [188]

Tabelle 5.2: Phasenübergangstemperaturen T_m von vollhydratisiertem DMPC, DPPC und POPC für protonierte und perdeuterierte Acylketten (POPC: d_{31} ($sn-1$); DMPC: d_{54} ($sn-1,2$); DPPC: d_{62} ($sn-1,2$))

³ „Volle Hydratisierung“ bezeichnet im folgenden den Bereich, in dem die NMR-empfindlichen Parameter bei Erhöhung von n_w (fast) konstant bleiben.

⁴ EYPC, d. h. aus Eigelb (*Egg Yolk*) extrahiertes PC, ist weitgehend mit POPC identisch.

5.1.1 Interlamellares Wasser

Abbildung 5.1 zeigt typische NMR-Spektren von mit D_2O hydratisierten $d62$ -DPPC Multilayern bei $n_w = 23,4$ für Temperaturen ober- und unterhalb des Phasenübergangs.

Oberhalb des Phasenübergangs bei $37,75^\circ C$ nehmen die Quadrupolaufspaltungen der Acylkettensignale mit steigender Temperatur durch erhöhte Segmentbewegungen ab. Beim Übergang in die Gelphase steigt $\Delta\nu$ durch Einfrieren der Kettenbewegung stark an; es können keine Einzelsignale mehr aufgelöst werden.

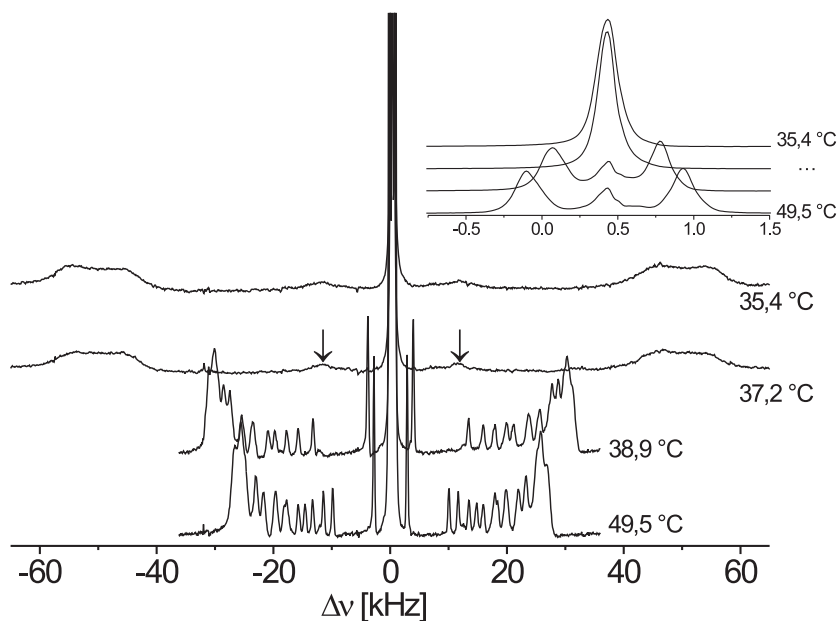


Abbildung 5.1: NMR-Spektren von $d62$ -DPPC Multilayern bei $n_w = 23,4$; *Inlay*: D_2O -Signale. Die Pfeile kennzeichnen die Position der terminalen Methylgruppen in der Gelphase

Die D_2O -Aufspaltung $\Delta\nu(D_2O)$ nimmt in der L_α -Phase mit steigender Temperatur zu (*Inlay*-Spektrum); in der Gelphase tritt im untersuchten Temperaturbereich nur eine stark verbreiterte Linie auf. Ein geringer Anteil D_2O ist in der flüssigkristallinen Phase unorientiert (Signal in der Spektrenmitte); durch zu schnelle Hydratisierung oder zu kurze Äquilibrierungszeiten ordnen sich eventuell Teile des Lipid/Wasser-Gemisches nicht zu Bilayern, sondern bilden vesikuläre Phasen, die in ihrem Innern und in den Zwischenräumen Wasserkavitäten enthalten.

Abbildung 5.2 faßt die Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu(D_2O)$ von DPPC und POPC für unterschiedliche Hydratationen zusammen. In beiden Fällen steigt $\Delta\nu(D_2O)$ in der L_α -Phase mit abnehmendem n_w . Bei niedriger Hydratisierung steigt die Temperatur des Phasenübergangs etwas an (Abschnitt 5.1.4) und es bleibt für $T \leq T_m$ ein Splitting $\Delta\nu(D_2O) > 0$. Zugleich tritt in diesem Bereich eine zweite Komponente im Spektrum auf.

Anmerkung: Die Äquilibrierungszeit betrug bei allen Messungen mit Temperaturvariation 15–20 min pro 2 K Temperaturänderung. Eichexperimente mit einem Temperatursensor am Probenort (S. 39) sowie die NMR-Spektren der Lipide zeigen, daß diese Intervalle ausreichend sind. Soweit nicht anders angegeben, sind für Messungen bei variabler Temperatur nur die Daten der Kühlzyklen gezeigt, da für $n_w > 5$ die Quadrupolaufspaltungen in Heiz- und Kühlzyklus gleich sind.

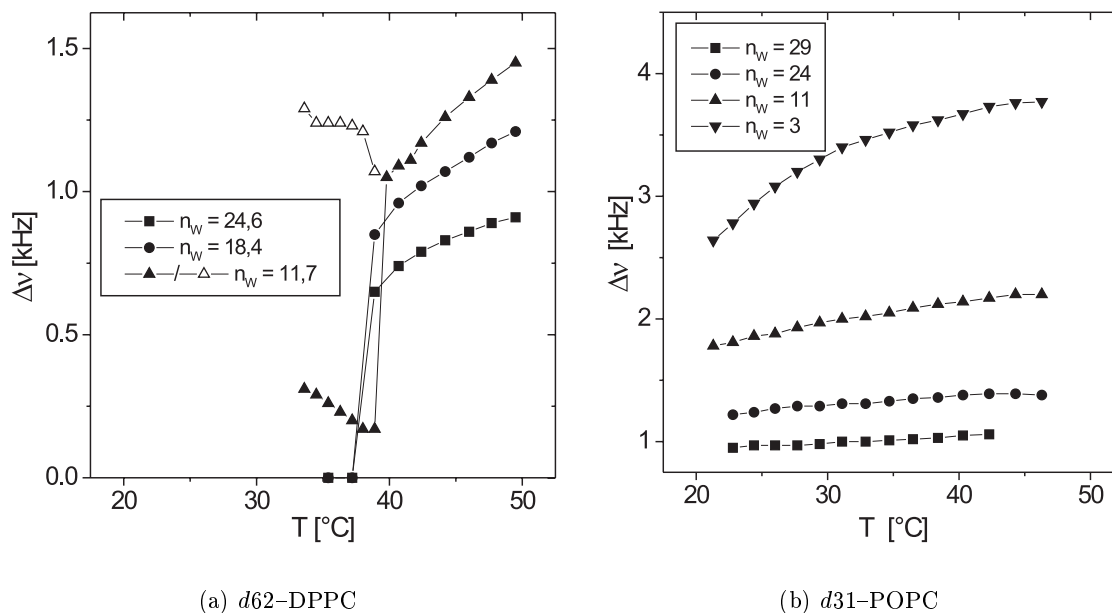


Abbildung 5.2: $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ vs. Temperatur bei DPPC- und POPC-Membranen für unterschiedliche n_w ; offene Symbole in (a): 2. Komponente im ^2H -Spektrum

Der Betrag von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ ist für POPC bei vergleichbaren Hydratationen deutlich größer, da es weiter vom Phasenübergang entfernt ist. Normiert man die Temperatur auf eine reduzierte Temperatur bezüglich des Phasenübergangs, $T_{red} = (T - T_m)/T_m$ (T , T_m in Kelvin), so fallen die Kurven für gleiche Hydratation annähernd zusammen:

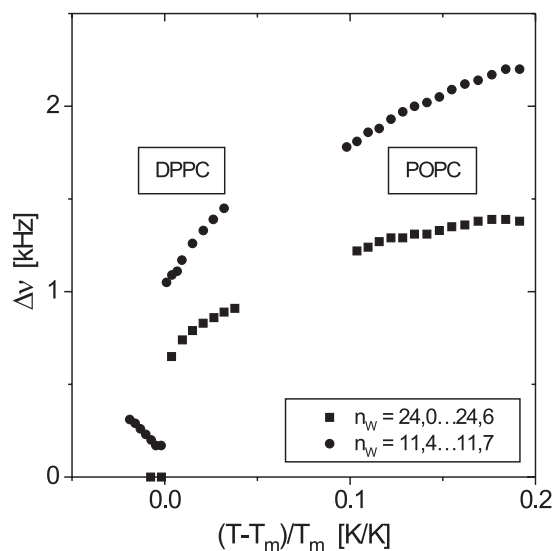


Abbildung 5.3: $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für DPPC und POPC als Funktion der reduzierten Temperatur T_{red} ; n_w beträgt für POPC 24,0 bzw. 11,4 und für DPPC 24,6 bzw. 11,7. Bei DPPC wurde der Anstieg von T_m auf ca. 39,5 °C bei $n_w = 11,7$ berücksichtigt.

Für hohe Hydratationen folgt $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für DPPC und POPC trotz unterschiedlicher Ket-

tenlänge und -sättigung einem universellen Verhalten. Die mittleren Kopfgruppenflächen der Lipide sind in etwa gleich (Tabelle 5.1) und damit auch die Zahl der Wassermoleküle, die in direkten Kontakt zur Membranoberfläche treten können. Deren Wechselwirkung mit den PC-Molekülen findet vor allem mit den Carbonylgruppen, der Phosphat- und der Trimethylammoniumgruppe statt [77, 145].

Bei $n_w \approx 11$ ist die Korrelation von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für DPPC und POPC schlechter, da sich DPPC in der Nähe des Phasenübergangs befindet und sich deshalb Änderungen in der Kopfgruppenfläche und der Molekülbeweglichkeit ergeben.

Ein skaleninvariantes Verhalten bezüglich der reduzierten Temperatur ist typisch für Phasenübergänge, die sich nach der **Landau-Entwicklung der Freien Energie** beschreiben lassen [162]. Ein invariantes Verhalten gegenüber T_{red} wurde in [173] auch für den Ordnungsparameter der Acylketten von POPC, DPPC, DPPS und DPPE gezeigt.

Anmerkung: Untersuchungen bei reduzierter Temperatur lassen sich besser vergleichen; praktisch sind die Messungen auf den Bereich $\approx 15 \dots 60^\circ\text{C}$ beschränkt. Unterhalb von 15°C muß der Gasstrom für die Temperaturregelung im NMR-Gerät mit flüssigem Stickstoff betrieben werden; dies wurde wegen der Kondensatbildung im Kühlsystem und in der Probe vermieden. Bei zu hohen Temperaturen sinkt die Hydratation während eines Meßzyklus um mehr als 5 %.

Die Hydratationsabhängigkeit von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei konstanter Temperatur ist in Abbildung 5.4 für DMPC, DPPC und POPC zusammengefaßt. Es wurde jeweils oberhalb des Phasenübergangs der vollhydratisierten Lipide gemessen ($T = 38^\circ\text{C}$ für POPC und DMPC, $T = 45^\circ\text{C}$ für DPPC).

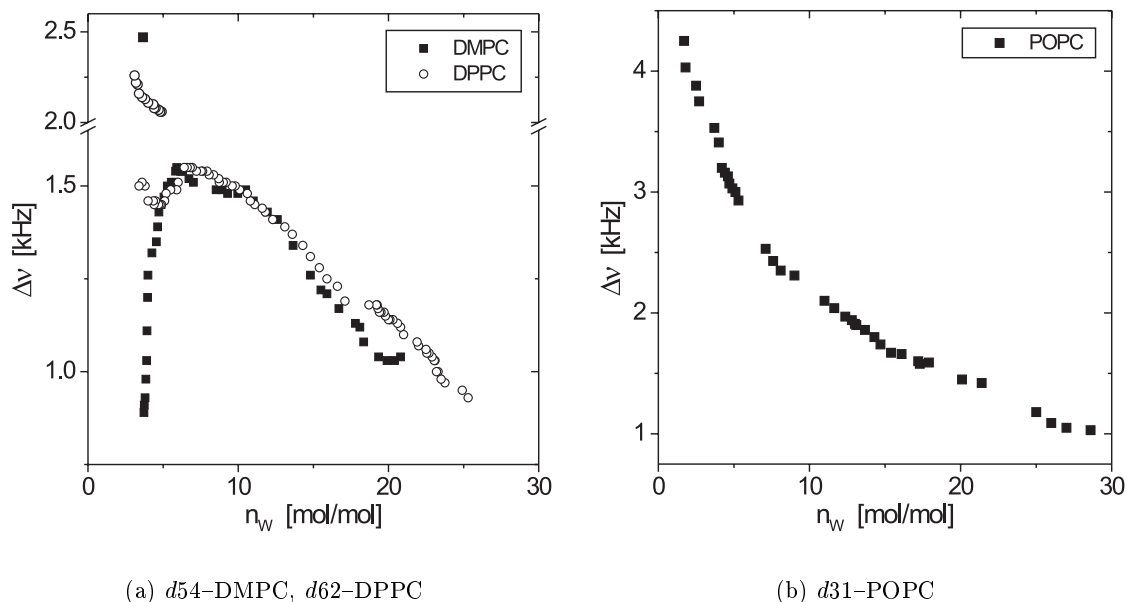


Abbildung 5.4: $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei PC-Membranen als Funktion von n_w bei konstanter Temperatur ($T = 38^\circ\text{C}$ für POPC und DMPC, $T = 45^\circ\text{C}$ für DPPC)

Die Zunahme der Wasserordnung bei **Dehydratisierung** ist für DMPC und DPPC trotz unterschiedlicher Kettenlänge und einer daraus resultierenden anderen Schmelztemperatur T_m für $n_w > 8$ ähnlich und qualitativ anders als bei POPC. Bei POPC (Abb. 5.4(b)) steigt $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in etwa exponentiell mit abnehmendem n_w , während dieser Verlauf bei DMPC

und DPPC weniger deutlich ausgeprägt ist.

Für die gesättigten PCs flacht der Verlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei $n_w < 10$ ab: da sich beide Lipide nahe dem Phasenübergang befinden und T_m in diesem Bereich deutlich ansteigt (s. u.), wird der Effekt der Dehydratisierung (Zunahme von $\Delta\nu$) durch den Anstieg von T_m (Abnahme von $\Delta\nu$, vgl. Abb. 5.3) kompensiert.

Für $n_w < 5$ bricht $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei DMPC und DPPC zusammen und es tritt eine zweite Signalkomponente im Spektrum auf. Dies läßt sich mit einer partiellen Entmischung in koexistierende Gelphasen- und flüssigkristalline Domänen erklären (siehe Abb. 5.12(d)). Jede Lipidkopfgruppe ist im Mittel nur noch von einer Wasserlage bedeckt; es wird eine Art Perkolationsgrenze für die Bewegung des Wassers in der Bilayerebene erreicht. Bei POPC wurde bis zu einer Hydratation von $n_w = 1,7$ keine Perkolationsgrenze beobachtet.

Die Koexistenz von 2 Wassersignalen bedeutet, daß die Gel-/Fluiddomänen groß genug sind, so daß das Wasser im Beobachtungszeitraum nicht mehr zwischen ihnen austauschen kann. Aus der Integral der beiden Signale läßt sich unter Verwendung der in [204] mit PFGSE- ^1H -NMR⁵ gemessenen Diffusionskonstanten D_{lat} parallel zur Oberfläche die Größe der Gelphasendomänen abschätzen. Dabei wird vereinfachend angenommen, daß die Domänen kreisförmig sind und sich in einer zusammenhängenden flüssigkristallinen Matrix befinden; die Breite des Übergangsbereichs von Gel- zu Fluiddomänen wird vernachlässigt.

Abbildung 5.5 zeigt die aus [204] entnommenen Diffusionskonstanten als Funktion der Hydratation.

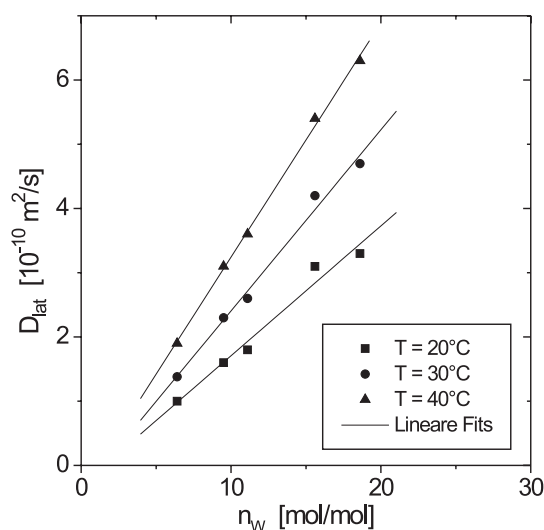


Abbildung 5.5: Diffusionskonstante D_{lat} von H_2O auf orientierten EYPC-Multilayern als Funktion von T und n_w ; Daten aus [204] bzw. für 40°C daraus extrapoliert

⁵ *Pulsed Field Gradient Spin Echo*-NMR: in einem statischen Feldgradienten wird die Echo-Amplitude nach einer *Quadrupolar-Echo*-Anregung (Kap. 3.5.1, S. 40) durch Diffusion moduliert:
 $A(G) = A(0) \exp[-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D]$;
 G bzw. δ sind Amplitude und Breite des Gradientenpulses und Δ der Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Pulsen, γ ist das gyromagnetische Verhältnis und D die Diffusionskonstante.

Die mittlere quadratische Entfernung, die ein Wassermolekül in der Zeit Δt durchläuft, ergibt sich aus der Einstein-Gleichung für zweidimensionale Diffusion [111]:

$$\langle r^2 \rangle(\Delta t) = 4 D_{lat} \Delta t \quad (5.1)$$

$\Delta t = 1/\Delta\Delta\nu$ ist der reziproke Frequenzabstand der austauschenden Signale (Abb. 5.6).

Damit ist die mittlere Fläche A_{dom} einer Gelphasendomäne:

$$A_{dom} \approx \langle r^2 \rangle \pi \quad (5.2)$$

Bei $n_w = 6,5$ ist $\Delta\Delta\nu = 200 \dots 300$ Hz und $D_{lat} \approx 2 \cdot 10^{-11}$ m²/s bei $T \approx 40$ °C; damit erhält man $A_{dom} \approx 13 \dots 8$ μm² bzw. einen mittleren Domänenradius von $2 \dots 1,6$ μm.

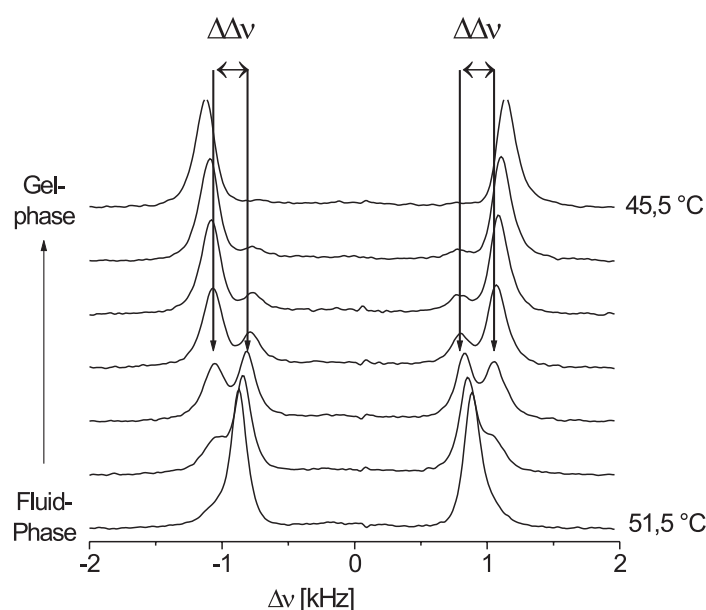


Abbildung 5.6: D₂O-Signal von koexistierenden Gel-/Fluiddomänen in DPPC-Membranen bei $n_w = 6,5$; $\Delta\Delta\nu$ ist der Frequenzabstand von Gel- und Fluidphasensignal

Die größte Unsicherheit in der Bestimmung der Domänengröße A_{dom} liegt in der Abschätzung der Diffusionskonstante D_{lat} in diesem Bereich. Es existieren nur Daten für EYPC, das sich bei den in [204] untersuchten Hydratationen ($n_w = 4,9 \dots 18,6$) und Temperaturen ($T = 1 \dots 31$ °C) anders als DPPC meist über dem Phasenübergang befindet (Abb. 5.11(b)). In einer gemischten Gel-/Fluidphase könnte D_{lat} und damit A_{dom} deutlich kleiner sein.

5.1.2 Acylkettenbereich

In Abbildung 5.7 ist für *d54*-DMPC, *d62*-DPPC und *d31*-POPC die Hydratationsabhängigkeit von $\Delta\nu$ für den Plateaubereich der Acylketten und die terminale Methylgruppe zusammengefasst.

Die Quadrupolaufspaltungen des **Plateaubereichs** (Abb. 5.7(a)), also der Methylengruppen 2–6 (*sn*-1) bzw. 3–6 (*sn*-2), sind bei DMPC und DPPC für $n_w \geq 6$ identisch und erreichen bei $n_w \approx 20$ einen Minimalwert von 51 kHz, entsprechend einem Ordnungsparameter $|S_{CD}| = 0,20$.

Die Kettenordnung von POPC ist aufgrund der größeren Kopfgruppenfläche (Tabelle 5.1) und der höheren reduzierten Temperatur deutlich niedriger als bei den gesättigten Lipiden.

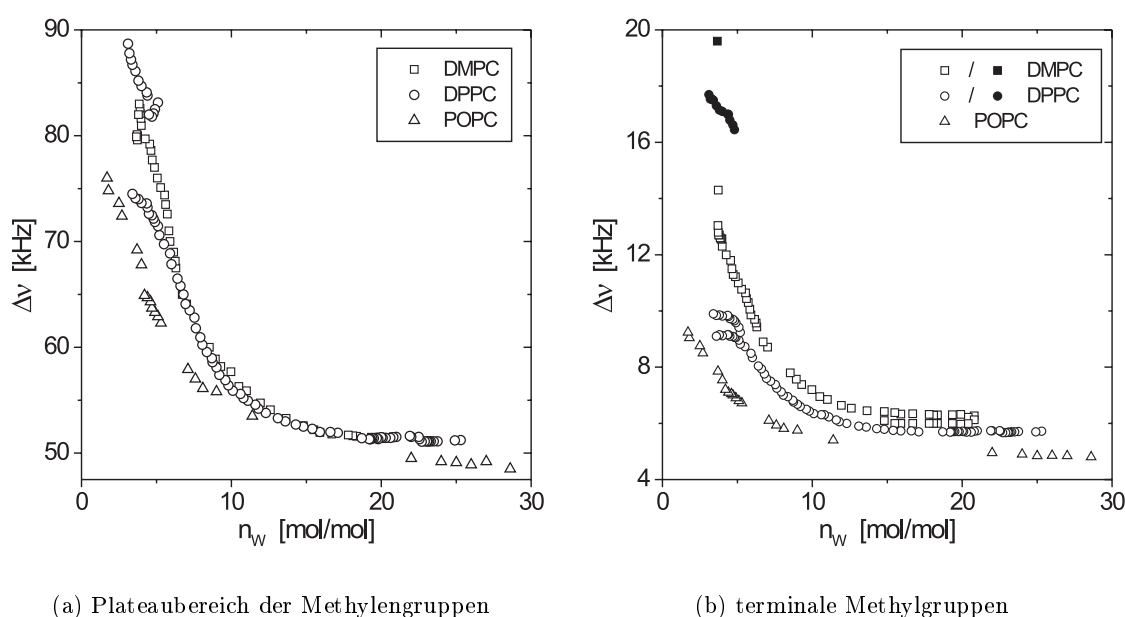


Abbildung 5.7: Quadrupolaufspaltungen des Acylkettenbereichs von *d54*-DMPC, *d62*-DPPC und *d31*-POPC als Funktion von n_w bei konstanter Temperatur (38 °C bei DMPC und POPC bzw. 45 °C bei DPPC); geschlossene Symbole in (b): Gelphasensignale

Die Ordnung der **terminalen Methylgruppen** (Abb. 5.7(b)) nimmt mit zunehmender Kettenlänge und/oder Unsattheit entsprechend den mittleren Kopfgruppenflächen ab.

Für $n_w > 15$ wurden bei DMPC, nicht aber bei DPPC separate Signale der terminalen Methylgruppen der *sn*-1 und *sn*-2 Kette mit einem mittleren Frequenzabstand von 300 Hz beobachtet.

Bei DPPC spaltet das Signal der terminalen Methylgruppe für $n_w < 5$ in 3 Subspektren auf: neben einem Gelphasensignal bei 16,5–17,7 kHz sieht man 2 Signale der flüssigkristallinen Phase mit einer mittleren Frequenzaufspaltung von 740 Hz.

Der monoton ansteigende Teil der Kurven in Abbildung 5.7(b) läßt sich in einem modellfreien Ansatz mit einer Exponentialkurve nach Gleichung 5.3 nähern:

$$\Delta\nu(\text{CH}_3) = \Delta\nu^\infty + a \cdot \exp\left(-\frac{n_w}{b}\right) \quad (5.3)$$

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 mit den Meßwerten dargestellt und in Tabelle 5.3 zusammengefaßt.

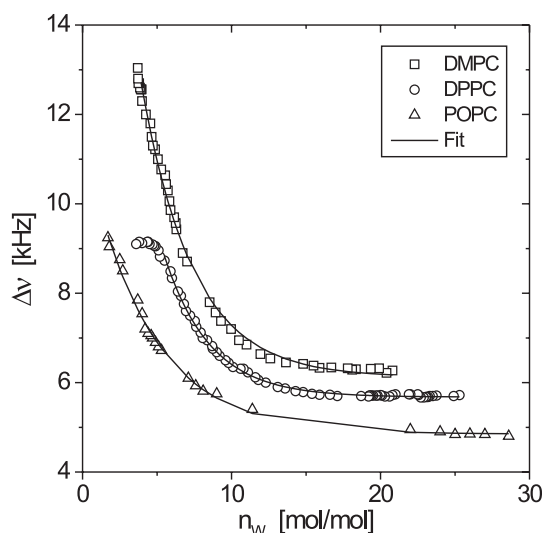


Abbildung 5.8: Exponentialfits der Quadrupolaufspaltung der terminalen Methylgruppen von *d54*-DMPC, *d62*-DPPC und *d31*-POPC ($T = 38^\circ\text{C}$ für DMPC und POPC, $T = 45^\circ\text{C}$ für DPPC)

Lipid	DMPC	DPPC	POPC
$\Delta\nu^\infty$	$6,12 \pm 0,05$	$5,68 \pm 0,01$	$4,85 \pm 0,04$
a	$20,29 \pm 0,70$	$18,72 \pm 0,48$	$6,63 \pm 0,14$
b	$3,49 \pm 0,10$	$3,09 \pm 0,04$	$4,26 \pm 0,14$

Tabelle 5.3: Fitparameter in Abbildung 5.8

Die Abfalllänge b ist für POPC deutlich größer als für die gesättigten Lipide. Die Doppelbindung in der *sn-2*-Kette führt zu einem höheren isothermen Kompressibilitätsmodul $K_A = A(\partial T/\partial A)_T$ [134]; damit erstreckt sich der Ordnungsprozeß der Acylketten bei Dehydratisierung über einen längeren Bereich.

Die auf $n_w = 0$ extrapolierte Quadrupolaufspaltung $\Delta\nu(\text{CH}_3) = \Delta\nu^\infty + a$ ist für DPPC 24,4 kHz und damit gleich der Aufspaltung der Signale in der vollhydratisierten Gelphase (23,2 kHz; Markierung in Abb. 5.1). **Die Zunahme der Kettenordnung von DPPC in der Gelphase ist also äquivalent einer weitgehenden Dehydratisierung.**

5.1.3 Interpretation der Hydratationsabhängigkeit von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$

Volke et al. [201] stellten ein Modell auf, in dem der hydrationsabhängige Verlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ als Zweiseiten-Austausch zwischen oberflächennahem, mit der Membran wechselwirkendem Wasser und freiem Wasser (*bulk water*) interpretiert wird:

Aufgrund schnellen Austausches wird bei der Hydratation n_w eine mittlere Quadrupolaufspaltung $\langle\Delta\nu\rangle$ von D_2O gemessen:

$$\langle\Delta\nu(n_w)\rangle = \frac{1}{n_w} \int_0^{n_w} \Delta\nu(n'_w) dn'_w \quad (5.4)$$

Das Quadrupolsplitting des n'_w -ten Wassermoleküls beträgt:

$$\Delta\nu(n'_w) = \Delta\nu^0 \exp\left(-\frac{n'_w}{n_w^0}\right) \quad (5.5)$$

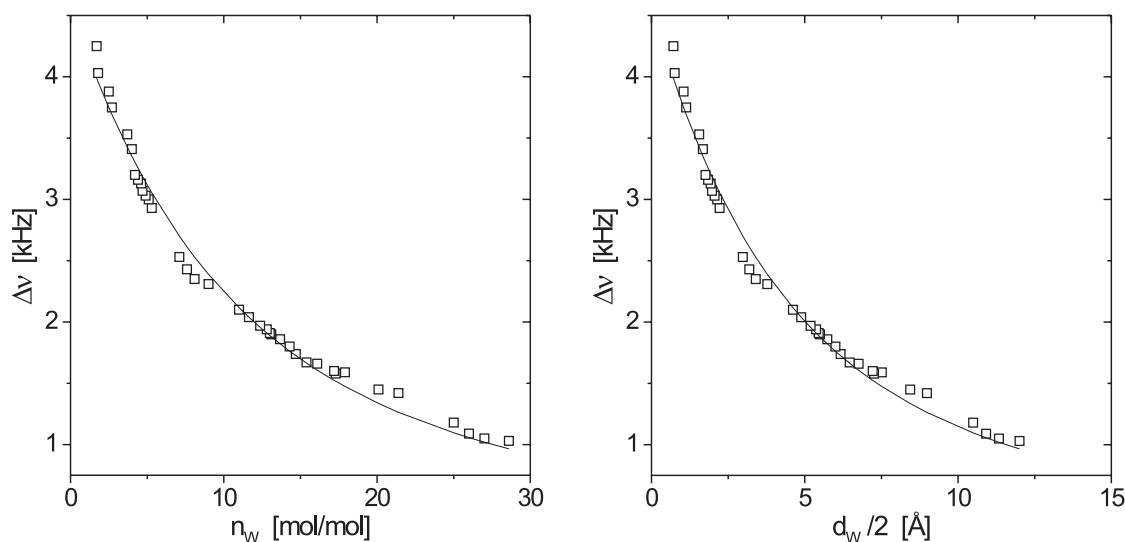
n_w^0 ist eine Konstante und $\Delta\nu^0$ ein hypothetisches Splitting für $n_w = 0$.

Damit ergibt sich für Gleichung 5.4:

$$\langle\Delta\nu(n_w)\rangle = \frac{\Delta\nu^0 \cdot n_w^0}{n_w} \left[1 - \exp\left(-\frac{n_w}{n_w^0}\right)\right] \quad (5.6)$$

Aus der obigen Diskussion geht hervor, daß Gleichung 5.6 nur bei hohen reduzierten Temperaturen, also weit weg vom Phasenübergang, erfüllt ist.

In Abbildung 5.9(a) ist $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ von POPC nach Gleichung 5.6 genähert.



(a) $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ als Funktion von n_w mit Fit nach Gleichung 5.6

(b) $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ als Funktion von $d_w/2$ mit Fit nach Gleichung 5.7; $d_w/2$: Dicke der Wasserschicht über der Membran

Abbildung 5.9: Fit von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ von POPC-Membranen gemäß Gleichung 5.6 bzw. 5.7

Die Fitergebnisse sind $\Delta\nu^0 = 4571 \pm 64 \text{ Hz}$ und $n_w^0 = 6,10 \pm 0,18$, im Vergleich mit

2343 ± 80 Hz bzw. $5,03 \pm 0,3$ für POPC bei 23°C in [201]⁶. Die etwas größere Abfalllänge n_w^0 in orientierten Multischichten entspricht der Beobachtung, daß in diesen Systemen auch bei hoher Hydratation eine endliche Quadrupolaufspaltung beobachtet wird.

In Abbildung 5.9(b) wurde n_w auf die durchschnittliche Dicke $d_w/2$ der Wasserschicht über der Membran transformiert:

$$d_w/2 = \frac{n_w \cdot v_w}{A_{KG}} \quad (5.7)$$

$A_{KG} \approx 69,4 \text{ \AA}^2$ ist die mittlere Kopfgruppenfläche von POPC (Tab. 5.1) und $v_w = 29,13 \text{ \AA}^3$ das mittlere Volumen eines D_2O -Moleküls bei 40°C [110]⁷.

Eine entsprechende Modifikation von Gleichung 5.6,

$$\langle \Delta\nu \rangle = \frac{\Delta\nu^0 \cdot \lambda^0}{n_w} \left[1 - \exp\left(-\frac{n_w}{\lambda^0}\right) \right] \quad (5.8)$$

ergibt $\lambda^0 = 2,56 \pm 0,07 \text{ \AA}$, in guter Übereinstimmung mit der Abfalllänge λ des Hydratationsdrucks (Glg. 2.2, S. 23): in [158] wurde für EYPC mit der *osmotic pressure* Methode $\lambda = 2,1 \text{ \AA}$ gemessen.

5.1.4 Hydratationsabhängigkeit der Phasenübergangstemperatur T_m

Mit abnehmender Hydratation steigt die Temperatur T_m des Phasenhauptübergangs in PC-Multischichten stark an. Bedingt durch die Schwierigkeit, kontrolliert und exakt niedrige Hydratationen einzustellen, streuen die Literaturwerte für $T_m(n_w)$ erheblich. Bei der Untersuchung dehydratisierter Vesikel (z. B. mittels DSC) besteht zudem die Schwierigkeit, eine Wechselwirkung der Vesikel untereinander und mit der Meßzelle zu vermeiden.

Die Dehydratisierung orientierter, ^2H -markierter Multischichten im NMR-Spektrometer ist gut kontrollierbar, wenn der Austausch von D_2O gegen H_2O aus der Kühlluft unterbunden wird (Kap. 3.6.4, S. 46). Der Fehler von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ bei der Probenentemperatur im NMR-Gerät ist gegenüber der Breite der Phasenübergänge bei kleinen n_w meist vernachlässigbar. Allerdings liegt T_m bei deuterierten Lipiden um einige $^\circ\text{C}$ tiefer als bei protonierten (Tab. 5.2).

In Abbildung 5.10 wird der Anstieg von T_m bei $d54\text{-DMPC}$ in D_2O mit Literaturdaten für protoniertes DMPC in D_2O [52] (DSC) sowie in H_2O (dielektrische Messungen [139] bzw. verschiedene Techniken [113]) verglichen. Die Fehlerbalken der NMR-Resultate stellen keine Ungenauigkeit in der Bestimmung von T_m dar, sondern den Bereich, in dem die D_2O -Signale von 10 auf 90 % ihres Maximalwertes in der Fluid- bzw. Gelphase ansteigen (vgl. Abb. 6.37(b)).

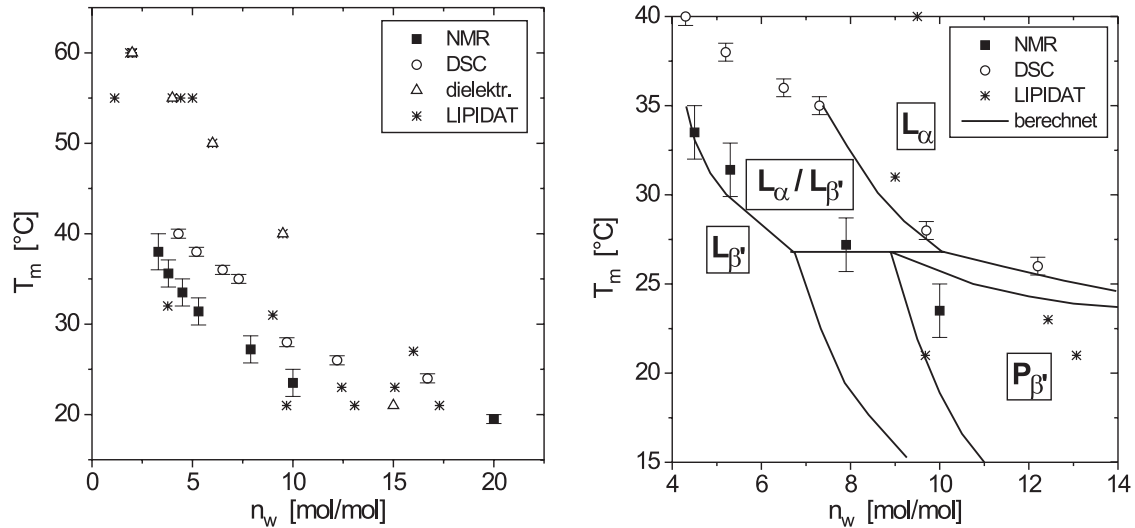
Ein Ausschnitt der Daten ist in Abbildung 5.10(b) in ein berechnetes Phasendiagramm von protoniertem DMPC [118] eingetragen. Die erwartete Breite des Koexistenzbereichs von L_α - und L_β -Phase kann experimentell nicht bestätigt werden; dies liegt unter anderem an der Definition von Anfangs- und Endpunkt des Phasenübergangs.

In Abb. 5.11(a) werden NMR-Resultate von $d62\text{-DPPC}$ mit 49 LIPIDAT-Daten verglichen. Letztere wurden aufgrund der starken Streuung für gleiche n_w gemittelt (Fehlerbalken: Standardabweichung). Die gestrichelten Linien sind aus einer optischen Untersu-

⁶ Da in [201] multilamellare Vesikel untersucht wurden, unterscheidet sich $\Delta\nu^0$ um einen Faktor 2.

⁷ Korrekturen für die Hydratationsabhängigkeit von A_{KG} [39,134] wurden in erster Näherung vernachlässigt.

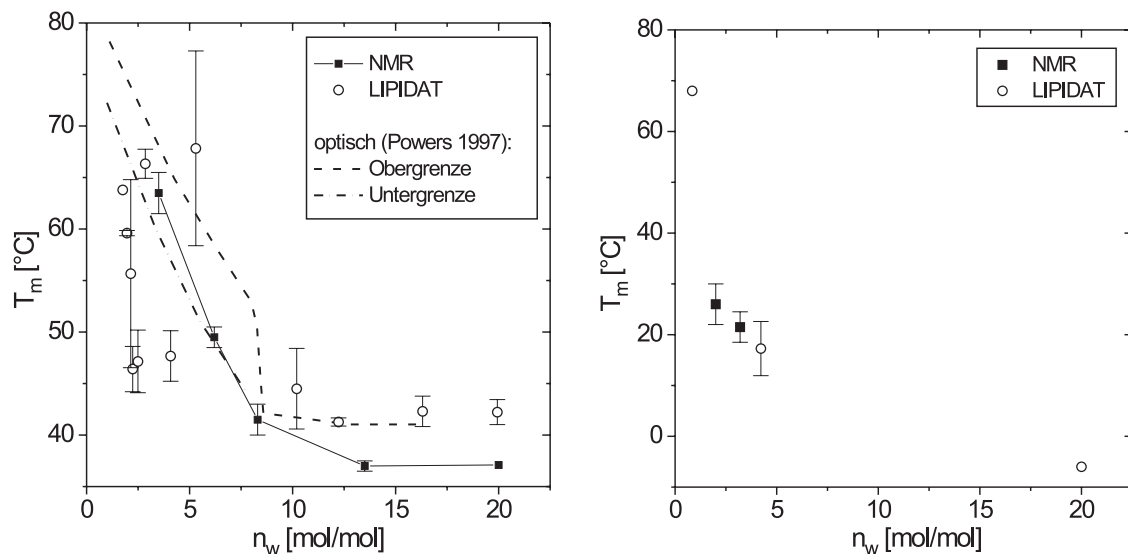
chung von DPPC-Bilayern [152] ermittelte Grenzen des Koexistenzbereichs von L_α - und L_β -Phase.



(a) NMR-Daten ($d54$ -DMPC) und Literaturdaten aus [52, 139] und LIPIDAT (9 Einträge)

(b) Ausschnitt aus (a) mit berechneten Phasengrenzen (in [118])

Abbildung 5.10: Hydratationsabhängigkeit von T_m für DMPC



(a) DPPC: NMR-Daten ($d62$ -DPPC) und LIPIDAT (49 Einträge); gestrichelte Linien: Koexistenzbereich L_α/L_β nach [152]

(b) POPC: NMR-Daten ($d31$ -POPC) und LIPIDAT (4 Einträge)

Abbildung 5.11: Hydratationsabhängigkeit von T_m für DPPC und POPC

In Abbildung 5.11(b) sind analog NMR-Resultate und Literaturwerte für **POPC** zusam-

mengefaßt. Aufgrund der niedrigen Phasenübergangstemperatur bei voller Hydratation liegen nur wenige Meß- und Literaturwerte vor.

5.1.5 Domänenbildung

Die Existenz von koexistierenden Gel-/Flüssigphasen-Domänen in Lipidschichten bei niedriger Hydratation wurde bereits für DPPC beobachtet [88, 94, 192]. In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Resultate für POPC und DMPC erhalten. Auf Glas nach der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode orientierte Multischichten von DPPC liefern vergleichbare Ergebnisse wie die in [94] verwendete Methode der Vesikelspreitung auf Silizium-Substraten mit Hydratation aus der Dampfphase.

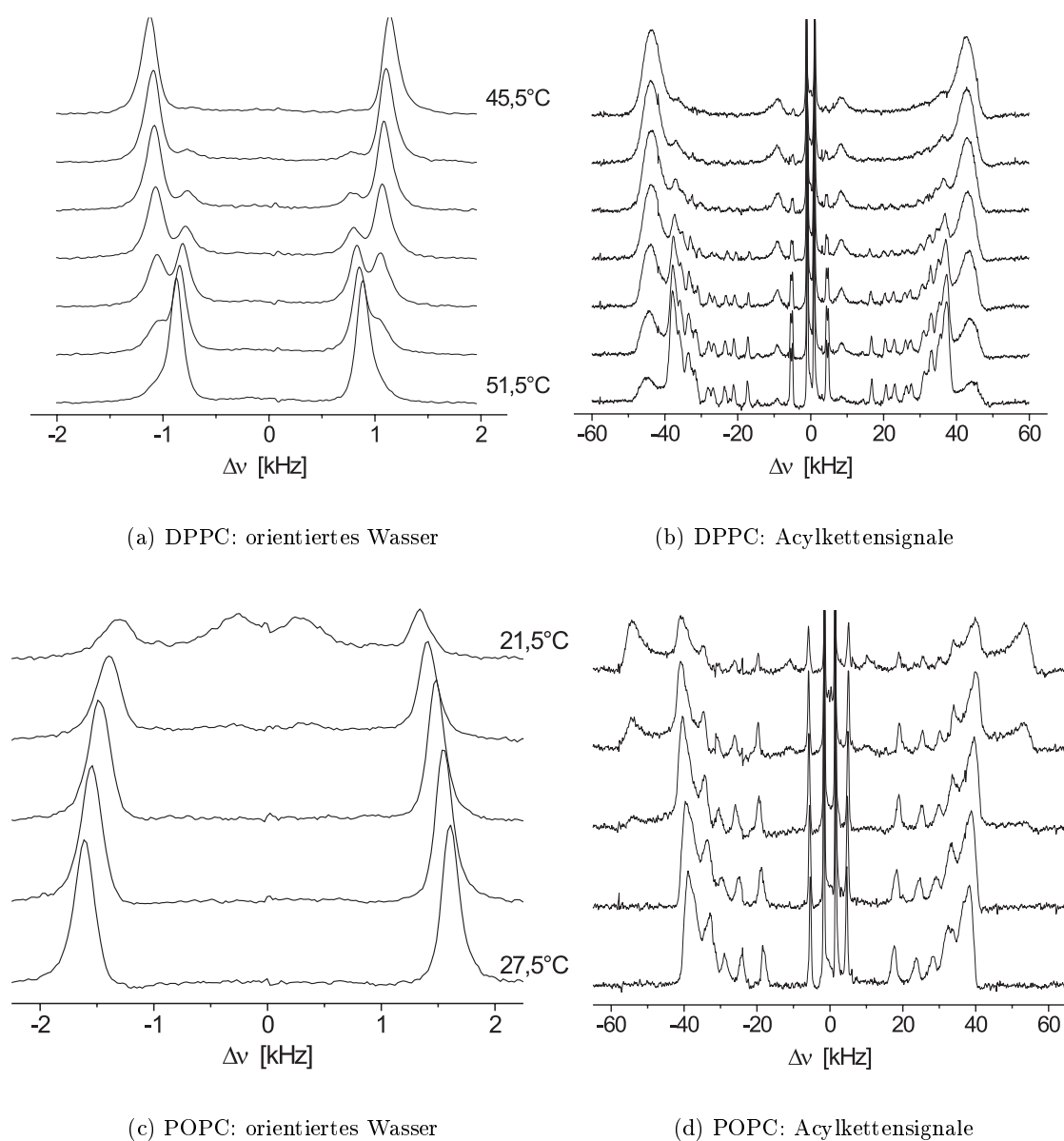


Abbildung 5.12: Koexistierende Domänen in $d62$ -DPPC- und $d31$ -POPC Membranen ($n_w = 6$ bzw. 4); Temperaturschritte $\Delta T = 1^\circ\text{C}$ (a,b) bzw. $1,5^\circ\text{C}$ (c,d)

5.1.6 Diskussion

Interlamellares Wasser:

Bei voller Hydratation zeigt die Quadrupolaufspaltung des interlamellaren Wassers bei DPPC und POPC ein universelles Verhalten, wenn $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ über der reduzierten Temperatur T_{red} dargestellt wird (Abb. 5.3 und [71]); für die Orientierung der Wassermoleküle ist also in erster Linie die Struktur der Kopfgruppe relevant.

Bei teilweiser Dehydratisierung versagt eine Darstellung von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ vs. T_{red} , da hier die Dynamik des Wassers und der Acylketten für die verschiedenen Lipide divergieren und zudem eine unterschiedliche Interbilayer-Wechselwirkung unterstellt werden kann.

Die Ordnungsparameter der Acylketten (genauer: des Plateaubereichs) von POPC und DPPC verlaufen in einer Auftragung über T_{red} zwar auch parallel, unterscheiden sich aber aufgrund der Un sättigung der Oleoylkette von POPC um ca. 13 % [173].

Am Phasenübergang verschwindet die Aufspaltung der D_2O -Linien bei vollhydratisierten Proben zugunsten einer einzigen, stark verbreiterten Linie (Abb. 5.1, *Inlay*-Spektrum). Ein ähnliches Verhalten wurde für gesättigte Lipide (DMPC, DPPC und DMPE) bereits von Hawton und Doane [71] gezeigt und mit einem sehr starken *motional narrowing* durch kritische Prozesse in der Nähe des Phasenübergangs (*pretransitional phenomena*) erklärt. Laterale Fluktuationen der Kopfgruppenfläche am Phasenübergang erzeugen kurzzeitig Kavitäten im Bereich der Kopfgruppen, in die Wassermoleküle eindringen können. Es wurde postuliert, daß $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O}) \approx 0$ ist in Bereichen, in denen die Flächenfluktuationen mindestens die Größe eines Wassermoleküls haben und nur noch kleinere Bereiche zur Quadrupolaufspaltung beitragen.

Aufgrund der Nähe der Meßtemperatur zum Phasenübergang weicht der Verlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ vs. n_w bei DMPC und DPPC (Abb. 5.4) deutlich von dem Exponentialverhalten ab, das für Lipide bei $T \gg T_m$ gefunden wurde. In [52, 55] wurde deshalb eine andere Auftragung, $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ vs. $1/n_w$, gewählt und aus der abschnittswisen Linearität der Daten Rückschlüsse über die Zahl der Wassermoleküle in verschiedenen „Hydratationsschalen“ getroffen. Angesichts der unterschiedlichen Faktoren, die $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in der Nähe des Phasenübergangs beeinflussen, scheint eine derartige Interpretation nicht gerechtfertigt.

Neben der Annäherung an den Phasenübergang können bei DMPC und DPPC weitere Ursachen für die Abflachung von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ im Bereich $5 < n_w < 12$ verantwortlich sein: eine Perkolationsimulation von DMPC [205] zeigt, daß in diesem Bereich die Zahl der Wassermoleküle mit ≥ 2 H-Brücken zu Nachbarmolekülen stärker zunimmt als die mit < 2 H-Brücken abnimmt; das interlamellare Wasser wird „zäher“. Lipid und Wasser können in diesem Bereich nicht mehr als getrennte Phasen behandelt werden.

An POPC-Membranen wurde gezeigt, daß sich die Kopfgruppe bei abnehmender Hydratation zunehmend parallel zur Bilayerebene ausrichtet [9] und damit ihr Dipolmoment senkrecht zur Membranebene abnimmt. Dieses Verhalten sollte bei DMPC und DPPC ähnlich oder stärker sein, da das Dipolfeld der Carbonylgruppen gleich groß und das der terminalen Methylgruppen durch die höhere Kettenordnung eher größer ist als in POPC (siehe Kap. 1.2.5, S. 7). Dem wirkt eine verstärkte Orientierung des interlamellaren Wassers mit abnehmender Hydratation entgegen.

Hydratationsabhängigkeit von T_m :

Die Zunahme von T_m bei sinkender Hydratation kann mit NMR relativ genau und quasi-kontinuierlich ermittelt werden. Da es sich hierbei nicht um einen scharfen Übergang handelt, ist auch die Breite des Koexistenzbereichs von Bedeutung; diese ergibt sich direkt aus den Integralverhältnissen der Subspektren. Dagegen läßt die große Streuung der Literaturdaten den Schluß zu, daß eine Definition der Hydratation allein aus der Einwaage von Wasser oder aus einer Hydratisierung über die Dampfphase für diesen Zweck relativ ungenau ist. Daneben hängt die Bestimmung von T_m auch von der Meßmethode ab: ob sie sensibel ist für den Beginn, das Ende oder den ganzen Phasenübergang.

Die Änderung von T_m mit n_w kann als Kriterium für den Begriff „volle Hydratation“ herangezogen werden: bei voller Hydratation sind die Eigenschaften der Lipidmembran unabhängig vom Wasseranteil, die beiden Phasen mithin unabhängig voneinander. Bei teilweiser Dehydratisierung beeinflusst die reduzierte Dynamik des Wassers in Oberflächennähe die Dynamik des Gesamtsystems, die beiden Phasen sind gekoppelt.

Eine kalorimetrische Untersuchung der Hydratisierung von DMPC bei 27 °C [118] zeigt eine stark negative Enthalpie für die Bindung der ersten 3 Wassermoleküle, gefolgt von einer leicht positiven Enthalpie im Bereich $3 < n_w < 10$. Anders als von den Autoren interpretiert ist dies der Koexistenzbereich von $L_{\beta'}$ - und L_{α} -Phase (Abb. 5.10(b)). Die positive Enthalpie ist somit teilweise eine Entmischungswärme.

Analog erklärt sich der starke Abfall der partiellen molaren Transferenthalpie⁸ von Wasser bei $n_w \approx 3$ in einem bei 25 °C gemessenen POPC-System (Abb. 8 in [14]): bei dieser Hydratation kreuzt die Phasenübergangstemperatur die Meßtemperatur (Abb. 5.11(b)).

In derselben Arbeit wurde gezeigt, daß die Freie Energie $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ der Dehydratisierung im Bereich $10 > n_w > 0$ monoton ansteigt (Abb. 9 in [14]). Übertragen auf die vorliegenden NMR-Messungen bedeutet dies, daß das chemische Potential μ der Dehydratisierung auch über den Phasenübergang hinweg kontinuierlich verläuft.

Die aus dem Verlauf von ΔG vs. n_w abgeleitete Abfallkonstante des Hydratationsdrucks von $2,6 \pm 0,2$ (mol/mol) ist jedoch deutlich kleiner als der in Kapitel 5.1.3 bzw. [201] berechnete Wert $n_w^0 = 6,1 \pm 0,2$ (38 °C) resp. $5,0 \pm 0,3$ (23 °C).

Hydratationsdruck:

Die Transformation von $\Delta\nu(n_w)$ auf $\Delta\nu(d_w/2)$ in Abbildung 5.9(b) liefert bei einer Auswertung nach dem Zweiseiten-Modell von Volke et al. [201] eine gute Abschätzung für die Abfalllänge λ des Hydratationsdrucks.

Dagegen könnte argumentiert werden, daß bei der Betrachtung nur eines „Halbraumes“ $d_w/2 \cdot A_{KG}$ über jedem Lipidmolekül der Einfluß der gegenüberliegenden Membran nicht berücksichtigt wird. Anders als bei multilamellaren Vesikeln [201] geht $\Delta\nu(D_2O)$ in Membran-Multischichten auch im vollhydratisierten Zustand nicht auf 0 zurück. Ein Vergleich der Abfalllängen λ für die beiden Versuchsanordnungen zeigt jedoch, daß dieser Effekt vernachlässigt werden kann, da λ von der Größenordnung nur einer Wasserlage ($\approx \sqrt[3]{v_w} = 3 \text{ \AA}$) ist.

⁸ Transferenthalpie: Enthalpieänderung eines Wassermoleküls beim Übergang von der *bulk*-Phase in die Hydratationsschale des Lipids.

Domänenbildung:

Die 3 untersuchten PC-Systeme – DMPC, DPPC und POPC – verhalten sich bei sehr niedrigen Hydratationen ähnlich: die ^2H -Spektren zeigen sowohl beim interlamellaren D_2O als auch im Acylkettenbereich koexistierende Gel- und Flüssigphasendomänen.

Unterschiede bestehen in der Art der koexistierenden Signale (Abb. 5.1): bei DPPC und DMPC (Spektren nicht gezeigt) ist $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in der Gelphase *größer*, bei POPC *kleiner* als in der L_α -Phase. Anders als bei DPPC verbreitern sich bei POPC die Signale von D_2O und der Acylketten bei Annäherung an den Phasenübergang stark. Es scheinen bei POPC auch bei niedrigen Hydratationen mehr *trans/gauche*-Isomerisierungen möglich zu sein als bei DPPC. Entsprechend sollte auch die Kopfgruppenfläche von POPC weniger abnehmen als bei den gesättigten Lipiden [39] und die oben erläuterte Bildung von Wasserkavitäten am Phasenübergang bei POPC auch bei niedrigen Hydratationen noch teilweise möglich sein.

Acylkettenbereich:

Obwohl Kettenordnung und Kopfgruppenhydratisierung unabhängige Parameter sind, erwartet man bei abnehmender Hydratation ein ähnliches Verhalten: wenn die Kopfgruppenfläche durch Dehydratation abnimmt, sind die verbleibenden Wassermoleküle im Mittel fester gebunden und der Kettenbereich höher geordnet.

Dies trifft auf POPC zu, nicht aber auf DMPC und DPPC. Die Wasserordnung ist im Bereich $5 < n_w < 12$ fast konstant, während die mittlere Bilayerdicke durch die höhere Ordnung der Acylkettensegmente zunimmt.

Der Nachweis von Domänenbildung im Kettenbereich und beim assoziierten Wasser erfolgt auf verschiedenen Zeitskalen: während der Austausch von Ketten zwischen L_α - und L_β -Phase aufgrund der Stabilität zusammenhängender Domänen [161] langsam sein kann, erfolgt der diffusive Austausch von Wasser zwischen Domänen an der Membranoberfläche schnell. Der ähnliche Verlauf der beiden Signale in Abbildung 5.12 bedeutet also, daß die Gelphasendomänen relativ groß sind und sich das Wasser zwischen Signalanregung und -detektion (ca. 10^{-4} s) nur in einer Phase bewegt.

5.1.7 Ausblick und Anregungen**Orientierung des interlamellaren Wassers**

Anders als die NMR-Signale von Deuterium-Markierungen der Lipide läßt sich die Quadrupolaufspaltung des interlamellaren Wassers nicht aus einer einfachen Mittelung der Konformation der D_2O -Moleküle berechnen. Die Kurzzeitigkeit der Wechselwirkung mit der Membranoberfläche und der schnelle Austausch mit *bulk*-Wasser werden zusätzlich dadurch kompliziert, daß der gemessene Ordnungsparameter von orientiertem Wasser sehr empfindlich ist, z. B. gegen kleine Änderungen des Bindungswinkels $\angle(\text{O-H-O})$. Ungeachtet dessen kann $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ gut mit Eigenschaften der Lipidmembranen im vollhydratisierten und teilweise dehydratisierten Zustand korreliert werden (diese Arbeit und [61,98,200–202] bzw. [9,27–29,98]).

Eine mikroskopische Herleitung der mittleren Orientierung oberflächennaher Wassermoleküle, etwa aus MD-Simulationen, ist bisher nicht gezeigt worden. Eine mögliche Vorge-

hensweise für PC-Membranen soll kurz skizziert werden:

In [111] wurde die mittlere Orientierung von Wassermolekülen in unmittelbarer Nähe von unterschiedlich geladenen, glatten Oberflächen untersucht. Abbildung 5.13 zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Winkels θ zwischen dem Dipolvektor eines Wassermoleküls und der Oberflächennormalen für positive, negative und neutrale Oberflächenladung. An negativ geladenen Oberflächen ist die Verteilung besonders scharf um $\theta \approx \pm 126^\circ$ zentriert, wenn also eine der O-H Bindungen direkt zur Oberfläche zeigt.

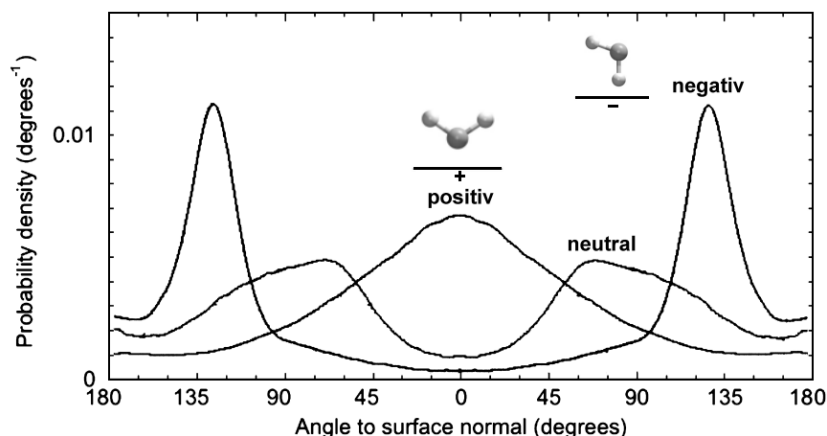


Abbildung 5.13: Orientierung des Dipolvektors von Wasser an geladenen Oberflächen nach [111]

Die Orientierung des interlamellaren Wasser geht vor allem auf die Wechselwirkung mit den Carbonylgruppen (negative Partiaalladung δ^-) und in geringerem Umfang mit der Trimethylammonium- und Phosphatgruppe (δ^+ bzw. δ^-) zurück [78]. Aus der relativen Position dieser 3 Gruppen im Bilayer sowie ihrer Zugänglichkeit für die Wassermoleküle könnte so die Quadrupolaufspaltung des Wassers zumindest qualitativ verstanden werden.

Abschätzung von Domänengrößen

Die wichtigste Voraussetzung für eine Abschätzung der Größe von koexistierenden Gel-/Flüssigphasendomänen ist eine genaue Kenntnis der Diffusionskonstanten in teilweise dehydratisierten Systemen. Es wurde bisher nicht untersucht, wie sich die Diffusion am Phasenübergang als Funktion von n_w ändert.

Desweiteren könnte aus den (kleinen) Differenzen zwischen den NMR-Signalen der Acylketten und des Wassers für die koexistierenden Phasen die Größe des Übergangsbereiches zwischen Domänen und damit mit Annahmen über die Domänenform deren Größe berechnet werden. Voraussetzung hierfür ist, daß die Anregung im NMR über den ganzen Frequenzbereich gleichmäßig erfolgt.

5.2 Austausch labiler Deuteronen in POPC/Cholesterol-Systemen

Eine erste Anwendung der in dieser Arbeit entwickelten *Inversion-Transfer*-Technik (Kap. 4) war die Bestimmung der Raten des ^2H -Austausches zwischen der Hydroxylgruppe des Cholesterols und dem interlamellaren D_2O in einer orientierten ($\theta = 0$) POPC/Chol-Mischung (30 mol-% Chol).

Das Proton der 3- β -Hydroxylgruppe von Cholesterol tauscht bei einer Präparation der Proben mit Deutero-Methanol und anschließender Hydratisierung mit D_2O vollständig gegen Deuteronen aus. Als Referenzsignal dient eine kovalent gebundene ^2H -Markierung in der 3- α -Position von Cholesterol (Kap. 3.1, S. 27).

Hydratisierungsverhalten

Abbildung 5.14 zeigt die Entwicklung der Quadrupolaufspaltung des interlamellaren D_2O und der *sn*-1-Kette von POPC (terminale Methylgruppe und Plateaubereich) als Funktion von n_w bei $T = 38^\circ\text{C}$. Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten für reines POPC (ebenfalls $T = 38^\circ\text{C}$) mit angeführt.

Die Hydratation des POPC/Chol-Systems wurde bezüglich der Gesamtmenge Lipid + Sterol berechnet.

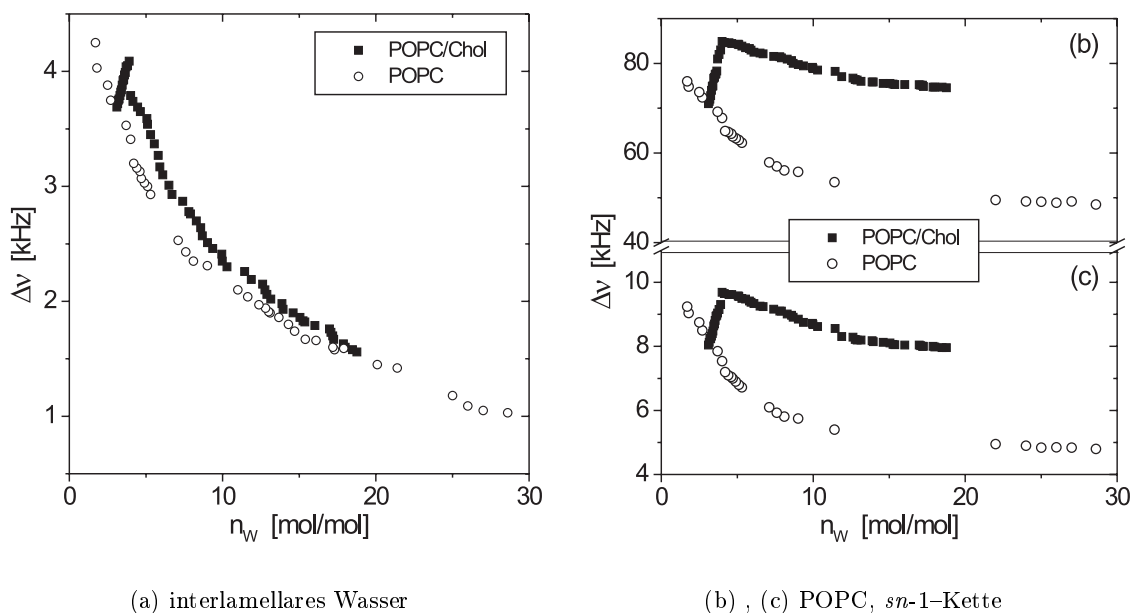


Abbildung 5.14: d_{31} -POPC/Chol-System (7:3-molar, $T = 38^\circ\text{C}$); Verlauf von $\Delta\nu$ vs. n_w für D_2O (a) und die *sn*-1-Kette von POPC ((c): terminale Methylgruppe; (b): Plateaubereich); jeweils im Vergleich mit reinem POPC

Im POPC/Chol-System ist $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für $n_w > 4$ geringfügig höher als bei reinem POPC. Dagegen wird die Kettenordnung von POPC durch Cholesterol deutlich erhöht durch die Bildung einer *liquid-ordered*- (l_o -)Phase (u. a. [49, 138]). Für $n_w < 4$ geht $\Delta\nu$ im POPC/Chol-System sowohl für das D_2O als auch für die POPC-Ketten stark zurück;

interessanterweise schneiden die entsprechenden Kurven in Abbildung 5.14 die von reinem POPC bei derselben Hydratation. Es kann davon ausgegangen werden, daß in diesem Bereich eine Entmischung in POPC- und Cholesterol-reiche Domänen stattfindet.

Abbildung 5.15 faßt die n_w -Abhängigkeit der $3-\alpha$ - ^2H und $3-\beta$ - ^2HO Splittings⁹ von Cholesterol in einer POPC/ d_2 -Chol-Mischung bei 30 °C zusammen. Die Signale verlaufen in etwa parallel mit einem Maximum bei $n_w \approx 10$. Wie später (S. 100) diskutiert wird, kann aus der Aufspaltung des CD-Signals der mittlere Kippwinkel α_0 zwischen der Molekülachse von Cholesterol und der Bilayernormale abgeleitet werden. Im Vorgriff darauf sei bemerkt, daß nach diesem Modell $\Delta\nu(\text{CD}) = 88 \dots 93 \text{ kHz}$ einem Winkel $\alpha_0 = 16,8 \dots 14,8^\circ$ entspricht.

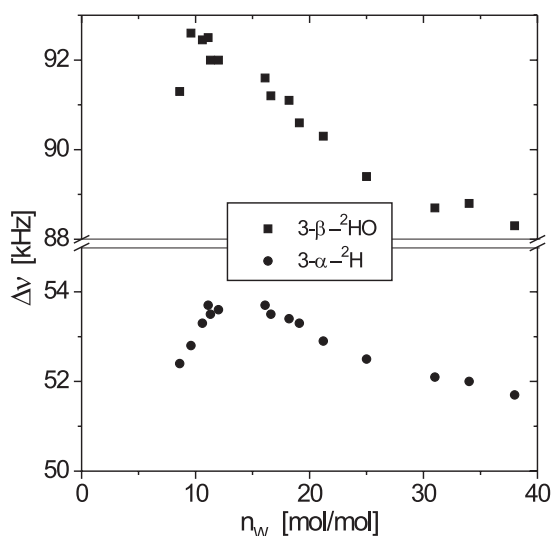


Abbildung 5.15: POPC/ d_2 -Chol-Mischung (7:3-molar, $T = 30^\circ\text{C}$); Verlauf $\Delta\nu$ vs. n_w der $3-\alpha$ - ^2H und $3-\beta$ - ^2HO Signale von Chol

Austauschraten der labilen Deuteronen

In Abbildung 5.16 sind für eine POPC/ d_2 -Chol-Mischung (7:3-molar, $T = 30^\circ\text{C}$) bei einer Variation der Delay-Zeit $\Delta = 0,5 \dots 128 \text{ ms}$ (Kap. 4.2) repräsentative Austauschspektren sowie die relative Signalhöhe M^{OD} der austauschenden OD-Signale von Chol mit einem Fit der Daten gemäß Gleichung 4.3 bei $n_w = 19$ dargestellt.

Der Verlauf der Austauschrate k_{OD} als Funktion von n_w ist in Abbildung 5.17(a) gezeigt: k_{OD} steigt mit zunehmender Hydratation deutlich an und erreicht bei $n_w = 25$ einen Maximalwert von $280 \pm 20 \text{ s}^{-1}$; für größere Hydratationen verlangsamt sich der Austausch wieder. Im Vergleich mit den Austauschraten der OD-Gruppen von anderen Lipiden¹⁰ sind die Absolutwerte von k_{OD} jedoch relativ niedrig.

Im Bereich des Maximums von k_{OD} pendelt sich die longitudinale Relaxationszeit $T_{1,z}$ von des Chol-OD bei einem Wert von ca. 150 ms ein (Abb. 5.17(b)). Dagegen ändern sich die Quadrupolaufspaltungen von D_2O und der beiden Steroldeuteronen (Abb. 5.15) in diesem Bereich kontinuierlich mit der Hydratation; die longitudinale Relaxationszeit von D_2O steigt stetig mit n_w an auf ca. 125 ms bei $n_w = 38$. Im Gegensatz dazu liegt $T_{1,z}$ für das CD-Signal fast unabhängig von n_w bei ca. 5–10 ms¹¹.

⁹ Im weiteren mit CD- bzw. OD-Signal bezeichnet.

¹⁰ POPG, Cardiolipin: Kap. 5.3, Sphingomyelin: Kap. 6.1.2, SM/Cholesterol: Kap. 6.2

¹¹ Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß $T_{1,z}(\text{OD})$ stark temperaturabhängig ist: bei 37°C bleibt

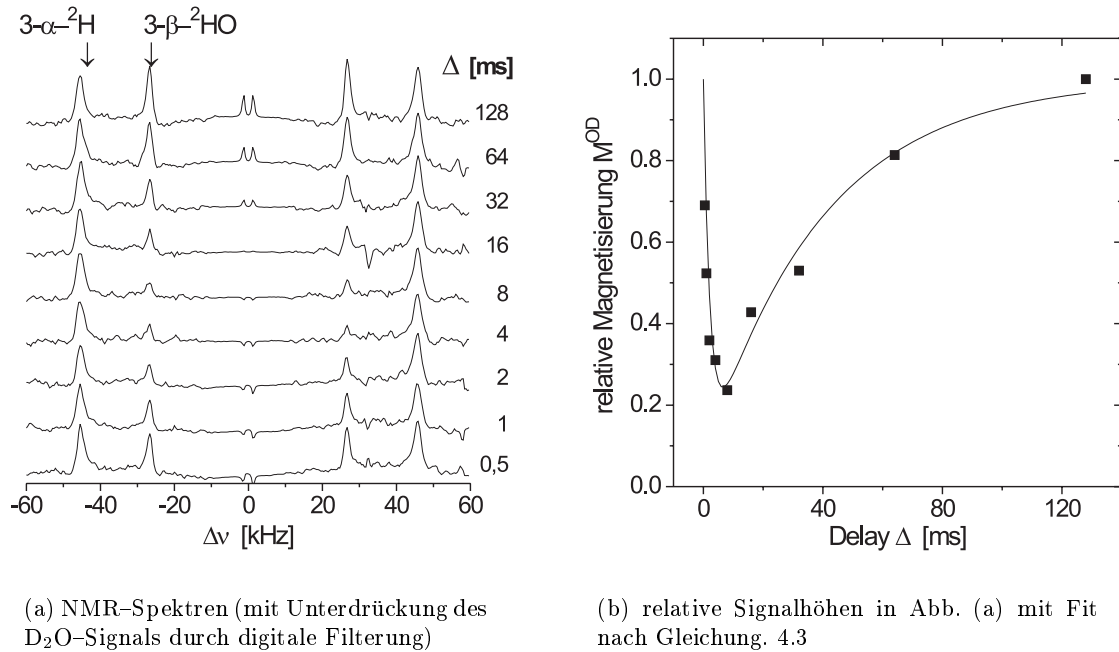


Abbildung 5.16: POPC/ d_2 -Chol-Mischung (7:3-molar, $T = 30^\circ C$): NMR-Spektren und relative Signalthöhen für *Inversion-Transfer*-Anregung bei $n_w = 19$

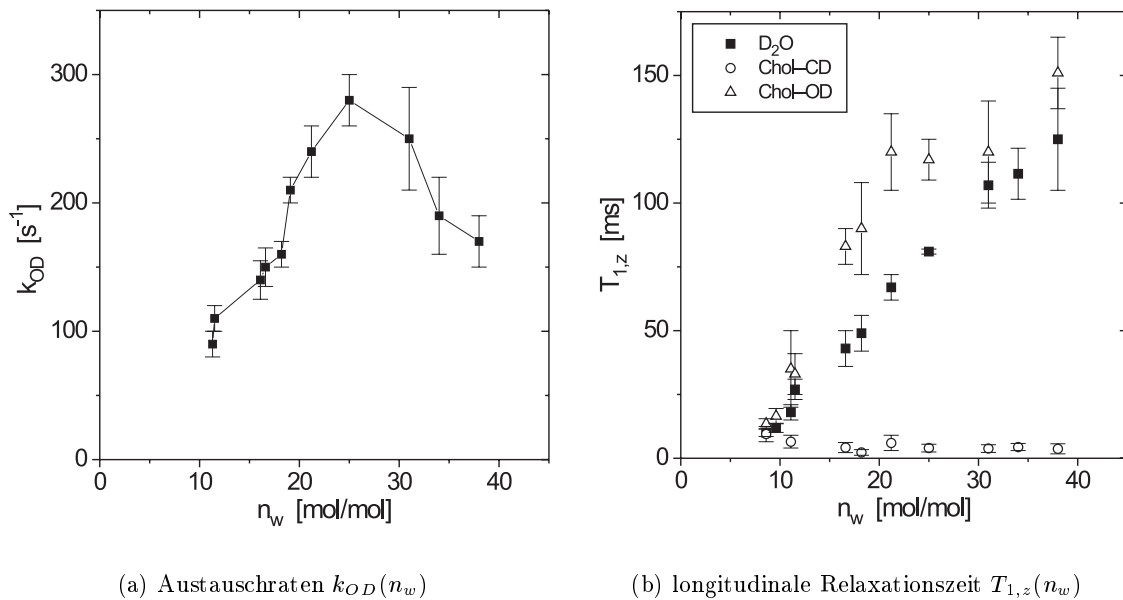


Abbildung 5.17: POPC/ d_2 -Chol (7:3-molar, $T = 30^\circ C$): Austauschraten k_{OD} des $3-\beta$ -Deuterons und longitudinale Relaxationszeit $T_{1,z}$ von D_2O und den deuterierten Chol-Positionen

es für $n_w > 6$ bei einem Wert von ≈ 50 ms konstant [97, 98].

Diskussion

Im Bereich $10 < n_w < 25$ nimmt die Austauschrate k_{OD} der 3- β -Deuteronen von Cholesterol monoton mit der Hydratation zu. In diesem Bereich ändert sich die Orientierung des Cholesterol-Moleküls im Bilayer leicht von $14,8^\circ$ auf $16,8^\circ$ und die Kopfgruppenfläche von POPC nimmt bis $n_w \approx 20 \dots 25$ zu [92]. Beide Effekte bewirken eine Abnahme der Packungsdichte im Bilayer und damit auch eine bessere Zugänglichkeit der Chol-OD Gruppe für das interlamellare Wasser.

Das Maximum bei $n_w \approx 25$ fällt mit einer Abflachung des Verlaufs von $T_{1,z}(OD)$ zusammen; der OD-Bindungsvektor erreicht hier offenbar seine volle Bewegungsfreiheit. In diesem Bereich erreichen auch die Quadrupolaufspaltungen von D_2O sowie der CD- und OD-Signale von Chol ein konstantes Niveau.

Für $n_w > 25$ nimmt k_{OD} wieder ab: die mittlere Kopfgruppenfläche erreicht einen konstanten Wert, während sich die Fluktuationen der Gesamtmembran mit steigendem Wasseranteil erhöhen. Der Austausch von Deuteronen mit der OD-Gruppe des Sterols beinhaltet einen geometrischen Faktor: die Hydroxylgruppe liegt im Mittel auf der Höhe der Carbonylgruppen von PC [49, 146]. Damit nimmt ihre Wechselwirkung mit dem interlamellaren Wasser ab, wenn der Konfigurationsraum der PC-Kopfgruppe bei zunehmender Hydratation [193] oder Temperatur zunimmt.

In [175] wird die Grenzhydratisierung, ab der eine DMPC/Chol-Mischung als Zweikomponentensystem behandelt werden kann, bei 24 Gew.-% Wasser ($n_w \approx 10$) ausgemacht. Bei einer geringeren Hydratisierung sind die Cholesterolemoleküle nicht optimal in die PC-Matrix eingebunden und segregieren teilweise in Domänen. Dies zeigt sich in den Quadrupolsignalen der CD- und OD-Gruppe: das Sterol richtet sich in der Membran auf und der Austausch der Deuteronen nimmt stark ab.

5.3 Cardiolipin–Systeme

Cardiolipin (CL) unterscheidet sich von anderen Phospholipiden dadurch, daß es über 4 Acylketten verfügt und in größeren Mengen nur in Membranen auftritt, an denen zelluläre Prozesse der Energiekonservierung stattfinden (siehe S. 9). Die beiden Phosphate der Kopfgruppe sowie die 4 Carbonylgruppen der Fettsäureketten sind in ein dichtes Netzwerk von inter- und innermolekulare Wasserstoffbrücken eingebunden [18, 174]. Diese bilden vermutlich auf molekularer Ebene die strukturelle Basis für die postulierte Rolle von CL bei der Speicherung und dem Transport von Protonen in energiekonservierenden Membranen [72].

Das Proton der zentralen OH–Gruppe von Cardiolipin tauscht unter der in Kapitel 5.2 beschriebenen Präparation gegen Deuteronen aus und ist so im ^2H –NMR Spektrum sichtbar. Es wurde das Hydratisierungsverhalten von CL in Mischungen mit PC und/oder PE untersucht und mit der *Inversion-Transfer*–Methode die Austauschraten k_{OD} der labilen Deuteronen bestimmt und mit Daten für POPG–Membranen verglichen.

Das Mischungsverhältnis PC/PE/CL (2:2:1–molar) wurde analog der physiologischen Lipidverteilung in der inneren Mitochondrienmembran gewählt [42].

Hydratisierungsverhalten

$\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ verläuft in einem 2:2:1–molaren POPC/POPE/CL–System (Abb. 5.18(a)) qualitativ ähnlich wie bei reinem POPC (Abb. 5.4(b)). Die monotone Zunahme von $\Delta\nu$ mit abnehmender Hydratisierung kehrt sich jedoch bei einer Grenzhydratisierung $n_w^{sat} = 14$ um. Dieser Effekt ist in einer POPC/CL–Membran mit 50 mol-% CL noch deutlicher ausgeprägt; hier liegt das Maximum von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei $n_w^{sat} = 19$.

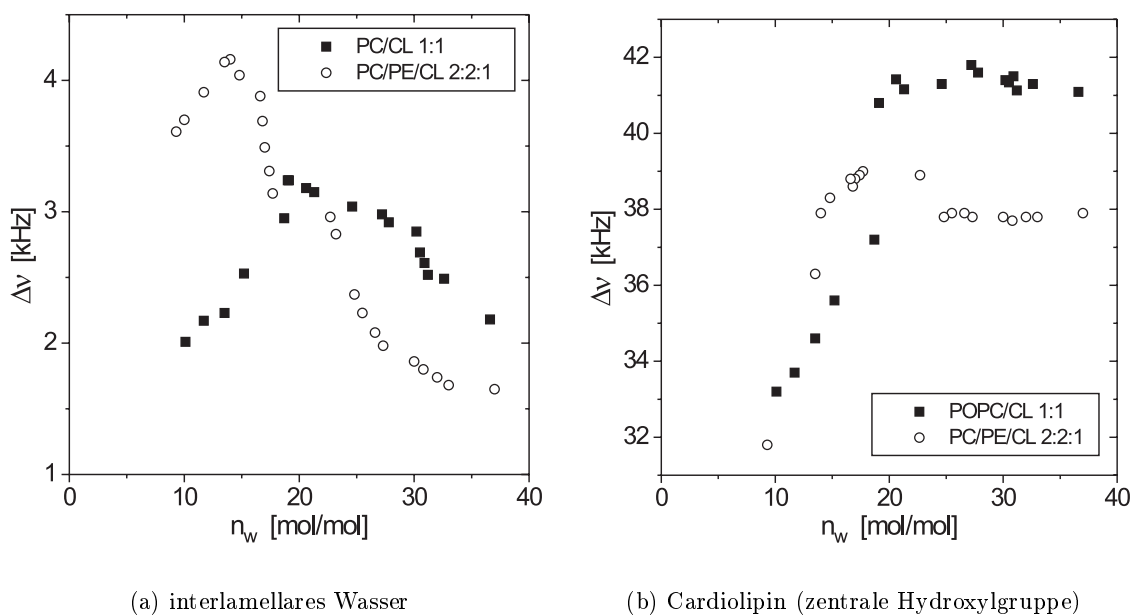


Abbildung 5.18: $\Delta\nu(n_w)$ für das interlamellare D_2O und die Hydroxylgruppe von CL in POPC/CL (1:1–molar) und POPC/POPE/CL (2:2:1–molar) bei 38°C

Da für eine DMPC/CL-Membran der gleichen molaren Zusammensetzung ähnliche Werte gemessen wurden [98], scheint dieser Effekt unabhängig von der PC-Struktur zu sein.

Für die zentrale Hydroxylgruppe von CL (Abb. 5.18(b)) ist $\Delta\nu$ für $n_w > n_w^{sat}$ fast konstant und nimmt für $n_w < n_w^{sat}$ stark ab. In [98] wurde bei PC/CL-Systemen die **Bildung von invertiert hexagonalen (H_{II} -)Domänen bei niedriger Hydratation** postuliert und mit ^2H - und ^{31}P -NMR nachgewiesen. Die Quadrupolaufspaltung von Lipiden ist in langgestreckten H_{II} -Phasen um einen Faktor 4 gegenüber der L_α -Phase reduziert [172], da die Lipide nicht nur um ihre Molekülachse, sondern auch um die Längsachse der Zylinder rotieren können. Die CL-reichen H_{II} -Domänen tauschen schnell mit den lamellaren Domänen aus, so daß im NMR eine mittlere Quadrupolaufspaltung beobachtet wird.

Abbildung 5.19 zeigt ein Modell für derartige transiente Domänen: durch Dehydratisierung werden die Kopfgruppen von CL stärker komprimiert als der Acylkettenbereich, der geometrische Packungsparameter P (Kap. 2.1.3, S. 20) wird größer als 1. Die damit verbundene intrinsische Spannung in der Membran ermöglicht den *flip-flop* der CL-Moleküle, der für die „eingegrabenen“ Zylinderstrukturen notwendig ist. Da aber eine Struktur nach Abb. 5.19 den PC-Molekülen einen Packungsparameter $P < 1$ und damit eine geringere Abschirmung der Acylketten von der Wasserphase aufzwingt, tauschen die H_{II} -Domänen schnell mit lamellaren Domänen aus.

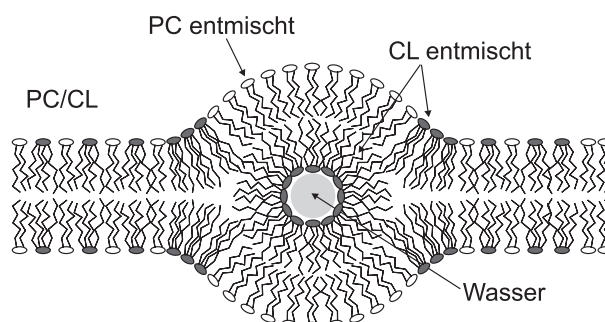


Abbildung 5.19: Vermutete Struktur von PC/CL-Membranen bei niedrigen Hydratationen (analog zu [40])

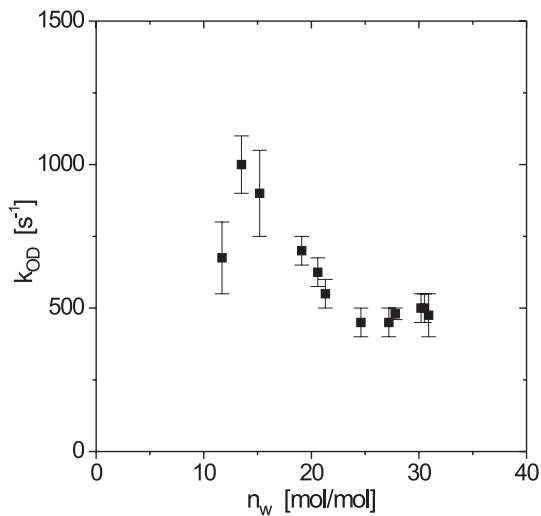
Austauschraten der labilen Deuteronen

Die Deuteron-Austauschraten der beiden untersuchten CL-Systeme sind in Abbildung 5.20 als Funktion von n_w gegenübergestellt.

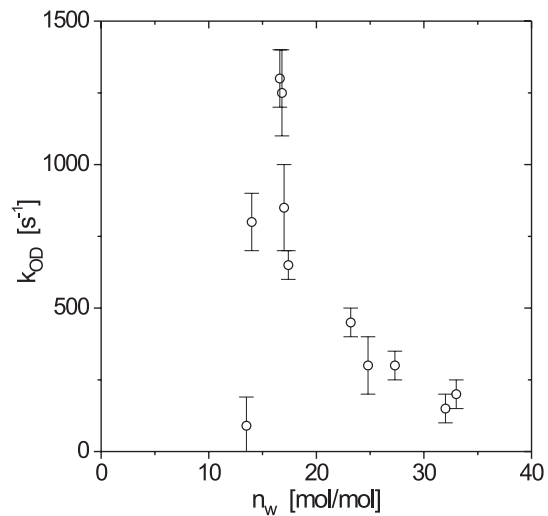
In der 1:1-molaren PC/CL-Mischung ist die Austauschrate für $n_w > 20$ auf einem konstanten Niveau von $k_{OD} \approx 500 \text{ s}^{-1}$. Darunter, also in dem Bereich, in dem der Anteil an koexistierenden H_{II} -Domänen sukzessive zunimmt, steigt k_{OD} erst stark an und fällt für $n_w < 13$ wieder ab. In einer Membraneometrie nach Abb. 5.19 nimmt die Zugänglichkeit der CL-Hydroxyle für D_2O und damit des Austausches mit D_2O stark ab: ein Teil des CL ist ganz von der Wasserphase abgeschirmt, ein anderer Teil reichert sich wahrscheinlich in den stark gekrümmten Bilayerregionen an, die die H_{II} -Domänen umschließen.

In der PC/PE/CL-Mischung durchläuft $k_{OD}(n_w)$ ebenfalls ein Maximum in dem Bereich, in dem sich der Verlauf der Quadrupolaufspaltung von D_2O und des CL-Hydroxyls umkehrt. Es wurde nicht systematisch untersucht, ob auch hier ein kontinuierlicher Übergang in eine H_{II} -Phase auftritt; angesichts der hohen Tendenz von PE zur Bildung nichtlamellarer Phasen ist eine solche Annahme jedoch plausibel. Für $n_w > 20$ nimmt die Deuteron-

Austauschrate stark ab auf $k_{OD} \approx 200 \text{ s}^{-1}$.



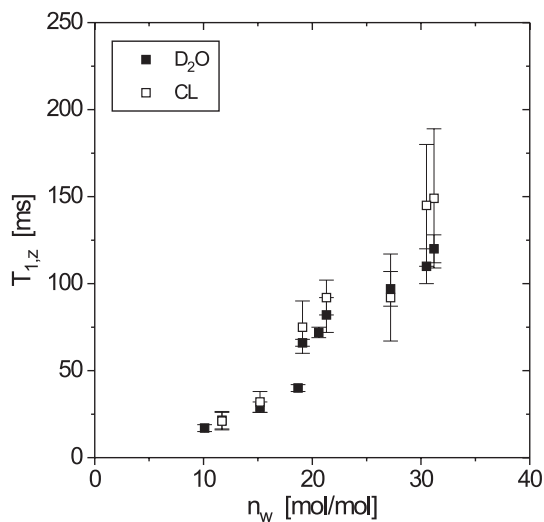
(a) POPC/CL (1:1-molar)



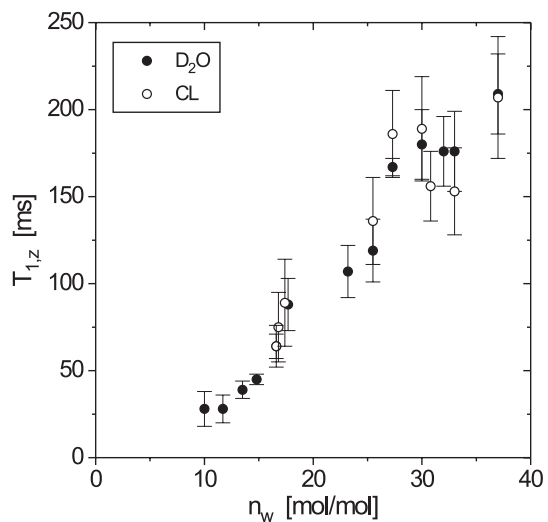
(b) POPC/POPE/CL (2:2:1-molar)

Abbildung 5.20: Austauschraten der zentralen Hydroxylgruppe von CL in POPC/CL (1:1-molar) und POPC/POPE/CL (2:2:1-molar) bei 38 °C

In beiden CL-Systemen korreliert das Maximum der Austauschraten mit einem starken Anstieg der longitudinalen Relaxationszeit $T_{1,z}$ von D_2O und der OD-Gruppe von CL, wobei die beiden Größen im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich verlaufen.



(a) POPC/CL (1:1-molar)



(b) POPC/POPE/CL (2:2:1-molar)

Abbildung 5.21: Longitudinale Relaxationszeit $T_{1,z}$ von D_2O und der CL-Hydroxylgruppe in POPC/CL und POPC/POPE/CL bei 38 °C

Am Beispiel von POPG wurde das Austauschverhalten einer Membran untersucht, die zu 100 % aus anionischen Lipiden besteht. Der physiologische Hintergrund dazu ist, daß PG in vielen Bakterien die häufigste Lipidkomponente darstellt [11]. Die POPG-Kopfgruppe hat zwei austauschende Hydroxylgruppen am β - und γ -Segment (zur Nomenklatur s. Abb. 1.6, S. 9).

Der Verlauf der Austauschraten und die longitudinalen Relaxationszeiten $T_{1,z}$ des interlamellaren Wassers und der austauschenden Hydroxylgruppen sind in Abbildung 5.22 als Funktion der Hydratation gezeigt.

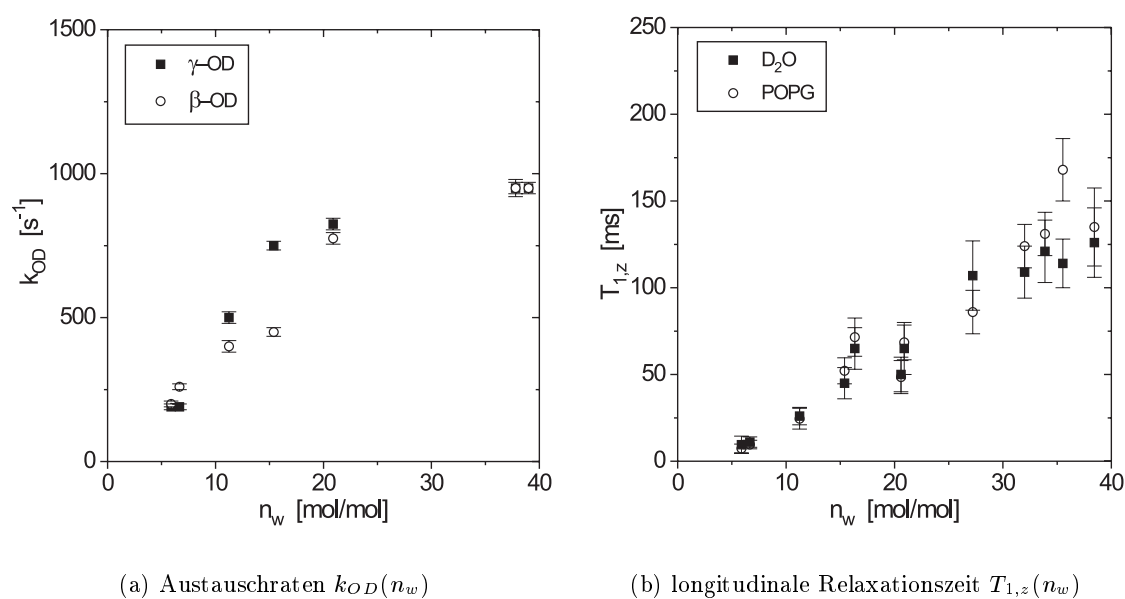


Abbildung 5.22: Austauschraten k_{OD} und longitudinale Relaxationszeit $T_{1,z}$ der interlamellaren Wassers bei POPG ($T = 30^\circ\text{C}$); siehe auch [97]

Die Austauschraten von β - und γ -Segment sind bei niedrigem n_w leicht unterschiedlich und erreichen für hohe Hydratation einen Sättigungswert $k_{OD}^{sat} \approx 1000 \text{ s}^{-1}$.

Interpretation von $T_{1,z}$ mit dem Modell eines Zweiseiten-Austausches

In [201] wird ein Modell für die Hydratationsabhängigkeit von $T_{1,z}$ entwickelt: unter der Annahme, daß nur Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe der Oberfläche von der Membran in ihrem Relaxationsverhalten gestört werden und für $n_w > 10$ schnell mit den ungestörten Wassermolekülen austauschen, erhält man analog zu Gleichung 5.6:

$$R_{1,z}(n_w) = 1/T_{1,z}(n_w) = \frac{3}{8}(2\pi\chi)^2 \left[\tau_s^0 \exp\left(-\frac{n_w}{n_w^r}\right) + \tau_f \left(1 - \exp\left(-\frac{n_w}{n_w^r}\right)\right) \right] \quad (5.9)$$

Die Korrelationszeit der Wassermoleküle ist im ungestörten Zustand (*bulk water*) τ_f und an der Oberfläche τ_s^0 ; n_w^r ist die Abfallkonstante der Korrelationszeit des von der Oberfläche beeinflussten Wassers. Für *bulk water* bei 23 °C ist $T_{1,z} \approx 450$ ms und $\tau_f = 3 \cdot 10^{-12}$ s [201].

$T_{1,z}$ wurde für die CL-Systeme (unter Vernachlässigung der oben diskutierten Koexistenz von L_α/H_{II} -Phasen für $n_w < 20$) und POPG nach Gleichung 5.9 ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 zusammengefaßt; zum Vergleich sind die Daten für POPC aus [201] mit angeführt.

Lipid(e)	T [°C]	τ_f [10^{-12} s]	τ_s^0 [10^{-10} s]	n_w^r [mol/mol]
POPC/POPE/CL (2:2:1)	38	$6,1 \pm 1,2$	$2,5 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,6$
POPC/CL (1:1)	38	$7,9 \pm 2,9$	$3,6 \pm 0,7$	$6,5 \pm 0,9$
POPG	30	$12,4 \pm 1,4$	$4,8 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,3$
POPC [201]	23	$5,1 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,7$
EYPC [201]	23	$9,1 \pm 1,3$	$3,2 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$

Tabelle 5.4: Parameter für Fit von $T_{1,z}(n_w)$ von D₂O gemäß Gleichung 5.9 für verschiedene Lipidmischungen

Die größere Abfalllänge n_w^r der Relaxation für die CL-Systeme und für POPG im Vergleich zu POPC kann mit einer höheren Zahl von H-Brücken an der Membranoberfläche erklärt werden.

Diskussion

Für POPG nähert sich k_{OD} bei **hoher Hydratation** dem Wert der Austauschrate von Protonen in reinem Wasser bei neutralem pH und Raumtemperatur [129], $k_{OH} = 1100 \text{ s}^{-1}$. In den CL-Systemen wird diese Rate im Übergangsbereich zwischen der rein lamellaren Phase und koexistierenden H_{II} -Phasen erreicht, in einem Bereich also, in dem die Membran vermutlich starken Formfluktuationen unterworfen ist. Für hohe Hydratationen ($n_w > 30$) erreicht k_{OD} in den CL-Systemen einen konstanten Wert k_{OD}^{sat} , der linear vom Molanteil geladenen Lipids¹² in der Membran abhängt (Abb. 5.23(a)).

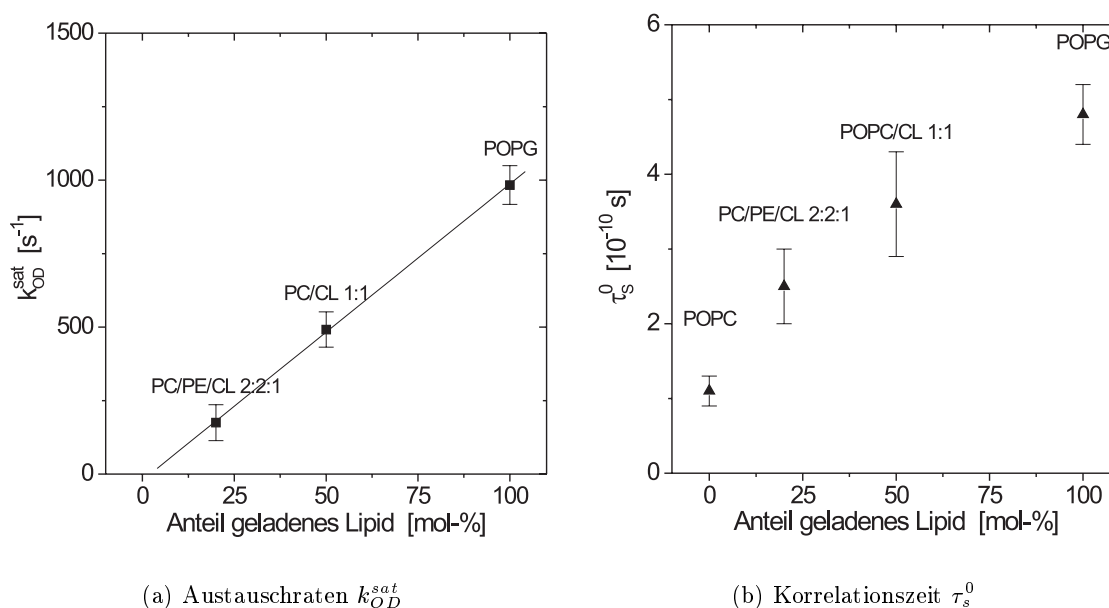


Abbildung 5.23: Gemittelte Austauschraten für $n_w > 30$ und Korrelationszeit τ_s^0 als Funktion des Molanteils geladener Lipide (Annahme: CL einfach ionisiert)

Die aus $T_{1,z}(n_w)$ abgeleitete Korrelationszeit des Wassers an der Membranoberfläche, τ_s^0 , steigt ebenfalls mit der Membranladung an.

Der Abhängigkeit von k_{OD}^{sat} und τ_s^0 von der Ladungsdichte läßt auf eine **höhere Verweildauer bzw. langsamere Diffusion von Wasser an geladenen Membranoberflächen** schließen.

Für diese Beobachtung können mehrere Erklärungen herangezogen werden:

- Die PC-Kopfgruppe richtet sich mit steigender negativer Membranladung zunehmend parallel zur Bilayerebene aus [117, 150, 171]. Dadurch stabilisieren sich H-Brücken zwischen dem interlamellaren Wasser und dem Interface-Bereich, wie in [174] mit FTIR für Cardiolipin in PC-Membranen gezeigt wurde.
- Der Radius der *Coulomb-cages* (S. 24) nimmt linear mit der Ladung zu [67]; damit steigt auch die Verweildauer von Protonen an der Membranoberfläche. Dies erklärt

¹² Dabei wurde angenommen, daß CL nur einfach ionisiert ist ($pK_1 = 2,8$; $pK_2 > 7,5$, [166]) und sich k_{OD} und τ_s^0 zwischen 30 (POPG) und 38 °C (CL-Systeme) nicht stark ändern.

auch, warum der Fluß von Protonen durch die Membran durch CL [34] erhöht wird und allgemein die Protonenleitung an der Membranoberfläche in Anwesenheit von negativ geladenen Lipiden steigt [69].

- In [46] wird die Störung der Orientierung und Rotation von Wasser in direktem Kontakt mit (Protein-) Oberflächen bestimmt: die verlangsamte Dynamik der Wassermoleküle in der 1. Hydratschale führt zu einer 10–100-fach reduzierten lateralen Mobilität – in etwa das Verhältnis der Korrelationszeiten τ_f/τ_s^0 .

Für **niedrige Hydratationen** ist die Bestimmung und Interpretation von Austauschraten in CL-Systemen problematisch, da diese auch in Abwesenheit divalenter Kationen oder anderer Trigger ein komplexes Phasenverhalten aufweisen. Bei hohem CL-Anteil oder in Anwesenheit etwa von PE geht mit abnehmender Hydratation die L_α -Phase kontinuierlich in eine invers hexagonale Phase (H_{II}) über [98].

Aus diesem Grunde ist es auch nicht möglich, in Analogie zu Kapitel 5.1.4 die Zunahme der lyotropen Phasenübergangstemperatur bei Dehydratisierung zu messen. In den obigen Messungen wurde stets angenommen, daß dieser Effekt im untersuchten Hydratationsbereich keine Rolle spielt.

Eine weitere Komplikation besteht darin, daß der pH-Wert teilhydratisierter, ungepufferter Systeme nicht bekannt ist; es ist daher nicht klar, ob CL unter diesen Umständen ein- oder zweifach ionisiert ist. Da die Ladung des Lipids durch Gegenladungen (hier: Na^+) kompensiert wird, erscheint es plausibel, daß die Hydrathülle um diese Ionen die effektive Hydratisierung erniedrigt.

Ob diese Dehydratisierung zu einer Absenkung des pH-Wertes führt, die ihrerseits einen Übergang in die H_{II} -Phase auslösen kann [169], ist offen.

Ausblick

Abbildung 5.23 legt nahe, daß sowohl die Deuteron-Austauschraten als auch die Korrelationszeit oberflächennaher Wassermoleküle, τ_s^0 , von der mittleren Membranladung abhängen. Eine systematische Untersuchung dieser Größen, etwa mit variablen Anteilen POPG in einer POPC-Matrix, sowie der lateralen Diffusion an der Membranoberfläche [204] wäre von großem Interesse, weil sie helfen könnte, die Rolle geladener Lipide in der Plasmamembran zu verstehen.

Der kontinuierliche Übergang zwischen L_α - und H_{II} -Phase, der in Cardiolipin-Membranen bei niedriger Hydratation beobachtet wurde ([98] und diese Arbeit), weist auf eine der möglichen Rollen dieses Lipids hin: die „Bereitstellung“ eines hohen Maßes an Krümmungsenergie in der Membran. Diese kann den Einbau von Proteinen in die Membran sowie die Aktivität der Proteine in und an der Membran kontrollieren [162].

Durch Dehydratisierung der Membranoberfläche erhöht sich offensichtlich die Tendenz zu Nicht-Bilayer-Phasen. Wie gezeigt wurde, treten bereits bei $n_w \approx 15$ koexistierende H_{II} -Phasen auf. Dies entspricht etwa 3 Wasserlagen, bzw. einer 10 Å dicken Wasserschicht. Eine derartige Dehydratisierung ist in stark gefalteten Membranen (etwa in den Cristae der Mitochondrien) oder bei Anlagerung von Proteinen an die Membran zu erwarten.

Phasendiagramme von PC/CL- sowie, physiologisch noch bedeutender, PC/PE/CL-Systemen als Funktion der Hydratation und der Temperatur wären in dieser Hinsicht sehr aufschlußreich.

Kapitel 6

Sphingomyelin

I believe [...] that it will be found that the significance of the hydrogen bond for physiology is greater than any other single structural feature.

*Linus Pauling 1939
in „The Nature of the Chemical Bond“*

Vorbemerkung

In Kapitel 1.4.3 wurde auf die biochemische Relevanz von Sphingomyelin (SM) bei der Domänenbildung in Lipidmembranen hingewiesen. Bis heute sind viele Modellsysteme mit SM untersucht worden, die jedoch alle unter einer wichtigen Einschränkung leiden:

Es existieren keine Röntgen-Strukturdaten, da die Flexibilität des Lipids die Züchtung hochreiner Kristalle verhindert [184]. Ob die Daten von Ceramid (S. 12) auch für SM gültig sind, ist fraglich. Damit ist sowohl die Geometrie der Lipide im Bilayer als auch die der intra- und intermolekularer Wasserstoffbrücken bereits bei reinem SM spekulativ; für Mischungen etwa mit Cholesterol gilt dies umso mehr.

Im folgenden wird versucht, diese Fragen mittels ^2H -NMR-Untersuchungen von SM/PC/Chol-Mischungen etwas einzugrenzen. Es handelt sich dabei immer um natürlich vorkommendes SM, d. h. um das *D-erythro*-Stereoisomer aus Rinderhirn (bbSM, *bovine brain* SM) oder Eigelb (EYSM, *egg yolk* SM).

Da spezifisch deuteriertes Sphingomyelin nicht kommerziell erhältlich ist und eine Synthese im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, wurden die Informationen indirekt ermittelt: aus der Ordnung des interlamellaren Wassers, aus der Ketten- oder Kopfgruppenordnung beigemischter deuterierter Lipide oder aus den Signalen der Amid- und 3-*hydroxy*-Gruppe von SM¹: bei einer Präparation der Proben mit Deutero-Methanol ($\text{H}_3\text{C-OD}$) und anschließender Hydratisierung mit D_2O tauschen die Protonen dieser Gruppen gegen Deuteronen aus und sind so mit ^2H -NMR detektierbar.

Die ND- und OD-Signale konnten durch ihre unterschiedliche chemische Verschiebung und die Tatsache, daß in einer C-D-O Bindung der OD-Vektor frei um die C-O Achse drehbar ist ($\angle(\text{C-D}, \text{O-D}) \approx 72,5^\circ$), zugeordnet werden. Damit ist die effektive Quadrupolaufspaltung von Hydroxyldeuteronen durch Bewegungsmittelung stark reduziert.

¹ Im folgenden als ND- bzw. OD-Gruppe bezeichnet.

Zum Verständnis von Phasenumwandlungsphänomenen wurden für einige der Modellsysteme DSC- und Filmwaagenexperimente (FW) gemacht (Tabelle 6.1).

Lipide (Sterol) in mol-%					Methode(n)
PC		SM		Chol	
DPPC	POPC	bov. brain	egg yolk		
–	–	100	–	–	NMR, DSC, FW
–	–	–	100	–	NMR, DSC
–	–	67	–	33	NMR
75	–	–	–	25	NMR
33	–	67	–	–	NMR, DSC, FW
33	–	–	67	–	NMR, DSC
25	–	50	–	25	NMR, DSC
25	–	–	50	25	NMR, FW
–	25	50	25		NMR
–	33	67	–	–	NMR, FW, DSC
–	67	33	–	–	NMR

Tabelle 6.1: Untersuchte Sphingomyelin-Systeme

6.1 Reines Sphingomyelin

Das thermotrope Phasenverhalten von Sphingomyelin unterscheidet sich deutlich von anderen physiologischen Phospholipiden: der Phasenübergang erfolgt kontinuierlich über einen Bereich von 20–45 °C mit einem Maximum bei $T_m = 35\text{--}40$ °C. Die Breite des Übergangs ist aus der Verteilung der Kettenlängen (Tabelle 1.2, S. 11) allein nicht zu verstehen: sie ist für EYSM nur unwesentlich kleiner als für bbSM, obwohl EYSM eine relativ homogene Fettsäureverteilung (vorwiegend C 16:0) hat.

Eine mögliche Ursache ist die intensive Wasserstoffverbrückung im Interface- und Kopfgruppenbereich: Amid- und Hydroxylgruppe können als Donor und Akzeptor, die Phosphatgruppe des Cholins nur als Akzeptor von H-Brücken agieren (S. 11).

In allen untersuchten orientierten Multischichten ($\theta = 0^\circ$) zeigten die OD- und ND-Gruppe von SM in der L_α -Phase ein weitgehend konstantes Quadrupolsplitting (ca. 55 ± 5 bzw. 115 ± 5 kHz) in einem Bereich von 35–80 °C. In der Gelphase sind diese Signale so stark verbreitert, daß sie auch bei hohen Scanzahlen kaum vom Rauschen zu unterscheiden sind.

Das Verhältnis des Integrals $I(T)$ über dem ND- bzw. OD-Signal bei der Temperatur T in der Nähe des Phasenübergangs zum maximalen Integral I_{max} oberhalb des Phasenübergangs, $I(T)/I_{max}$, korreliert bei reinen SM-Membranen qualitativ sehr gut mit DSC-Ergebnissen, wenn man einen Umwandlungsgrad gel-fluid, $U(T)$, definiert als:

$$U(T) = \frac{\int_{T_{min}}^T C_p(T') dT'}{\int_{T_{min}}^{T_{max}} C_p(T') dT'} = \begin{cases} 0 & \text{für reine Gelphase} \\ 1 & \text{für reine } L_\alpha\text{-Phase} \end{cases} \quad (6.1)$$

Das relative Integral der ND-/OD-Signale ist damit ein Maß für den fluiden Anteil an Sphingomyelin (Abb. 6.1; DSC-Daten für bbSM aus [45]).

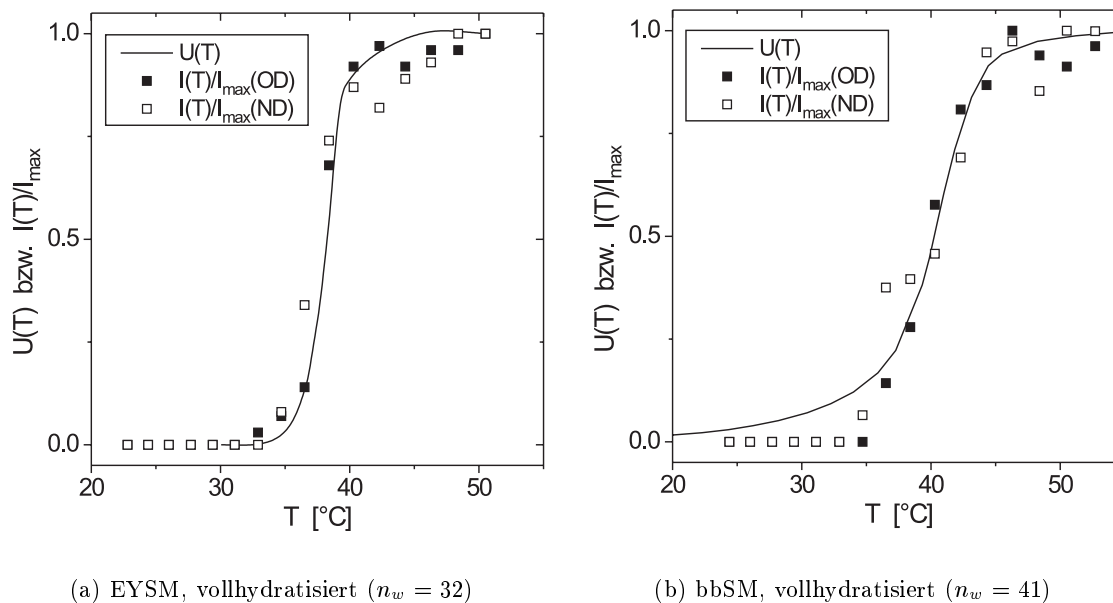


Abbildung 6.1: Vergleich des Umwandlungsgrades $U(T)$ aus DSC-Messungen mit dem Integral der ND-/OD-Signale im NMR

Die Quadrupolaufspaltung des D_2O -Signals verhält sich reziprok zum Umwandlungsgrad: sie verschwindet, im Gegensatz etwa zu PC, in der flüssigkristallinen Phase (Abb. 6.2). Die Wendepunkte der beiden Kurven liegen im Rahmen der Genauigkeit der Temperaturregelung im NMR-Gerät ($\pm 0,5$ °C) bei gleichen Temperaturen.

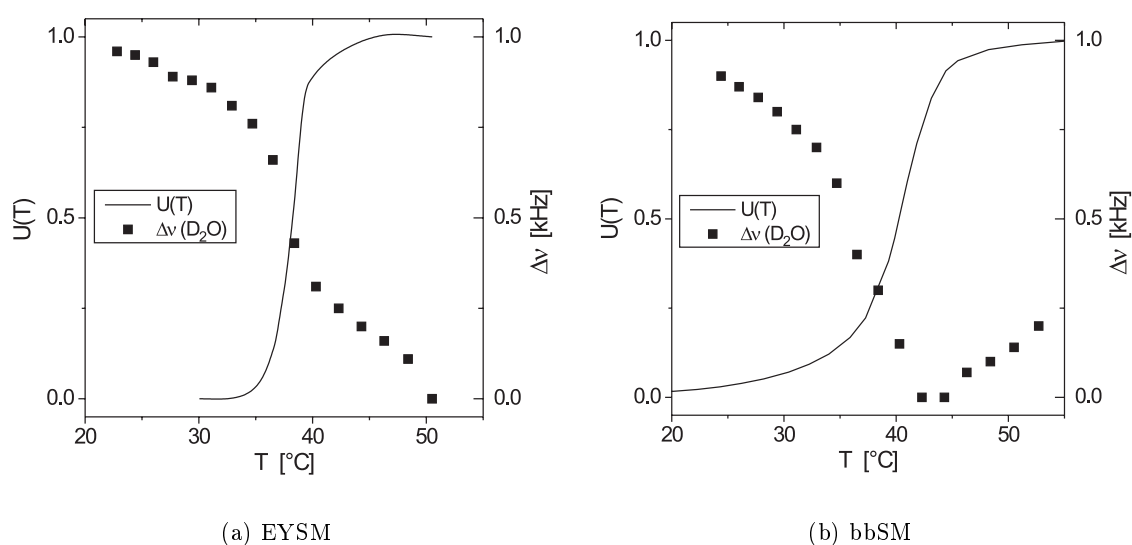


Abbildung 6.2: wie Abb. 6.1; Vergleich von $U(T)$ mit $\Delta\nu(D_2O)$

Die geringe Zunahme der Wasserorientierung bei bbSM für $T > T_m$ kann eine Folge der inhomogenen Kettenzusammensetzung sein, die einen gewissen Grad an Unordnung im Bilayer erzeugt.

Das „Verschwinden“ der OD- und ND-Signale ist die Folge eines extremen Anstiegs der longitudinalen Relaxationszeit $T_{1,z}$ zu Werten, die für Festkörperphasen typisch sind (Abb. 3.10(a), S. 42). Abbildung 6.3 zeigt ein NMR-Spektrum von EYSM bei 23 °C, das mit reduzierter Pulslänge entsprechend einer geschätzten Relaxationszeit $T_{1,z} = 10$ s unter einem *Ernst-Winkel* θ_E von 82° aufgenommen wurde². Die Meßdaten wurden aufgrund des niedrigen Signal-/Rauschverhältnisses geglättet (gleitender Mittelwert über 25 Meßpunkte).

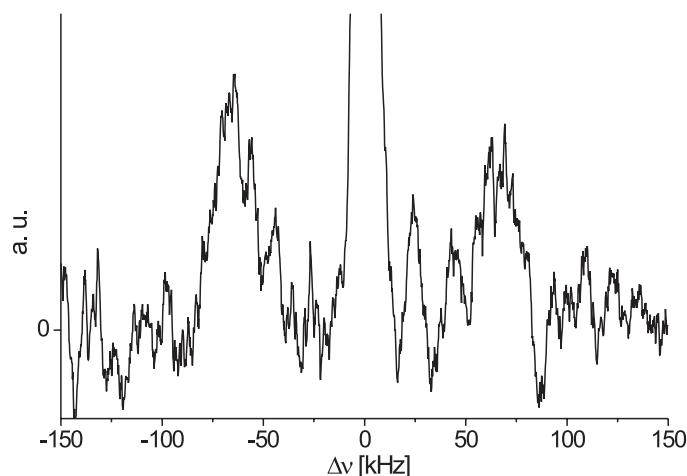


Abbildung 6.3: Gelphasenspektrum von vollhydratisiertem EYSM bei 23 °C

Das Signal bei $\Delta\nu \approx 130\text{--}140$ kHz wurde den Amid-Deuteronen zugeordnet; die Hydroxylgruppe bleibt aufgrund der Bewegungsmittelung schlecht aufgelöst. Trotz der starken Einschränkung der Rotationsfreiheit des Lipids in der Gelphase ist der Ordnungsparameter $S_{\text{ND}} \approx 0,40$ ähnlich hoch wie in der L_α -Phase (s. u.). Die asymmetrische Form der ND-Spektren deutet darauf hin, daß der Asymmetrieparameter η etwa durch eingeschränkte Rotationsfreiheit von Null abweicht (siehe S. 32).

6.1.1 Hydratisierungsverhalten

Ungewöhnlich ist die isotrope Beweglichkeit der D_2O -Moleküle im Bereich der SM-Kopfgruppe oberhalb des Phasenübergangs (Abb. 6.2), die zu einem Verschwinden der Quadrupolaufspaltung führt. PC hat dieselbe Cholin-Kopfgruppe und orientiert vor allem oberhalb und zu einem geringeren Ausmaß unterhalb des Phasenübergang Wasser. Dies führt zu einer temperaturabhängigen Quadrupolaufspaltung des D_2O -Signals (Kap. 5.1.1 und [27]) mit einem Minimum bei T_m .

Bei vollhydratisiertem Sphingomyelin tritt erst bei hohen Temperaturen wieder eine Quadrupolaufspaltung, d. h. partielle Orientierung von D_2O , auf (Abb. 6.4(a)). Dies deutet darauf hin, daß alle Donoren und Akzeptoren von Wasserstoffbrücken in der L_α -Phase

² Zur Verkürzung der Meßzeit werden die Spins nicht komplett in die $x'y'$ -Ebene geklappt, sondern nur um den Winkel θ_E ; Voraussetzung dafür ist die ungefähre Kenntnis von $T_{1,z}$.

intra- oder intermolekular gesättigt sind. Bei $T \approx 70^\circ\text{C}$ brechen diese Wasserstoffbrücken auf, und das Lipid kann mit dem Wasser wechselwirken.

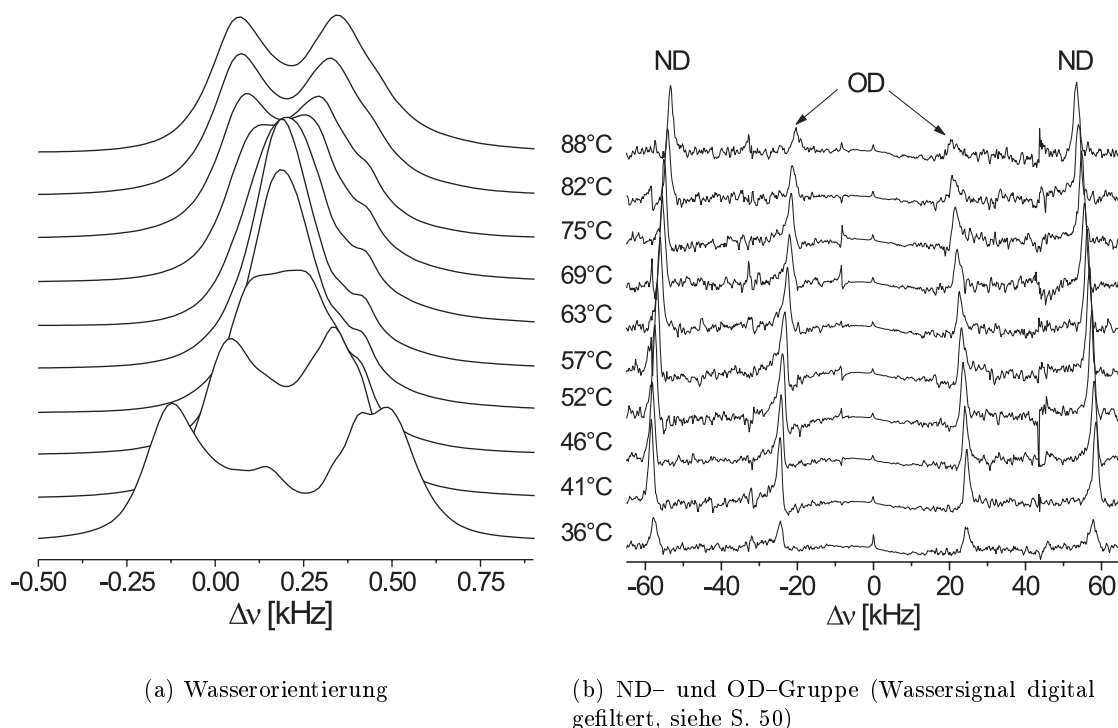


Abbildung 6.4: Temperaturabhängigkeit der NMR-Signale von vollhydratisiertem EYSM ($n_w = 32$)

Die über den ganzen Temperaturbereich weitgehend konstante Position der ND- und OD-Signale (Abb. 6.4(b)) zeigt, daß sich die Orientierung des Interface-Bereichs im Bilayer nicht ändert.

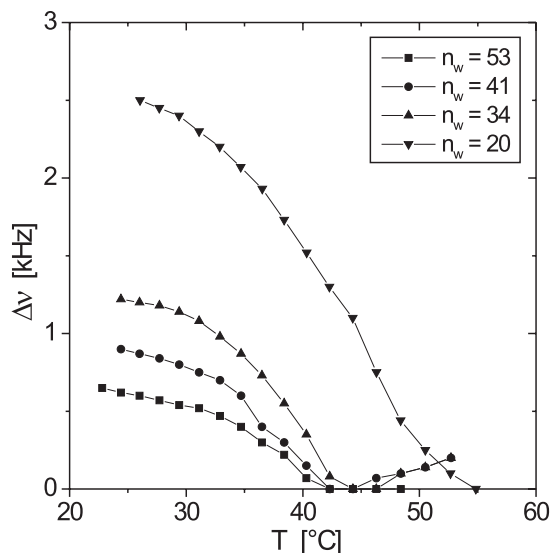
Die Verbreiterung des Hydroxylsignals bei hohen Temperaturen verläuft parallel zu $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$, vermutlich durch eine starke Beschleunigung des Austausches von labilen Deuteronen mit dem interlamellaren Wasser.

Einfluß der Dehydratisierung

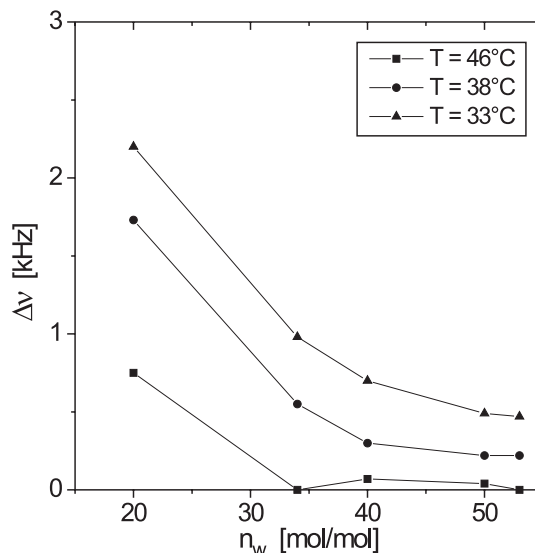
In Abbildung 6.5 ist für **bbSM** die Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu$ für das interlamellare D_2O , die Hydroxylgruppe und die Amidgruppe bei verschiedenen Hydratationen zusammengefaßt.

Mangels kovalenter Markierungen wurde n_w aus dem Integralverhältnis der OD-/ND-Signale und dem Wassersignal berechnet. Wenn ein Teil der OD- oder ND-Gruppen durch unvollständigen Austausch, durch partielle Sättigung ($T_{1,z} \approx$ Wiederholrate) oder große Linienbreite nicht im Spektrum sichtbar ist, könnte n_w kleiner sein als angegeben. Allerdings müßte dies ein Mechanismus sein, der beide Gruppen in gleichem Umfang betrifft. Mit FTIR konnte zudem gezeigt werden, daß nach einem Austausch von H_2O gegen D_2O die NH-Protonen in weniger als einer Stunde *vollständig* gegen Deuteronen austauschen [197].

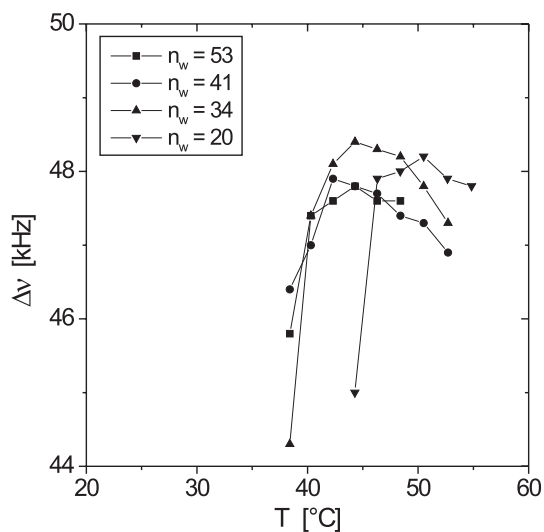
Während die Quadrupolaufspaltung von D_2O in der L_α -Phase bei $n_w > 20$ verschwindet, steigt sie in der Gelphase für abnehmende Temperatur und/oder Hydratation stark an.



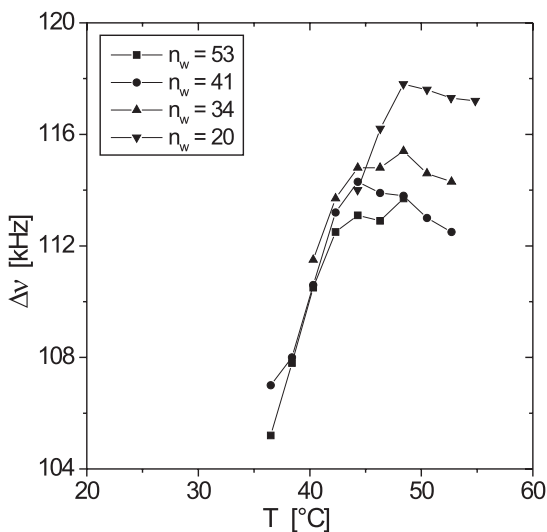
(a) interlamellares Wasser



(b) wie (a), für ausgewählte Temperaturen



(c) Hydroxylgruppe



(d) Amidgruppe

Abbildung 6.5: Quadrupolsplittings von bbSM als Funktion von n_w und Temperatur

Die Quadrupolsplittings der Amid- und Hydroxylsignale sind in der L_α -Phase kaum temperaturabhängig; nur beim Übergang in die Gelphase nimmt $\Delta\nu$ etwas ab. Es kann nicht unterschieden werden, ob die Ursache eine leichte Verkippung des Interface-Bereiches oder eine andere Geometrie der Wasserstoffbrücken ist³.

³ In wasserstoffverbrückten N-D Bindungen skaliert die statische Quadrupol-Kopplungskonstante mit dem Abstand $R(D \cdots O)$ (R in Å): $\chi = (253 - 572/R^3)$ kHz [155].

Auch bei **EYSM**-Multischichten hängt $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ im Bereich hoher Hydratation ($n_w = 20 \dots 32$) nur geringfügig von n_w ab und zeigt zudem dieselbe Temperaturabhängigkeit beim Durchgang durch den Phasenübergang (Abb. 6.6(a)).

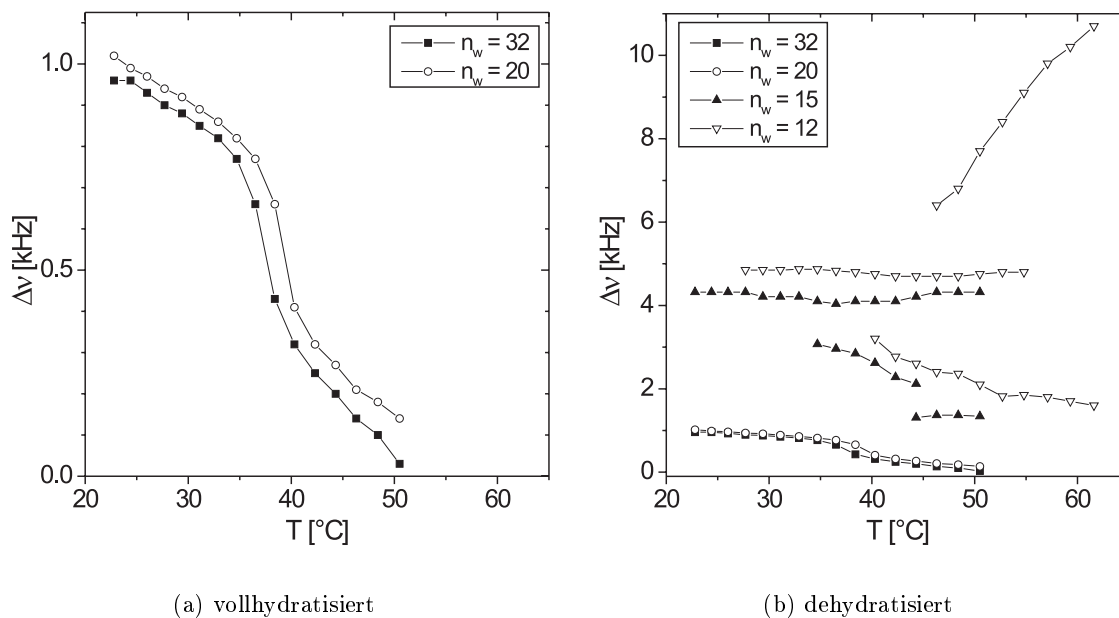


Abbildung 6.6: $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in teilhydratisierten EYSM-Membranen

Bei niedriger Hydratation ($n_w \leq 15$) treten im Wassersignal bis zu 3 Subspektren mit ungewöhnlich hoher Quadrupolaufspaltung auf; Abbildung 6.7 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Wassersignals im Vergleich mit den anderen ^2H -Signalen.

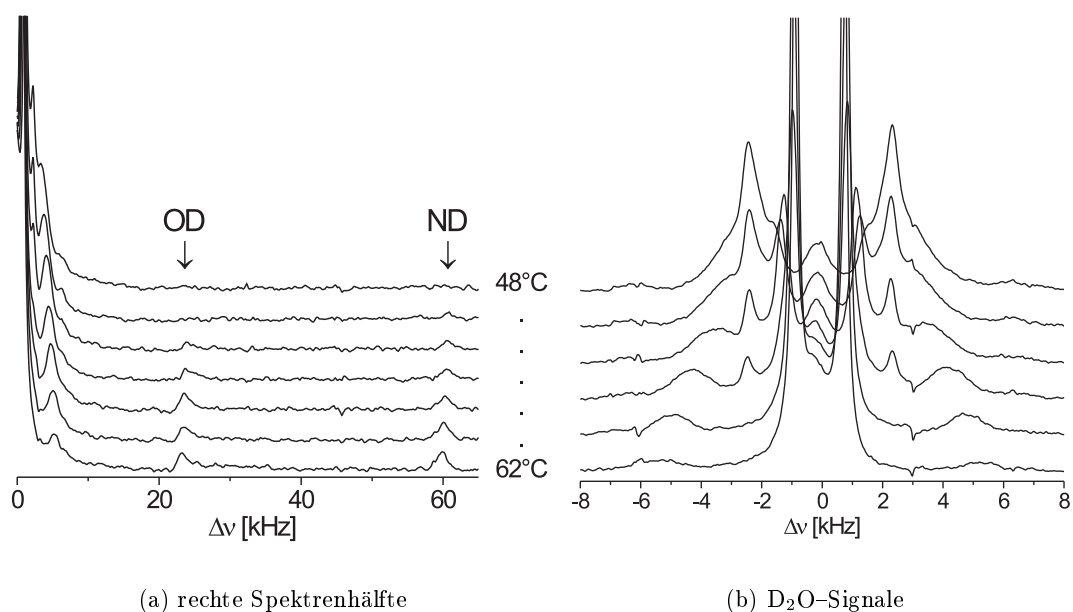


Abbildung 6.7: NMR-Spektren von teilhydratisierten EYSM-Membranen ($n_w = 12$)

Eine Komponente bleibt relativ stabil bei 4–5 kHz, während die anderen stark temperaturabhängig sind. Die OD- und ND-Signale liegen in diesem Spektrum wiederum bei etwa 45 bzw. 120 kHz, sind aber für $T < 50^\circ\text{C}$ stark verbreitert. Mit ihnen korreliert ist die breiteste Wasseraufspaltung bei 11 kHz $\xrightarrow{T \rightarrow T_m}$ 6,5 kHz.

Diskussion

In vollhydratisierten SM-Systemen verschwindet die Quadrupolaufspaltung von D_2O in der L_α -Phase. Das heißt, daß Interface- und Kopfgruppenbereich in hohem Maße durch Wasserstoffbrücken vernetzt sind; Donatoren und Akzeptoren von H-Brücken sind abgesättigt und interlamellare Wassermoleküle finden wenig Möglichkeiten der Wechselwirkung. Dieser Effekt ist bei bbSM gegenüber EYSM aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Fettsäureketten etwas abgeschwächt.

Eine schwache Assoziation des Wassers mit der Oberfläche von SM-Membranen in der L_α -Phase wurde bereits früher postuliert [85,86]. Sphingolipide [89] oder allgemein Lipide mit gleichzeitig vorhandenen Donatoren und Akzeptoren von H-Brücken [18] sollten nur in geringem Umfang mit dem Wasser wechselwirken.

Es wurde gezeigt [6, 26, 102, 167, 176], daß sich am Phasenübergang von SM vor allem die Eigenschaften der Cholin-Kopfgruppe ändern: ihre Beweglichkeit nimmt bei sinkender Hydratation oder Temperatur stärker ab als bei vergleichbaren PC-Membranen. Dies deutet auf starke Wasserstoffbrücken zwischen Amid-, Hydroxyl- und Phosphatgruppe [176] hin. Aus dem Circular dichroismus des Interface-Bereichs von SM [6] wurde ebenfalls abgeleitet, daß H-Brücken zwischen Phosphatgruppe und Hydroxyl- oder Amidgruppe zu einer geringeren Bewegungsfreiheit der Kopfgruppe als bei PC führen. Diese H-Brücken sind relativ stark, da Hydroxyl- und Amidgruppe in einem Bereich mit niedriger Dielektrizitätszahl ϵ liegen [6]. Aus ^1H - und ^{31}P -NMR Messungen an invertierten SM-Mizellen in Chloroform [184] wurde gefolgert, daß die **Wasserstoffbrücken zwischen dem Sphingosin-Hydroxyl und dem Phosphatester-Sauerstoff** in der Kopfgruppe **intramolekular** sind. Dagegen ist die **Amidgruppe intra- und intermolekular** H-verbrückt.

Die Abbildungen 6.6(a) und 6.4 werden derart interpretiert, daß für $T < T_m$ und $T \gg T_m$ die H-Brücken zwischen dem Sphingosin-Hydroxyl und dem Phosphatester-Sauerstoff teilweise aufbrechen und es zu Wechselwirkungen zwischen OD-Gruppe und Wasser kommt. Für $T < T_m$ kann dies daraus resultieren, daß die Beweglichkeit der Kopfgruppe und die des Interface-Bereichs in der Gelphase in unterschiedlichem Maße abnehmen.

Daß sich die (geringe) Hydratisierung der Amidgruppe am Phasenübergang kaum ändert, wurde mit FTIR-Messungen⁴ von vollhydratisiertem EYSM gezeigt [73].

^{31}P -NMR Messungen bestätigen, daß Sphingomyelin über einen weiten Temperatur- und Hydratationsbereich eine stabile Bilayerphase bildet (Abb. 3.4(b), S.34). Die starre Interface-Struktur bewirkt, ähnlich dem Einfluß von Cholesterol in PC-Membranen, eine Verwischung des Unterschiedes Gelphase/flüssigkristalline Phase. In der Gelphase sind die Ketten kondensiert, allerdings durch die starre Struktur des Interface-Bereichs mit einem hohen Grad an Rotationsfreiheit: 34% befinden sich noch in einer *gauche*-Konformation [102]. Die Kondensation der Ketten reicht jedoch aus, um die Bewegung der ND- und OD-Gruppen in ihrer Rotationsfreiheit einzuschränken und ihre transversale Relaxationszeit stark zu verringern.

⁴ Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie

Die Übergang zwischen voller Hydratisierung und teilweiser Dehydratisierung findet nach Abb. 6.5(a) und 6.6 bei $n_w \approx 20$ statt. Dies steht im Einklang mit Röntgenstreuungsmessungen, bei denen für bbSM-Membranen bei 40 °C eine Grenzhydratation $n_w^{sat} \approx 25$ (40 Gew.-%) gemessen wurde [195], bei der die mittlere Kopfgruppenfläche einen konstanten Wert $A_{KG} = 54 \text{ \AA}^2$ annimmt [7].

Bei niedrigen Hydratationen ($n_w < 15$) erreicht $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ sehr hohe Werte (Abb. 6.6 und 6.7) und es treten bis zu 3 koexistierende Wasserdomänen auf. In Abbildung 6.7(b) nehmen sowohl Quadrupolaufspaltung als auch Linienbreite des äußersten D_2O -Signals mit steigender Temperatur stark zu.

Der molekulare Ordnungsparameter S_{OD} eines mit der Molekülachse zur Membranoberfläche orientierten Wassermoleküls liegt üblicherweise bei nur 0,01–0,02 [61], d. h. $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})_{max} \approx \frac{3}{2} \cdot 0,02 \cdot 220 \text{ kHz} = 6,6 \text{ kHz}$. Die beobachteten Werte $\Delta\nu \approx 10 \text{ kHz}$ können nur erklärt werden, wenn man annimmt, daß ein Teil der D_2O -Moleküle im Mittel über einen längeren Zeitraum „schräg“ im Kopfgruppenbereich der Lipide angeordnet ist [83]. Die Korrelation der maximalen Wasseraufspaltung in Abbildung 6.7 mit der Verbreiterung insbesondere des Sphingosin-Hydroxylsignals deutet auf eine derartige Konformation des Wassers mit der Hydroxylgruppe hin.

Ausblick

Die Hydratisierung von Lipidmembranen ist vor allem durch direkte Wechselwirkung zwischen Membranoberfläche und Wasser bedingt [32]. Da bei SM in der L_α -Phase weder die Kopfgruppe noch der Interface-Bereich Wasser orientieren, sollte der Hydratationsdruck P_0 (Kap. 2.2.3 und 5.1.3) relativ niedrig sein. In der Tat wurde mit der *Osmotic-Pressure*-Methode [143, 158] für SM ein wesentlich geringerer Wert als für EYPC gemessen ($P_0 = 1,6$ bzw. $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ dyn/cm}^2$; jeweils L_α -Phase), während die Abfalllänge λ für beide Lipide gleich ist ($\approx 2 \text{ \AA}$, [126]).

Eine Messung des Hydratationsdrucks für verschiedene Sphingomyeline über den ganzen Bereich des Phasenübergangs sollte die aus den NMR-Daten abgeleitete Änderung der Hydrophilie der SM-Oberfläche bestätigen.

6.1.2 Austauschraten labiler Deuteronen

Das Austauschverhalten der labilen Deuteronen in Sphingomyelin–Multischichten wurde mit der *Inversion-Transfer*-Technik (Kap. 4) als Funktion von Hydratation und Temperatur untersucht.

Ein gemeinsames Merkmal sowohl von reinen SM–Membranen als auch von Mischungen mit PC oder Cholesterin ist, daß die ND–Signale durch die selektive Inversion der D_2O –Magnetisierung nicht beeinflußt werden (Abb. 6.8), d. h. daß die Deuteron–Austauschraten hier $\ll 1/T_{1,z}^{ND}$ sind.

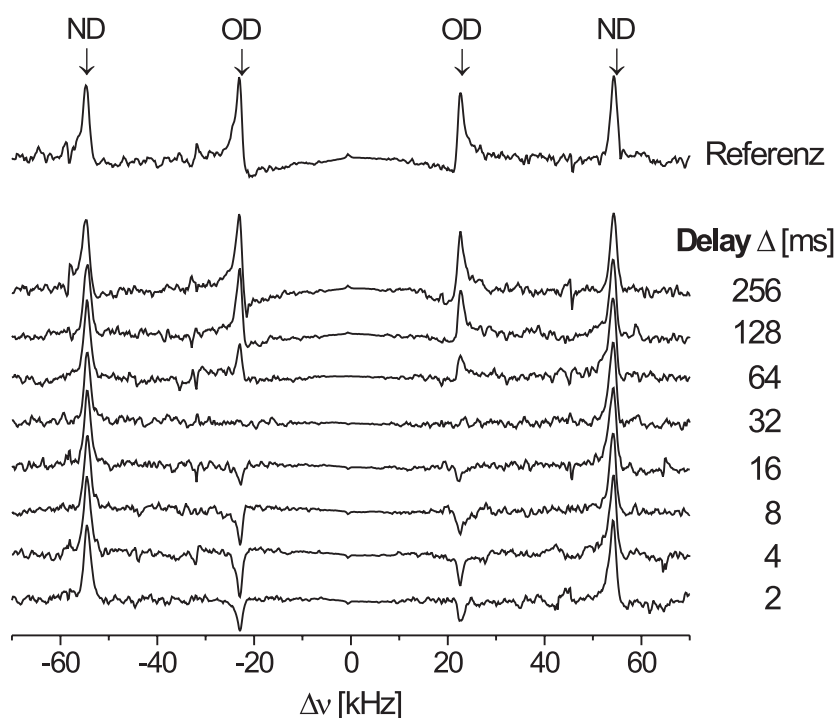
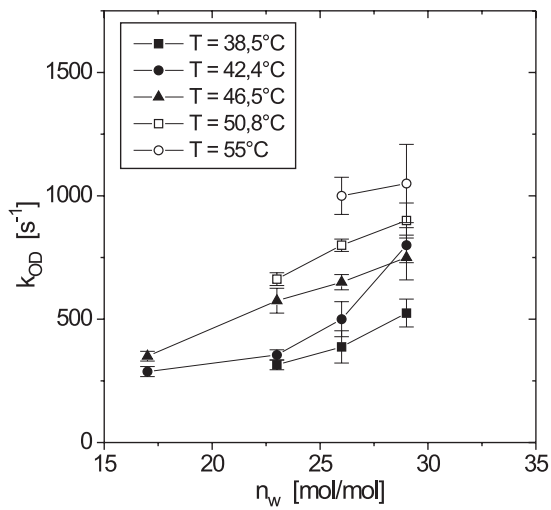


Abbildung 6.8: NMR–Spektren von austauschenden Deuteronen in orientierten EYSM–Membranen bei $T = 42,4^\circ\text{C}$ und $n_w = 29$ (D_2O –Signal durch digitale Filterung unterdrückt)

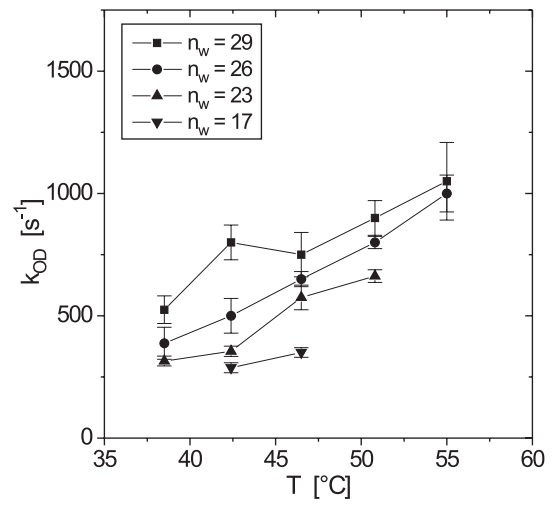
In Abbildung 6.9 und 6.10 sind die Austauschraten k_{OD} von EYSM– und bbSM–Membranen als Funktion der Temperatur und der Hydratation gezeigt. Aufgrund der Heterogenität der Fettsäureketten sind die austauschenden Signale bei bbSM breiter und mit einem stärkeren Rauschen behaftet als bei EYSM; die Bestimmung der Austauschraten wird dadurch ungenauer.

Sowohl bei EYSM als auch bei bbSM steigt k_{OD} mit der Temperatur stark an, ohne im untersuchten Temperaturbereich einen Sättigungswert zu erreichen. Bei vergleichbarer Hydratation ($n_w = 20$ bei bbSM, $n_w = 23$ oder 17 bei EYSM) sind die Austauschraten bei bbSM–Membranen, trotz eines größeren Fehlers, höher.

Bei konstanter Temperatur nimmt k_{OD} für EYSM und bbSM monoton mit der Hydratation zu.



(a) als Funktion der Hydratation



(b) als Funktion der Temperatur

Abbildung 6.9: Austauschraten von labilen Deuteronen in EYSM-Membranen

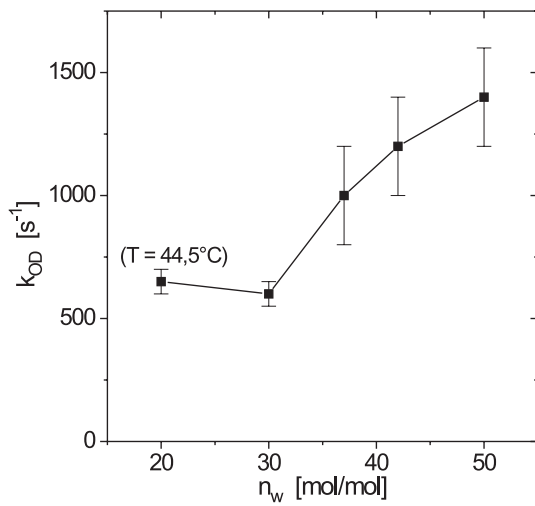
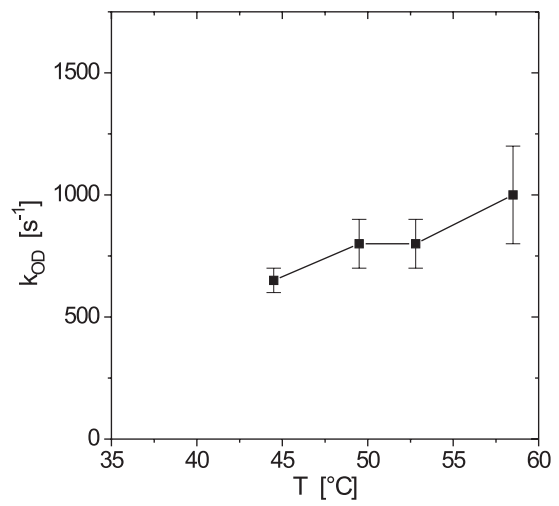
(a) als Funktion der Hydratation bei $T = 46,5^\circ\text{C}$ (b) als Funktion der Temperatur bei $n_w = 20$

Abbildung 6.10: Austauschraten von labilen Deuteronen in bbSM-Membranen

Da es sich beim Deuteronenaustausch offensichtlich um einen temperaturaktivierten Prozeß handelt, kann die Aktivierungsenergie E_A aus den Austauschraten über eine Arrhenius-Beziehung abgeleitet werden [4, 76]:

$$k_{OD} = A \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (6.2)$$

bzw.

$$\ln k_{OD} \propto -\frac{E_A}{RT} \quad (6.3)$$

$R = 8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$ ist die molare Gaskonstante. Vereinfachend wurde eine Reaktion 1. Ordnung angenommen.

In Abbildung 6.11 sind die temperaturabhängigen Austauschraten von bbSM und EYSM aus Abb. 6.9(b) und 6.10(b) für $n_w \geq 20$ zusammengefaßt und gemeinsam ausgewertet. Die Werte für $n_w < 20$ wurden verworfen, da in diesem Bereich nicht mehr von voller Hydratation ausgegangen werden kann und sich entsprechend T_m zu höheren Werten hin verschiebt.

Aus der Steigung der Fitgeraden ergibt sich eine mittlere Aktivierungsenergie $E_A = (41,1 \pm 6,0) \text{ kJ/mol}$ ⁵.

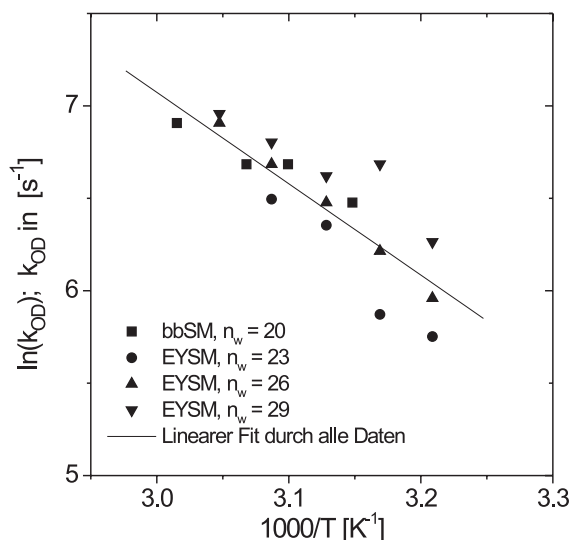


Abbildung 6.11: Arrhenius-Auftragung der Deuteron-Austauschraten von SM mit einem linearen Fit an alle Meßpunkte; die Steigung der Fitgeraden beträgt $-(4,94 \pm 0,73) \cdot 10^3/\text{K}$

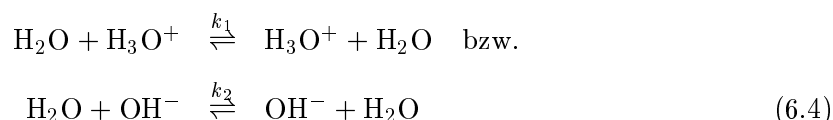
⁵ Anmerkung: Die hier und im folgenden angegebenen Aktivierungsenergien sind extrem groß im Vergleich zur thermischen Energie $RT = 2,5 \text{ kJ/mol}$ bei 298 K. Eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Prozeß abläuft, erfordert zusätzliche Informationen über den präexponentiellen Faktor A in Gleichung 6.2. Dieser ist von der Größenordnung der typischen Schwingungsfrequenzen des Systems.

Diskussion

Die Austauschraten der labilen Deuteronen von SM-Membranen sind im Vergleich zu denen in POPC/Chol- und Cardiolipin-Systemen (Abb. 5.17(a) bzw. Abb. 5.20) bei allen Hydratationen sehr hoch. Dies deutet darauf hin, daß die Hydroxylgruppe von SM zum interlamellaren Wasser hin orientiert ist; damit ist die Aktivierung des Austausches allein thermisch und nicht durch geometrische Faktoren bestimmt.

Für hohe Hydratation und/oder Temperatur nähert sich k_{OD} dem Wert von 1100 s^{-1} , der für Protonenaustausch in reinem Wasser bei Raumtemperatur und neutralem pH bestimmt wurde [129].

Die monotone Zunahme von k_{OD} mit der Temperatur erlaubt die Abschätzung der Aktivierungsenergie $E_A = (41,1 \pm 6,0)\text{ kJ/mol}$ des Protonenaustausches. Diese liegt deutlich höher als bei reinem Wasser, wo für einen Austausch nach Gleichung 6.4 für Protonen $\Delta H(\text{H}^+) = 10\text{ kJ/mol}$ und für Hydroxylionen $\Delta H(\text{OH}^-) = 8,8\text{ kJ/mol}$ gemessen wurde [116].



Ein Teil des Unterschieds geht auf die stabileren Wasserstoffbrücken von D_2O zurück (Kap. 2.1.4, S. 21); den Hauptbeitrag liefert aber vermutlich die reduzierte Mobilität von Wasser an der Membranoberfläche (Kap. 5.3, S. 78).

Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, ist das Relaxationsverhalten von D_2O in SM-Systemen komplexer als bei PC-Systemen; deshalb kann das Modell eines Zweiseiten-Austausches hier nicht verwendet werden.

Der auf der NMR-Zeitskala nicht meßbare Austausch der Amiddeuteronen könnte aus einer sehr starken Wechselwirkung mit den Carbonyl-Sauerstoffen über H-Brücken [102] resultieren.

6.1.3 Relaxationsverhalten des interlamellaren Wassers

Die **longitudinale Relaxationszeit** $T_{1,z}$ des Wassers nimmt bei EYSM ähnlich wie bei PC-Membranen [201] mit steigender Hydratation stark zu (Abb. 6.12(a)), ohne jedoch die Werte zu erreichen, die für PC bei sehr hoher Hydratation typisch sind ($T_{1,z} \approx 350$ ms, [201]). Ein starker Anstieg von $T_{1,z}$ erfolgt bei höheren Hydratationen als bei PC- [ebd.] oder CL-Systemen (Abb. 5.21). Für hohe Temperaturen erreicht die Relaxation ein hydrationsabhängiges Maximum (Abb. 6.12(b)).

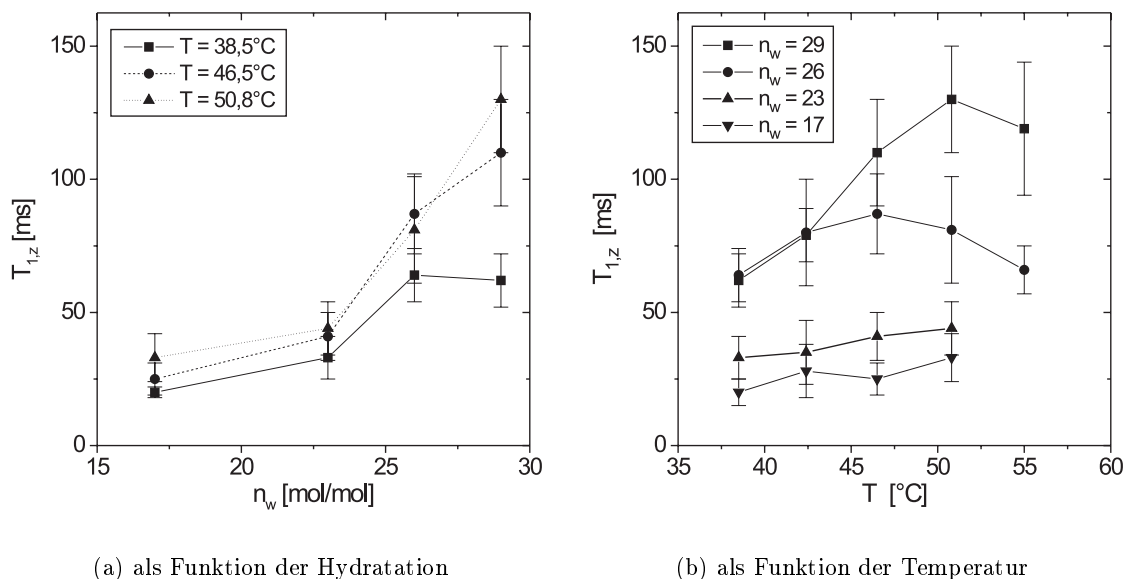


Abbildung 6.12: Longitudinale Relaxationszeit $T_{1,z}$ von EYSM

Die Relaxationszeiten von D_2O im bbSM-System sind bei gleicher Hydratation und Temperatur etwas höher als bei EYSM (Daten nicht gezeigt).

Aus der Temperaturabhängigkeit von $T_{1,z}$ kann unter der Voraussetzung einer monoexponentiellen Relaxation die effektive Korrelationszeit τ_c der Wassermoleküle berechnet werden [194, 201]:

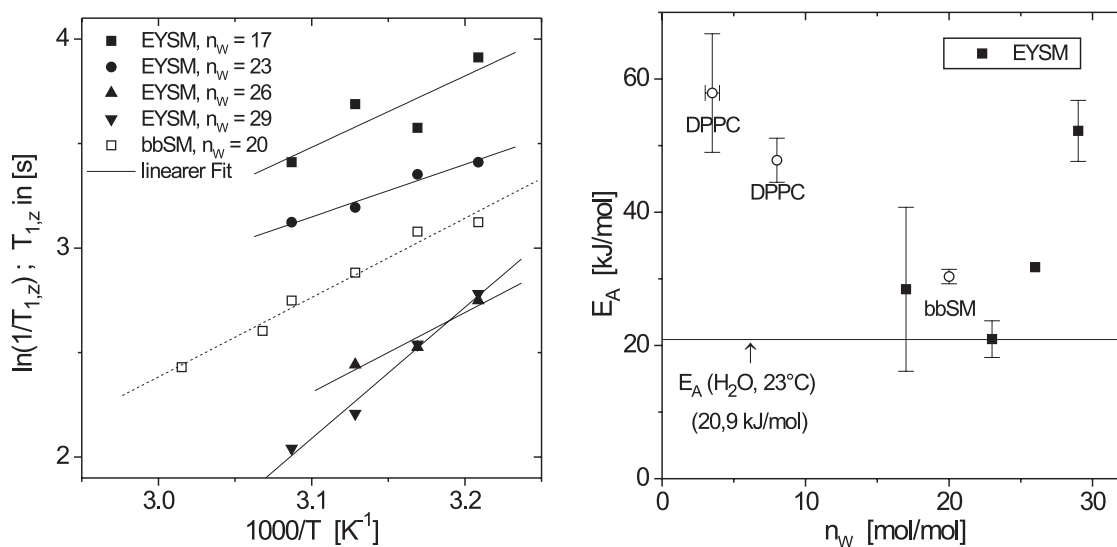
$$\frac{1}{T_{1,z}} = \frac{3}{8}(2\pi\chi)^2\tau_c \quad (6.5)$$

$\chi = 220 \text{ kHz}$ ist die statische Kopplungskonstante von D_2O . Für reines Wasser ist $T_{1,z} \approx 450$ ms (bei 23°C) und damit $\tau_c = 3$ ps [201]. Der Maximalwert von $T_{1,z}$ beträgt für EYSM 125 ms; damit ist $\tau_c \leq 11$ ps – deutlich langsamer als bei reinem Wasser, aber schnell genug, um die Annahme eines schnellen Austausches der Wassermoleküle untereinander zu rechtfertigen ([81], S. 361).

Sofern Gleichung 6.5 gültig ist, kann analog zu Gleichung 6.3 die Aktivierungsenergie E_A des Wassers aus der Temperaturabhängigkeit der Relaxationsrate $1/T_{1,z}$ berechnet werden [193]:

$$\frac{1}{T_{1,z}} \propto \exp\left(\frac{E_A}{RT}\right) \quad (6.6)$$

Für eine quantitative Analyse können nur die Daten aus Abbildung 6.12 herangezogen werden, in denen $T_{1,z}(T)$ monoton steigt. Die starke Streuung der Daten ergibt sich daraus, daß $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ fast Null ist und die Linien deshalb kaum aufgelöst sind. $T_{1,z}$ wurde für jede Signalkomponente separat bestimmt; der angegebene Fehler setzt sich also aus der Abweichung der zwei Werte von $T_{1,z}$ vom Mittelwert und aus den individuellen Fitfehlern zusammen.



(a) $\ln(1/T_{1,z})$ für ausgewählte Werte in Abb. 6.12(b) – d. h. für Bereiche, in denen $T_{1,z}$ mit der Temperatur steigt

(b) Aktivierungsenergie von $T_{1,z}(\text{D}_2\text{O})$ an SM- und DPPC-Membranen nach Glg. 6.6; DPPC-Daten aus [94]; $E_A(\text{H}_2\text{O})$ aus [204]

Abbildung 6.13: Aktivierungsenergie der D_2O -Relaxation von SM-Systemen im Vergleich mit (orientierten) DPPC-Multilayern

Abbildung 6.13(b) faßt die nach Gleichung 6.6 für die SM-Systeme gewonnenen Daten zusammen. Mit angeführt sind Literaturdaten für 0° -orientierte DPPC-Multilayer⁶ und zum Vergleich die Aktivierungsenergie für Selbstdiffusion von reinem H_2O (20,9 kJ/mol, [204]).

⁶ Der im Originaltext genannte Wert von $E_A = 32,1 \text{ kJ/mol}$ für $n_w = 3-4$ mußte nach einer Reevaluierung der Daten auf $57,9 \pm 8,9 \text{ kJ/mol}$ korrigiert werden.

Diskussion

Die oben durchgeführte Ableitung einer Aktivierungsenergie der D_2O -Relaxation ist aus mehreren Gründen problematisch:

- Da $T_{1,z}(D_2O)$ nicht monoton mit der Temperatur steigt, wurde zur Bestimmung von E_A gemäß Gleichung 6.6 nur ein Teil der $T_{1,z}$ -Werte herangezogen.
- Die Mechanismen, die zu einer Abnahme von $T_{1,z}$ bei hohen Temperaturen und/oder Hydratationen führen, können nur teilweise verstanden werden (s. u.).
- Vergleichbare Literaturdaten, d. h. die Temperaturabhängigkeit der Relaxation des interlamellaren Wassers, wurden nur in [94] für teilweise dehydratisierte DPPC-Multilayer ($n_w = 8$ bzw. 3–4) gefunden. Andere Untersuchungen beschränken sich auf die Aktivierung deuterierter Lipidsegmente (z. B. [194]).

Eine vorsichtige Interpretation der Abbildungen 6.12 und 6.13(b) läßt folgende Schlüsse zu:

Der Hydratationsbereich, in dem die Dynamik des interlamellaren Wassers von der Oberfläche der SM-Membranen beeinflusst ist, ist deutlich höher als bei PC-Systemen. Dies steht nicht im Widerspruch zu der Feststellung, daß sich SM-Oberflächen weniger hydrophil als ihre PC-Pendants verhalten: während hydrophile Oberflächen vor allem die Ordnung des Wassers in ihrer unmittelbaren Nähe beeinflussen, bewirken hydrophobe Oberflächen eine starke Ordnung des Wassers, die sich über relativ große Distanzen erstrecken kann [80].

Der Rückgang von $T_{1,z}$ bei hohen Temperaturen wird auf einen komplexen Zusammenhang mit der Änderung der Wasserstoffverbrückung (Abb. 6.4) und einem (bis jetzt nicht gemessenen) Einfluß von Membranundulationen zurückgeführt.

In diesem Sinne wird auch der Verlauf von $E_A(n_w)$ von D_2O für das EYSM-System interpretiert: die „Hydrophobizität“ von SM wird nur bei hoher Hydratation beobachtet (Abb. 6.6); in diesem Bereich steigt $E_A(n_w)$ auf Werte, die beim (hydrophileren) DPPC nur für sehr geringe Hydratationen erreicht werden.

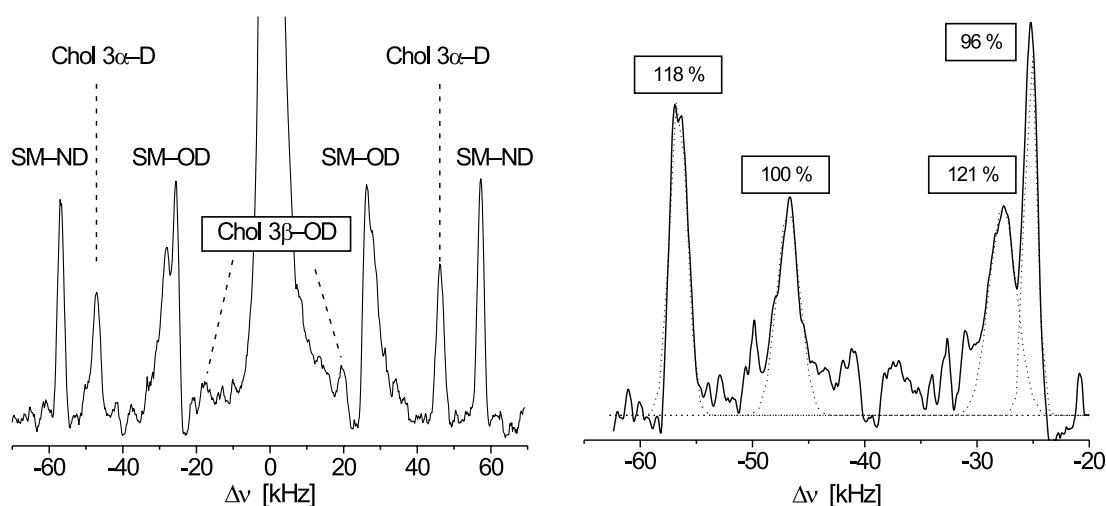
Die Aktivierungsenergie der Selbstdiffusion von reinem Wasser wird als eine Untergrenze für die Aktivierung der D_2O -Relaxation verstanden.

6.2 Binäre SM/Cholesterol-Systeme

Nach dem Temperatur- und Phasenverhalten von reinem Sphingomyelin wurde als nächstes der Einfluß von Cholesterol untersucht.

Abbildung 6.14 zeigt das NMR-Spektrum einer 2:1-molaren bbSM/Cholesterol-Mischung bei $n_w = 27$, also in einem Bereich, in dem reine SM-Membranen als voll hydratisiert angenommen werden können. Die 3α -Position von Cholesterol wurde nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Methode selektiv deuteriert.

Nach der oben erwähnten Präparation mit Deutero-Methanol erwartet man neben den D_2O -Signalen die Signalaare der austauschenden Deuteronen der ND- und OD-Gruppen des SM mit einer Quadrupolaufspaltung von ca. 110 bzw. 55 kHz sowie die Signale des kovalent gebundenen 3α -Deuterons und der austauschenden 3β -Hydroxylgruppe von Cholesterol bei ca. 90 bzw. 30 kHz. Die Integralverhältnisse sollten den molaren Anteilen entsprechen, d. h. 2:2:1:1 in der genannten Reihenfolge.



(a) 2H -Spektrum bei 53 °C

(b) Dekonvolution der linken Spektrenhälfte nach Gauss-Linien; Flächen auf das Integral des 3β -OD Signals von Chol normiert

Abbildung 6.14: 2H -Spektrum einer 2:1-molaren bbSM/Chol-Membran bei $n_w = 27$

Beobachtet wird (Abbildung 6.14):

1. Das 3β -OD Signal von Cholesterol ist im 2H -Spektrum kaum nachweisbar.
2. Das Integralverhältnis SM-OD/Chol- 3α -D ist etwas größer als der erwartete Wert, während das SM-ND Signal nur etwa die Hälfte des erwarteten Integrals hat.
3. Das SM-OD Signal zeigt eine stark verbreiterte zweite Komponente mit einem Frequenzabstand von 2,34 bzw. 1,37 kHz mit einem Unterschied der chemischen Verschiebung von 0,98 kHz.

Punkt 2 ist nur teilweise erklärbar mit der endlichen Breite der Signalanregung: in Versuchen mit $d31$ -POPC/SM und $d31$ -POPC/Chol, in denen die Methyl- und Methylensignale

des POPC eindeutige Referenzen liefern, lag der Verlust an Intensität des ND-Signals bei ca. 10–15 %, die Chol-3 β -OD Gruppe zeigte keinen meßbaren Signlrückgang.

Die zwei Komponenten des SM-OD Signals sind in etwa gleich groß. Nimmt man an, daß je ein SM- und ein Chol-Molekül stark miteinander wechselwirken, so kann die Aufspaltung aus einer minimalen Verkippung des Interface-Bereichs von SM für Cholesterol-assoziierte SM-Moleküle resultieren. Damit verändern sich Elektrostatik und/oder Geometrie der H-Brücken des SM-OD und bewirken die unterschiedliche chemische Verschiebung der zwei Subsignale.

In Abbildung 6.15 sind die Quadrupolaufspaltungen bei $n_w = 27$ über einen Temperaturbereich von 26...60 °C zusammengestellt. Für das SM-OD ist nur die Quadrupolaufspaltung der schmalen Komponente in Abb. 6.14 gezeigt.

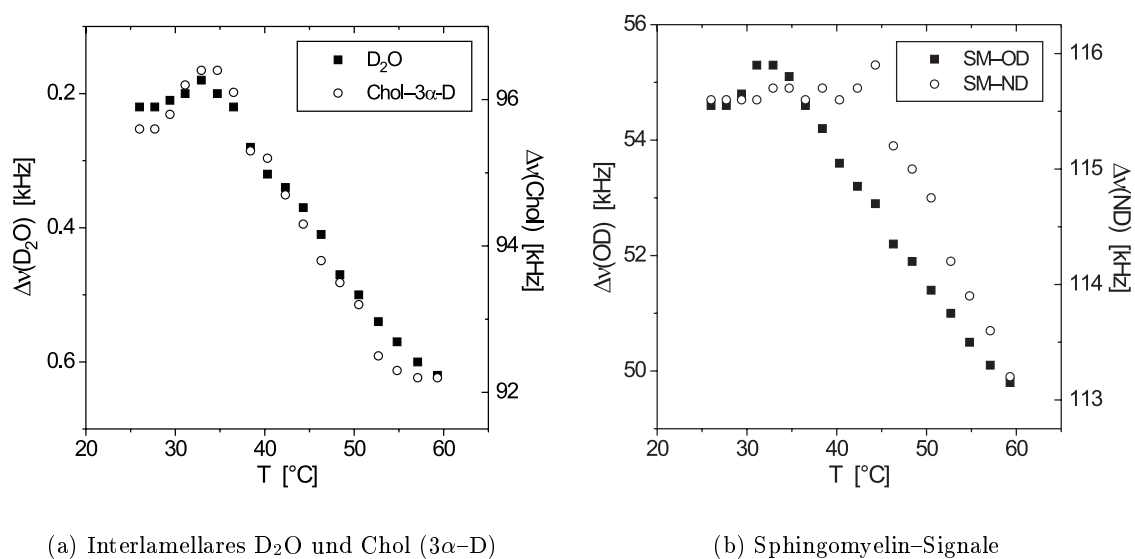


Abbildung 6.15: Temperaturverlauf der 2H -Aufspaltungen $\Delta\nu$ in einer 2:1-molaren bbSM/Chol-Membran bei $n_w = 27$

Sie unterscheiden sich bemerkenswert von denen des reinen Sphingomyelin:

$\Delta\nu(D_2O)$ steigt für $T > 33$ °C kontinuierlich mit der Temperatur an; der Anstieg verläuft parallel zur Abnahme der Quadrupolaufspaltung des Chol-3 α -D und des SM-OD. Das SM-ND Signal ist im Bereich von 33–44 °C weitgehend konstant.

Die Sphingomyelin-Signale sind über den ganzen Temperaturbereich klar aufgelöst. Im Bereich des Phasenübergangs von reinem bbSM verbreitert sich das SM-ND Signal etwas, wobei die breite Schulter des SM-OD Signals erhalten bleibt (Daten nicht gezeigt).

Normiert man die Quadrupolaufspaltungen in Abbildung 6.15 auf ihren Maximalwert bei $T = 33$ °C (bzw. 44 °C beim SM-ND) und trägt sie über $\Delta\nu(D_2O)$ auf, so sieht man erneut den parallelen Verlauf der Aufspaltungen von D_2O , SM-OD und Chol-3 α -D:

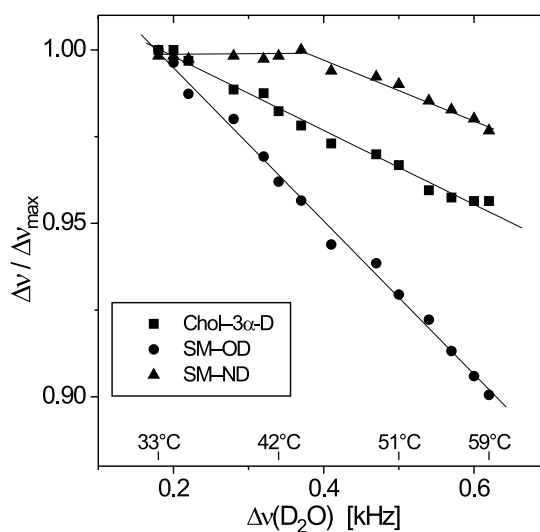


Abbildung 6.16: Relative Änderung $\Delta\nu/\Delta\nu_{\max}$ der SM- und Chol-Signale in Abb. 6.15 für $T \geq 33^\circ\text{C}$ als Funktion von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$; durchgezogene Linien: lineare Näherungen

Einfluß der Dehydratisierung

Die Quadrupolaufspaltungen des D_2O und des 3α -Deuterons von Cholesterol ist in Abbildung 6.17 gezeigt. $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ nimmt für niedrige Hydratationen stark zu. Das Chol-Signal ändert sich weniger deutlich, steigt aber für abnehmende Hydratation und Temperatur kontinuierlich an.

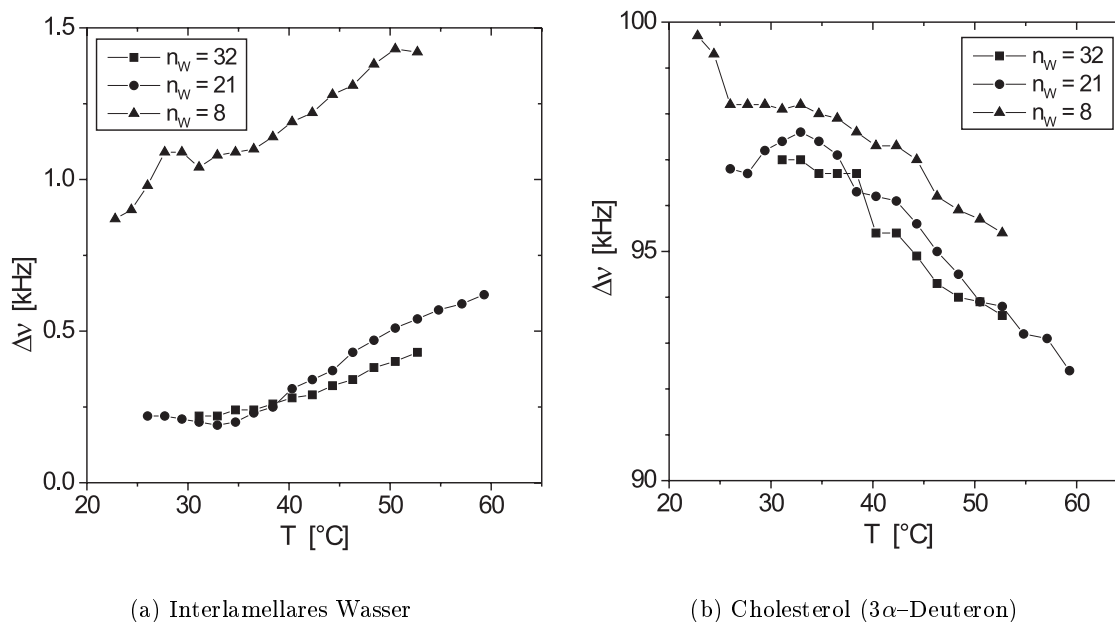


Abbildung 6.17: Dehydratisierung der 2:1-molaren bbSM/Chol-Mischung: Quadrupolaufspaltungen von D_2O und Chol-3 α -D als Funktion von n_w und T

Orientierung von Cholesterol

Aus dem Ordnungsparameter S_{CD} des 3α -Deuterons von Chol kann die **mittlere Orientierung der Molekülachse von Cholesterol** abgeleitet werden. S_{CD} setzt sich zusammen aus den Beiträgen der Molekülgeometrie, S_γ , und der Orientierung der Molekülachse zur Bilayernormalen im Winkel α , S_α (Abb. 6.18(a)):

$$S_{CD} = S_\alpha \cdot S_\gamma \quad \text{mit} \quad (6.7)$$

$$S_\gamma = \frac{1}{2}(3 \cos^2 \gamma - 1) \quad \text{und} \quad (6.8)$$

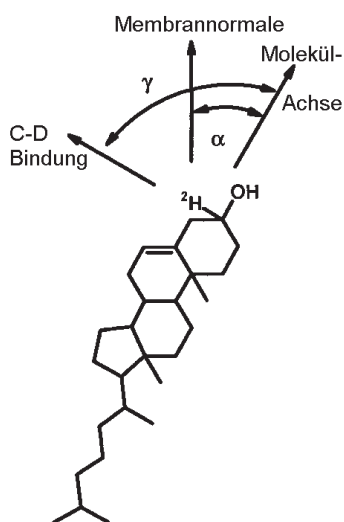
$$S_\alpha = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \alpha - 1 \rangle \quad (6.9)$$

S_γ ist ein geometrischer Faktor, bestimmt durch den Winkel γ zwischen C-²H Bindung und Molekülachse. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß $\gamma = 79^\circ$ und damit $S_\gamma = -0,445$ ist (in [30]). Für den molekularen Ordnungsparameter S_α muß ein Bewegungsmodell angenommen werden, um das Zeitmittel zu bestimmen. Für eine axialsymmetrische Gauß-Verteilung von α um einen mittleren Kippwinkel α_0 herum kann α_0 durch numerische Integration simuliert werden:

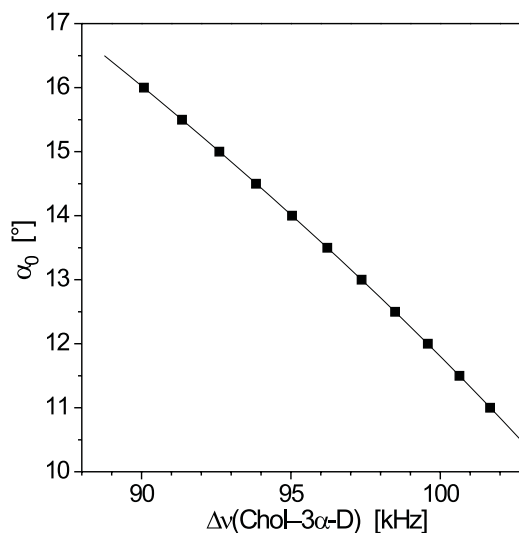
$$S_\alpha = \frac{\frac{1}{2} \int_0^\pi \sin(\alpha) \exp(-\alpha^2/2\alpha_0^2) (3 \cos^2 \alpha - 1) d\alpha}{\int_0^\pi \sin(\alpha) \exp(-\alpha^2/2\alpha_0^2) d\alpha} \quad (6.10)$$

In PC/Chol-Mischungen wird α_0 durch die Geometrie der Wasserstoffbrücke zwischen der *sn*-2 Carbonylgruppe und dem 3β -OH festgelegt [108] und liegt bei ca. 16° [30].

Im vorliegenden Fall nimmt das Quadrupolsplitting des 3α -Deuterons von 93 auf 100 kHz zu; dem entsprechen Werte von α_0 von $14,8 \dots 11,8^\circ$ (Abb. 6.18(b)).



(a) Geometrie eines Cholesterol-Moleküls im Bilayer



(b) Simulation des Kippwinkels α_0 als Funktion von $\Delta\nu(\text{Chol-}3\alpha\text{-D})$ gemäß Glg. 6.10

Abbildung 6.18: Orientierung von Cholesterol im Bilayer (nach [30])

Austauschraten labiler Deuteronen

Wie oben gezeigt wurde, kann das austauschende 3- β -Deuteron von Cholesterol im NMR-Spektrum kaum nachgewiesen werden. Eine *Inversion-Transfer*-Anregung invertiert also in der SM/Chol-Mischung nur das OD-Signal von Sphingomyelin. Die zugehörigen Austauschraten können aufgrund der teilweisen Aufspaltung des OD-Signals nur mit einer großen Unschärfe bestimmt werden.

Im Rahmen dieses Fehlers schwanken die Austauschraten um den Wert für Protonenaustausch in reinem Wasser, 1100 s^{-1} (vgl. Diskussion auf S. 93).

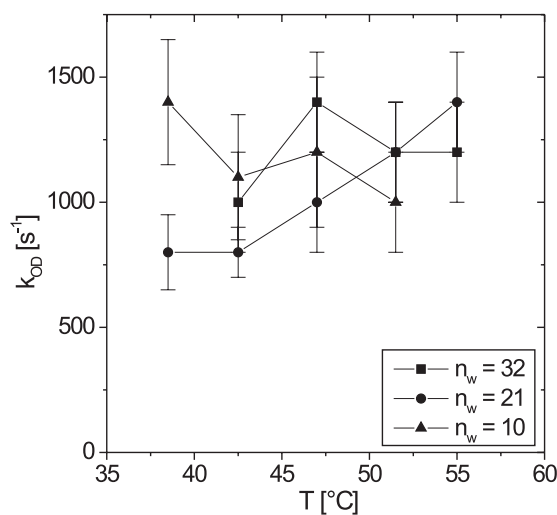


Abbildung 6.19: Deuteron-Austauschraten der labilen Hydroxylgruppe von SM im 2:1-molaren bbSM/Chol-System

Diskussion

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß zwischen der 3 β -OH Gruppe von Cholesterol und der Amidgruppe von Sphingomyelin eine stabile Wasserstoffbrücke vorliegt [15, 18]. Dies erklärt die Abnahme des ND-Signals in Abbildung 6.14: wenn zwischen einem Teil der Amidgruppen und Cholesterol H-Brücken bestehen, die statisch in der Membranebene ausgerichtet sind, so ist ihr ²H-Spektrum stark verbreitert (Pulverspektrum). Auch eine Einschränkung der Rotationsfreiheit des SM-ND kann ähnlich wie im Falle des Chol-3 β -OD die transversale Relaxationszeit dieser Komponente stark reduzieren und damit die ²H-Linien verbreitern.

Die Aufspaltung der Signale des SM-OD sowie ihre unterschiedliche chemische Verschiebung deuten darauf hin, daß sich die Orientierung des Interface-Bereichs von SM bei einer Assoziation mit Chol leicht ändert. Im Interface-Bereich ist die Dielektrizitätszahl ϵ niedrig (≈ 2) und deshalb die H-Brücken relativ stark [7]. Bereits geringfügige Änderungen in der Molekülgeometrie können die Elektrostatik und damit die Stärke der H-Brücken in diesem Bereich modifizieren [148]. Dies erklärt die Aufspaltung der SM-OD Linien sowie ihre unterschiedliche chemische Verschiebung.

In anderen Messungen wurde gezeigt, daß bei bbSM-Monolayern die Zugabe einer äquimolaren Menge Cholesterol zu einem starken Anstieg des Dipolpotentials führt [126].

$\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ zeigt in vollhydratisierten SM/Chol-Systemen ein deutlich anderes Temperatur-

verhalten als bei reinem SM (Abb. 6.17(a) bzw. 6.5(a)): für $T > 33\text{ °C}$ nimmt $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ kontinuierlich zu. In [51] wurde für Palmitoyl-SM/Chol-Vesikel mittels DSC gezeigt, daß der Phasenübergang zwei Komponenten aufweist. Neben einem scharfen Peak, dessen Maximum sich kontinuierlich von 41 °C bei 0 % Chol auf 35 °C bei 20 % Chol verschiebt, liegt ein relativ breiter Peak fast unabhängig vom Chol-Anteil bei etwa 42 °C . Die Ergebnisse wurden derart interpretiert, daß der scharfe Peak den Phasenübergang einer SM-reichen und der breitere Peak denjenigen einer Chol-reichen Subphase oder der Grenzregion um diese Domänen darstellt.

Das Minimum von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei $T \approx 33\text{ °C}$ wird daher als eine Komponente des Phasenübergangs der SM/Chol-Mischung interpretiert, obwohl bei der hier untersuchten Chol-Konzentration von 33 mol-% in [51] kein kalorimetrisches Signal mehr detektiert wurde.

Der parallele Verlauf der Quadrupolaufspaltungen des D_2O , des 3β -Deuterons von Chol und des SM-OD (Abb. 6.15) legt nahe, daß diese 3 Gruppen von demselben Mechanismus beeinflußt werden. Mit steigender Temperatur nimmt der mittlere Kippwinkel α_0 von Cholesterol im Bilayer zu; dies führt zu einer veränderten Ausrichtung der SM-OD Gruppe sowie zu verstärkter Wechselwirkung mit dem interlamellarem Wasser.

Die Deuteron-Austauschraten des Hydroxylgruppe von SM sind in Anwesenheit von Chol deutlich höher als bei reinem SM und hängen kaum von Temperatur und Hydratation ab (Abb. 6.19); k_{OD} liegt fast immer im Bereich der Proton-Austauschraten von reinem Wasser. Dies deutet ebenfalls darauf hin, daß sich die Wasserstoffverbrückung der SM-Hydroxylgruppe in Anwesenheit von Cholesterol ändert.

Ausblick

Nur mit kettendeutertem Sphingomyelin ist eine Aussage darüber möglich, in welchem Umfang und bei welchen Segmenten sich die Ordnung der SM-Acylketten in der Gelphase durch Cholesterol erhöht.

Eine systematische Variation der Stereoisomere von SM und Chol, d.h. von 4 x 2 Möglichkeiten (SM: D/L-*erythro*/*threo*; Chol: *nat*/*ent*), könnte die Geometrie der Wasserstoffverbrückung entschlüsseln. Ein Vergleich der Kondensation von EYSM-Monolayern durch die beiden Enantiomere *nat*-Cholesterol (natürliche Variante) und *ent*-Cholesterol zeigte einen deutlichen Einfluß der Stereogeometrie des Sterols, der für 30 mol-% Chol maximal ist [101].

6.3 SM/DPPC-Membranen

Phosphatidylcholin und Sphingomyelin gehören zu den häufigsten Phospholipiden in biologischen Membranen. Der altersbedingte Austausch von PC durch SM (Kap. 1.4.3) legt nahe, die Eigenschaften von Sphingomyelin- und PC-Membranen mit und ohne Cholesterol vergleichend zu untersuchen. In den vorangegangenen Abschnitten ist gezeigt worden, daß reines Sphingomyelin sich deutlich anders als Phosphatidylcholin verhält und Cholesterol einen starken Einfluß auf dieses Verhalten hat.

In der Literatur finden sich vor allem Daten für SM/PC(/Chol)-Systeme mit DPPC als PC-Komponente, da DPPC und DPPC/Chol wohl die am besten charakterisierten Membransysteme darstellen. Den zahlreichen Untersuchungen binärer SM/Chol- und DPPC/Chol-Mischungen (z. B. [3, 15, 109, 198]) stehen jedoch wenige Arbeiten gegenüber, die den differentiellen Effekt eines Austausches von PC gegen SM untersuchen (z. B. [123, 180]).

In den folgenden Untersuchungen wurde DPPC meist in der $d4(\alpha, \beta)$ -Form verwendet, d. h. die beiden Methylensegmente der Cholin Kopfgruppe sind deuteriert (zur Nomenklatur siehe Abb. 1.6, S. 9). Gegenüber der kettendeuterierten Form hat $d4$ -DPPC den Vorteil, daß sich die ^2H -Signale nicht mit denen von Sphingomyelin überlappen und zusätzlich Änderungen in der mittleren Kopfgruppenorientierung verfolgt werden können: so ändert die Cholingruppe ihren mittleren Winkel von $\approx 30^\circ$ zur Membranoberfläche in Anwesenheit von geladenen Lipiden [171] oder bei Dehydratation [9].

6.3.1 DSC- und Filmwaagenexperimente

Zum besseren Verständnis wurden für einige der mit NMR untersuchten SM/PC-Mischungen Filmwaagen- und DSC-Versuche gemacht.

In Abbildung 6.20(a) sind die exothermen Wärmen des Phasenübergangs von bbSM/DPPC-Schallvesikeln⁷ der Zusammensetzung 2:1 mol/mol mit und ohne Cholesterol gezeigt. Das molare Verhältnis SM/PC ist dabei konstant, der Cholesterol-Anteil beträgt 25 mol-%. Die Enthalpien wurden auf die Gesamt-Molmenge normalisiert. Es wurden Heiz- und Kühlkurven gemessen, die sich nur geringfügig unterscheiden; dargestellt sind jeweils die Kühlkurven.

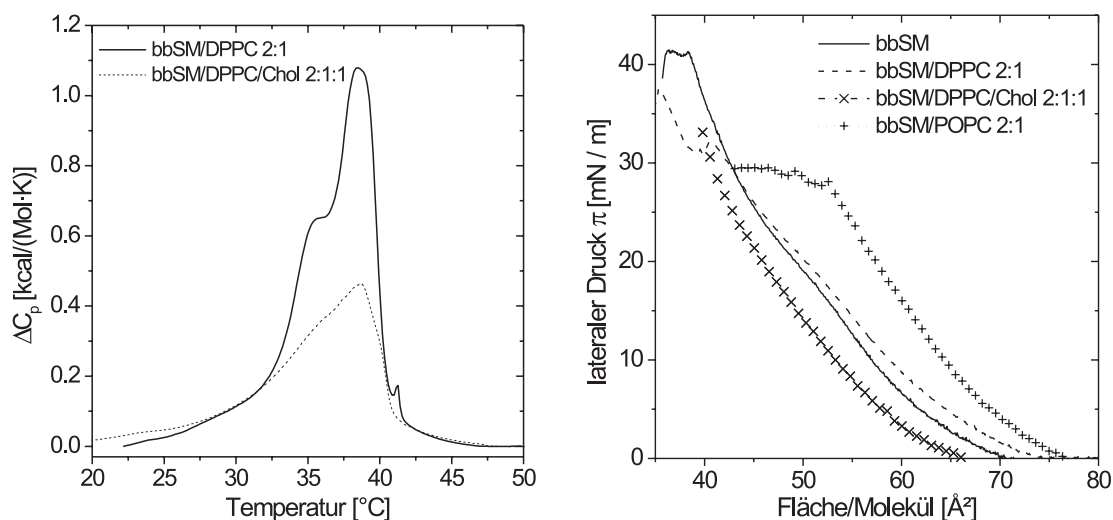
Die Enthalpie $\Delta H = 6,23$ kcal/mol des Phasenübergangs der bbSM/DPPC-Mischung liegt zwischen der von reinem bbSM ($(5,84 \pm 0,27)$ kcal/mol, [126]) und reinem DPPC (8,6 kcal/mol, [181]⁸).

Der gemessene Wert $\Delta H = 3,76$ kcal/mol für die bbSM/DPPC/Chol-Vesikel liegt für gleiche Molanteile Cholesterol deutlich über denen von binären SM/Chol- und PC/Chol-Systemen [181]. Im Vergleich mit der bbSM/DPPC-Mischung zeigt sich, daß Cholesterol vor allem die Breite des Phasenübergangs erhöht, während seine Position konstant bleibt.

In [181] wurde gezeigt, daß für steigende Anteile Cholesterol ΔH bei SM/Chol schneller abfällt als bei DPPC/Chol. Eine Dekonvolution der DSC-Kurve nach den Beiträgen idealer und nichtidealer Mischung ergab, daß die langsamere Abnahme von ΔH im DPPC/Chol-System vor allem auf eine weniger ideale Mischbarkeit zurückgeht.

⁷ Schallvesikel werden durch Ultraschall-Bestrahlung der Lipiddispersion erzeugt; aufgrund ihrer relativ kleinen Durchmesser (ca. 100 nm) ist der Phasenübergang geringfügig zu kleineren Temperaturen verschoben.

⁸ Die Aufspaltung der Enthalpie von DPPC in Vor- und Hauptübergang ist hier nicht berücksichtigt; nach [35] liegt das Verhältnis $\Delta H_{pre}/\Delta H_{main}$ bei 1/6,33.



(a) DSC von bbSM/DPPC (2:1-molar) und bbSM/DPPC/Chol (2:1:1-molar); $\Delta H = 6,23$ bzw. $3,76$ kcal/mol

(b) Isotherme Monolayerkompression von bbSM bei $T = 25$ °C; Einfluß von Cholesterol und Kettensättigung

Abbildung 6.20: DSC- und Filmwaagenmessungen von bbSM-enthaltenden Systemen

Abbildung 6.20(b) zeigt unter anderem für molare Zusammensetzungen wie in Abb. 6.20(a) isotherme Monolayermessungen ($T = 25$ °C):

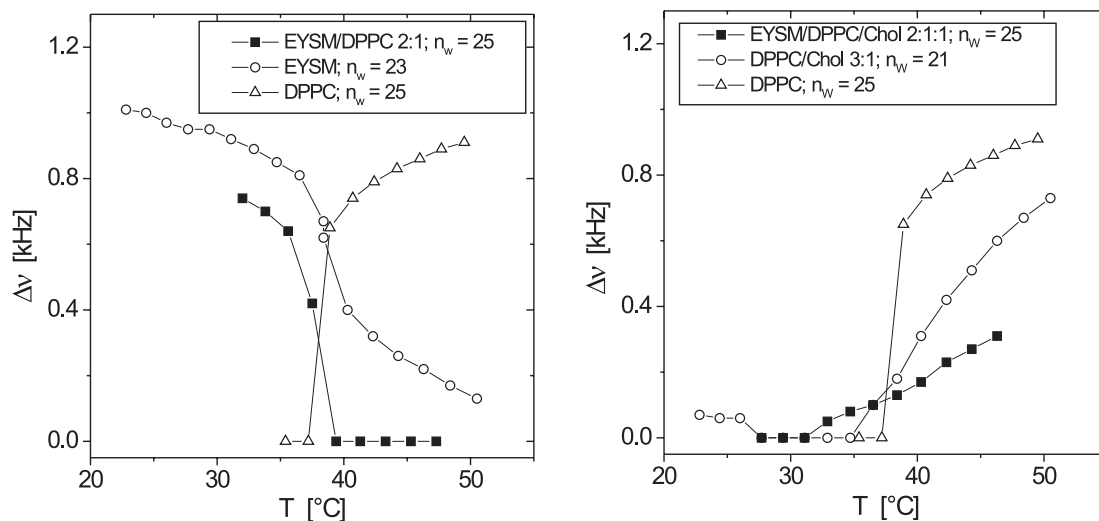
DPPC-Anteile reduzieren den lateralen Druck π von bbSM-Monolayern etwas; Cholesterol hat den erwarteten kondensierenden Effekt. SM/POPC-Monolayer sind aufgrund der zusätzlichen Doppelbindung im POPC wesentlich weniger kompressibel als entsprechende SM/DPPC-Systeme.

Ein Vergleich der Druck-Fläche- (π - A)-Diagramme von binären DPPC/Chol- bzw. bbSM/Chol-Monolayern ([3] bzw. [109]) zeigt in beiden Fällen deutlich den kondensierenden Effekt von Cholesterol; bei Sphingomyelin ist dieser jedoch für bis zu 30 mol-% Chol stärker ausgeprägt. Bei DPPC erreicht der laterale Druck $\pi(A)$ nach einem anfänglichen Anstieg einen Plateaubereich, in dem sich die Ketten zunehmend ordnen. Erst wenn hier ein Maximum erreicht ist, steigt $\pi(A)$ weiter an. Dieser Plateaubereich verschwindet bei DPPC bei etwa 30 mol-%, wozu bei bbSM bereits < 10 mol-% Chol ausreichen.

6.3.2 Vollhydratisierte SM/DPPC(/Chol)-Systeme

Der Einfluß von Cholesterol auf die Orientierung des interlamellaren Wassers von vollhydratisierten EYSM/DPPC-Membranen geht aus Abbildung 6.21 hervor. Teil (a) zeigt $\Delta\nu(D_2O)$ für eine 2:1-molare EYSM/DPPC-Mischung im Vergleich mit entsprechenden Daten von reinem EYSM bzw. *d62*-DPPC; in Teil (b) enthält die EYSM/DPPC-Mischung zusätzlich 25 mol-% Cholesterol (bezogen auf die Gesamtmenge Lipid + Sterol). Als Vergleich dient hier reines *d62*-DPPC und eine DPPC/Chol-Mischung.

Ähnlich wie bei reinen SM-Membranen ändert Cholesterol das Hydratisierungsverhalten des SM/PC-Systems drastisch.



(a) EYSM/DPPC 2:1-molar, im Vergleich mit reinem EYSM bzw. DPPC

(b) EYSM/DPPC/Chol 2:1:1-molar, im Vergleich mit reinem DPPC und DPPC/Chol (3:1-molar)

Abbildung 6.21: EYSM/DPPC-Multischichten ohne und mit Cholesterol (Molanteile SM/PC 2:1 bzw. SM/PC/Chol 2:1:1); Einfluß von Chol auf die Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu(D_2O)$ im Vergleich mit entsprechenden Daten für reines EYSM bzw. DPPC (a) sowie für DPPC/Chol 3:1-molar (b)

Die Temperaturabhängigkeit der Quadrupolaufspaltung des Wassers ist für **EYSM/DPPC** (2:1-molar) ähnlich wie für reines EYSM (Abb. 6.21(a)), d. h. $\Delta\nu(D_2O)$ verschwindet bei Temperaturen oberhalb des Phasenübergangs. In Anwesenheit von DPPC ist die absolute Frequenzaufspaltung $\Delta\nu(D_2O)$ zwar reduziert, ihr Rückgang für $T \rightarrow T_m$ jedoch akzentuierter. Oberhalb des Phasenübergangs von reinem DPPC (Tab. 5.2, S. 54) trägt die DPPC-Komponente in dieser Mischung nicht mehr zur Orientierung des Wassers bei.

Interpretiert man beim **EYSM/DPPC/Chol**-System (Abb. 6.21(b)) die verschwindende Quadrupolaufspaltung von D_2O als den Phasenübergang, so ist dieser im gemischten System gegenüber reinem DPPC bzw. EYSM ($T_m \approx 39^\circ C$, [7]) etwas zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Oberhalb des Phasenübergangs nimmt $\Delta\nu(D_2O)$ fast linear mit der Temperatur zu, jedoch deutlich weniger als in einer 3:1-molaren DPPC/Chol-Mischung, wenn also der SM-Anteil gegen PC ausgetauscht ist.

Diskussion

Der homogene Verlauf der Quadrupolaufspaltungen des Wassers und der SM-Signale im EYSM/DPPC-System legen den Schluß nahe, daß DPPC weitgehend ideal mit EYSM mischt. Ähnliche Ergebnisse wurden für Palmitoyl-SM/DMPC-Messungen aus DSC-Untersuchungen abgeleitet [107].

Der Verlauf von $\Delta\nu(D_2O)$ als Funktion der Temperatur ist für EYSM/DPPC ähnlich wie bei reinem EYSM und ganz anders als für reines DPPC; der Rückgang von $\Delta\nu(D_2O)$ am Phasenübergang ist sogar deutlicher ausgeprägt.

Wenn sich die Wasserorientierung im gemischten System der von SM „anpaßt“, heißt dies, daß DPPC in die intensive Wasserstoffverbrückung von SM einbezogen und die Wechselwirkung insbesondere der Ester–Carbonyl mit dem Wasser stark reduziert ist. In [197] wurde für 1:1–molare SM/DPPC–Mischungen mit FTIR aus der Verschiebung der C=O–Signale der *sn*-1–Kette von DPPC gezeigt, daß eine solche Wechselwirkung möglich ist; sie konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Nach [197] bewirkt SM in DPPC–Membranen in der L_α –Phase auch eine Abnahme der Amplitude der Kettenbewegungen, ohne die Zahl der *trans/gauche*–Isomerisierungen zu reduzieren. Damit steigt die Packungsdichte der Membran und die Zugänglichkeit der PC–Carbonylgruppe für Wasser sinkt.

Cholesterol kehrt das Verhalten von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ im SM/DPPC–System um: bei niedrigen Temperaturen verschwindet $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ und steigt oberhalb des Phasenübergangs mit der Temperatur an, analog dem Verhalten von SM/Chol–Membranen (Abb. 6.15). DPPC beeinflusst also die Wechselwirkung einer SM/Chol–Membran mit dem interlamellaren Wasser kaum.

Wird der SM–Anteil durch DPPC ersetzt, so ist zwar der Verlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ qualitativ ähnlich, der absolute Wert ist jedoch sowohl im SM/Chol– als auch im SM/DPPC/Chol–System bei vergleichbarer Hydratation deutlich geringer.

Das Signal der 3- β -²HO–Gruppe von Cholesterol ist auch beim SM/DPPC/Chol–System stark verbreitert. Dies bedeutet wiederum eine relativ starre Orientierung des Hydroxyls oder der damit verbrückten Wasser.

Ausblick

Bisher wurden vor allem binäre SM/Chol– oder PC/Chol–Systeme untersucht. Das Verhalten ternärer SM/PC/Chol–Systeme ist naturgemäß komplexer; wie die obigen Gegenüberstellungen gezeigt haben, spricht jedoch vieles dafür, in SM/DPPC/Chol–Membranen den Effekt der Substitution von PC durch SM systematisch zu untersuchen.

Die hydrophobe Länge von Cholesterol beträgt 17,5 Å; dies entspricht in Bilayern aus gesättigten PCs einer mittleren Kettenlänge 17:0/17:0 [128]. Für kürzere Acylketten nimmt T_m in Anwesenheit von Chol zu, für längere nimmt es ab [128]. Damit besteht die Möglichkeit, daß das ungewöhnliche Verhalten der Wasserorientierung in SM/DPPC/Chol–Systemen die Folge eines Zusammenspiels von Kettenorientierung (von DPPC durch SM) und Cholesterol–Effekten ist. Es müßte also die Kettenlänge der PC–Komponente systematisch variiert werden, um diesen Effekt zu untersuchen.

6.3.3 Dehydratisierung von SM/DPPC(/Chol)-Systemen

Das gegensätzliche Verhalten der Wasserorientierung an EYSM/DPPC-Membranen mit und ohne Cholesterin bleibt auch bei niedrigen Hydratationen erhalten, wie aus Abbildung 6.22 hervorgeht:

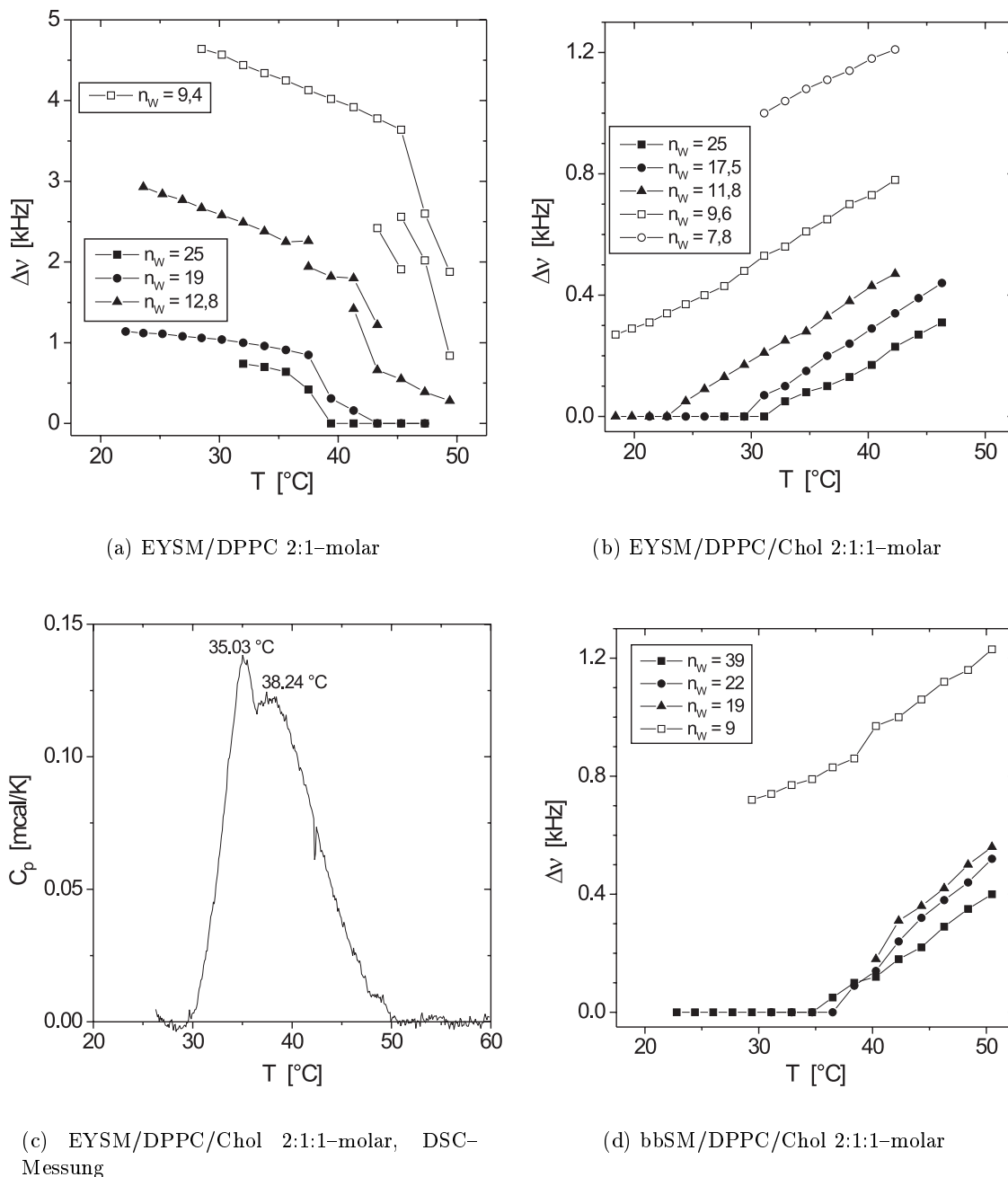


Abbildung 6.22: $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ von 2:1-molaren SM/DPPC-Systemen ohne und mit 25 mol-% Chol als Funktion von T und n_w ; (c): DSC-Messung von 2:1:1-molaren EYSM/DPPC/Chol-Schallvesikeln

Im EYSM/DPPC-System (Abb. 6.22(a)) nimmt $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für $n_w \leq 13$ mit abnehmen-

der Temperatur ähnlich wie bei reinem EYSM (Abb. 6.6) stark zu; gleichzeitig treten im Bereich des Phasenübergangs mehrere koexistierende Wassersignale auf. Der Koexistenzbereich verschiebt sich für $n_w < 10$ zu höheren Temperaturen, wie man es bei einer Erhöhung der Phasenübergangstemperatur bei niedrigen Hydratationen erwarten würde.

Abbildung 6.23 zeigt NMR-Spektren des D_2O -Signals bei $n_w = 9,4$ im Temperaturbereich, in dem mehrere koexistierende Domänen auftreten.

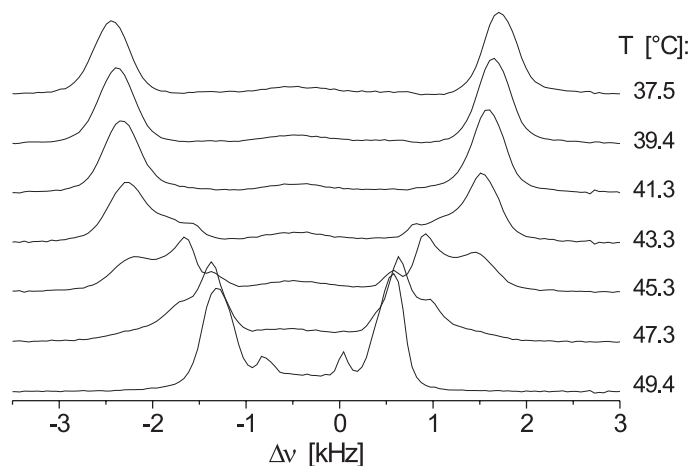


Abbildung 6.23: Domänenbildung im EYSM/DPPC-System (2:1-molar) bei $n_w = 9,4$

In Anwesenheit von Cholesterol (Abb. 6.22(b)) steigt $\Delta\nu(D_2O)$ im EYSM/DPPC-System unabhängig von n_w annähernd linear mit der Temperatur, wobei die Steigung der Kurven nahezu konstant ist. In bbSM/DPPC/Chol-Membranen der gleichen molaren Zusammensetzung (2:1:1) nimmt $\Delta\nu(D_2O)$ ebenfalls fast linear mit der Temperatur zu, allerdings ändert sich für $n_w > 19$ nur die Steigung der Kurve.

Eine lineare Näherung des Anstiegs von $\Delta\nu(D_2O)$ vs. T im EYSM/DPPC/Chol-System ergibt für alle untersuchten Hydratationen eine mittlere Steigung $d\Delta\nu(D_2O)/dT = 22,4 \pm 2,1$ Hz/K (Abb. 6.24(a)). Die Temperatur T^* , bei der $\Delta\nu(D_2O)$ oder eine lineare Extrapolation davon verschwindet, verschiebt sich mit abnehmendem n_w zu *niedrigeren* Temperaturen (Abb. 6.24(b)).

Eine genauere Betrachtung von Abbildung 6.22(b) zeigt, daß der Anstieg von $\Delta\nu(D_2O)$ nicht exakt linear ist, sondern einen kleinen „*dip*“ aufweist, dessen Position in Abb. 6.24(b) als T^{**} eingetragen wurde.

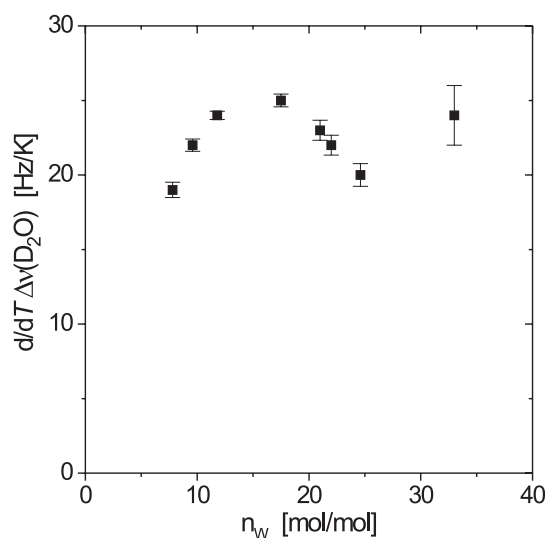
Estep et al. [51] untersuchten mit DSC (vollhydratisierte) Palmitoyl-SM/Chol Systeme⁹. Die DSC-Kurven zeigten dabei eine breite Komponente bei ca. 42 °C und eine scharfe Komponente, deren Maximum sich mit zunehmendem Chol-Anteil deutlich zu tieferen Temperaturen verschob. Die zugehörige Enthalpie ging dabei von ca. 6,8 kcal/mol bei 0 % Cholesterol auf 0 bei etwa 25 mol-% zurück. Die Ergebnisse werden derart interpretiert, daß in diesen Mischungen eine Phasentrennung in SM- und Chol-reiche Domänen stattfindet, wobei der scharfe DSC-Peak der SM-reichen Phase zugeordnet wird.

Abbildung 6.22(c) zeigt eine DSC-Messung von EYSM/DPPC/Chol-Vesikeln; im Rahmen der Meßgenauigkeit¹⁰ stimmen die Maxima der Wärmekapazität C_p mit den Temperaturen

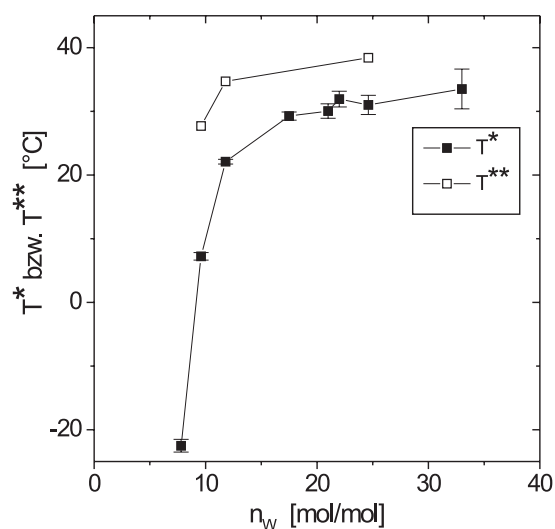
⁹ EYSM besteht je nach Präparat zu 68–84 % aus Palmitoyl-SM, siehe Tabelle 1.2, S. 11.

¹⁰ Die absoluten Wärmen sind bei 25 mol-% Cholesterol extrem niedrig; damit kann die Subtraktion der Basislinie die Peaks der DSC-Kurve verschieben.

T^* und T^{**} in Abb. 6.24(b) überein.



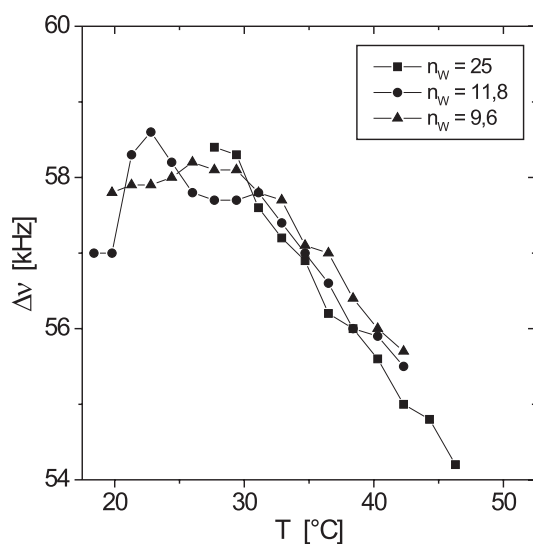
(a) Inkrement $d\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})/dT$ als Funktion von n_w (Fehlerbalken: Fitfehler)



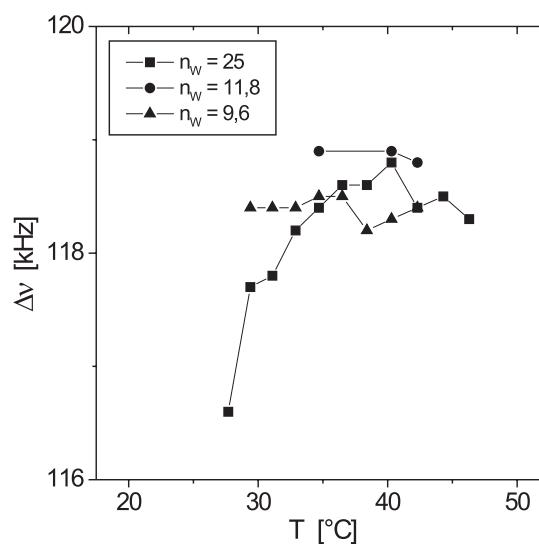
(b) Nulldurchgang T^* von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ vs. T als Funktion von n_w ; Erklärung von T^{**} im Text

Abbildung 6.24: Lineare Näherung der Quadrupolaufspaltung von D_2O in 2:1:1-molaren EYSM/DPPC/Chol-Membranen

Abbildung 6.25 zeigt die OD- und ND-Signale des Sphingomyelin in der EYSM/DPPC/Chol-Mischung.



(a) OD-Gruppe



(b) ND-Gruppe

Abbildung 6.25: EYSM/DPPC/Chol 2:1:1-molar; Quadrupolaufspaltungen der SM-Signale

Der absolute Wert der Quadrupolaufspaltung ändert sich nur wenig; von Interesse ist besonders die Temperatur, unterhalb der die Signale nicht mehr aufgelöst werden können. Die Temperatur wurde wie in Abb. 6.22(b) zwischen 18 und ca. 45 °C variiert. Man erkennt, daß die ND- und OD-Signale bei Temperaturen ähnlich T^* „verschwinden“.

Diskussion

Die Beobachtung, daß DPPC die Hydratisierungseigenschaften sowohl von SM- als auch von SM/Chol-Systemen (vgl. Abb. 6.6 bzw. 6.17(a)) nicht wesentlich verändert, gilt auch bei niedrigen Hydratationen.

Cholesterol kehrt den Verlauf der Quadrupolaufspaltung des interlamellaren D_2O von SM/DPPC-Systemen um: anstatt in der L_α -Phase verschwindet $\Delta\nu(D_2O)$ im SM/DPPC/Chol-System im Bereich unterhalb des Phasenübergangs. Es erscheint gerechtfertigt, die aus der Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu(D_2O)$ abgeleiteten Größen T^* und T^{**} (Abb. 6.24(b)) als Phasenübergangstemperaturen $T_{m,1}$ und $T_{m,2}$ zu interpretieren. Ähnlich wie in Palmitoyl-SM/Chol-Mischungen [51] nimmt $T_{m,1}$ für einen Teil der Membran bei Dehydratisierung stark ab. Aus Abb. 6.25 geht hervor, daß es sich dabei vermutlich um SM-angereicherte Domänen handelt – analog der Diskussion in [51], die auf Seite 101 kurz skizziert wurde. Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, kann der zweite Peak in Abb. 6.22(c) DPPC-reichen Domänen zugeordnet werden. Im Bereich zwischen $T_{m,1}$ und $T_{m,2}$ koexistieren dann flüssigkristalline SM-reiche Domänen mit gelförmigen DPPC-reichen Domänen; über die Anreicherung von Cholesterol in den verschiedenen Subphasen kann keine Aussage getroffen werden.

Es kann mit dieser Interpretation nicht geklärt werden, wieso ein derartiger Koexistenzbereich (fast) keinen Einfluß auf das Temperaturverhalten von $\Delta\nu(D_2O)$ zeigt. Der in erster Näherung lineare Anstieg der Quadrupolaufspaltung mit der Temperatur könnte durch eine thermische Ausdehnung der Membran zustande kommen. Dafür existieren für das untersuchte System keine Daten.

6.3.4 Kopfgruppendynamik von DPPC

Es ist bekannt, daß sich die Orientierung der PC-Kopfgruppe gegenüber der Bilayerebene bei Dehydratisierung [9,193] oder in Anwesenheit von geladenen Lipiden [117,171] ändert. Ist die PC-Komponente selektiv an den α - und β -Methylengruppen deuteriert ($d4$ -PC; zur Nomenklatur der Segmente s. Abb. 1.6, S. 9), so beobachtet man im zweiten Fall über einen weiten Ladungsbereich einen linearen Zusammenhang der Quadrupolaufspaltungen $\Delta\nu(\alpha)$ und $\Delta\nu(\beta)$ in der Form [9]:

$$\Delta\nu(\beta) = m \cdot \Delta\nu(\alpha) + \text{const.} \quad \text{mit} \quad \begin{cases} m = -0,5 & \text{für positive Oberflächenladung} \\ m = -1,0 & \text{für negative Oberflächenladung} \end{cases} \quad (6.11)$$

Beim Dehydratisierung des zwitterionischen POPC ändern sich $\Delta\nu_\alpha$ und $\Delta\nu_\beta$ im Verhältnis $m = -0,76$, also zwischen den Grenzwerten positiver und negativer Oberflächenladung [9].

Abbildung 6.26 zeigt ein typisches NMR-Spektrum einer 2:1:1-molaren EY5M/ $d4$ -DPPC/Chol-Mischung in der L_α -Phase, wobei die Signale aufgrund von Literaturwerten zugeordnet wurden. Die Signale der α -Methylengruppe sind über einen weiten Temperaturbereich in 2 Subspektren aufgespalten.

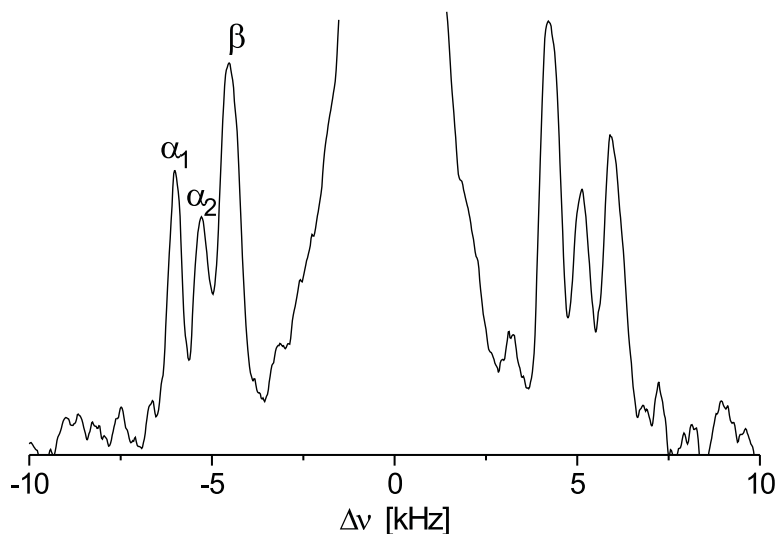
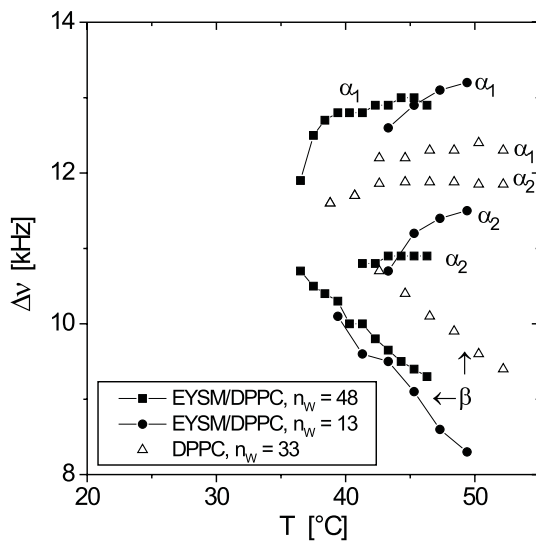
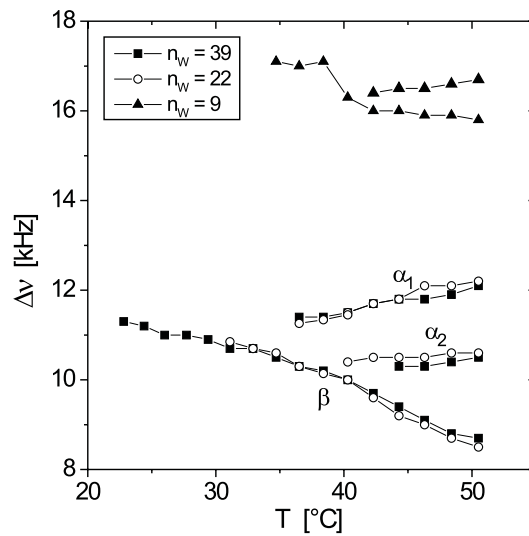
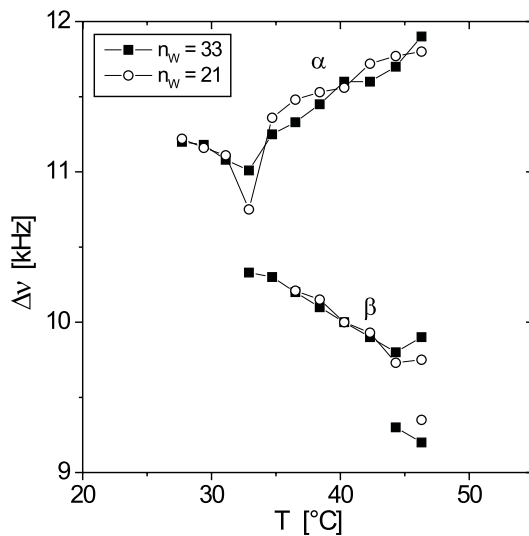
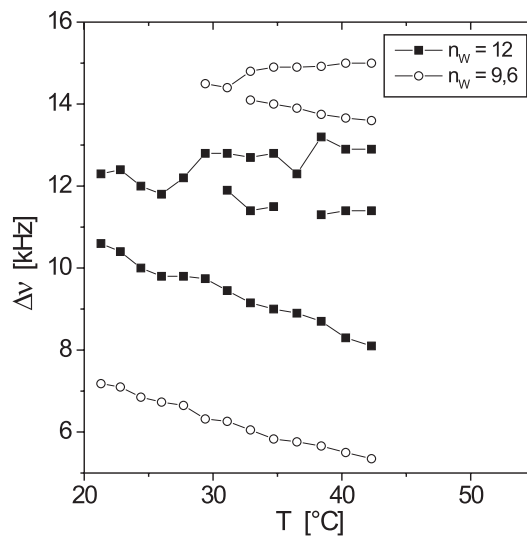


Abbildung 6.26: NMR-Signale der α/β -Segmente von DPPC in einer vollhydratisierten bbSM/ $d4$ -DPPC/Chol-Mischung (2:1:1-molar; $n_w = 39$, $T = 48,4^\circ\text{C}$)

In Abbildung 6.27 ist für 2:1-molare SM/DPPC-Mischungen ohne und mit Chol der Temperaturverlauf von $\Delta\nu(\alpha)$ und $\Delta\nu(\beta)$ für verschiedene Hydratationen im Vergleich mit reinem $d4$ -DPPC (in (a)) zusammengefaßt. Bei allen gemessenen Systemen sind die α -Deuteronen oberhalb des Phasenübergangs inäquivalent; bei Annäherung an T_m verschmelzen die 3 Signale. Für Hydratationen über $n_w \approx 12$ sind $\Delta\nu(\alpha)$ und $\Delta\nu(\beta)$ fast unabhängig von der Hydratation; unterhalb dieser Grenze wird das Verhalten relativ komplex. Die Subspektren koaleszieren dann bei höheren Temperaturen, entsprechend einem Anstieg der Phasenübergangstemperatur von reinem Sphingomyelin.

(a) EYSM/*d4*-DPPC 2:1-molar im Vergleich mit reinem *d4*-DPPC(b) bbSM/*d4*-DPPC/Chol 2:1:1-molar(c) EYSM/*d4*-DPPC/Chol 2:1:1-molar bei hoher Hydratation(d) EYSM/*d4*-DPPC/Chol 2:1:1-molar bei niedriger HydratationAbbildung 6.27: Quadrupolaufspaltung der α - und β -Methylengruppen von DPPC in Anwesenheit von Sphingomyelin (bbSM oder EYSM) und Cholesterol

Trägt man $\Delta\nu(\beta)$ über $\Delta\nu(\alpha)$ auf („ α/β -Plot“), so erhält man annähernd einen linearen Zusammenhang (Abb. 6.28). Die Meßpunkte sind indes nicht ausreichend, um die Steigung dieser Geraden zuverlässig zu bestimmen. Der lineare Zusammenhang versagt für Temperaturen unmittelbar über T_m (Datenpunkte am rechten Rand der Abbildungen).

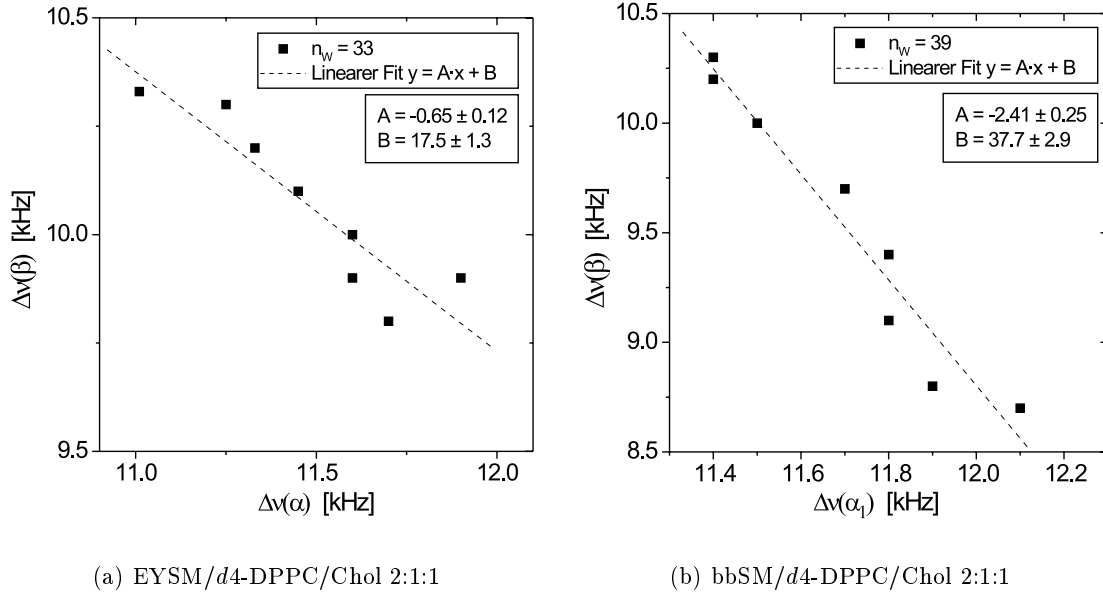


Abbildung 6.28: α/β -Verhalten der Kopfgruppenmethylene von $d4$ -DPPC bei voller Hydratisierung: $\Delta\nu(\beta)$ als Funktion von $\Delta\nu(\alpha)$ bzw. $\Delta\nu(\alpha_1)$

Diskussion

Anders als bei reinem DPPC und der EYSM/DPPC-Mischung ändern sich sowohl bei EYSM/DPPC/Chol als auch bei bbSM/DPPC/Chol die α - und β -Splittings von $d4$ -DPPC in der flüssigkristallinen Phase annähernd linear und gegenläufig mit der Temperatur. Daß der in früheren Arbeiten [9, 117, 171, 193] eingeführte α/β -Plot auch in den ternären SM/PC/Chol-Systemen angewandt werden kann, ist *a priori* nicht zu erwarten. In den zitierten Arbeiten ist die gegenläufige Änderung von $\Delta\nu(\alpha)$ und $\Delta\nu(\beta)$ das Resultat einer veränderten Elektrostatik im Kopfgruppenbereich; dies kann direkt durch das Einbringen geladener Lipide oder indirekt durch Dehydratisierung erfolgen. Letztere führt über die Erhöhung der mittleren Wasserorientierung vermutlich zu einem größeren Dipolpotential über der Membran.

Die annähernd lineare Änderung von $\Delta\nu(\beta)$ vs. $\Delta\nu(\alpha)$ bei Variation der Temperatur kann, ebenso wie der lineare Verlauf von $\Delta\nu(D_2O)$ in diesen Membranen (Abb. 6.22(b) und (d)), durch eine thermische Ausdehnung zustandekommen.

Die Steigung m des α/β -Plots ist für die beiden ternären Mischungen jeweils negativ, für bbSM als SM-Komponente allerdings mit einem deutlich höheren Betrag. Nur für EYSM ist $m \approx -0,65$ vergleichbar mit Werten für reine PC-Membranen ($m \approx -0,76$ für POPC [9]).

Eine Inäquivalenz der beiden Deuteronen an der α -Position wurde zwar beobachtet, beträgt aber bei DPPC-Vesikeln nur ca. 300 Hz [25] und bei den vorliegenden orientierten

DPPC-Membranen im Mittel 420 Hz. Aus der deutlich höheren Linienbreite der α -Signale bei reinem DPPC (Daten nicht gezeigt) kann geschlossen werden, daß dieses Segment durch die Nähe zur Phosphatgruppe weniger Rotationsfreiheit besitzt und deshalb die Linien inäquivalent sind.

In Anwesenheit von Sphingomyelin ist die Inäquivalenz der α -Signale deutlich höher, beispielsweise 1,5 kHz im bbSM/DPPC/Chol-System bei $T = 44,3^\circ\text{C}$ und $n_w = 39$.

Für das unterschiedliche Verhalten können mehrere Effekte verantwortlich sein: Zum einen können Wasserstoffbrücken zwischen SM und der Phosphatgruppe des PC diese und das nachfolgende α -Methylen in ihrer Bewegungsfreiheit einschränken. Dies entspräche der Beobachtung, daß die Ordnung der Wassermoleküle in SM/DPPC-Membranen der von SM folgt, mithin also die Wechselwirkung der PC-Komponente mit dem Wasser eingeschränkt ist.

Ferner zeigt ein Vergleich der Infrarot-Banden von SM und SM/DPPC-Mischungen [197], daß sich in der Mischung das Glycerol-Rückgrat von DPPC etwas aufstellt, d. h. das $sn-1$ -Segment etwas tiefer in den hydrophoben Bereich sinkt, während das $sn-2$ -Segment mehr in einen hydrophileren Bereich gelangt. Diese Umlagerung könnte sich in den Kopfgruppenbereich – und dort vor allem in den ersten Segmenten – fortsetzen.

Die Aufspaltung der α -Deuteronen kann auch dadurch zustande kommen, daß sich die DPPC-Kopfgruppen in verschiedenen Umgebungen befinden, wenn ein Teil der Moleküle enger mit SM oder Chol assoziiert ist.

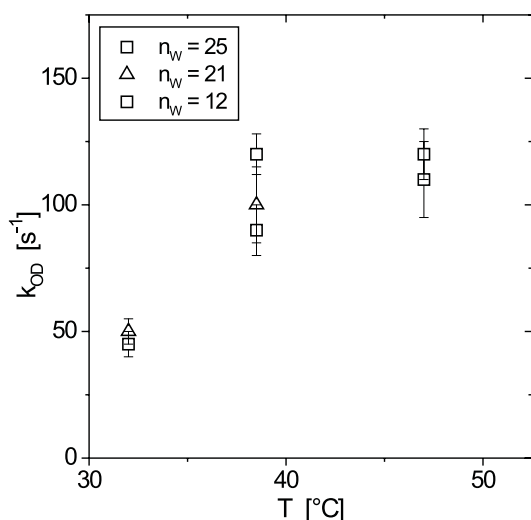
Die Aufspaltung der α -Deuteronen verschwindet etwa bei der oben definierten Temperatur T^{**} bzw. $T_{m,2}$, während α - und β -Signal zwischen T^* und T^{**} bzw. $T_{m,1}$ und $T_{m,2}$ koaleszieren.

Bei der Dehydratisierung von reinen POPC-Membranen ist der Abstand $\Delta\nu(\alpha) - \Delta\nu(\beta)$ für $n_w \geq 15$ in etwa konstant und nimmt darunter stark zu [9].

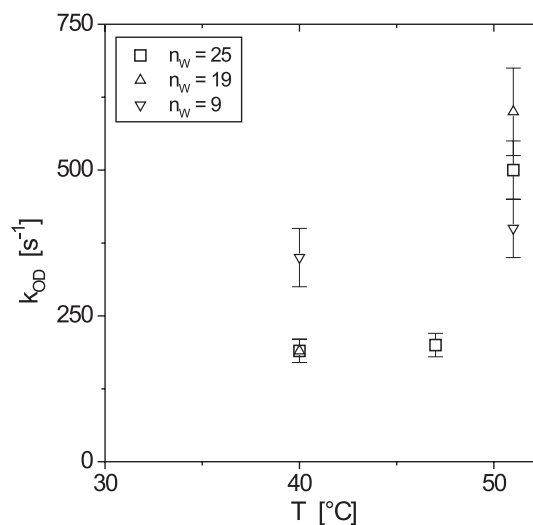
Im vorliegenden Fall verschwindet $\Delta\nu(\alpha) - \Delta\nu(\beta)$ in der L_α -Phase bei Annäherung an den Phasenübergang. Gemeinsam mit der Beobachtung verschwindender Wasserorientierung bei SM- und SM/DPPC-Membranen in diesem Temperaturbereich ist dies ein weiteres Indiz für die geringere Hydrophilie von SM-Oberflächen.

6.3.5 Austauschraten labiler Deuteronen

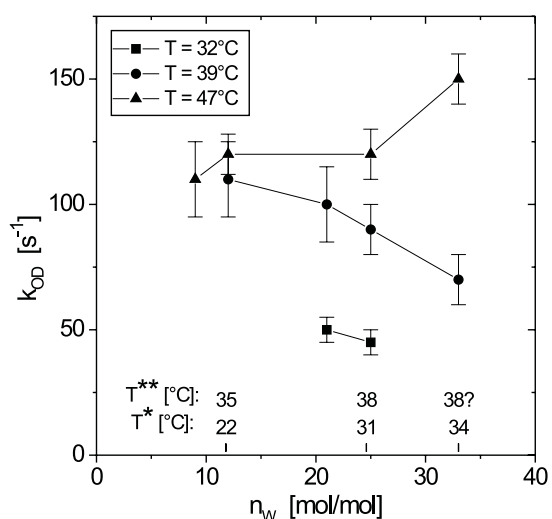
Für die ternären Mischungen SM/DPPC/Chol im Molverhältnis 2:1:1 wurden die Austauschraten der labilen Deuteronen der Sphingomyelin-Komponente bestimmt. Die Gegenüberstellung in Abbildung 6.29 zeigt extreme Unterschiede zwischen EYSM und bbSM: k_{OD} ist für EYSM bei allen Temperaturen kleiner als 150 s^{-1} , auch bei hohen Hydratationen. Für $T = 39^\circ\text{C}$, also im Bereich des Phasenübergangs von reinem EYSM, geht dieser Wert mit steigender Temperatur weiter zurück.



(a) EYSM/DPPC/Chol; k_{OD} als Funktion der Temperatur



(b) bbSM/DPPC/Chol; k_{OD} als Funktion der Temperatur



(c) EYSM/DPPC/Chol; k_{OD} als Funktion der Hydratation

Abbildung 6.29: Deuteron-Austauschraten k_{OD} der SM-Hydroxylgruppe in 2:1:1-molaren SM/DPPC/Chol-Mischungen

Ein Vergleich mit den Austauschraten von reinem EYSM und bbSM (Abb. 6.9 und 6.10, S. 91) zeigt, daß die Raten in den SM/DPPC/Chol-Membranen durchwegs niedriger sind als bei den reinen Lipiden. Ebenso liegen sie für bbSM deutlich unter den für bbSM/Chol bestimmten Werten (Abb. 6.15, S. 98).

Diskussion

Prinzipiell ist es problematisch, für das vorliegende ternäre System mit 2 austauschenden Hydroxylgruppen (in SM und Chol) den Austauschprozeß als Reaktion 1. Ordnung zu betrachten, wie es die Grundannahme bei der Herleitung der Austauschgleichungen in Kapitel 4 war. Eine separate Betrachtung der beiden Beiträge scheint nur dann möglich, wenn sie mit deutlich unterschiedlichen Geschwindigkeiten ablaufen.

Ebenso wie bei den vorhergehenden Messungen an SM/Chol-Systemen ist auch hier das OD-Signal von Chol nicht im ^2H -Spektrum nachweisbar.

Wenngleich die absoluten Werte der Austauschraten eventuell durch Prozesse höherer Ordnung verändert werden, so ist doch ein relativer Vergleich zwischen bbSM und EYSM möglich, da die molaren Anteile an DPPC und Chol in Abb. 6.29(a) bzw. 6.29(b) gleich sind.

Die niedrigen Austauschraten im EYSM/DPPC/Chol-System können mit der dichteren Packung der Membran aufgrund der im Vergleich mit bbSM homogeneren und gesättigteren Ketten (Tab. 1.2) erklärt werden.

Die Zunahme von k_{OD} mit sinkender Hydratation im EYSM/DPPC/Chol-System (Abb. 6.29(c)) bei $T = 39^\circ\text{C}$ deutet ebenso wie der Verlauf der D_2O -Quadrupolaufspaltung in diesem System (Abb. 6.22(b)) darauf hin, daß in dieser Mischung zumindest für einen Teil der Lipide die Phasenübergangstemperatur mit abnehmendem n_w sinkt.

6.4 SM/POPC-Membranen

In früheren Arbeiten wurde als Beispiel für die Modifikation von SM-Membranen durch PC vor allem DPPC untersucht (z. B. [123, 124, 197]). Physiologisch relevanter ist es jedoch, ungesättigte Phosphatidylcholine zu betrachten. Hierbei ist POPC ein gutes Modellsystem, da die Länge seiner Acylketten (C16:0/18:1) etwa in der Mitte der natürlichen Kettenverteilung liegt.

Die (wenigen) Literaturdaten für POPC/SM-Systeme sollen kurz vorgestellt werden:

- Molare SM/POPC-Verhältnisse von 2:1 bis 4:1 sind typisch für das *Exoleaftet* der Bürstensaummembran der Nierenrinde [130]. Monolayer dieser Zusammensetzung zeigen auf Glimmeroberflächen [130] sowie auf silanisiertem Glas [47] bei Raumtemperatur eine makroskopische Phasentrennung in PC-reiche *liquid expanded* und SM-reiche *liquid condensed* Phasen. Cholesterin assoziiert vor allem mit den SM-reichen Domänen und verstärkt die laterale Trennung von POPC und SM.
- Isotherme Kompressionskurven bei Raumtemperatur sind für POPC/Chol- und SM/Chol-Monolayer fast identisch, wenn man die größere Kopfgruppenfläche von POPC berücksichtigt [109].
- In ternären Monolayern aus PC (POPC oder DPPC), Cholesterin und SM (N-oleoyl-Sphingomyelin oder N-palmitoyl-Sphingomyelin) ist die Wechselwirkung zwischen Sterol und Lipid für die POPC-enthaltenden Systeme schwächer als für DPPC [123]. Der Unterschied zwischen gesättigtem und ungesättigtem PC hängt dabei nicht vom Mischungsverhältnis PC/SM, sondern vom Verhältnis SM/Chol ab.
- Untracht und Shipley [195] erstellten aus DSC- und Röntgenmessungen ein **ternäres Phasendiagramm für bbSM/EYPC/H₂O** im Temperaturbereich 10–44 °C. Für bestimmte Zusammensetzungen und/oder Temperaturen treten dabei laterale Phasentrennungen auf:
 - Bei mehr als 33 mol-% Sphingomyelin separiert bei Abkühlung auf 20 °C zunehmend eine lamellare SM-reiche Gelphase.
 - Die Phasenübergangstemperatur T_m steigt in allen untersuchten Systemen (SM/PC 3:1-, 2:1-, 1:1-, 1:2-molar) unterhalb von ≈ 20 Gewichts-% Wasser ($n_w \approx 12$) an.

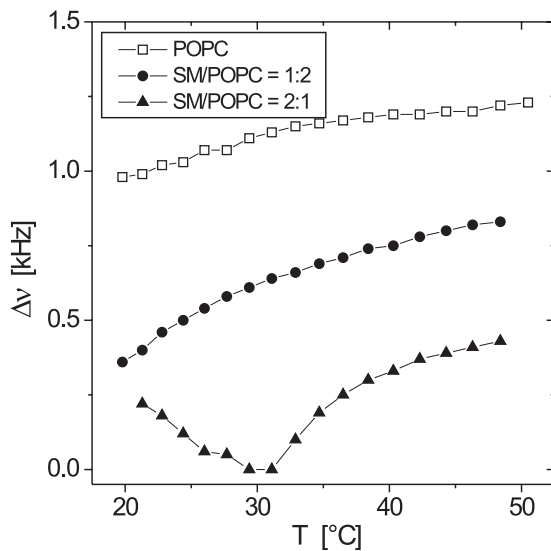
In Tabelle 6.2 ist die Zusammensetzung der im folgenden untersuchten SM/POPC(/Chol)-Modellmembranen aufgelistet:

Lipidanteil in mol-%		
bbSM	d31-POPC	Chol
–	100	–
67	33	–
33	67	–
50	25	25

Tabelle 6.2: Untersuchte Sphingomyelin/POPC-Membranen

6.4.1 Vollhydratisierte Membranen

Die Temperaturabhängigkeit der Quadrupolaufspaltung für das interlamellare D_2O , die terminale Methylgruppe und den Plateaubereich der Methylensignale der $d_{31}(sn-1)$ -Kette von POPC in SM-Membranen sind in Abbildung 6.30 für $n_w = 25-26$ zusammengefasst. Der SM-Gehalt der Mischungen wurde dabei von 0–67 mol-% variiert.



(a) interlamellares Wasser

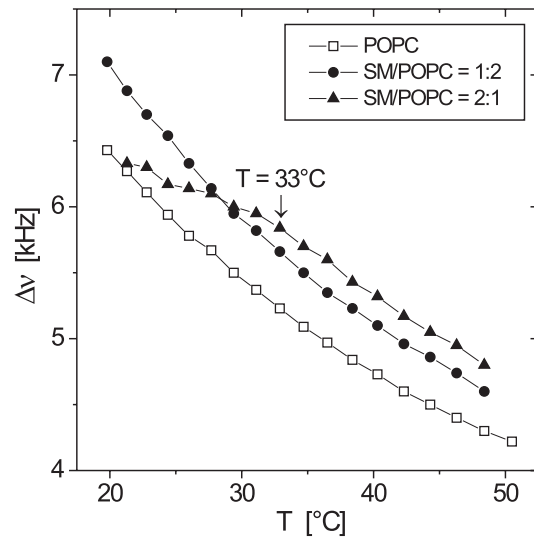
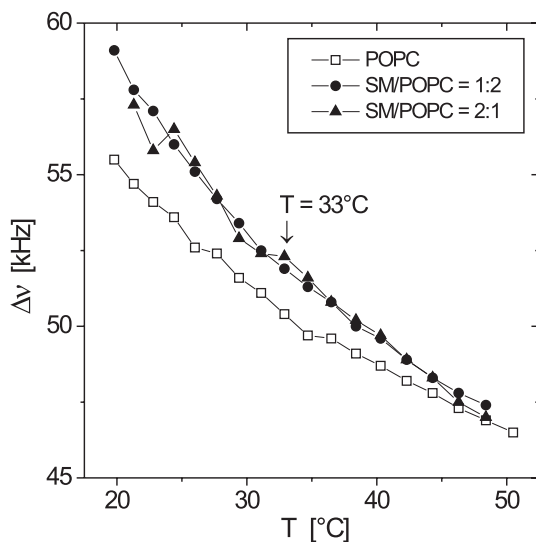
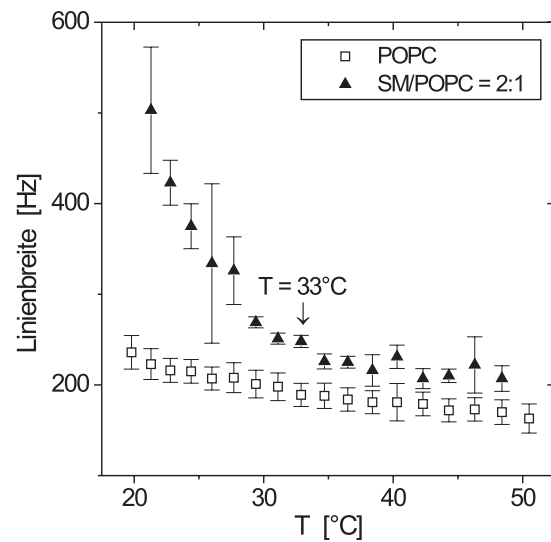
(b) 2H -Signale der terminalen Methylgruppe von POPC(c) 2H -Signale des Plateaubereichs von POPC(d) Mittlere Linienbreite der 2H -Signale der terminalen Methylgruppe von POPC

Abbildung 6.30: Vergleich der 2H -NMR Aufspaltungen von reinem d_{31} -POPC mit bbSM/ d_{31} -POPC (2:1- und 1:2-molar); n_w jeweils 25–26

Verhalten des interlamellaren Wassers

Aus Abbildung 6.30(a) geht hervor, daß die Quadrupolaufspaltung des interlamellaren Wassers für hohe Temperaturen ($T > 30$ °C) proportional zum SM-Anteil abnimmt.

Wie anhand von Abbildung 5.3 (S. 56) diskutiert wurde, zeigt bei PC-Membranen $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ als Funktion der reduzierten Temperatur T_{red} ein einheitliches Verhalten. Ein verallgemeinerter Ansatz, der anstelle der Phasenübergangstemperatur T_m eine sogenannte kritische Temperatur T^* sowie einen kritischen Exponenten n verwendet, lautet [71]:

$$\Delta\nu(\text{D}_2\text{O}) \propto \left| \frac{T}{T^*} - 1 \right|^n = A \cdot |T - T^*|^n \quad (6.12)$$

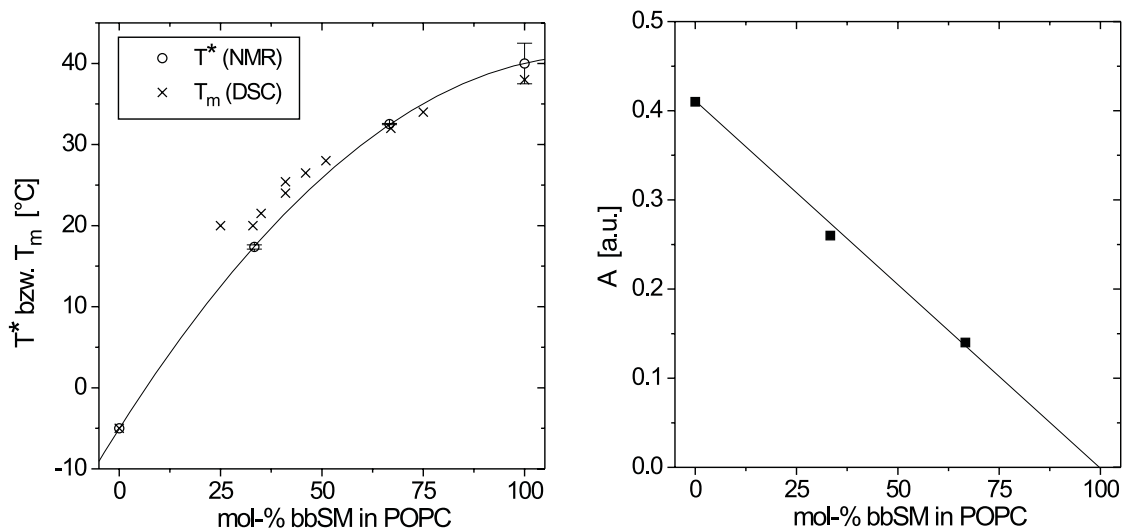
Ein Fit von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ aus Abb. 6.30(a) nach Gleichung 6.12 mit den Fitparametern T^* , n und A und den Annahmen, daß bei reinem POPC $T_m = T^* \approx -5$ °C und $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei T_m verschwindet, ergibt folgende kritische Größen:

Membran	T^* bzw. T_m [°C]	n	A
POPC	-5	$0,28 \pm 0,02$	0,41
bbSM/POPC 1:2	$17,4 \pm 0,3$	$0,34 \pm 0,01$	0,26
bbSM/POPC 2:1	$32,5 \pm 0,1$	$0,39 \pm 0,02$	0,14
bbSM	$40 \pm 2,5$	-	(≈ 0)

Tabelle 6.3: Ergebnisse für den Fit von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ vs. T in bbSM/POPC-Mischungen gemäß Gleichung 6.12; für POPC und bbSM wurde $T^* = T_m$ angenommen (Werte für T_m aus [77] bzw. [45]); n_w jeweils 25–26

Der Vergleich von T^* mit DSC-Daten für den Phasenübergang von bbSM/EYPC-Vesikeln [195] in Abbildung 6.31(a) zeigt, daß diese Größe sehr gut mit T_m übereinstimmt. Die geringfügigen Unterschiede zwischen T^* und T_m ergeben sich aus der Heterogenität von EYPC im Vergleich zu POPC sowie aus einer anderen Zusammensetzung der Fettsäureketten des hier verwendeten bbSM. Die in [195] aufgelistete Verteilung weicht vor allem in den Anteilen an C18:0 (36,1 %) und C24:1 (35,0 %) von den Werten in Tabelle 1.2 (S. 11) ab.

Der Vorfaktor A in Gleichung 6.12 ist *a priori* nur eine Normierungsgröße für den Wert von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in der L_α -Phase. Die Extrapolation von A auf eine reine SM-Membran (Abb. 6.31(b)) suggeriert, daß A bei 100 % SM verschwindet. Wie unter anderem in Abb. 6.2 gezeigt wurde, geht $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in der flüssigkristallinen Phase von reinen SM-Systemen tatsächlich fast auf 0 zurück.



(a) Fitparameter T^* aus NMR-Messungen im Vergleich mit T_m aus DSC-Daten aus [195]

(b) Vorfaktor A der Quadrupolaufspaltung

Abbildung 6.31: Fitparameter T^* und A für vollhydratisierte bbSM/POPC-Membranen als Funktion des SM-Anteils. T^* wurde mit DSC-Daten für T_m (aus [195]) verglichen; die durchgezogene Linie ist eine quadratische Näherung des Verlaufs von T^*

Acylkettenbereich

Die terminale Methylgruppe der $sn-1$ Kette von POPC, die sensitiv für das Zentrum des hydrophoben Bereichs ist, zeigt für SM/POPC-Membranen eine höhere Ordnung als bei reinem POPC (Abb. 6.30(b)); diese steigt mit zunehmendem SM-Anteil. In der Membran mit 67 mol-% SM tritt bei $T < 33$ °C ein „Knick“ im Verlauf der Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu$ auf – d. h. in dem Bereich, in dem die Wasserordnung in diesem System minimal ist und die Membran vermutlich in eine Gelphase übergeht. Die Linienbreite der Methylsignale steigt in diesem Bereich stark an (Abb. 6.30(d)).

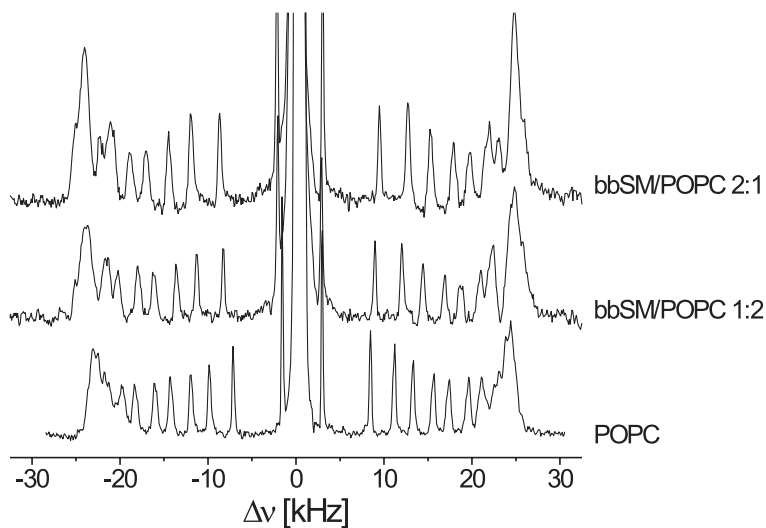
Die Ordnungsparameter des Plateaubereichs, also der Methylengruppen in der Nähe des Interface-Bereichs, ändern sich in Anwesenheit von SM für hohe Temperaturen kaum, steigen jedoch bei niedrigen Temperaturen gegenüber reinem POPC stark an. Zwischen 33 und 67 mol-% SM scheint der Sphingomyelin-Anteil dabei nur eine geringe Rolle zu spielen.

Der Anstieg der Ordnung der $sn-1$ -Kette von POPC betrifft alle Kettensegmente. In Abbildung 6.32 ist das **Ordnungsparameterprofil** der $sn-1$ -Kette von POPC für 0, 33 und 67 mol-% Sphingomyelin ($n_w = 26-27$, $T = 42, 4$ °C) aufgetragen. Die SM-Signale liegen außerhalb des gezeigten Frequenzbereichs bzw. im Plateaubereich von POPC.

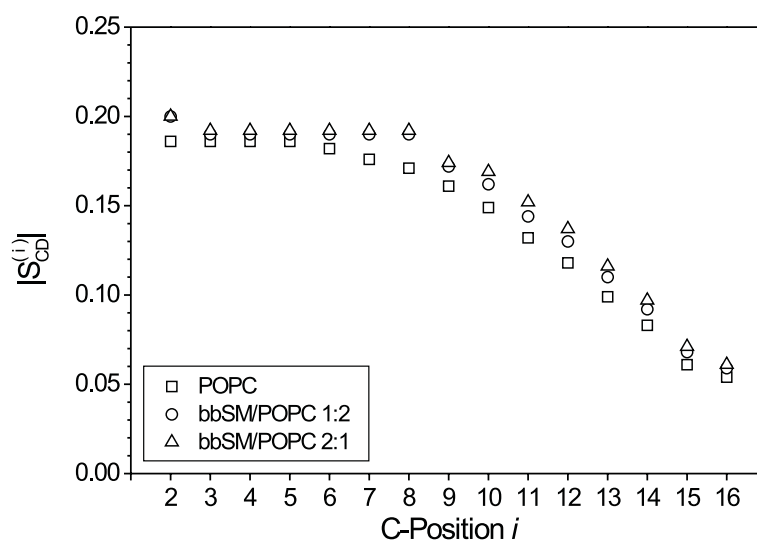
Die mittlere Länge L_C der $sn-1$ -Kette von POPC beträgt nach Gleichung 3.29 (S. 44) 12,23 Å für reines POPC, 12,40 Å bei 33 mol-% bbSM und 12,47 Å für 67 mol-% bbSM.

Abbildung 6.33 zeigt NMR-Spektren und Ordnungsparameterprofil für dieselben Mischungen bei $T = 21,3$ °C. Bei 67 mol-% bbSM befindet sich die PC-Komponente bereits in einer **gelähnlichen Phase**. Gelähnlich insofern, als die Signale wie in einer Gelphase stark

verbreitern, aber im Unterschied zu reinem POPC nicht eine deutlich höheren Frequenz-
aufspaltung zeigen (siehe Abb. 5.12(d), S. 65). Entsprechend bleiben auch die Werte für
 L_C in einem engen Bereich: 12,87 Å, 13,1 Å und $\approx 13,2$ Å für 0/33/67 mol-% bbSM.

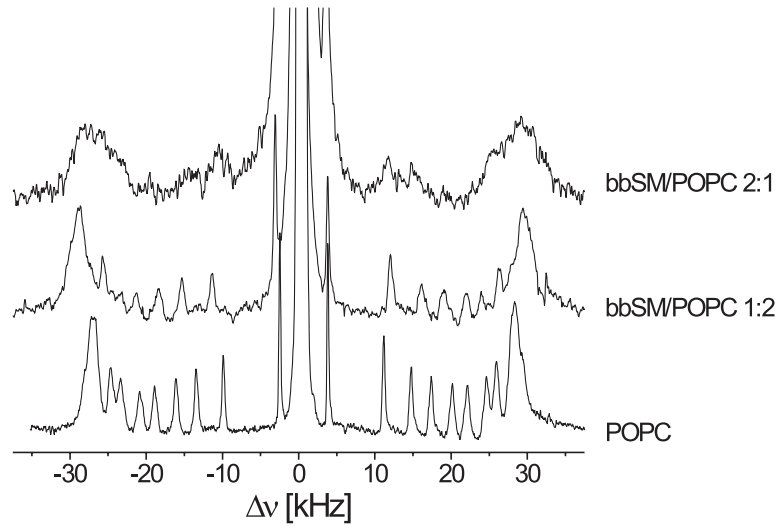


(a) NMR-Spektren

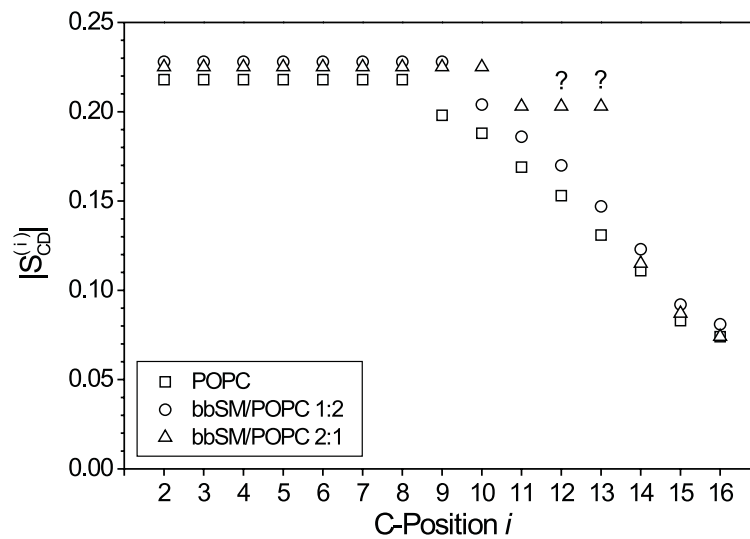


(b) Ordnungsparameterprofil

Abbildung 6.32: Ordnungsparameter der sn -1-Kette von POPC als Funktion des bbSM-Anteils bei $n_w = 26$ – 27 und $T = 42, 4 \pm 0, 5$ °C



(a) NMR-Spektren



(b) Ordnungsparameterprofil

Abbildung 6.33: Ordnungsparameter der sn -1-Kette von POPC als Funktion des bbSM-Anteils bei $n_w = 26$ – 27 und $T = 21, 3 \pm 0, 5$ °C

Um den differentiellen Effekt von SM auf die Kettenordnung von POPC zu demonstrieren, wurden die segmentellen Ordnungsparameter $|S_{CD}^{(i)}|$ der bbSM/POPC-Systeme auf die entsprechenden Werte der reinen POPC-Membran, $|S_{CD}^{(i)}|_{\text{POPC}}$, normiert. Abbildung 6.34 zeigt die normierten Ordnungsparameter bei 42,4 °C (offene Symbole) sowie für die 1:2-molare SM/POPC-Mischung bei 21,3 °C (geschlossene Symbole). Einige Werte (Symbole in Klammern) weichen vom mittleren Verlauf ab. Sie beziehen sich auf Signale im Übergang zum Plateaubereich, wo eine eindeutige Zuordnung der Kettensegmente schwierig ist.

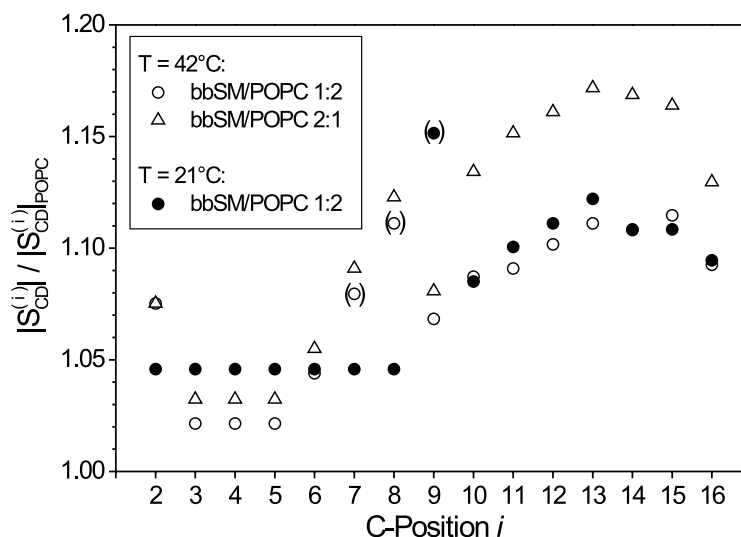


Abbildung 6.34: Ordnungsparameter der bbSM/POPC-Systeme normiert auf den jeweiligen Wert von reinem POPC. Offene Symbole: bei 42,4 °C (Abb. 6.32); geschlossene Symbole: bei 21,3 °C (Abb. 6.33). Im Übergang zum Plateaubereich ist die Zuordnung der Segmente nicht eindeutig und führt deshalb zu einem hohen relativen Fehler (umklammerte Symbole).

Diskussion

Interlamellares Wasser: Anders als bei DPPC folgt in SM/POPC-Mischungen die Quadrupolaufspaltung des Wassers qualitativ nicht dem Verhalten der reinen SM-Komponente, sondern dem von POPC. Dies ist ein Hinweis auf eine deutlich geringere Wechselwirkung der Lipide, wie sie auch aus Monolayer-Messungen (Abb. 6.20(b), S. 104) erwartet wird: aufgrund der ungesättigten Oleoyl-Kette des POPC sind SM/POPC-Membranen lockerer gepackt als vergleichbare SM/DPPC-Membranen.

Die „Hydrophobizität“ der Sphingomyelin-Oberfläche äußert sich in einem geringeren Absolutwert von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in Anwesenheit von SM. Das interlamellare Wasser wechselwirkt vor allem mit der POPC-Komponente; die beobachtete Quadrupolaufspaltung stellt in der flüssigkristallinen Phase eine Mittelung von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})_{\text{POPC}}$ und $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})_{\text{SM}} \approx 0$ dar. Dies zeigt sich deutlich bei einer Näherung von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ nach Gleichung 6.12, in der der Vorfaktor A , der als Normierungsgröße der Quadrupolaufspaltung interpretiert werden kann, linear mit dem SM-Anteil abnimmt (Abb. 6.31(b)).

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß in SM/POPC-Systemen die Wasserstoffbrücken von SM weitgehende innermolekular koordiniert sind; damit sollten **POPC und SM in der L_α -Phase weitgehend ideal mischbar** sein.

Acylketten: Aus den Ordnungsparameterprofilen in Abb. 6.32 und 6.33 geht hervor, daß Sphingomyelin die Ordnung der *sn*-1-Kette von POPC in allen Segmenten erhöht.

Der differentielle Effekt von SM auf $|S_{CD}^{(i)}|$ (Abb. 6.34) in der flüssigkristallinen Phase ($T = 42,4\text{ °C}$) beginnt sich vor allem ab dem Methylensegment C_5 von POPC bemerkbar zu machen, also in etwa auf der Höhe der *trans*-Doppelbindung in der Sphingosinkette ($C_4=C_5$)¹¹. Bis zum C_{13} -Segment von POPC steigt der relative Unterschied auf circa 12 bzw. 17 % für einen SM-Anteil von 33 bzw. 67 mol-%.

Die Erhöhung der Ordnungsparameter der *sn*-1-Kette von POPC geht auf eine Reduktion der *gauche*-Isomerisierungen in Anwesenheit von SM zurück; für den differentiellen Unterschied im Vergleich zu reinem POPC spielt vor allem die Position der Doppelbindung in der Sphingosinkette von SM eine Rolle.

Bei $21,4\text{ °C}$ ist die 1:2-molaren SM/POPC-Mischung in der Nähe des Phasenübergangs ($T_m \approx 17,4\text{ °C}$). Ein Vergleich der differentiellen Ordnungsparameter (Abb. 6.34) zeigt, daß gegenüber $T = 42,4\text{ °C}$ vor allem Breite und Ordnungsparameter des Plateaubereichs etwas erhöht sind.

Dagegen ist die Membran mit 67 % bbSM bei $21,4\text{ °C}$ in einem Zustand, der weiter oben als *gelähnlich* beschrieben wurde. Es fehlen typische Eigenschaften der Gelphase wie ein deutlich höherer Ordnungsparameter des Plateaubereichs. Dies wird darauf zurückgeführt, daß bei (reinem) SM die Gelphase relativ ungeordnet ist; ca. 34 % der Ketten liegen nach FTIR-Messungen noch in einer *gauche*-Konformation vor [102].

Untracht und Shipley [195] beobachteten in bbSM/EYSM-Systemen bei sinkenden Temperaturen eine zunehmende Entmischung für > 33 mol-% SM. Eine geordnete lamellare SM-Gelphase koexistiert in diesem Bereich neben einer flüssigkristallinen SM/PC-Mischphase. Auf eine Entmischung deuten bei den NMR-Messungen nur die Signale der terminalen Methylgruppe von POPC bei 67 % SM hin, deren Quadrupolaufspaltung sich für $T < 33\text{ °C}$ zunehmend der von reinem POPC annähert (Abb. 6.30(b)). Gleichzeitig nimmt die Linienbreite dieses Signals stark zu (Abb. 6.30(b)), da die Wechselwirkung mit den SM-Domänen die transversale Relaxationszeit der Methylgruppen reduziert.

Sphingomyelin-Signale: Das Signal der Hydroxylgruppe von Sphingomyelin fällt mit dem Plateaubereich von POPC zusammen, d. h. es kann im Spektrum nicht aufgelöst werden. Dagegen ist die Aufspaltung der ND-Gruppe bei 33 mol-% bbSM über den ganzen untersuchten Temperaturbereich, d. h. bis $T = 20\text{ °C}$, zu sehen (Daten nicht gezeigt). In der Mischung mit 67 mol-% bbSM steigt $\Delta\nu(\text{ND})$ mit abnehmender Temperatur bis $T \approx 35\text{ °C}$ leicht an und nimmt bei weiterer Abkühlung wieder ab. Im Bereich des Phasenübergangs bei $T \approx 32\text{ °C}$ verbreitert sich das ND-Signal stark.

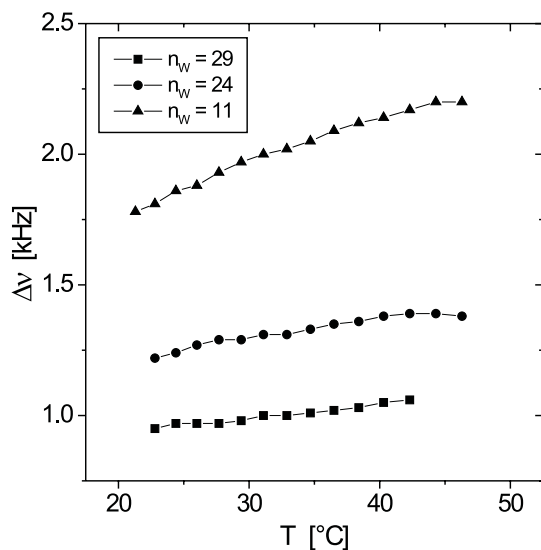
Aus diesen Beobachtungen kann zwar geschlossen werden, daß die Membran mit 33 mol-% bbSM bis $T = 20\text{ °C}$ voll mischbar ist; die von Untracht und Shipley [195] geforderte teilweise Entmischung bei > 33 mol-% bbSM kann jedoch nicht eindeutig anhand der NMR-Daten gezeigt werden. Dazu müßte auch die Kettenordnung von deuteriertem Sphingomyelin herangezogen werden.

¹¹ Es wurde bisher nicht gezeigt, daß sich Segmente gleicher Indizes in der *sn*-1-Kette von POPC und in der Sphingosinkette von SM in etwa auf gleicher Höhe im *hydrocarbon core* befinden; eine derartige Annahme erscheint aber bei einem Vergleich der Molekülgeometrie gerechtfertigt.

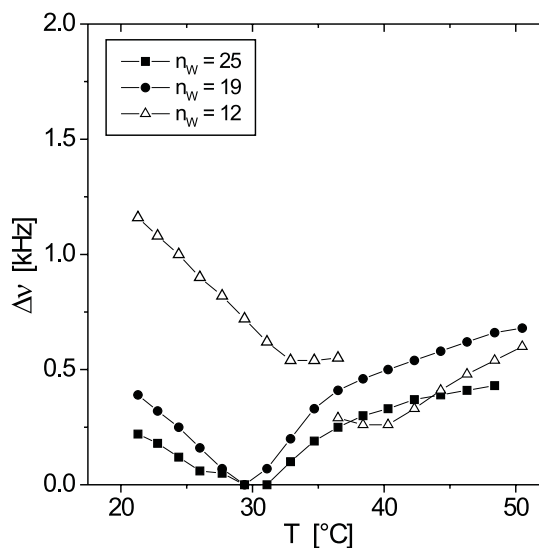
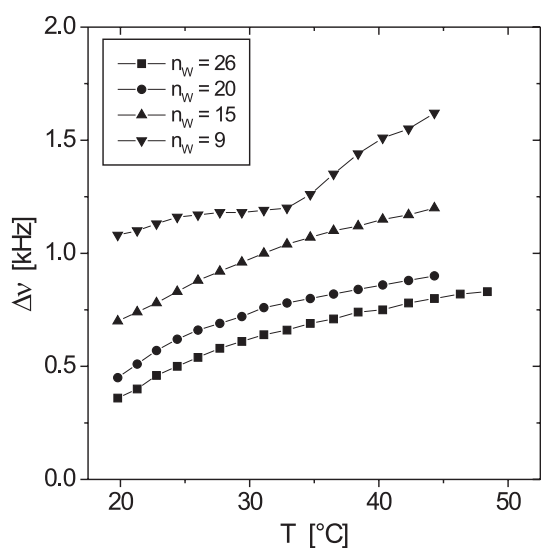
6.4.2 Einfluß der Dehydratisierung

Interlamellares Wasser; Ableitung der Phasenübergangstemperatur

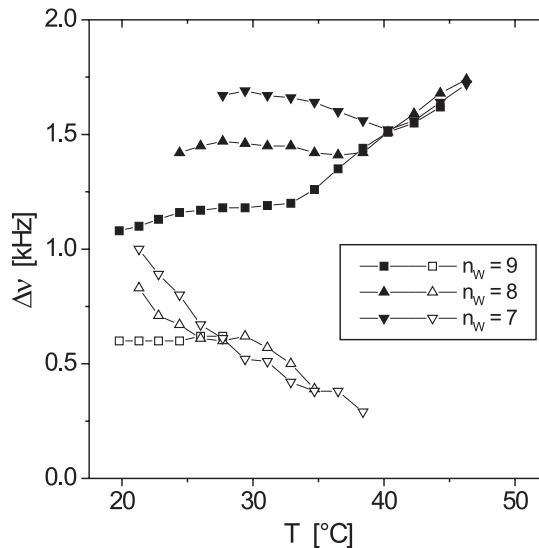
Abbildung 6.35 faßt das Temperaturverhalten von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ bei verschiedenen Hydratationen n_w der bbSM/POPC-Systeme im Vergleich mit reinem POPC zusammen.



(a) reines POPC

(b) SM/POPC 2:1; zur Koexistenz zweier D_2O -Signale bei $n_w = 12$ und $T = 37^\circ\text{C}$ vgl. Abb. 6.37(a)

(c) SM/POPC 1:2, intermediäre Hydratation



(d) SM/POPC 1:2, niedrige Hydratation

Abbildung 6.35: $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in POPC- und bbSM/POPC-Membranen als Funktion der Temperatur bei Variation der Hydratation n_w

Bei hohem n_w kann aus dem Verlauf der D_2O -Quadrupolaufspaltung der thermotrope Phasenübergang von SM/POPC-Membranen abgeleitet werden (vgl. Abb. 6.31(a)). Bei teilweise dehydratisierten Proben ist es schwieriger, die NMR-Signale mit dem Phasen-zustand zu korrelieren, da oft mehrere koexistierende, D_2O -Signale im NMR-Spektrum auftreten.

bbSM/POPC 2:1-molar: Nur bei dieser Mischung liegt der Phasenübergang bei voller Hydratisierung im untersuchten Temperaturbereich. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigt, daß auch bei dehydratisierten Membranen das Minimum von $\Delta\nu(D_2O)$ in Abb. 6.35(b) als Phasenübergang interpretiert werden kann. Die so gewonnenen Daten sind in Abbildung 6.36 in das von Untracht und Shipley [195] ermittelte hydrations-abhängige Phasendiagramm T_m vs. n_w (grau hinterlegter Bereich¹²) eingetragen.

Die mit NMR ermittelten Werte divergieren bei niedrigen Hydratationen leicht für die Heiz- und Kühlzyklen. Soweit entsprechende Daten vorhanden waren, wurden sie in das Diagramm integriert.

Die NMR-Daten für T_m vs. n_w sind etwas zu höheren Hydratationen hin verschoben. Neben der deutlich anderen Fettsäureverteilung von bbSM in [195] kann unterstellt werden, daß teilhydratisierte Proben in der NMR-Anordnung definiertere Phasen bilden als im DSC und in der vorliegenden Untersuchung eher dem Gleichgewichtszustand entsprechen¹³. Die „Fehlerbalken“ der NMR-Resultate geben die Breite des Bereichs an, in dem die Fluid- bzw. Gelphasensignale von 10 auf 90% ihres maximalen Integrals ansteigen (Abb. 6.37(b)).

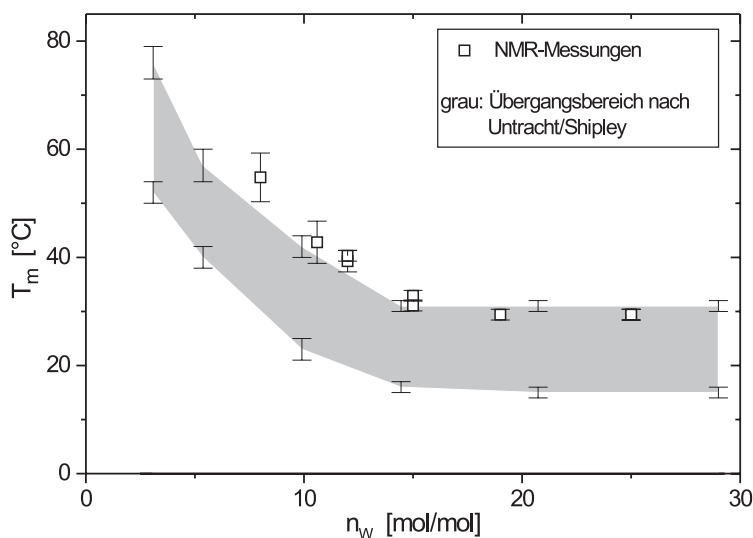
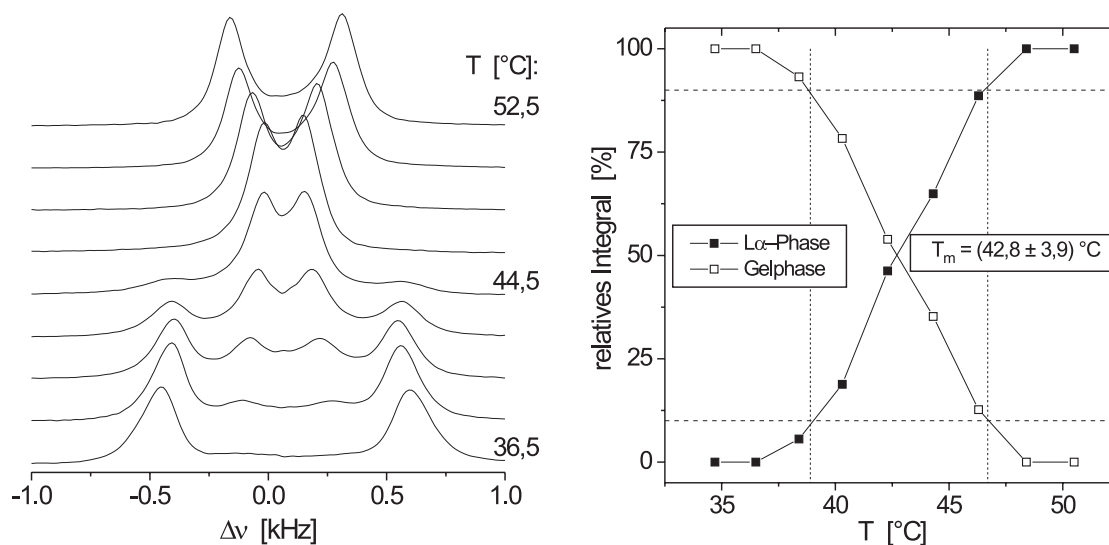


Abbildung 6.36: Hydrationsabhängiges Phasendiagramm des 2:1-molaren SM/POPC-Systems; schattierter Bereich: aus [195] entnommene Daten

Für den Bereich, in dem mehrere D_2O -Signale koexistieren, sind in Abbildung 6.37(a) NMR-Spektren des Wassersignals gezeigt.

¹²Die angegebenen Fehlerbalken berücksichtigen die Ungenauigkeit dieser Daten bzw. der Interpolation zwischen ihnen sowie den Ablesefehler.

¹³Die in [195] angegebenen Heiz- und Kühlraten von 5 bzw. 10 °C/min sind extrem hoch; üblich sind für derartige Messungen einige °C/h.



(a) NMR-Spektren als Funktion der Temperatur

(b) relatives Integral der Subspektren aus Deconvolution nach Lorentz-Linien

Abbildung 6.37: Nachweis koexistierender Domänen im Phasenübergangsbereich der 2:1-molaren bbSM/POPC-Mischung bei $n_w = 10, 6$: ^2H -NMR Spektren von D_2O und relative Änderung der Signalintegrale

bbSM/POPC 1:2-molar: Im Falle der POPC-Membran mit 33 mol-% bbSM wurde T_m dem Bereich zugeordnet, in dem sich das Temperaturverlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in Abb. 6.35(c) und (d) ändert.

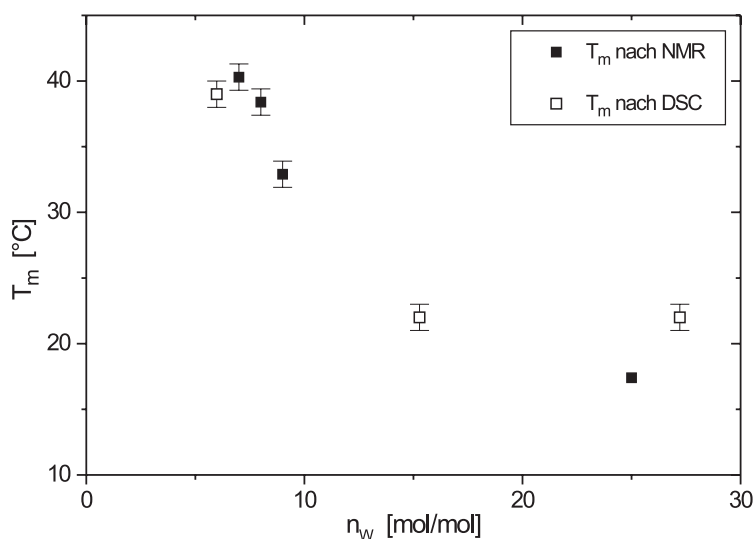


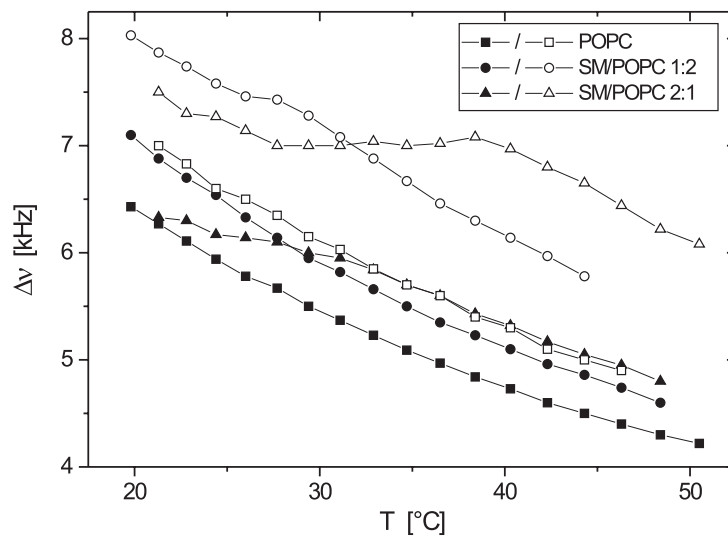
Abbildung 6.38: Hydratationsabhängiges Phasendiagramm des 1:2-molaren bbSM/POPC-Systems

Der annähernd temperaturunabhängige Verlauf des einen Astes von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für $T < T_m$ (gefüllte Symbole in Abb. 6.35(d)) sowie das Auftreten eines zweiten Signals (offene Sym-

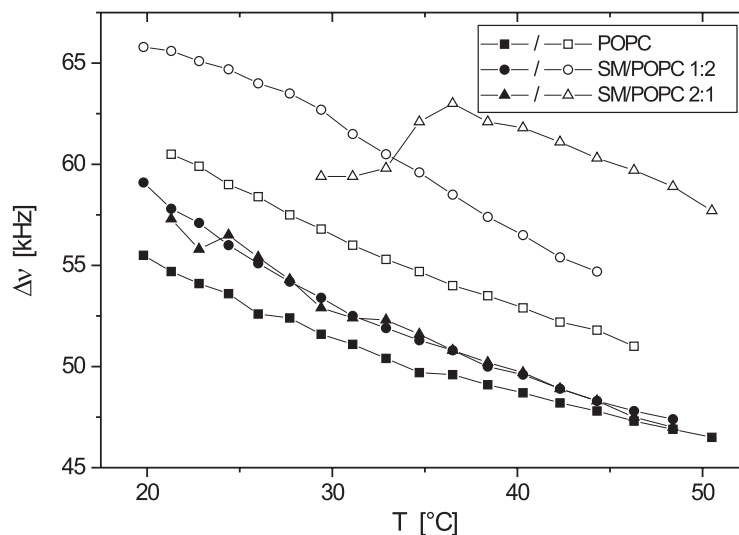
bole) wird der in die Gelphase übergehenden POPC- bzw. SM-Komponente zugeschrieben.

Acylkettenbereich

Der Einfluß der Dehydratisierung auf die Temperaturabhängigkeit der Ordnung von terminaler Methylgruppe und Plateaubereich der *sn*-1-Kette von POPC ist in Abbildung 6.39 für 0, 33 und 67 mol-% bbSM-Anteil dargestellt.



(a) terminale Methylgruppe



(b) Plateaubereich

Abbildung 6.39: Ordnung der *sn*-1-Kette von *d*31-POPC für 0/33/67 mol-% bbSM; geschlossene Symbole: $n_w = 25-26$; offene Symbole: $n_w = 11-12$

Es ist jeweils der Verlauf von $\Delta\nu$ bei hoher Hydratation ($n_w = 25$ – 26 , geschlossene Symbole) und niedriger Hydratation ($n_w = 11$ – 12 , offene Symbole) gezeigt. Alle Quadrupol-splittings wurden Kühlkurven entnommen; Unterschiede zwischen Heiz- und Kühlkurven traten erst bei $n_w < 8$ auf.

Beide Signalgruppen nehmen monoton (und in etwa exponentiell) mit abnehmender Temperatur zu, bis sie den Bereich des Phasenübergangs erreichen. Im vermuteten Koexistenzbereich von Flüssig- und Gelphase zeigen sich bei $n_w = 11$ – 12 Unterschiede: die Aufspaltung der terminalen Methylgruppe bleibt in etwa konstant, während die des Plateaubereichs deutlich abnimmt.

In dem Bereich, in dem alle 3 untersuchten SM/POPC-Systeme bei niedriger Hydratisierung in der flüssigkristallinen Phase vorliegen ($T > 38^\circ\text{C}$), verlaufen die Kurven $\Delta\nu$ vs. T für die **Methylgruppen** in etwa parallel und proportional zum SM-Anteil verschoben. Dagegen nimmt bei hoher Hydratisierung der Ordnungsparameters zwischen 0 und 33 mol-% SM deutlich stärker zu als zwischen 33 und 67 mol-% SM.

Die Ordnung des **Plateaubereichs** hängt in der flüssigkristallinen Phase ebenfalls stark von n_w ab: sie ist bei $n_w \approx 25$ fast unabhängig vom SM-Gehalt, während sie für $n_w \approx 12$ überproportional mit dem SM-Anteil zunimmt. So ist beispielsweise bei 40°C der Ordnungsparameter des Plateaubereichs gegenüber reinem POPC um 6,8 bzw. 17,5 % bei 33 bzw. 67 mol-% bbSM erhöht.

Von den NMR-Signalen von Sphingomyelin kann nur die Amidgruppe aufgelöst werden, da die Hydroxylgruppe im Bereich der Acylkettensignale von POPC liegt. Bei allen Hydratationen verbreitert sich das ND-Signal am Phasenübergang (Daten nicht gezeigt).

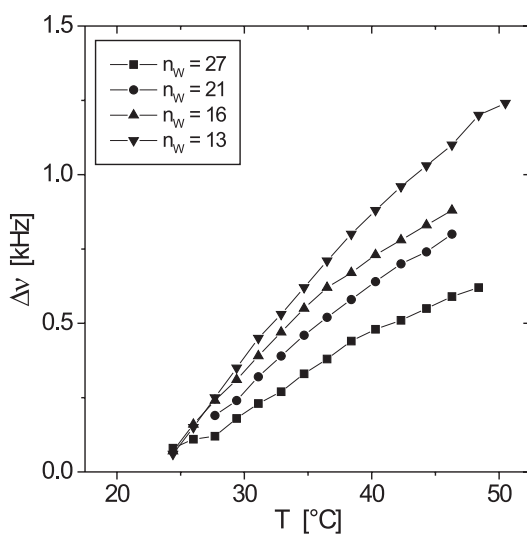
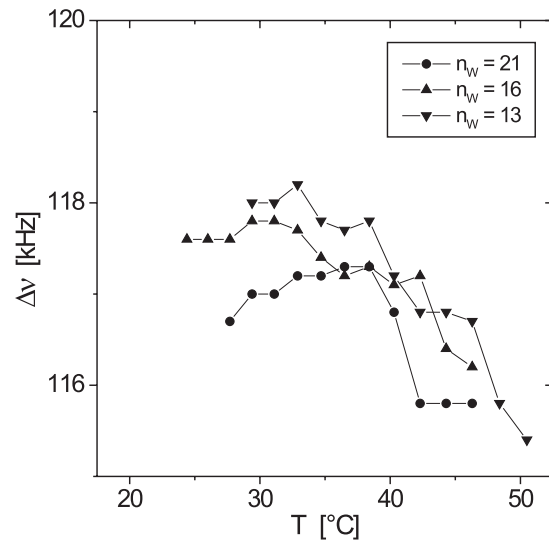
Diskussion

Der Übergang der bbSM/POPC-Systeme von der flüssigkristallinen in die Gelphase äußert sich im Verlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ in Form eines Minimums bzw. in einer Abweichung im Temperaturverhalten. Im Acylkettenbereich von POPC nähert sich die Quadrupolaufspaltung in der Gelphase bei 67 mol-% SM für $T \rightarrow 20^\circ\text{C}$ dem Splitting von reinem POPC. Dies bedeutet, daß die von Untracht und Shipley [195] beobachtete Separation SM-reicher Phasen in diesem Bereich auch bei niedrigen Hydratationen stattfindet.

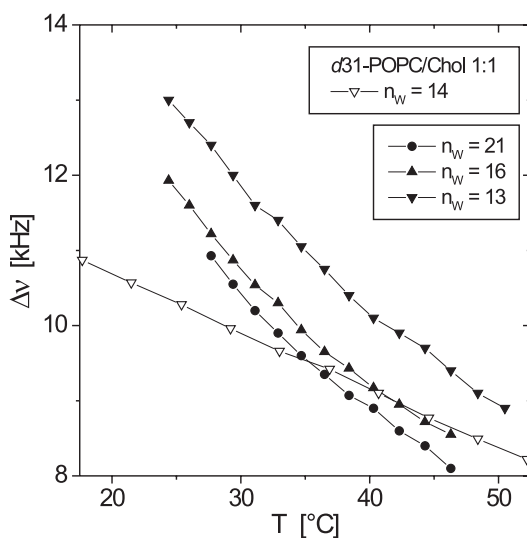
Die **Dehydratisierung** der Membranoberfläche führt zu einer höheren Packungsdichte im Acylkettenbereich und damit zu einem steigenden Anteil von *trans*-Konformationen der Methylengruppen, d.h. zu einer Zunahme der mittleren Kettenlänge. Die überproportionale Zunahme von $\Delta\nu(\text{Plateau})$ mit dem SM-Gehalt in der flüssigkristallinen Phase kann darauf zurückgehen, daß POPC nicht nur durch den Kettenbereich von SM, sondern auch durch den starren Interface-Bereich höher geordnet wird. Beide Effekte gehen umso stärker zurück, je größer der Gelphasenanteil der SM-Komponente wird.

6.4.3 Effekt von Cholesterol

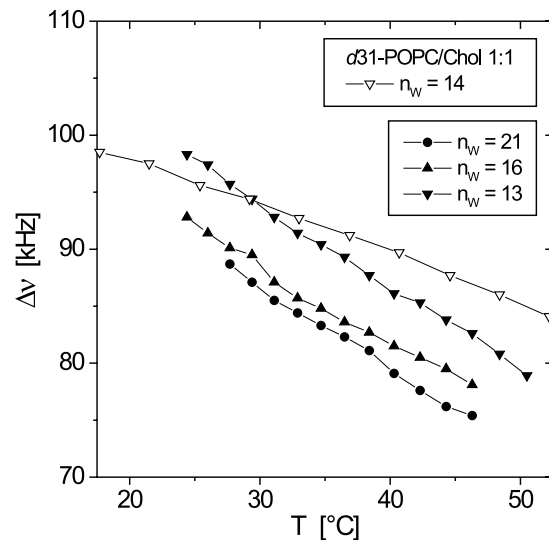
Zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterol auf bbSM/POPC-Membranen wurden für eine 2:1:1-molare bbSM/*d*31-POPC/Chol-Mischung Messungen bei verschiedener Hydratation ($n_w = 13-27$) durchgeführt. Abbildung 6.40 faßt die jeweiligen Quadrupolaufspaltungen von D_2O , der Amidgruppe von SM sowie der terminalen Methylgruppe und des Plateaubereichs von *d*31-POPC zusammen.

(a) interlamellares D_2O 

(b) Amidgruppe von SM



(c) terminale Methylgruppe von POPC



(d) Plateaubereich von POPC

Abbildung 6.40: 2H -Aufspaltungen eines 2:1:1-molaren bbSM/*d*31-POPC/Chol-Systems (geschlossene Symbole) im Vergleich mit 1:1-molarem *d*31-POPC/Chol (offene Symbole)

Zum Vergleich wurde für dieselben Molanteile eine Membran ohne SM, d. h. eine 1:1-molare *d*31-POPC/Chol-Mischung, gemessen.

In Kapitel 6.3 wurde gezeigt, daß sich das Hydratisierungsverhalten von SM/DPPC-Membranen in Anwesenheit von Cholesterol fundamental ändert. Bei SM/POPC-Membranen würde man dies *a priori* nicht erwarten, da hier das Hydratisierungsverhalten in der L_α -Phase von der POPC-Komponente bestimmt wird (Abb. 6.30(a)).

In der Tat zeigt der Verlauf von $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für das bbSM/POPC/Chol-System ein für POPC typisches Verhalten (Abb. 6.40(a)), wobei $\Delta\nu(\text{D}_2\text{O})$ für alle untersuchten Hydratationen, anders als in SM/DPPC/Chol-Mischungen (Abb. 6.22), auf eine Temperatur $T \approx 24\text{--}25^\circ\text{C}$ zu konvergieren scheint. Diese Beobachtung kann allerdings dadurch relativiert werden, daß in bbSM/POPC-Systemen die Phasenübergangstemperatur T_m erst bei niedrigen Hydratationen von n_w abhängt (Abb. 6.38 und 6.36).

In diesem Temperaturbereich verbreitern auch die ND-Signale der SM-Komponente (Abb. 6.30(d)) stark und sind im ^2H -Spektrum nicht mehr aufzulösen.

Diskussion

Die verschwindende Quadrupolaufspaltung von D_2O in der 2:1:1-molaren bbSM/POPC/Chol-Mischung bei $24\text{--}25^\circ\text{C}$ deutet auf einen Phasenübergang in diesem Bereich hin, der in DSC-Untersuchungen nicht detektiert werden konnte.

Sollte dies der Fall sein, so können die mit dem Phasenübergang verbundenen Fluktuationen der Membranstruktur das Auftreten extrem großer Domänenstrukturen sowohl in Monolayern als auch in Bilayern und Vesikeln [47] von SM/POPC/Chol-Mischungen bzw. Extrakten aus der Bürstensaummembran der Nierenrinde erklären. Bei Temperaturen um 25°C wurden in 1:1:1-molaren DOPC/SM/Chol-Vesikeln geordnete Domänen in der Größenordnung einiger $10\ \mu\text{m}$ beobachtet (Abb. 5 in [47]).

Die Ordnung der *sn*-1-Kette von POPC ist in der SM/*d*31-POPC/Chol-Mischung sowohl für die terminale Methylgruppe als auch für den Plateaubereich extrem hoch. Im Vergleich mit einer äquimolaren *d*31-POPC/Chol-Membran zeigt sich, daß auch ohne SM der Plateaubereich von POPC sehr hoch geordnet ist. Allerdings wird die Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu$ in Anwesenheit von SM deutlich moduliert.

6.5 Beobachtungen *en passant*

Zum Schluß soll noch auf eine Beobachtung hingewiesen werden, die im Hinblick auf die Wechselwirkung von Sphingomyelin–enthaltenden Membranen mit Detergentien wie Triton X–100 interessant ist: bei der Präparation der Multilayer–Proben wird das in Methanol oder Methanol/Chloroform gelöste Lipid auf die Glasplättchen aufgetragen und in einem warmen Luftstrom getrocknet. Dieses Verfahren dauert üblicherweise etwa 15 min, bei SM–enthaltenden Proben jedoch bis zu 90 min.

Abbildung 6.41 zeigt die Zeitdauer bis zur vollständigen Verdunstung von jeweils 1 mg Lipid (Gesamtmenge) in 100 μ l Methanol/Chloroform (5:1–molar); jeder Meßwert wurde durch Mittelung über je 5 Proben bestimmt. Alle Proben wurden unter identischen Bedingungen getrocknet.

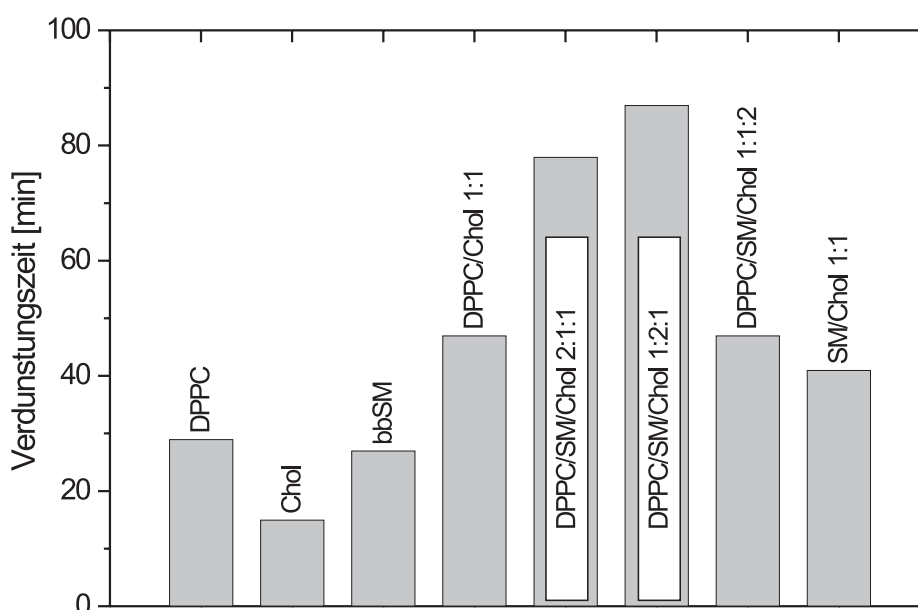


Abbildung 6.41: Verdunstungszeiten verschiedener in Methanol/Chloroform (5:1–molar) gelöster Lipide oder Lipidmischungen

Diese Ergebnisse weisen auf eine starke Wechselwirkung zwischen Sphingomyelin/Cholesterol und dem Lösungsmittel hin, die zu einer Erniedrigung des Dampfdrucks führt. Detailliertere Messungen des Aggregatzustandes der gelösten Lipide sowie die Bestimmung der Dampfdruckkurven etwa mit statischer Lichtstreuung bzw. einer Thermowaage könnten diese Beobachtungen untermauern.

In [7] wird darauf hingewiesen, daß SM in apolaren organischen Lösungsmitteln (anders als PC) eine gelartige Phase bildet. Gelöst in Chloroform bildet PC Mizellen, während SM praktisch unlöslich ist. Selbst bei Zugabe von (polarem) Methanol existieren erhebliche Unterschiede zwischen PC und SM.

Kapitel 7

Ausblick

Weiteres experimentelles Vorgehen

Die wichtigste Voraussetzung weiterer Untersuchungen von Sphingomyelin-Systemen mit Festkörper-NMR ist eine spezifische Markierung mit geeigneten Isotopen:

- Eine selektive Deuterierung der Fettsäurekette bzw. der Sphingosinkette kann die Unterschiede in der Kettenpackung und -dynamik gegenüber PC-Membranen aufzeigen. Insbesondere sollte der hohe Anteil von *gauche*-Konformationen in der Gelphase mit ^2H -NMR Spektroskopie bestätigt werden und die Konsequenzen im Hinblick auf Untersuchungen bei Raumtemperatur (z. B. Monolayerexperimente) diskutiert werden. Auch die stärkere Wechselwirkung mit Cholesterol kann so vielleicht besser verstanden werden.
- ^2H -Markierungen im Kopfgruppenbereich können den Einfluß der höheren Wasserstoffverbrückung auf Orientierung und Dynamik der Cholingruppe im Vergleich mit PC zeigen. Die Dynamik der SM-Kopfgruppe sollte sich bei Dehydratisierung oder in Anwesenheit zusätzlicher Donoren/Akzeptoren von Wasserstoffbrücken (z. B. Cholesterol) deutlich ändern.
- Mit einer $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Doppelmarkierung der Säureamidgruppe läßt sich die mittlere Orientierung dieses Segments bestimmen. Aus Änderungen der statischen Kopplungskonstante kann die Stärke der Wasserstoffbrücken in diesem Bereich abgeleitet werden.

Die Geometrie der Wasserstoffbrücken im Interface-Bereich von Sphingomyelin und dabei insbesondere die Rolle der Amid- und Hydroxylgruppe sind mangels Röntgenstrukturdaten weiterhin spekulativ. Dies gilt umso mehr für Mischungen von SM mit Cholesterol und PC, d. h. für sogenannte *raft*-Mischungen. Ein mögliches Vorgehen zur Klärung dieser Fragen besteht darin, in diesen Modellsystemen die Stereoisomere von SM und Chol (D/L-*erythro*/*threo*-SM und *nat*/*ent*-Chol) systematisch zu variieren.

Auch die Dynamik kollektiver Oberflächenbewegungen (Undulationen) von Sphingomyelin-Membranen sowie das makroskopische Verhalten von SM-Vesikeln wurden bisher wenig untersucht. Die relativ starre Interface-Struktur und ihre hohe Wasserstoffverbrückung lassen elastische Konstanten erwarten, die sich deutlich von denen anderer Lipide unterscheiden.

Zum Vergleich bieten sich dazu auch *in vivo* geeignete Modellsysteme an: die Außenseite der Plasmamembran von Wiederkäuer-Erythrozyten besteht zum Großteil aus Sphingomyelin [20,56], da Wiederkäuer ein spezielles Enzym zur Abtötung von Ciliaten (Wimperntierchen) benötigen, das auch gegen PC aktiv ist [56]. Die Mikroviskosität der Plasmamembran von Schaf-Erythrozyten ist infolge des hohen SM-Gehalts im physiologischen Temperaturbereich wesentlich höher als beim Menschen [7,20].

Selbst bei menschlichen Erythrozyten (24 mol-% Cholesterol, 15 % SM, 18 % PC – davon 82 % des SM bzw. 76 % des PC im Exoleaflet) wurde aus Monolayer-Untersuchungen gefolgert, daß sich daß System unter physiologischen Bedingungen in der Nähe eines kritischen Mischbarkeitspunktes befindet [91].

Allgemein enthalten Erythrozyten neben SM und PC hohe Mengen an Phosphatidylethanolamin (PE) im Exoleaflet ($27,4 \pm 2,0$ mol-% beim Menschen, $29,9 \pm 2,8$ mol-% beim Rind [56]). Untersuchungen von Modellsystemen SM/PE/PC(/Chol) wurden bisher nicht durchgeführt; es ist zu erwarten, daß sich in Anwesenheit dieses Lipids, das selbst in hohem Maße Wasserstoffbrücken bildet, das Verhalten von SM/PC-Membranen markant ändert.

Aus der Quadrupolaufspaltung des interlamellaren Wassers kann sehr gut auf viele Eigenschaften von Membranen geschlossen werden; theoretische Modelle für den absoluten Wert dieser Meßgröße sowie seiner Änderung mit der Temperatur, der Hydratisierung oder der Lipidstruktur existieren bisher jedoch noch nicht. Vor diesem Hintergrund wurde angeregt, die Orientierung oberflächennaher Wassermoleküle mit Simulationen von Wasser an geladenen Oberflächen [111] zu vergleichen.

Biologische Bedeutung dieser Arbeit

Aus der verschwindenden Quadrupolaufspaltung von D_2O in der L_α -Phase von vollhydratisierten, reinen SM-Multischichten wurde im Einklang mit anderen Untersuchungen [126] gezeigt, daß die Oberfläche dieser Membranen trotz gleicher Kopfgruppenstruktur weniger hydrophil als die von PC ist. Damit sollten deutliche Unterschiede bei der Bindung ungeladener Moleküle auftreten. In der Tat unterscheidet sich die Bindung des hochhydrophoben Proteins β -Lactoglobulin an SM deutlich von der an DPPC oder DMPC [106]: während und oberhalb des Phasenübergangs scheint das Protein mit SM, nicht aber mit PC zu wechselwirken. Ebenso sinkt die Aktivität der Lipoprotein-Lipase, eines der wichtigsten Stoffwechsellzyme, in PC/SM-Membranen aufgrund der geringeren Hydratisierung der Oberfläche [164].

Das unterschiedliche Phasenverhalten von SM und PC sowie ihre unterschiedliche Wechselwirkung mit Proteinen könnte im Hinblick auf die altersbedingte Ersetzung von PC durch SM in vielen Membranen ein wichtiger Beitrag zur Bildung pathogener Veränderungen sein. Schließlich sei darauf hingewiesen, daß die starke Wechselwirkung zwischen Sphingomyelin und Cholesterol eine Rolle im Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen zu spielen scheint.

Literaturverzeichnis

- [1] ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH, 1995
- [2] ALBI, E. ; PELOSO, I. ; MAGNI, M. V.: Nuclear membrane sphingomyelin-cholesterol changes in rat liver after hepatectomy. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999), Nr. 3, S. 692–95
- [3] ALBRECHT, O. ; GRULER, H. ; SACKMANN, E. : Pressure-composition phase diagrams of cholesterol/lecithin, cholesterol/phosphatidic acid, and lecithin/ phosphatidic acid mixed monolayers: a Langmuir film balance study. In: *J. Colloid Interface Sci.* 79 (1981), Nr. 2, S. 319–38
- [4] ATKINS, P. W.: *Physikalische Chemie*. 2. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH, 1996
- [5] BAR, L. K. ; BARENHOLZ, Y. ; THOMPSON, T. E.: Effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine-sphingomyelin bilayers. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 9, S. 2507–16
- [6] BARENHOLZ, Y. ; THOMPSON, T. E.: Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 604 (1980), Nr. 2, S. 129–58
- [7] BARENHOLZ, Y. : Sphingomyelin-lecithin balance in membranes: composition, structure, and function relationships. In: SHINITZKY, M. (Hrsg.): *Physiology of Membrane Fluidity* Bd. 1. Boca Raton/USA : CRC Press, 1984, S. 131–73
- [8] BASZKIN, A. (Hrsg.) ; NORDE, W. (Hrsg.): *Physical Chemistry of Biological Interfaces*. New York : Marcel Dekker, 2000
- [9] BECHINGER, B. ; SEELIG, J. : Conformational changes of the phosphatidylcholine headgroup due to membrane dehydration. A ^2H -NMR study. In: *Chem. Phys. Lipids* 58 (1991), Nr. 1–2, S. 1–5
- [10] BERGELSON, L. O. ; GAWRISCH, K. ; FERRETTI, J. A. ; BLUMENTHAL, R. : *Mol. Membr. Biol.* Bd. 12: *Domain Organization in Biological Membranes*. 1995
- [11] BEYER, K. . *persönliche Mitteilung*. 2001
- [12] BICKNESE, S. ; PERIASAMY, N. ; SHOHET, S. B. ; VERKMAN, A. S.: Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency-domain microfluorimetry. In: *Biophys. J.* 65 (1993), Nr. 3, S. 1272–82
- [13] BINDER, H. ; ARNOLD, K. ; ULRICH, A. S. ; ZSCHÖRNIG, O. : Interaction of Zn^{2+} with phospholipid membranes. In: *Biophys. Chem.* 90 (2001), Nr. 1, S. 57–74.

- [14] BINDER, H. ; KOHLSTRUNK, B. ; HEERKLOTZ, H. H.: Hydration and lyotropic melting of amphiphilic molecules: A thermodynamic study using Humidity Titration Calorimetry. In: *J. Colloid Interface Sci.* 220 (1999), Nr. 2, S. 235–49
- [15] BITTMAN, R. ; KASIREDDY, C. R. ; MATTJUS, P. ; SLOTTE, J. P.: Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 39, S. 11776–81
- [16] BLOOM, M. ; MOURITSEN, O. : Structure and dynamics of membranes. In: LIPOWSKY, R. (Hrsg.) ; SACKMANN, E. (Hrsg.): *Handbook of Biological Physics* Bd. 1A. Amsterdam : Elsevier Science B.V., 1995, S. 65–95
- [17] BLOOM, M. ; DAVIS, J. H. ; MACKAY, A. L.: Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry. In: *Chem. Phys. Lett.* 80 (1981), Nr. 1, S. 198–202
- [18] BOGGS, J. M.: Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. In: *Biochim. Biophys. Acta* 906 (1987), Nr. 3, S. 353–404
- [19] BORLE, F. ; SEELIG, J. : Hydration of Escherichia coli lipids. Deuterium T_1 relaxation time studies of phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. In: *Biochim. Biophys. Acta* 735 (1983), Nr. 1, S. 131–36
- [20] BOROCHOV, H. ; SHINITZKY, M. ; BARENHOLZ, Y. : Sphingomyelin phase transition in the sheep erythrocyte membrane. In: *Cell. Biophys.* 1 (1979), Nr. 3, S. 219–28
- [21] BOVEY, F. A. ; JELINSKI, L. ; MIRAU, P. A.: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2. Auflage. New York : Academic Press, 1988
- [22] BRETSCHER, M. S. ; MUNRO, S. : Cholesterol and the Golgi apparatus. In: *Science* 261 (1993), Nr. 5126, S. 1280–81
- [23] BROCKMAN, H. : Dipole potential of lipid membranes. In: *Chem. Phys. Lipids* 73 (1994), Nr. 1,2, S. 57–79
- [24] BROWN, M. F. ; NEVZOROV, A. A.: ^2H -NMR in liquid crystals and membranes. In: *Colloids Surf. A* 158 (1999), Nr. 1–2, S. 281–98
- [25] BROWNING, J. L. ; SEELIG, J. : Bilayers of phosphatidylserine: a deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance study. In: *Biochemistry* 19 (1980), Nr. 6, S. 1262–70
- [26] BRUZIK, K. S.: Conformation of the polar headgroup of sphingomyelin and its analogues. In: *Biochim. Biophys. Acta* 939 (1988), Nr. 2, S. 315–26
- [27] BRYANT, G. ; POPE, J. M. ; WOLFE, J. : Motional narrowing of the ^2H NMR spectra near the chain melting transition of phospholipid/ D_2O mixtures. In: *Eur. Biophys. J.* 21 (1992), Nr. 5, S. 363–67
- [28] BRYANT, G. ; WOLFE, J. : Can hydration forces induce lateral phase separations in lamellar phases? In: *Eur. Biophys. J.* 16 (1989), Nr. 6, S. 369–74

- [29] BRYANT, G. ; POPE, J. M. ; WOLFE, J. : Low hydration phase properties of phospholipid mixtures. Evidence for dehydration-induced fluid-fluid separations. In: *Eur. Biophys. J.* 21 (1992), Nr. 3, S. 223–32
- [30] BRZUSTOWICZ, M. R. ; STILLWELL, W. ; WASSALL, S. R.: Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated phospholipid membranes: a solid state ^2H NMR investigation. In: *FEBS Lett.* 451 (1999), Nr. 2, S. 197–202
- [31] CECKLER, T. L. ; CUNNINGHAM, B. A.: Transition state thermodynamics of lipid bilayers characterized by differential scanning calorimetry. In: *Chem. Educ.* 2 (1997), Nr. 6, S. 1–17
- [32] CEVC, G. : Hydration force and the interfacial structure of the polar surface. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (1991), Nr. 17, S. 2733–39
- [33] CEVC, G. ; MARSH, D. : *Cell Biology: A Series of Monographs*. Bd. 5: *Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models*. New York : John Wiley & Sons, 1987
- [34] CHEN, Q. P. ; LI, Q. T.: Effect of cardiolipin on proton permeability of phospholipid liposomes: the role of hydration at the lipid–water interface. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 389 (2001), Nr. 2, S. 201–06
- [35] CHEN, S. C. ; STURTEVANT, J. M. ; GAFFNEY, B. J.: Scanning calorimetric evidence for a third phase transition in phosphatidylcholine bilayers. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), Nr. 9, S. 5060–63
- [36] CINELLI, S. ; ONORI, G. ; SANTUCCI, A. : Solvent isotope effects on the phase transition properties of lipid bilayers. In: *Colloids Surf. B* 20 (2001), Nr. 4, S. 297–302
- [37] CLARKE, R. J.: The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. In: *Adv. Colloid Interface Sci.* 89-90 (2001), S. 263–81
- [38] COSTER, H. G. ; LAVER, D. R. ; SCHOENBORN, B. P.: Effect of $^2\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ replacement on the dielectric structure of lipid bilayer membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 686 (1982), Nr. 1, S. 141–43
- [39] COSTIGAN, S. C. ; BOOTH, P. J. ; TEMPLER, R. H.: Estimations of lipid bilayer geometry in fluid lamellar phases. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1468 (2000), Nr. 1-2, S. 41–54
- [40] CULLIS, P. R. ; DE KRUIJFF, B. ; HOPE, M. J. ; VERKLEIJ, A. J. ; NAYAR, R. ; FARREN, S. B. ; TILCOCK, C. ; MADDEN, T. D. ; BALLY, M. B.: Structural properties of lipids and their functional roles in biological membranes. In: ALOIA, R. C. (Hrsg.): *Membrane Fluidity in Biology* Bd. 1. New York : Academic Press, 1983, S. 39–81
- [41] CURTAIN, C. C. ; GORDON, L. M. ; ALOIA, R. C.: Lipid domains in biological membranes: conceptual development and significance. In: ALOIA, R. C. (Hrsg.) ; CURTAIN, C. C. (Hrsg.) ; GORDON, L. M. (Hrsg.): *Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function* Bd. 2. New York : Alan R. Liss, 1988, S. 1–15
- [42] DAUM, G. : Lipids of mitochondria. In: *Biochim. Biophys. Acta* 822 (1985), Nr. 1, S. 1–42

- [43] DAVIS, J. H. ; JEFFREY, K. R. ; BLOOM, M. : Spin-lattice relaxation as a function of chain position in perdeuterated potassium palmitate. In: *J. Magn. Reson.* 29 (1978), Nr. 2, S. 191–99
- [44] DAVIS, J. H.: The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by deuterium NMR. In: *Biochim. Biophys. Acta* 737 (1983), Nr. 1, S. 117–71
- [45] DÖBEREINER, H. G. ; KÄS, J. ; NOPPL, D. ; SPRENGER, I. ; SACKMANN, E. : Budding and fission of vesicles. In: *Biophys. J.* 65 (1993), Nr. 4, S. 1396–403.
- [46] DENISOV, V. P. ; HALLE, B. : Protein hydration dynamics in aqueous solution. In: *Faraday Discuss.* 103 (Hydration processes in biological and macromolecular systems) (1996), S. 227–44
- [47] DIETRICH, C. ; BAGATOLLI, L. A. ; VOLOVYK, Z. N. ; THOMPSON, N. L. ; LEVI, M. ; JACOBSON, K. ; GRATTON, E. : Lipid rafts reconstituted in model membranes. In: *Biophys. J.* 80 (2001), Nr. 3, S. 1417–28
- [48] DINATALE, J. A. ; VOLD, R. R.: The effects of chemical-shift anisotropy on deuterium powder patterns. In: *J. Magn. Reson. A* 117 (1995), Nr. 2, S. 304–06
- [49] DOULIEZ, J.-P. ; LEONARD, A. ; DUFOURC, E. J.: Conformational order of DMPC *sn*-1 versus *sn*-2 chains and membrane thickness: an approach to molecular protrusion by solid state ^2H -NMR and neutron diffraction. In: *J. Phys. Chem.* 100 (1996), Nr. 47, S. 18450–57
- [50] DOWHAN, W. : Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? In: *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997), S. 199–232
- [51] ESTEP, T. N. ; MOUNTCASTLE, D. B. ; BARENHOLZ, Y. ; BILTONEN, R. L. ; THOMPSON, T. E.: Thermal behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions. In: *Biochemistry* 18 (1979), Nr. 10, S. 2112–17
- [52] FAURE, C. ; BONAKDAR, L. ; DUFOURC, E. J.: Determination of DMPC hydration in the L_α and L_β phases by ^2H solid state NMR of D_2O . In: *FEBS Lett.* 405 (1997), Nr. 3, S. 263–66
- [53] FAURE, C. ; TRANCHANT, J. F. ; DUFOURC, E. J.: Interfacial hydration of ceramide in stratum corneum model membrane measured by ^2H NMR of D_2O . In: *J. Chim. Phys. Phys. - Chim. Biol.* 95 (1998), Nr. 2, S. 480–86
- [54] FIELDING, C. J. ; FIELDING, P. E.: Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1529 (2000), Nr. 1-3, S. 210–22
- [55] FINER, E. G. ; DARKE, A. : Phospholipid hydration studied by deuterium magnetic resonance spectroscopy. In: *Chem. Phys. Lipids* 12 (1974), S. 1–16
- [56] FLORIN-CHRISTENSEN, J. ; SUAREZ, C. E. ; FLORIN-CHRISTENSEN, M. ; WAINSELBAUM, M. ; BROWN, W. C. ; MCELWAIN, T. F. ; PALMER, G. H.: A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), Nr. 14, S. 7736–41
- [57] FUKUSHIMA, E. ; ROEDER, S. B. W.: *Experimental Pulse NMR: A Nuts and Bolts Approach*. Reading (USA) : Addison-Wesley, 1981

- [58] GALLY, H. U. ; PLUSCHKE, G. ; OVERATH, P. ; SEELIG, J. : Structure of Escherichia coli membranes. Glycerol auxotrophs as a tool for the analysis of the phospholipid head-group region by deuterium magnetic resonance. In: *Biochemistry* 20 (1981), Nr. 7, S. 1826–31
- [59] GAWRISCH, K. ; BARRY, J. A. ; HOLTE, L. L. ; SINNWELL, T. ; BERGELSON, L. D. ; FERRETTI, J. A.: Role of interactions at the lipid-water interface for domain formation. In: *Mol. Membr. Biol.* 12 (1995), Nr. 1, S. 83–88
- [60] GAWRISCH, K. ; RICHTER, W. ; MÖPS, A. ; BALGAVY, P. ; ARNOLD, K. ; KLOSE, G. : The influence of water concentration on the structure of egg yolk phospholipid/water dispersions. In: *Studia Biophysica* 108 (1985), S. 5–16
- [61] GAWRISCH, K. ; RUSTON, D. ; ZIMMERBERG, J. ; PARSEGAN, V. A. ; RAND, R. P. ; FULLER, N. : Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. In: *Biophys. J.* 61 (1992), Nr. 5, S. 1213–23
- [62] GEMMECKER, G. : Basic Principles of FT NMR (www.nmr.de). (1999)
- [63] GRAINGER, D. W. ; REICHERT, A. ; RINGSORF, H. ; SALESSE, C. : An enzyme caught in action: direct imaging of hydrolytic function and domain formation of phospholipase A₂ in phosphatidylcholine monolayers. In: *FEBS Lett.* 252 (1989), Nr. 1–2, S. 73–82
- [64] GREGORY, J. K. ; CLARY, D. C. ; LIU, K. ; BROWN, M. G. ; SAYKALLY, R. J.: The water dipole moment in water clusters. In: *Science* 275 (1997), Nr. 5301, S. 814–17
- [65] GROTHUS, C. d.: Mémoire sur la décomposition de l'eau et des corps qu'elle tient en dissolution à l'aide de l'électricité galvanique. In: *Annales de Chimie* 58 (1806), S. 54–74
- [66] GRUEN, D. W. R. ; MARČELJA, S. ; PAILTHORPE, B. A.: Theory of polarization profiles and the "hydration force". In: *Chem. Phys. Lett.* 82 (1981), Nr. 2, S. 315–20
- [67] GUTMAN, M. ; NACHLIEL, E. ; MOSHIACH, S. : Dynamics of proton diffusion within the hydration layer of phospholipid membrane. In: *Biochemistry* 28 (1989), Nr. 7, S. 2936–40
- [68] GUTMAN, M. ; NACHLIEL, E. : The dynamics of proton exchange between bulk and surface groups. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1231 (1995), Nr. 2, S. 123–38
- [69] HAINES, T. : Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: A hypothesis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), S. 160–64
- [70] HALTIA, T. ; FREIRE, E. : Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995), Nr. 2, S. 295–322
- [71] HAWTON, M. H. ; DOANE, J. W.: Pretransitional phenomena in phospholipid/water multilayers. In: *Biophys. J.* 52 (1987), Nr. 3, S. 401–04
- [72] HÜBNER, W. ; MANTSCH, H. ; KATES, M. : Intramolecular hydrogen bonding in cardiolipin. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1066 (1991), Nr. 2, S. 166–74

- [73] HÜBNER, W. ; BLUME, A. : Interactions at the lipid-water interface. In: *Chem. Phys. Lipids* 96 (1998), Nr. 1–2, S. 99–123
- [74] HEIM, M. : *Elektrische Leitfähigkeit oberflächenadsorbierter Wasserschichten und deren Anwendung zur Rastertunnelmikroskopie von Isolatoren und biologischen Molekülen*, Technische Universität München, Diss., 1998
- [75] HINDERLITER, A. ; ALMEIDA, P. F. F. ; CREUTZ, C. E. ; BILTONEN, R. L.: Domain formation in a fluid mixed lipid bilayer modulated through binding of the C2 protein motif. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 13, S. 4181–91
- [76] HINTON, J. F. ; EASTON, P. L. ; NEWKIRK, D. K. ; SHUNGU, D. C.: ^{23}Na -NMR study of ion transport across vesicle membranes facilitated by phenylalanine analogs of gramicidin. In: *Biochim Biophys Acta* 1146 (1993), Nr. 2, S. 191–96
- [77] HUBER, T. : *Untersuchungen zur mikroskopischen Struktur einer biologischen Membran*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 1998
- [78] HUBER, T. . *persönliche Mitteilungen*. 2000/2001
- [79] ISRAELACHVILI, J. ; WENNERSTRÖM, H. : Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. In: *Nature* 379 (1996), Nr. 6562, S. 219–25
- [80] ISRAELACHVILI, J. N.: *Intermolecular and surface forces*. 2. Auflage. London : Academic Press, 1992
- [81] JAMES, T. L.: *Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry. Principles and Applications*. New York : Academic Press, 1975
- [82] JARRELL, H. C. ; WAND, A. J. ; GIZIEWICZ, J. B. ; SMITH, I. C. P.: The dependence of glyceroglycolipid orientation and dynamics on head-group structure. In: *Biochim. Biophys. Acta* 897 (1987), Nr. 1, S. 69–82
- [83] JEDLOVSKY, P. ; MEZEI, M. : Orientational order of the water molecules across a fully hydrated DMPC bilayer: A Monte Carlo simulation study. In: *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), Nr. 17, S. 3614–23
- [84] JEENER, J. ; BROEKAERT, P. : Nuclear magnetic resonance in solids: thermodynamic effects of a pair of rf pulses. In: *Phys. Rev.* 157 (1967), Nr. 2, S. 232–40
- [85] JENDRASIAK, G. L.: The hydration of phospholipids and its biological significance. In: *J. Nutr. Biochem.* 7 (1996), Nr. 11, S. 599–609
- [86] JENDRASIAK, G. L.: The effect of the choline headgroup on phospholipid hydration. In: *Chem. Phys. Lipids* 113 (2001), Nr. 1–2, S. 55–66
- [87] JÜRGENS, E. : *Untersuchungen zum Lipid-Wasser-Phasendiagramm von makroskopisch geordneten und ungeordneten Modellmembransystemen*, Universität Ulm, Diss., 1981
- [88] KAR, L. ; NEY-IGNER, E. ; FREED, J. H.: Electron spin resonance and electron-spin-echo study of oriented multilayers of L_{α} -dipalmitoylphosphatidylcholine water systems. In: *Biophys. J.* 48 (1985), Nr. 4, S. 569–95

- [89] KARLSSON, K. A.: Aspects on structure and function of sphingolipids in cell surface membranes. In: ABRAHAMSSON, S. (Hrsg.) ; PASCHER, I. (Hrsg.): *Structure of Biological Membranes*. New York : Plenum Press, 1977, S. 245–74
- [90] KELLER, S. L. ; BEZRUKOV, S. M. ; GRUNER, S. M. ; TATE, M. W. ; VODYANOV, I. ; PARSESIAN, V. A.: Probability of alamethicin conductance states varies with nonlamellar tendency of bilayer phospholipids. In: *Biophys. J.* 65 (1993), Nr. 1, S. 23–27
- [91] KELLER, S. L. ; PITCHER, I. ; HUESTIS, W. H. ; MCCONNELL, H. M.: Red blood cell lipids form immiscible liquids. In: *Phys. Rev. Lett.* 81 (1998), Nr. 22, S. 5019–22
- [92] KLOSE, G. ; KÖNIG, B. ; PALTAUF, F. : Sorption isotherms and swelling of POPC in H₂O and ²H₂O. In: *Chem. Phys. Lipids* 61 (1992), Nr. 3, S. 265–70
- [93] KÖNIG, S. ; SACKMANN, E. ; RICHTER, D. ; ZORN, R. ; CARLILE, C. ; BAYERL, T. M.: Molecular dynamics of water in oriented DPPC multilayers studied by quasi-elastic neutron scattering and deuterium-nuclear magnetic resonance relaxation. In: *J. Chem. Phys.* 100 (1994), Nr. 4, S. 3307–16
- [94] KÖNIG, S. : *Untersuchungen zur molekularen Bewegung und Diffusion von Membranen mittels inkohärenter, quasielastischer Neutronenstreuung und Deuterium-NMR*, Technische Universität, Diss., 1993
- [95] KORNYSHEV, A. A. ; LEIKIN, S. : Fluctuation theory of hydration forces: the dramatic effects of inhomogeneous boundary conditions. In: *Phys. Rev. A* 40 (1989), Nr. 11, S. 6431–37
- [96] KUCHARCZYK, W. ; MACDONALD, P. M. ; STANISZ, G. J. ; HENKELMAN, R. M.: Relaxivity and magnetization transfer of white matter lipids at MR imaging: importance of cerebroside and pH. In: *Radiology* 192 (1994), Nr. 2, S. 521–29
- [97] KURZE, V. ; STEINBAUER, B. ; HUBER, T. ; BEYER, K. : A ²H-NMR study of macroscopically aligned bilayer membranes containing interfacial hydroxyl residues. In: *Biophys. J.* 78 (2000), Nr. 5, S. 2441–51
- [98] KURZE, V. : *Untersuchungen zur Hydratation orientierter Phospholipid-Membranen mittels magnetischer Kernresonanz-Spektroskopie*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 1998
- [99] LADBROOKE, B. D. ; CHAPMAN, D. : Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. In: *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969), Nr. 4, S. 304–56
- [100] LAFLEUR, M. ; FINE, B. ; STERNIN, E. ; CULLIS, P. R. ; BLOOM, M. : Smoothed orientational order profile of lipid bilayers by ²H-nuclear magnetic resonance. In: *Biophys. J.* 56 (1989), Nr. 5, S. 1037–41
- [101] LALITHA, S. ; KUMAR, A. S. ; COVEY, D. F. ; STINE, K. J.: Enantiospecificity of sterol-lipid interactions: first evidence that the absolute configuration of cholesterol affects the physical properties of cholesterol-sphingomyelin membranes. In: *Chem. Commun.* (2001), Nr. 13, S. 1192–93

- [102] LAMBA, O. P. ; BORCHMAN, D. ; SINHA, S. K. ; LAL, S. ; YAPPERT, M. C. ; LOU, M. F.: Structure and molecular conformation of anhydrous and of aqueous sphingomyelin bilayers determined by infrared and Raman spectroscopy. In: *J. Mol. Struct.* 248 (1991), Nr. 1–2, S. 1–24
- [103] LANGNER, M. ; KUBICA, K. : The electrostatics of lipid surfaces. In: *Chem. Phys. Lipids* 101 (1999), Nr. 1, S. 3–35
- [104] LED, J. J. ; GESMAR, H. : The applicability of the magnetization-transfer NMR technique to determine chemical exchange rates in extreme cases. The importance of complementary experiments. In: *J. Magn. Reson.* 49 (1982), Nr. 3, S. 444–63
- [105] LED, J. J. ; GESMAR, H. ; ABILDGAARD, F. : Applicability of magnetization transfer nuclear magnetic resonance to study chemical exchange reactions. In: *Methods Enzymol.* 176 (1989), S. 311–29
- [106] LEFÈVRE, T. ; SUBIRADE, M. : Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. In: *Int. J. Biol. Macromol.* 28 (2000), Nr. 1, S. 59–67
- [107] LENTZ, B. R. ; HOECHLI, M. ; BARENHOLZ, Y. : Acyl chain order and lateral domain formation in mixed phosphatidylcholine–sphingomyelin multilamellar and unilamellar vesicles. In: *Biochemistry* 20 (1981), Nr. 24, S. 6803–09
- [108] LEONARD, A. ; ESCRIVE, C. ; LAGUERRE, M. ; PEBAY-PEYROULA, E. ; NERI, W. ; POTT, T. ; KATSARAS, J. ; DUFOURC, E. J.: Location of cholesterol in DMPC membranes. A comparative study by neutron diffraction and molecular mechanics simulation. In: *Langmuir* 17 (2001), Nr. 6, S. 2019–30
- [109] LI, X.-M. ; MOMSEN, M. M. ; SMABY, J. M. ; BROCKMAN, H. L. ; BROWN, R. E.: Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 20, S. 5954–63
- [110] LIDE, D. : *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* 79. Auflage. Boca Raton (USA) : CRC Press, 1998
- [111] LINDAHL, E. : *Computational Modeling of Biological Membrane and Interface Dynamics*, Royal Institute of Technology, Stockholm, Diss., 2001
- [112] LINSEISEN, F. : *Festkörper-NMR-Untersuchungen zur molekularen Ordnung und Dynamik in Lipidmonoschichten und Lipiddoppelschichten*, Technische Universität München, Diss., 1995
- [113] LIPIDAT: www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu. (2001)
- [114] LLOYD-SMITH, J. : *Broadline 1H and 2H Nuclear Magnetic Resonance studies of binary lipid mixtures containing docosahexaenoic acid*, University of British Columbia, Kanada, PhD Thesis, 1999
- [115] LUM, K. ; CHANDLER, D. ; WEEKS, J. D.: Hydrophobicity at small and large length scales. In: *J. Phys. Chem. B* 103 (1999), Nr. 22, S. 4570–77
- [116] LUZ, Z. ; MEIBOOM, S. : The activation energies of proton transfer reactions in water. In: *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964), Nr. 22, S. 4768–9

- [117] MACDONALD, P. M. ; LEISEN, J. ; MARASSI, F. M.: Response of phosphatidylcholine in the gel and liquid-crystalline states to membrane surface charges. In: *Biochemistry* 30 (1991), Nr. 14, S. 3558–66
- [118] MARKOVA, N. ; SPARR, E. ; WADSOE, L. ; WENNERSTRÖM, H. : A calorimetric study of phospholipid hydration. Simultaneous monitoring of Enthalpy and Free Energy. In: *J. Phys. Chem. B* 104 (2000), Nr. 33, S. 8053–60
- [119] MARKS, F. : Der Stoffwechsel der Arachidonsäure. In: *Biologie in unserer Zeit* 30 (2000), Nr. 6, S. 342–53
- [120] MARRINK, S. J. ; BERKOWITZ, M. ; BERENDSEN, H. J. C.: Molecular dynamics simulation of a membrane/water interface: the ordering of water and its relation to the hydration force. In: *Langmuir* 9 (1993), Nr. 11, S. 3122–31
- [121] MARSH, D. : Water adsorption isotherms and hydration forces for lysolipids and diacyl phospholipids. In: *Biophys. J.* 55 (1989), Nr. 6, S. 1093–100
- [122] MARČELJA, S. ; RADIĆ, N. : Repulsion of interfaces due to boundary water. In: *Chem. Phys. Lett.* 42 (1976), Nr. 1, S. 129–30
- [123] MATTJUS, P. ; SLOTTE, J. P.: Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? In: *Chem. Phys. Lipids* 81 (1996), Nr. 1, S. 69–80
- [124] MAULIK, P. R. ; SHIPLEY, G. G.: N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 24, S. 8025–34
- [125] MAYER-KUCKUK, T. : *Kernphysik*. 6. Auflage. Stuttgart : Teubner-Verlag, 1994
- [126] MCINTOSH, T. J. ; SIMON, S. A. ; NEEDHAM, D. ; HUANG, C. H.: Interbilayer interactions between sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 7, S. 2020–24
- [127] MCINTOSH, T. J.: Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. In: *Chem. Phys. Lipids* 81 (1996), Nr. 2, S. 117–31
- [128] McMULLEN, T. P. ; MCELHANEY, R. N.: New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1234 (1995), Nr. 1, S. 90–98
- [129] MEIBOOM, S. : Nuclear magnetic resonance study of the proton transfer in water. In: *J. Chem. Phys.* 34 (1961), S. 375–88
- [130] MILHIET, P. E. ; DOMEQ, C. ; GIOCONDI, M.-C. ; VAN MAU, N. ; HEITZ, F. ; GRIMELLEQ, C. L.: Domain formation in models of the renal brush border membrane outer leaflet. In: *Biophys. J.* 81 (2001), Nr. 1, S. 547–55
- [131] MILLER, I. R. ; CHAPMAN, D. ; DRAKE, A. F.: Circular dichroism spectra of aqueous dispersions of sphingolipids. In: *Biochim. Biophys. Acta* 856 (1986), Nr. 3, S. 654–60.

- [132] MOURITSEN, O. G. ; BLOOM, M. : Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. In: *Biophys. J.* 46 (1984), Nr. 2, S. 141–53
- [133] MUKHOPADHYAY, A. ; LAW, B. M.: Dipole orientational order at the critical interface. In: *Phys. Rev. E* 63 (2001), Nr. 1-1, S. 011507/1–12
- [134] NAGLE, J. F. ; TRISTRAM-NAGLE, S. : Structure of lipid bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000), Nr. 3, S. 159–95
- [135] NASLAVSKY, N. ; SHMEEDA, H. ; FRIEDLANDER, G. ; YANAI, A. ; FUTERMAN, A. H. ; BARENHOLZ, Y. ; TARABOULOS, A. : Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. In: *J. Biol. Chem.* 274 (1999), Nr. 30, S. 20763–71
- [136] NELSESTUEN, G. L.: Significance of reduced dimensionality in reaction kinetics: impact of multi-site particles. In: *Chem. Phys. Lipids* 101 (1999), Nr. 1, S. 37–44
- [137] NELSON, D. L. ; COX, M. M.: *Lehninger, Principles of Biochemistry*. 3. Auflage. Cranbury (USA) : Worth Publishers, 2000
- [138] NEZIL, F. A. ; BLOOM, M. : Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes. In: *Biophys. J.* 61 (1992), Nr. 5, S. 1176–83
- [139] NIMTZ, G. ; ENDERS, A. ; BINGGELI, B. : Hydration dependence of the head group mobility in phospholipid (DMPC) membranes. In: *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 89 (1985), Nr. 8, S. 842–45
- [140] NYBERG, L. ; DUAN, R. D. ; NILSSON, A. : Sphingomyelin. A dietary component with structural and biological function. In: *Prog. Colloid Polym. Sci.* 108 (1998), S. 119–28
- [141] OLIVER, A. E. ; FISK, E. ; CROWE, L. M. ; DE ARAUJO, P. S. ; CROWE, J. H.: Phospholipase A₂ activity in dehydrated systems: effect of the physical state of the substrate. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1267 (1995), Nr. 2/3, S. 92–100
- [142] PAROLA, A. H.: Membrane Lipid-Protein Interactions. In: SHINITZKY, M. (Hrsg.): *Biomembranes—Physical Aspects* Bd. 1. Weinheim : Wiley-VCH, 1993, S. 159–278
- [143] PARSEGHIAN, V. A. ; RAU, D. C.: Water near intracellular surfaces. In: *J. Cell Biol.* 99 (1984), Nr. 1 (2), S. 196–200
- [144] PASCHER, I. : Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. In: *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976), Nr. 2, S. 433–51
- [145] PASENKIEWICZ-GIERULA, M. ; TAKAOKA, Y. ; MIYAGAWA, H. ; KITAMURA, K. ; KUSUMI, A. : Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. In: *Biophys. J.* 76 (1999), Nr. 3, S. 1228–40
- [146] PASENKIEWICZ-GIERULA, M. ; ROG, T. ; KITAMURA, K. ; KUSUMI, A. : Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study. In: *Biophys. J.* 78 (2000), Nr. 3, S. 1376–89

- [147] PERERA, L. ; ESSMANN, U. ; BERKOWITZ, M. L.: Role of water in the hydration force acting between lipid bilayers. In: *Langmuir* 12 (1996), Nr. 11, S. 2625–29
- [148] PERILLO, M. A. ; YU, R. K. ; MAGGIO, B. : Modulation of the surface electrostatics by selective modifications in the chemical structure of sphingolipids. In: ALLEN, M. (Hrsg.) ; CLEARY, S. (Hrsg.) ; SOWERS, A. (Hrsg.): *CHARGE AND FIELD EFFECTS IN BIOSYSTEMS* Bd. 4. Singapur : World Scientific Publishing, 1994, S. 110–21
- [149] PETRACHE, H. I. ; DODD, S. W. ; BROWN, M. F.: Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by ^2H NMR spectroscopy. In: *Biophys. J.* 79 (2000), Nr. 6, S. 3172–92
- [150] PINHEIRO, T. J. ; DURALSKI, A. A. ; WATTS, A. : Phospholipid headgroup-headgroup electrostatic interactions in mixed bilayers of cardiolipin with phosphatidylcholines studied by ^2H NMR. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 16, S. 4896–902
- [151] POMÈS, R. ; ROUX, B. : Free energy profiles for H^+ conduction along hydrogen-bonded chains of water molecules. In: *Biophys. J.* 75 (1998), Nr. 1, S. 33–40
- [152] POWERS, L. ; PERSHAN, P. S.: Monodomain samples of dipalmitoyl phosphatidylcholine with varying concentrations of water and other ingredients. In: *Biophys. J.* 20 (1977), Nr. 2, S. 137–52
- [153] PRATS, M. ; TOCANNE, J. F. ; TEISSIE, J. : Lateral proton conduction at a lipid/water interface. Effect of lipid nature and ionic content of the aqueous phase. In: *Eur. J. Biochem.* 162 (1987), Nr. 2, S. 379–85
- [154] PRATS, M. ; TEISSIE, J. ; TOCANNE, J. F.: Lateral proton conduction at lipid-water interfaces and its implications for the chemiosmotic-coupling hypothesis. In: *Nature* 322 (1986), Nr. 6081, S. 756–58
- [155] PROSSER, R. S. ; DALEMAN, S. I. ; DAVIS, J. H.: The structure of an integral membrane peptide: a deuterium NMR study of gramicidin. In: *Biophys. J.* 66 (1994), Nr. 5, S. 1415–28.
- [156] RAFFY, S. ; TEISSIE, J. : Control of lipid membrane stability by cholesterol content. In: *Biophys. J.* 76 (1999), Nr. 4, S. 2072–80
- [157] RAMSTEDT, B. ; LEPPIMAKI, P. ; AXBERG, M. ; SLOTTE, J. P.: Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. In: *Eur. J. Biochem.* 266 (1999), Nr. 3, S. 997–1002
- [158] RAND, R. P. ; FULLER, N. ; PARSEGIAN, V. A. ; RAU, D. C.: Variation in hydration forces between neutral phospholipid bilayers: evidence for hydration attraction. In: *Biochemistry* 27 (1988), Nr. 20, S. 7711–22
- [159] RIETVELD, A. ; SIMONS, K. : The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998), Nr. 3, S. 467–79
- [160] RUOCCO, M. J. ; SIMINOVITCH, D. J. ; LONG, J. R. ; DAS GUPTA, S. K. ; GRIFFIN, R. G.: ^2H and ^{13}C nuclear magnetic resonance study of N-palmitoyl-galactosylsphingosine (cerebroside)/cholesterol bilayers. In: *Biophys. J.* 71 (1996), Nr. 4, S. 1776–88

- [161] SACKMANN, E. : Biological membranes: architecture and function. In: *Handbook of Biological Physics* Bd. 1A. Amsterdam : Elsevier, 1995, S. 1–63
- [162] SACKMANN, E. : Physical basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles. In: *Handbook of Biological Physics* Bd. 1A. Amsterdam : Elsevier, 1995, S. 213–304
- [163] SACKMANN, E. ; FEDER, T. : Budding, fission and domain formation in mixed lipid vesicles induced by lateral phase separation and macromolecular condensation. In: *Mol. Membr. Biol.* 12 (1995), Nr. 1, S. 21–28
- [164] SAITO, H. ; ARIMOTO, I. ; TANAKA, M. ; SASAKI, T. ; TANIMOTO, T. ; OKADA, S. ; HANDA, T. : Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1486 (2000), Nr. 2–3, S. 312–20
- [165] SCHERER, J. R.: On the position of the hydrophobic/hydrophilic boundary in lipid bilayers. In: *Biophys. J.* 55 (1989), Nr. 5, S. 957–64
- [166] SCHLAME, M. ; RUA, D. ; GREENBERG, M. L.: The biosynthesis and functional role of cardiolipin. In: *Prog. Lipid Res.* 39 (2000), Nr. 3, S. 257–88
- [167] SCHMIDT, C. F. ; BARENHOLZ, Y. ; THOMPSON, T. E.: A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer systems. In: *Biochemistry* 16 (1977), Nr. 12, S. 2649–56
- [168] SCHMITT, U. W. ; VOTH, G. A.: The isotope substitution effect on the hydrated proton. In: *Chem. Phys. Lett.* 329 (2000), Nr. 1–2, S. 36–41
- [169] SEDDON, J. M. ; KAYE, R. D. ; MARSH, D. : Induction of the lamellar-inverted hexagonal phase transition in cardiolipin by protons and monovalent cations. In: *Biochim. Biophys. Acta* 734 (1983), Nr. 2, S. 347–52
- [170] SEELIG, J. : ³¹P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 515 (1978), Nr. 2, S. 105–40
- [171] SEELIG, J. ; MACDONALD, P. ; SCHERER, P. : Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. In: *Biochemistry* 26 (1987), Nr. 24, S. 7535–41
- [172] SEELIG, J. : Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. In: *Q. Rev. Biophys.* 10 (1977), Nr. 3, S. 353–418
- [173] SEELIG, J. ; SEELIG, A. : Lipid conformation in model membranes and biological membranes. In: *Q. Rev. Biophys.* 13 (1980), Nr. 1, S. 19–61
- [174] SHIBATA, A. ; IKAWA, K. ; SHIMOOKA, T. ; TERADA, H. : Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1192 (1994), Nr. 1, S. 71–78
- [175] SHIN, Y. K. ; BUDIL, D. E. ; FREED, J. H.: Thermodynamics and dynamics of phosphatidylcholine-cholesterol mixed model membranes in the liquid crystalline state: effects of water. In: *Biophys. J.* 65 (1993), Nr. 3, S. 1283–94

- [176] SIMINOVITCH, D. J. ; JEFFREY, K. R.: Orientational order in the choline headgroup of sphingomyelin: A ^{14}N -NMR study. In: *Biochim Biophys Acta* 645 (1981), Nr. 2, S. 270–78
- [177] SIMON, S. A. ; MCINTOSH, T. J.: Magnitude of the solvation pressure depends on dipole potential. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), Nr. 23, S. 9263–67
- [178] SIMONS, M. ; KELLER, P. ; DE STROOPER, B. ; BEYREUTHER, K. ; DOTTI, C. G. ; SIMONS, K. : Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), Nr. 11, S. 6460–64
- [179] SINGER, S. J. ; NICOLSON, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In: *Science* 175 (1972), Nr. 23, S. 720–31
- [180] SMABY, J. M. ; BROCKMAN, H. L. ; BROWN, R. E.: Cholesterol's interfacial interactions with sphingomyelins and phosphatidylcholines: Hydrocarbon chain structure determines the magnitude of condensation. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 31, S. 9135–42
- [181] SNYDER, B. ; FREIRE, E. : Compositional domain structure in phosphatidylcholine-cholesterol and sphingomyelin-cholesterol bilayers. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), Nr. 7, S. 4055–59
- [182] STRYER, L. : *Biochemie*. 4. Auflage. Heidelberg : Akademischer Verlag, 1996
- [183] SUBCZYNSKI, W. K. ; HYDE, J. S. ; KUSUMI, A. : Oxygen permeability of phosphatidylcholine-cholesterol membranes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), Nr. 12, S. 4474–78
- [184] TALBOTT, C. M. ; VOROBYOV, I. ; BORCHMAN, D. ; TAYLOR, K. G. ; DUPRE, D. B. ; YAPPERT, M. C.: Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1467 (2000), Nr. 2, S. 326–37
- [185] TANFORD, C. : *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. 2. Auflage. New York : John Wiley & Sons, 1980
- [186] TEISSIE, J. ; GABRIEL, B. ; PRATS, M. : Lateral communication by fast proton conduction: a model membrane study. In: *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993), Nr. 7, S. 243–46
- [187] TEISSIE, J. ; PRATS, M. ; SOUCAILLE, P. ; TOCANNE, J. F.: Evidence for conduction of protons along the interface between water and a polar lipid monolayer. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), Nr. 10, S. 3217–21
- [188] THEWALT, J. L. ; BLOOM, M. : Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams. In: *Biophys. J.* 63 (1992), Nr. 4, S. 1176–81
- [189] TIELEMAN, D. P. ; MARRINK, S. J. ; BERENDSEN, H. J. C.: A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1331 (1997), Nr. 3, S. 235–70
- [190] TROUARD, T. P.: *Acyl chain dynamics in model phospholipid membranes as studied by deuterium NMR spectroscopy*, University of Virginia, USA, PhD Thesis, 1992

- [191] TU, K. ; KLEIN, M. L. ; TOBIAS, D. J.: Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. In: *Biophys. J.* 75 (1998), Nr. 5, S. 2147–56
- [192] ULMIUS, J. ; WENNERSTRÖM, H. ; LINDBLOM, G. ; ARVIDSON, G. : Deuteron nuclear magnetic resonance studies of phase equilibria in a lecithin-water system. In: *Biochemistry* 16 (1977), Nr. 26, S. 5742–45
- [193] ULRICH, A. S. ; WATTS, A. : Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by ^2H -NMR. In: *Biophys. J.* 66 (1994), Nr. 5, S. 1441–49
- [194] ULRICH, A. ; VOLKE, F. ; WATTS, A. : The dependence of phospholipid head-group mobility on hydration as studied by deuterium-NMR spin-lattice relaxation time measurements. In: *Chem. Phys. Lip.* 55 (1990), S. 61–66
- [195] UNTRACHT, S. H. ; SHIPLEY, G. G.: Molecular interactions between lecithin and sphingomyelin. Temperature- and composition-dependent phase separation. In: *J. Biol. Chem.* 252 (1977), Nr. 13, S. 4449–57
- [196] VANCE, D. E. ; VANCE, J. E.: *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Menlo Park (USA) : Benjamin Cummings, 1985
- [197] VILLALAIN, J. ; ORTIZ, A. ; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.: Molecular interactions between sphingomyelin and phosphatidylcholine in phospholipid vesicles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 941 (1988), Nr. 1, S. 55–62
- [198] VIST, M. R. ; DAVIS, J. H.: Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ^2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 2, S. 451–64
- [199] VOGLINO, L. ; MCINTOSH, T. J. ; SIMON, S. A.: Modulation of the binding of signal peptides to lipid bilayers by dipoles near the hydrocarbon-water interface. In: *Biochemistry* 37 (1998), Nr. 35, S. 12241–52
- [200] VOLKE, F. ; ARNOLD, K. ; GAWRISCH, K. : The effect of hydration on the mobility of phospholipids in the gel state. A proton nuclear magnetic resonance spin echo study. In: *Chem. Phys. Lipids* 31 (1982), Nr. 2, S. 179–89
- [201] VOLKE, F. ; EISENBLÄTTER, S. ; GALLE, J. ; KLOSE, G. : Dynamic properties of water at phosphatidylcholine lipid-bilayer surfaces as seen by deuterium and pulsed field gradient proton NMR. In: *Chem. Phys. Lipids* 70 (1994), Nr. 2, S. 121–31
- [202] VOLKE, F. ; EISENBLÄTTER, S. ; KLOSE, G. : Hydration force parameters of phosphatidylcholine lipid bilayer as determined from ^2H -NMR studies of deuterated water. In: *Biophys. J.* 67 (1994), Nr. 5, S. 1882–87
- [203] WALES, D. J.: Structure, dynamics, and thermodynamics of clusters: tales from topographic potential surfaces. In: *Science* 271 (1996), Nr. 5251, S. 925–29
- [204] WASSALL, S. R.: Pulsed field gradient-spin echo NMR studies of water diffusion in a phospholipid model membrane. In: *Biophys. J.* 71 (1996), Nr. 5, S. 2724–32
- [205] WEISS, W. ; ENDERS, A. ; NIMTZ, G. : Connectivity of hydrogen bonds in water between lecithin bilayers. In: *Phys. Rev. A* 33 (1986), Nr. 3, S. 2137–39

- [206] WHEELER, O. H. ; MATEOS, J. L.: Stereochemistry of reduction of ketones by complex metal hydrides. In: *Can. J. Chem.* 36 (1958), S. 1431–35
- [207] WILTON, D. C.: Anionic phospholipids and the regulation of cell functions. In: *Biochem. Soc. Trans.* 26 (1998), Nr. 3, S. 378–83
- [208] WIMPERIS, S. : Broadband and narrowband composite excitation sequences. In: *J. Magn. Reson.* 86 (1990), Nr. 1, S. 46–59
- [209] WOLFE, J. ; BRYANT, G. : Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. In: *Cryobiology* 39 (1999), Nr. 2, S. 103–29

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kurze, V., Steinbauer, B., Huber, T., Beyer, K.: A ^2H -NMR study of macroscopically aligned bilayer membranes containing interfacial hydroxyl residues. In: *Biophys. J.* 78 (2000), Nr. 5, S. 2441–51

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Stoffwechselbiochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Professor Klaus Beyer. Seinen zahlreichen Anregungen und seinen schier unbegrenzten Literaturkenntnissen verdanke ich es, daß ich als „Novize“ auf dem Gebiet der Membranspektroskopie die vorliegende Arbeit trotz zahlreicher Unterbrechungen zügig fertigstellen konnte.

Einen herzlichen Dank auch an alle weiteren Personen, die mir in den letzten 3 Jahren geholfen haben:

- Herrn Prof. Sackmann, der vorbehaltlos die Betreuung eines weiteren Doktoranden auf sich genommen hat,
- Herrn Prof. Baumeister für die Unterstützung zum Ende meiner Arbeit,
- Thomas Huber für unsere gute Zusammenarbeit, auch über den großen Teich hinweg,
- Brigitte Nuscher für die Präparation der Proben und ihre Geduld, wenn ich deutliche Spuren im Labor hinterließ,
- Volker Kurze für die Einführung in das Thema und seinen Beistand bei technischen Fragen,
- Michael Bärman und Matthias Schneider für die Meßzeiten in Garching,
- den Leuten in der Werkstatt für tatkräftige Hilfe,
- meinen Eltern und Geschwistern

und natürlich Claudia, die geduldig meine langen Abende im Labor hingenommen hat.