

4 Mechanochemische Eigenschaften von Phospholipidvesikeln

Im vorangegangenen Kapitel erfolgte eine eingehende Untersuchung der Interaktion von Amphiphil und lipophilem Solubilisat auf molekularer Ebene sowie eine Charakterisierung des Einflusses auf die intrinsischen Eigenschaften der Doppelschicht. An dieser Stelle bleibt jedoch die Frage zu beantworten, inwiefern ein lipophiles Solubilisat die mechanische Beschaffenheit der Doppelschicht und insbesondere die elastischen Membraneigenschaften beeinflusst. Hierzu wird im folgenden Kapitel eine im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Methode zur Bestimmung elastischer Konstanten vorgestellt und zunächst eingehend geprüft. Im Anschluß erfolgt eine detaillierte Analyse des Einflusses lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit von Phospholipidvesikeln und eine Korrelation der Ergebnisse mit den Beobachtungen auf molekularer Ebene.

4.1 Elastische Eigenschaften amphiphiler Substanzen

Die elastischen Eigenschaften dominieren das dynamische Verhalten sowohl bei Krümmungsänderungen, als auch beim Strecken von Mono- bzw. Doppelschichten und die thermodynamischen Eigenschaften von Amphiphilfilmen an Grenzflächen. Der Krümmungselastizität kommt ferner bei der thermodynamischen Betrachtung von Mikroemulsionen und lamellaren Phasen eine zentrale Rolle zu. Viele charakteristische Phänomene im Bereich biologischer Membranen, wie das wohlbekanntes „Flickering“ der Erythrocyten, beruhen auf dem elastischen Verhalten [87].

4.2 Elastizität von Vesikeln

Das Verhalten und die Gestalt fluider Vesikel wird wesentlich durch die elastischen Eigenschaften der Membranen geprägt. Diese sind durch ein hochelastisches Verhalten und eine geringe Biegesteifigkeit k_c in Größenordnungen von $k_c = 10 - 40 kT$ gekennzeichnet. Vesikel nehmen diejenige Gestalt an, bei der die Krümmungsenergie minimal ist. Basierend auf dieser Grundlage wird es möglich, Vesikelgestalten aber auch Gestaltänderung theoretisch zu beschreiben und auf Beobachtungen in biologischen Systemen wie die Gestalt der Erythrocyten oder zellulären Vorgängen wie der Endo- und Exocytose zu projizieren. Die Kenntnis der Biegesteifigkeit ist weiterhin von essentieller Bedeutung für die Charakterisierung des Verhaltens von Vesikeln in Kapillaren.

Die Vesikelmembran zeigt in der fluiden Phase bei schwacher mechanischer Belastung drei wesentliche elastische Eigenschaften.

4.2.1 Scherelastizität

Die Scherelastizität kann für Doppelschichten in der fluiden Phase aufgrund der hohen lateralen Beweglichkeit der Lipidmoleküle als ineffektiv betrachtet werden [88]. Sie wird folglich bei weiteren Betrachtungen vernachlässigt. Die Scherelastizität spielt jedoch eine entscheidende Rolle, falls eine zusätzliche Vernetzung der Amphiphilmoleküle untereinander vorliegt. Sie hat weiterhin Bedeutung im Bereich biologischer Membranen. Hier liegt wie im Falle der Erythrocyten ein zellspezifisches Zytoskelett vor, ein in der Membran verankertes Polymergeflecht, welches die elastischen Membraneigenschaften maßgeblich beeinflusst.

4.2.2 Dehnungselastizität

Eine Deformation in Form eines tangentialen Drucks oder einer Spannung tritt in Erscheinung, sobald die Membranfläche in Form einer Dehnung oder Stauchung verändert wird. Falls die Zeitspanne dieser Systemstörung kleiner ist als die Zeit, die das System benötigt, um Moleküle aus einem Reservoir, z.B. der Bulkphase, auszutauschen, so entspricht diese Störung einer elastischen Deformation. Die Molekülanzahl in der Membran von Phospholipidvesikeln ist aufgrund der geringen Löslichkeit der Amphiphile festgelegt. Die Dehnungsenergie E_s pro Fläche A einer elastischen Deformation ist somit gegeben durch

$$E_s = \frac{1}{2} k_s \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (4.1)$$

wobei $\Delta A = A - A_0$.

Typische Werte für den Dehnungsmodul k_s liegen im Bereich von 100 - 300 mN · m⁻¹ [89]. Somit benötigt jede Form der lateralen Deformation eine verhältnismäßig große Energiemenge entsprechend dem Vierfachen der Grenzflächenspannung einer Öl/Wasser-Grenzfläche [20]. Eine Ausdehnung der Membranfläche, wie sie beispielsweise mit der Mikropipettentechnik erzeugt werden kann, ist um etwa 5 % möglich; eine weitere Ausdehnung führt zur Bildung lipophiler Poren bzw. zum Bruch der Vesikel [90].

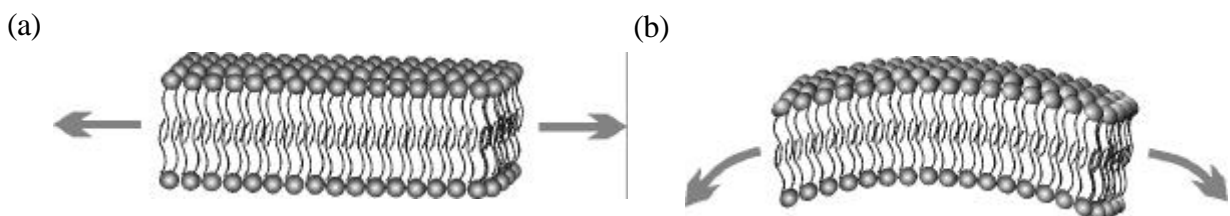


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Dehnung (a) und Krümmung (b) einer Phospholipiddoppelschicht.

4.2.3 Krümmungselastizität

Die fluiden Membranen der Phospholipidvesikel sind durch eine hohe Flexibilität gekennzeichnet und als hochelastisch zu betrachten. Vesikel sind aus diesem Grunde in der Lage, thermisch angeregt um ihren Gleichgewichtslage zu fluktuieren, d.h. zu undulieren. Diese Auslenkungen vom Energieminimum erfolgt unter Erhöhung der Konformations-Entropie und ist eine Folge der zweidimensionalen Brown'schen Molekularbewegung. Typische Werte für den Modul der Biegesteifigkeit k_c von Phospholipidvesikeln liegen im Bereich von $k_c = (1 - 2) \cdot 10^{-19}$ J [91,92,93]. Die zum Biegen der Membran aufzuwendende Energie liegt weit unterhalb der zur Dehnung nötigen. Bei Einwirkung kleiner Kräfte auf die Vesikelmembran dominiert infolgedessen die Krümmungselastizität der Membran, so daß der Fokus der Untersuchungen auf die Charakterisierung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c gelegt wird.

4.3 Bestimmung der Biegesteifigkeit

Der vertikale Durchmesser der Phospholipiddoppelschicht ist mit etwa 4 nm im Vergleich zur lateralen Ausdehnung von einigen 10 μm vernachlässigbar klein. Die fluide Membran kann somit mathematisch als eine zweidimensionale elastische Fläche in einem dreidimensionalen Raum betrachtet werden. Die elastische Energie dieser Fläche wird im wesentlichen durch die Krümmungsenergie E_c bestimmt. Der mathematischen Betrachtung zur Ermittlung der Biegesteifigkeit aus den Fluktuationen um die Gleichgewichtslage liegen hierbei folgende Voraussetzungen zugrunde:

Die Membranfläche A ist eine für jedes Vesikel konstante Größe, da wie beschrieben der Austausch von Molekülen mit der Wasserphase aufgrund der geringen Löslichkeit der Lipide vernachlässigt werden kann. Gleichzeitig wird das Volumen V des Vesikels als konstant angesehen, da die Diffusion von Wasser durch den lipophilen Membranbereich ein für den Beobachtungszeitraum langsamer Prozeß ist. Desweiteren ist die Flächendifferenz $\Delta A_{\text{Membran}}$ der inneren und äußeren Monoschicht nach $\Delta A_{\text{Membran}} = A_a - A_i$ als konstant zu betrachten, da ein Molekülaustausch zwischen den Monoschichten in Form eines „Flip-Flop“-Prozesses eine hohe Aktivierungsenergie erfordert.

Die Änderung der Krümmung der Membran in eine Richtung wird durch das Auftreten eines Krümmungsmomentes ermöglicht, wobei eine Monoschicht gedehnt und die andere gestaucht wird. Zur Ermittlung des Beitrags der Krümmung an der freien Energie betrachtet man ein lokales Koordinatensystem mit der z-Achse parallel zur Flächennormalen. Die Abszisse und die Ordinate liegen in Richtung der Hauptkrümmungen c_x und c_y . Die Deformation der Membran wird nunmehr beschrieben durch die Verschiebung u der Doppelschicht in der Normalenrichtung.

Es gilt

$$c_x = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \text{ sowie } c_y = \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}.$$

Bei der Entwicklung in zweiter Ordnung tragen nur die Terme zur Krümmungsenergie bei, die von der Orientierung des Koordinatensystems unabhängig sind. Die von Helfrich beschriebene Kontinuums-Theorie der Elastizität flüssiger Membranen liefert für die elastische Energie pro Flächeneinheit für kleine Deformationen den Ausdruck [88]

$$E_c = \frac{1}{2} k_c \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} - c_0 \right)^2 + \bar{k}_c \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \cdot \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} - \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right) \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right) \right)$$

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot k_c (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{k}_c \cdot c_1 \cdot c_2. \quad (4.2)$$

k_c bezeichnet den Modul der Biegesteifigkeit und $c_1 = r_1^{-1}$, $c_2 = r_2^{-1}$ die beiden Hauptkrümmungen. Der lineare Term c_0 kennzeichnet die spontane Krümmung, einen Parameter, der eine lokale Vorkrümmung der Fläche, d.h. einen möglichen nicht-flachen, relaxierten Zustand der Membran, beschreibt. Dieses ist zu berücksichtigen, falls auf beiden Membranseiten verschiedene wäßrige Lösungen angrenzen, oder die beiden Monoschichten unterschiedliche Moleküle aufweisen. Die Membran besitzt in diesen Fällen schon eine bevorzugte Krümmung, die in der freien Energie als Nullpunktsverschiebung für die Krümmung durch c_0 einbezogen wird.

Während die elastische Konstante k_c die zylindrische Krümmung beschreibt und sich auf Änderungen in der mittleren Krümmung H

$$H = \frac{c_1 + c_2}{2} \quad (4.3)$$

bezieht, charakterisiert der Modul der Gauß'schen Krümmung \bar{k}_c eine sattelförmige, gemäß

$$K = c_1 \cdot c_2. \quad (4.4)$$

Hierbei hängt der Modul der Gauß'schen Krümmung für eine homogene, isotrope Fläche von deren Topologie ab. Für eine geschlossene Kugelschale, wie die im folgenden betrachteten quasi-sphärischen Vesikel, liefert die Integration über die gesamte Fläche nach dem Gauß-Bonnet-Theorem [94] einen konstanten Betrag von $4\pi\bar{k}_c$. Die Vesikelgestalt ist somit unabhängig von \bar{k}_c .

Für die freie Energie E_c eines sphärischen Vesikels mit $c_1 = c_2$ gilt folglich unter Vernachlässigung einer spontanen Krümmung ($c_0 = 0$)

$$E_c = \frac{k_c}{2} \cdot \int_A dA (c_1 + c_2)^2 = 8\pi k_c. \quad (4.5)$$

4.4 Methoden zur Bestimmung der Biegesteifigkeit

Zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften von Vesikeln existieren eine Reihe verschiedener Techniken. Diese können in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden.

Die erste Kategorie bezeichnet invasive Methoden wie die Mikropipetten-Einsaugtechnik. Diese beruhen, wie auch die Technik der Deformation quasi-sphärischer Vesikel im elektrischen Feld [93,95], auf der Untersuchung der Reaktion der Membran auf eine angelegte Kraft [96,97]. In die zweite Kategorie fallen nicht-invasive Methoden wie beispielsweise die Synchrotron-Röntgenstreuungstechnik [98]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete lichtmikroskopische Methode der Fluktuationsanalyse fällt ebenfalls in diese Kategorie. Sie beruht auf der Ermittlung der Biegesteifigkeit aus den mittleren quadratischen Amplituden thermisch angeregter Fluktuationen quasi-sphärischer [99,100] oder tubusförmiger Vesikel [101].

4.4.1 Prinzip der Fluktuationsanalyse

Die Fluktuationsanalyse einzelner frei fluktuierender, quasi-sphärischer Vesikel ist eine Methode der Lichtmikroskopie zur berührungsfreien Bestimmung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c . Sie beruht auf der Arbeit von Schneider et al. im Jahre 1984 [99] und wurde durch Milner und Safran [102] weiterentwickelt. Das zugrundeliegende Modell basiert auf der Entwicklung der Abweichung der Vesikelmembran von der sphärischen Gestalt in zweiter Ordnung. Entsprechend können die Auslenkungen mit Hilfe dreidimensionaler Kugelfunktionen beschrieben und die Amplituden der Kugelfunktionen als Funktion der Biegesteifigkeit k_c sowie der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ ausgedrückt werden. Da die mikroskopischen Untersuchungen zunächst nur Informationen über die Fluktuationsamplituden der zweidimensionalen Kontur liefern, erfolgt die Korrelation mit der dreidimensionalen Theorie unter Verwendung eines Projektionsalgorithmus.

4.4.2 Theoretische Grundlagen

Ein Vesikel kann wie beschrieben als eine quasi-sphärische Hülle mit einem konstanten Volumen V und einer konstanten Fläche A betrachtet werden. Besitzt das Vesikel verglichen mit einer Kugel gleichen Volumens einen Flächenüberschuß Δ , so kann ein äquivalenter Radius r_0 einer entsprechenden Kugel gleichen Volumens V definiert werden. Es gilt

$$V = \frac{4\pi}{3} r_0^3 . \quad (4.6)$$

Mit Definition des dimensionslosen Flächenüberschusses Δ , der die für die Fluktuationen zur Verfügung stehende Fläche kennzeichnet, folgt ferner

$$A = 4\pi r_0^2 (1 + \Delta), \quad (4.7)$$

wobei $\Delta \geq 0$ ist.

Die Brown'sche Molekularbewegung bedingt eine thermische Anregung quasi-sphärischer Vesikel und bewirkt eine permanente Oszillation der Vesikelgestalt um die Gleichgewichtsform. Die Deformationen um eine sphärische mittlere Form können folglich durch eine Reihenentwicklung bis zur zweiten Ordnung zu einem Zeitpunkt t gemäß

$$r(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t) = r_0 (1 + u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)) \quad (4.8)$$

definiert werden. Hierbei kennzeichnen $u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)$ die relativen Deformationen eines geringfügig deformierten Vesikels mit

$$|u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)| \ll 1, \text{ sowie } \Delta \ll 1,$$

wobei der Ursprung im Vesikelzentrum liegt. Der Radius $r(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)$ wird in Polarkoordinaten mit dem Polarwinkel \mathbf{J} und dem Azimutwinkel \mathbf{j} ausgedrückt.

Der dynamische Teil der Deformationen, d.h. die thermischen Fluktuationen können somit in Termen der Kugelfunktionen $Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j})$ mit den zeitabhängigen Amplituden $a_l^m(t)$ beschrieben werden. Mit

$$u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t) = \sum_{l,m}^{l_{\max}} a_l^m(t) Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j}) \quad (4.9)$$

folgt aus (4.8)

$$r(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t) = r_0 \left(1 + \sum_{l,m}^{l_{\max}} a_l^m(t) Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j}) \right) \quad (4.10)$$

mit $l \geq 2$ und $|m| \leq l$.

Die Summation über alle l beginnt bei $l = 2$, da, falls die Moden mit $l = 0$ von Null verschieden sind, die Restriktion der Volumenkonstanz nicht eingehalten wird. Moden mit $l = 1$ hingegen entsprechen einer Translation der Sphäre. Sind diese von Null verschieden, so stimmt das ermittelte Massenzentrum nicht mehr mit dem des wahren Volumens V überein. Die Wellenzahl l_{\max} repräsentiert die Grenze der Summation, entsprechend der Mode mit der kleinsten möglichen Wellenlänge. Diese liegt im Bereich der Dicke der Doppelschicht.

Die Kugelfunktionen $Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j})$ werden durch die Legendre Polynome $P_l^m(\cos \mathbf{j})$ nach

$$Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j}) = (-1)^m \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi} \frac{(l-m)!}{(l+m)!}} \cdot P_l^m(\cos \mathbf{j}) \cdot e^{im\mathbf{J}} \quad (4.11)$$

mit dem angulären Moment l und der Quantenzahl m definiert [103].

Befindet sich ein Vesikel in einem thermischen Reservoir und ist der Druck im Inneren des Vesikels gleich dem äußeren, so kann mit (4.10) der zeitliche Erwartungswert der Fluktuationsamplituden mit der Temperatur in Beziehung gesetzt werden. Die einzelnen Schwingungsmoden sind nach der hydrodynamischen Theorie der Modenrelaxation nicht gekoppelt [104]. Aus diesem Grunde lassen sich die Amplituden jeder Kugelfunktion berechnen. Als kanonische Variable der Energie gehen die Amplituden quadratisch in die Energie ein und liefern gemäß dem Gleichverteilungssatz einen Betrag von $\frac{1}{2} kT$. Die normalisierten mittleren quadratischen Amplituden der Kugelfunktionen sind mit $c_0 = 0$ gemäß [102]

$$\langle |a_l^m|^2 \rangle = \frac{kT}{k_c (l+2) (l-1) [l(l+1) + \bar{s}]} \quad (4.12)$$

charakterisiert. Durch Einführung des dimensionslosen Lagrangeparameters \bar{s} , einer effektiven (*reduzierten*) Grenzflächenspannung, wird hierbei die Zwangsbedingung der konstanten Membranfläche berücksichtigt. Aus (4.12) wird ersichtlich, daß die Berechnung des Erwartungswerts des Amplitudenquadrats als Scharmittel durch die Bestimmung einzelner Zustände der Fluktuation in beliebiger Zeitabfolge nach Zerlegung in die jeweiligen Kugelfunktionen möglich ist.

$$\langle |a_l^m|^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} |a_l^m|^2 \quad (4.13)$$

Der Ausdruck $\langle \rangle$ kennzeichnet hierbei den zeitlichen Mittelwert. Die freie Energie eines quasi-sphärischen fluktuierenden Vesikels folgt unter Vernachlässigung der spontanen Krümmung sowie der effektiven Spannung der Beziehung

$$E_c = 8\mathbf{p} k_c + \frac{k_c}{2} \sum_{l,m}^{\infty} (l+2) \cdot (l-1) \cdot l(l+1) \cdot |a_l^m(t)|^2 \quad (4.14)$$

für Wellenzahlen $l \geq 2$. Die Energie E_c ist somit $(2l+1)$ -fach in m entartet [§].

4.4.2.1 Bedeutung der effektiven Grenzflächenspannung

Die effektive, dimensionslose Grenzflächenspannung \bar{s} , die in (4.12) auftaucht, kann physikalisch als Spannungsterm gemäß einer reduzierten Membranspannung

$$\bar{s} = \frac{\mathbf{s} \cdot r_0^2}{k_c} \quad (4.15)$$

mit der lateralen Spannung σ definiert werden und resultiert aus der Entropie der Flickerbewegung. Während der Biegesteifigkeitsmodul k_c eine Konstante des Lipids darstellt, entspricht die effektive Spannung vielmehr einer geometrischen Eigenschaft des Vesikels. Diese wird im wesentlichen durch das Verhältnis von Membranfläche zu Vesikelvolumen zum Zeitpunkt der Vesikelbildung bestimmt und verdeutlicht die Individualität des einzelnen

[§] Die Wellenzahlen $l = 0$ und $l = 1$ entsprechen einer Änderung der Größe der Sphäre, bzw. einer Translation und tragen nicht zur Krümmungsenergie bei.

Vesikels. Experimentell können durchaus Vesikel beobachtet werden, die negative Werte der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ aufweisen. Die Grenze des beschriebenen Modells liegt gemäß Gleichung (4.12) bei $\bar{\sigma} \leq -6$. In diesem Bereich nehmen die Vesikel ellipsoidale Gestalt an und die Beschreibung über die Kugelfunktionen verliert die Gültigkeit.

Die Überschußfläche Δ ist gegenüber der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$, dem beschriebenen Lagrangeparameter, eine physikalisch anschauliche Größe. Δ beschreibt den normierten Flächenüberschuß im Vergleich zu einer Kugel gleichen Volumens mit der Fläche A_0 gemäß

$$\Delta = \frac{A - A_0}{A_0} \quad (4.16)$$

Die Überschußfläche ist mit der effektiven Spannung verknüpft durch [105]

$$\Delta = \frac{kT}{8pk_c} \sum_{l \geq 2}^{l_{\max}} \frac{2l+1}{l \cdot (l+1) + \bar{\sigma}}. \quad (4.17)$$

4.4.3 Korrelation der experimentellen Daten mit der Theorie

Die Verwendung der Videomikroskopie erlaubt die Beobachtung thermisch angeregter Formfluktuationen von Vesikeln. Mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung ist die Detektion der Vesikelkontur zu verschiedenen Zeitpunkten t und eine nachfolgende Analyse der Konturdaten möglich.

Das vorgestellte Modell dient zur Beschreibung der Fluktuationen um die sphärische Gestalt und ist für die Untersuchung riesiger nahezu sphärischer Vesikel mit Durchmessern von 5 - 30 μm geeignet, die eine geringe Überschußfläche Δ aufweisen. Diese gelten im folgenden als quasi-sphärisch, d.h. im Mittel rund und weisen keinerlei Vorzugsrichtung auf. Das entsprechende mikroskopische Bild liefert für den Bereich maximalen Kontrastes idealerweise Informationen über die Formfluktuationen in der Äquatorialebene des Vesikels. Hierbei dient der Vesikelschwerpunkt als Bezugsgröße. Bei genügend langer Beobachtungszeit werden alle räumlichen Fluktuationen in der Beobachtungsebene wiedergeben. Die eigentliche Beobachtungszeit sollte hierbei groß im Vergleich zur Relaxationszeit der Moden sein, wobei Beobachtungszeiten von 3 - 5 Minuten in der Regel ausreichen.

Die Untersuchung mittels der Mikroskopie liefert jedoch ausschließlich Informationen über die Formfluktuationen in der äquatorialen Ebene des Vesikels. Diese müssen mit der dreidimensionalen Theorie verknüpft werden. Hierzu existieren zwei unterschiedliche Ansätze, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

4.4.4 Fourieranalyse der Konturfluktuationen

Die erstmals von Engelhardt et al. [106] vorgestellte Methode beruht auf der Fourieranalyse der beobachteten Kontur, wobei die Amplituden der verschiedenen Moden zur Bestimmung der Biegesteifigkeit als eine komplexe Summe der Kugelfunktionen ausgedrückt werden.

Die relativen Deformationen $u(\mathbf{j}, t)$ der Konturfluktuation als Abweichung der Vesikeloberfläche von derjenigen einer Sphäre können in der xy -Ebene ($\mathbf{J} = \mathbf{p}/2$) nach Fouriertransformation als zeitabhängige Amplituden $\mathbf{n}_q(t)$ ausgedrückt werden durch

$$\mathbf{n}_q(t) = \frac{1}{2\mathbf{p}} \int_0^{2\mathbf{p}} u(\mathbf{j}, t) e^{i\mathbf{q}\mathbf{j}} d\mathbf{j} . \quad (4.18)$$

Mit (4.9) folgt für die zeitabhängigen Amplituden in der Ebene

$$\mathbf{n}_q(t) = \frac{1}{2\mathbf{p}} \sum_{l=q}^{l=\max} \sum_{m=-l}^{m=l} a_{l,m}(t) \int_0^{2\mathbf{p}} Y_l^m\left(\frac{\mathbf{p}}{2}, \mathbf{j}\right) e^{i\mathbf{q}\mathbf{j}} d\mathbf{j} , \quad (4.19)$$

sowie für die Amplitudenquadrate

$$\langle |\mathbf{n}_q(t)|^2 \rangle = \sum_{l=q}^{l=\max} \langle |a_l^m(t)|^2 \rangle \left[P_l^q(\cos \mathbf{p}/2) \right]^2 \cdot \frac{2l+1}{4\mathbf{p}} \cdot \frac{(l-q)!}{(l+q)!} . \quad (4.20)$$

Hierbei sind $\left[P_l^q(\cos \mathbf{p}/2) \right]^2$ die Werte der assoziierten Legendre-Polynome in der äquatorialen Ebene.

Die Summation beginnt bei $l = q$, mit $l_{\min} \geq 2$, da sonst der Nenner divergiert. Die Summe ist also eine Funktion der dimensionslosen Wellenzahl der Kontur. Die mittleren quadratischen Amplituden der Konturfluktuationen in der Ebene stehen direkt mit denen der Kugelfunktionen entsprechend Gleichung (4.12) in Verbindung, so daß der Biegesteifigkeitsmodul k_c nach

$$k_c = \frac{kT}{\langle |\mathbf{n}_q|^2 \rangle} \sum_{l=q}^{l=\max} \frac{2l+1}{4\mathbf{p}} \cdot \frac{(l-q)!}{(l+q)!} \cdot \frac{\left[P_l^q(\cos \mathbf{p}/2) \right]^2}{(l-1)(l+2)[l \cdot (l+1) + \bar{\mathcal{S}}]} \quad (4.21)$$

ermittelt werden kann. Zur exakten Bestimmung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c sowie der effektiven Grenzflächenspannung $\bar{\mathcal{S}}$ ist jedoch die Durchführung eines Fits von $\mathbf{n}_q(t)$ als Funktion der Wellenzahl q nötig. Dies ist insofern problematisch, als daß die mittleren quadratischen Amplituden der Konturfluktuation eine komplexe Summe über viele mittlere quadratische Amplituden der Kugelfunktion in Abhängigkeit von den Parametern k_c und $\bar{\mathcal{S}}$ darstellt, so daß die Anpassung aufwendig ist. Aus diesem Grunde wird bei dieser Methode im allgemeinen die effektive Grenzflächenspannung mit $\bar{\mathcal{S}} \cong 0$ vernachlässigt.

4.4.5 Analyse der Konturfluktuationen mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion

Die zweite Methode wurde erstmals von Bivas et al. [100] vorgestellt. Sie basiert auf der Analyse der Autokorrelationsfunktion der Konturfluktuationen. Für die normalisierte anguläre Autokorrelationsfunktion $\mathbf{x}(\mathbf{g}, t)$ eines Vesikels mit dem Radius r gilt zu einem Zeitpunkt t [107]

$$\mathbf{x}(\mathbf{g}, t) = \frac{1}{r_o^2} \left[\frac{1}{2\mathbf{p}} \int_0^{2\mathbf{p}} r(\mathbf{j} + \mathbf{g}, t) \cdot r^*(\mathbf{j}, t) d\mathbf{j} - r^2(t) \right]. \quad (4.22)$$

Die zeitlich gemittelte Autokorrelationsfunktion folgt somit der Beziehung

$$\mathbf{x}(\mathbf{g}) = \langle \mathbf{x}(\mathbf{g}, t) \rangle = \sum_{l=2}^{l_{\max}} \sum_{m \neq 0} \left\langle |a_l^m(t)|^2 \right\rangle Y_l^m \left(\frac{\mathbf{p}}{2}, \mathbf{g} \right) Y_l^m \left(\frac{\mathbf{p}}{2}, 0 \right). \quad (4.23)$$

Letztere kann als eine Reihe von Legendre-Polynomen $P_l(\cos \mathbf{g})$ mit den theoretischen Koeffizienten $B_l(\bar{\mathbf{s}}, k_c)$ ausgedrückt werden, welche nach dem Gleichverteilungsprinzip gegeben sind gemäß

$$\mathbf{x}(\mathbf{g}) = \langle \mathbf{x}(\mathbf{g}, t) \rangle = \sum_{l=2}^{l_{\max}} B_l(\bar{\mathbf{s}}, k_c) P_l^0(\cos \mathbf{g}). \quad (4.24)$$

Die Amplituden der Dekomposition stehen in direkter Beziehung zu den Amplituden der Kugelfunktionen, so daß der Biegesteifigkeitsmodul k_c aus der Beziehung

$$B_l(\bar{\mathbf{s}}, k_c) = \frac{kT}{4\mathbf{p}k_c} \cdot \frac{2l+1}{(l-1)(l+2) \cdot [\bar{\mathbf{s}} + l(l+1)]} \quad (4.25)$$

mit $l \geq 2$ erhalten werden kann. Zur Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c wird die experimentelle Autokorrelationsfunktion für jede Kontur bestimmt und nach Zerlegung in eine Reihe von Legendre-Polynomen werden die theoretischen Koeffizienten erhalten. Hieraus können im Anschluß die Mittelwerte $B_l = \langle B_l(t) \rangle$ berechnet werden.

Zur Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c und der effektive Spannung $\bar{\mathbf{s}}$ ist ebenfalls eine Datenanpassung von Gleichung (4.25) nötig, diese ist aber im Vergleich zur Fouriermethode weniger komplex.

Der offensichtliche Nachteil dieser Auswertemethode zeigt sich jedoch in der Tatsache, daß experimentell auftretende systematische Fehler nicht direkt nachgewiesen werden können und nur mit Hilfe statistischer Test detektierbar sind. Dies ist insofern problematisch, da die digitale Bildverarbeitung aufgrund des zur Auswertung nötigen hohen Dateninputs automatisiert und zur exakten Konturerkennung eine ausgewogene Balance zwischen Signal und Rauschen hergestellt werden muß. Hierbei können Artefakte generiert werden, die zu erheblichen Abweichungen der Meßwerte führen.

4.4.6 Modifizierte Methode zur Fluktuationsanalyse

Zur Kompensierung der genannten Nachteile erfolgte die Analyse der Fluktuationen in Form einer Kombination der beiden aufgeführten Methoden. Hierzu wurde die Autokorrelationsmethode im Rahmen dieser Arbeit in einer geringfügig modifizierten Form angewandt, um eine direkte Kontrolle der Gültigkeit der erhaltenen Daten zu erzielen. Durch Umstellen von (4.25) erhält man eine Beziehung zwischen den theoretischen Koeffizienten B_l und dem Biegesteifigkeitsmodul k_c

$$U_l(\bar{s}, k_c) = k_c \bar{s} + k_c \cdot l(l+1) \quad (4.26)$$

mit

$$U_l(\bar{s}, k_c) = \frac{kT}{4p} \cdot \frac{2l+1}{B_l(\bar{s}, k_c)(l+2)(l-1)}. \quad (4.27)$$

Aus Gleichung (4.26) wird deutlich, daß die Auftragung der experimentellen Daten in Form eines U_l vs. $l(l+1)$ -Plots ein lineares Verhalten erwarten läßt. Die Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c kann nunmehr aus der jeweiligen Geradensteigung und die Spannung \bar{s} aus dem Ordinatenschnittpunkt gemäß Abbildung 4-2 ermittelt werden.

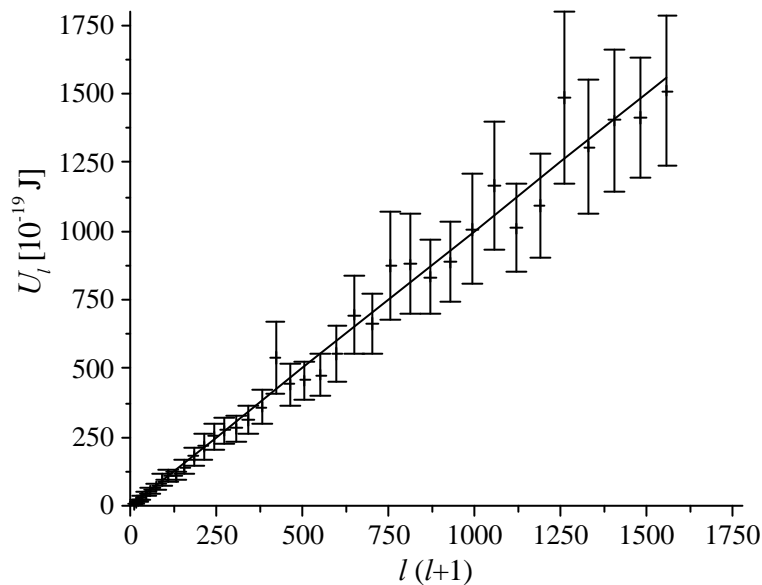


Abbildung 4-2: U_l vs. $l(l+1)$ -Plot simulierter Konturdaten zur Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c und der effektiven Spannung \bar{s} nach Gleichung (4.26). Die elastischen Konstanten ($k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und $\bar{s} = 0$) können durch fehlergewichtete lineare Datenanpassung (durchgezogene Linie) gemäß der Erläuterung im Text ermittelt werden. Die Fehlerbalken der Legendre-Moden entsprechen der Standardabweichung der Bestimmung.

Der Vorteil der linearen Darstellung liegt in der Möglichkeit der direkten Kontrolle der experimentell erhaltenen Werte auf Anomalien. Der somit ermittelte Wert für die effektive Spannung $\bar{\sigma}$ wird weiterhin für die exakte Bestimmung der Abhängigkeit des Biegesteifigkeitsmoduls k_c von der Wellenzahl q eingesetzt (vgl. Abbildung 4-3). Die jeweiligen erhaltenen Werte von k_c werden im Anschluß auf Übereinstimmung verglichen.

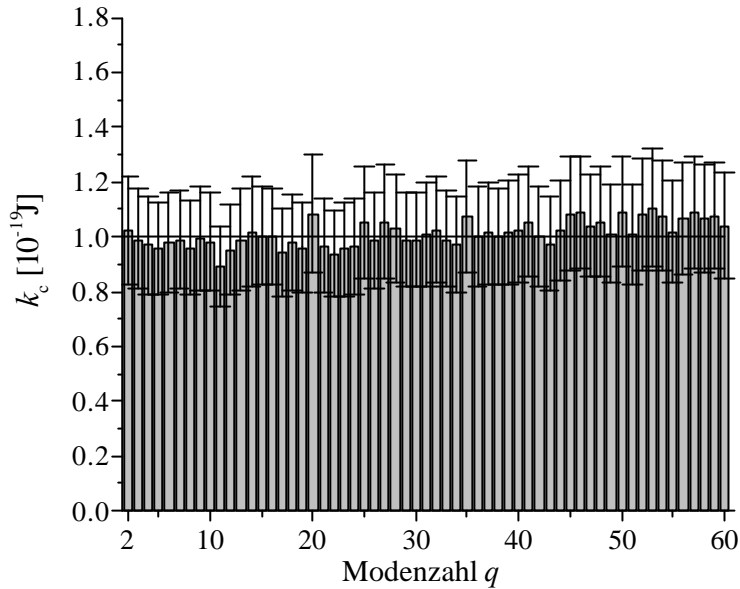


Abbildung 4-3: Abhängigkeit der Biegesteifigkeit k_c von der Modenzahl q nach Gleichung (4.21) für simulierte Konturdaten mit einer effektiven Spannung $\bar{\sigma} = 0$. Die Biegesteifigkeit k_c entspricht dem Plateaubereich mit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ (durchgezogene Linie) und ist für den gesamten betrachteten Bereich der Modenzahlen unabhängig von q .

4.5 Optimierung der Methode der Fluktuationsanalyse

Das vorgestellte theoretische Modell ermöglicht eine direkte Korrelation der mittleren quadratischen Amplituden der thermisch angeregten Formfluktuationen quasi-sphärischer Vesikel mit der Biegesteifigkeit k_c sowie der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$. Da die Methode der Fluktuationsanalyse im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden sollte, galt es zunächst die Grenzen des Modells im Detail zu charakterisieren, um mögliche Fehlerquellen zu minimieren. Weiterhin mußte die eigentliche Bildanalyse optimiert und bestmöglich an die Videomikroskopie adaptiert werden, da insbesondere Einflüsse in Form von Rauschen oftmals eine erhebliche Beeinflussung des eigentlichen Signals verursachen.

4.6 Numerische Simulationen

Die Meßgenauigkeit der Fluktuationsanalyse wird neben der Natur der Fluktuationen im wesentlichen durch experimentelle Fehlerquellen beeinträchtigt. Hierzu zählt die Ungenauigkeit der Konturanalyse, bedingt durch das begrenzte Auflösungsvermögen des mikroskopischen Systems, aber auch die oftmals begrenzte Anzahl experimentell auswertbarer Konturkoordinaten und der zur Analyse verwertbaren Konturen. In Anbetracht der auftretenden hohen Datenmenge und dem hiermit verbundenen Rechenaufwand ist es ferner wichtig, eine ausgewogene Balance zwischen dem zeitlichen Aufwand und der Präzision der Methode zu konzipieren. Aus diesem Grunde wurde zunächst die Signifikanz der Bestimmungsmethode eingehend untersucht. Um die methodische Präzision und die Grenzen des theoretischen Modells zu charakterisieren, wurden numerisch simulierte Konturdaten untersucht. Anschließend erfolgte eine detaillierte Analyse des möglichen Einflusses experimenteller Ungenauigkeiten basierend auf der numerischen Simulation.

4.6.1 Datensimulation

Die Generierung theoretischer Konturdaten erfolgte numerisch durch Ermittlung der theoretischen Werte der mittleren quadratischen Fourieramplituden bei gegebenem mittleren Vesikelradius, effektiver Spannung und Biegesteifigkeitsmodul k_c gemäß Gleichung (4.21) [108]. Die quadratischen Amplituden einer Kontur erhält man durch anschließende Multiplikation der theoretischen Werte mit einem zufälligen Faktor gemäß einer χ^2 -Verteilung. Die Zerlegung in Sinus- und Cosinus-Komponenten der Fourierserie erlaubt nunmehr die winkelabhängige Projektion der Konturkoordinaten mit zufälliger Phase. Auf diese Weise können Konturen (in Form von x - y Datenpaaren) simuliert werden, die mit 500 Punkten eine realen Vesikeln vergleichbare Anzahl an Konturpunkten aufweisen. Die Analyse der Konturen erfolgt analog der Auswertung experimenteller Daten. Auf diese Weise wird es möglich, potentielle experimentelle Einflüsse auf die Ermittlung der Biegesteifigkeit k_c sowie auf die effektive Spannung $\bar{\sigma}$ zu quantifizieren. Die entsprechenden Eingangsvariablen der Simulationen sind Tabelle 4-1 zu entnehmen.

Tabelle 4-1: Variablen der numerischen Simulation

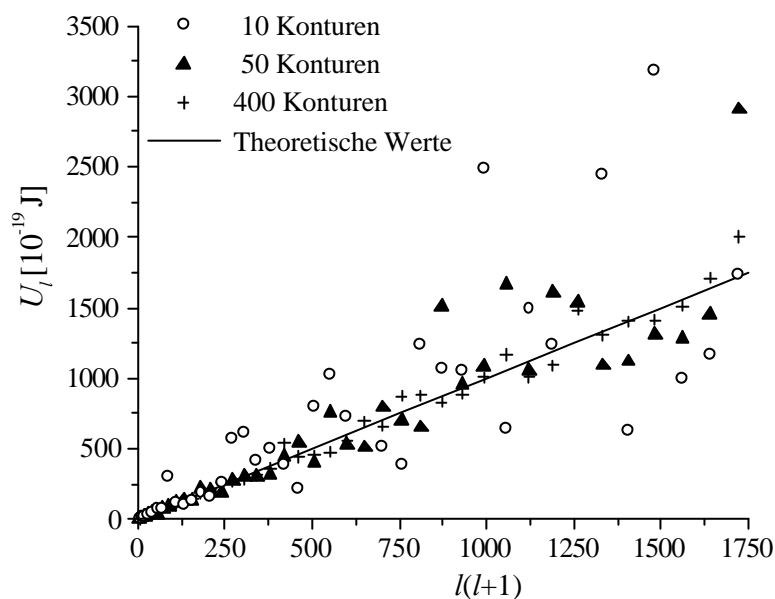
| | |
|-----------------------------|--------------------|
| Anzahl simulierter Konturen | 400 |
| Punkte pro Kontur | 500 |
| Vesikelradius r_0 | 15.0 μm |
| Temperatur T | 30.0°C |

4.6.2 Statistischer Einfluß der verwendeten Konturdaten

Die thermisch bedingten Formfluktuationen von Vesikeln weisen ihrer Natur nach Zufallscharakter auf. Die Genauigkeit der Messung, deren Theorie auf der Grundlage der statistischen Mechanik beruht, sollte somit direkt proportional der analysierten Datenmenge sein. Voraussetzung hierfür ist, daß die verwendeten Konturen unkorreliert sind. Um die anfallende Datenmenge (die mitunter beträchtliche Anforderungen an die Speicherkapazität des Datenverarbeitungssystems stellen kann) in einem sinnvollen Rahmen zu halten, wurde vorab eine Abschätzung des statistischen Einflusses der Anzahl analysierter Vesikelkonturen durchgeführt.

Abbildung 4-4 zeigt die Ergebnisse der Auswertung simulierter Konturdaten bei gegebener Biegesteifigkeit von $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und effektiver Spannung $\bar{s} = 0$ unter Variation der Anzahl der verwendeten Konturen.

(a)



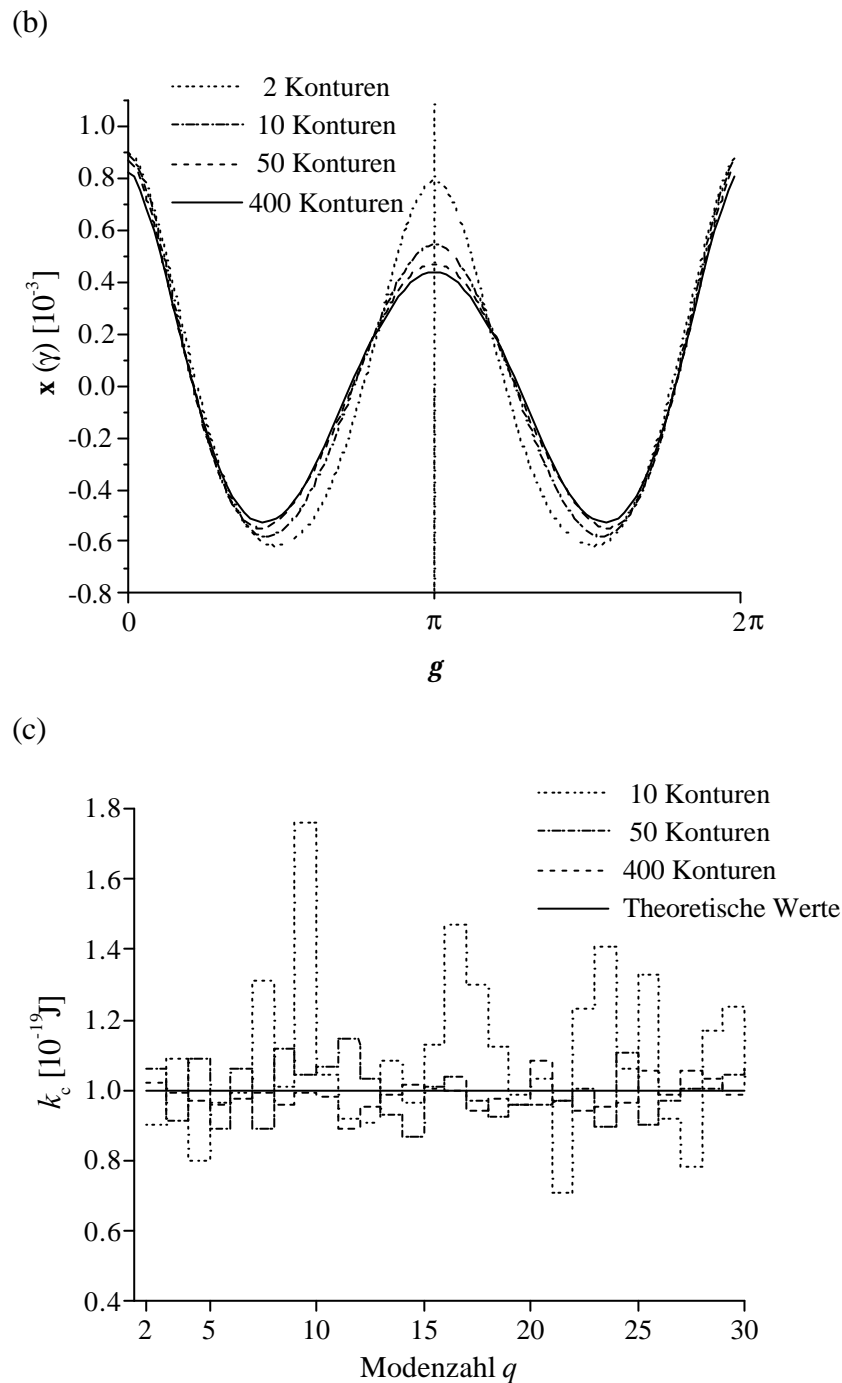


Abbildung 4-4: Statistischer Einfluß der Anzahl eingesetzter Konturen auf die Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c . Die verwendeten Konturdaten für ein Vesikel mit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ und einer effektiven Spannung $\bar{s} = 0$ wurden numerisch simuliert und ohne den Einfluß der Bildverarbeitung nach Gleichung (4.21) ausgewertet. (a) U_l vs. $l(l+1)$ -Plot sowie (b) entsprechende Autokorrelationsfunktion $\mathbf{x}(\mathbf{g})$ als Funktion von \mathbf{g} , (c) Biegesteifigkeit k_c als Funktion der Modenzahl q .

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Anzahl eingesetzter Konturen auf die Analysenmethode. Die Ermittlung der aufgeführten Werte erfolgte über einen Bereich von Modenzahlen $q \leq 50$ bzw. von Quantenzahlen $l \leq 50$.

| Werte | Korrelationsmethode | Fouriermethode |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| n | $k_c [10^{-19} \text{ J}]$ | $k_c [10^{-19} \text{ J}]$ |
| 10 | 0.52 ± 2.0 | 1.10 ± 0.22 |
| 50 | 0.88 ± 0.12 | 1.01 ± 0.09 |
| 100 | 0.92 ± 0.07 | 1.00 ± 0.07 |
| 400 | 0.97 ± 0.03 | 1.00 ± 0.04 |

Ein Vergleich beider Methoden verdeutlicht die höhere Präzision der Fouriermethode bei geringer Anzahl an Konturen. Eine Anzahl von 50 Konturen ist ausreichend für eine Genauigkeit der Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c von $\pm 1 \%$. Schon vergleichsweise kleine Datensätze erlauben somit bei Vernachlässigung der effektiven Spannung eine recht gute Abschätzung der Biegesteifigkeit. Demgegenüber ist bei der Bestimmung der Biegesteifigkeit mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion eine vergleichsweise höhere Anzahl an Konturen nötig. Kleine Datensätze führen zu ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnissen im Bereich großer Quantenzahlen l und somit zu einer entsprechend hohen Abweichung bei der Bestimmung von k_c .

4.6.3 Einfluß der Membranspannung

Quasi-sphärische Vesikel, die eine sehr geringe Überschußfläche Δ aufweisen, zeigen bei thermisch angeregter Fluktuation positive Werte der effektiven Membranspannung $\bar{\sigma}$. Hierdurch werden die Fluktuationsamplituden reduziert und die Biegesteifigkeit erhöht. Wird die Überschußfläche vernachlässigbar klein, so strebt die Spannung gegen Unendlich. Thermisch angeregte Fluktuationen sind nicht mehr beobachtbar. Hierzu müßten Dehnungsmoden angeregt werden, die weit oberhalb der thermischen Energie liegen. Bei Vergrößerung der Überschußfläche Δ eines Vesikels treten hingegen negative Membranspannungen auf. Die Gültigkeit des theoretischen Modells ist jedoch auf den Bereich kleiner Fluktuationsamplituden im Vergleich zum Vesikelradius beschränkt. Wird $\bar{\sigma} \approx -6$, so divergiert die zweite Harmonik und es erfolgt der Übergang in eine ellipsoide Gestalt. Im folgenden soll der Einfluß der Membranspannungen auf die jeweilige Analysenmethode ermittelt werden. Hierzu wurden erneut nach Gleichung (4.21) Konturdaten simuliert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-5 sowie in Abbildung 4-6 dargestellt.

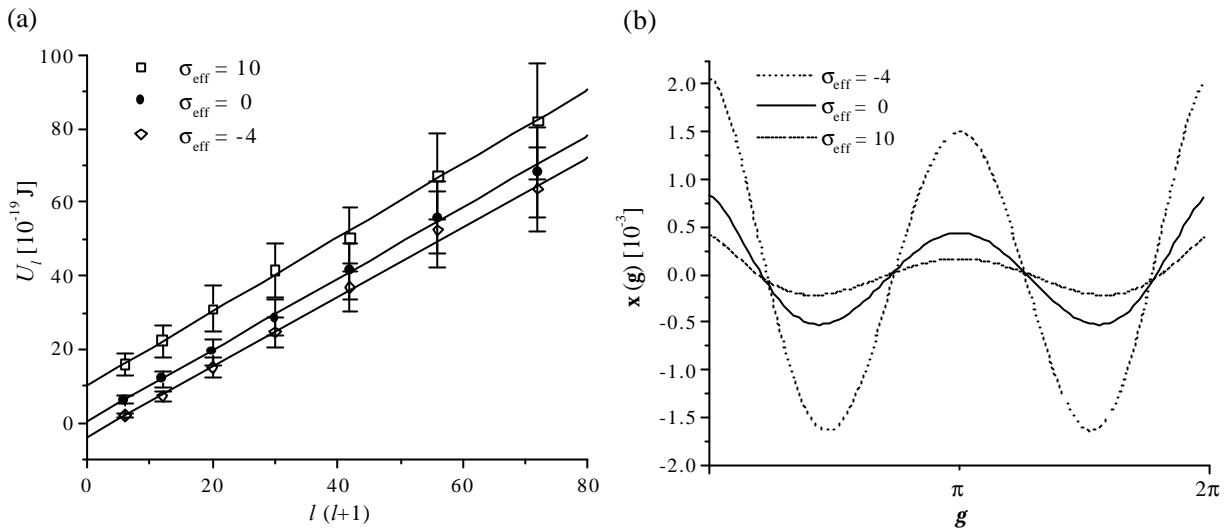


Abbildung 4-5: (a) Einfluß simulierter effektiver Spannungen auf den linearen Verlauf im U_l vs. $l(l+1)$ -Plot in Form der Nullpunktverschiebung des Ordinaten Schnittpunkts bei konstanter Biegesteifigkeit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J (Darstellung für den Bereich kleiner Quantenzahlen l). Die Grafik (b) zeigt jeweils die entsprechende Autokorrelationsfunktion $x(g)$ als Funktion von g .

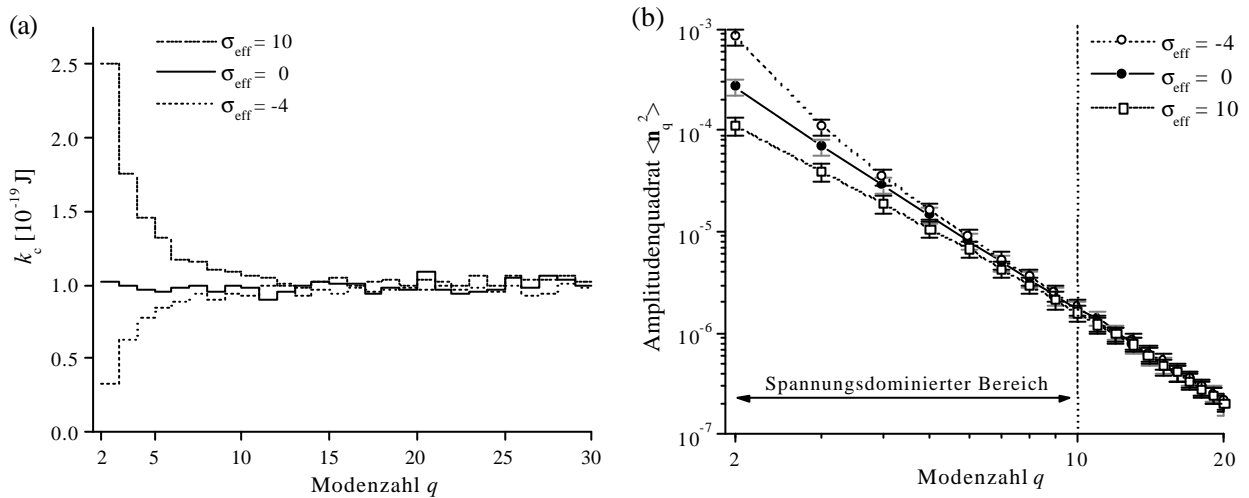


Abbildung 4-6: Einfluß der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ auf die Abhängigkeit der Biegesteifigkeit k_c (a) sowie der mittleren quadratischen Amplituden (b) von der Modenzahl q . Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Fouriermethode. Der spannungsdominierte Bereich verläuft bis zu Modenzahlen von $q \leq 10$.

Die Membranspannung ist im U_l vs. $l(l+1)$ -Plot gemäß Abbildung 4-5 (a) in Form einer Nullpunktverschiebung des Ordinaten Schnittpunkts detektierbar und führt zu keinerlei Abweichungen vom linearen Verhalten. Demgegenüber liefert die Fouriermethode nach Abbildung 4-6 (a) unter dem Einfluß effektiver Spannungen deutliche Abweichungen der ermittelten Biegesteifigkeiten im Bereich kleiner Modenzahlen von $q = 2 - 10$. Die mittlere-

ren quadratischen Amplituden zeigen in diesem spannungsdominierten Bereich nur eine schwache Abhängigkeit vom Biegesteifigkeitsmodul k_c . Hierdurch werden im Falle der Anwesenheit hoher Spannungen zu hohe und bei niedrigen Spannungen zu niedrige Werte von k_c ermittelt. Da jedoch die separate Ermittlung von $\bar{\sigma}$ mit Hilfe des U_l vs. $l(l+1)$ -Plots möglich ist, kann die entsprechende Korrektur der Fouriermethode zur exakten Bestimmung von k_c sowohl bei positiven als auch negativen effektiven Membranspannungen vorgenommen werden. Hierdurch wird ein Datenvergleich ermöglicht und das Risiko der Bestimmung artifiziieller Ergebnisse minimiert.

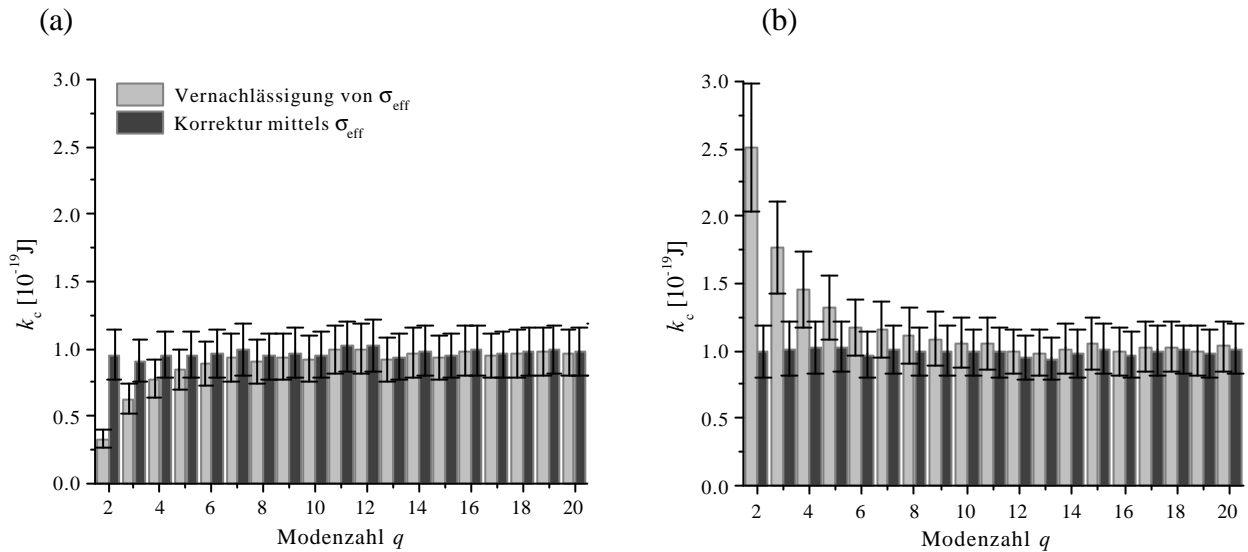


Abbildung 4-7: Verlauf der Biegesteifigkeit k_c als Funktion der Modenzahl q nach Fourieranalyse simulierter Konturdaten mit von Null verschiedenen effektiven Spannungen:

(a) $\bar{\sigma} = -4$ und (b) $\bar{\sigma} = 10$. Die Berechnung erfolgte gemäß (4.21) jeweils unter Vernachlässigung $\bar{\sigma} = 0$ (helle Balken) sowie unter Berücksichtigung der effektiven Spannung $\bar{\sigma} = -4$, bzw. $\bar{\sigma} = 10$ (dunkle Balken).

Die Kombination beider Methoden ermöglicht eine exakte Ermittlung der elastischen Konstanten k_c und $\bar{\sigma}$ unter gleichzeitiger Detektion möglicher Anomalien und liefert ferner wichtige Informationen über die Natur des untersuchten Vesikels aus dem Verlauf des Spektrums der Fourieranalyse. Dies ist im Hinblick auf die Analyse experimenteller Daten von essentieller Bedeutung, da eine Separation des eigentlichen Signals vom experimentell verursachten Rauschen vorgenommen werden muß. Der Einfluß der digitalen Bildverarbeitung sowie des verwendeten optischen Systems soll im folgenden ausführlich diskutiert werden.

4.6.4 Fluktuationsanalyse und Methoden der digitalen Bildverarbeitung

4.6.4.1 Mikroskopieverfahren zur Fluktuationsanalyse

Die optische Untersuchung thermisch bedingter Formfluktuationen von Vesikeln erfordert eine Methode, die eine kontinuierliche Detektion der relativen Deformationen der Membran ermöglicht. Zum Zwecke der Minimierung externer Fehlerquellen ist die Verwendung nicht-invasiver Untersuchungsmethoden, wie die auf der Lichtmikroskopie basierenden Videomikroskopie, bzw. die Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie, vorteilhaft. Diese ermöglicht die Bestimmung der Biegesteifigkeit durch einfache Beobachtung der Formfluktuationen, ohne das System signifikant zu beeinflussen.

Problematisch zeigt sich jedoch bei der Visualisierung, daß Vesikeln als nahezu nicht absorbierende Objekte nur sehr schwache Kontraste liefern. Diese sind selbst unter Zuhilfenahme von Methoden der digitalen Bildbearbeitung für eine exakte Detektion der Kontur der Vesikelmembran unzureichend. Aus diesem Grund ist für eine präzise Konturanalyse die Auswahl einer geeigneten kontrastverstärkenden Methodik unerlässlich. Diesbezüglich kommen eine Reihe mikroskopischer Verfahren in Betracht, wobei im folgenden die gebräuchlichsten auf ihre Anwendung zur Konturanalyse diskutiert werden sollen.

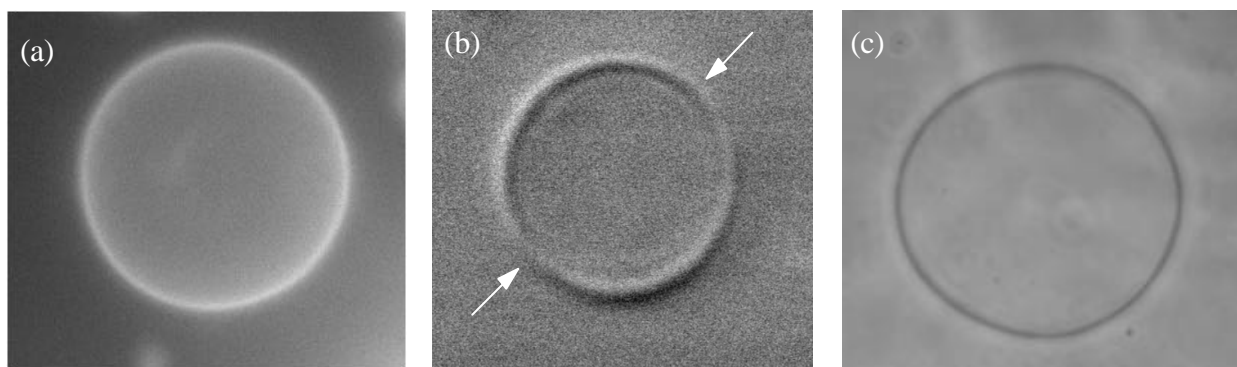


Abbildung 4-8: Vergleich verschiedener lichtmikroskopischer Verfahren zur Visualisierung der Vesikelmembran von Riesenvesikeln. Die Größen der Vesikel sind nicht identisch.

- (a) Aufnahme unter Verwendung der Auflichtfluoreszenzmikroskopie nach Solubilisierung eines lipophilen Fluoreszenzmarkers (Pyren) im Membranbereich
- (b) Differentieller Interferenzkontrast (DIC) nach Nomarski zur scheinbaren perspektivischen Ansicht (die Pfeile kennzeichnen den Wechsel von positivem zu negativem Kontrast)
- (c) Aufnahme mit Hilfe des Phasenkontrastes nach Zernike

Abbildung 4-8 zeigt die Aufnahmen mittels unterschiedlicher Verfahren zur Visualisierung der Vesikelmembran, mit denen eine Fluktuationsanalyse prinzipiell möglich ist [99,100,109]. Die Verfahren weisen jedoch zum Teil erhebliche Nachteile auf.

Die Auflichtfluoreszenzmikroskopie wurde zur Bestimmung elastischer Eigenschaften von Schneider et al. erfolgreich eingesetzt [99]. Nachteil dieser Methode ist jedoch zum einen die mäßige örtliche Auflösung, die durch die geringe Lichtintensität der Fluoreszenz hervorgerufen wird. Weitaus problematischer ist zum anderen die notwendige Verwendung von Fluoreszenzmarkern, die als Fremdmoleküle ihrerseits Einfluß auf die zu untersuchenden physikalischen Membraneigenschaften nehmen [107]. Da es sich bei Vesikeln um Phasenobjekte handelt, ist eine sehr gängige Methode der Visualisierung der Vesikelmembran die Verwendung des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC) [100], insbesondere in Kombination mit der Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie (VEC-DIC) [80]. Diese Methode liefert Bilder mit hoher Auflösung und plastischem Eindruck (vgl. Abbildung 4-8 (b)). Das hierbei verwendete charakteristische Doppelstrahlverfahren hat allerdings einen für die Konturextraktion entscheidenden Nachteil: die Kontur der Vesikel ist nur innerhalb der vorgegebenen Richtung gut extrahierbar. In der hierzu senkrechten Orientierung findet ein Kontrastwechsel statt, der dazu führt, daß an dieser Stelle keine eindeutige Konturanalyse möglich ist (vgl. Abbildung 4-8 (b)). Aus diesem Grund findet die Methode des DIC bei der Bestimmung der Biegesteifigkeit nur selten Verwendung [100], ist jedoch bei der auf Längenänderungen basierenden Mikropipettentchnik verbreitet [110]. Die geeignetste Alternative ist die sogenannte Phasenkontrastmikroskopie, einer Methode zur Visualisierung von Phasenobjekten, d.h. von Objekten, die nur die Phase, aber nicht die Amplitude des Lichtes beeinflussen. Diese Technik liefert zwar eine vergleichsweise geringere Auflösung, indes einen ausgeprägten isotropen Kontrast und ist infolgedessen zur Konturextraktion mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung sehr gut geeignet.

4.6.5 Experimenteller Aufbau

In Anbetracht der diskutierten Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahren zur Visualisierung quasi-sphärischer Vesikel erfolgte die Fluktuationsanalyse unter Verwendung der Phasenkontrastmikroskopie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu ein Phasenkontrastmikroskop installiert. Die Adaption einer digitalen CCD-Kamera ermöglichte eine nachgeschaltete rechnergestützte digitale Bildverarbeitung. Die Unendlich-Optik des Mikroskops erlaubt die Verwendung eines Vergrößerungswechslers (neben einem 5-fach Zoomokular) und somit eine variable, nahezu beliebige Nachvergrößerung zur Projektion auf den CCD (charge-coupled device)-Chip einer hochauflösenden Kamera. Hieraus ergibt sich eine optimale Ausnutzung der Bildfläche zur Bildanalyse auch bei unterschiedlichen Vesikelgrößen.

Bei dem verwendeten Kamerasystem wurde entgegen der in der Literatur üblichen Verwendung herkömmlicher Videokameras eine hochauflösende 12-Bit-monochrome CCD-Kamera mit Peltierkühlung und „lens-on-chip-Technologie“ verwendet. Diese verfügt im Gegensatz zu den herkömmlichen Systemen über eine elektronische Verschlussblende und erlaubt somit eine definierte Wahl der Belichtungszeit. Hierdurch wird eine exakte Kontrolle der Zeitauflösung möglich und die numerische Korrektur der durch die Video-Integrationszeit verursachten Fehler überflüssig [111]. Das Kamerasystem weist weiterhin eine hohe Linearität in der örtlichen, sowie in der Intensitätsauflösung auf, wobei der digitale Datentransfer zu einem Personalcomputer ein günstiges Signal/Rausch-Verhältnis ermöglicht. Ferner kann durch die hohe Graustufentiefe eine sehr exakte Detektion von Intensitätsgradienten und somit eine präzise Konturdetektion durchgeführt werden.

Für die Fluktuationsanalyse wurden üblicherweise Bilder in Zeitabständen von einer Sekunde aufgenommen, gespeichert und in einem späteren Schritt der Konturextraktion zugeführt. Da die anfallende Datenmenge aufgrund der großen Anzahl benötigter Konturen recht hoch ausfiel, wurde für Standarduntersuchungen der relevante Bildausschnitt ROI (region of interest) auf 640×512 Pixel (picture elements) beschränkt.

4.6.6 Digitale Bildverarbeitung und Prinzip der Bildanalyse

Die Bildbearbeitung liefert eine Methode zur Aufarbeitung der digitalen Bildinformation, die für eine exakte Ermittlung der Konturkoordinaten oftmals unerlässlich ist. Hierbei können mit Hilfe homogener Punktoperationen die Grauwerte in Echtzeit unter Verwendung spezieller Tabellen, sogenannter „look-up-tables“ (LUT) modifiziert und somit kontrastreiche Darstellungen erzielt werden. Inhomogene Punktoperationen sind vergleichsweise aufwendiger, da die jeweilige Funktion für jedes Pixel separat berechnet werden muß. Da bei den Untersuchungen oftmals ungleichmäßig ausgeleuchtete Bilder auftraten, die die Qualität der anschließenden Bildverarbeitung beeinträchtigten, waren zeitaufwendige Intensitätskorrekturen unerlässlich. Auf die Subtraktion des Bildhintergrundes in Form von „out-of-focus“-Aufnahmen zur Korrektur inhomogener Beleuchtungen und Linsenfehlern wurde im allgemeinen verzichtet.

Die Bildverarbeitung dient zur exakten Detektion der Vesikelkontur (Abbildung 4-9). Hierbei liegt die Annahme zugrunde, daß die exakte Position der Membran im Bereich der Konturpunkte mit maximalem Kontrast und minimaler Intensität liegt. Die so ermittelten Konturdaten werden anschließend numerisch ausgewertet.

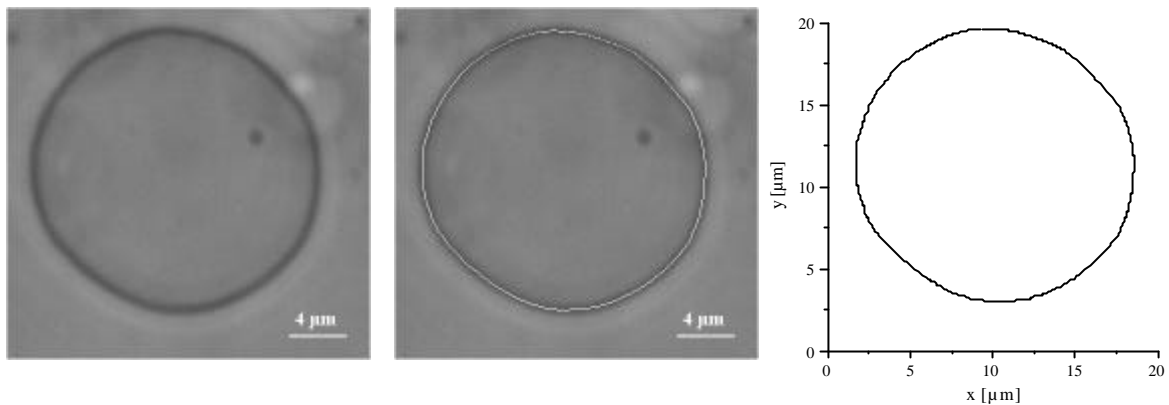


Abbildung 4-9: Prinzip der Konturextraktion der äquatorialen Vesikelebene:

- (a) Die Phasenkontrastmikroskopie liefert zu einem Zeitpunkt t ein Abbild der Vesikelmembran in der äquatorialen Vesikelebene in Form einer dunklen Kontur auf hellem Untergrund. Das Intensitätsprofil entspricht einer maximalen Graustufentiefe von 4096 Graustufen bei einer Pixelgröße von 64 nm.
- (b) Die Detektion der Konturkoordinaten erfolgt mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Optimas 6.0 unter Verwendung des Algorithmus nach Liu [112]. Die exakte Position der Vesikelmembran wird definiert als der Bereich der Konturpunkte des Bildes mit maximalem Kontrast (d.h. minimaler Intensität) innerhalb der dunklen Kontur.
- (c) Die extrahierten Konturdaten werden in Form von x,y -Koordinaten der theoretischen Datenanalyse zur Bestimmung der elastischen Konstanten zugeführt.

Aufgrund der großen Datenmenge mit einem Minimum von etwa 300 Bildern pro Messung war eine Automatisierung der Bildbearbeitung und anschließenden Konturdetektion (in Form einer implementierten Makroroutine) unerlässlich. Die Daten wurden mit Hilfe eines in C++ geschriebenen Programms ausgewertet.

Bei den Untersuchungen wurden ausschließlich einzelne, frei im Medium dispergierte Vesikel untersucht. Diese zeigen durch die Brown'sche Molekularbewegung bedingte Translationen in der Beobachtungsebene wie auch entlang der optischen Achse. Die Bewegung in der Beobachtungsebene wird hierbei durch die separate Berechnung des Vesikelzentrums für jedes Bild berücksichtigt. Die Translation entlang der optischen Achse kann nur durch ständige Fokussierung während der Aufnahmen kompensiert werden. Hierbei treten dennoch gelegentlich defokussierte oder „verschmierte“ Aufnahmen auf, deren Konturen nur unvollständig ausgewertet werden können. Aus diesem Grund wurden die Konturen zunächst fouriertransformiert und in Form der ersten 5 Terme dargestellt. Experimentell auftretende Abweichungen können durch binominale Glättung korrigiert oder vollständig

gelöscht werden. Weichen mehr als 5 % der Punkte einer Kontur ab, so wird die gesamte Kontur verworfen. Die Verwendung einer binominalen Konturglättung zeigte sich jedoch als sehr kritischer Parameter, der oftmals zu Artefakten in der Messung führen kann, so daß im allgemeinen auf derartige Korrekturen verzichtet wurde. Erfolgt bei mehr als 10 % der Konturen eine Korrektur, so wird die gesamte Sequenz nicht verwendet.

4.6.7 Einfluß der Bildbearbeitung und der Auflösung

Die zur Bildanalyse nötige Bildbearbeitung wie auch der zur Konturdetektion verwendete Algorithmus können potentielle Fehlerquellen bei der Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c darstellen. Zur Charakterisierung dieser Einflüsse wurden durch numerische Simulation erzeugte, zweidimensionale Konturdaten für gegebene Biegesteifigkeiten und effektive Spannungen in binäre Bilddaten umgewandelt und entsprechend der Konturanalyse realer Vesikel analysiert. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden in Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11 verdeutlicht den unterschiedlichen Einfluß des auf diese Weise generierten Rauschens.

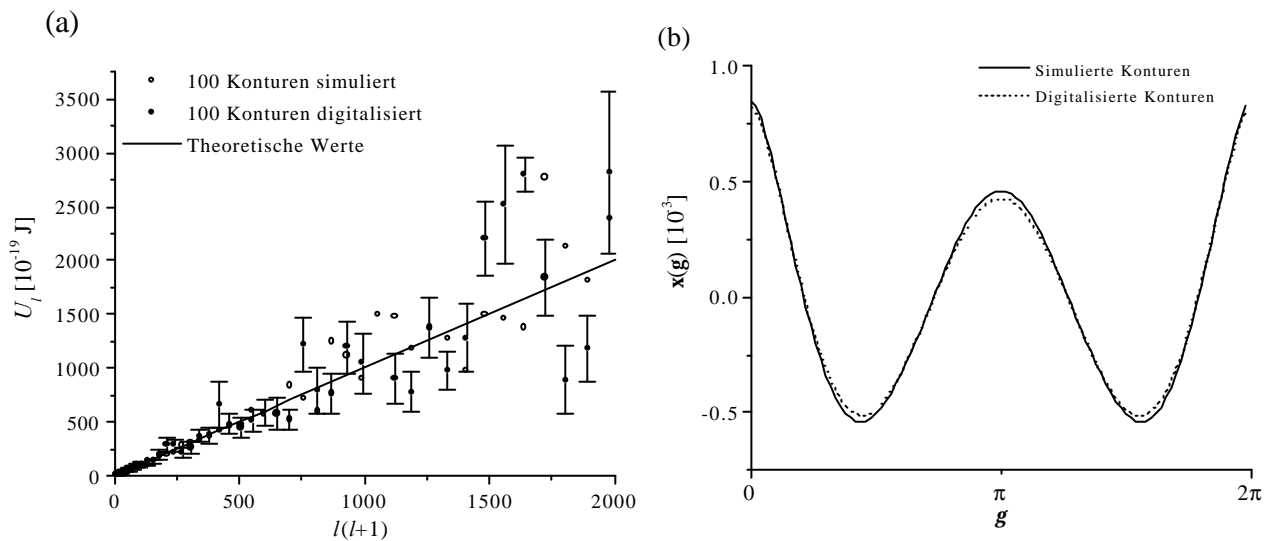
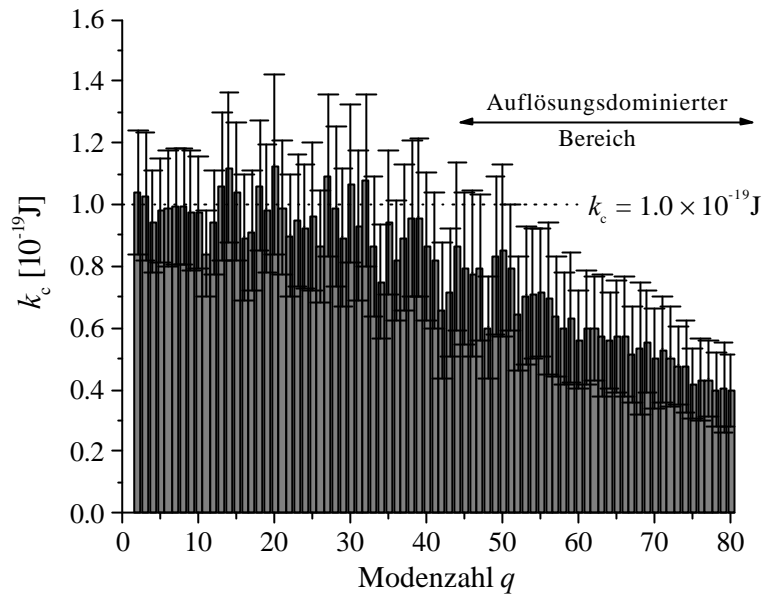


Abbildung 4-10: Untersuchung des Einflusses der digitalen Bildverarbeitung auf die Ermittlung der elastischen Konstanten mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion. U_l vs. $l(l+1)$ -Plot der theoretischen Werte (durchgezogene Linie) $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und $\bar{s} = 0$. Grafik (a) zeigt den Vergleich der Analyse numerisch simulierter Konturdaten (\circ), sowie der simulierten Konturdaten nach Umwandlung in entsprechende „Vesikelbilder“ mit einer Größe von 512×512 Pixel mit anschließender Bildbearbeitung und Konturextraktion (\bullet). Grafik (b) zeigt den entsprechenden Verlauf der Autokorrelationsfunktion $x(g)$ als Funktion von g .

(a)



(b)

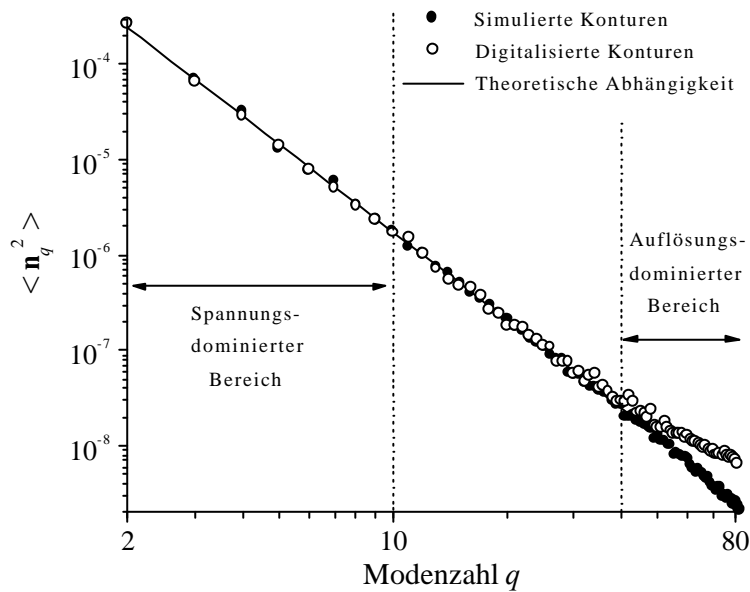


Abbildung 4-11: Einfluß der digitalen Bildverarbeitung auf die Abhängigkeit der Biegesteifigkeit k_c (a) sowie der mittleren quadratischen Amplituden (b) von der Modenzahl q . Analyse numerisch simulierter binärer Konturdaten ($N = 100$) mit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und $\bar{s} = 0$ bei einer Bildgröße von 512×512 Bildpunkten.

Während der Einfluß der Bildverarbeitung auf die Ergebnisse der mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion gewonnenen Daten vernachlässigbar ist, zeigt die Fouriermethode im Bereich hoher Modenzahlen q deutliche Abweichungen. Hierbei handelt es sich um ein auflösungsbedingtes Phänomen. Eine Variation der Auflösung der simulierten Daten in Abbildung 4-12 führt zu entsprechenden unterschiedlichen „Cut-offs“ im Bereich hoher Modenzahlen q . Im auflösungsdominierten Bereich wird die Biegesteifigkeit abhängig von der Modenzahl q . Hierdurch kommt es bei der in Abbildung 4-11 gewählten Auflösung von 512×512 Pixel oberhalb eines Cut-offs von $q = 40$ zu einer Unterbestimmung von k_c . Diese Auflösung entspricht im wesentlichen den folgenden experimentellen Auflösungen realer Vesikel.

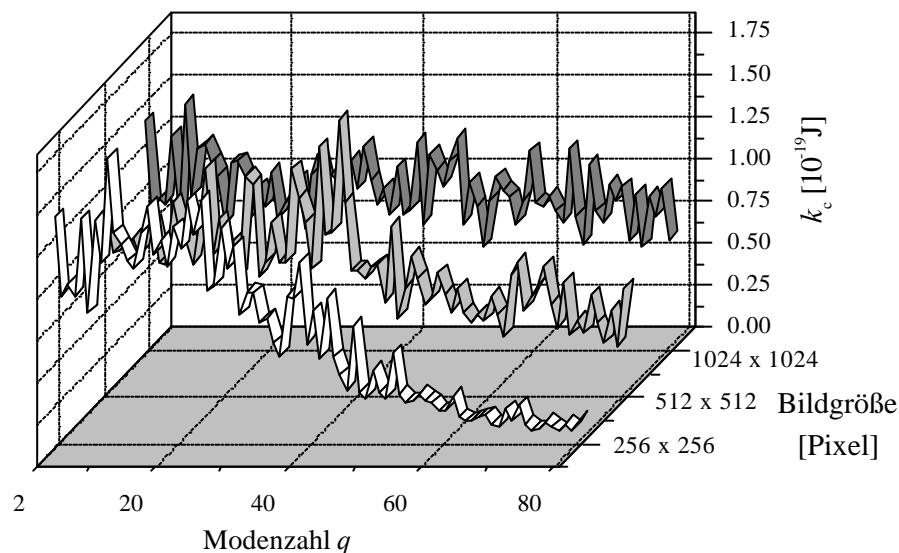


Abbildung 4-12: Fourieranalyse simulierter Vesikelbilder ($N = 20$) unterschiedlicher Auflösung von 256×256 , 512×512 sowie 1024×1024 Bildpunkten. Während bei einer Auflösung von 1024×1024 Pixel die ermittelte Biegesteifigkeit für den gesamten Modenbereich unabhängig von der Modenzahl q ist, verschiebt sich mit sinkender Pixelzahl der Cut-off zu kleineren Modenzahlen. Somit sinkt die Anzahl der auswertbaren Moden, da die limitierte Auflösung im Bereich hoher Modenzahlen zu einer Unterbestimmung der Biegesteifigkeit führt.

4.6.8 Zeitliche Auflösung

Neben der räumlichen Auflösung, die im wesentlichen durch die Qualität des optischen Systems und die optimale Ausnutzung des CCD-Chips gegeben ist, wird die zeitliche Auflösung durch den Einfluß der Integrationszeit der CCD-Kamera limitiert. Üblicherweise kommen bei den Untersuchungen herkömmliche Videokameras mit automatisch geregelter Belichtungszeit und einer Rate von 25 Bildern pro Sekunde zum Einsatz. Diese weisen maximale Integrationszeiten von 40 ms auf.

Sehr schnelle Bewegungen von Objekten wie der fluktuierenden Membran können jedoch bei zu großer Belichtungszeit nicht mehr exakt lokalisiert werden. Sie führen zu einem „Verschmieren“ der Kontur und zu einer verminderten räumlichen Auflösung. Es können somit nur solche Moden präzise bestimmt werden, deren Korrelationszeit größer als die Integrationszeit der CCD-Kamera ist. Aus diesem Grunde wird bei Verwendung der Autokorrelationsmethode zur Vermeidung der Überbestimmung von k_c oftmals auf einen Korrekturfaktor zurückgegriffen [91]. Auf diese Weise wird der Einfluß der Integrationszeit durch eine Korrektur der Amplituden der Legendre-Polynome berücksichtigt. Da jedoch nicht gänzlich auszuschließen ist, daß eine derartige Korrektur wiederum zu einer fehlerhaften Bestimmung der Biegesteifigkeit führen kann, wird im Rahmen dieser Arbeit auf eine numerische Korrektur verzichtet. Neben der Möglichkeit der Verwendung eines Stroboskops zur Beleuchtung [111] besteht eine weitere Möglichkeit, die genannte Problematik zu umgehen, in der Verwendung einer CCD-Kamera mit elektronisch geregelter Verschlußblende [111]. Letztere wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Mit Hilfe dieser Verschlußblende ist es möglich, die Belichtungszeit exakt einzustellen und somit die zeitliche Auflösung präzise zu definieren.

Durch theoretische Berechnung der Relaxationszeiten einzelner Moden ist es möglich den signifikanten Modenbereich für eine gegebene Verschlußzeit zu verifizieren. Werte außerhalb dieses Bereiches bleiben für die Berechnung der elastischen Konstanten unberücksichtigt. Die Zeitabhängigkeit der Fluktuationen kann mit Hilfe der zeitabhängigen Autokorrelationsfunktion beschrieben werden. Jede Ordnung l der Formfluktuation eines Vesikels weist eine charakteristische Relaxationszeit t_l auf. Ausgedrückt in einer Reihe von Legendre-Polynomen mit den Amplituden $B_l(t, \bar{s}, k_c)$ folgt für die Relaxation [102,108]

$$B_l(t + \mathbf{t}, \bar{s}, k_c) = B_l(t, \bar{s}, k_c) \cdot e^{\left(\frac{-\mathbf{t}}{t_l}\right)}. \quad (4.28)$$

Die Relaxationszeit ist gemäß

$$t_l = \frac{hr_0^3}{k_c} \cdot \frac{(2l+1)}{(l+2)(l-1)[\bar{s} + l(l+1)]} \cdot \frac{(2l^2 + 2l - 1)}{l(l+1)} \quad (4.29)$$

näherungsweise invers proportional zur dritten Potenz der Ordnung l , wobei h die Viskosität des Mediums darstellt.

Ist die Integrationszeit der Video-Kamera größer als die Relaxationszeit, so wird die ermittelte Amplitude kleiner als der Realität entsprechend und der Wert für k_c überbestimmt. Bei gegebener Vesikelgröße kann der jeweilige Cut-off anhand von Abbildung 4-13 bestimmt werden.

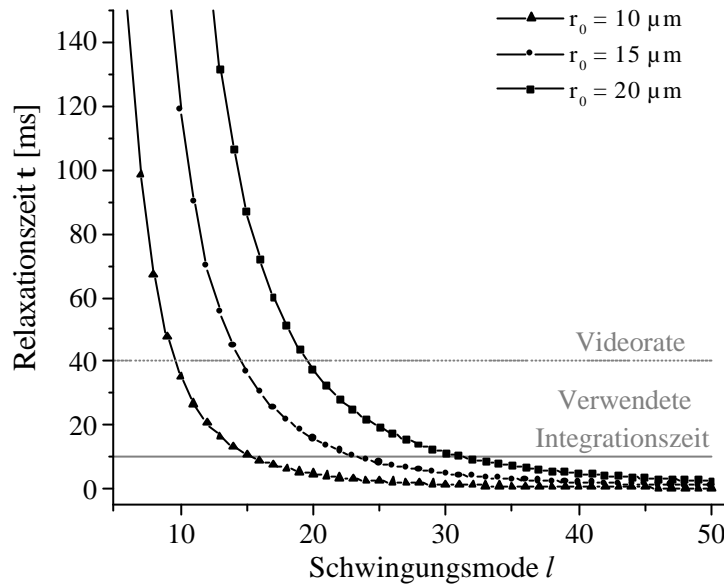


Abbildung 4-13: Vergleich der theoretisch ermittelten Relaxationszeiten für Vesikel unterschiedlicher Äquivalentradien r_0 , sowie $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$, $\bar{S} = 0$ und $h = 0.891 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ mit einer Kameraintegrationszeit von 10 ms zur Ermittlung des Cut-offs.

Für die Relaxationszeit t_q der Modenzahlen q gilt nach Méléard eine analoge Abhängigkeit gemäß [108]

$$t_q = \frac{hr_0^3}{k_c} \cdot \frac{(2q+1)}{(q+2)(q-1)[\bar{S} + q(q+1)]} \cdot \frac{(2q^2 + 2q - 1)}{q(q+1)}. \quad (4.30)$$

Der auflösungsbedingte Einfluß auf die Bestimmung der elastischen Konstanten ist in Abbildung 4-14 anhand des U_l vs. $l(l+1)$ -Plots am Beispiel eines realen Vesikels exemplarisch erläutert.

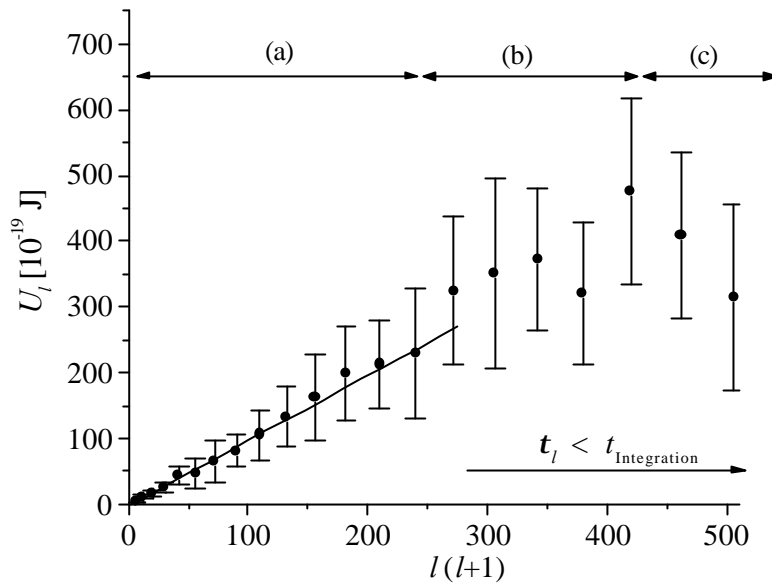


Abbildung 4-14: U_l vs. $l(l+1)$ -Plot eines realen Vesikels mit einem Äquivalentradius $r_0 = 9.8 \mu\text{m}$ ($k_c \approx 1 \cdot 10^{-19} \text{ J}$, $\bar{s} = -3$). Der theoretisch ermittelte Cut off von $t_{15} = 11 \text{ ms}$ stimmt mit dem experimentell beobachtbaren überein. Somit ist der Bereich der zur linearen Regression verwendbaren Daten (a) auf Werte bis $l = 15$ beschränkt. Werte oberhalb (b) des Cut-offs führen zu einer Überbestimmung von k_c . Der Bereich (c) wird allein durch die räumliche Auflösung limitiert.

4.6.9 Abschätzung des Meßbereich

Der Meßbereich der vorgestellten Methode zur Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c einzelner Vesikel kann in guter Näherung mit $1 \cdot 10^{-20} \text{ J} < k_c < 1 \cdot 10^{-18} \text{ J}$ abgeschätzt werden. Der Bereich kleiner Biegesteifigkeiten ($k_c \leq 1 \cdot 10^{-20} \text{ J}$) wird durch die hohen Amplituden der thermischen Fluktuationen (vgl. Abbildung 4-15 a) limitiert. Hiermit verbunden ist eine Abweichung von der theoretischen Annahme der quasi-sphärischen Vesikelgestalt und der Verlust der Gültigkeit des theoretischen Modells. Andererseits kann die exakte mikroskopische Ermittlung der Kontur nicht mehr realisiert werden, da die Fluktuationsamplituden aufgrund der begrenzten Tiefenschärfe des Mikroskops und der Limitierung durch die Integrationszeit der Videokamera zu einem „Verschmieren“ des mikroskopischen Bildes führen.

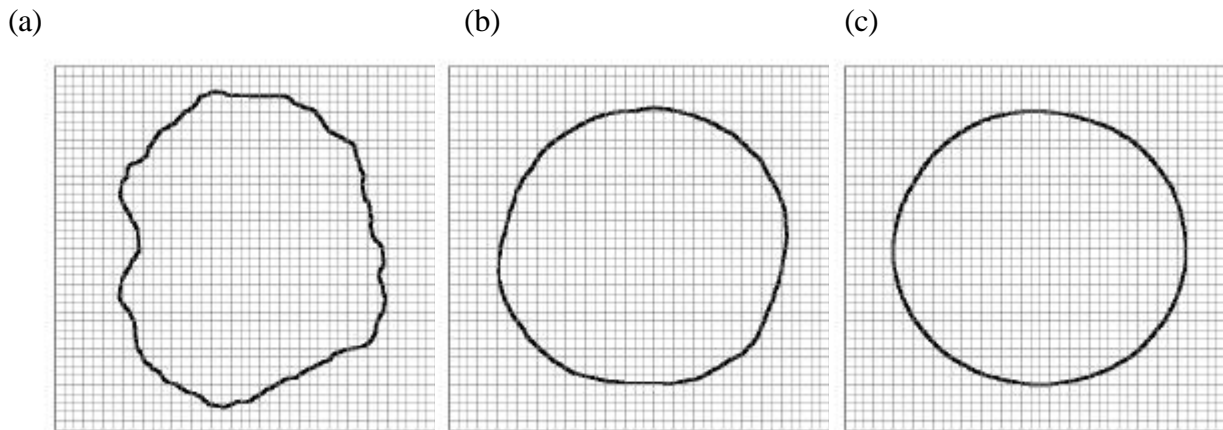


Abbildung 4-15: Einfluß der Biegesteifigkeit k_c auf die Morphologie numerisch simulierter Vesikelkonturen ($\bar{s} = 0$): (a) $k_c = 1 \cdot 10^{-20}$ J, (b) $k_c = 1 \cdot 10^{-19}$ J sowie (c) $k_c = 1 \cdot 10^{-18}$ J.

Im Bereich hoher Biegesteifigkeiten $k_c \geq 1 \cdot 10^{-18}$ J sinken die Fluktuationsamplituden hingegen ab, so daß das Auflösungsvermögen des Mikroskops der limitierende Faktor wird. Eine geringfügige Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses ist gegebenenfalls durch die Verwendung hochaperturiger Linsensysteme zu gewährleisten.

4.6.10 Diskussion

Die vorgestellte kombinierte Methode zur präzisen Analyse der Formfluktuationen einzelner quasi-sphärischer Vesikel ermöglicht die Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c im Bereich von $1 \cdot 10^{-20}$ J bis $1 \cdot 10^{-18}$ J unter gleichzeitiger Ermittlung der effektiven Spannung. Die gewählte grafische Präsentation erlaubt eine direkte Beurteilung der Meßergebnisse ohne hohen statistischen Aufwand, so daß spannungs- sowie auflösungsdominierte Bereiche innerhalb der Spektren detektiert werden können. Die Präzision der Methode ist abhängig von der Größe der untersuchten Vesikel sowie der Anzahl der verwendeten Konturdaten. Ferner bestimmt bei konstanter Vesikelgröße die Belichtungszeit der CCD-Kamera den Bereich signifikanter Moden.

Der Vergleich beider Meßmethoden zeigt, daß die Fouriermethode eine auf experimentelle Einflüsse unempfindliche Analysenmethode darstellt. Diese kann ohne großen statistischen Aufwand zur Ermittlung der Biegesteifigkeiten von Vesikeln im Bereich vernachlässigbarer effektiver Spannungen herangezogen werden. Tritt das Rauschen in Form eines weißen Rauschens auf, so wird es den einzelnen Moden gleichmäßig überlagert [107]. Experimentell verursachtes Rauschen führt hingegen zu einem Fehler, der mit steigender Datenmenge durch ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis minimiert werden kann. Die Restriktion der zeitlichen wie auch der optischen Auflösung bewirkt lediglich eine Reduktion des Plateaus signifikanter Moden. Bei der gewählten Versuchsanordnung dominiert die zeitliche Auflösung.

Eine exakte Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c unter gleichzeitiger Ermittlung der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ wird durch simultane Analyse der Konturfluktuationen mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion ermöglicht. Diese Methode erfordert einen relativ hohen Input an Konturdaten und stellt vergleichsweise hohe Ansprüche an die Speicherkapazität sowie die Rechnerleistung. Vorteilhaft ist jedoch der geringe Einfluß experimentell verursachten Rauschens, welches dem Signal lediglich in Form einer δ -Funktion überlagert wird.

4.7 Fluktuationsanalyse von Vesikeln

Die Fluktuationsanalyse wurde zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften riesiger fluider DMPC-Vesikel eingesetzt und im Anschluß der Einfluß von solubilisiertem Toluol als lipophiles Solubilisat konzentrationsabhängig untersucht. Die Darstellung der Vesikel erfolgte mit Hilfe der Quellmethode nach Reeves und Dowben [33]. Diese liefert eine hohe Ausbeute an Vesikeln mit großer Überschußfläche und effektiven Spannungen im Bereich von $\bar{\sigma} = -5$ bis $\bar{\sigma} = 15$. Die Ausbeute an unilamellaren Vesikeln ist verglichen zur Methode der Elektropräparation [113] geringer. Die Einstellung konstanter Toluol/DMPC-Verhältnisse erwies sich jedoch unter Verwendung der Elektropräparation aufgrund des hohen Dampfdrucks von Toluol als äußerst problematisch.

4.7.1 Die Bedeutung der effektiven Membranspannung von Vesikeln

Die Amplituden der thermischen Fluktuationen frei fluktuierender Vesikel hängen sowohl von der Biegesteifigkeit k_c als auch von der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ der Membran ab. Letztere wirkt nach Gleichung (4.15) in Form einer reduzierten Spannung auf die Fluktuationsamplituden. Die quadratische Abhängigkeit vom Vesikelradius hat zur Folge, daß selbst kleinste laterale Spannungen ($\sigma \geq 10^{-5} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) einen deutlichen Einfluß auf die Fluktuationsamplituden ausüben. Liegen laterale Spannungen von $10^{-3} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ vor, so erscheinen die Vesikel rigide und sind für die Fluktuationsanalyse ungeeignet [93]. Die effektive Spannung eines Vesikels ist eine für das jeweilige Vesikel individuelle Größe, die sehr stark von den Bedingungen zum Zeitpunkt des Membranschlusses zur Vesikelstruktur und somit von den Präparationsbedingungen abhängen kann. Sie spiegelt die Überschußfläche Δ wieder, die das Vesikel im Vergleich zur Fläche einer Kugel gleichen Volumens aufweist und die für die Formfluktuationen zur Verfügung steht. Diese ist somit von Vesikel zu Vesikel sehr unterschiedlich (Abbildung 4-16).

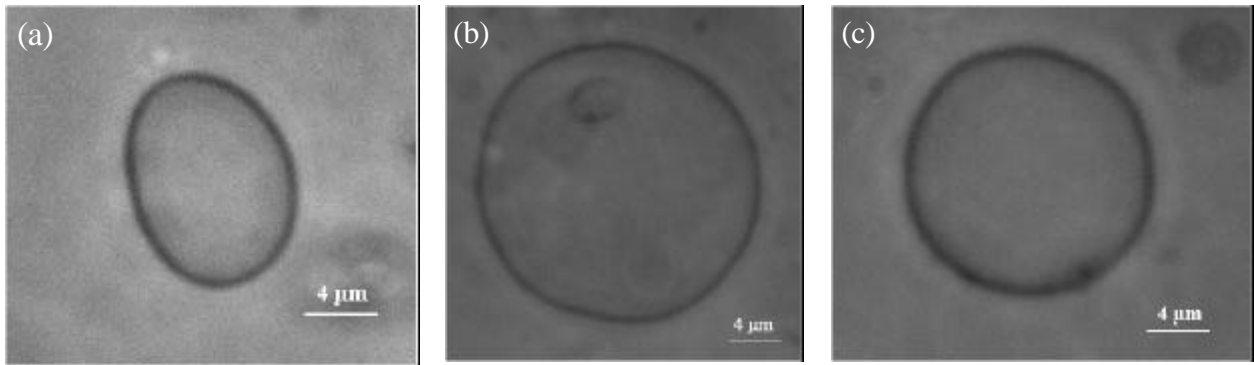


Abbildung 4-16: Typische Vesikelgestalt von DMPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Membranspannung.

(a) $\bar{s} = -5.3$, $r_0 = 4.7 \mu\text{m}$, $s = -1.9 \cdot 10^{-5} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

(b) $\bar{s} = 1$, $r_0 = 10.4 \mu\text{m}$, $s = 1.4 \cdot 10^{-9} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

(c) $\bar{s} = 13.5$, $r_0 = 7.5 \mu\text{m}$, $s = 4.3 \cdot 10^{-8} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

4.7.2 Formfluktuationsanalyse unter isothermen Bedingungen

4.7.2.1 Aufbau des Meßsystems

Die elastischen Eigenschaften von Vesikeln stellen temperaturabhängige Größen dar. Aus diesem Grunde ist für die Untersuchung die Gewährleistung einer Temperaturkonstanz während der Messung Voraussetzung. Hierzu wurde der in Abbildung 4-17 dargestellte temperierbare Objektisch konstruiert.

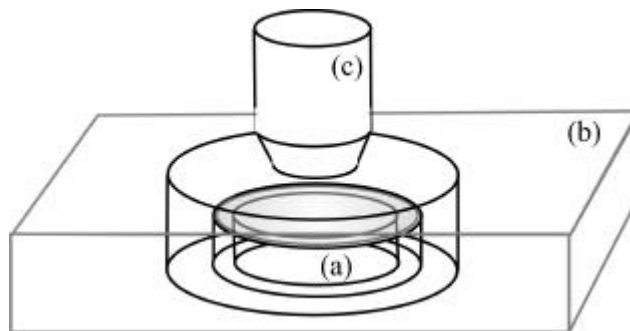


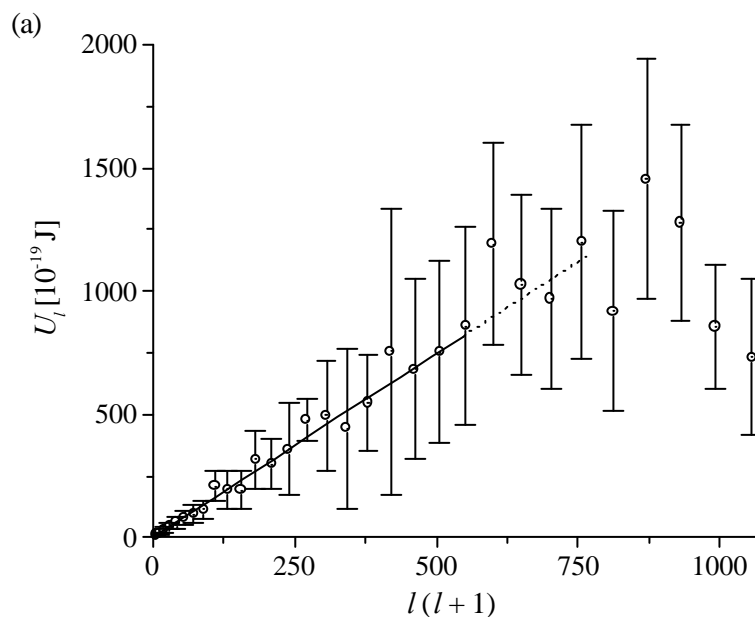
Abbildung 4-17: Temperierbarer Objektisch zur Verwendung in der Durchlicht- sowie der Auflichtfluoreszenzmikroskopie. Der Tisch besteht aus einem Metallblock (b), der mit Heizspiralen durchzogen ist. Über einen Kryostaten wird die innere Objektkammer mit der probengefüllten Mikroküvette (a) temperiert und die Probe mit Hilfe eines Phasenkontrastobjektives (c) beobachtet.

Vorteil dieser Konstruktion ist die Möglichkeit der Verwendung von Ölimmersionslinsensystemen hoher numerischer Apertur und speziell eines Ölimmersionskondensators, so daß bei Durchlichtuntersuchungen optimale Auflösungen erzielt werden können.

Der Objektisch wird über einen Kryostaten extern temperiert und kann in einem Temperaturbereich von 0°C - 60°C betrieben werden. Der Tisch beinhaltet einen Probenraum, der über eine Zuleitung mit Inertgas geflutet werden kann. Innerhalb des Probenraums befindet sich eine hermetisch verschließbare Objektkammer (Höhe $200\ \mu\text{m}$, Volumen $36\ \mu\text{L}$). Diese besteht aus einem auf eine Glasplatte aufgeschmolzenen Glasring, auf den wiederum ein rundes Deckglas ($\varnothing = 22\ \text{mm}$) aufgesetzt wird. Hierbei wurde auf die Verwendung jeglicher Form von Klebe- oder Dichtungsmaterialien verzichtet, da diese Substanzen nach Diffusion in die Vesikelmembran die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können [95]. Die Temperatur wird innerhalb des Probenraumes über ein Thermoelement (PT-100) kontrolliert. Alle verwendeten Glasmaterialien bestehen aus Quarzglas und sind auch für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im UV-Bereich geeignet. Bei der Bestimmung der elastischen Eigenschaften wurde auf die Verwendung hochaperturiger Ölimmersionsobjektive verzichtet, da aufgrund des Probenkontaktes Temperaturgradienten auftreten, die der Einhaltung einer konstanten Temperatur entgegenwirken. Diese können Konvektionen innerhalb der Probe verursachen, die eine präzise Messung beeinträchtigen.

4.7.3 DMPC-Vesikel

Die videomikroskopische Untersuchung der Fluktuationsamplituden von DMPC-Vesikeln erfolgte bei konstanter Temperatur von 30°C ausschließlich an frei im wäßrigen Medium fluktuierenden Vesikel unter Vernachlässigung der Gravitationskraft. Die Vesikel wurden zuvor auf optisch detektierbare Defekte untersucht. Abbildung 4-18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Fluktuationsanalyse eines DMPC-Vesikels.



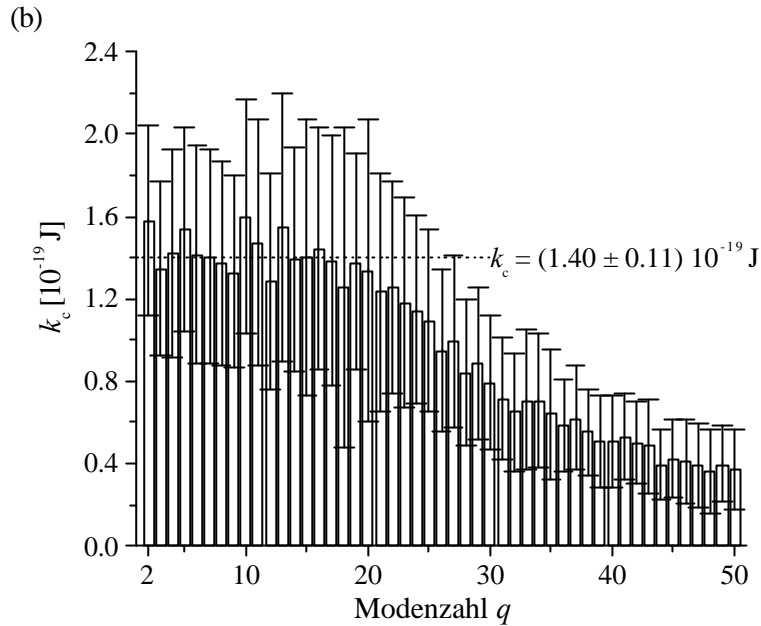


Abbildung 4-18: Ergebnisse der Fluktuationsanalyse von 318 Konturen eines undulierenden DMPC-Vesikels bei konstanter Temperatur von 30.0°C ($r_0 = 16.4 \mu\text{m}$).

(a) U_l vs. $l(l+1)$ Plot zur Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c und der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ nach Gleichung (4.26). Die Biegesteifigkeit kann mittels linearem Fit der Daten mit $l < 22$ zu $k_c = (1.39 \pm 0.06) \cdot 10^{-19} \text{ J}$, sowie die effektive Spannung $\bar{\sigma} = 2 \pm 1$ ermittelt werden (durchgezogene Linie). Im Bereich $l > 22$ zeigt sich die auflösungsbedingte Abweichung vom linearen Verhalten (gepunktete Linie).

(b) Biegesteifigkeit k_c als Funktion der Wellenzahl q nach Gleichung (4.21) mit $\bar{\sigma} = 2$. Die Werte von k_c sind bis $q = 20$ unabhängig von der Wellenzahl. Aus diesem Plateaubereich kann ein Modul der Biegesteifigkeit von $k_c = (1.40 \pm 0.11) \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ermittelt werden. Der Modenbereich $q > 20$ ist auflösungsdominiert und liefert zu niedrige Werte der Biegesteifigkeit.

Ein Vergleich beider Methoden ergibt eine Biegesteifigkeit k_c von $(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-19} \text{ J}$.

Die exakte Bestimmung des Moduls der Biegesteifigkeit k_c von Vesikeln eines Phospholipids erfordert die Analyse einer Vielzahl einzelner Vesikel, um zwischen intrinsischen Membraneigenschaften und dem individuellen Verhalten einzelner Vesikel zu unterscheiden. Abbildung 4-19 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Biegesteifigkeit von 37 DMPC-Vesikeln in Form eines Histogramms bei einer konstanten Temperatur von 30°C .

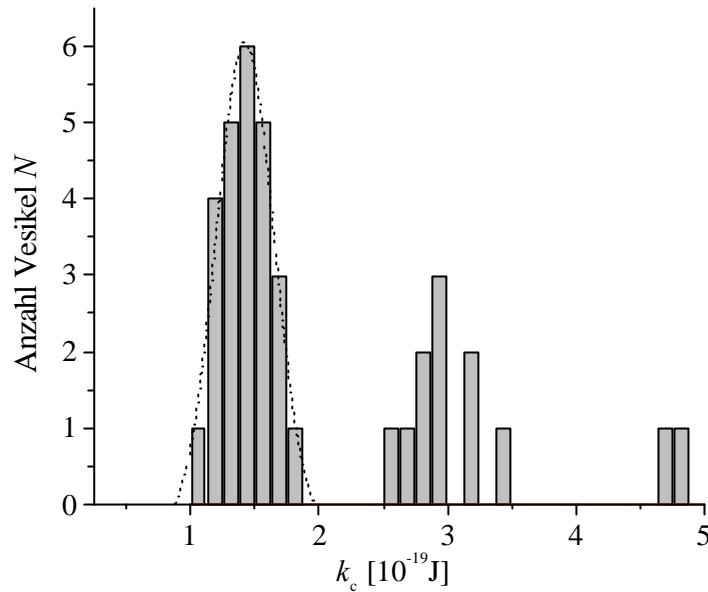


Abbildung 4-19: Histogramm der Häufigkeitsverteilung der ermittelten Biegesteifigkeiten von 37 DMPC-Vesikeln bei $T = (30.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$. Die verschiedenen Gaußverteilungen deuten auf das Vorliegen von Vesikeln mit unterschiedlicher Anzahl an Lamellen hin. Das Maximum der ersten Verteilung liefert mit $k_c = 1.42 \cdot 10^{-19}$ J die charakteristische Biegesteifigkeit für das unilamellare System ($n = 1$), das zweite mit $k_c = 2.88 \cdot 10^{-19}$ J ($n = 2$) die Biegesteifigkeit für bilamellare Systeme.

Die auffällige Existenz verschiedener Gaußverteilungen mit abnehmender Häufigkeit kann mit dem Vorliegen von Vesikeln unterschiedlicher Lamellenzahl n ($n = 1, 2, \dots$ usw.) begründet werden. Der Modul der Biegesteifigkeit für unilamellare DMPC-Vesikel ($n = 1$) ergibt sich aus dem Maximum der Gaußverteilung mit der kleinsten Biegesteifigkeit ($k_c = (1.42 \pm 0.21) \times 10^{-19}$ J). Der Biegesteifigkeitsmodul k_c ist für reine Phospholipidvesikel direkt proportional zur Dicke der Vesikelmembran. Aus diesem Grunde deuten die höheren Werte von k_c auf mehrschalige Vesikel ($n > 1$) hin, die ein Vielfaches der Biegesteifigkeit unilamellarer Vesikel liefern. Für mehrschalige Vesikel gilt:

$$k_{c,\text{eff}} = n \cdot k_c \cdot \mathbf{k}, \quad (4.31)$$

wobei $\mathbf{k} \geq 1$ mögliche Interaktionen zwischen den Doppelschichten berücksichtigt. Die Lamellenabstände liegen weit unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops und sind auf optischem Wege nicht nachweisbar. Die Multilamellarität kann jedoch mit Hilfe der Fluktuationsanalyse verifiziert werden. Biegesteifigkeiten oberhalb von $k_c = 4 \cdot 10^{-19}$ J deuten weiterhin auf Abweichungen von den Gleichgewichtsbedingungen, wie beispielsweise auf Druckunterschiede ($\Delta p \neq 0$) zwischen dem Vesikelinnenraum und der äußeren wässrigen Phase hin.

Diese Vesikel im Bereich erhöhter Biegesteifigkeiten zeigen dementsprechend deutliche Hysteresereischeinungen im Verlauf von k_c bei Variation der Temperatur.

Der Vergleich der ermittelten Biegesteifigkeit für unilamellare DMPC-Vesikel mit Literaturdaten zeigt eine gute Übereinstimmung (Tabelle 4-3). Hierbei ist anzufügen, daß die publizierten Daten stark variieren. Diese Variation ist einerseits auf die unterschiedlichen Präparations- sowie Auswertemethoden zurückzuführen. Ferner führen systematische Fehlerquellen wie der Einfluß von Verunreinigungen des Phospholipids [34] sowie diffusive Einträge von Dichtungsmaterialien [95] zur Bestimmung erniedrigter Biegesteifigkeiten k_c .

Tabelle 4-3: Auflistung einiger publizierter Werte der Biegesteifigkeit k_c unilamellarer DMPC-Vesikel.

| Phospholipid | k_c [10^{-19} J] | $k_c/(kT)$ | T [°C] | Literatur |
|--------------|-----------------------|------------|----------|--------------|
| DMPC | 1.42 ± 0.21 | 33.9 | 30.0 | diese Arbeit |
| DMPC | 1.52 ± 0.06 | 36.7 | 27.0 | [114] |
| DMPC | 1.30 ± 0.09 | 31.1 | 30.0 | [92] |
| DMPC | 1.1 | 26.3 | 30.0 | [115] |

4.7.4 Einfluß der Acylreste auf die Biegesteifigkeit

Eine Änderung des Biegesteifigkeitsmodul k_c sollte immer dann zu erwarten sein, wenn die intermolekularen Kräfte innerhalb der Doppelschicht verändert werden [114]. Tabelle 4-4 zeigt die ermittelten Werte für DLPC- und DMPC-Vesikel.

Tabelle 4-4: Ermittelte Biegesteifigkeiten bei Variation der Acylreste.

| Phospholipid | k_c [10^{-19} J] | T [°C] |
|--------------|-----------------------|----------|
| DLPC | 0.98 ± 0.15 | 27 |
| DMPC | 1.42 ± 0.21 | 30 |

In Übereinstimmung mit Literaturdaten steigt die Biegesteifigkeit fluider Phosphatidylcholinvesikel mit zunehmender Kettenlänge der Acylreste in der Reihenfolge $k_{c(\text{DLPC})} < k_{c(\text{DMPC})} < k_{c(\text{DPPC})}$ [92]. Die Biegesteifigkeit für Membranen einer Komponente folgt im allgemeinen der Beziehung [116]

$$k_c \sim K \cdot \frac{d^n}{a^m}, \quad (4.32)$$

wobei d die Dicke der Phospholipiddoppelschicht, a den molekularen Platzbedarf der Lipide und n und m empirische Exponenten darstellen. Die Konstante K berücksichtigt molekulare Änderungen innerhalb der Doppelschicht.

Membranen ungesättigter Phospholipide zeigen aufgrund des höheren Platzbedarfs und der verminderten Dicke der Doppelschicht eine deutlich erniedrigte Biegesteifigkeit im Vergleich zu gesättigten Lipiden. Dies hat eine wesentliche biologische Konsequenz: Organismen besitzen hierdurch die Möglichkeit, die elastischen Eigenschaften von Zell- oder Organellmembranen durch den Einbau ungesättigter Lipide gezielt variieren zu können.

Für das oben genannte Beispiel der Lecithine kann ferner eine quadratische Abhängigkeit der Biegesteifigkeit von der Dicke des hydrophoben Bereichs der Doppelschicht gefunden werden [92].

4.7.5 Einfluß grenzflächenaktiver Solubilisate auf die Biegesteifigkeit

Neben der Variation der Lipide innerhalb der Doppelschicht verursacht der Einbau grenzflächenaktiver Fremdmoleküle in die Membran eine Variation der Biegesteifigkeit. Eine entsprechende Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Biegesteifigkeiten ist in Tabelle 4-5 aufgelistet. Die untersuchten Substanzen weisen größtenteils grenzflächenaktive Eigenschaften auf und haben eine ausgeprägte Affinität zum Kopfgruppenbereich der Phospholipide.

Tabelle 4-5: Einfluß grenzflächenaktiver Solubilisate auf die Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln bei einer Temperatur von 30°C.

| Phospholipid | Solubilisat | Molverhältnis | k_c [10^{-19} J] |
|--------------|----------------------|---------------|-----------------------|
| DMPC | Myristinsäure | 1:1 | 1.14 ± 0.23 |
| DMPC | Ethanol | 1:0.5 | 0.90 ± 0.08 |
| DMPC | Natriumdodecylsulfat | 1:2 | 0.51 ± 0.05 |

Das Prinzip der Variation der Biegesteifigkeit von Zellmembranen ist ebenfalls ein in der Natur vielfach beobachtbares Phänomen. Ein populäres Beispiel liefert Cholesterin, ein Regulator der Fluidität der Membran von Eukaryontenzellen. Cholesterin erhöht die Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln signifikant. Untersuchungen von DMPC-Vesikeln mit einem Anteil von 50 Mol-% Cholesterin zeigen bei $T = 30^\circ\text{C}$ eine Biegesteifigkeit von $k_c = (6.1 \pm 0.3) \cdot 10^{-19}$ J [114]. Dieser Effekt kann auf der Grundlage von Packungsargumenten erklärt werden. Der „ordnende Einfluß“, den Cholesterin auf die unpolaren Ketten des umgebenden Amphiphils ausübt, erniedrigt den Platzbedarf der Lipidmoleküle, da die Acylreste zunehmend ausgestreckt werden. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten intermolekularen Wechselwirkung des Amphiphils im lipophilen Bereich der Doppelschicht [106,114]. Desweiteren könnte die Verzahnung der Ketten der gegenüberliegenden Monoschichten und das hierdurch bedingte eingeschränkte gegenseitige Gleiten der Schichten einen Einfluß haben [115,117].

Eine Reduktion der Biegesteifigkeit kann nach Einlagerung von Proteinen oder einer relativ geringer Menge von Oligopeptiden wie dem Ionencarrier Valinomycin [113] beobachtet werden und beruht vermutlich auf einer lokalen Verminderung der Membrandicke. Ein ähnlicher Effekt spielt bei der Solubilisierung von vergleichsweise kurzkettigen Bolalipiden eine Rolle [118,119]. Diese membrandurchspannenden Lipide findet man in Zellmembranen thermophiler Archaeobakterien, die innerhalb ökologischer Nischen bei Temperaturen auch oberhalb von 100°C existieren. Kurzkettige Amphiphile wie mizellbildende Phospholipide, einkettige Tenside oder kurzkettige Alkohole wirken hingegen als eine Art „Spacer“. Im Bereich der Terminierung der kurzkettigen Amphiphile erhöht sich die Freiheit der Acylreste des langkettigen Phospholipids. In diesem Bereich steigt nun der freie Platzbedarf der Acylreste von etwa 0.3 nm² auf etwa 0.4 nm² an, wodurch die zur Biegung benötigte Energie deutlich sinkt [98]. Weiterhin führt der Unterschied des Packungsparameters von Phospholipid und der eingelagerten Substanz vermutlich zu einer Kopplung zwischen der lokalen Krümmung und den eingelagerten Molekülen [57].

Der Einfluß amphiphiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit zeigt eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit. Bei Konzentrationen nahe der Lyse der Vesikel können Porenbildungen innerhalb der Membran auftreten. Auf diese Weise kommt es durch Solubilisierung von Natriumcholat zur Bildung hochflexibler Vesikel, den sogenannten TransfersomenTM [8].

4.8 Einfluß lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit

4.8.1 Statische Untersuchungen

Der Einfluß grenzflächenaktiver Substanzen auf die elastischen Eigenschaften von Vesikelmembranen ist recht gut charakterisiert. Über den Einfluß lipophiler, hauptsächlich im unpolaren Bereich lokalisierter Solubilisate ist hingegen sehr wenig bekannt. Einzig Niggemann et al. führten eine Erniedrigung der Biegesteifigkeit während den Untersuchungen auf einen diffusiven Eintrag von Xylol aus dem Dichtungsmaterial der Probenzelle in die Vesikelmembran zurück [95].

Aus diesem Grunde galt es, dieser Fragestellung detailliert nachzugehen. Hierzu wurde der konzentrationsabhängige Einfluß von Toluol auf die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel eingehend untersucht und diese Ergebnisse mit den bereits diskutierten Erkenntnissen auf molekularer Ebene korreliert. Da die Solubilisierungskapazität für kleine aromatische Moleküle in Vesikeln vergleichsweise hoch ist, konnten die Untersuchungen hierzu über einen sehr breiten Konzentrationsbereich erfolgen.

4.8.1.1 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten DMPC/Wasser

Die Fluktuationsanalysen erfolgen zur Vermeidung intervesikulärer Wechselwirkungen in verdünnter Lösung. Im Bereich geringer Phospholipidkonzentrationen von $c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ist die Wasserlöslichkeit des Toluol jedoch nicht vernachlässigbar. Somit muß durch Bestimmung des molaren Verteilungskoeffizient DMPC/Wasser eine effektive Konzentration von Toluol in der Phospholipiddoppelschicht ermittelt werden (Abbildung 4-20).

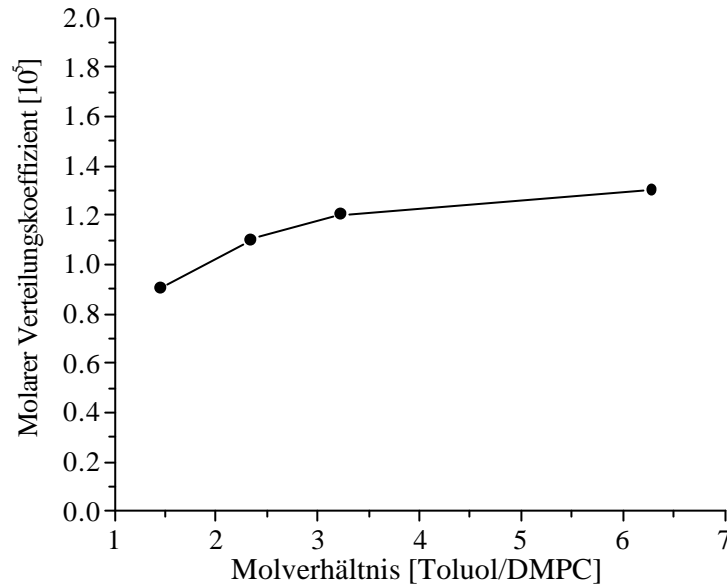


Abbildung 4-20: Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten DMPC/Wasser für Toluol vom Molverhältnis [Toluol/DMPC] bei 30°C. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung der Methode nach Katz und Diamond [120] durch Ermittlung der Toluolkonzentration der wäßrigen Phase mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie nach Abtrennung der Vesikelphase.

Da Vesikel in dieser Größenordnung eine polydisperse Verteilung aufweisen und aus einem Gemisch uni- sowie multilamellarer Strukturen zusammengesetzt sind, kann die bestimmte effektive Konzentration jedoch nur als eine Näherung angesehen werden.

4.8.1.2 Konzentrationsabhängiger Einfluß auf die Biegesteifigkeit

Abbildung 4-21 zeigt den Verlauf der Biegesteifigkeit k_c unilamellarer DMPC-Vesikel als Funktion von solubilisiertem Toluol. Die Einlagerung des lipophilen Solubilisats bewirkt eine signifikante Abnahme von $k_c = (1.42 \pm 0.21) \cdot 10^{-19}$ J auf einen Wert von $k_c = (0.36 \pm 0.10) \cdot 10^{-19}$ J.

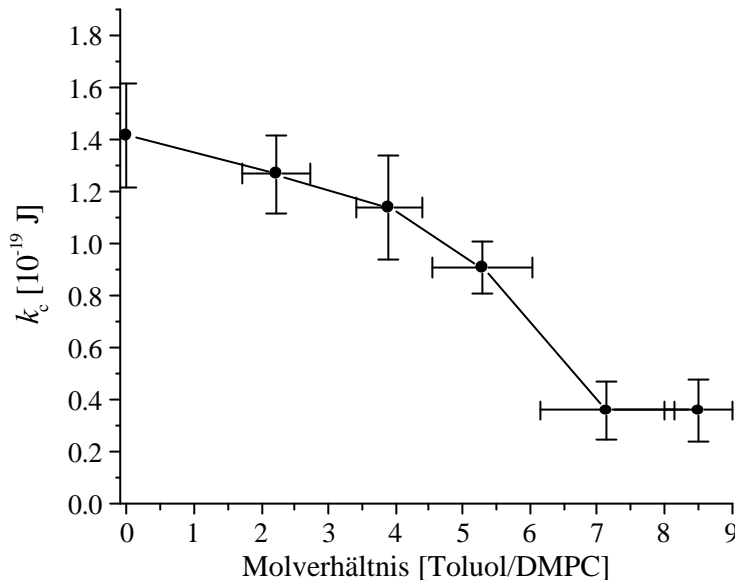


Abbildung 4-21: Einfluß der solubilisierten Toluolmenge auf die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei 30.0°C . Die Meßpunkte entsprechen Durchschnittswerten von 5 - 15 Vesikeln.

Der konzentrationsabhängige Verlauf der Erniedrigung von k_c kann durch eine Einteilung in drei unterschiedliche Regime charakterisiert werden. Im Bereich kleiner Toluolkonzentrationen zeigt sich eine verhältnismäßig geringe Abhängigkeit von der Solubilisatkonzentration. Dieses ist insofern überraschend, als daß die Biegesteifigkeit hauptsächlich durch den lipophilen Bereich der Doppelschicht dominiert wird [92]. Veränderungen der intermolekularen Wechselwirkungen des Acylbereichs sollten somit einen ausgeprägten Einfluß auf k_c haben. Mit zunehmender Solubilisatmenge sinkt die Biegesteifigkeit deutlich ab und erreicht bei vollständiger Sättigung der Wasserphase mit Toluol einen Plateaubereich. Die Vesikel rahmen in diesem Bereich als Folge der erniedrigten Dichte des binären Gemisches auf.

Gemäß den Ergebnissen der Röntgenbeugung ist insbesondere bei hoher Solubilisatkonzentrationen eine Zunahme der Dicke der Doppelschicht zu erwarten. Eine Erklärung für die Abnahme der Biegesteifigkeit mit steigender Toluolmenge sollte somit nicht einzig auf geometrischen Argumenten gemäß Gleichung (4.32) beruhen. Vielmehr ist eine mögliche Ursache auf molekularer Ebene zu vermuten. Dies soll im folgenden eingehend diskutiert werden.

Toluol wird wie bereits dargelegt in vergleichsweise hoher Konzentration im Membranbereich von DMPC-Vesikeln solubilisiert. Kleine Solubilisatkonzentrationen führen hierbei zu geringfügigen Veränderungen der elastischen Membraneigenschaften. Der lipophile Bereich der fluiden Doppelschicht liefert genügend freies Volumen, um kleine Moleküle ohne nennenswerte Störung der Integrität der Membran einzulagern [39,121]. Die Anisotropie des Acylbereichs bewirkt ferner eine bevorzugte Orientierung des Toluols senkrecht zur Membranebene [122], wobei ein einzelnes Molekül Toluol entlang einer voll ausgestreckten Kette eines DMPC-Moleküls nur etwa 30% der Länge beansprucht. Der Einfluß kleiner Toluolmengen auf die elastischen Eigenschaften ist im Vergleich zu grenzflächenaktiven Substanzen gering und mit einer Erniedrigung der Acyl-Acyl-Wechselwirkung der Amphiphile zu begründen.

Im Bereich steigender Solubilisatkonzentrationen dominieren vermutlich Diffusionsprozesse des Solubilisats das elastische Verhalten der Membran. Im Gegensatz zu polaren Solubilisaten, die im Kopfgruppenbereich der Doppelschicht verankert sind, zeigen lipophile Solubilisate eine um etwa einen Faktor 10 höhere laterale Mobilität [123]. Typische Diffusionskonstanten liegen im Bereich von $D = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für Benzol [123] und $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für Pyren [63]. Neben der lateralen beobachtet man bei lipophilen Solubilisaten ebenfalls eine transversale Diffusion [62]. Eine Kopplung der lokalen Solubilisatkonzentration und der Membrankrümmung wird vielfach im Bereich grenzflächenaktiver Solubilisate diskutiert [57,116,124] und konnte für lipophile Solubilisate in Kapitel 2 und Kapitel 3 bereits gezeigt werden. Diffusionsprozesse des Solubilisats sind schnell im Vergleich zu Krümmungsänderungen der Doppelschicht, wie sie bei der Fluktuation auftreten. Somit kommt es während der Auslenkung der Membran aus der Gleichgewichtslage zu einer verstärkten lateralen Diffusion des Solubilisats in Regionen bevorzugter Packungsbedingungen. Hieraus resultiert letztendlich eine Erniedrigung der Biegesteifigkeit k_c . Moleküle, die im Kopfgruppenbereich verankert sind, zeigen ausschließlich laterale Diffusionsprozesse. Im Falle lipophiler Solubilisate sind jedoch zusätzlich transversale Diffusionsprozesse in Form eines Flip-Flops des Solubilisats zwischen den Monoschichten der Doppelschicht möglich, der Einfluß auf die Biegesteifigkeit kurz erläutert wird.

Die thermisch induzierte Auslenkung der Membran aus der Gleichgewichtslage, wie sie während der Undulation der Membran auftritt, bewirkt lokal eine Änderung der Membrankrümmung. Hierbei erfährt der hydrophobe Bereich der konvexen Monoschicht eine Kompression und analog der unpolare Bereich der konkaven Schicht eine Expansion (vgl. Abbildung 4-22).



Abbildung 4-22: Schematische Darstellung des Spannungseinflusses auf den lipophilen Bereich während der Biegung der Lipiddoppelschicht (Erläuterungen im Text). Der lipophile Bereich der unteren Monoschicht wird bei der Auslenkung aus der Ruhelage expandiert und der obere gleichzeitig komprimiert.

Als Folge dieser hauptsächlich im lipophilen Bereich der Monoschichten lokalisierten Wechselwirkungen resultiert eine elastische Kraft der Membran in Richtung ihrer Ausgangslage. Je größer somit die Wechselwirkungen der Acylreste ist desto größer wird die resultierende Biegesteifigkeit der Membran und umgekehrt. Die Einlagerung eines frei beweglichen Moleküls innerhalb des lipophilen Membranbereichs führt zu einer Reduktion lokaler Dichtefluktuationen während der Undulation der Membran. Bei der Auslenkung der Membran kommt es zu einer bevorzugten Diffusion der lipophilen Moleküle aus den komprimierten in die expandierten Bereiche. Diese Diffusion ist sowohl lateral, als auch in Form eines Austausches zwischen den einzelnen Monoschichten möglich. Dies führt zu einer Verstärkung der Amplituden der Fluktuation der Membran und zur Erniedrigung der Biegesteifigkeit k_c .

Ein weiterer Einfluß, die in Kapitel 3 diskutierte Segregation ist vermutlich im Bereich steigender Solubilisatkonzentrationen zu beobachten. Innerhalb der Doppelschicht koexistieren zwei fluide lamellare Phasen, eine toluolreiche und eine toluolarme in Abhängigkeit von der Temperatur und Toluolmenge. Die Existenz eines biphasigen Gleichgewichts wird als eine mögliche Erklärung für Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von Vesikelmembranen diskutiert [114]. Dies führt innerhalb der Doppelschicht zu Fluktuationen der lokalen Zusammensetzung. Effekte dieser Art haben großen Einfluß auf die Kompressibilität von Zwei-Komponenten-Gemischen [125] und können vermutlich eine Erniedrigung der Biegesteifigkeit bewirken [126,127].

Die Existenz eines Plateaus von k_c im Bereich von Toluolkonzentrationen nahe der maximalen Solubilisierungskapazität der Membran deutet auf ein Minimum der Amphiphilwechselwirkung zugunsten von Acyl-Toluol-Interaktionen hin. Dieser Einfluß entspricht Beobachtungen im System DSPC/Benzol [39]. Die mit Hilfe der Röntgenbeugung beobachtete Zunahme der Membrandicke unterstreicht die Interkalation zwischen den Monoschichten, so daß auch mögliche Verzahnungen der Schichten vollständig aufgehoben werden.

4.8.2 Phasenseparationen im System Toluol/DMPC

Toluolkonzentrationen nahe der Sättigungsgrenze der Doppelschicht führen zu visualisierbaren Defekten im Membranbereich, die als Domänen von Toluol im Membranbereich als Folge einer Phasenseparation identifiziert werden konnten (Abbildung 4-23). Hierdurch bedingt ist ein erneuter Anstieg der Biegesteifigkeit k_c detektierbar (Daten nicht in Abbildung 4-21 enthalten). Interessanterweise sind die Domänen trotz der zu erwartenden Linienspannung stabil.

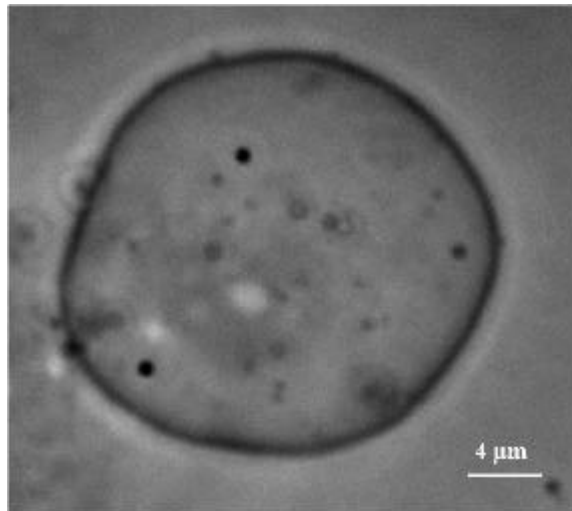


Abbildung 4-23: Bild eines fluktuierenden Vesikels mit einer Toluolkonzentration nahe der maximalen Solubilisierungskapazität. Die dunklen punktförmigen Bereiche befinden sich auf der Vesikeloberfläche. Hierbei handelt es sich um Anreicherungen des Solubilisats im Membranbereich. Die Domänen weisen Durchmesser von etwa 800 nm auf und sind über den Beobachtungszeitraum einiger Stunden stabil. Eine Fluktuationsanalyse des Vesikels liefert eine Biegesteifigkeit von $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J.

Toluolkonzentrationen oberhalb der Solubilisierungskapazität der fluiden Vesikel führen zur Koexistenz von Emulsionstropfen mit sphärischen Vesikeln. Die Vesikel weisen analog den Beobachtungen unter Verwendung der DPPC-Vesikel phasensepariertes Toluol auf (Abbildung 4-24).

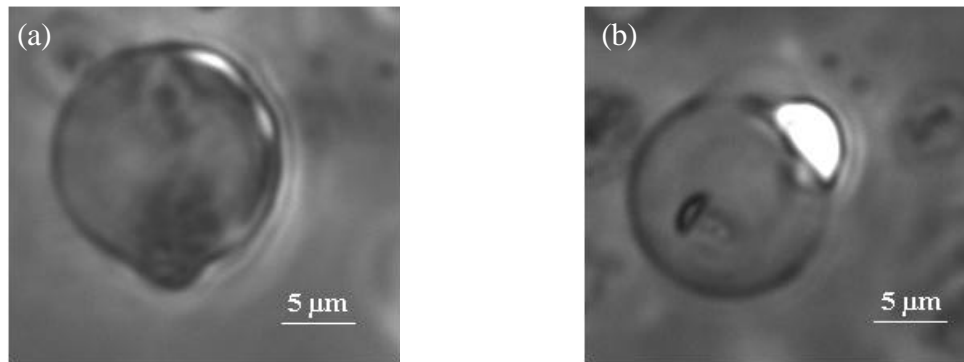


Abbildung 4-24: DMPC-Vesikel im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität. Ein Teil des Membranbereichs ist durch die Separation von Toluol (heller Bereich) deutlich verbreitert (a), bzw. Toluol ist tropfenförmig im Membranbereich eingelagert (b). Die Vesikel weisen keinerlei Überschußfläche auf und zeigen somit keine thermisch angeregten Undulationen. Die Krümmungsradien sind im Bereich der Toluoleinlagerung leicht erniedrigt.

Die Segregation erfolgt unter Separation der beiden Monoschichten und Ausweichen von Toluol in die dritte Dimension. Um den ungünstigen Toluol/Wasser-Kontakt zu minimieren, diffundieren vermutlich verstärkt Phospholipidmoleküle zur Grenzfläche. Hierdurch wird die Überschußfläche des Vesikels stark reduziert, so daß thermisch bedingte Undulationen in der Folge nicht mehr beobachtbar sind.

Derartige visualisierbare Phasenseparationen konnten für den Bereich der BTX-Aromaten als lipophile Solubilisate nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich keinerlei Abhängigkeit von der Kettenlänge der Acylreste des Lecithins.

4.9 Temperaturabhängige Formfluktuationsanalyse

4.9.1 Thermoelastische Eigenschaften

Da der Biegesteifigkeitsmodul k_c von Phospholipidvesikeln in der L_α -Phase wesentlich durch Wechselwirkungen des hydrophoben Bereichs des Bilayers geprägt wird [92], ist ferner ein temperaturabhängiges Verhalten zu erwarten. Mit steigender Temperatur steigt die Anzahl möglicher Rotationsisomere im Acylbereich der Doppelschicht. Hierdurch nimmt die Länge l_c sowie resultierend die van-der-Waals-Wechselwirkungen der Acylketten ab. Gleichzeitig steigt die Membranfläche an, während die Dicke der Doppelschicht und die Biegesteifigkeit sinken.

Die Untersuchungen des thermotropen Verhaltens wurden unter Bedingungen unendlicher Verdünnung an einzelnen Vesikeln durchgeführt. Abbildung 4-25 zeigt den experimentell ermittelten Verlauf des Biegesteifigkeitsmoduls k_c eines DMPC-Vesikels als Funktion der Temperatur.

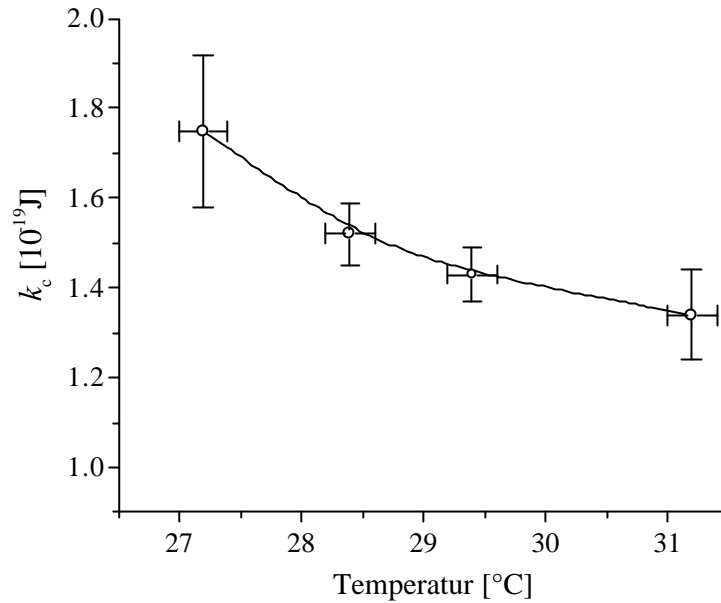


Abbildung 4-25: Temperaturabhängiger Verlauf der Biegesteifigkeit k_c eines DMPC-Vesikels. Die experimentell ermittelten Werte wurden durch Fluktuationsanalyse eines einzelnen Vesikels durch Variation der Temperatur erhalten.

Bei Annäherung der Temperatur der Phasenumwandlung ($T_m = 24^\circ\text{C}$) ist eine deutlich erhöhte Biegesteifigkeit zu erkennen. Hier werden Anomalien im elastischen Verhalten der Membran beobachtbar, die den Bereich $T < T_m + 3^\circ\text{C}$ dominieren und eine Folge der Phasenumwandlungen sind [92].

Da die Spannung der Membran ebenfalls temperaturabhängig ist, wurden vergleichende Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der Biegesteifigkeit an Vesikeln mit nahezu identischen effektiven Spannungen \bar{s} durchgeführt. Abbildung 4-26 zeigt zum Vergleich die Temperaturabhängigkeit der Biegesteifigkeit eines toluolbeladenen DMPC-Vesikels.

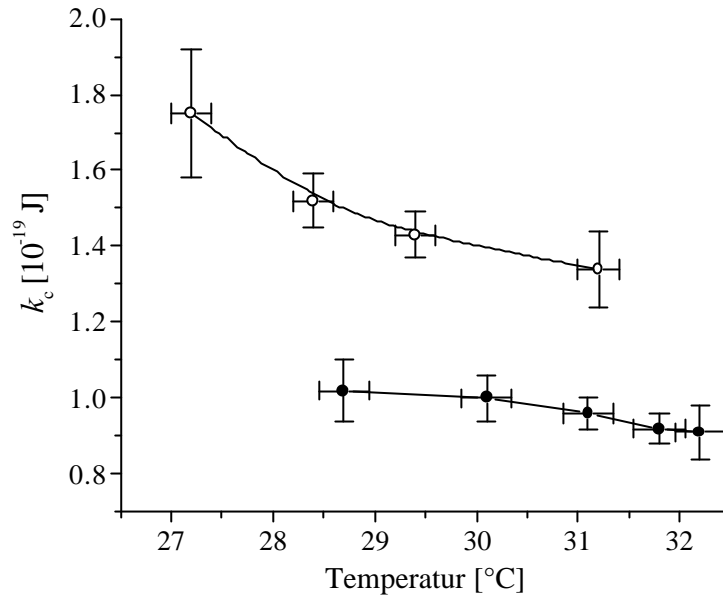


Abbildung 4-26: Einfluß der Temperatur auf die Biegesteifigkeit k_c unilamellarer Vesikel. Die Grafik zeigt im Vergleich den Verlauf eines DMPC-Vesikels (—○—) sowie eines DMPC-Vesikels mit solubilisiertem Toluol (85 Mol-%) nahe der maximalen Solubilisierungskapazität der Membran (—●—).

Die thermische Abhängigkeit der Biegesteifigkeit wird durch das Solubilisat deutlich beeinflusst. So zeigt sich im Temperaturbereich von 29°C bis 31°C eine um den Faktor zwei höhere Abnahme von k_c mit steigender Temperatur bei Abwesenheit des lipophilen Solubilisats. Die Abnahme der Biegesteifigkeit bei Erhöhung der Temperatur ist eine Folge der Bildung von Rotationsisomeren und der hierdurch bedingten verminderten van-der-Waals-Wechselwirkung der Acylreste im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Unter dem Einfluß des lipophilen Solubilisats ist eine temperaturbedingte Bildung von Rotationsisomeren bei nahezu solubilisatgesättigter Doppelschicht entsprechend klein.

4.9.2 Isobarer thermischer Flächenausdehnungskoeffizient b

Die thermisch bedingte Ausdehnung von Wasser ist im Vergleich der einer Lipiddoppelschicht klein. Dieses hat zur Folge, daß bei einer Temperaturerhöhung die Membranfläche A zunimmt, während das innere Volumen V nahezu konstant bleibt. Folglich sinkt das reduzierte Volumen und die Gestalt des Vesikels ändert sich. So erfolgt ausgehend von einer Kugel bei Erhöhung der Temperatur eine Formänderung in eine ellipsoide Gestalt.

Das thermische Verhalten wird durch den jeweiligen Ausdehnungskoeffizienten beschrieben. Im Gegensatz zu homogenen, isotropen Flüssigkeiten, bei denen der Flächen- und der Volumenausdehnungskoeffizient proportional sind, zeigt die thermische Ausdehnung von Lipiddoppelschichten ein anisotropes Verhalten.

Die Volumenausdehnung g_V folgt aus der Summe $g_V = \mathbf{b} + \mathbf{b}_\perp$, des Flächenausdehnungskoeffizienten \mathbf{b} und des Ausdehnungskoeffizienten des Membranquerschnitts \mathbf{b}_\perp . Die thermisch bedingte laterale Ausdehnung der Membran bei einer Erhöhung der Temperatur ist im allgemeinen mit der gleichzeitigen Dickenabnahme verbunden.

Der isobare thermische Flächenausdehnungskoeffizient \mathbf{b} einzelner unilamellarer Vesikel kann mit Hilfe der Videomikroskopie aus der temperaturabhängigen Änderung der Vesikelfläche ermittelt werden. Zur Charakterisierung des Einflusses eines lipophilen Solubilizats auf den Wert von \mathbf{b} erfolgte die Bestimmung unter Verwendung einzelner DMPC-Vesikel sowie DMPC-Vesikel nach Solubilisierung von Toluol (85 Mol-%) im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Hierzu wurden ausschließlich Vesikel mit etwa identischer effektiver Spannung verglichen.

Der Flächenausdehnungskoeffizient \mathbf{b} wird definiert als

$$\mathbf{b} = \frac{1}{A_0} \cdot \left(\frac{\partial A}{\partial T} \right)_p \quad (4.33)$$

und kann bei bekannter Temperaturabhängigkeit der Biegesteifigkeit sowie der effektiven Spannung (Abbildung 4-27) durch Ermittlung der Überschußfläche Δ gemäß Gleichung (4.17) ermittelt werden.

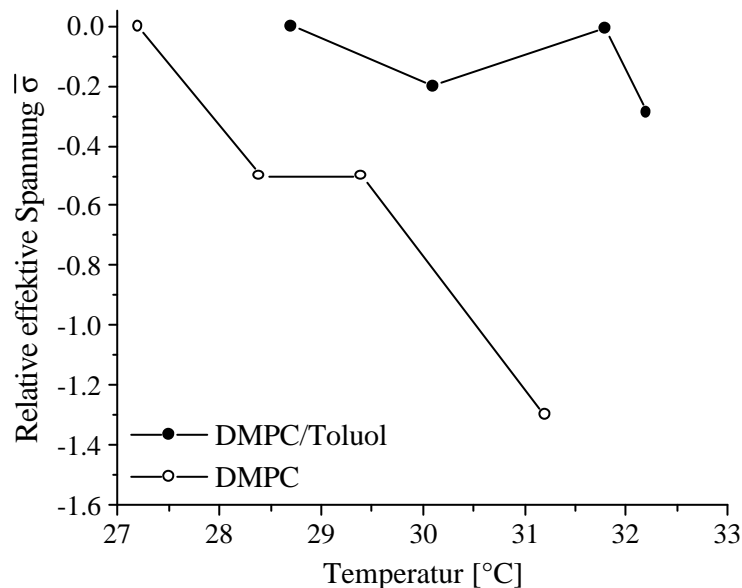


Abbildung 4-27: Temperaturabhängige Abnahme der effektiven Spannung (bezogen auf die Ausgangswerte bei niedriger Temperatur) eines unilamellaren DMPC-Vesikels (—○—) und eines DMPC-Vesikels nach Solubilisierung von Toluol (—●—).

Der Flächenausdehnungskoeffizient \mathbf{b} folgt aus der Temperaturabhängigkeit der Überschußfläche gemäß [113]

$$\Delta(T) = \mathbf{b} \cdot (T - T_0) \quad (4.34)$$

und kann unter der Annahme einer nahezu linearen Abhängigkeit nach Abbildung 4-28 ermittelt werden. T_0 bezeichnet hierbei die Temperatur, bei der formal jegliche Überschußfläche verschwunden ist ($\Delta = 0$) und thermisch angeregte Fluktuationen nicht mehr beobachtet werden.

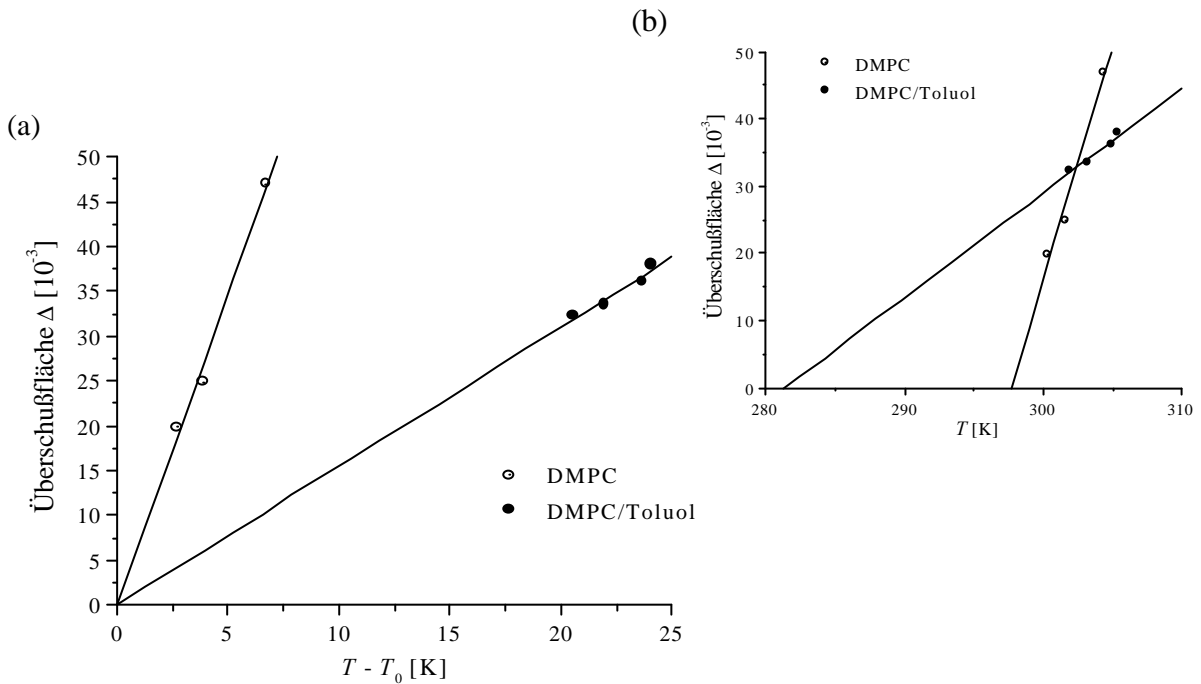


Abbildung 4-28: (a) Verlauf der Überschußfläche als Funktion der reduzierten Temperatur ($T - T_0$) zur Ermittlung des thermischen Flächenausdehnungskoeffizienten \mathbf{b} nach Gleichung (4.34). Die Temperatur T_0 ergibt sich aus dem Abszissenschnittpunkt der Auftragung Δ vs. T (b).

Tabelle 4-6: Vergleich der ermittelten thermischen Ausdehnungskoeffizienten \mathbf{b} sowie der Temperatur T_0 unilamellarer Vesikel.

| | T_0 [°C] | \mathbf{b} [10^{-3} K^{-1}] |
|------------------------|------------|---|
| DMPC | 24.5 | 6.9 ± 0.8 |
| DMPC/Toluol (85 Mol-%) | 8.2 | 1.6 ± 0.3 |

Der ermittelte Flächenausdehnungskoeffizient \mathbf{b} von DMPC zeigt eine gute Übereinstimmung mit Literaturwerten. Diese liegen im Bereich von $6.8 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (29°C) [96] und $10.4 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (24°C) [113]. Unter dem Einfluß von Toluol bei Konzentrationen nahe der maximalen Solubilisierungskapazität erfolgt eine deutliche Erniedrigung von \mathbf{b} und T_0 in

Richtung des Ausdehnungskoeffizienten von Toluol. Die Reduktion von b ist vergleichbar mit der nach Einlagerung von Cholesterin in die Membran von DMPC-Vesikeln (50 Mol-%) mit $b = 1.3 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ unter gleichzeitiger Erniedrigung der Kompressibilität der Membranfläche [96,128].

Die reduzierte thermische Ausdehnung der Doppelschicht nach Solubilisierung von Toluol ist vermutlich eine Folge des Auftretens von Grenzflächenspannungen. Die thermisch bedingte laterale Ausdehnung führt im Bereich der Kopfgruppe zu einem erhöhten Platzbedarf und zu einem Kontakt des lipophilen Bereichs mit der wässrigen Phase. In Anwesenheit eines lipophilen Solubilisats geschieht dies bei vergleichbar kleinerer Temperaturerhöhung und führt zu einer erhöhten Grenzflächenspannung im Bereich der Öl/Wasser-Grenzfläche. Die Grenzflächenspannung wirkt bei einer Temperaturerhöhung somit der lateralen Ausdehnung bedingt durch die Ausbildung von Rotationsisomeren entgegen.

4.9.3 Aktivierungsenergie der Biegsamkeit

Mit Hilfe eines Arrhenius-Diagramms kann eine scheinbare Aktivierungsenergie E_0 der Biegsamkeit, d.h. der inversen Biegesteifigkeit der Membran gemäß [95]:

$$k_c = k_{c,0} \cdot e^{\left(\frac{E_0}{k \cdot T}\right)} \quad (4.35)$$

durch lineare Anpassung nach Auftragung von $\ln k_c$ vs. T^{-1} ermittelt werden (Abbildung 4-29). Der Vergleich der Daten in Tabelle 4-7 für DMPC-Vesikel zeigt eine deutliche erniedrigte Aktivierungsenergie bei Anwesenheit eines lipophilen Solubilisats.

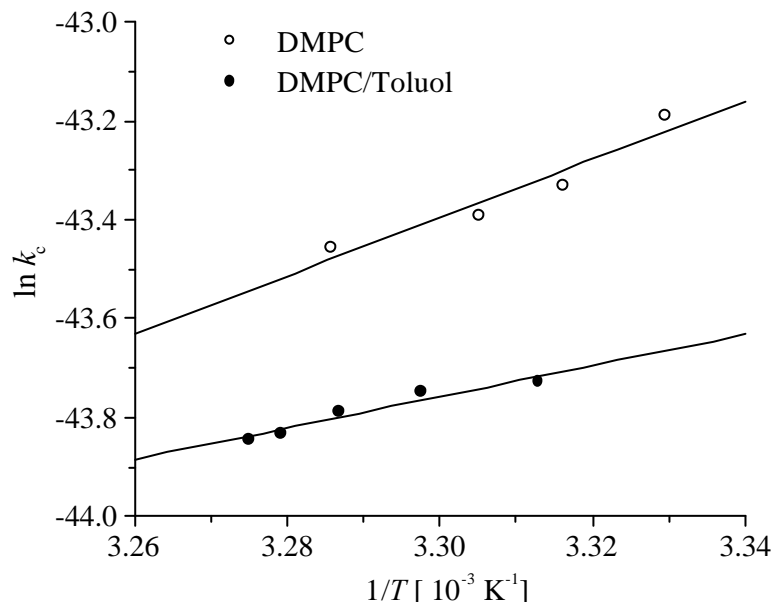


Abbildung 4-29: Arrhenius-Diagramm zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_0 der Biegsamkeit (inversen Biegesteifigkeit).

Tabelle 4-7: Aktivierungsenergie der Biegsamkeit (Flexibilität) unilamellarer Vesikel verschiedener Zusammensetzung.

| Zusammensetzung | E_0 [10^{-19} J] | Literatur |
|------------------------|-----------------------|--------------|
| DMPC | 1.16 ± 0.20 | diese Arbeit |
| DMPC/Toluol (85 Mol-%) | 0.60 ± 0.16 | diese Arbeit |
| DOPC | 0.98 ± 0.16 | [95] |

4.10 Zusammenfassung

Die Fluktuationsanalyse erlaubt die nicht-invasive Ermittlung der Biegesteifigkeit k_c einzelner unilamellarer Vesikel auf der Basis der Videomikroskopie. Die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel bei 30°C liefert in Übereinstimmung mit Literaturdaten einen Wert von $k_c = (1.42 \pm 0.21) \cdot 10^{-19}$ J, der mit steigender Temperatur sinkt.

Der Einfluß grenzflächenaktiver Solubilisate wie Natriumdodecylsulfat oder Ethanol führt zu einer Erniedrigung von k_c . Die Solubilisierung von Toluol im lipophilen Bereich der Doppelschicht von DMPC-Vesikel bewirkt ebenfalls eine Reduktion der Biegesteifigkeit bis $k_c = (0.36 \pm 0.10) \cdot 10^{-19}$ J. Diese ist konzentrationsabhängig und kann mit der hohen Beweglichkeit des Solubilisats begründet werden. Ferner haben Inhomogenitäten in der Zusammensetzung von Solubilisat und Amphiphil im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen einen Einfluß auf die Biegesteifigkeit. Unter dem Einfluß von Toluol sinkt der thermische Ausdehnungskoeffizient der Membran von DMPC-Vesikeln von $(6.9 \pm 0.8) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ auf $(1.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$, ein Effekt, der auf erhöhte Grenzflächenspannungen hindeutet. Das Auftreten von mikroskopisch nachweisbaren Toluoldomänen innerhalb der Membran im Bereich der maximalen Solubilisierungskapazität ist eine Folge einer Phasenseparation und führt zu einem anomalen Verhalten der Biegesteifigkeit k_c , die in der Folge ansteigt. Eine weitere Erhöhung der Solubilisatkonzentration führt zur Aggregation einzelner Cluster unter deutlicher Dickenzunahme der Membran. Dieses Ausweichen in die dritte Dimension erfolgt jedoch auf Kosten der Überschußfläche Δ , so daß Vesikel im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität keine Überschußfläche aufweisen.

4.11 Bedeutung der Biegesteifigkeit von Vesikeln

Neben der bereits diskutierten Bedeutung der Biegesteifigkeit von Amphiphilfilmen an Grenzflächen, spielt k_c vermutlich auch eine entscheidende Rolle bei Solubilisierungsprozessen von Vesikeln, ein Punkt, der im folgenden Kapitel näher erläutert wird. Die Biegesteifigkeit hat ebenfalls Einfluß auf das Verhalten von Vesikeln im Bereich poröser Materialien und bei der Annäherung von Vesikeln an feste Grenzflächen.

4.11.1 Permeation flexibler Phospholipidvesikel in mikroporösen Materialien

Untersuchungen des Permeationsverhaltens von Vesikeln im Bereich artifizierender sowie biologischer Barrieren wie der menschlichen Haut konnten zeigen, daß die Permeabilität von Vesikeln neben dem Verhältnis von Poren- zu Vesikelgröße (r_p bzw. r_v) sehr stark von der Biegesteifigkeit k_c abhängt. Nach Cevc [8] gilt für die Permeationsrate j von Vesikeln durch eine, im Vergleich zum Vesikelradius, kleinere Pore aufgrund eines Druckgefälles Δp die genäherte Beziehung

$$j \sim \frac{kT}{k_c} \left(\frac{r_p}{r_v} \right)^2 \Delta p. \quad (4.36)$$

Die Zugabe von Natriumcholat zu Phospholipidvesikeln führt zur einer deutlichen Erniedrigung der Biegesteifigkeit und zur Bildung sogenannter Transfersomen, die selbst bei einem Verhältnis $r_v/r_p \geq 0.25$ Permeationsraten zeigen, die weitaus größer als diejenigen unbeladener Vesikel sind und im Bereich mizellarer Lösungen ($r_m/r_p \approx 60$) liegen.

Mikroskopische Untersuchungen der Permeation riesiger fluider DMPC-Vesikel durch ein poröses Material bestehend aus Quarzpartikeln bestätigen den Durchtritt durch vergleichsweise kleine Poren (Abbildung 4-30). Liegen die Vesikel im Gelzustand vor, so kann eine Permeation im Falle von $r_v > r_p$ nicht beobachtet werden.

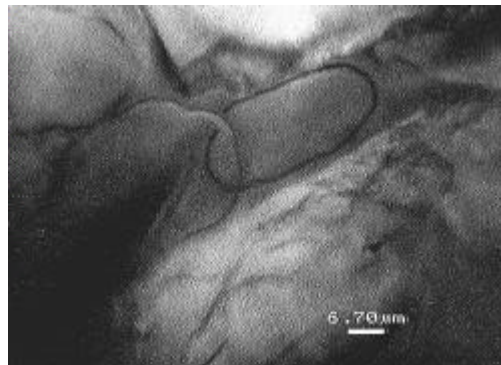


Abbildung 4-30: Permeation einer Reihe fluider DMPC-Vesikel aufgrund eines Druckgradienten durch einen engen Porenbereich bestehend aus diffusen Quarzpartikeln. Die Vesikel werden beim Eintritt in die vergleichsweise kleine Pore in eine elliptische Form deformiert. Auf diese Weise ist ein Durchdringen der Pore möglich, obwohl der Vesikelradius größer ist als der Porenradius.

4.11.2 Undulationskräfte bei Annäherung von Vesikeln an feste Grenzflächen

Die Biegesteifigkeit fluider Membranen ist verantwortlich für fluktuationsbedingte Wechselwirkungen von Vesikeln mit festen Grenzflächen. Thermische bedingte Fluktuationen relaxierter Vesikel führen zu einer dynamischen Oberflächenrauigkeit der Vesikel-

membran. Mit Annäherung an eine feste Grenzfläche werden die Moden mit größerer Wellenlänge nach und nach unterdrückt. Hieraus resultiert eine repulsive, entropische Kraft, die mit Annäherung an die Oberfläche ansteigt. Mit dem Abstand des Vesikels d_w von der Oberfläche gilt [129]

$$E_{\text{Und}} = \frac{3\mathbf{p}^2 (kT)^2}{128 k_c} \frac{1}{d_w^2}. \quad (4.37)$$

Die mittleren quadratischen Amplituden der Fluktuationen stehen in direktem Zusammenhang mit dem Quadrat des mittleren Abstandes d_w [130]

$$\langle u^2 \rangle \approx d_w^2.$$

Die Undulationskräfte liegen für DMPC-Vesikel mit der Dicke d_1 der Doppelschicht in der gleichen Größenordnung wie die anziehenden van-der-Waals-Wechselwirkungen gemäß

$$E_{\text{vdW}} = \frac{A_H}{12\mathbf{p}} \left(\frac{1}{d_w^2} + \frac{1}{(d_w + 2d_1)} - \frac{2}{(d_w + d_1)^2} \right) \quad (4.38)$$

wobei A_H die Hamaker Konstante bezeichnet ($A_H = 1 - 6 \cdot 10^{-21}$ J [129]).

Falls die Biegesteifigkeit k_c klein gegen kT ist, können Undulationskräfte die Wechselwirkung dominieren. Ferner minimieren sich die Undulationskräfte, falls die Membranspannung z.B. aufgrund osmotischer Effekte steigt. Hierdurch werden die Amplituden der Undulation erniedrigt.