

# **Theoretische und experimentelle Untersuchungen von Mischungsphänomenen in fluiden Lipiddoppelschichten**

**Anwendung der  $^2\text{H}$ -NMR- und FTIR-Spektroskopie und der Kalorimetrie zur Untersuchung von pseudobinären Phosphatidylcholin/Phosphatidylglycerin- und Phosphatidylcholin/Phosphatidylethanolamin-Systemen sowie Einsatz von Monte Carlo-Methoden zur Computersimulation von lateralen Lipidwechselwirkungen**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation  
(D 386)

vorgelegt von

**CHRISTOF JOHANN**

Kaiserslautern 1999

Betreuer: Prof. Dr. A. Blume

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 1995 bis August 1999 im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern und im Institut für Physikalische Chemie in Halle an der Saale.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:

**26. August 1999**

Prüfungskommission:

Vorsitzender: **Prof. Dr. G. Himbert**

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. A. Blume**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. S. Ernst**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Blume für die hervorragende Betreuung und die gewährten persönlichen Freiräume. Es fällt schwer, sich bessere Arbeitsbedingungen vorzustellen.

Herrn Prof. Dr. Ernst danke ich für das freundliche Entgegenkommen, meine Arbeit in einem sehr kurzen Zeitraum zu begutachten, um meine Promotion noch vor dem 1.9. zu ermöglichen.

Herrn Prof. Dr. Himbert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Herzdame Simone gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	<i>1</i>
<b>1.1</b>	<b>BEDEUTUNG DER PHOSPHOLIPIDE</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>MOLEKULARE STRUKTUR DER PHOSPHOLIPIDE</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>EIGENSCHAFTEN DER PHOSPHOLIPIDE</b>	<b>4</b>
2	<i>Zielsetzung</i>	<i>9</i>
3	<i>Verwendete Methoden</i>	<i>10</i>
<b>3.1</b>	<b>DIE MONTE CARLO-TECHNIK</b>	<b>10</b>
3.1.1	Einführung	10
3.1.2	Statistisch-mechanische Grundlagen	11
3.1.3	Allgemeiner Algorithmus	16
3.1.4	Vor- und Nachteile von Monte Carlo-Methoden	18
<b>3.2</b>	<b><sup>2</sup>H-NMR-SPEKTROSKOPIE</b>	<b>19</b>
3.2.1	Allgemeine Grundlagen	19
3.2.2	Deuterium-NMR-Spektroskopie an Phospholipiden	22
<b>3.3</b>	<b>FTIR-SPEKTROSKOPIE</b>	<b>29</b>
3.3.1	Allgemeine Grundlagen	29
3.3.2	FTIR-Spektroskopie an Phospholipiden	31
<b>3.4</b>	<b>DIFFERENTIELLE KALORIMETRIE (DSC)</b>	<b>32</b>
4	<i>Theoretische Arbeiten</i>	<i>34</i>
<b>4.1</b>	<b>Grundlegende Entscheidungen</b>	<b>34</b>
4.1.1	Das Gitter	34
4.1.2	Der Zufallsgenerator	37
<b>4.2</b>	<b>Monte Carlo-Simulationen auf der Grundlage unterschiedlicher Modelle</b>	<b>41</b>
4.2.1	Zweikomponenten-/Einphasensysteme mit und ohne Elektrostatik	41
4.2.1.1	Herleitung eines allgemeinen Modells ohne Elektrostatik	42
4.2.1.1.1	Exemplarische Anwendung und programmtechnische Details	48
4.2.1.1.2	Fazit	60
4.2.1.2	Erweiterung des Modells unter Berücksichtigung der Elektrostatik	62
4.2.1.2.1	Exemplarische Anwendung	66
4.2.1.2.2	Fazit	70
4.2.2	Einkomponenten-/Zweiphasensysteme	71
4.2.2.1	Herleitung eines Zweizustandsmodells mit experimentellen Parametern	72
4.2.2.1.1	Exemplarische Anwendung	74
4.2.2.1.2	Fazit	100
4.2.2.2	Das Pink-Modell	100
4.2.2.2.1	Herleitung des Modells	101
4.2.2.2.2	Auswahl der mikroskopischen Größen	108
4.2.2.2.3	Exemplarische Anwendung	111
4.2.2.2.4	Fazit	121
4.2.3	Zweikomponenten-/Zweiphasensysteme	122
4.2.3.1	Herleitung des Modells	122
4.2.3.2	Exemplarische Anwendung	126
4.2.3.3	Fazit	142

5	<i>Experimentelle Arbeiten</i>	<b>143</b>
<b>5.1</b>	<b>DSC-MESSUNGEN</b>	<b>143</b>
5.1.1	Probenvorbereitung und meßtechnische Details	143
5.1.2	Das System DMPC/DPPG	144
5.1.2.1	Diskussion	150
5.1.3	Das PC/PE-System	151
5.1.3.1	Das System DMPC/DMPE	154
5.1.3.2	Das System DPPC/DPPE	158
5.1.3.3	Das System DMPC/DPPE	163
5.1.3.4	Das Gemisch DPPC/DMPE	167
5.1.3.5	Allgemeiner Vergleich	170
<b>5.2</b>	<b>SPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN</b>	<b>178</b>
5.2.1	Probenvorbereitung und meßtechnische Details	178
5.2.1.1	<sup>2</sup> H-NMR-Spektroskopie	178
5.2.1.2	FTIR-Spektroskopie	180
5.2.2	Das PC/PE-System	181
5.2.2.1	<sup>2</sup> H-NMR-Spektroskopie	181
5.2.2.2	FTIR-Spektroskopie	201
5.2.3	Das PC/PG-System	226
5.2.3.1	<sup>2</sup> H-NMR-Spektroskopie	226
5.2.3.2	FTIR-Spektroskopie	241
<b>5.3</b>	<b>SYNTHESEN</b>	<b>257</b>
5.3.1	Verwendete Geräte	257
5.3.2	Verwendete Chemikalien	257
5.3.3	Darstellung des Phosphat-Reagenzes	259
5.3.4	Isolierung von Phospholipase D	260
5.3.5	Synthese von d <sub>54</sub> -DMPC	261
5.3.5.1	Vorbehandlung der Lösungsmittel	261
5.3.5.2	Darstellung des L- $\alpha$ -Glycerophosphatidylcholin-Cadmiumkomplexes	262
5.3.5.3	Darstellung von d <sub>54</sub> -Myristinsäureanhydrid	262
5.3.5.4	Darstellung von d <sub>54</sub> -DMPC	263
5.3.5.5	Chromatographische Reinigung	265
5.3.6	Darstellung von d <sub>62</sub> -DPPC	266
5.3.7	Darstellung von d <sub>54</sub> -DMPA	267
5.3.8	Darstellung von d <sub>54</sub> -DMPG	269
5.3.9	Darstellung von d <sub>62</sub> -DPPG	272
5.3.10	Darstellung von d <sub>54</sub> -DMPE	272
5.3.11	Darstellung von d <sub>62</sub> -DPPE	273
6	<i>Zusammenfassung</i>	<b>275</b>
<b>6.1</b>	<b>Theoretische Arbeiten</b>	<b>275</b>
<b>6.2</b>	<b>Experimentelle Arbeiten</b>	<b>277</b>
7	<i>Verwendete Literatur</i>	<b>279</b>

## Abkürzungen und Symbole

### Lateinisches Alphabet

A	Flächenbedarf einer Acylkette
AFM	Atomic Force Microscopy
C	Zyklomatische Zahl
$c_p$	molare Wärmekapazität
d	Durchmesser einer Lipidkopfgruppe im Modell
DMPA	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DMPE	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerin
DPPS	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylserin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
e	Elementarladung ( $1.6021892 \cdot 10^{-19}$ C)
EFG	Elektrischer Feldgradient

ESR	Elektronenspinresonanz
f	Verteilungsfunktion
$\underline{E}$	Tensor des elektrischen Feldgradienten
FID	Free Induction Decay
FRAP	Flourescence Recovery after Photobleaching
FTIR	<i>Fourier</i> Transform Infrarot
$g_i$	Entartungsgrad des Energiezustandes i
h	<i>Plancksches</i> Wirkungsquantum ( $6.626176 \cdot 10^{-34}$ Js)
H	molare Enthalpie
$\Delta H_{um}$	molare Phasenumwandlungsenthalpie
$\Delta H_{vH}$	<i>van't Hoff</i> -Enthalpie
I	Kernspinquantenzahl
J	Energiebetrag für die Wechselwirkung zweier all-trans-Ketten
k	<i>Boltzmann</i> -Konstante ( $1.3807 \cdot 10^{-23}$ J/K)
K	Anzahl der im <i>Pink</i> -Modell verwendeten Zustände
L	Kantenlänge eines hexagonalen Gitters, ausgedrückt durch die Anzahl der Gitterplätze
$m_l$	magnetische Quantenzahl
M	Anzahl der C-Atome pro Acylkette
$M_0$	makroskopische Magnetisierung



$M_{\text{eff}}$	Länge der Projektion der Acylkette auf die Membrannormale (effektive Kettenlänge)
$N$	Teilchenzahl
$N_{\text{AB}}$	Zahl der AB-Paare
$N_{\text{L}}$	<i>Loschmidt</i> -Konstante ( $6.022045 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
$P$	Permeationswahrscheinlichkeit
PE	Phosphatidylethanolamin
PFT	Pulse <i>Fourier</i> Transform
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphatidylglycerin
PS	Phosphatidylserin
$q$	Partiellladung
$r$	Abstand zwischen den Zentren zweier Teilchen
$r^{\text{Zy}}$	Radius des fiktiven Zylinders, welcher eine Acylkette umschließt
$R$	Gaskonstante ( $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ )
RIS	Rotational Isomeric State
$S_{xy}$	Ordnungsparameter der Bindung $y$ einer Kette im Zustand $x$
$T_{\text{m}}$	Phasenumwandlungstemperatur
$T_{\text{red}}$	reduzierte Temperatur
$T$	absolute Temperatur

$T^*$	kritische Temperatur
$\underline{V}$	Matrix der <i>van der Waals</i> -Wechselwirkungen zwischen zwei Kohlenwasserstoffketten
$x_i$	Molenbruch der Komponente $i$
$Y$	relative Permeabilität
$z$	Zufallszahl
$Z$	Zustandssumme

### **Griechisches Alphabet**

$\gamma$	repulsiver Energieterm, welcher den Einfluß der auftretenden Kettenlängendifferenzen bzgl. der Wechselwirkungsenergie wichtet
$\delta_{xy}$	<i>Kronecker</i> -Symbol
$\Delta v_Q$	Quadrupolaufspaltung
$\epsilon$	Dielektrizitätszahl
$\epsilon_0$	elektrische Feldkonstante ( $8.85418782 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ s}^2 \text{ m}^{-3} \text{ kg}^{-1}$ )
$\eta$	kooperative Einheit
$\theta$	Winkel zwischen einer C-C-Bindung und der Membrannormalen
$\lambda$	Wellenlänge
$\Lambda$	Energiebeitrag für die sterische Wechselwirkung der Acylketten
$\nu_L$	<i>Larmor</i> -Frequenz
$\xi$	Multiplikator für die Berechnung von Zufallszahlen

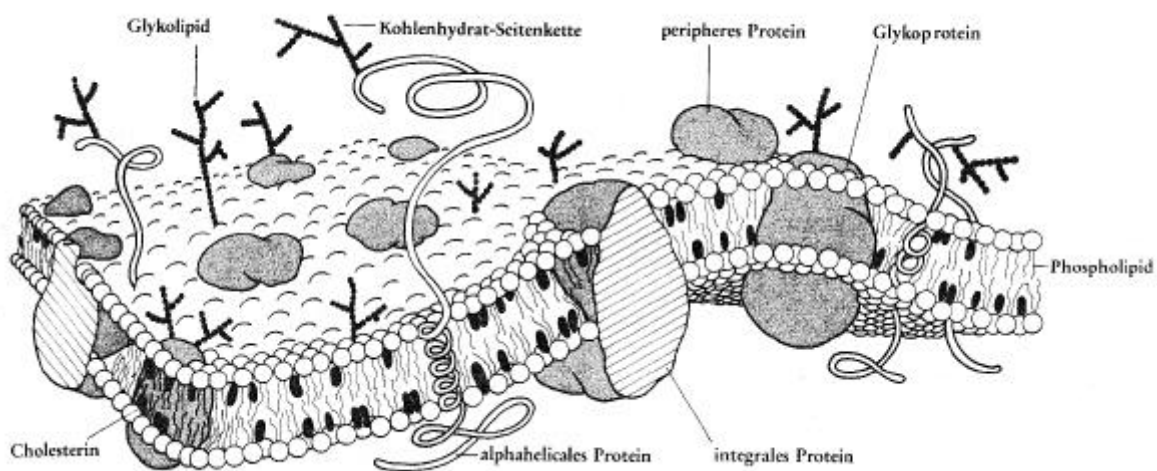
$\Xi$	größtmöglich gewählte Integerzahl als Basis für die Berechnung von Zufallszahlen
$\Pi$	lateraler Druck
$\rho$	thermodynamischer (makroskopischer) Nichtidealitätsparameter
$\sigma_i$	Zustandsoperator von Teilchen $i$
$\tau$	Kompaktheit eines Clusters
$\psi$	potentielle elektrostatische Energie
$\omega_{AB}$	molekularer Nichtidealitätsparameter
$\omega_{GA}$	Kooperativitätsparameter
$\Omega$	Operator zur Berechnung der Gesamtenergie eines Gittersystemes



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 BEDEUTUNG DER PHOSPHOLIPIDE

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Moleküle gehören ausnahmslos zur Klasse der Phospholipide und besitzen eine fundamentale biologische Bedeutung in ihrer Rolle als Grundbaustein aller biologischer Membranen [z. B. Winter, 1990]. Durch ihre speziellen Eigenschaften bilden sie sehr dünne (6-10 nm) und dennoch hochselektive und flexible Permeabilitätsbarrieren, welche für lebende Zellen essentiell sind. Solche biologischen Membranen bestehen aus teilweise über einhundert unterschiedlichen Phospholipiden [z. B. Dowhan, 1997] sowie Glykolipiden, Proteinen und Cholesterin und sind somit derart komplex aufgebaut, daß es unmöglich ist, anhand dieser Systeme detaillierte Aussagen über die Eigenschaften einzelner Lipidtypen zu machen (Abb. 1):



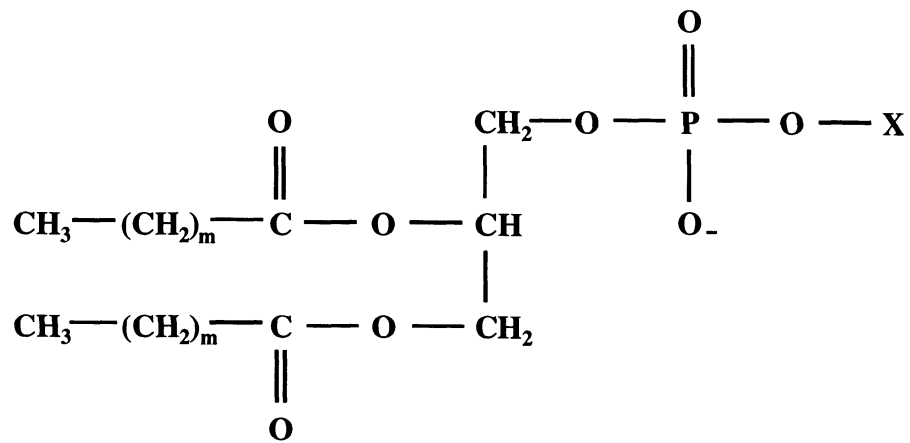
*Abbildung 1:* Schematische Darstellung einer biologischen Membran; Bild aus Winter [1990].

Aus diesem Grunde behilft man sich oftmals damit, lediglich Modellmembranen aus ein bis drei unterschiedlichen Lipidtypen zu untersuchen, um so die entsprechenden Rückschlüsse auf das Verhalten dieser Komponenten in ihrer realen in-vivo-Umgebung ziehen zu können. Diesem Ansatz wird auch in der vorliegenden Arbeit gefolgt, wobei hier nur Systeme mit maximal zwei verschiedenen Phospholipiden eingesetzt werden.

## 1.2 MOLEKULARE STRUKTUR DER PHOSPHOLIPIDE

Generell besitzen Phospholipide einen Alkohol (entweder Glycerin oder Sphingosin) als strukturelles Grundgerüst [z. B. Stryer, 1991]. Da im folgenden ausschließlich die Glycerinderivate betrachtet werden, müßte man die entsprechenden Moleküle eigentlich genauer als Phosphoglyceride bezeichnen, in Anlehnung an den gängigen Sprachgebrauch wird aber dennoch die etwas weiter gefaßte Bezeichnung „Phospholipide“ verwendet.

*sn*-1- und *sn*-2-Position des Glycerin-„Rückgrates“ sind mit langkettigen Fettsäuren verestert (14 bis 24 C-Atome bei 2-4 Doppelbindungen in biologischen Systemen [Blume, 1991]), wobei diese bei natürlich vorkommenden Lipiden mit wenigen Ausnahmen als geradzahlige Homologe auftreten [z. B. Koynova und Caffrey, 1998] und oftmals eine unterschiedliche Länge innerhalb des Moleküls besitzen [z. B. Seelig und Seelig, 1980]. Die *sn*-3-Hydroxylgruppe des Glycerins ist über eine Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Alkohol (der „Kopfgruppe“) verknüpft, welcher recht unterschiedliche Strukturen besitzen kann und das chemische und physikalische Verhalten des Lipids entsprechend beeinflusst. Abb. 2 gibt einen Überblick über die hier verwendeten Komponenten und beinhaltet gleichzeitig die bedeutendsten aller in der Natur vorkommenden Kopfgruppen [Stryer, 1991]:



m =	10	Dilauroyl (DL)	X = -H	Phosphatidsäure (PA)
	12	Dimyristoyl (DM)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Phosphatidylcholin (PC)
	14	Dipalmitoyl (DP)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Phosphatidylethanolamin (PE)
	16	Distearoyl (DS)	-CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	Phosphatidylglycerin (PG)
			-CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )COO <sup>-</sup>	Phosphatidylserin (PS)

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phospholipide mit den entsprechenden Abkürzungen (eingeklammert): Für Dimyristoylphosphatidylglycerin ergibt sich beispielsweise das Kürzel DMPG usw.

### 1.3 EIGENSCHAFTEN DER PHOSPHOLIPIDE

Die Funktionalität der Phospholipide als Membranbausteine beruht auf ihrer molekularen Struktur: So kann man in Abb. 2 deutlich einen hydrophoben Bereich (die beiden Kohlenwasserstoffketten) erkennen, dem auf der anderen Seite eine hydrophile Kopfgruppe gegenübersteht. Um diese Amphiphilie zu unterstreichen, werden die einzelnen Lipidmoleküle meist schematisch in der folgenden Form dargestellt:

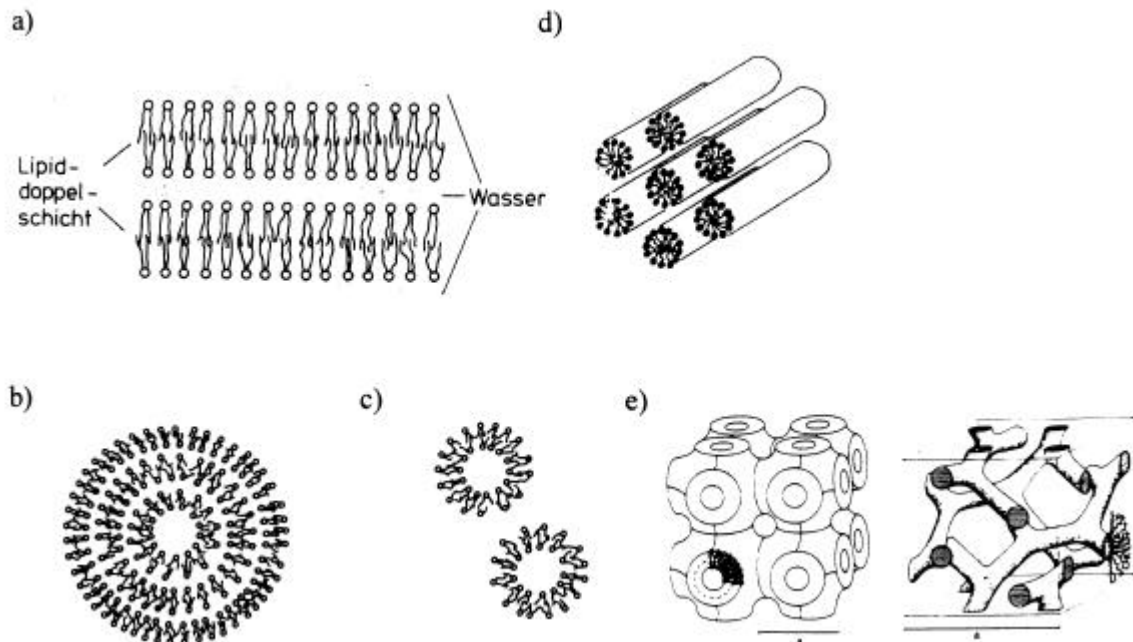


*Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Phospholipids; Bild aus Stryer [1991].*

Die eigentliche Genialität dieses Strukturprinzips wird dann offenkundig, wenn man Lipidmoleküle in Wasser – dem einzigen biologisch relevanten Medium – suspendiert: Da nämlich die Solvatation der einzelnen Kohlenwasserstoffketten für die Wassermoleküle entropisch sehr ungünstig ist, kommt es zu einer spontanen Aggregation, um diesen energetischen Aufwand so gering wie möglich zu halten (hydrophober Effekt [z. B. Blokzijl und Engberts, 1993]). Die entstehenden Strukturen werden zudem noch durch Dispersionswechselwirkungen zwischen den Ketten und eventuell auch Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Kopfgruppe und den Wassermolekülen stabilisiert, wodurch sie den Charakter einer zweidimensionalen Flüssigkeit erhalten [Winter und Noll, 1998].



In Abhängigkeit von der Art der Kopfgruppen und der Länge der Acylketten bilden die Phospholipide unterschiedliche Überstrukturen [Seddon, 1996], von denen die am häufigsten auftretenden in der folgenden Abbildung zusammengefaßt sind:



**Abbildung 4:** *Unterschiedliche Überstrukturen von Lipiddoppelschichten im wässrigen Medium: a) multilamellare Doppelschicht; b) multilamellares Vesikel; c) unilamellares Vesikel; d) hexagonale Phase; e) kubische Phasen; Abbildung nach Galla [1988], Shinitzky [1993] und Seddon [1996].*

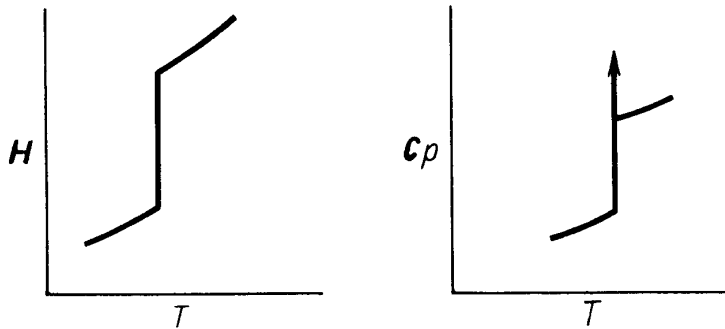
Der generelle Aufbau von biologischen Membranen durch Lipiddoppelschichten (vgl. Abb. 1) hat für die Zelle eine ganze Reihe von Vorteilen: So „reparieren“ sich die einzelnen Schichten aufgrund des hydrophoben Effektes selbständig und stellen für Ionen und polare Moleküle eine sehr wirkungsvolle Barriere dar [Stryer, 1991], besitzen aber andererseits auch genügend Fluidität, um beispielsweise Proteine einzulagern und in ihrer Funktion zu unterstützen, und ermöglichen ebenso durch die Bildung von Kanälen den gezielten Stoffaustausch mit der Außenwelt.

Phospholipide befinden sich in natürlichen Membranen stets in ihrer lamellaren Hochtemperatur- (oder „flüssig-kristallinen“) Phase [Seddon, 1996], welche durch die ausgeprägte Beweglichkeit der Acylketten gekennzeichnet ist. Zudem existieren in Modellmembranen aus ein oder zwei unterschiedlichen Komponenten noch eine Vielzahl anderer

Phasen in Abhängigkeit von z. B. Kopfgruppe, Kettenlänge, Zusammensetzung und Temperatur der jeweiligen Probe [z. B. Gruner, 1989; Seddon, 1996; Winter und Noll, 1998].

Von besonderer Bedeutung ist dabei der sogenannte Hauptphasenübergang von der bereits erwähnten flüssig-kristallinen Phase in die Tieftemperatur- (oder „Gel“-) Phase bei einer charakteristischen Umwandlungstemperatur  $T_m$ . Er ist bei reinen Lipiden hochkooperativ und mit einer sehr großen Änderung der Systemenergie von über 20 kJ/(mol Lipid) bei den hier untersuchten Reinsubstanzen verbunden [z. B. Blume, 1991], was hauptsächlich auf die mit steigender Temperatur massive Zunahme an gauche-Konformeren in den Acylketten zurückzuführen ist [z. B. Winter und Noll, 1998]. Unterhalb von  $T_m$  besitzen diese nämlich überwiegend eine starre all-trans-Anordnung, weswegen lebende Zellen auch stets darauf bedacht sind, den flüssig-kristallinen Charakter ihrer Membranen – etwa durch Einlagerung von niedrigschmelzenden Lipiden – zu erhalten [Cullis et al., 1986].

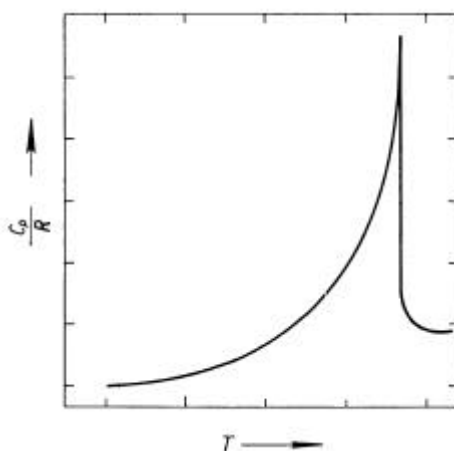
Eine interessante Frage, die bis heute noch nicht eindeutig geklärt ist, ist die nach der Natur des Hauptphasenübergangs bei reinen wässrigen Lipiddispersionen [z. B. Biltonen, 1990; Groll et al., 1996]. Hier stehen prinzipiell zwei Alternativen zur Debatte: Bei einer Umwandlung „erster Ordnung“ würde die Enthalpie des Systems einen diskontinuierlichen Sprung bei  $T = T_m$  aufweisen und die Wärmekapazität  $c_p$  entsprechend an diesem Punkt (zumindest theoretisch) die Form einer unendlich hohen  $\delta$ -Funktion annehmen [Kortüm und Lachmann, 1981], wie in Abb. 5 schematisch dargestellt ist:



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von Enthalpie  $H$  und Wärmekapazität  $c_p$  für einen Phasenübergang erster Ordnung; Diagramm aus Kortüm und Lachmann [1981].

Anschaulich betrachtet bedeutet dieses Phasenverhalten für die einzelnen Moleküle des Ensembles, daß die Umwandlung bei  $T_m$  spontan für alle Teilchen stattfindet, ohne daß bei geringfügig niedrigeren Temperaturen irgendwelche Anzeichen für diesen Vorgang zu erkennen gewesen wären.

In der Praxis liefert die Messung von  $c_p$  allerdings aufgrund von mikroskopischen Verunreinigungen der Probe und der endlichen Genauigkeit der Meßgeräte ein wesentlich breiteres Signal, so daß sie nicht mehr ohne weiteres von einer Umwandlung „zweiter Ordnung“ unterschieden werden kann. In diesem Fall weist  $H$  als Funktion von  $T$  einen kontinuierlichen sigmoiden Verlauf auf, und die dazugehörige  $c_p$ -Kurve ähnelt in ihrer Form dem griechischen Buchstaben Lambda ( $\Lambda$ ), weswegen Umwandlungen zweiter Ordnung auch oft als Lambda-Übergänge bezeichnet werden [z. B. Prigogine und Defay, 1962]:



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Wärmekapazität für einen Phasenübergang zweiter Ordnung (Lambda-Übergang); Diagramm nach Prigogine und Defay [1962].

Betrachtet man den Verlauf der Wärmekapazitätskurven, so wird schnell klar, daß eine eindeutige Zuordnung von experimentellen Daten zu einer der beiden Typen sehr schwer ist. Auf molekularer Ebene hingegen wäre ein Unterschied deutlicher nachzuweisen, denn bei Lambda-Übergängen können die einzelnen Moleküle – bildlich gesprochen – erkennen, daß sich das Ensemble  $T_m$  nähert, da die Fluktuationen mit steigender Temperatur kontinuierlich zunehmen.

Zur theoretischen Beschreibung von kooperativen Phasenübergängen hat sich das von *Ernst Ising* [1925] ausgearbeitete einfache Modell als sehr geeignet erwiesen und dient auch heute noch als theoretische Ausgangsbasis für zahlreiche Computersimulationen. Der Grundgedanke ist dabei der folgende: Das zu untersuchende Ensemble aus  $i$  Teilchen wird auf einem festen  $d$ -dimensionalen Gitter angeordnet, so daß jedes Teilchen (welches genau zwei energetisch unterschiedliche Zustände einnehmen kann) genau  $j$  nächste Nachbarn besitzt. Die Gesamtenergie  $E$  des Systems besteht dann aus einem konstanten Term, welcher lediglich von  $i$  abhängt, sowie einem Anteil, der von dem Zustand der  $j$  Nachbarn beeinflusst wird [z. B. Brush, 1967; Chandler, 1987]:

$$E = A \sum_i \mathbf{s}_i + B \sum_i \sum_j \mathbf{s}_i \mathbf{s}_j . \quad (1)$$

$A$  und  $B$  sind hierbei vorgezogene Konstanten, und  $\sigma$  ist ein Operator, welcher den Zustand des entsprechenden Teilchens (1 oder  $-1$ ) wiedergibt.

Durch die geeignete Wahl des Parameters  $B$  lassen sich prinzipiell Übergänge erster und zweiter Ordnung mit beliebiger Kooperativität unter Zuhilfenahme von Monte Carlo-Methoden simulieren und auch analysieren [z. B. Mouritsen, 1984; Binder und Heermann, 1988], wodurch interessante ergänzende Informationen zu den experimentellen Ergebnissen gewonnen werden können.

---

## 2 ZIELSETZUNG

---

Die generelle Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, einen Beitrag zur Untersuchung des Mischungsverhaltens von Phospholipiden zu liefern, läßt sich in eine theoretische und eine experimentelle Problemstellung unterteilen:

Im theoretischen Bereich lag die erste Herausforderung darin, bereits existierende Modelle zur Monte Carlo-Simulation von Lipidsystemen aus vorhandenen Publikationen zu sichten, die relevanten mathematischen Formulierungen zu entwickeln und anschließend in einen geeigneten Quellcode zur Durchführung der entsprechenden Computersimulationen zu übersetzen. Mit den hieraus gewonnenen Erfahrungen sollte dann der Versuch unternommen werden, eigene Ideen bei der Simulation von Einphasen-/Zweikomponentensystemen bzw. Zweiphasen-/Einkomponentensystemen umzusetzen und die Ergebnisse auf der Grundlage der verwendeten physikalischen Modelle zu interpretieren. Als Höhepunkt wurde abschließend die Entwicklung eines Formelgebäudes zur Beschreibung von Zweiphasen-/Zweikomponentensystemen ins Auge gefaßt.

Auf experimenteller Seite wurde das Ziel angestrebt, wässrige PC/PE- bzw. PC/PG-Systeme mit unterschiedlichen Kettenlängen auf ihre Mischbarkeit hin zu untersuchen. Hierzu war es erforderlich, die bereits im Arbeitskreis vorhandenen kalorimetrischen Daten zu vervollständigen. Außerdem sollten die entsprechenden äquimolaren Gemische aus jeweils einem deuterierten und einem undeuterierten Phospholipid hergestellt und anschließend mittels  $^2\text{H}$ -NMR- und FTIR-spektroskopischer Methoden analysiert werden, um auf diese Weise die beiden Komponenten der Mischungen getrennt voneinander beobachten zu können. Die benötigten perdeuterierten Lipide sollten vorher aus den entsprechenden Fettsäuren synthetisiert werden.

---

## 3 VERWENDETE METHODEN

---

### 3.1 DIE MONTE CARLO-TECHNIK

#### 3.1.1 EINFÜHRUNG

Die Monte Carlo-Methode ist eine sehr universell einsetzbare Technik, welche u. a. verwendet wird, um mathematische Probleme zu lösen, bei denen eine exakte Berechnung gar nicht oder nur mit sehr hohem Zeitaufwand möglich wäre. Sie wurde ursprünglich in den USA gegen Ende des Zweiten Weltkrieges - vermutlich aus aktuellem Anlaß - zur Simulation von Neutronendiffusion in spaltbaren Materialien entwickelt und in einem Artikel von *Metropolis und Ulam* [1949] erstmals als „Monte Carlo“-Methode bezeichnet. Dieser etwas verwirrende Name rührt daher, daß eine sehr große Anzahl von (Pseudo-)Zufallszahlen - ähnlich wie bei einem Roulette-Spiel - benötigt wird, und nimmt daher Bezug auf das weltberühmte Spielkasino in Monaco (Abb. 7)



Abbildung 7: *Spielkasino in Monte Carlo* [<http://www.monaco.mc/monaco/icons/>]

Von den beiden prinzipiellen Anwendungsfeldern, nämlich der Simulation von zufälligen Prozessen (wie etwa der obengenannten Neutronendiffusion) und der Lösung von klar definierten, aber analytisch unlösbaren Gleichungssystemen, ist in bezug auf die Simulation des Phasenverhaltens von Lipidsystemen nur letzteres von Bedeutung und soll im folgenden näher beschrieben werden [Mouritsen, 1984; Mouritsen, 1990].

### 3.1.2 STATISTISCH-MECHANISCHE GRUNDLAGEN

Man geht von einem kanonischen Ensemble von  $N$  Teilchen aus, die in einem  $d$ -dimensionalen Gitter angeordnet sind. Weist man nun jedem Teilchen dieses Gitters einen ganz bestimmten Quantenzustand  $a$  zu, so entsteht ein sogenannter Mikrozustand (oder Mikrokonfiguration)  $j = \{a_1, a_2, a_3, \dots, a_N\}$  [Wedler, 1987] mit einer hieraus resultierenden Gesamtenergie. Letztere ist entartet, d. h. es existiert eine große Anzahl von Mikrokonfigurationen, durch welche dieselbe Gesamtenergie realisiert werden kann, so daß man allgemein die Menge aller Mikrozustände mit solch einem gemeinsamen Merkmal als Makrozustand bezeichnet.

Weiterhin setzt man voraus, daß das System „ergodisch“ ist, d. h. jedes Teilchen kann im Laufe der Zeit jeden erlaubten Energiezustand einnehmen [Wood und Parker, 1957]. Wenn sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, führt dies dazu, daß für ein genügend großes  $N$  der Mittelwert über die Zustände aller Teilchen zum Zeitpunkt  $t$  (Scharmittelwert) gleich dem zeitlichen Mittelwert der Zustände ist, die ein einzelnes Teilchen – über einen hinreichend langen Zeitraum gemessen – einnimmt (Zeitmittelwert). Somit bezeichnet eine Momentaufnahme des gesamten hinreichend großen Ensembles auch alle möglichen Energiezustände, die ein einzelnes Teilchen im Gleichgewicht besetzen kann. Für die weitere Betrachtung der Simulation eines Systems von Teilchen auf einem Gitter wird im folgenden vor allem der Scharmittelwert betrachtet.

Das statistische Gewicht  $W_{GI}$  für die Realisierung eines bestimmten Mikrozustandes  $j$  im thermodynamischen Gleichgewicht läßt sich mit Hilfe der *Boltzmann*-Statistik ausdrücken [Binder und Heermann, 1988]:

$$W_{\text{Gl}}(j) = \frac{e^{\left(\frac{-E_j}{kT}\right)}}{\sum_{i=1}^J e^{\left(\frac{-E_i}{kT}\right)}}, \quad j \in \{i\}. \quad (2)$$

Hierbei bezeichnet  $E$  die Gesamtenergie des Mikrozustandes  $j$ ,  $T$  die absolute Temperatur und  $k$  die *Boltzmann*-Konstante. Die Summe im Nenner läuft über alle Mikrozustände und wird auch als Zustandssumme  $Z$  bezeichnet. Um jetzt einen Erwartungswert für eine makroskopische Observable  $\langle O \rangle$  (also z. B. die mittlere makroskopische Magnetisierung eines aus lauter kleinen Elementarmagneten bestehenden Systems) zu erhalten, ist es vonnöten, über die entsprechenden Werte  $o_j$  aller Mikrozustände (also z. B. die resultierende Magnetisierung der einzelnen Elementarmagneten) – gewichtet mit ihren *Boltzmann*-Faktoren – zu summieren [Allen und Tildesley, 1987]:

$$\langle O \rangle = \sum_{j=1}^J [W_{\text{Gl}}(j) \cdot o_j] = \frac{\sum_{j=1}^J \left[ o_j \cdot e^{\left(\frac{-E_j}{kT}\right)} \right]}{\sum_{j=1}^J \left[ e^{\left(\frac{-E_j}{kT}\right)} \right]}; \quad (3)$$

hier zeigt sich auch das Problem bei der exakten Berechnung von  $\langle O \rangle$ : Selbst wenn für jedes Teilchen nur zwei unterschiedliche Konfigurationen möglich wären, würde jeder Summenausdruck über  $2^N$  Zustände laufen, wobei jeder Mikrozustand noch  $N$  Quantenzustände beinhaltet [Bak, 1983], was eine genaue Ermittlung selbst mit schnellen Rechnern extrem zeitaufwendig bzw. unmöglich macht. Mit Hilfe der Monte Carlo-Technik ist es jedoch möglich, mit weit weniger Aufwand einen Wert für  $\langle O \rangle$  zu ermitteln, welcher der analytischen Lösung bei hinreichend langer Simulationsdauer sehr nahe kommt.

Die Überlegung hierbei ist folgende: Die einzelnen Glieder der Summe spannen eine Hyperfläche auf. Wegen der Exponentialfunktion in den einzelnen Ausdrücken wird es aber nur verhältnismäßig wenige Werte geben, deren statistisches Gewicht nicht verschwindend gering ist und die somit tatsächlich einen signifikanten Beitrag zu dieser Summe leisten. Man kann nun zur näherungsweisen Berechnung ein regelmäßiges Gitter über die Hyperfläche legen und in diesen Abständen alle Werte herauspicken und aufaddieren; mathematisch läßt sich jedoch zeigen, daß es wesentlich effizienter ist, die Addition mit völlig zufällig



ausgewählten Werten vorzunehmen (auch wenn es nicht möglich ist, „zufällige“ Zahlen zu erzeugen - siehe Kapitel 4) [Binder, 1988]. Diese auch als „einfache“ Monte Carlo-Methode bezeichnete Technik reduziert zwar die Anzahl der Terme, welche zu einer annähernden Berechnung von  $Z$  benötigt werden, schon ganz erheblich [Alexandrowicz, 1972], ist aber immer noch sehr ineffektiv.

Die entscheidende Überlegung gelang schließlich *Metropolis et al.* [1953] mit Hilfe eines kleinen Tricks: Anstatt zufällig Konfigurationen auszuwählen, mit dem *Boltzmann*-Faktor zu gewichten und zu addieren – also „einfaches“ Monte Carlo zu betreiben –, beschritt man gerade den umgekehrten Weg, nämlich Konfigurationen mit *Boltzmann*-gewichteter Wahrscheinlichkeit auszuwählen und dann alle diese gleichgewichtet zu addieren. Da die Exponentialfunktion des *Boltzmann*-Faktors sehr schnell abfällt, führt dies dazu, daß wirklich nur die „wichtigen“ Zustände mit großen Beiträgen zu der Summe in nennenswerter Menge beachtet werden, weswegen die hier beschriebene Methode im angelsächsischen Sprachgebrauch meist auch als „Importance Sampling“ bezeichnet wird. Unter diesen Umständen vereinfacht sich Gleichung (3) zu dem leicht berechenbaren arithmetischen Mittelwert [Scott, 1996]

$$\langle O \rangle = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J o_j, \quad (4)$$

wobei  $j$  eine mit der Wahrscheinlichkeit  $W(j)$  gemäß Gleichung (2) ausgewählte Mikrokonfiguration und  $J$  die Anzahl dieser gesammelten Konfigurationen ist. Um Gleichung (4) anwenden zu können, müssen noch zwei weitere Probleme bewältigt werden; zum einen nämlich entzieht sich die Zustandssumme  $Z$  wie oben erwähnt jeglicher Berechnung, und außerdem muß geklärt werden, ob die Zustände  $j$  tatsächlich mit ihren Gleichgewichtswahrscheinlichkeiten ausgewählt werden können, also ob gilt

$$W(j \rightarrow \infty) = W_{\text{Gl}}(j). \quad (5)$$

*Metropolis et al.* lösten diese Aufgabe, in dem sie die einzelnen Zustände  $j$  nicht unabhängig voneinander auswählten, sondern jeden Zustand  $j+1$  über den vorangegangenen Zustand  $j$  mit Hilfe einer bestimmten Übergangswahrscheinlichkeit  $M(j \rightarrow j+1)$  konstruierten. Hängt die Wahl der neuen Konfiguration lediglich von ihrer vorhergehenden ab, so spricht

man auch von einem *Markov*- oder gedächtnislosen Prozeß [Pütz, 1995]. An diese *Markov*-Kette sind noch zusätzlich die folgenden Bedingungen geknüpft:

- Der gesamte Prozeß muß (wie oben bereits definiert) ergodisch sein.
- Der Prozeß muß „mikroreversibel“ sein, das heißt es muß gelten:  

$$W(j+1) \cdot M(j+1 \rightarrow j) = W(j) \cdot M(j \rightarrow j+1). \quad (6)$$

Mikroreversibilität bedeutet nichts anderes, als daß immer eine definierte Wahrscheinlichkeit bestehen muß, daß die neue Konfiguration im nächsten Schritt wieder in die vorherige übergeht. Diese Prämisse ist für die folgende Argumentation von essentieller Bedeutung und führt bei Nichtbeachtung zu deutlich falschen Simulationsergebnissen [siehe z. B. Jan et al., 1984]. Mit Hilfe von (2) läßt sich Gleichung (6) dann wie folgt umformen:

$$\frac{W(j+1)}{W(j)} = \frac{M(j \rightarrow j+1)}{M(j+1 \rightarrow j)} = \frac{e^{\left(\frac{-E_{j+1}}{kT}\right)}}{e^{\left(\frac{-E_j}{kT}\right)}} = e^{\left(\frac{E_j - E_{j+1}}{kT}\right)}. \quad (7)$$

Der Quotient der Übergangswahrscheinlichkeiten hängt also lediglich von der Energiedifferenz der beiden betrachteten Konfigurationen ab, die „unberechenbare“ Zustandssumme  $Z$  kürzt sich durch die Division heraus, und man kann über diesen eleganten Weg den Erwartungswert  $\langle O \rangle$  berechnen – vorausgesetzt es läßt sich zeigen, daß  $W(j \rightarrow \forall)$  tatsächlich die Gleichgewichtsverteilung  $W_{Gl}(j)$  approximiert. Ein detaillierter mathematischer Beweis findet sich hierzu in *Feller* [1950] und *Wood und Parker* [1957], anschaulich betrachtet läßt sich die Begründung auch wie folgt verstehen [Metropolis et al., 1953]:

Man geht von dem eingangs erwähnten System von  $N$  Teilchen aus und greift sich exemplarisch zwei mögliche Energiezustände  $A$  und  $B$  heraus. Für die allgemein formulierte Wahrscheinlichkeit  $P$ , daß ein Übergang zwischen diesen beiden stattfindet, muß – da ein ergodisches System vorliegt und Gleichung (6) gilt – die folgende Beziehung erfüllt sein:

$$P_{AB} = P_{BA}. \quad (8)$$

Hieraus folgt direkt, daß bei zwei Zuständen gleicher Energie ( $E_A = E_B$ ) jedes Teilchen aus  $A$  genauso häufig nach  $B$  wechselt, wie dies entsprechend umgekehrt der Fall ist.

Besitzen aber A und B unterschiedliche Energien (z. B.  $E_A < E_B$ ), so ist es weiterhin ein leichtes, ausgehend von Niveau B den Zustand A mit der Wahrscheinlichkeit  $P_{BA}$  zu erreichen, wogegen sich im umgekehrten Fall die Übergangswahrscheinlichkeit durch die exponentiell gewichtete Energiedifferenz des *Boltzmann*-Faktors verringert. Für die Anzahl der Teilchen  $n_{AB}$  (bzw.  $n_{BA}$ ), die ihren Energiezustand von A nach B (bzw. umgekehrt) wechseln, gilt somit

$$n_{AB} = n_A \cdot P_{AB} \cdot e^{\left(\frac{E_A - E_B}{kT}\right)};$$

$$n_{BA} = n_B \cdot P_{BA}; \quad (9)$$

$n_A$  und  $n_B$  bezeichnen die Gesamtzahl der Teilchen in den jeweiligen Zuständen A bzw. B. Die Nettodifferenz dieser „Teilchenwanderung“ ergibt sich also unter Berücksichtigung von Gleichung (8) zu

$$n_{AB} - n_{BA} = \Delta n = n_A \cdot P_{AB} \cdot \left[ e^{\left(\frac{E_A - E_B}{kT}\right)} - \frac{n_B}{n_A} \right]; \quad (10)$$

die beiden Terme in der eckigen Klammer beschreiben zum einen die angestrebte Gleichgewichtsverteilung (e-Funktion) und zum anderen das Besetzungsverhältnis der betrachteten Niveaus. Wenn nun  $n_A$  weniger besetzt ist als  $n_B$ , so wird – da die Exponentialfunktion nur Werte zwischen null und eins annehmen kann –  $\Delta n$  negativ, d. h. es werden sich mehr Teilchen vom Zustand B in den Zustand A begeben als umgekehrt. Ist aber  $n_A$  stärker besetzt als  $n_B$ , so ist  $\Delta n$  positiv, und der gegenläufige Effekt tritt ein. Für eine genügend lange Simulationsdauer wird daher  $\Delta n$  durch dieses dauernde Wechselspiel gegen null gehen, da

$$\frac{n_B}{n_A} = e^{\left(\frac{E_A - E_B}{kT}\right)} \text{ wird.} \quad (11)$$

Damit ist Gleichung (5) erfüllt (da jede Energieänderung eines Teilchens direkt mit  $j$  korreliert) und der Beweis erbracht, daß mittels einer hinreichend langen *Markov*-Kette auf sehr elegantem Wege statistisch-mechanische Mittelwerte von Teilchenensembeln mit vertretbarem technischen Aufwand ermittelt werden können. Wie dramatisch sich diese Ver-

besserung auswirken kann, läßt sich z. B. an einem simplen *Ising*-Modell mit einem aus lediglich 16 Elementarmagneten bestehenden quadratischen Gitter demonstrieren [Pütz, 1995]: Da die Berechnung der Observablen  $\langle O \rangle$  mit einem Fehler verknüpft ist, welcher direkt mit der Varianz der Meßwerte korreliert, hängt die Dauer der Simulation in entscheidendem Maße von dieser ab. Für die *Metropolis*-Methode ergibt sich eine Streuung der Energiewerte um etwa zwei Größenordnungen, wogegen man bei der „klassischen“ Mittelwertberechnung nach Gleichung (3) mit Schwankungen des statistischen Gewichtes der einzelnen Makrozustände um 43(!) Größenordnungen vorliebnehmen müßte.

Die *Metropolis*-Statistik hat daher eine effiziente Simulation von Systemen, die wesentlich komplexer als einfache zweidimensionale *Ising*-Modelle sind, überhaupt erst möglich gemacht und stellt auch heute noch eine populäre Methode (neben speziell auf bestimmte Probleme zugeschnittenen Techniken [z. B. Hardy und Pastor, 1994; Allen und Tildesley, 1987; Swendsen et al., 1992]) zur Untersuchung biochemischer Prozesse mittels Monte Carlo-Statistik dar.

### 3.1.3 ALLGEMEINER ALGORITHMUS

In allen in dieser Arbeit geschriebenen Programmen bildet die oben erläuterte *Metropolis*-Methode den zentralen Kern der jeweiligen Simulationsroutinen. Ausgangspunkt ist dabei stets eine Anzahl von Teilchen (mit unterschiedlichen Eigenschaften, die aber an dieser Stelle noch vernachlässigt werden sollen) auf einem zweidimensionalen Gitter. Der generelle schematische Ablauf dieser Prozedur läßt sich dabei wie folgt beschreiben [siehe auch Binder und Stauffer, 1984]:

- 1) wähle ein Teilchen  $i$  aus;
- 2) ändere fiktiv eine Eigenschaft des betreffenden Teilchens (dies kann sowohl eine Änderung des Energiezustandes, als auch ein räumlicher Austausch mit einem benachbarten Teilchen sein), und berechne die Energiedifferenz  $\Delta E = E_{\text{neu}} - E_{\text{alt}}$ ;
- 3) ist  $\Delta E < 0$ , der Vorgang also energetisch begünstigt, so führe die fiktive Änderung tatsächlich aus;
- 4) ist  $\Delta E$  hingegen  $> 0$ , so ermittle eine Zufallszahl  $z$  (mit  $0 \leq z \leq 1$ ) und vergleiche sie mit  $\exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right)$ ;
- 5) wenn  $z < \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right)$ , dann führe die fiktive Änderung ebenfalls durch;
- 6) wähle ein neues Teilchen  $j$  aus und wiederhole die Prozedur 2) bis 6);
- 7) hat das System sein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht, so können makroskopische Eigenschaften  $\langle O \rangle$  des Systems als einfache arithmetische Mittelwerte gemäß Gleichung (4) ermittelt werden;

Bei der Auswahl der Teilchen (Schritt 1) und 6)) muß dafür Sorge getragen werden, daß im Laufe der Simulation auch jedes in gleichem Maße berücksichtigt wird, da sonst die korrekte Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtes nicht gewährleistet ist. Dazu bieten sich zwei Methoden an, nämlich erstens das gesamte Gitter Schritt für Schritt durchzugehen und die Teilchen nacheinander zu untersuchen, oder zweitens die Teilchen auf dem Gitter zufällig auszuwählen. Die Entscheidung für eine dieser Methoden ist nicht ganz so trivial, wie man annehmen könnte, und wird in Kapitel 4 näher analysiert.

Relativ einsichtig ist auch die Tatsache, daß Ereignisse, für die  $\Delta E > 0$  ist, doch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zugelassen werden (Schritt 4)), da sonst keinerlei Möglichkeit bestünde, ein lokales Energieminimum zu überwinden, und das System seine Gleichgewichtskonfiguration ebenfalls nicht erreichen könnte. Wenn ein Ereignis letztendlich doch

abgelehnt wird, so muß die neue Konfiguration, welche ja in diesem Falle mit der Ausgangskonfiguration identisch ist, dennoch für die Bildung der statistischen Mittelwerte mitgezählt werden [Metropolis, 1953], weil die Argumentation über Gleichung (10) ansonsten nicht mehr schlüssig ist.

Des weiteren ist die Verlässlichkeit des „Zufallsgenerators“, also der Vorschrift, nach der (Pseudo-) Zufallszahlen berechnet werden, von großer Bedeutung, da die ermittelten Zahlen wirklich einheitlich über das gesamte Intervall zwischen null und eins verteilt sein müssen. In Kapitel 4 wird dieses Problem daher genauer unter die Lupe genommen.

#### 3.1.4 VOR- UND NACHTEILE VON MONTE CARLO-METHODEN

Ein entscheidender Vorteil, der sich bei der Simulation von Lipidsystemen mittels Monte Carlo bietet, ist der, daß Zeitintervalle von der Größenordnung, in denen sich solche Phänomene wie Phasenseparation, Domänenbildung oder Phasenübergänge abspielen, untersucht werden können. Molekulardynamik-Simulationen sind hierfür noch gänzlich ungeeignet, da allein die Simulation eines Ensembles von 256 Hexanmolekülen über den Zeitraum von einer Sekunde auf einer SGI R4000 Workstation etwa 300000 Jahre dauern würde [Jorgensen, 1996].

Diesen Vorteil muß man jedoch damit bezahlen, daß die zugrundegelegten Modelle im Vergleich deutlich rudimentärer gestaltet sind, was mit einem gewissen Informationsverlust einhergeht [Friedberg und Cameron, 1970]. Außerdem sind die einzelnen Mikrozustände durch die *Markov*-Kette in hohem Maße miteinander korreliert, was bei der Mittelwertbildung über die einzelnen Makrozustände berücksichtigt werden muß [Allen und Tildesley, 1987]. Diese Korrelation führt auch dazu, daß der Weg, wie ein System in der Simulation sein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht, von physikalisch äußerst zweifelhafter Bedeutung ist, da in diesem Fall eine starke Abhängigkeit von der gewählten Ausgangskonfiguration besteht, welche erst mit Erreichen des Gleichgewichtes verlorengeht. Außerdem können auch praktisch unmögliche Bewegungen zugelassen werden, wenn die gerade ermittelte Zufallszahl klein genug ist [Pastor, 1994]. Hier sind die Molekulardynamik-Rechnungen der Monte Carlo-Methode klar überlegen.

## 3.2 <sup>2</sup>H-NMR-SPEKTROSKOPIE

### 3.2.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

Die NMR-Spektroskopie ist eine der bedeutendsten Meßtechniken überhaupt, wie man schon allein aus der Tatsache ersehen kann, daß für Entwicklungen auf diesem Gebiet bereits zwei Nobelpreise (1952 und 1991) vergeben wurden. Das zugrundeliegende Prinzip ist dabei jedoch recht einfach und soll im folgenden kurz beschrieben werden [Friebolin, 1992; Winter und Noll, 1998].

Damit ein Kern NMR-spektroskopisch untersucht werden kann, muß er einen Eigendrehimpuls (und somit ein permanentes magnetisches Dipolmoment) besitzen, das heißt für die kernspezifische Drehimpulsquantenzahl  $I$  gilt die Voraussetzung  $I > 0$ . Bringt man nun eine Probe einer geeigneten Molekülsorte in ein Magnetfeld, so nehmen die einzelnen Kernspins gemäß der magnetischen Quantenzahl  $m_I$  (mit  $m_I = I, I-1, \dots, -I$ )  $2I+1$  unterschiedliche räumliche Orientierungen mit unterschiedlicher Energie (*Zeeman-Niveaus*) ein und führen aufgrund der thermischen Energie eine Präzessionsbewegung um die z-Achse (die Richtung des Magnetfeldes) aus. Das Besetzungsverhältnis zwischen beispielsweise der energetisch günstigsten Orientierung ( $m_I = I$ ) und einer mit  $m_I = I-1$  hängt direkt mit der Stärke des angelegten Feldes (derzeit maximal ca. 20 T) zusammen und liegt für Deuterium bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten NMR-Gerät mit einer Flußdichte von 9.4 T etwa in der Größenordnung von lediglich 1:0.9999984 bei einer Temperatur von 300 K [Holzhäuser, 1995]. Da die präzedierenden Kernspins keine Phasenbeziehung zueinander besitzen, ergibt sich aus dieser Differenz eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$  in Richtung der z-Achse, wie die folgende Abbildung für den Fall  $I = 1/2$  anschaulich illustriert:

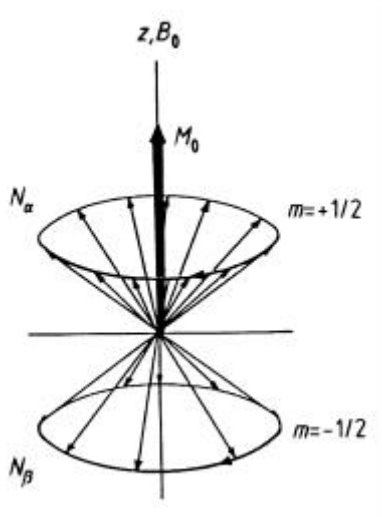


Abbildung 8: *Unterschiedliche Kernspins (Pfeile) einer Kernsorte mit  $I = 1/2$  auf den beiden möglichen Präzessionskegeln mit unterschiedlicher magnetischer Quantenzahl  $m_1$  (hier als  $m$  bezeichnet); durch den Besetzungsunterschied ( $N_a > N_b$ ) und die Abwesenheit einer Phasenbeziehung entsteht eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$  in Richtung des anliegenden Feldes ( $z$ -Achse); Diagramm aus Friebolin [1992].*

Zur Durchführung der eigentlichen Messungen macht man sich nun den Umstand zunutze, daß das Energiequantum  $h \cdot \nu_L$ , welches das „Umklappen“ eines Spins bewirkt, sowohl für jede Kernsorte als auch für die unterschiedliche chemische Umgebung gleicher Kerne einen spezifischen Wert proportional zu der angelegten Feldstärke besitzt, wobei man  $\nu_L$  allgemein als *Larmor-Frequenz* der entsprechenden Kerne bezeichnet.

Ein einfaches NMR-Experiment besteht somit bei konstantem Magnetfeld in dem Einstrahlen unterschiedlicher Frequenzen (im MHz-Bereich) mittels einer Senderspule in die zu untersuchende Probe. Sobald eine *Larmor-Frequenz* erreicht wird, können die betroffenen Spins ihren Quantenzustand mit der Auswahlregel  $\Delta m_1 = \pm 1$  ändern, und die resultierende Energieabsorption wird durch eine Empfängerspule als Signal registriert. Da diese Methode jedoch sehr zeitaufwendig ist, wird heute überwiegend – wie auch in der vorliegenden Arbeit – die sogenannte PFT (Pulse Fourier Transform)-Technik verwendet [Ernst, 1992]. Hier strahlt man kurze und sehr energiereiche Pulse größerer Feldstärke in die Probe ein und deckt damit ein derart breites Frequenzband ab, daß alle gewünschten *Larmor-Frequenzen* gleichzeitig vorhanden sind. Nach jedem Puls erhält man durch die zeitliche Relaxation der



makroskopischen Magnetisierung aller Spinsysteme in der x-y-Ebene ein überlagertes Interferogramm (der sogenannte FID), aus welchem mittels *Fourier-Transformation* die einzelnen Signale in der Frequenzdomäne gewonnen werden können (Abb. 9):

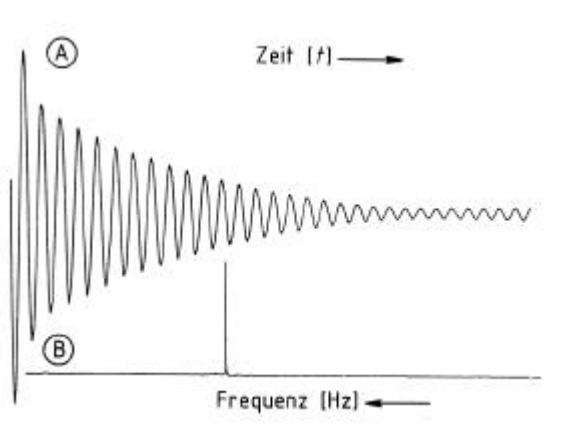


Abbildung 9: **A: Durch Relaxation bedingter freier Induktionsabfall (FID) der makroskopischen Magnetisierung bezüglich der x-y-Ebene als Funktion der Zeit; B: Das durch Fourier-Transformation gewonnene entsprechende Spektrum als Funktion der Frequenz; Diagramm aus Friebolin [1992].**

Da die Aufnahme der Spektren mittel PFT-Technik sehr schnell vonstatten geht, ist es praktikabel, zur Verbesserung der Auflösung eine große Anzahl FIDs aufzunehmen und vor der *Fourier-Transformation* zu addieren. Das Signal-Rausch-Verhältnis kann damit bei N durchgeführten Messungen um den Faktor  $N^{1/2}$  erhöht werden.

In der folgenden Abbildung ist der prinzipielle Aufbau eines typischen PFT-NMR-Spektrometers – wie es auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde – schematisch dargestellt:

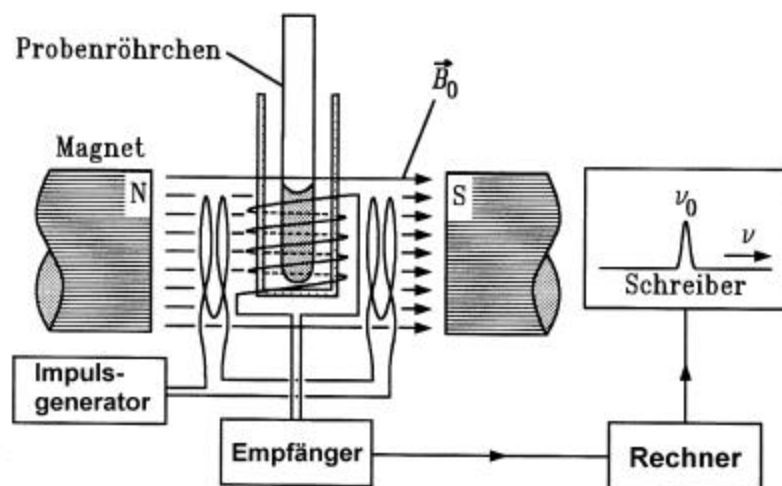


Abbildung 10: *Schematischer Aufbau eines PFT-NMR-Gerätes; Sender- und Empfängerspule sind senkrecht zueinander und senkrecht zum Magnetfeld angeordnet; Diagramm nach Winter und Noll [1998].*

Der Impulsgenerator ist ständig in Betrieb und wird durch eine Sperre geregelt, welche durch den Meßrechner angesteuert wird. Ein durchgelassener Puls gelangt zuerst in einen Verstärker und wird anschließend in die Probe eingestrahlt. Durch die Relaxation der makroskopischen Magnetisierung in der Probe erhält die senkrecht zu der Sendespule angeordnete Empfängerspule als Signal den resultierenden FID, verstärkt diesen und leitet ihn an den Meßrechner weiter. Dort wird das analoge Signal digitalisiert und durch Aufheben der Sperre ein neuer Puls gesendet. Die gemessenen Interferogramme werden anschließend addiert und *Fourier*-transformiert, so daß man das entsprechende Frequenzspektrum erhält.

### 3.2.2 DEUTERIUM-NMR-SPEKTROSKOPIE AN PHOSPHOLIPIDEN

Der entscheidende Unterschied zwischen  $^1\text{H}$ - und  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie besteht in der Tatsache, daß Deuterium einen Kernspin von  $I = 1$  und damit – wie alle Atome mit  $I > 1/2$  – ein elektrisches Quadrupolmoment  $Q$  besitzt, während dies für ein Proton ( $I = 1/2$ ) nicht der Fall ist [Friebolin, 1992]. Anschaulich gesehen beschreibt das Quadrupolmoment die Abweichung der Kernladungsverteilung von der Kugelsymmetrie und muß somit durch einen symmetrischen Tensor ausgedrückt werden, welcher sich allerdings nach geeigneter Koordinatentransformation und der Annahme einer schnellen Ladungsbewegung in eine skalare

Größe umformen läßt [Cohen und Reif, 1957]. Eine Verzerrung der Ladungsverteilung kann nur auftreten, wenn sich der Kern in einer inhomogenen elektrischen Umgebung mit einem daraus resultierenden elektrostatischen Feldgradienten (EFG) befindet (das s-Elektron des Deuteriums spielt somit keine Rolle), dann allerdings sind die Quadrupolwechselwirkungen aufgrund der geringen räumlichen Entfernung der beteiligten intramolekularen Ladungen sehr stark und werden zur dominierenden Komponente bei der Relaxation der Kernspins [Blume, 1988b].

Da Deuterium ein relativ kleines Quadrupolmoment besitzt ( $Q(^2\text{H}) \approx 2.87 \cdot 10^{-31} \text{ m}^2$  im Vergleich zu etwa  $Q(^{14}\text{N}) \approx 1.67 \cdot 10^{-30} \text{ m}^2$  [Friebolin, 1992]), kann man seinen Einfluß noch als „Störung“ der Zeeman-Niveaus auffassen und quantenmechanisch ermitteln. Das qualitative Ergebnis dieser Berechnung ist in der folgenden Abbildung wiedergegeben:

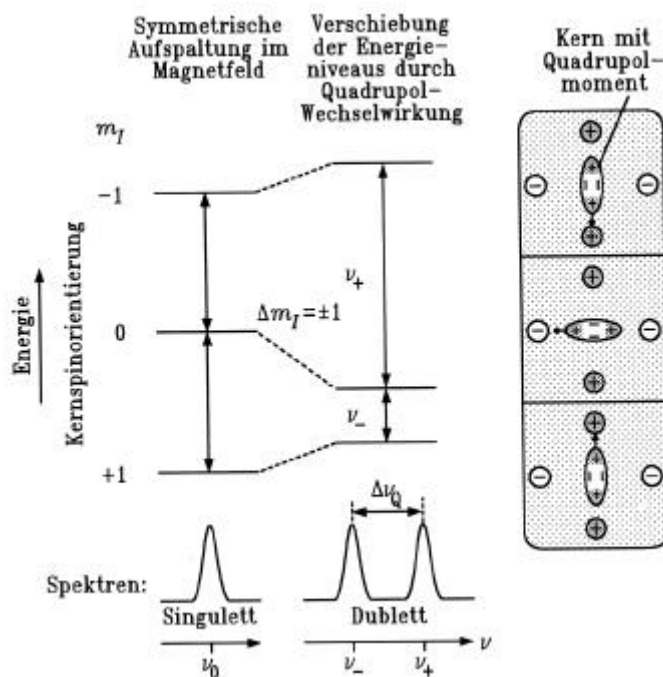


Abbildung 11: *Einfluß der Quadrupolwechselwirkung auf die Zeeman-Niveaus von Deuterium; aus dem ursprünglich beobachteten Singulett wird ein Dublett mit symmetrischer Anordnung der Signale um die ursprüngliche Larmor-Frequenz (hier  $\nu_0$ );  $\Delta\nu_Q$  bezeichnet die Quadrupolaufspaltung; Diagramm nach Winter und Noll [1998].*

Entscheidend für die Interpretation der Spektren ist dabei die Tatsache, daß durch die Quadrupolwechselwirkungen offensichtlich eine Linienaufspaltung symmetrisch zu der ursprünglichen Larmor-Frequenz auftreten kann. Diese ist jedoch nicht immer gleich, son-

dern hängt maßgeblich von den Eigenschaften des EFG und der Richtung des angelegten Magnetfeldes ab.

Der Elektrische Feldgradient  $\underline{F}$  ist eine tensorielle Größe mit der Spur null und kann durch eine geeignete Koordinatentransformation in eine diagonalisierte Form gebracht werden [Seelig, 1977]:

$$\underline{F} = \begin{pmatrix} F_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & F_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & F_{zz} \end{pmatrix}, \quad (12)$$

wobei definitionsgemäß  $F_{zz} \geq F_{yy} \geq F_{xx}$  gilt.

Da der EFG bei den in der vorliegenden Arbeit ausschließlich untersuchten aliphatischen C-D-Gruppen axialsymmetrisch zu der Bindungsrichtung verläuft, läßt sich Gleichung (12) durch die Bedingung  $F_{xx} = F_{yy}$  noch zusätzlich weiter vereinfachen.  $F_{zz}$  bezeichnet man gemeinhin als „Feldgradienten“ und führt der Anschaulichkeit halber eine Ladungsseparation durch:

$$F_{zz} = e \cdot q_F. \quad (13)$$

Die Quadrupolaufspaltung einer C-D-Gruppe für jede beliebige Orientierung des EFG bezüglich des angelegten Magnetfeldes kann damit durch Anwendung einer geeigneten Rotationsmatrix als Funktion von  $F_{zz}$  – dem betragsmäßig größten Wert des Gradiententensors – multipliziert mit einem winkelabhängigen Abschwächungsterm wie folgt ausgedrückt werden [Seelig, 1977]:

$$\Delta n_Q = \frac{3}{2} \left( \frac{e^2 q_F Q}{h} \right) \left( \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right). \quad (14)$$

$\alpha$  bezeichnet hierbei den Winkel zwischen dem angelegten magnetischen Feld und der Richtung der  $F_{zz}$ -Komponente des EFG. Der Term in der ersten runden Klammer definiert die sogenannte „Quadrupolkopplungskonstante“ mit einem Wert von etwa 169 kHz [Blume, 1988b] für die hier betrachteten aliphatischen C-D-Bindungen.

Welche experimentell wichtigen Informationen lassen sich nun aus den obigen Betrachtungen gewinnen? Zuerst ist aus Gleichung (14) sofort ersichtlich, daß  $\Delta\nu_Q$  nur von der Richtung, nicht aber von der Stärke des angelegten Magnetfeldes abhängt, denn bei den Quadrupolwechselwirkungen handelt es sich ja um intramolekulare elektrostatische Effekte. Da diese außerdem die Relaxationszeit der durch den Sendepuls ausgelenkten makroskopischen Magnetisierung verkürzen, nimmt auch die Breite der Spektrallinien aufgrund der *Heisenbergschen* Unschärferelation deutlich zu [Friebolin, 1992], was wiederum zur Folge hat, daß Linienaufspaltungen aufgrund von Spin-Spin-Kopplungen oder chemischer Anisotropie meist nicht mehr beobachtet werden können. Der entscheidende Vorteil der  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie besteht jedoch in der Winkelabhängigkeit von  $\Delta\nu_Q$ : Bei isotropen Systemen mit schnellen Molekülbewegungen – wie z. B. reines, flüssiges  $\text{D}_2\text{O}$  – nimmt auf der NMR-Zeitskala ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  s [Winter und Noll, 1998]) jedes Teilchen eine große Anzahl von Orientierungen bezüglich des äußeren Magnetfeldes ein, so daß man in dem entsprechend gemittelten Spektrum nur ein einziges Singulett erkennt. Bei einem Pulver- (oder *Pake*-) Spektrum liegt hingegen genau das andere Extrem vor: In diesem Fall sind zwar ebenfalls alle möglichen Winkel  $\alpha$  in der Probe vertreten, aber die einzelnen Spinsysteme behalten ihre räumliche Ausrichtung bei, so daß das resultierende Spektrum gemäß Gleichung (14) im Prinzip aus einer sehr großen Anzahl von Dubletts mit unterschiedlichem  $\Delta\nu_Q$  besteht, wie die folgende Abbildung verdeutlicht:

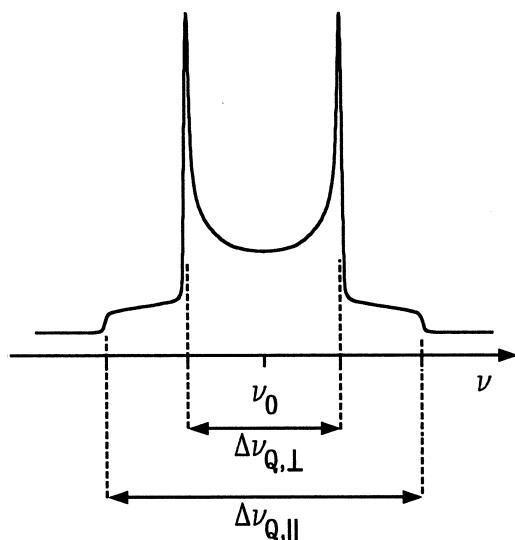


Abbildung 12: *Schematische Darstellung eines  $^2\text{H}$ -Pake-Spektrums für den fiktiven Fall eines Pulvers aus lauter aliphatischen C-D-Bindungen;  $\mathbf{Dn}_{Q^{\wedge}}$  (ca. 125 Hz) und  $\mathbf{Dn}_{Q_{\text{eff}}}$  (ca. 250 Hz) beziehen sich auf die senkrechte bzw. horizontale Orientierung des Feldgradienten  $e\mathbf{q}_F$  bezüglich der Richtung des äußeren Magnetfeldes; Diagramm aus Winter und Noll [1998].*

Da der Term  $3\cos^2\alpha - 1$  Werte von 2 bis  $-1$  einnehmen kann, laufen die beiden Einzelspektren über die Larmor-Frequenz  $\nu_0$  des ungestörten Übergangs hinaus und überlagern sich dementsprechend. Für den Fall  $\alpha = 54.44^\circ$  wird  $\cos^2\alpha = 1/3$  und es tritt lediglich ein Singulett bei  $\nu_0$  auf, weswegen dieser Wert auch als „magischer Winkel“ bezeichnet wird [Griffin, 1981].

Dispergiert man nun Phospholipide mit perdeuterten Acylketten in Wasser, so bilden sich Vesikel, in denen die einzelnen Lipidmoleküle zwar in jedem beliebigen Winkel zu dem äußeren Magnetfeld stehen, die einzelnen C-D-Bindungen jedoch eine deutliche Anisotropie in ihren Bewegungsmöglichkeiten aufweisen. Somit gibt das resultierende NMR-Spektrum direkt Aufschlüsse über die mittlere zeitliche Orientierung der Kettensegmente bezüglich einer Vorzugsachse [Spiess, 1985]. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen in der flüssig-kristallinen Phase sind die auftretenden Kettenbewegungen (trans-gauche-Isomerisierung, Rotation der Ketten um ihre Längsachse, „Wakkelbewegungen“ des gesamten Moleküls) zu schnell für das NMR-Zeitfenster [Winter und Noll, 1998] und führen somit durch die zeitliche Mittelung zu einer geringeren

Quadrupolaufspaltung, so daß die beobachteten Bandenformen zwischen der eines *Pake*-Spektrums und einem isotropen Signal liegen. Letzteres wird jedoch lediglich beim Auftreten einer hexagonalen Phase annähernd erreicht, da in diesem Fall die zusätzlich ermöglichte schnelle Diffusion der Lipidmoleküle und ihr größerer Bewegungsspielraum die vorhandene Anisotropie in dem beobachteten Zeitintervall fast vollständig aufheben [Lafleur et al., 1996].

Weil die einzelnen Kettensegmente der perdeutერიerten Lipidmoleküle in der gebildeten Membran unterschiedliche Beweglichkeiten besitzen, erhält man somit durch eine einzige NMR-Messung einen Satz von Dubletts mit unterschiedlichem  $\Delta\nu_Q$ , wodurch eine direkte Zuordnung zu den jeweiligen Positionen in der Kette ermöglicht wird [Seelig, 1977]. Die gemessenen Pulverspektren lassen sich außerdem mit Hilfe einer mathematischen Prozedur (dem sogenannten *De-Pake*-ing) in das entsprechende Spektrum einer vollkommen orientierten Probe umrechnen [Sternin et al., 1983], wodurch die auftretenden Dubletts deutlicher zutage treten und somit eine (subjektive) Verbesserung der Auflösung erzielt wird.

Vom technischen Standpunkt aus gesehen besteht bei der Durchführung der NMR-Messungen noch das Problem, daß im Falle von Deuterium die Abdeckung des gesamten zu untersuchenden Frequenzbereiches einen Puls mit sehr hoher Leistung erfordert und außerdem die Relaxationszeiten der induzierten Quermagnetisierung durch die auftretenden Quadrupolwechselwirkungen sehr kurz sind [Blume, 1988b]. Die von der Empfängerspule wegen des starken Sendesignals benötigte Totzeit macht es daher unmöglich, den unmittelbar folgenden und schnell abfallenden FID komplett aufzuzeichnen, woraus ein gravierender Informationsverlust resultiert. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wendet man eine spezielle Pulsfolge an [Griffin, 1981; Davis, 1983] und verzögert auf diese Weise den Beginn des FID um eine geeignete Zeitspanne  $t$ , welche deutlich größer als die Erholungszeit des Empfängers ist [Davis et al., 1976]:

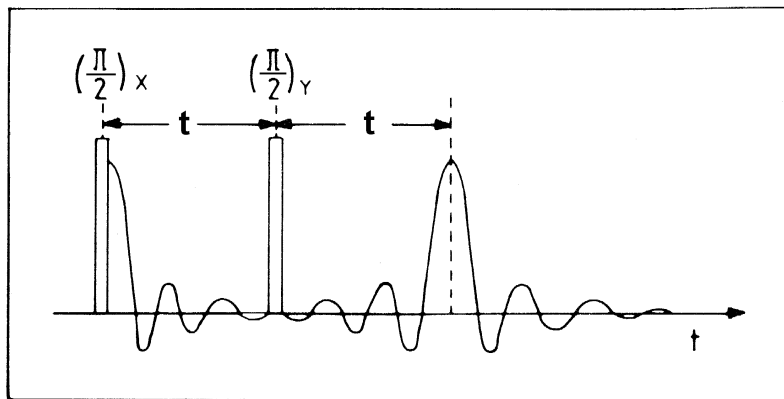


Abbildung 13: *Quadrupol-Echo Sequenz zur Verschiebung des erzeugten FIDs auf der Zeitachse; es werden zwei Sendepulse eingestrahlt, welche die makroskopische Magnetisierung des Spinsystems jeweils  $90^\circ$  um die angegebene Achse (x oder y) drehen; die Aufzeichnung beginnt nach der Zeit  $2t$  auf dem Maximum des Interferogramms (gestrichelte Linie); Diagramm nach Blume [1982b].*

Die in Abb. 13 dargestellte Pulsfolge besitzt den gleichen Effekt wie die Spin-Echo-Sequenz in der Protonen-NMR-Spektroskopie: Mit dem ersten Puls wird eine Quermagnetisierung erzeugt, welche in dem folgenden Zeitintervall  $t$  relaxiert. Der zweite Sendepuls führt hingegen zu einer Refokussierung, so daß sich das Spinsystem nach einer weiteren Periode  $t$  wieder in derselben Situation wie direkt nach der ersten Anregung befindet und somit mit einer Verzögerung von  $2t$  aufgezeichnet werden kann.



### 3.3 FTIR-SPEKTROSKOPIE

#### 3.3.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

Im Gegensatz zu der gerade beschriebenen NMR-Technik werden im Falle der IR-Spektroskopie durch das Einstrahlen der geeigneten Resonanzfrequenz ganze Atomgruppen zu Schwingungen angeregt, sofern sich das Dipolmoment des betroffenen Moleküls während dieses Vorgangs ändert [Engelke, 1992]. Hierzu benötigt man eine deutlich energiereichere Strahlung (mit einer Wellenlänge  $\lambda$  von 3-20  $\mu\text{m}$  in der vorliegenden Arbeit) im Vergleich zu  $\lambda \approx 5 \text{ m}$  für die entsprechenden  $^2\text{H}$ -NMR-Messungen.

Was das Meßprinzip betrifft, so sind sich die FTIR- und die bereits erwähnte PFT-NMR-Methode sehr ähnlich: Die in die Probe eingestrahlte elektromagnetische Strahlung deckt jeweils den gesamten zu untersuchenden Frequenzbereich komplett ab, und die zeitliche Abhängigkeit der am Detektor ankommenden Intensität (das Interferogramm) wird durch *Fourier*-Transformation in die Frequenzdomäne (das eigentliche Spektrum) überführt. Bezüglich der technischen Realisierung sind allerdings vollkommen unterschiedliche Ansätze notwendig, da im Falle der Kernresonanz das zeitliche Abklingen der induzierten Magnetisierung (der FID) direkt beobachtet werden kann, während bei der IR-Spektroskopie die Intensität in Abhängigkeit von der optischen Weglänge aufgezeichnet wird (Abb. 14):

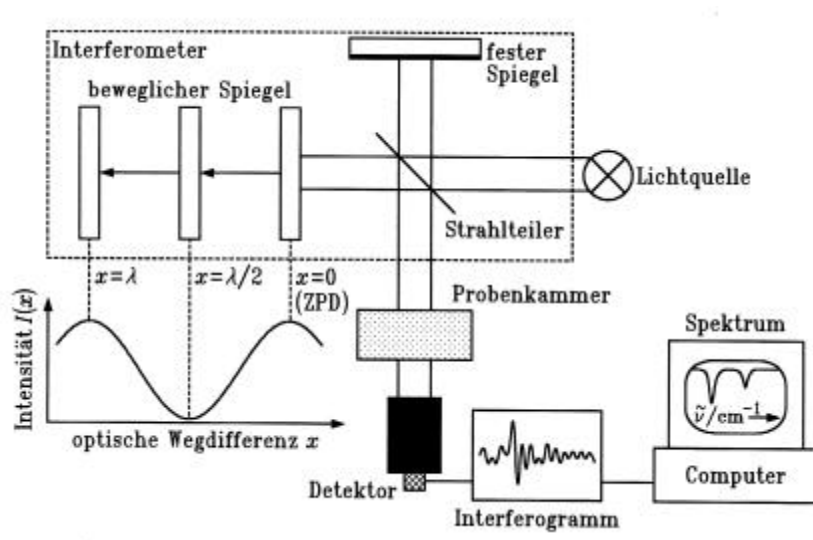


Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines FTIR-Spektrometers; Diagramm aus Winter und Noll [1998].

Das einfallende polychromatische Infrarotlicht wird durch einen halbdurchlässigen Strahlteiler in zwei ebenfalls polychromatische Teilstrahlen zerlegt, anschließend an zwei unterschiedlichen Spiegeln reflektiert und wieder zusammengeführt. Da einer der beiden Spiegel in  $x$ -Richtung (der Richtung des einfallenden Strahles) beweglich ist, läßt sich die zurückzulegende Entfernung des entsprechenden Teilstrahles verändern, was nach der Rekombination durch die auftretende konstruktive bzw. destruktive Interferenz zu einem modulierten Signal führt, welches direkt von der optischen Weglänge  $x$  abhängt. Für die Intensität  $I$  der von der Lichtquelle eingestrahnten Wellenlänge  $\lambda$  gilt somit nach der Zusammenführung der Teilstrahlen [Herres und Gronholz, 1984]:

$$I = I_0 \cos\left(\frac{2px}{\lambda}\right), \quad (15)$$

wobei  $I_0$  der entsprechenden Intensität vor der Strahlenteilung entspricht.

Das auf diese Weise modulierte (polychromatische) Frequenzband wird anschließend in die Probenkammer eingestrahlt. Dort absorbieren die IR-aktiven Molekülgruppen bei ihren jeweiligen Resonanzfrequenzen Energie und werden zu Schwingungen angeregt, während die Intensität des ungenutzten Lichtes nach dem Durchtritt durch die Probe mit Hilfe eines

Photohalbleiters als Funktion der Zeit registriert wird [Günzler und Heise, 1996]. Um bei der punktuellen Aufzeichnung des Interferogramms eine hohe und reproduzierbare Ortsgenauigkeit zu erreichen, wird in dem hier verwendeten Gerät das monochromatische Licht eines He-Ne-Lasers ( $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ) – welches moduliert eine harmonische Sinusfunktion ergibt – als Referenz miteingestrahlt (Abb. 15):

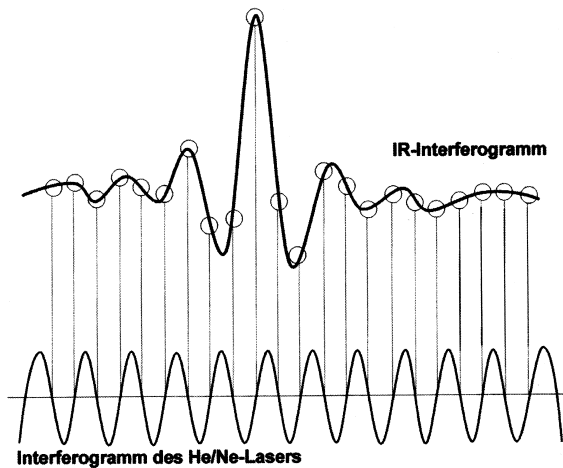


Abbildung 15: *Schematische Darstellung der Aufzeichnung eines FTIR-Interferogramms: Bei jedem Nulldurchgang des Referenz-Interferogramms wird ein Meßpunkt in der Probe aufgenommen, wodurch eine hohe Wellenzahlgenauigkeit erreicht wird; Diagramm aus Gottwald und Wachter [1997].*

Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses werden vor der *Fourier*-Transformation zuerst mehrere Interferogramme addiert, wodurch das auftretende Grundrauschen entsprechend verringert wird. Um diese Kumulation ohne eventuelle Wellenzahlverschiebungen zu ermöglichen, muß jedoch ein einheitlicher Bezugspunkt vorgegeben werden. Dies kann durch das zusätzliche Einstrahlen eines Weißlichtsignals geschehen, welches aufgrund seines breiten Frequenzbandes ein sehr scharfes Interferogramm liefert und somit als Normierung genutzt werden kann [Günzler und Heise, 1996].

### 3.3.2 FTIR-SPEKTROSKOPIE AN PHOSPHOLIPIDEN

Da die angeregten Normalschwingungen der Atomgruppen eines Lipidmoleküls unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen, lassen sich mit Hilfe eines gemessenen IR-Spektrums gleichzeitig eine große Anzahl unterschiedlicher Informationen gewinnen. Eine ta-

bellarische Übersicht der bei Phospholipiden auftretenden Gruppenschwingungen findet sich beispielsweise in *Blume* [1996].

Auf der Zeitskala geht die IR-Schwingungsanregung mit etwa  $10^{-12}$  s [Winter und Noll, 1998] wesentlich schneller vonstatten als die *trans-gauche*-Isomerisierung der Acylketten, so daß man diesbezüglich eine „Momentaufnahme“ des untersuchten Lipidensembles erhält, welche auch nicht durch ebenfalls zu langsame Wackelbewegungen oder Kettenrotationen gestört wird. Zudem ist es auch möglich, deuterierte und nicht-deuterierte Gruppen parallel zu untersuchen, da erstere aufgrund der höheren Masse bei etwas niedrigeren Wellenzahlen angeregt werden und somit sehr gut unterschieden werden können [Engelke, 1991]. Ein entsprechendes Experiment ist hingegen bei der NMR-Spektroskopie aufgrund der stark unterschiedlichen *Larmor*-Frequenzen von Protonen und Deuterium (400 MHz bzw. ca. 61 MHz bei einer Flußdichte von 9.4 T) unmöglich.

### 3.4 DIFFERENTIELLE KALORIMETRIE (DSC)

Mit Hilfe der DSC läßt sich das thermotrope Phasenverhalten wässriger Lipiddispersionen untersuchen. Das hierzu verwendete Kalorimeter besteht im Prinzip aus zwei identischen Zellen (einer Meß- und einer Referenzzelle), welche sich in einem thermisch isolierten Raum befinden und durch hochempfindliche Temperatursensoren mit sich und den Raumwänden in Kontakt stehen [Plotnikov et al., 1997]. Bei der Messung werden Probe und Referenz durch eine elektrische Heizleistung  $P$  mit gleicher Geschwindigkeit aufgeheizt und die absolute Temperatur mit den – ebenfalls beheizbaren – Raumwänden abgeglichen. Tritt nun beispielsweise ein endothermer Phasenübergang in der Probenzelle auf, so muß dieser – damit die Forderung  $\Delta T = 0$  erfüllt bleibt – eine zusätzliche Heizleistung  $\Delta P$  zugeführt werden, welche der Differenz der Wärmekapazitäten von Probe und Referenz proportional ist [Blume, 1988a]:

$$c_{\text{diff}} = c_{\text{Probe}} - c_{\text{Referenz}} = \Delta P \left( \frac{dt}{dT} \right). \quad (16)$$

Da die verwendete Heizrate bekannt ist, erhält man als Ergebnis der Messung  $c_{\text{diff}}$  – den Umwandlungsanteil der molaren Wärmekapazität [Winter und Noll, 1998] – als Funktion

der Temperatur. Die zugehörige molare Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{um}}$  kann dann zusätzlich bei gegebenem Zellvolumen und gegebener Stoffmenge durch einfache Integration über den entsprechenden Temperaturbereich ermittelt werden [Blume, 1988a]:

$$\Delta H_{\text{um}} = \int_{T_1}^{T_2} c_{\text{diff}} dT . \quad (17)$$

---

## 4 THEORETISCHE ARBEITEN

---

### 4.1 GRUNDLEGENDE ENTSCHEIDUNGEN

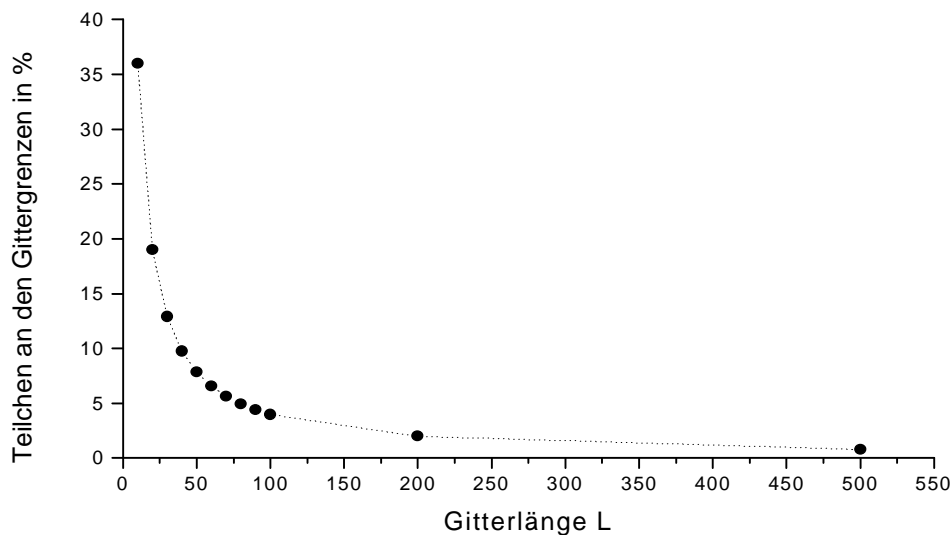
Beim Durchsehen der vorhandenen Literatur über Monte Carlo-Simulationen an Lipidsystemen und *Ising*-Modellen findet man eine Fülle von Anregungen und Informationen. Allerdings zeigt sich sehr schnell, daß die zur Verfügung stehende CPU-Leistung der limitierende Faktor ist, wenn es um das Konstruieren von möglichst realitätsnahen Modellen geht, so daß es angebracht erscheint, von Anfang an bestimmte generelle Einschränkungen zu machen. Eine der grundlegendsten Entscheidungen ist hierbei die Wahl der räumlichen Umgebung, in der sich die zu untersuchenden Teilchen bewegen.

#### 4.1.1 DAS GITTER

Ob man die zu untersuchenden Teilchen überhaupt auf ein Gitter setzt, ihnen also nur bestimmte räumliche Positionen erlaubt, oder ob man ein Kontinuumsmodell verwendet, hängt von dem Ziel der jeweiligen Simulation ab. Da im folgenden stets eine Hälfte einer Lipid-Doppelschicht betrachtet werden soll, in welcher die Moleküle ja idealerweise ohne Fehlstellen gepackt sind, um ihre Funktion als biologische Barriere zu erfüllen [Seddon, 1996], scheint eine Gitterbetrachtung von Vorteil zu sein, zumal hierdurch das Eigenvolumen der einzelnen Teilchen gleich implizit mitberücksichtigt wird und nicht durch zeitaufwendige Berechnung ermittelt werden muß. Außerdem hat sich gezeigt, daß sich die Verwendung von Gittermodellen zum Studium von Polymerketten [Milik et al., 1990] und Lipidmonoschichten [Mouritsen et al., 1995a] durchaus eignet. Da das Hauptaugenmerk der in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen auf dem Studium von lateralen Domänen – also von molekularen Fluktuationserscheinungen – liegt, wurde eine zweidimensionale Betrachtungsweise gewählt und auf eine nähere Analyse von Kettenorientierungen und Ordnungsparametern verzichtet. Dies führt zu einer signifikanten Einsparung von CPU-Zeit, zumal die vernachlässigte Wechselwirkung der Moleküle „in der Tiefe“ nicht vollständig verlorengeht, sondern – wie später gezeigt – in ein zweidimensionales Szenario transformiert werden kann.

Um die annähernd hexagonale Packung der Lipidmoleküle in der lamellaren Phase [Chong et al., 1994] möglichst realitätsgetreu wiederzugeben, wurde ein trianguläres Gitter mit sechsfacher Koordination dem einfacheren quadratischen Gitter mit der Koordinationszahl vier vorgezogen, welches jedoch ebenfalls vereinzelt für die Simulation von Lipidmonoschichten verwendet wird [Harris und Rice, 1988].

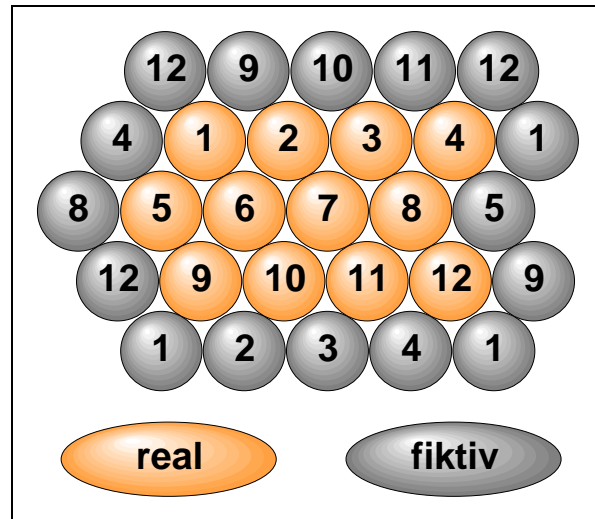
Da sich die Simulation aus technischen Gründen auf einen - gegenüber den wirklichen Dimensionen - winzigen räumlichen Ausschnitt beschränken muß, ist der prozentuale Anteil der Teilchen an den Grenzen eines  $L \cdot L$  großen Gitters relativ zur Gesamtzahl durchaus beträchtlich, wie Abb. 16 verdeutlicht:



**Abbildung 16:** *Prozentualer Anteil der Teilchen an den Grenzen eines  $L \cdot L$  großen Gitters an der Gesamtteilchenzahl; die gepunktete Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung.*

Da diese Teilchen keine sechs nächsten Nachbarn mehr besitzen, sondern gewissermaßen mehr oder weniger von einer undurchdringlichen Wand umgeben sind, werden die statistisch ermittelten Gleichgewichtseigenschaften des Systems durch sie in unerwünschter Weise beeinflusst. Eine Standardtechnik zur Verminderung dieser End-Effekte ist es daher, periodische Grenzen zu implementieren [Binder und Stauffer, 1984]. Dies geschieht, indem man die Teilchen an einem Ende des Gitters in fiktive Nachbarschaft zu den Teilchen am gegenüberliegenden Ende setzt. Damit wird es auch möglich, beispielsweise auf der linken

Seite das Gitter zu verlassen, da man im selben Moment auf der gegenüberliegenden Seite wieder in das Gitter eintreten würde. Zur Verdeutlichung ist ein Schema des in dieser Arbeit verwendeten Modells in Abb. 17 dargestellt.



**Abbildung 17:** Schematisches Modell des verwendeten hexagonalen Gitters mit periodischen Grenzen; die farbigen Kugeln repräsentieren das tatsächliche Gitter, die grauen Kugeln stellen die fiktiven Nachbarn für die Teilchen an der Gittergrenze dar.

Mit der Einführung der periodischen Grenzen kann man zwar dafür Sorge tragen, daß die Koordinationszahl überall erhalten bleibt, und somit einen realistischeren Gleichgewichtszustand erreichen, allerdings müssen noch weitere problematische Effekte berücksichtigt werden: So besteht bei der Betrachtung von langreichweitigen Kräften, wie z. B. den elektrostatischen Wechselwirkungen (über die 90 (!) nächsten Nachbarn) der Kopfgruppen-dipole von PE-Molekülen [Pink et al., 1998], die Gefahr, daß ein Teilchen von seinem eigenen „Spiegelbild“ beeinflusst wird, was zu langreichweitigen Symmetrien führt, die eigentlich gar nicht vorhanden sind [Allen und Tildesley, 1987]. Zur Umgehung dieses Problems wurden für die Simulationen relativ große Gitter (mit  $L \geq 80$ ) gewählt und die Modelle möglichst einfach gehalten, um die vorhandene CPU-Zeit optimal zu nutzen.

Wenn man Systeme in der Nähe der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  untersucht, ergibt sich eine weitere Schwierigkeit, welche in der englischsprachigen Literatur gemeinhin als „Finite-Size-Effect“ bezeichnet wird und bei der Behandlung von *Ising*-Systemen in der Festkörperphysik eine gravierende Rolle spielt [z. B. Binder und Heermann, 1988]. Vereinfacht ausgedrückt besteht das Problem darin, daß die Größe der fluktuierenden Domänen,



welche ja bei Annäherung an  $T_m$  zunimmt, unter Umständen nicht mehr durch die modelleigene Korrelationslänge vorgegeben wird, sondern durch die Dimensionen des Gitters. Unter der Korrelationslänge versteht man dabei den Abstand, über welchen sich Fluktuationen an einem Ort des Gitters noch auf einen anderen Ort auswirken [Chandler, 1987].

Die periodischen Grenzen verhindern dieses Problem nicht, sondern bewirken zusätzlich noch eine „Überkorrelation“ [Mouritsen, 1984]. Unter diesen Umständen ist es äußerst schwierig, die Ordnung eines Phasenüberganges zu bestimmen, da „große“ (bezüglich des Gitters) fluktuierende Domänen, also kooperative Einheiten, sowohl von einem Übergang erster Ordnung als auch von einem Übergang zweiter Ordnung auf einem zu kleinen Gitter herrühren können. Für die Simulation von Phasenübergängen bei Phospholipiden wurde ein mathematisches Verfahren entwickelt, um hier Licht ins Dunkel zu bringen [Challa et al., 1986; Risbo et al., 1995]. Dieser Rechenaufwand läßt sich jedoch für hinreichend einfache Simulationsmodelle durch Vergrößerung des Gitters über die spezifische Korrelationslänge hinaus umgehen, da dann für einen Übergang erster Ordnung die kooperative Einheit mit der Größe des Systems weiter zunimmt, für einen Übergang zweiter Ordnung jedoch nicht [Corvera et al., 1993]. Eine nähere Untersuchung dieser Thematik erfolgt im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit.

#### 4.1.2 DER ZUFALLSGENERATOR

*„It may seem perverse to use a computer, that most precise and deterministic of all machines conceived by the human mind, to produce ‘random’ numbers“* [Press et al., 1986]. Dieser Satz beschreibt treffend die Schwierigkeiten, denen man gegenübersteht, wenn man für eine Simulation Zufallszahlen in millionenfacher Menge benötigt. Da bei diesen Dimensionen herkömmliche Verfahren wie beispielsweise Würfeln viel zu langsam sind, besteht die einzige Möglichkeit darin, einen Computer dazu zu bewegen, zufällige Zahlen zu generieren. Da ein Computer aber nur „ja“ oder „nein“, aber kein „vielleicht“ kennt, ist dies so prinzipiell nicht machbar. Glücklicherweise ist es aber gar nicht nötig, wirklich im wahrsten Sinne des Wortes „zufällige“ Zahlen zu erzeugen, sondern die generierten Zahlen müssen lediglich folgende Kriterien erfüllen, um bei einer Monte Carlo-Simulation eingesetzt werden zu können:

- Sie müssen schnell erzeugbar sein.
- Sie müssen reproduzierbar sein.
- Sie müssen in dem vorgegebenen Intervall (hier zwischen null und eins) vollkommen gleichmäßig verteilt sein.

Diese Kriterien werden recht gut von sogenannten multiplikativ kongruenten Generatoren erfüllt [Press et al., 1986]; die zentrale rekursive Rechenvorschrift für die Ermittlung einer „Zufallszahl“  $z$  ist hierbei die folgende [Allen und Tildesley, 1987]:

$$z_{i+1} = (\text{MODULO}(\xi \cdot z_i, \Xi)) / \Xi, \text{ mit} \quad (18)$$

$$\text{MODULO}(\xi \cdot z_i, \Xi) = (\xi \cdot z_i) - \Xi \cdot \text{INT}(\xi \cdot z_i / \Xi). \quad (19)$$

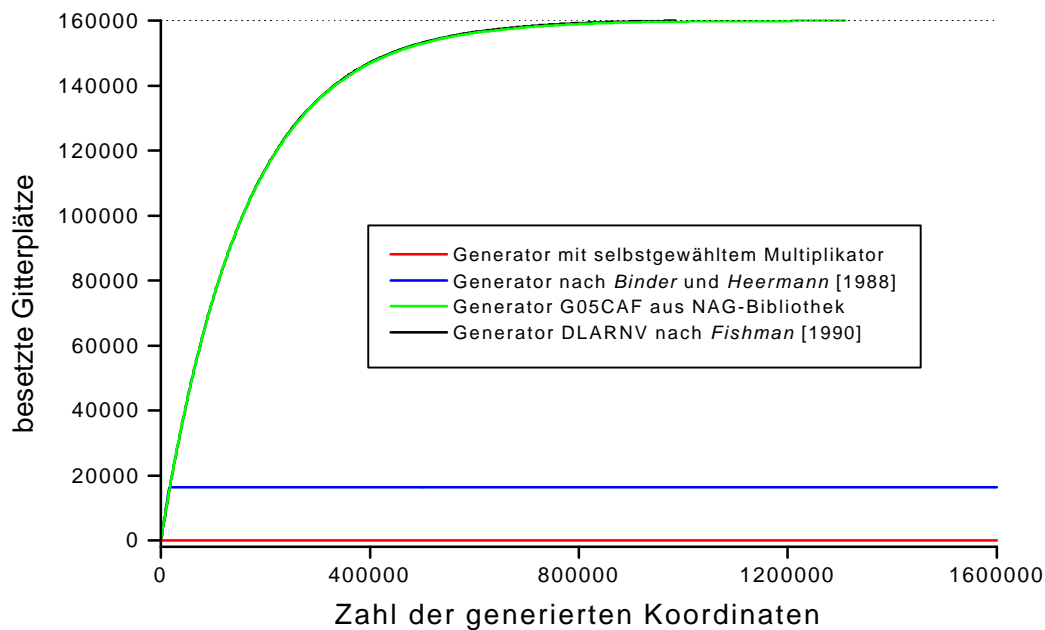
Hierbei liefert die Funktion INT den ungerundeten ganzzahligen Wert, welcher sich bei der Division ergibt (z. B.  $\text{INT}(10/6) = 1$ ). Die MODULO-Funktion erscheint auf den ersten Blick etwas unübersichtlich, ist jedoch für den Rechner sehr schnell durchführbar, da einfach die vorderen Bits des Produktausdruckes (unter Berücksichtigung des Vorzeichens!) weggelassen werden können [Binder und Stauffer, 1984].  $\Xi$  ist eine möglichst große Integerzahl, welche die Wiederholungsperiode vorgibt, da der oben beschriebene Algorithmus theoretisch nur maximal  $\Xi - 1$  unabhängige Werte erzeugen kann, bevor sich der gesamte Zyklus wiederholt [Allen und Tildesley, 1987]. Wie viele unabhängige  $z_i$  man aber tatsächlich erzeugen kann, hängt ganz gravierend von der Wahl des Multiplikators  $\xi$  ab, welcher bestimmte Kriterien erfüllen muß, damit sich die Wiederholungssequenz nicht dramatisch verkürzt [Knuth, 1973], und der Gegenstand intensiver Forschung ist. Eine Tabelle optimierter  $\Xi$ - und  $\xi$ -Werte findet sich z. B. in *Press et al.* [1986].

Der Versuch, in der vorliegenden Arbeit einen von *Press et al.* [1986] empfohlenen Generator (RAN1) zu implementieren, scheiterte daran, daß der verwendete Algorithmus zu viel CPU-Zeit benötigte und sich bei den durchgeführten Experimenten als geschwindigkeitsbestimmend erwies. Daher wurde für die Simulationen auf den SGI-Workstations INDIGO und OCTANE ein multiplikativ kongruenter Generator mit Namen DLARNV (im

INDIGO-systemeigenen Verzeichnis complib.sgimath) verwendet, welcher mit den von *Fishman* [1990] gefundenen optimierten Parametern  $\Xi = 2^{48}$  und  $\xi = 3395283404653$  arbeitet. Er ist bedeutend schneller als RAN1, da der Quellcode teilweise vektorisierbar ist, so daß die Zufallszahlen immer parallel in Blöcken von 128 Stück generiert werden können. Als Beweis dafür, wie wichtig die richtige Wahl von  $\xi$  ist, sei noch erwähnt, daß *Fishman*  $351 \cdot 10^{11}$  Multiplikatoren untersuchte und nur 42 (!) für tauglich hielt.

Die Simulationen auf dem Supercomputer SC900 wurden statt dessen mit Hilfe des renommierten Generators G05CAF ( $\Xi = 2^{59}$ ,  $\xi = 13^{13}$ ) aus der NAG FORTRAN - Bibliothek durchgeführt, welcher in der Literatur als sehr zuverlässig gilt [Knuth, 1973; Allen und Tildesley, 1987].

Getreu der Mahnung, man solle nie einen Zufallsgenerator verwenden, den man vorher nicht selbst getestet hat [Press et al., 1986], wurde - um zu untersuchen, ob sich die Zufallszahlen auch wirklich einheitlich verteilen - folgendes Experiment durchgeführt: Zuerst wurde ein  $400 \cdot 400$  großes Gitter aufgespannt und alle Gitterpunkte als „unbesetzt“ deklariert. Anschließend wurden Koordinaten aus je zwei Zufallszahlen ermittelt und die entsprechenden Gitterpunkte als „besetzt“ registriert. Ein „guter“ Generator zeichnet sich somit dadurch aus, daß die Anzahl der freien Gitterplätze mit steigender Zahl der erzeugten Koordinaten kontinuierlich abnimmt, wobei dieser Abfall jedoch nicht linear, sondern exponentiell erfolgt [Binder und Stauffer, 1984]. Pro Gitterplatz wurden daher zehn Koordinaten, also insgesamt  $3.2 \cdot 10^6$  Zufallszahlen generiert, eine Größenordnung, welche auch die tatsächlichen Verhältnisse in den späteren Simulationen widerspiegelt. Zusätzlich zu DLARNV und G05CAF wurde noch ein weiterer Generator aus *Binder* und *Heermann* [1988] mit  $\Xi = 2^{17}$  und  $\xi = 1277$  zum Vergleich diesem Test unterworfen. Da diese Autoren nachdrücklich darauf hinweisen, daß der Wert für  $\xi$  nicht verändert werden darf, wurde zur Befriedigung der wissenschaftlichen Neugier ein zusätzliches Experiment mit  $\xi = 1512$  (meinem Geburtsdatum) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 zusammengefaßt.



**Abbildung 18:** Anzahl der besetzten Gitterplätze eines  $400 \times 400$  großen Gitters in Abhängigkeit von der Anzahl und Güte der errechneten Zufallszahlen, welche in Zweierblöcken zu Koordinaten zusammengefaßt wurden; die schwarze und die grüne Linie überlagern sich dabei fast vollständig.

Sowohl DLARNV als auch G05CAF zeigen bezüglich der gleichmäßigen Verteilung sehr gute Eigenschaften und können das aufgespannte Gitter bereits nach 985000 bzw. 1310000 Schritten vollständig besetzen, während der Generator aus *Binder* und *Heermann* nur etwa 16000 unterschiedliche Vektoren erzeugen kann, bevor sich die MODULO-Sequenz wiederholt. Katastrophal sind jedoch die Ergebnisse, welche mit dem selbstgewählten Multiplikator erreicht wurden, hier beträgt die Anzahl der besetzten Gitterpunkte gerade vier (!), womit sich bestätigt, wie elementar eine sorgfältige Auswahl von  $\xi$  ist.

Wie obige Ausführung zeigt, handelt es sich bei den erzeugten  $z_i$  nicht um wirklich zufällig errechnete Werte, sondern um vollkommen deterministisch ermittelte Zahlen, die lediglich gewissen Anforderungen (Gleichverteilung, Reproduzierbarkeit) genügen müssen, um sich für Monte Carlo-Simulationen zu eignen. Der Begriff „Zufallszahl“ ist daher eigentlich streng genommen ebenso wie „Monte Carlo“ irreführend, beide Begriffe haben sich aber eingebürgert und werden auch in dieser Arbeit weiterhin verwendet.

## 4.2 MONTE CARLO-SIMULATIONEN AUF DER GRUNDLAGE UNTERSCHIEDLICHER MODELLE

Im folgenden werden mit zunehmender Komplexität stark vereinfachte theoretische Modelle für eine Phospholipidmonoschicht, bestehend aus einer oder zwei Komponenten und einer oder zwei Phasen, vorgestellt. Dabei bleiben etwaige transversale Wechselwirkungen mit der zweiten Hälfte der Doppelschicht - wie etwa der Austausch von Molekülen [Homan und Pownall, 1988] oder die gegenseitige Induktion von Domänen [Almeida et al., 1992] - unberücksichtigt. Die Grundidee der jeweiligen Ansätze wurde aus den zitierten Veröffentlichungen entnommen, das mathematische Gerüst und der entsprechende Quellcode wurden selbständig entwickelt und gegebenenfalls nach eigenen Vorstellungen modifiziert. Die Programme wurden allesamt in FORTRAN geschrieben und auf einer SGI INDIGO-Workstation mit R2000-Prozessor (33 MHz) und 32 MB RAM eingesetzt. Später konnten auch noch eine SGI OCTANE mit R10000-Prozessor (175 MHz) und 128 MB RAM sowie der Supercomputer SGI ORIGIN 2000 (16 R10000-Prozessoren mit je 195 MHz und 4.1 GB RAM) des Regionalen Hochschulrechenzentrums Kaiserslautern verwendet werden.

Im Verlaufe der Arbeit zeigte sich sehr bald, daß eine erschöpfende Analyse der einzelnen Modelle jeglichen Rahmen sprengen würde, so daß die hier erhaltenen Ergebnisse lediglich eine breite Basis für weitere Untersuchungen darstellen.

### 4.2.1 ZWEIKOMPONENTEN-/EINPHASENSYSTEME MIT UND OHNE ELEKTROSTATIK

Mit dem folgenden stark vereinfachten Ansatz wird versucht, einen tieferen Einblick in die intermolekulare Struktur einer aus zwei unterschiedlichen Phospholipiden bestehenden Monoschicht zu gewinnen. Der Hauptphasenübergang der Mischung von der Gel- in die flüssigkristalline Phase wird hierbei nicht berücksichtigt, es wird also davon ausgegangen, daß sich alle Lipidmoleküle bezüglich dieses Überganges in derselben Phase befinden. Der Gedankengang und die theoretische Herleitung des Formelgebäudes werden dabei bewußt ausführlich gestaltet, da die später beschriebenen (und wesentlich komplexeren) Modelle logisch auf den hier dargestellten Grundlagen aufbauen.

#### 4.2.1.1 Herleitung eines allgemeinen Modells ohne Elektrostatik

Unter phänomenologisch-thermodynamischen Gesichtspunkten läßt sich die molare Enthalpie  $H$  des oben beschriebenen Systems, welches aus zwei unterschiedlichen Komponenten A und B besteht, wie folgt ausdrücken [Kortüm und Lachmann, 1981]:

$$H = x^A \cdot H^A + x^B \cdot H^B + \Delta H^E; \quad (20)$$

$x$  bezeichnet hierbei den Molenbruch,  $H^A$  und  $H^B$  stellen den Beitrag der jeweiligen Reinkomponenten zur Gesamtenthalpie dar, und  $\Delta H^E$  ist eine mischungsbedingte Exzeßgröße, welche die Abweichung des Systems von seinem idealen Verhalten widerspiegelt. Um Aussagen über den letztgenannten Term machen zu können [Johann, 1995], verwendet man die *Gibbs - Helmholtz - Gleichung*

$$\Delta G^E = \Delta H^E - T \cdot \Delta S^E \quad (21)$$

und setzt willkürlich  $\Delta S^E = 0$  (Grenzfall der „regulären Mischung“ [Lee, 1977b]). Eine Potenzreihenentwicklung von  $\Delta G^E$  nach dem Molenbruch liefert dann in erster Näherung das folgende Ergebnis:

$$\Delta G^E = \Delta H^E = x(1-x)\rho. \quad (22)$$

Die Exzeßenthalpie setzt sich somit zusammen aus dem Produkt der Molenbrüche sowie einer Energiegröße, die gemeinhin als „Nichtidealitätsparameter“ bezeichnet wird. Überträgt man nun die aus den Gleichungen (20) und (22) gewonnenen Informationen auf ein molekulares System von  $N$  Molekülen, welche sich auf einem  $L \cdot L$  großen zweidimensionalen Gitter befinden, so kann man - unter Vernachlässigung langreichweitiger Wechselwirkungen - analog schreiben [Huang et al., 1993]:

$$E_{\text{ges}} = N_{AA} \cdot E_{AA} + N_{BB} \cdot E_{BB} + N_{AB} \cdot E_{AB}. \quad (23)$$

$E_{\text{ges}}$  ist die relevante Gesamtenergie des Gittersystems,  $E_{AA}$ ,  $E_{BB}$  und  $E_{AB}$  stehen für die Wechselwirkungsenergien zwischen den mit A und B bezeichneten Lipidtypen und  $N_{xx}$  entsprechend für deren Anzahl. Genaugenommen müßte zu dem Ausdruck für  $E_{\text{ges}}$  noch ein konstanter Term (nämlich  $N_A \cdot E_A + N_B \cdot E_B$  für den Beitrag der potentiellen Energien der Teilchen) hinzugerechnet werden, da sich aber das Verhältnis von A zu B bei der Durchführung

der hier dargestellten Statistik nicht ändert, hat diese Größe keine Auswirkungen auf die Simulation und wird daher vernachlässigt.

Der Molenbruch der Mischung wird in Gleichung (23) indirekt durch die Zahl  $N_{xx}$  der vorhandenen A-A-, B-B- und A-B-Paare ausgedrückt, diese können jedoch mit Hilfe der folgenden Relationen (24) und (25) für den hier vorhandenen Fall eines hexagonalen Gitters mit periodischen Grenzen in die entsprechenden absoluten Teilchenzahlen  $N_x$  umgerechnet werden [Sugár et al., 1994a]:

$$N_A = \frac{2 \cdot N_{AA} + N_{AB}}{6}, \quad (24)$$

$$N_B = \frac{2 \cdot N_{BB} + N_{AB}}{6}. \quad (25)$$

Gleichung (23) kann somit umgeschrieben werden in:

$$\begin{aligned} E_{\text{ges}} &= \left(3 \cdot N_A - \frac{N_{AB}}{2}\right) \cdot E_{AA} + \left(3 \cdot N_B - \frac{N_{AB}}{2}\right) \cdot E_{BB} + N_{AB} \cdot E_{AB} \\ &= 3 \cdot (N_A \cdot E_{AA} + N_B \cdot E_{BB}) + N_{AB} \cdot \left[ E_{AB} - \left( \frac{E_{AA} + E_{BB}}{2} \right) \right]; \end{aligned} \quad (26)$$

Der in den eckigen Klammern stehende Term wird im folgenden mit  $\omega_{AB}$  bezeichnet und beschreibt die Abweichung der tatsächlichen Wechselwirkungsenergie zwischen A-B-Paaren von dem einfachen theoretischen Durchschnittswert (runde Klammer in der eckigen Klammer), womit er in völliger Analogie zu dem in Gleichung (22) definierten Energiebetrag  $\rho$  steht. Er stellt daher gewissermaßen einen „molekularen“ Nichtidealitätsparameter dar, welcher sowohl positiv als auch negativ sein kann, je nachdem, ob der Kontakt mit gleichartigen (für  $\omega_{AB} > 0$ ) oder ungleichartigen ( $\omega_{AB} < 0$ ) Nachbarn vorgezogen wird. Für  $\omega_{AB} = 0$  sind die Komponenten ideal mischbar, die Teilchen also vollkommen zufällig auf dem Gitter verteilt.

Mit Gleichung (26) wurde zwar ein Ausdruck für die Gesamtenergie des Systems gefunden, wie aber läßt sich damit nun Monte Carlo-Simulation betreiben? Die Lösung ist leicht zu erkennen, wenn man einmal rein anschaulich überlegt, wie sich die Gesamtenergie des

Gitters - unter der Voraussetzung, daß periodische Grenzen vorhanden sind! - ermitteln läßt: Man setzt sich auf das erste Teilchen (welches vom Typ A oder B ist), betrachtet nacheinander alle sechs nächsten Nachbarn und addiert die jeweiligen Wechselwirkungsenergien  $E_{xx}$  auf; anschließend wiederholt man dieselbe Prozedur mit Teilchen zwei usw., bis man alle Gitterpunkte berücksichtigt hat. Die Summe über alle Energien am Ende dieser Prozedur ist dann genau doppelt so hoch wie die gesuchte Gesamtenergie des Systems, da jede Wechselwirkung zweimal (je einmal aus der Sicht eines der beiden beteiligten Teilchen) gezählt wurde. Faßt man diese Überlegung nun in Form einer Rechenvorschrift  $\Omega$  zusammen, so läßt sich sofort die folgende Schlüsselgleichung aufschreiben [Jan et al., 1984]:

$$\Omega = \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 (E_{AA} \cdot \mathbf{d}_{Ai} \cdot \mathbf{d}_{Aj} + E_{BB} \cdot \mathbf{d}_{Bi} \cdot \mathbf{d}_{Bj} + E_{AB} \cdot \mathbf{d}_{Ai} \cdot \mathbf{d}_{Bj} + E_{AB} \cdot \mathbf{d}_{Bi} \cdot \mathbf{d}_{Aj}); \quad (27)$$

$j$  bezeichnet jeweils die nächsten Nachbarn von Teilchen  $i$ , und  $\delta_{xy}$  ist ein weiterer Operator (das *Kronecker-Symbol*), welcher nur entweder den Wert eins (für  $y = x$ ) oder null annehmen kann. Um die Simulation programmtechnisch zu vereinfachen, wird  $\delta$  durch eine Variable  $\sigma$  gemäß der folgenden Rechenvorschriften

$$\mathbf{d}_{Ai} = \left( \frac{1 + \mathbf{s}_i}{2} \right) \text{ und } \mathbf{d}_{Bi} = \left( \frac{1 - \mathbf{s}_i}{2} \right) \quad (28)$$

ersetzt, wobei  $\sigma$  entweder den Wert  $+1$  oder  $-1$  annehmen kann. Durch diese Transformation ergeben sich bei der Erstellung des Quellcodes zahlreiche Vereinfachungen, so läßt sich beispielsweise ein beliebiges Teilchen ohne aufwendige Abfragen durch den Befehl

ZUSTANDNEU = -ZUSTANDALT

in den jeweils anderen Zustand transformieren. Da dieser Vorgang während einer Simulation viele millionenmal wiederholt wird, ist die einfachere Handhabung auch mit einer merklichen Zeitersparnis gekoppelt. Außerdem erhält man dadurch, daß man positive Zahlen für Komponente A und negative Zahlen für Komponente B reserviert, auch die Möglichkeit, pro Komponente unterschiedliche Zustände einzuführen (also  $\sigma = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ ), worauf später noch näher eingegangen wird.



Wenn man Gleichung (28) auf Gleichung (27) anwendet und die Terme ausmultipliziert, erhält man den folgenden Ausdruck für  $\Omega$ :

$$\begin{aligned} \Omega = & \frac{1}{8} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 [E_{AA} + E_{BB} + 2E_{AB}] + \frac{1}{8} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 [(\mathbf{s}_i + \mathbf{s}_j)(E_{AA} - E_{BB})] + \\ & + \frac{1}{8} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 [(\mathbf{s}_i \mathbf{s}_j)(E_{AA} + E_{BB} - 2E_{AB})]. \end{aligned} \quad (29)$$

Der erste Summenausdruck ist unabhängig von  $\sigma$  und wird bei der Berechnung von  $E_{\text{ges}}$  genau  $6N$ -mal (Auflösung der Doppelsumme) berücksichtigt, also

$$\frac{1}{8} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 [E_{AA} + E_{BB} + 2E_{AB}] = \frac{6N}{8} (E_{AA} + E_{BB} + 2E_{AB}) = E_0; \quad (30)$$

für den zweiten – von  $\sigma_i$  und  $\sigma_j$  abhängigen – Term in Gleichung (29) läßt sich nach reiflicher Überlegung eine sehr elegante Vereinfachung finden, wobei man wiederum nicht aus den Augen verlieren darf, daß ein System mit periodischen Grenzen vorliegt. Unter diesen Umständen gilt nämlich die auf den ersten Blick erstaunliche Beziehung

$$\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 (\mathbf{s}_i + \mathbf{s}_j) = 12 \sum_{i=1}^N \mathbf{s}_i; \quad (31)$$

bei rein anschaulicher Betrachtung offenbart sich dann die Plausibilität von (31), denn jedes Teilchen ist sowohl einmal Zentralteilchen (und wird wegen der Summe über alle Nachbarn  $j$  sechsmal gezählt) als auch sechsmal Nachbarteilchen (und wird in sechs Summen je einmal gezählt), so daß es insgesamt genau zwölfmal berücksichtigt wird. Somit läßt sich der zweite Summenausdruck in Gleichung (29) folgendermaßen schreiben:

$$\frac{1}{8} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 [(s_i + s_j)(E_{AA} - E_{BB})] = \frac{12}{8} (E_{AA} - E_{BB}) \sum_{i=1}^N s_i = k \sum_{i=1}^N s_i. \quad (32)$$

Zur Vereinfachung des dritten Ausdruckes in Gleichung (29) zieht man den Faktor  $-1/2$  in die Doppelsumme und erhält dadurch einen Term, welcher bis auf das Vorzeichen mit der Definition des Nichtidealitätsparameters  $\omega_{AB}$  in Gleichung (26) übereinstimmt.

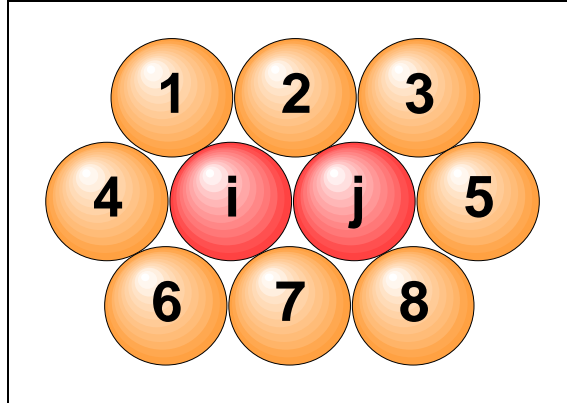
Durch die gesamte Umformung ist somit für  $\Omega$  ein Ausdruck entstanden, der in seiner Struktur dem Energieoperator des in der Einleitung erwähnten *Ising*-Modells in einem externen Feld (hier durch den Faktor  $\kappa$  repräsentiert) entspricht [Jan et al., 1984]:

$$\Omega = E_0 + k \sum_{i=1}^N s_i - \frac{w_{AB}}{4} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 (s_i s_j). \quad (33)$$

Damit man mit dieser Gleichung Monte Carlo-Simulation betreiben kann, benötigt man zur Durchführung der in Kapitel 3.1.3 dargestellten *Metropolis*-Methode noch eine zusätzliche Vorgabe, welche beschreibt, wie sich die Teilchen auf dem Gitter bewegen sollen. Hierzu wird eine von *Kawasaki* [1972] für *Ising*-Systeme abgeleitete Technik verwendet, welche die folgenden Schritte beinhaltet:

- 1) wähle ein Teilchen  $i$  aus;
- 2) wähle zufällig einen der sechs nächsten Nachbarn  $j$  aus;
- 3) vertausche die beiden Teilchen und berechne die Energiedifferenz  $\Delta E$ ;
- 4) verfare weiter nach der *Metropolis*-Methode wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben;

Abbildung 19 zeigt einen Ausschnitt aus einem Gitter mit den beiden zu vertauschenden Teilchen  $i$  und  $j$ :



**Abbildung 19:** Schematischer Ausschnitt aus einem hexagonalen Gitter zur Veranschaulichung der Kawasaki-Methode; Teilchen  $j$  wurde zufällig unter den Nachbarn von  $i$  ausgewählt.

Da bei der Wanderung durch den Phasenraum nur die Energiedifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Gliedern der *Markov*-Kette eine Rolle spielt, ist lediglich der letzte Term in Gleichung (33) von Bedeutung, da sowohl  $E_0$  als auch die Summe über alle  $\sigma_i$  für ein Einphasensystem konstant bleiben. Der für die Simulation relevante Energiebeitrag für den Ausgangszustand  $E_{\text{alt}}$  ergibt sich somit zu

$$E_{\text{alt}} = \frac{-W_{\text{AB}}}{2} \left[ \mathbf{s}_i (\mathbf{s}_j + \mathbf{s}_1 + \mathbf{s}_2 + \mathbf{s}_4 + \mathbf{s}_6 + \mathbf{s}_7) + \mathbf{s}_j (\mathbf{s}_i + \mathbf{s}_2 + \mathbf{s}_3 + \mathbf{s}_5 + \mathbf{s}_7 + \mathbf{s}_8) \right], \quad (34)$$

und der analoge Ausdruck  $E_{\text{neu}}$  für den Fall der Vertauschung von  $i$  und  $j$  liefert entsprechend

$$E_{\text{neu}} = \frac{-W_{\text{AB}}}{2} \left[ \mathbf{s}_j (\mathbf{s}_i + \mathbf{s}_1 + \mathbf{s}_2 + \mathbf{s}_4 + \mathbf{s}_6 + \mathbf{s}_7) + \mathbf{s}_i (\mathbf{s}_j + \mathbf{s}_2 + \mathbf{s}_3 + \mathbf{s}_5 + \mathbf{s}_7 + \mathbf{s}_8) \right]. \quad (35)$$

Der Faktor  $\frac{1}{2}$  vor der Klammer kommt dadurch zustande, daß wegen der Doppelsumme in Gleichung (33) jedes Pärchen  $\sigma_x \sigma_y$  zweimal gezählt werden muß. Ob der neue Zustand akzeptiert wird oder nicht, hängt - wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben - von der Energiedifferenz  $\Delta E$  ab, wobei in der gesamten Arbeit stets

$$\Delta E = E_{\text{neu}} - E_{\text{alt}} \quad (36)$$

gilt. Die Kombination der Gleichungen (34), (35) und (36) liefert dann die im Falle des simplen Modells eines Einphasen-/Zweikomponentensystems für die Monte Carlo-Simulation maßgebliche Beziehung

$$\Delta E = \frac{-w_{AB}}{2} (\mathbf{s}_j - \mathbf{s}_i) \left[ (\mathbf{s}_1 + \mathbf{s}_2 + \mathbf{s}_4 + \mathbf{s}_6 + \mathbf{s}_7) - (\mathbf{s}_2 + \mathbf{s}_3 + \mathbf{s}_5 + \mathbf{s}_7 + \mathbf{s}_8) \right]. \quad (37)$$

#### 4.2.1.1.1 Exemplarische Anwendung und programmtechnische Details

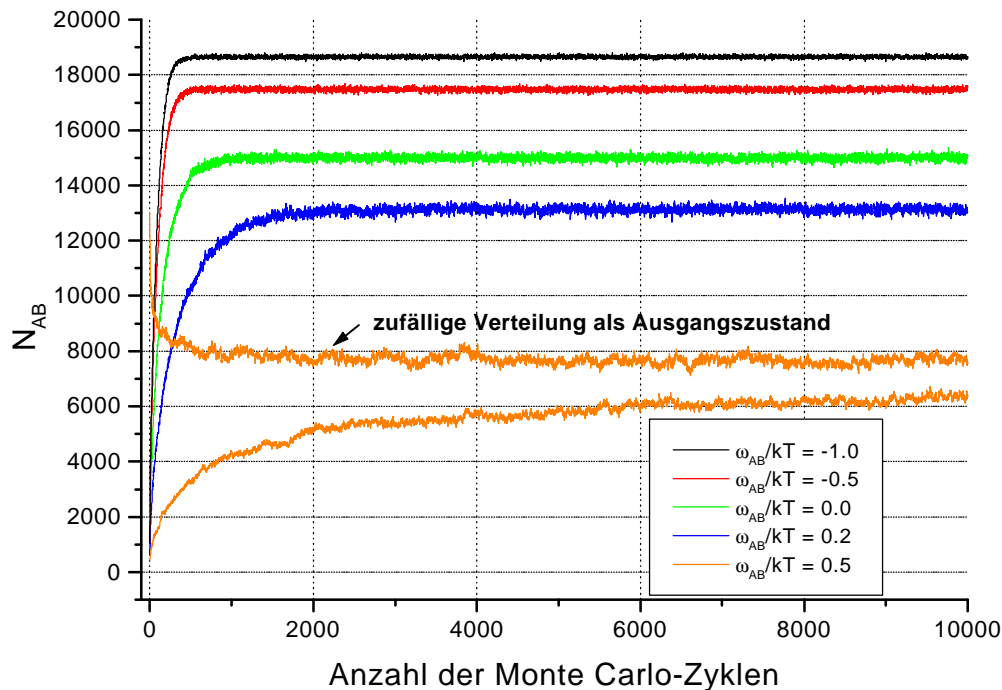
Gleichung (37) ist ein vollkommen allgemein gehaltener mathematischer Ausdruck, der außer einigen grundlegenden Annahmen (eine Phase, zwei Komponenten) keinerlei Informationen über das zu simulierende System enthält. Daher stellt sich nun die entscheidende Frage, auf welche Art und Weise man das theoretische Modell mit experimentellen Fakten „füttern“ kann. Offensichtlich ist dies hier lediglich über die Manipulation von drei Variablen - Molenbruch  $x_i$ , Nichtidealitätsparameter  $\omega_{AB}$  und Temperatur  $T$  - möglich, wobei die Beziehung zwischen  $\omega_{AB}$  und der thermodynamischen Exzeßgröße  $\rho$  ausgenutzt werden kann.

In *Johann et al.* [1996] wurde bereits der Versuch unternommen, mit Hilfe der Theorie der regulären Mischungen einen Weg zu finden, den Parameter  $\rho$  durch Anpassung an kalorimetrisch ermittelte Phasendiagramme pseudobinärer Lipidgemische zu erhalten, und dank der Arbeiten von *Garidel et al.* [1997a, 1997b, 1998], *Garidel und Blume* [1998] sowie eigener, in dieser Arbeit beschriebener Messungen liegen die entsprechenden Daten für eine große Anzahl von Systemen vor. Dies ermöglicht es, anhand einiger ausgewählter Beispiele zu untersuchen, welche Informationen das oben abgeleitete einfache Modell liefert, wenn man das „komprimierte experimentelle Ergebnis“  $\rho$  in die Simulation einbringt.

Da bei gegebenem  $\omega_{AB}$  für  $\Delta E$  nur eine geringe Zahl von unterschiedlichen Ergebnissen möglich ist, werden die entsprechenden Werte der für die *Metropolis*-Methode notwendigen Exponentialfunktionen für alle möglichen  $\sigma$ -Kombinationen bereits vor Beginn der eigentlichen Simulation berechnet und in der geschwindigkeitsbestimmenden Monte Carlo-Schleife je nach  $\sigma$ -Konstellation darauf zurückgegriffen. Pro Monte Carlo-Schritt benötigt man - um eventuelle Korrelationen zu vermeiden - für die Auswahl des Nachbarn  $j$  und für den Fall

$\Delta E > 0$  zwei unterschiedliche Zufallszahlen, welche in Blöcken zu jeweils 128000 generiert und sukzessive „verbraucht“ werden. Dabei beansprucht die in dieser Arbeit verwendete INDIGO-Workstation bei der Ausführung von  $10^8$  Monte Carlo-Schritten ca. 2100 Sekunden CPU-Zeit, ihr Nachfolger OCTANE hingegen begnügt sich mit nur ca. 290 (!) Sekunden.

Zu Beginn der Simulationen muß geklärt werden, wie viele Monte Carlo-Zyklen notwendig sind, um das System von seiner (willkürlich gewählten) Ausgangskonfiguration in den Gleichgewichtszustand zu bringen. Unter Monte Carlo-Zyklus versteht man dabei allgemein eine Anzahl von Monte Carlo-Schritten, die der Zahl der Teilchen auf dem Gitter entspricht [Allen und Tildesley, 1987]. Für ein Ensemble von 10000 Teilchen und  $x = 0.5$  wurde für unterschiedliche Werte von  $\omega_{AB}$  solch eine Untersuchung durchgeführt, wobei als Indikator für das Erreichen des Gleichgewichtszustandes die Zahl der A-B-Paare  $N_{AB}$  verwendet wurde (siehe Abb. 20). Als Startwert diente dabei jeweils eine komplett entmischte Konfiguration mit dem kleinstmöglichen  $N_{AB}$ .

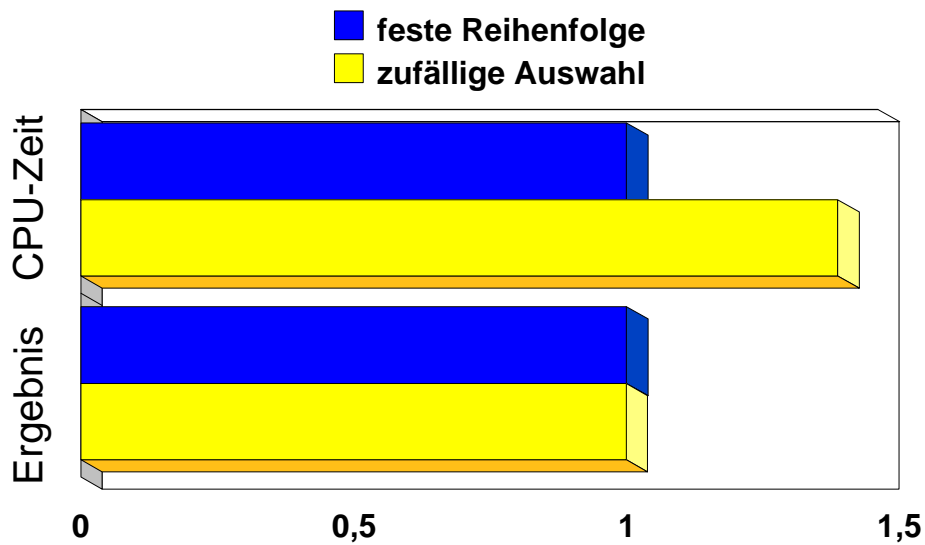


**Abbildung 20:** Gleichgewichtseinstellungen eines Systems aus 10000 Teilchen mit  $x = 0.5$  für verschiedene Werte von  $\omega_{AB}$  (dividiert durch die thermische Energie des Systems); gemessen wurde die Anzahl der A-B-Paare  $N_{AB}$  ausgehend von einem Zustand vollständiger Phasenseparation.

Es läßt sich leicht erkennen, daß die Äquilibration für  $\omega_{AB} \leq 0$  wegen der guten Durchmischung bereits nach etwa 1500 Monte Carlo-Zyklen abgeschlossen ist, während sich das System bei  $\omega_{AB}/kT = 0.5$  selbst nach 10000 Zyklen noch in einem metastabilen Bereich befindet, da die großen Domänen gleichartiger Moleküle offenbar nur sehr zögerlich aufgebrochen werden. Aus diesem Grund wurde - wie in Abb. 20 gezeigt - die letztgenannte Simulation noch einmal wiederholt, allerdings diesmal mit einer „idealen Mischung“ als Startkonfiguration, also vollkommen zufälliger Verteilung der Teilchen. Die entsprechende Kurve scheint auf eine deutlich schnellere Gleichgewichtseinstellung hinzudeuten, welche zudem einen signifikant größeren Wert besitzt als bei dem vorhergehenden Experiment. Allerdings ist diese Aussage äußerst zweifelhaft, da ähnliche Phänomene in der Literatur bekannt sind [Binder und Stauffer, 1984; Jan et al., 1984] und hier auch explizit darauf hingewiesen wird, daß die Ausgangskonfiguration einer Simulation möglichst hoch geordnet sein sollte, um das Entstehen extrem langlebiger metastabiler Zustände zu vermeiden, welche für  $\omega_{AB} > 0$  zu einer dramatischen (und unnötigen) Verlängerung der

Gleichgewichtseinstellung führen können, da es für das Teilchenensemble in dieser Situation bedeutend schwieriger ist, die systemimmanente überschüssige Energie (zu viele AB-Paare!) abzugeben als im umgekehrten Falle (zu wenig AB-Paare) Energie aufzunehmen [Binder und Heermann, 1988]. Daß bei der Äquilibration der zufälligen Ausgangsverteilung ein metastabiler Zustand vorliegt, ist ausgesprochen wahrscheinlich, denn die schnelle Relaxationszeit deutet darauf hin, daß sich gleichartige Teilchen in unmittelbarer Nähe zueinander in relativ kurzer Zeit zu kleinen „Inseln“ zusammenfinden, die aber dann aufgrund des stark positiven  $\omega_{AB}$  keine Möglichkeit mehr haben, aufeinander „zuzuschwimmen“, und  $N_{AB}$  daher deutlich über dem tatsächlichen Gleichgewichtswert liegt. Im Falle des vollständig „nichtidealen“ Ausgangszustandes ist die Equilibrierungszeit zwar sehr lang, allerdings zeigt sich deutlich ein kontinuierlicher Anstieg, wogegen bei der „idealen“ Startkonfiguration über den beobachteten Bereich ab ca. 2000 Monte Carlo-Zyklen keine Änderung mehr zu erkennen ist, was auf ein sehr stabiles Nebenminimum schließen läßt. Ein Beispiel für eine solche „Inselkonfiguration“ findet sich in *Garidel et al.* [1997b] für das System DMPA/DPPC bei pH 4, hier wurde diese Darstellungsweise allerdings absichtlich gewählt, um den Effekt der Phasenseparation in einer biologischen Membran möglichst anschaulich zu gestalten, wohl wissend, daß die abgebildete Struktur nur ein lokales Energieminimum repräsentiert.

Der Frage, ob die zu untersuchenden Teilchen  $i$  in einer festen Reihenfolge ausgesucht werden können [Hastings, 1970; Allen und Tildesley, 1987; Binder und Heermann, 1988; Pütz, 1995] oder ob sie mit Hilfe einer weiteren Zufallszahl ermittelt werden müssen [Heimburg, persönliche Mitteilung], wurde dadurch nachgegangen, daß für den Fall  $\omega_{AB}/kT = -0.5$  je eine Simulation mit bzw. ohne zufällige Auswahl von  $i$  über 10000 Monte Carlo-Zyklen durchgeführt wurde. Nach 4000 Zyklen Äquilibrationszeit wurde nach jedem weiteren Zyklus  $N_{AB}$  ermittelt und hieraus am Ende der statistische Mittelwert berechnet. Gleichzeitig wurde der gesamte Zeitaufwand der beiden Prozeduren aufgezeichnet und die Daten als relative Verhältnisse in Abb. 21 dargestellt:

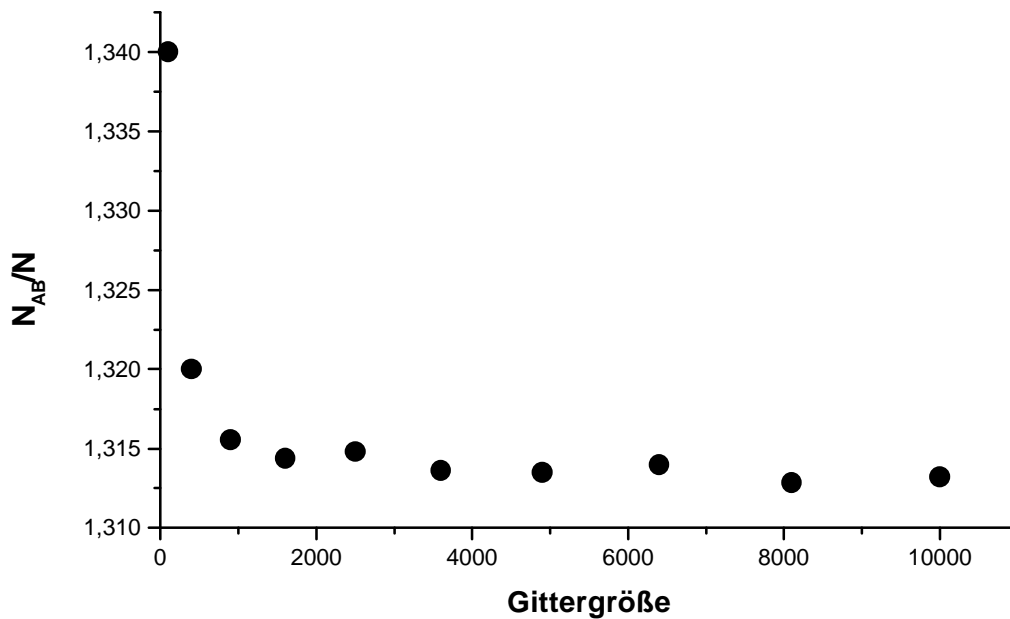


**Abbildung 21:** *Verbrauchte CPU-Zeit und Ergebnis (Zahl der  $N_{AB}$ -Paare) einer Monte Carlo-Simulation mit zufälliger Reihenfolge bei der Auswahl der Teilchen  $i$  im Verhältnis zu einer Simulation mit fester Teilchenwahl; die Messung der Ergebnisse erfolgte jeweils über 6000 Monte Carlo-Zyklen bei gleicher Ausgangssituation und gleichen Parametern.*

Es zeigt sich, daß - zumindest für den Fall der *Kawasaki*-Statistik - die Scharmittelwerte mit und ohne zufällige Ermittlung von  $i$  sehr gut übereinstimmen (das Verhältnis beträgt 0.9994:1), was nebenbei auch für die Güte des Zufallsgenerators spricht, denn mit einem „schlechten“ Zufallsgenerator werden u. U. einige Teilchen nur sehr selten oder niemals untersucht, was zu Verfälschungen des Ergebnisses führen kann. Die hier beobachtete Äquivalenz der beiden Methoden erscheint auch durchaus einsichtig, da es einem ausgewählten Teilchen im Grunde „egal“ sein müßte, auf welche Weise sowohl es selbst als auch seine nächsten Nachbarn ausgewählt werden, solange für die Ermittlung der jeweiligen Konfigurationen die *Metropolis*-Methode verwendet und jedes Teilchen im Schnitt gleich häufig untersucht wird.

Der Einfluß der End-Effekte auf die Simulation läßt sich untersuchen, indem man bei sonst gleicher Ausgangskonfiguration für verschiedene Gittergrößen wieder eine Observable (hier  $N_{AB}$ ) ermittelt und diese durch die jeweilige Gesamtzahl  $N$  der Teilchen dividiert [Huang und Feigensohn, 1993]. Die Ergebnisse für  $\omega_{AB}/kT = 0.2$  sind in Abb. 22 dargestellt:





**Abbildung 22:** *Mittlere Anzahl der A-B-Paare bezogen auf die jeweilige Gesamtteilchenzahl als Funktion der Gittergröße für  $w_{AB}/kT = 0.2$ ; es wurden pro Simulation  $10^5$  Monte Carlo-Zyklen durchgeführt.*

Offenbar wird für  $N < 1600$  die Struktur (trotz periodischer Grenzen) deutlich durch die Systemgröße beeinflusst (der eingangs erwähnte „finite-size“-Effekt!) und zwar dahingehend, daß für das gegebene  $\omega_{AB}$  zu kleine Domänen ausgebildet werden, wodurch  $N_{AB}$  zunimmt. Wenn  $\omega_{AB}$  weiter steigt, wird somit auch die Korrelationslänge zunehmen, was dazu führt, daß immer größere Gitter verwendet werden müssen. Für die hier untersuchten Fälle ist es jedoch ausreichend, mit einem Ensemble von 10000 Teilchen zu arbeiten, wie auch durch nähere mathematische Analyse gezeigt werden konnte [Huang und Feigenson, 1993].

Neben der Untersuchung dieser rein programmtechnischen Details stellt sich außerdem noch die Frage, ob - vom naturwissenschaftlichen Standpunkt aus gesehen - die Simulation von lateralen Domänen eines Lipidgemisches auf der Grundlage des Nichtidealitätsparameters  $\rho$  überhaupt sinnvoll ist. Wie nämlich aus Gleichung (22) hervorgeht, wird bei der Ermittlung von  $\rho$  ja gerade die Exzeßentropie vernachlässigt, also von einem „ideal“ gemischten System mit vollkommen zufälliger Verteilung der Teilchen ausgegangen [Lee, 1978]. Durch diese rein enthalpische Berücksichtigung der Mischungseffekte wird offensichtlich die tatsächliche Zahl der A-B-Paare überschätzt, ebenso wie ein athermischer An-

satz ( $\Delta H^E = 0$ ) die Zahl der A-B-Paare unterschätzen würde [Freire und Snyder, 1980a]. Als Rechtfertigung für die gewählte Vorgehensweise kann man allerdings anführen, daß es sich bei den hier untersuchten Systemen um Gemische von sehr ähnlichen Teilchen handelt [Ipsen und Mouritsen, 1988] und  $\Delta S^E$  daher vermutlich keine so große Rolle spielt, besonders wenn die Lipide lediglich unterschiedliche Kopfgruppen besitzen, da ihr Einfluß nur einen relativ geringen Beitrag zu der Gesamtwechselwirkungsenergie zwischen zwei Molekülen liefert [Boggs, 1987]. Eine experimentelle Ermittlung von  $\rho$  ist zudem nicht praktikabel, so daß ein Näherungsverfahren (mit den damit verbundenen Fehlern) ohnehin unumgänglich ist.

Als Beispiele für Lipidgemische mit unterschiedlich idealem Verhalten werden im folgenden die selbstvermischten und in Kapitel 5 näher analysierten Systeme DMPC/DMPE und DMPC/DPPE mit Hilfe der beschriebenen Monte Carlo-Methode untersucht. Der Parameter  $\rho$  setzt sich aus zwei Komponenten zusammen und wird anhand der Simulation des durch die DSC-Kurven festgelegten Phasendiagramms nach Gleichung (38) errechnet [Johann et al., 1996]:

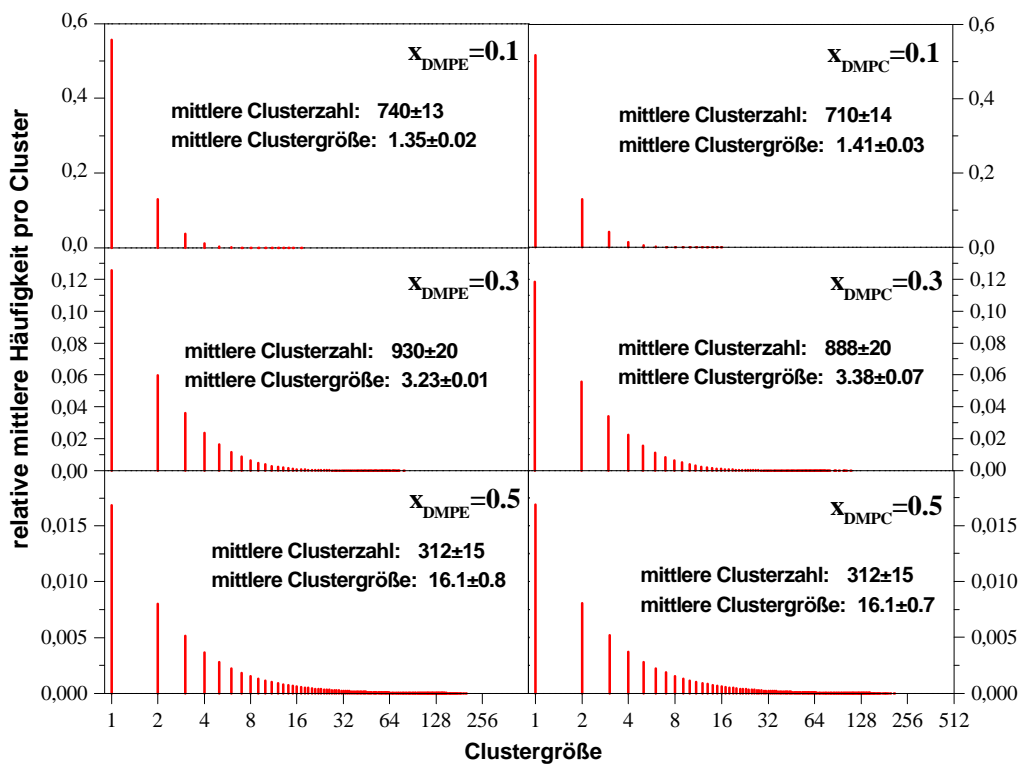
$$\rho = \rho_1 + (2x-1)\rho_2. \quad (38)$$

$\rho_2$  ist hierbei ein zusätzlicher Term, welcher Aussagen über das Verhalten von  $\rho$  in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Mischung macht (Asymmetrieparameter).

Mit den so gewonnenen Informationen wurde das Gemisch DMPC/DMPE bei unterschiedlichen Zusammensetzungen und einer reduzierten Temperatur

$$T_{\text{red}} = \frac{|T - T_m|}{T_m} \quad (39)$$

von 0.2 mittels Monte Carlo untersucht. Für die Analyse wurde ein Unterprogramm nach einem Artikel von *Sugár et al.* [1994b] implementiert, das während der Simulation in regelmäßigen Abständen Anzahl und Größe der vorhandenen Cluster ermittelt und aufzeichnet. Zur exemplarischen Erläuterung der Ergebnisse sind die charakteristischen Beobachtungen in Abb. 23 am Beispiel der Gelphase verdeutlicht:



**Abbildung 23:** mittlere Häufigkeit von Clustern bestimmter Größe in einem DMPC/DMPE-Gemisch als Verhältnis zur Gesamtzahl der Teilchen des entsprechenden Typs; untersucht wurde ein System aus 10000 Molekülen bei  $T_{red} = 0.2$  in der Gelphase; die Simulationsdauer betrug insgesamt  $2 \cdot 10^8$  Schritte bei einer Äquilibrierungszeit von  $1 \cdot 10^8$  Schritten; die statistischen Daten ergeben sich durch Mittelung über 10000 Einzelaufnahmen;  $r$  wurde gemäß Gleichung (38) mit Hilfe der folgenden Werte errechnet (siehe hierzu Kapitel 5)  $r_1 = -13$  J/mol,  $r_2 = 128$  J/mol und  $x = x_{DMPE}$ ; Zeitaufwand pro Gemisch: OCTANE: 780 s, INDIGO: 5620 s, ORIGIN: 420 s.

Das Diagramm spiegelt unverkennbar die gute Mischbarkeit von DMPC und DMPE wider, da eine sukzessive Zugabe von einer der beiden Komponenten bei geringen Konzentrationen in erster Linie zu einer Erhöhung der Clusterzahl bei relativ geringer durchschnittlicher Größe führt. Außerdem nimmt bei sämtlichen Gemischen die relative mittlere Häufigkeit mit der Domänengröße kontinuierlich ab, es wird also offensichtlich keine Paarbildung gleicher Teilchen signifikant bevorzugt. Mit zunehmender Konzentration steigt auch die mittlere Clustergröße immer stärker an, während sich gleichzeitig die Clusterzahl verringert; es tritt also offensichtlich eine Fusion ein, wobei jedoch aus Abb. 23 nicht erkennbar ist, ob es sich hierbei um eine durch nichtideales Verhalten bedingte Aggregation handelt oder ob die Clustergröße zwangsläufig durch die Konzentrationserhöhung zunimmt.

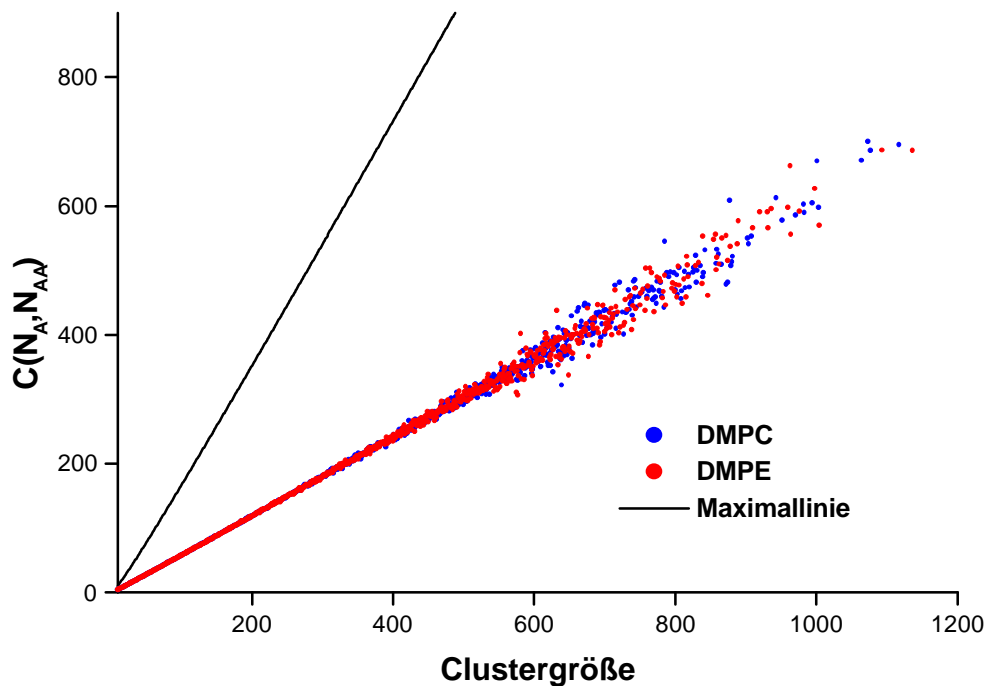
Da man aber bei Computersimulationen in der vorteilhaften Lage ist, jedes kleinste Detail eines „Experimentes“ untersuchen zu können, kann als Gradmesser für die Kompaktheit einer Domäne die sogenannte „Zyklomatische Zahl“  $C$  für jeden untersuchten Cluster ermittelt werden [Freire und Snyder, 1980b]:

$$C = N_{AA} - N_A + 1. \quad (40)$$

$C$  besitzt den Wert Null für eine langgezogene Teilchenkette und nimmt mit steigender Vernetzung entsprechend zu. Die maximale Zyklomatische Zahl  $C_{\max}$  läßt sich näherungsweise für  $N_A > 6$  durch Formel (41) bestimmen:

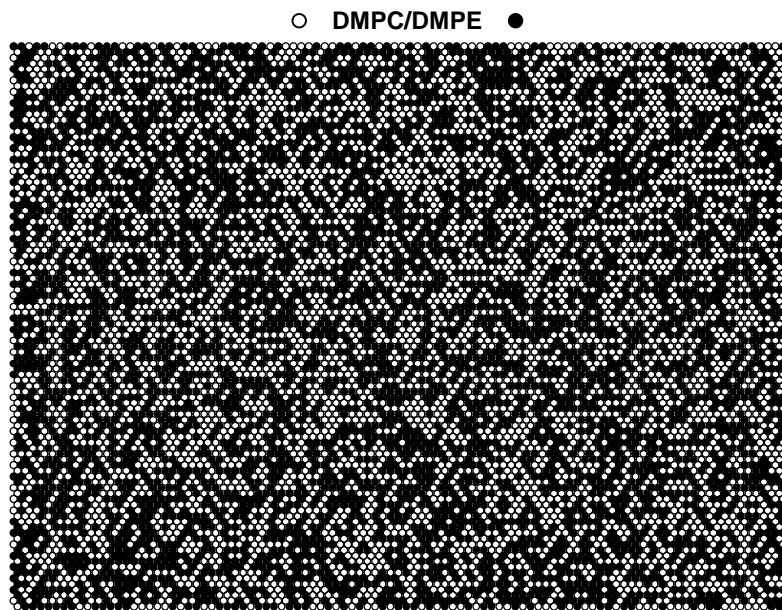
$$C_{\max} = 2(N_A - 1) - 3 \left[ \sqrt{1 + \frac{4}{3}(N_A - 1)} - 1 \right]; \quad (41)$$

die folgende Abbildung zeigt die entsprechenden Werte für das äquimolare DMPC/DMPE-Gemisch:



**Abbildung 24:** mittlere Zyklomatische Zahl  $C$  aus 10000 Stichproben als Funktion der Clustergröße für das äquimolare Gemisch DMPC/DMPE in der Gelphase bei  $T_{red} = 0.2$  (301 K).

Die Kompaktheit der entstehenden Domänen nimmt für beide Komponenten annähernd linear mit der Clustergröße und einer Steigung von etwa 0.61 zu, während  $C_{max}$  eine Geradensteigung von 1.9 besitzt und damit deutlich schneller wächst, so daß man davon ausgehen kann, daß die starke Erhöhung der mittleren Domänengröße bei  $x = 0.5$  durch einen überwiegend konzentrationsbedingten Fusionierungseffekt bewirkt wird. Eine testweise als vollkommen zufällig angenommene Verteilung der Teilchen auf dem Gitter erzeugt ein Clusterspektrum, welches ebenfalls durch eine Regressionsgerade mit der Steigung 0.61 beschrieben werden kann und somit die Folgerung nahelegt, daß sich das äquimolare Gemisch näherungsweise ideal verhält, was angesichts des niedrigen  $\rho_1$ -Wertes auch nicht verwunderlich ist. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 25 eine typische Mikrokonfiguration des untersuchten Ensembles dargestellt:



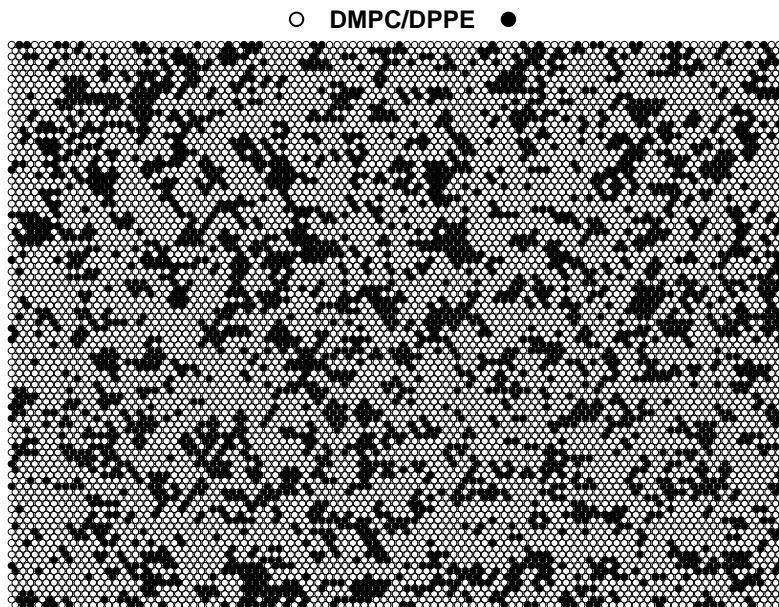
**Abbildung 25:** Mikrokonfiguration von 10000 Molekülen aus der Simulation eines äquimolaren DMPC/DMPE-Gemisches ( $r = -13\text{J/mol}$ ) bei  $T_{red} = 0.2$  in der Gelphase nach  $2 \cdot 10^8$  Monte Carlo-Schritten.

Außer der idealen Mischbarkeit bei  $x = 0.5$  läßt sich durch die Clusteranalyse noch ein weiterer - wenn auch geringer - Effekt beobachten: Wie nämlich aus Abb. 23 hervorgeht, macht es offensichtlich einen Unterschied, ob man wenig DMPE in einer großen Menge DMPC vorliegen hat oder umgekehrt, und das, obwohl es für die Moleküle in einem 1:1-Gemisch so gut wie keine Rolle spielt, welche nächsten Nachbarn sie gerade umgeben. Der Auslöser für dieses asymmetrische Verhalten ist offenbar der Parameter  $\rho_2$  aus Gleichung (38); er bewirkt, daß wenige Teilchen DMPC, die zu einer großen Menge DMPE hinzukommen, anscheinend eher dazu neigen, sich mit gleichartigen Nachbarn zu umgeben als im umgekehrten Fall.

Wie läßt sich nun dieses Phänomen verstehen? Da sich die beiden Moleküle lediglich in ihrer Kopfgruppe unterscheiden, liegt die Erklärung vermutlich in der Fähigkeit von PE, Wasserstoffbrücken auszubilden [z. B. Cevc, 1988]. Während ein DMPE-Molekül jedoch mit der Phosphatgruppe von sowohl DMPE als auch DMPC eine solche Wechselwirkung eingehen kann, ist es für eine geringe Menge von DMPC möglicherweise schwieriger, das bereits existierende komplexe Netzwerk von PE-Molekülen zu durchdringen, woraus eine verhältnismäßig stärkere Domänenbildung resultiert. Mit zunehmender Menge von PC wird

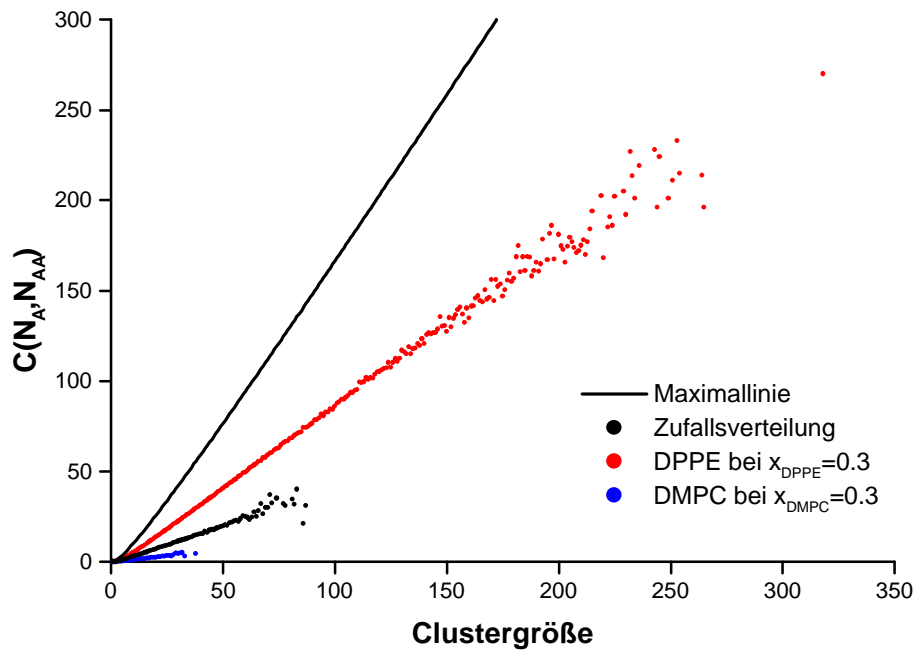
dieses Netzwerk allerdings aufgebrochen und eine immer bessere gegenseitige Durchmischung erreicht, bis sich dann bei  $x = 0.5$  das System annähernd ideal verhält.

Eine Erhöhung der Kettenlänge bei der PE-Komponente – wie in dem System DMPC/DPPE – hat hingegen einen viel entscheidenderen gegenläufigen Einfluß und führt dazu, daß bei niedrigen Konzentrationen von PC deutliche Entmischungserscheinungen auftreten, wie für  $T_{red} = 0.2$  und  $x_{DPPE} = 0.3$  aus Abb. 26 ersichtlich wird.



**Abbildung 26:** Mikrokonfiguration von 10000 Molekülen aus der Simulation eines DMPC/DPPE-Gemisches ( $\rho = 902$  J/mol) mit  $x_{DPPE} = 0.3$  bei  $T_{red} = 0.2$  in der Gelphase nach  $2 \cdot 10^8$  Monte Carlo-Schritten.

Ein Vergleich der Kompaktheit der gebildeten Domänen bei  $x_{DPPE} = 0.3$  (mit  $\rho = 902$  J/mol) und  $x_{DMPC} = 0.3$  (mit  $\rho = -1470$  J/mol) zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede (Abb. 27): So liegt die durchschnittliche Zyklomatische Zahl für PE-Cluster klar über der für  $x = 0.3$  ermittelten Zufallskonfiguration, und es werden auch weit größere Domänen gebildet, als dies für  $\rho = 0$  zu beobachten ist. Für den Fall  $x_{DMPC} = 0.3$  tritt wegen des stark negativen  $\rho$ -Wertes eine Tendenz zur Bildung von ungleichen Nachbarn auf, was sich durch geringe Domänengrößen und niedrige Zyklomatische Werte bemerkbar macht.



**Abbildung 27:** mittlere Zyklomatische Zahl  $C$  aus 10000 Stichproben als Funktion der Clustergröße für das Gemisch DMPC/DPPE bei  $x_{DMPC} = 0.3$  bzw.  $x_{DPPE} = 0.3$  in der Gelphase bei  $T_{red} = 0.2$ .

#### 4.2.1.1.2 Fazit

Unter Verwendung eines experimentell ermittelten Nichtidealitätsparameters kann man mit Hilfe der *Kawasaki*-Methode bei vorgegebenem Molenbruch und vorgegebener Temperatur interessante Einblicke bzgl. der lateralen Domänenbildung in Lipidmembranen gewinnen. Faszinierend ist dabei vor allem, daß sich die in einer einzigen Zahl  $\rho$  komprimierte „makroskopisch gemessene“ Information durch die Monte Carlo-Simulation in eine Vielzahl von mikroskopischen Aussagen über Clustergröße, -häufigkeit und -kompaktheit auffächern läßt und damit experimentell nur sehr schwer zugängliche Bereiche sichtbar gemacht werden können. Geht man von einem Flächenbedarf von ca.  $49 \text{ \AA}^2$  pro Molekül in der Gelphase aus [Nagle und Wiener, 1988], so würden sich beispielsweise für die in Abb. 26 dargestellte Konfiguration Domänen mit einer mittleren Länge von etwa  $40 \text{ \AA}$  ergeben, welche sich in praxi nur mit größerem technischen Aufwand - wie etwa AFM [Pedersen et al., 1996] oder FTIR-Spektroskopie [Mendelsohn et al., 1995] - beobachten lassen. Von besonderem Reiz wäre in diesem Zusammenhang die umgekehrte Variante, bei der man aus experimentell ermittelten durchschnittlichen Clustergrößen durch die Simulation Rückschlüsse auf den Nichtidealitätsparameter und damit auf das Phasendiagramm des Gemisches erhalten könnte.



Aus der absoluten  $\rho$ -Abhängigkeit der durchgeführten Statistik ergibt sich auch der größte Nachteil des verwendeten Modells, denn die gesamte Güte der Simulation steht und fällt mit der Qualität des Nichtidealitätsparameters. So liefert die Berechnung der  $\rho$ -Werte nach *Johann et al.* [1996] für das System DMPC/DMPE ein Ergebnis, welches signifikant von demjenigen von *Lee* [1978] abweicht (siehe auch Kapitel 5), weil unterschiedliche theoretische Methoden bei ähnlichen experimentellen Ergebnissen verwendet wurden.

Als weitere Unzulänglichkeit kann angeführt werden, daß die Beschreibung einer Lipidmembran mit Hilfe eines einfachen *Ising*-Modells viel zu grob ist, um halbwegs exakte Informationen aus einer Simulation zu liefern. Hier kann man allerdings so argumentieren, daß Membranfluktuationen kollektive Phänomene sind, die sich durch die Eigenschaften eines einzelnen Moleküles weder vorhersagen noch erklären lassen [Mouritsen und Kinnunen, 1996], so daß die Anwendung des *Ising*-Modells, welches sich bekanntermaßen ausgezeichnet zur Beschreibung kooperativer Effekte eignet [z. B. Brush, 1967], zwar massive Vereinfachungen impliziert, aber möglicherweise die entscheidenden kollektiven Eigenschaften der Teilchen doch besser als erwartet wiedergibt. Diesem Gedankengang scheinen auch die Arbeitsgruppen zu folgen, welche ebenfalls ein einfaches *Kawasaki*-Modell für ihre Zwecke verwendet haben [z. B. Jan et al., 1984; Huang et al., 1993; Huang und Feigenson, 1993; Hinderliter et al., 1994; Sugár et al., 1994a].

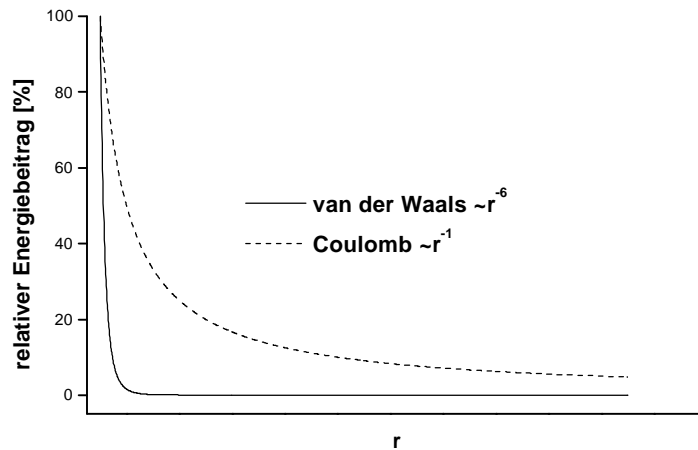
Abschließend sei hier noch angemerkt, daß der Parameter „Zeit“ von Simulation und Realität nicht direkt übereinstimmt, da in einem Monte Carlo-Schritt als der kleinsten Zeitspanne des simulierten Systems lediglich zwei Teilchen involviert und alle anderen „eingefroren“ sind, während sich in Wirklichkeit natürlich sämtliche Moleküle gleichzeitig bewegen. Eine Korrelation ist aber prinzipiell dennoch möglich, wenn man beispielsweise einen experimentellen Zeitwert vorgibt, nach dem ein Teilchen frühestens seinen Zustand wieder ändern kann (also eine Art „Totzeit“ –), und diesen dann mit einem Monte Carlo-Zyklus – in welchem jedes Molekül genau einmal untersucht wurde – in Verbindung bringt [Pink et al., 1982].

#### 4.2.1.2 Erweiterung des Modells unter Berücksichtigung der Elektrostatik

Besitzt eine der beiden Lipidkomponenten eine Partialladung (wie etwa PGs bei pH 7), so kann man den Versuch unternehmen, die damit einhergehenden repulsiven Wechselwirkungen in das Modell miteinzubeziehen. Während jedoch die *van der Waals*-Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten bei zunehmendem Kettenabstand mit der fünften und zwischen Einzelatomen gar mit der sechsten Potenz abnehmen [Israelachvili, 1992] und für die Simulation somit lediglich eine energetische Betrachtung der nächsten Nachbarn erforderlich ist, verhalten sich die *Coulomb*-Kräfte bedeutend langreichweitiger [Torrice und Valleau, 1980]. In einem kanonischen Ensemble von  $N$  Teilchen, bei denen eine eventuell vorhandene Partialladung jeweils im Zentrum angeordnet ist, besitzt ein Teilchen  $i$  eine potentielle elektrostatische Energie  $\Psi$ , welche sich wie folgt berechnen läßt:

$$\Psi_i = \frac{q_i}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \sum_{j=1}^{N-1} \frac{q_j}{r_{ij}}; \quad (42)$$

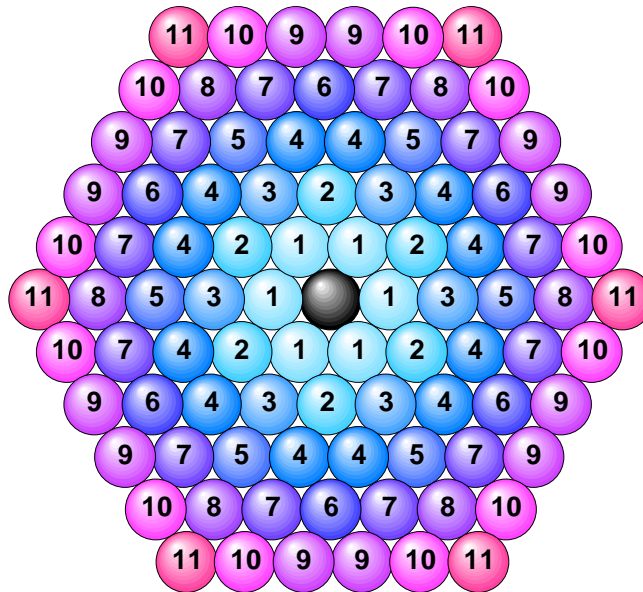
$q$  ist dabei die Partialladung des jeweiligen Teilchens,  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante und  $\epsilon$  die Dielektrizitätszahl.  $r_{ij}$  beschreibt die Entfernung zwischen dem Zentrum des Nachbarn  $j$  und dem Zentrum von  $i$ . Die Summe läuft wegen des asymptotischen Verhaltens von  $1/r$  strenggenommen über das gesamte Gitter. In Abb. 28 sind die unterschiedlichen Abstandsabhängigkeiten von *Coulomb*- und *van der Waals*-Wechselwirkungen zur Verdeutlichung graphisch dargestellt.



**Abbildung 28:** Qualitative Darstellung der van der Waals- bzw. Coulomb-Energie zwischen zwei einzelnen Atomen relativ zu dem jeweiligen Maximalwert als Funktion des Teilchenabstandes  $r$ .

Wie man erkennt, ist es für die Implementierung der Ladungseffekte in das Simulationsmodell durchaus vonnöten, bei jedem Monte Carlo-Schritt weit mehr als nur die ersten sechs benachbarten Teilchen zu berücksichtigen, um wirklich alle signifikanten Energiebeiträge miteinzubeziehen. Aus diesem Grunde existieren auch zahlreiche mathematische Methoden, um mit dem Problem der langreichweitigen Wechselwirkungen umzugehen [Allen und Tildesley, 1987]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch vereinfachend davon ausgegangen, daß ab einem Radius von fünf Moleküldurchmessern – das entspricht 90 untersuchten Nachbarn – keine entscheidenden Einflüsse mehr zu erwarten sind [Huang et al., 1993; Pink et al., 1998], weshalb weiter entfernte Teilchen bei der Ladungssimulation ignoriert wurden.

Um nun die jeweiligen *Coulomb*-Wechselwirkungen berechnen zu können, müssen - wenn man  $q$  als anpaßbaren Parameter verwendet - sowohl die Abstände  $r_{ij}$  als auch die Dielektrizitätszahl bekannt sein. Für die Simulation definiert man daher für den Flächenbedarf der Kopfgruppen einen Kreis mit dem Durchmesser  $d$  und setzt die Ladung in das Zentrum desselben. Die 90 untersuchten nächsten Nachbarn des ausgewählten Teilchens  $i$  kann man dann bei einem hexagonalen Gitter ohne Fehlstellen in elf Sphären mit unterschiedlichem Abstand zum Zentralmolekül unterteilen, wie in Abb. 29 gezeigt ist:



**Abbildung 29:** Einteilung der 90 nächsten Nachbarn in elf Sphären mit unterschiedlichem Abstand zum Zentralteilchen  $i$ ; der Radius eines Teilchens beträgt  $d/2$ .

Mit Hilfe des Kosinussatzes und einfacher Trigonometrie lassen sich daraus die Entfernungen der einzelnen Sphären zum Zentralteilchen als Funktion von  $d$  angeben (Tab. 1).

Sphäre	Abstand zum Zentralteilchen	Anzahl der Teilchen pro Sphäre
1	d	6
2	$d\sqrt{3}$	6
3	2d	6
4	$d\sqrt{7}$	12
5	3d	6
6	$2d\sqrt{3}$	6
7	$d\sqrt{13}$	12
8	4d	6
9	$d\sqrt{19}$	12
10	$d\sqrt{21}$	12
11	5d	6

**Tabelle 1:** Abstände der Ladungszentren der 90 nächsten Nachbarn zum Zentrum des Zentralteilchens  $i$ ; es treten elf unterschiedliche Entfernungen auf.

Um einen Absolutwert für den Durchmesser zu erhalten, wird von der Annahme ausgegangen, daß der - als kreisförmig angenommene - Flächenbedarf eines Teilchens in der flüssig-kristallinen Phase  $62 \text{ \AA}^2$  beträgt [Huang et al., 1993], was für  $d$  einen Wert von ca.  $8.9 \text{ \AA}$  ergibt. Hierbei bleiben die Größenunterschiede zwischen den in der Mischung vorhandenen Komponenten (beispielsweise PC und PG) allerdings unberücksichtigt, da andernfalls die festen Beziehungen in Tab. 1 Ihre Gültigkeit verlören und für jede Mikrokonfiguration neu ermittelt werden müßten, was die benötigte Rechenzeit noch zusätzlich bedeutend verlängern würde.

Die Dielektrizitätszahl  $\epsilon$  für den Kopfgruppenbereich einer Membranschicht liegt in ihrem Betrag zwischen dem Wert des Kettenbereichs ( $\epsilon \approx 2-5$ ) und dem der umgebenden Wasserphase ( $\epsilon \approx 80$ ) [Duniec und Thorne, 1981] und variiert mit Temperatur, Membranzusammensetzung und der Elektrolytkonzentration [Cevc, 1990]. Da eine geladene PG-Membran in 0.1 M CsCl-Lösung im Kopfgruppenbereich eine Dielektrizitätszahl von etwa 30 besitzt [Cevc und Marsh, 1983] und im folgenden PC/PG-Gemische - vermessen in 0.1 M NaCl-Lösung - mittels Monte Carlo untersucht werden, liegt es nahe, diesen Wert für  $\epsilon$  in den Simulationen zu verwenden. Die Dielektrizitätskonstante im hydrophoben Bereich der Doppelschicht ist, wie oben erwähnt, etwa um den Faktor 15 kleiner, und daher fallen die *Coulomb*-Wechselwirkungen in transversaler Richtung gemäß Gleichung (42) entsprechend stärker aus, so daß im Hinterkopf behalten werden muß, daß sich in der Realität möglicher-

weise auch die Kopfgruppen der zusammengehörigen Monoschichten gegenseitig beeinflussen, was im folgenden jedoch mangels genauer experimenteller Erkenntnisse vernachlässigt wird, zumal auch die transversale Kopplung der Kettensegmente laut jüngster NMR-Messungen sehr schwach zu sein scheint [Hetzer et al., 1998].

Der Wechselwirkung der in der wässrigen Phase befindlichen Gegenionen mit den geladenen Lipidmolekülen wird dadurch Rechnung getragen, daß  $q$  als anpaßbare Größe verwendet wird (für den Fall eines PG-Moleküls gilt  $0 \leq q \leq 1$ ) und somit nur den Teil der Partialladung widerspiegelt, welcher effektiv zur Abstoßung beiträgt. Hierbei geht man näherungsweise davon aus, daß sich das Gegenionenpotential über die gesamte simulierte Lipid-Wasser-Grenzfläche konstant verhält und somit keinen weiteren Einfluß auf die laterale Diffusion der Teilchen nimmt [Huang et al., 1993], während der entsprechende Beitrag zur Gesamtenergie des Systems mit Hilfe der *Gouy-Chapman*-Theorie berechnet werden kann [z. B. Lee, 1977a].

Als Auswahlkriterium für die Durchführung der *Kawasaki*-Statistik wird zusätzlich zu dem Term  $\Delta E$  aus Gleichung (37) eine Größe  $\Delta\Psi$  addiert, für die - im Falle der Vertauschung eines Teilchens  $i$  mit einem seiner Nachbarn (dem Teilchen  $j$ ) - gilt:

$$\Delta\Psi = \Psi_{\text{neu}} - \Psi_{\text{alt}} = (\Psi_{\text{neu}}^i + \Psi_{\text{neu}}^j) - (\Psi_{\text{alt}}^i + \Psi_{\text{alt}}^j); \quad (43)$$

Eine Abschätzung der Größenordnung von  $\Delta\Psi$  läßt sich durchführen, wenn man den Wert für das Produkt der konstanten Faktoren aus Gleichung (42) im voraus berechnet und durch die thermische Energie dividiert. Man erhält

$$\left( \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 d} \right) \frac{1}{kT} \approx \frac{630}{T}. \quad (44)$$

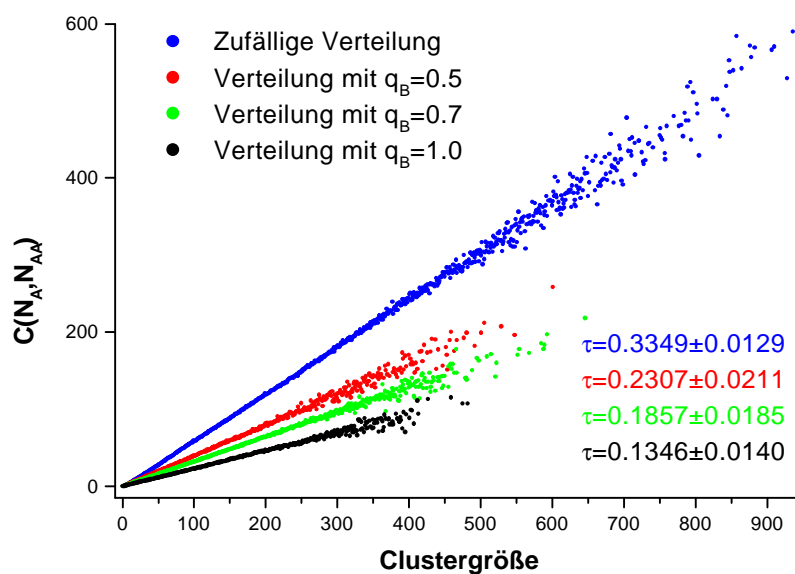
#### 4.2.1.2.1 Exemplarische Anwendung

Um die Auswirkungen der in das Modell implementierten Ladungseffekte zu testen, wurde für  $x = 0.5$  und  $T = 300\text{K}$  ein Gemisch mit unterschiedlichen Partialladungen der Komponente B untersucht. Bei der Strukturanalyse von Domänen mit mehr als sechs Teilchen ist es dabei hilfreich, die mittlere Zyklomatische Zahl  $C$  jeder Clustergröße durch den entsprechenden Maximalwert zu dividieren [Freire und Snyder, 1980b], da man auf diese

Weise einen unabhängigen Ausdruck für die Kompaktheit - im weiteren mit  $\tau$  bezeichnet - erhält, mit dem man auch Domänen unterschiedlicher Größen vergleichen kann:

$$t = \frac{C}{C_{\max}}. \quad (45)$$

Die Auswirkungen der Ladungseffekte auf die Domänenstruktur sind in Abb. 30 wiedergegeben:



**Abbildung 30:** mittlere Zyklomatische Zahl  $C$  aus 10000 Stichproben als Funktion der Clustergröße von Komponente  $B$  für ein äquimolares Gemisch mit  $q_A = 0$  und zunehmender Ladung  $q_B$ ; für jeden Monte Carlo-Schritt wurden die 90 nächsten Nachbarn berücksichtigt; Zeitverbrauch pro Simulation: OCTANE: 7760 s, INDIGO: 55880 s.

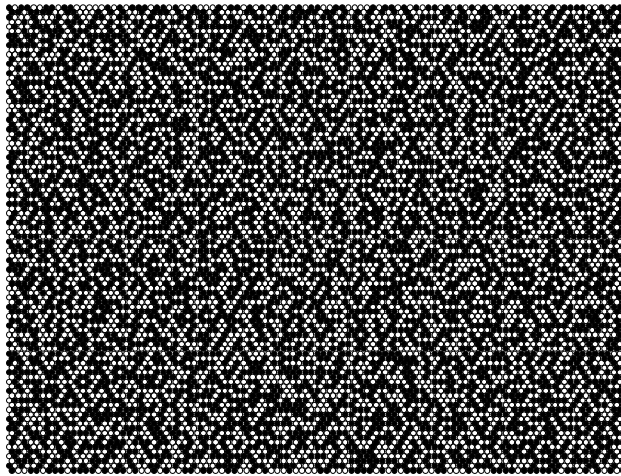
Erwartungsgemäß nimmt die maximale Clustergröße mit zunehmendem  $q$  ab, und auch die Kompaktheit  $\tau$  der einzelnen Domänen sinkt mit steigender Partiaalladung der beobachteten Teilchen. Ein Cluster hat also eine deutlich größere Oberfläche als in einem entsprechenden ungeladenen System mit derselben Teilchenzahl. Da sich  $\tau$  in dem untersuchten Bereich aber annähernd linear zu  $q$  verhält, scheint die maximale Zahl der  $N_{AB}$ -Paare – gewissermaßen ein „hexagonales Schachbrett“ – noch lange nicht erreicht zu sein, so daß die

Aggregation von mehreren geladenen Teilchen trotz „widriger Umstände“ durchaus keine Seltenheit darstellt.

Diese scheinbar triviale Erkenntnis beinhaltet jedoch eine möglicherweise für die biologische Realität recht interessante Information, da bereits seit längerem bekannt ist, daß z. B. PG-Domänen für die Funktionsfähigkeit bzw. den Transport von integralen Membranproteinen essentiell sind [Cevc, 1990]. Die Tatsache, daß sich geladene Domänen auch in pseudobinären Modellmembranen – trotz elektrostatischer Abstoßung – bilden, wurde durch indirekte experimentelle Bestimmung von Aktivitätskoeffizienten und anschließender Monte Carlo-Simulation für PC/PS-Gemische [Huang et al., 1993] sowie durch DSC-Messungen und nachfolgende Simulation der Phasendiagramme für PC/PG-Gemische [Garidel et al., 1997] bestätigt. Als Begründung für dieses Phänomen wurde jeweils ein subtiles Wechselspiel zwischen *Coulomb*-Abstoßung und attraktiven Wechselwirkungen wie beispielsweise Wasserstoffbrücken angeführt, was durchaus zutreffend sein mag. Allerdings drängt sich bei der Analyse von Abb. 30 – einem simplen Modell mit ausschließlich repulsiven Kräften – eine weitere Erklärung auf, nämlich der Einfluß eines rein statistischen Effektes, welcher offensichtlich bewirkt, daß selbst in einem System, in dem sich die Teilchen mit  $q = 1$  abstoßen, dennoch eine signifikante Zahl von Domänen und eben keine Schachbrettstruktur (mit  $\tau = 0$ ) vorliegt. Diese Tatsache beruht sowohl auf dem Einfluß der thermischen Energie, mit welcher Potentialbarrieren überwunden werden können, als auch auf der Langreichweitigkeit der Wechselwirkungen, durch die es für ein Teilchen keinen so großen Unterschied macht, ob jetzt der nächste oder der übernächste Nachbar ebenfalls geladen ist, was die Entstehung einer Domäne im Vergleich zu einem entsprechend negativen kurzreichweitigen  $\omega_{AB}$  begünstigt. Für den Fall  $x = 0.5$  und  $q_B = 1$  bei  $T = 300$  K ist zur Veranschaulichung in Abb. 31 eine typische Mikrokonfiguration exemplarisch dargestellt.



- geladene Komponente



**Abbildung 31:** Mikrokonfiguration von 10000 Molekülen aus der Simulation eines äquimolaren A/B-Gemisches mit  $q_B = 0.5$  und  $w_{AB} = 0.0$  bei 300 K;

Ein weiterer interessanter Sachverhalt, welcher sich mit dem hier verwendeten einfachen Ladungsmodell untersuchen läßt, ist die Frage nach der Asymmetrie des Mischungsverhaltens, also ob es bzgl. der Domänenstruktur einen Unterschied macht, wenn sich wenig geladene Teilchen in einem ungeladenen System befinden oder umgekehrt. Hierzu wurden Simulationen mit  $x_B = 0.1$  und  $x_B = 0.9$  durchgeführt – wobei die Teilchen vom Typ A neutral und vom Typ B mit unterschiedlichen Partialladungen (0.5 bzw. 1.0) versehen waren – und die Domänenstruktur der jeweils weniger vorhandenen Komponente analysiert. Dabei kristallisiert sich heraus, daß im Falle einer geladenen Minorität die mittlere Clustergröße reproduzierbar stets geringfügig – aber dennoch signifikant – niedriger ausfällt, als dies für  $x_A = 0.1$  zu beobachten ist. Dieser Effekt wurde auch von *Huang und Feigenson* [1993] bei der Monte Carlo-Simulation von PC/PS-Gemischen festgestellt und hat seine Ursache in der Langreichweitigkeit der elektrostatischen Wechselwirkungen. Da es aus diesem Grunde bei einer hohen Ladungsdichte des Systems energetisch gesehen keine so große Rolle spielt, ob der nächste oder der übernächste Nachbar eine Partialladung trägt, hat eine ungeladene Minorität in einem geladenen Medium eher die Möglichkeit zur Domänenbildung, als dies für wenige geladene Teilchen in einem System mit sehr geringer Ladungsdichte zutrifft.

Transferiert man dieses Ergebnis auf PC/PG-Gemische gleicher Kettenlänge bei pH 7, so sollte man vom rein elektrostatischen Gesichtspunkt aus einen leicht positiven Asymmetrie-

parameter  $\rho_2$  erwarten, wenn in Gleichung (38)  $x = x_{PG}$  gilt. Nach *Garidel et al.* [1997] ist dies jedoch nicht der Fall, allerdings sind die angepaßten  $\rho_2$ -Werte recht niedrig, so daß die fehlende Übereinstimmung entweder aus dem Einfluß zusätzlicher Effekte wie z. B. Wasserstoffbrücken oder aus dem Spielraum bei der Anpassung der Parameter resultieren kann. Die Betrachtung der Werte von  $\rho = \rho_1 + (2x-1)\rho_2$  legt allerdings die Vermutung nahe, daß elektrostatische Effekte eher eine untergeordnete Rolle bzgl. des Mischungsverhaltens von PC/PG-Systemen spielen [Garidel et al., 1997], was wohl auch damit zusammenhängt, daß die negative Partialladung der PG-Moleküle durch die in der wässrigen Phase vorhandenen Gegenionen mehr oder weniger stark abgeschirmt wird.

Um ein Gefühl dafür zu bekommen, welchen Wert der effektive Abstoßungsterm  $q \cdot e$  ungefähr besitzt, wurde für das in 0.1M NaCl-Lösung bei pH 7 vermessene äquimolare Gemisch DMPC/DMPG aus *Garidel et al.* [1997] für  $T = 300$  K eine Simulation nach Kapitel 4.2.1.1.1 ohne Berücksichtigung elektrostatischer Effekte durchgeführt und die mittlere Zahl der A-B-Paare aufgezeichnet. Anschließend wurde in einem weiteren Durchgang  $\omega_{AB} = 0$  gesetzt und  $q$  so lange sukzessiv verändert, bis der gemessene  $N_{AB}$ -Wert mit der ladungsfreien Konfiguration identisch war. Es zeigt sich hierbei, daß bei der gegebenen Temperatur  $q \approx 0.7$  gilt, was einer Flächenladungsdichte von etwa  $0.09 \text{ C/m}^2$  entspricht. Obwohl dieser Wert durchaus realistisch ist [Torrìe und Valleau, 1980], kann er nur als grober Anhaltspunkt gesehen werden, denn wäre der Ladungseinfluß in dem untersuchten Gemisch wirklich der dominierende Faktor, so müßte die Zahl der A-B-Paare in der Gelphase wegen des kleineren Flächenbedarfs der Kopfgruppen eigentlich ansteigen; allerdings verhalten sich die gemessenen Werte gerade umgekehrt ( $\rho_{\text{Gel}} = -440 \text{ J/mol}$ ,  $\rho_{\text{fl.-krist.}} = -955 \text{ J/mol}$ ) und unterstreichen somit die bereits erwähnte untergeordnete Rolle der *Coulomb*-Effekte bei dem vorliegenden System.

#### 4.2.1.2.2 Fazit

Obwohl das beschriebene Modell gravierende Vereinfachungen enthält (wie z. B. die eigentlich unzutreffende Beschreibung der Gegenionen als einheitlich über die Membranoberfläche verteilt [Langner et al., 1990] oder die Vernachlässigung der Dipoleigenschaften der PC-Kopfgruppen [Schneider und Keller, 1997]), können mit Hilfe von Simulation und Clusteranalyse dennoch einige fundamentale Aussagen über das allgemeine Mischungsverhalten von geladenen mit ungeladenen Teilchen gemacht werden. Beeindruckend ist hierbei

vor allem die Tatsache, daß man durch Verwendung der *Kawasaki*-Methode mathematische Gleichungen gewissermaßen „zum Leben erwecken“ und dadurch Beobachtungen machen kann, die durch rein theoretische Überlegungen nicht direkt vorhersagbar sind.

Für den speziellen Fall der PC/PG-Gemische lassen sich jedoch keine spezifisch ladungsdominierten Effekte – wie beispielsweise die Beeinflussung der Domänenstruktur durch Änderung des pH-Wertes [Träuble, 1976; Träuble et al., 1976] – erkennen, was einerseits auf einen lediglich marginalen Stellenwert der *Coulomb*-Wechselwirkungen in diesem System hindeutet (siehe auch Kapitel 5), zum anderen aber auch dadurch bedingt sein kann, daß die durch mathematische Näherungsverfahren bestimmten  $\rho$ -Werte eine solch detaillierte Analyse gar nicht zulassen, da ihre Absolutwerte (im Gegensatz zu der Differenz  $\Delta\rho = \rho_{\text{fl.-krist.}} - \rho_{\text{Gel}}$ ) gewissen Schwankungen unterliegen [Johann et al., 1996]. In diesem Zusammenhang sind die experimentellen Daten anderer Untersuchungsmethoden, wie z. B. von Ionenbindungsexperimenten [Hinderliter et al., 1994], sicherlich besser als Simulationsgrundlage geeignet.

#### 4.2.2 EINKOMPONENTEN-/ZWEIPHASENSYSTEME

Um die makroskopischen Phasenübergänge von Lipidensembles zu simulieren, sind detailgetreue Modelle, welche man z. B. bei Molekulardynamik-Simulationen verwendet, wegen des damit verbundenen enormen Rechenaufwandes (noch) nicht anwendbar [Tieleman et al., 1997], so daß die wesentlich stärker abstrahierende Monte Carlo-Technik hier deutlich besser geeignet ist. Dies impliziert allerdings, daß man eine große Zahl von Vereinfachungen in Kauf nehmen und sich daher auf die Beobachtung einiger wesentlicher Phänomene beschränken muß. So wird in der vorliegenden Arbeit beispielsweise auch bei Zweiphasensystemen stets angenommen, daß sich die untersuchten Teilchen auf einem hexagonalen Gitter mit festen Abständen befinden, und das, obwohl in der Realität der Flächenbedarf für ein Lipidmolekül in der flüssig-kristallinen Phase um etwa 20% zunimmt [Mouritsen et al., 1995b]. Als Rechtfertigung für diese Vernachlässigung läßt sich jedoch anführen, daß der Entropiebeitrag, der aus dieser räumlichen Auflockerung resultiert, weniger als 4% des Beitrages ausmacht, welcher durch die zunehmende Unordnung der Acylketten verursacht wird [Doniach, 1978].

Im folgenden werden Modelle abgeleitet und untersucht, welche grundsätzlich auf zwei unterschiedlichen Strategien beruhen, nämlich einerseits dem Einbringen von individuellen experimentellen Informationen in jede einzelne Simulation und andererseits einem generalisierten Ansatz mit rein mikroskopischen Informationen ohne direkten Bezug zu dem jeweiligen Experiment.

#### 4.2.2.1 Herleitung eines Zweizustandsmodells mit experimentellen Parametern

Bei diesem Ansatz liegt die Annahme zugrunde, daß ein Einkomponentensystem vorliegt und sich die einzelnen Lipidmoleküle entweder in der Gelphase (Zustand G) oder in der flüssig-kristallinen Phase (Zustand A) befinden und jeweils nur mit ihren sechs nächsten Nachbarn wechselwirken, d. h. es wird lediglich der (dominierende) Einfluß der kurzreichweitigen *van der Waals*-Kräfte berücksichtigt. Insofern ähnelt das Modell der weiter oben beschriebenen *Kawasaki*-Methode, allerdings mit dem gravierenden Unterschied, daß die Zusammensetzung des Ensembles zur Beschreibung des Phasenüberganges jetzt zwangsläufig variieren muß (mit  $N_G + N_A = \text{const.}$ ) und die Temperaturabhängigkeit des Systems somit von entscheidendem Interesse ist. Für den Monte Carlo-Algorithmus heißt dies, daß die Teilchen nicht mehr untereinander vertauscht werden, sondern daß der folgende Ablauf zum Tragen kommt:

- 1) wähle ein Teilchen  $i$  aus;
- 2) ändere den Zustand des Teilchens und berechne die Energiedifferenz  $\Delta E$ ;
- 3) verfähre weiter nach der *Metropolis*-Methode wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

Diese Überlegung basiert in ihrem Kern auf dem ursprünglich von *Ising* [1925] in seiner Dissertation untersuchten (eindimensionalen) Modell zur Beschreibung des kooperativen Verhaltens von Elementarmagneten bei Ferromagnetismus, bei dem makroskopische Phasenübergänge lediglich durch die Wechselwirkungen der nächsten Nachbarn untereinander induziert werden. Da die ersten Anwendungen von *Markov*-Prozessen auf zweidimensionale *Ising*-Systeme von *Glauber* [1963] stammen, ist es weithin üblich, die oben erwähnte Monte

Carlo-Technik als „Glauber-Kinetik“ zu bezeichnen [z. B. Mouritsen, 1984; Binder und Heermann, 1988].

Mit den obigen Ausführungen ist die allgemeine Vorgehensweise festgelegt, so daß jetzt noch geklärt werden muß, wie die Energiedifferenz  $\Delta E$  zu berechnen ist und auf welche Weise experimentelle Daten in die Simulation miteinbezogen werden sollen. Da DSC-Messungen relativ genaue Werte bezüglich der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  bzw. -enthalpie  $\Delta H_{um}$  liefern, bietet es sich an, diese Größen in das Modell zu implementieren [Sugár et al., 1994b]. Hierzu geht man zunächst wieder von der bereits für die *Kawasaki*-Statistik verwendeten Gleichung (23) aus, wobei man jedoch wegen des nun nicht mehr konstanten Verhältnisses von  $N_G$  zu  $N_A$  (bzw.  $N_A$  zu  $N_B$  in Gleichung (23)) auch die Terme  $E_G$  und  $E_A$  berücksichtigen muß:

$$E_{ges} = N_{GG} \cdot E_{GG} + N_{AA} \cdot E_{AA} + N_{GA} \cdot E_{GA} + N_G \cdot E_G + N_A \cdot E_A. \quad (23)$$

Da nach wie vor ein hexagonales Gitter mit periodischen Grenzen verwendet wird, haben die Beziehungen (24) und (25) weiterhin Gültigkeit, und es ergibt sich nach geeigneter Umformung unter Berücksichtigung von  $N_G + N_A = N$

$$E_{ges} = N(E_G + 3E_{GG}) + N_A(E_A - E_G + 3E_{AA} - 3E_{GG}) + N_{GA} \left[ E_{GA} - \frac{(E_{AA} + E_{GG})}{2} \right]. \quad (46)$$

Der Ausdruck in der eckigen Klammer steht in vollkommener Analogie zu der Definition des Nichtidealitätsparameters  $\omega_{AB}$  in Gleichung (26), allerdings mit dem Unterschied, daß er hier ein Maß dafür darstellt, wie günstig bzw. ungünstig ein Kontakt zwischen Teilchen in unterschiedlichen Phasen im Verhältnis zu gleichphasigen Nachbarn ist. Je positiver dieser Term wird, desto stärker wird das System bestrebt sein, nur in einer Phase zu existieren, daher wird diese Exzeßgröße im folgenden als „Kooperativitätsparameter“  $\omega_{GA}$  bezeichnet. Er ist für die hier untersuchten Lipidsysteme stets größer als null und wird als unabhängig von  $T$  angesehen, obwohl dies strenggenommen nicht der Fall ist [Sugár et al., 1994b].

Das erste Produkt in Gleichung (46) ist offensichtlich eine konstante Größe und spielt somit für die Ermittlung von  $\Delta E$  keine Rolle, während der zweite Klammerausdruck eine Energiedifferenz zwischen den beiden Phasen widerspiegelt und sich laut *Sugár et al.*

[1994b] gemäß der *Gibbs-Helmholtz*-Gleichung (21) in einen enthalpischen und einen entropischen Term aufteilen läßt, welche beide direkt durch DSC-Messungen zugänglich sind. Unter diesen Umständen ergibt sich für die Überführung eines Teilchens von Zustand A bzw. B in den Zustand B bzw. A der folgende Ausdruck für  $\Delta E$ :

$$\Delta E = \pm \left( \Delta H_{\text{um}} - \frac{T \Delta H_{\text{um}}}{T_m} \right) + w_{\text{GA}} \Delta N_{\text{GA}}. \quad (47)$$

Die kalorimetrisch ermittelten makroskopischen Größen  $T_m$  und  $\Delta H_{\text{um}}$  beeinflussen somit direkt die Mikrokonfiguration des Systems, während  $\omega_{\text{GA}}$  als anpaßbarer Parameter fungiert und die Kooperativität des Ensembles festlegt.

Für die weiteren Untersuchungen mit dem beschriebenen Modell ist es für die Berechnung bestimmter Werte (wie z. B. der Wärmekapazität) von Bedeutung, ob die simulierten Gitterpunkte ein komplettes Lipidmolekül oder lediglich eine der beiden Acylketten repräsentieren, was die Zahl der eingesetzten Teilchen halbieren würde. Mit dieser Fragestellung beschäftigten sich bereits *Jerala et al.* [1996], indem sie je zwei Gitterpunkte als „unendlich gekoppelt“ – also stets derselben Phase zugehörig – zusammenfaßten und eine zusätzliche Bewegungsart für die entstandenen Dimeren zuließen. Die Ergebnisse der Autoren sind jedoch für beide Ansätze fast vollkommen identisch, so daß hier im folgenden davon ausgegangen wird, daß jeder Gitterpunkt ein Lipidmolekül darstellt.

#### 4.2.2.1.1 Exemplarische Anwendung

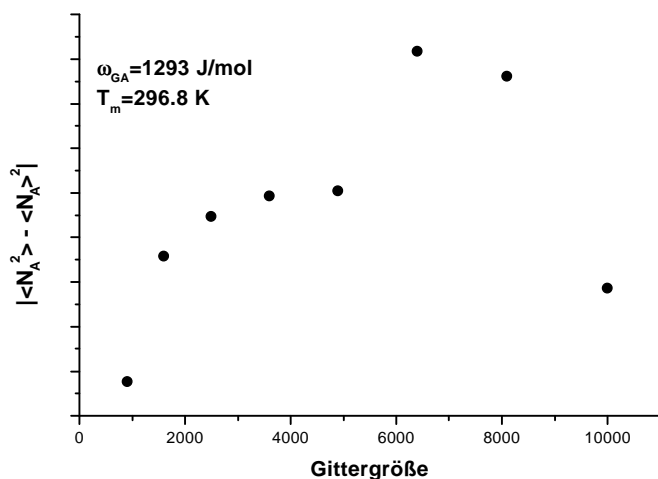
Nachdem das vorliegende Modell mit den experimentellen Größen  $\Delta H_{\text{um}}$  und  $T_m$  „gefüttert“ worden ist, muß der Parameter  $\omega_{\text{GA}}$  noch so angepaßt werden, daß die Kooperativität des entsprechenden Phasenüberganges näherungsweise richtig wiedergegeben wird. Dies geschieht über die Form der Wärmekapazitäts( $c_p$ -)kurve, deren „Schärfe“ in einem direkten Zusammenhang mit der kooperativen Einheit des Systems steht [Johann et al., 1996]. Molekular gesehen wird  $c_p$  bei gegebenem  $T$  um so größer sein, je stärker die zwischen den Phasen auftretenden Fluktuationen um ihren Mittelwert schwanken, je mehr Teilchen also gleichzeitig von einer Phase in die andere wechseln. Unter Berücksichtigung der Gitterdimensionen [Zhang et al., 1992] und der Tatsache, daß die Fluktuationen direkt mit der Zahl der Teilchen in einer Phase zusammenhängen [Heimburg und Marsh, 1996], kann man die

Wärmekapazität eines Teilchenensembles bei der Temperatur  $T$  mit Hilfe von Gleichung (48) berechnen:

$$c_p = \left| \langle N_A^2 \rangle - \langle N_A \rangle^2 \right| \frac{(\Delta H_{um})^2}{NRT^2} . \quad (48)$$

Der zwischen den Betragszeichen stehende Ausdruck ist ein Maß für die mittlere Streuung der einzelnen  $N_A$ -Werte, die eckigen Klammern bezeichnen die Mittelwerte der über den Verlauf der Simulation gesammelten Stichproben.

Bevor man jedoch damit beginnen kann, aussagekräftige Simulationen durchzuführen, muß man sich der folgenden Problematik bewußt sein: Bei der *Glauber*-Statistik kann nämlich – im Gegensatz zu der *Kawasaki*-Methode – jedes Teilchen sowohl den Zustand G als auch den Zustand A einnehmen, was besonders bei großem  $\omega_{GA}$  und  $T = T_m$  zu der Entstehung von im Vergleich zu der Gittergröße riesigen Domänen bzw. Fluktuationen führen kann. Dies hat demnach zur Konsequenz, daß strenggenommen bei jedem Phasenübergang erster Ordnung die Systemgrenzen den limitierenden Faktor bilden und die berechnete Wärmekapazität immer unterhalb des tatsächlichen Wertes liegt [Mouritsen, 1990]. Der exakte – und mathematisch recht aufwendige – Weg aus diesem Dilemma besteht in der Extrapolation der  $c_p$ -Werte auf  $N \rightarrow \infty$  [Lee und Kosterlitz, 1991]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch der empirische Weg bevorzugt, bei dem das mittlere Schwankungsquadrat von  $N_A$  für ein typisches Lipidsystem (DMPC mit  $T_m = 296.9$  K) gegen unterschiedliche Systemgrößen aufgetragen wurde (Abb. 32):



**Abbildung 32:** Abhängigkeit des mittleren Schwankungsquadrates von der Gittergröße auf der Grundlage der kalorimetrischen Daten von DMPC; für jede Simulation wurden insgesamt  $2 \times 10^8$  Monte Carlo-Schritte durchgeführt, die Äquilibrierungszeit betrug dabei  $1 \times 10^8$  Schritte; Zeitaufwand pro Simulation: OCTANE: 381 s, INDIGO: 2743 s.

Die gemessenen Datenpunkte zeigen einen recht interessanten Verlauf: Mit zunehmender Gittergröße nähern sich die Werte erwartungsgemäß asymptotisch dem Grenzwert für ein unendlich großes System an [Mouritsen, 1990], um dann jedoch ab  $N = 6400$  völlig unkoordiniert zu schwanken. Dieser Effekt ist aus Untersuchungen an *Ising*-Systemen in der theoretischen Physik bekannt [z. B. Binder und Heerman, 1988] und beruht auf der Tatsache, daß mit zunehmendem  $N$  die benötigten Relaxations- und Fluktuationszeiten des Ensembles stark ansteigen und die in Abb. 32 berechneten Mittelwerte ihre Aussagekraft verlieren. In der Tat führt eine Verdoppelung der Simulationsdauer für  $N = 6400$  zu einer deutlichen Angleichung des entsprechenden Schwankungsquadrates an den erwarteten Kurvenverlauf, woraus sich schließen läßt, daß man mit der Wahl der Systemgrößen bei Durchführung von *Glauber*-Dynamik deutlich vorsichtiger sein muß, als dies bei der *Kawasaki*-Statistik der Fall ist. In der Literatur wurden Lipidsysteme mit einer Gittergröße zwischen 1600 und 4225 – allerdings mit teilweise deutlich geringerer Simulationszeit – untersucht, ohne daß jedoch auf die oben erwähnten Beobachtungen explizit eingegangen wurde [Sugár et al., 1994b; Heimburg und Biltonen, 1996].

Um eine theoretische Wärmekapazitätskurve an die experimentellen Daten anzupassen, können nun bei einem bestimmten  $\omega_{GA}$  einige  $c_p$ -Werte bei verschiedenen Temperaturen in

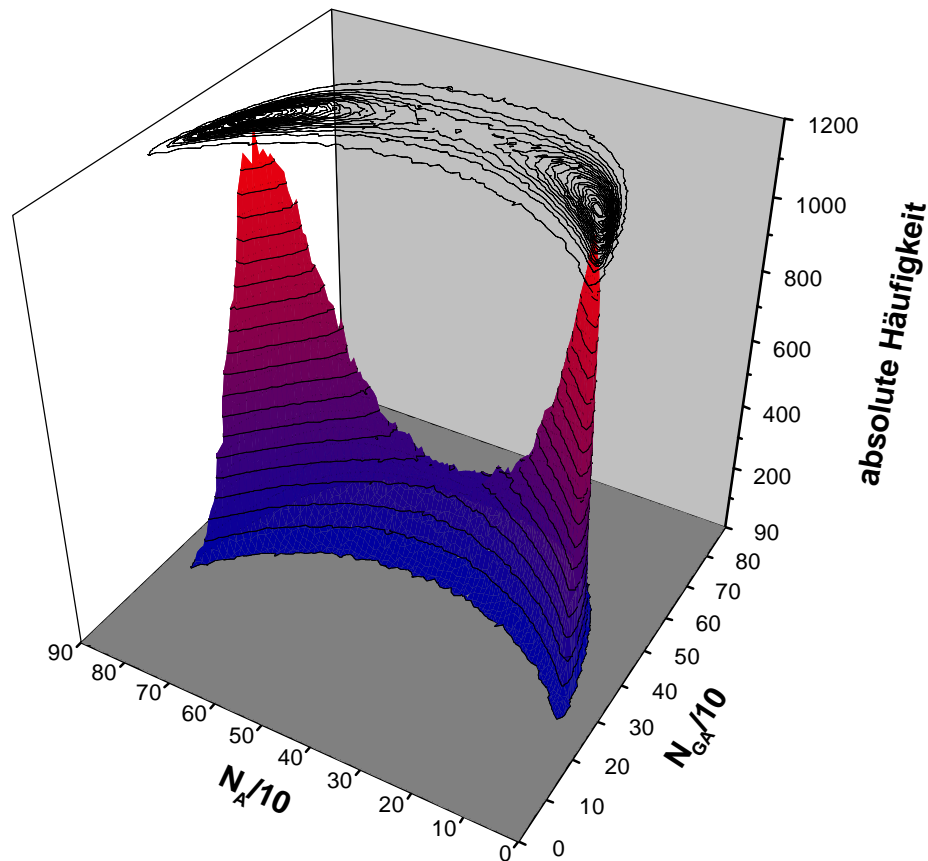


der Nähe von  $T_m$  mittels Gleichung (48) simuliert und bei Nichtübereinstimmung mit der Messung bei variiertem  $\omega_{GA}$  wiederholt werden. Diese Prozedur ist jedoch sehr mühsam, daher wurde für die schnelle Bestimmung des geeigneten Kooperativitätsparameters ein rein rechnerisches Verfahren durchgeführt, welches von *Ferrenberg und Swendsen* [1988] für *Ising*-Modelle entwickelt wurde. Der Grundgedanke dabei ist folgender: Wie in Kapitel 3 ausgeführt, wird die Monte Carlo-Methode deswegen angewendet, weil eine exakte mathematische Berechnung der benötigten Zustandssummen nicht möglich ist, da keine Informationen über die Verteilungsfunktion  $f$  der simulierten Teilchen vorliegen. In einem Zweiphasen-/Einkomponentensystem läßt sich aber jede mögliche Mikrokonfiguration durch die Festlegung von lediglich zwei Variablen, nämlich  $N_A$  (oder analog  $N_G$ ) und  $N_{GA}$ , mit Hilfe der Gleichungen (24) und (25) charakterisieren. Die Pointe des Verfahrens besteht nun darin, in einer sehr langen Simulation einen relativ genauen Wert für  $f(N_A, N_{GA})$  zu ermitteln, mit dessen Hilfe dann  $c_p$  (oder eine andere Observable) bei verschiedenen Temperaturen sofort berechnet werden kann. Angewendet auf das hier verwendete Zweizustandsmodell ergibt sich unter Berücksichtigung von *Heimburg und Marsh* [1996] für den Erwartungswert einer Observablen  $\langle O \rangle$

$$\langle O(T) \rangle = \frac{\sum_{N_G} \sum_{N_{GA}} \left[ O(N_A, N_{GA}) f(N_A, N_{GA}) \exp \left( - \frac{N_A \left( \Delta H_{um} - T \frac{\Delta H_{um}}{T_m} \right) + \frac{1}{2} N_{GA} \Delta w_{GA}}{RT} \right) \right]}{\sum_{N_A} \sum_{N_{GA}} \left[ f(N_A, N_{GA}) \exp \left( - \frac{N_A \left( \Delta H_{um} - T \frac{\Delta H_{um}}{T_m} \right) + \frac{1}{2} N_{GA} \Delta w_{GA}}{RT} \right) \right]}. \quad (49)$$

$\Delta \omega_{GA}$  bezeichnet hierbei den Differenzbetrag zwischen dem eingesetzten Wert für  $\omega_{GA}$  und dem Betrag des Kooperativitätsparameters, für den  $f(N_A, N_{GA})$  ermittelt wurde.

Zur Verifikation des erstellten Programmcodes und von Gleichung (49) zeigt die folgende Abbildung eine typische Verteilungsfunktion für ein 30-30 großes Gitter bei  $T_m = 310.3K$  und  $\omega_{GA} = 1382 J/mol$ :



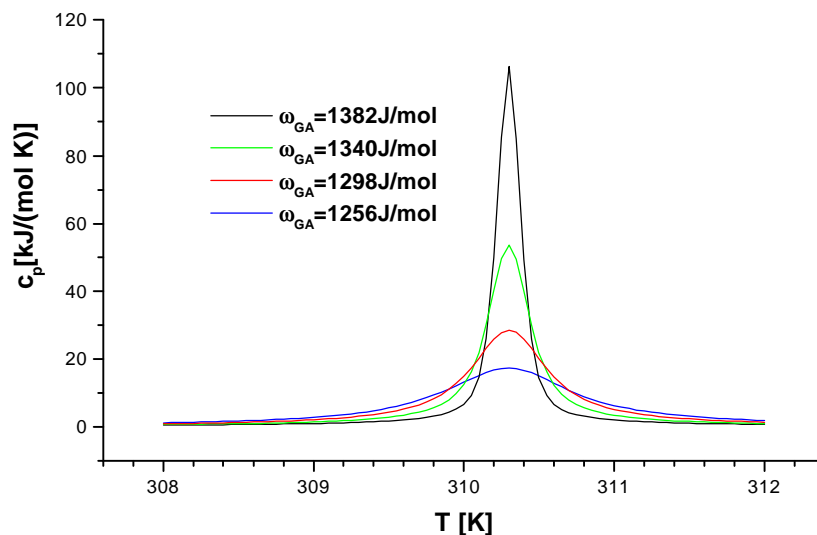
**Abbildung 33:** Verteilungsfunktion  $f(N_A, N_{GA})$  für ein Ensemble aus 900 Teilchen bei  $T_m = 310.3$  K und  $w_{GA} = 1382$  J/mol; es wurden  $1.28 \times 10^{10}$  Monte Carlo-Schritte durchgeführt und 43778 Werte aufgenommen; die Meßpunkte für  $N_A$  bzw.  $N_{GA}$  wurden in Pakete zu je 10 zusammengefaßt; benötigte Rechenzeit: 3625 s auf der OCTANE Workstation.

Das Histogramm wurde bei der Phasenumwandlungstemperatur aufgenommen, um wegen der daraus resultierenden starken Fluktuationen ein möglichst breites Datenspektrum erzeugen zu können. Um das zum Sammeln der Meßwerte benötigte zweidimensionale Feld (und die Doppelsumme in Gleichung (49)!) überschaubar zu halten, wurden je zehn mögliche Mikrokonfigurationen bei der Aufzeichnung zu Paketen zusammengefaßt, so daß der Gesamtumfang der obigen Simulation 8281 Koordinaten beträgt.

Man erkennt deutlich an der typischen „Flügelstruktur“ des Histogramms, daß eine Umwandlung erster Ordnung vorliegt [Pedersen et al., 1996], denn das System schwankt offensichtlich diskontinuierlich zwischen zwei metastabilen Zuständen, die sich in unterschiedlichen makroskopischen Phasen befinden. In diesem Verhalten liegt auch ein weiteres simulationstechnisches Problem, denn mit zunehmendem  $\omega_{GA}$  werden diese Zustände immer

ausgeprägter, was mit einer zwangsläufigen Erhöhung der Simulationsdauer verknüpft ist, da andernfalls unter Umständen gar kein Phasenübergang mehr in dem untersuchten Zeitfenster zu beobachten ist. Die gekrümmte Grundfläche des Graphen resultiert daher, daß die Abweichungen des Wertes für  $N_A$  von  $N/2$  zwangsläufig mit einer Erniedrigung der  $N_{GA}$ -Paare verbunden ist, was näherungsweise zu einer  $C_{2v}$ -Symmetrie des Konturdiagramms führt.

Mit Hilfe der simulierten Verteilungsfunktion lassen sich nun sehr schnell die Wärmekapazitätskurven für verschiedene Kooperativitätsparameter berechnen, wenn man den Operator für die Observable  $O(N_A, N_{GA})$  in Gleichung (49) durch  $N_A$  (bzw.  $N_A^2$ ) ersetzt und so-



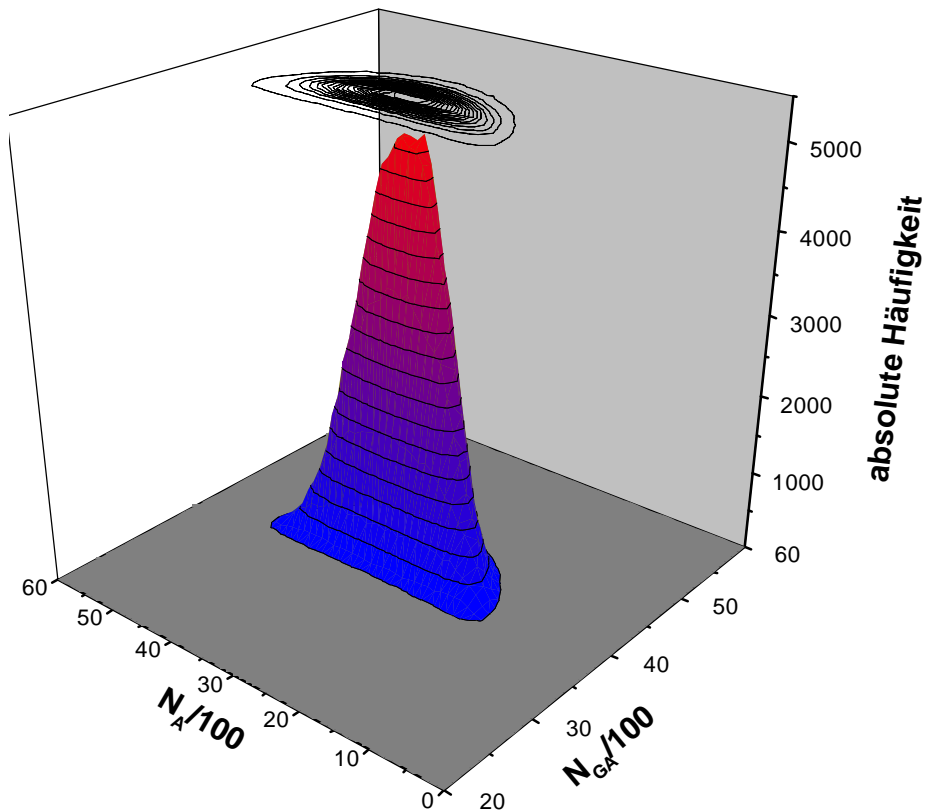
**Abbildung 34:** Wärmekapazitätskurven für unterschiedliche Kooperativitätsparameter  $\omega_{GA}$ , berechnet nach Gleichung (49) mit Hilfe der in Abb. 33 dargestellten Verteilungsfunktion.

mit einem Erwartungswert  $\langle N_A \rangle$  (bzw.  $\langle N_A^2 \rangle$ ) für Gleichung (48) erhält:

Ein ansteigendes  $\omega_{GA}$  bewirkt erwartungsgemäß eine verringerte Halbwertsbreite sowie eine Erhöhung des Maximalwertes der  $c_p$ -Kurve, wobei das Flächenintegral über den gesamten Temperaturbereich annähernd konstant bleibt. Die Ergebnisse sind identisch mit denen aus *Heimburg und Marsh* [1996], was dafür spricht, daß der erstellte Quellcode und die Herleitung der entsprechenden Formeln richtig sind (oder derselbe Fehler zweimal gemacht wurde!). Was die Generierung der Verteilungsfunktion mittels Monte Carlo betrifft,

so sei an dieser Stelle noch angemerkt, daß während der Simulation die Teilchen auch bei diesem Modell der Reihe nach untersucht wurden (um eine Zufallszahl zu sparen - siehe Abschnitt 4.2.1.1.1) und sich auch hier keinerlei nennenswerte Abweichungen gegenüber einer (zeitaufwendigeren) zufälligen Auswahl ergeben, was die diesbezüglich geäußerten Bedenken von *Heimburg* [persönliche Mitteilung] zumindest in dem vorliegenden Fall als unbegründet erscheinen läßt.

Mit der oben erhaltenen Bestätigung des Theoriegebäudes konnte nun der Versuch unternommen werden, mit diesem Modell eigene Wege zu gehen, und über die Anpassung makroskopischer Meßergebnisse – wie den DSC-Daten – Informationen über das mikroskopische Verhalten von Lipidsystemen zu gewinnen. Hierzu wurde zunächst für ein wesentlich größeres Gitter (6400 Moleküle) abermals eine Verteilungsfunktion durch Simulation ermittelt, wobei den Beobachtungen in Abb. 32 durch eine sehr lange Simulationsdauer ( $4.2 \cdot 10^{10}$ ) Rechnung getragen wurde. Hierbei muß beachtet werden, daß eine 32-bit INTEGER-Zahl „nur“ einen positiven Wertebereich von  $2^{31}-1$  (= 2147483647) besitzt, da ein Bit für das Vorzeichen reserviert ist, so daß die Aufzeichnung der Verteilungsfunktion einmal unterbrochen und mit anderen Startwerten für den Zufallsgenerator wiederaufgenommen werden mußte. Als experimentelle Vorgabe diente dabei die Umwandlungstemperatur von reinem DMPC (296.9 K),  $\omega_{GA}$  wurde (aufgrund von Erfahrungswerten) willkürlich mit 1298 J/mol angesetzt.

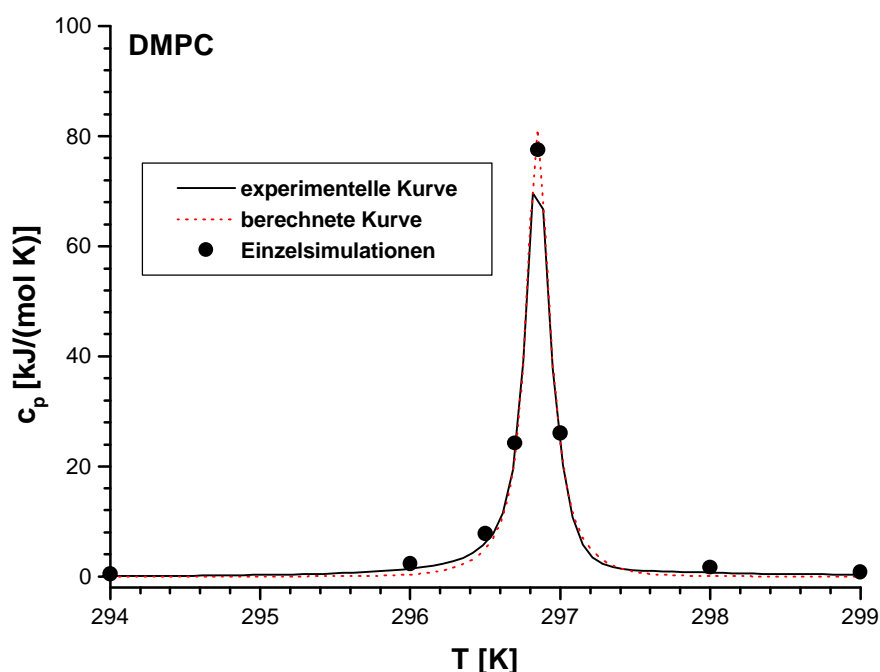


**Abbildung 35:** Verteilungsfunktion  $f(N_A, N_{GA})$  für ein Ensemble aus 6400 Teilchen bei  $T_m = 296.9 \text{ K}$  und  $w_{GA} = 1298 \text{ J/mol}$ ; es wurden  $4.2 \times 10^{10}$  Monte Carlo-Schritte durchgeführt und 355182 Werte aufgenommen; die Meßpunkte für  $N_A$  bzw.  $N_{GA}$  wurden in Pakete zu je 100 zusammengefaßt.

Interessanterweise zeigt die Verteilungsfunktion nun deutlich, daß bei dem gegebenen Kooperativitätsparameter ein kontinuierlicher Phasenübergang zweiter Ordnung vorliegt, bei dem gleichzeitig Gel- und flüssig-kristalline Domänen mit annähernd gleicher Teilchenzahl koexistieren. Eine nähere Untersuchung ergibt, daß diese plötzliche Änderung der Ordnung im Vergleich zu Abb. 33 durch die Vergrößerung des Gitters (und nicht durch die geringfügigen Änderung von  $T_m$  bzw.  $\omega_{GA}$ ) hervorgerufen wird, also scheint die Korrelationslänge der fluktuierenden Domänen die Gitterdimensionen bei 30·30 Molekülen deutlich zu überschreiten, so daß ein diskontinuierliches Phasenverhalten suggeriert wird, da einfach zu wenig Teilchen vorhanden sind, um große koexistierende Domänen darzustellen. Bei einer Vergrößerung des Systems zeigt sich dann, daß die vorgegebene Kooperativität nicht ausreicht, um auch hier alle vorhandenen Moleküle auf einmal in die andere Phase „mitzureißen“, zu jedem Zeitpunkt der Beobachtung befinden sich daher etwa gleich viele Teilchen

im Zustand G bzw. A, und die Ordnung des Phasenüberganges ist größer als eins. Um die Domänenfluktuationen von reinen DMPC-Systemen zu untersuchen, ist die Wahl eines 80·80 Gitters gegenüber einem kleineren ohnehin zu bevorzugen, da die vermessenen Vesikel eine wesentlich größere Oberfläche mit deutlich mehr Molekülen besitzen [Kerth, 1997], so daß das simulierte Ensemble als absolute Untergrenze gesehen werden muß.

Unter Anwendung der *Ferrenberg-Swendsen*-Methode wurde die berechnete  $c_p$ -Kurve bezüglich  $T_m$  und  $\Delta H_{um}$  an die experimentelle angepaßt und sicherheitshalber durch Einzelsimulationen bei verschiedenen Temperaturen verifiziert (Abb. 36):



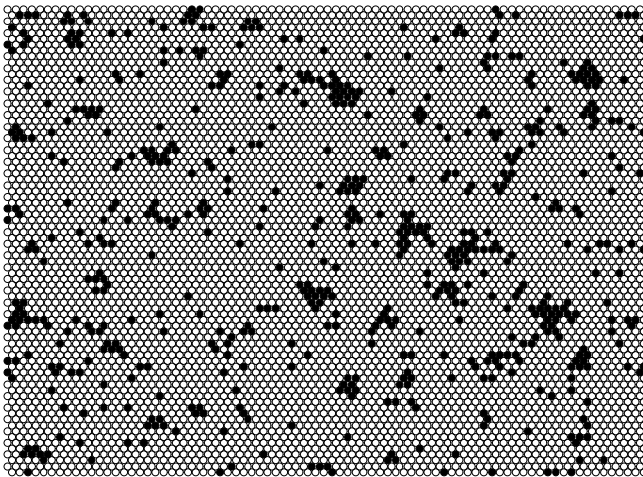
**Abbildung 36:** Anpassung der nach Ferrenberg und Swendsen [1988] berechneten  $c_p$ -Kurve bzgl.  $T_m$  ( $= 296.9$  K) und  $\Delta H_{um}$  ( $= 23.7$  kJ/mol) an die experimentellen Daten; Verifikation der berechneten Kurve durch Einzelsimulationen mit  $5 \times 10^8$  Monte Carlo-Schritten;  $w_{GA}$  ergibt sich zu 1290 J/mol.

Es zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment, und auch die mit kürzerer Meßdauer durchgeführten Einzelsimulationen weichen nur geringfügig von den berechneten Werten ab. Letztere konnten allerdings nur in dem Bereich zwischen ca. 285 und 299 Kelvin ermittelt werden, da mit zunehmender Entfernung von  $T_m$  die in Gleichung (49) verwendeten Exponentialfunktionen zu groß (bzw. zu klein) und von der

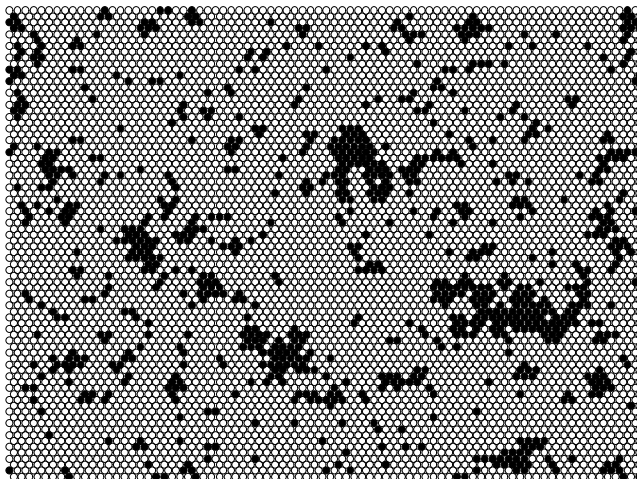
CPU letztendlich wie null oder unendlich behandelt werden, jedoch ist dies für die hier relevante Beschreibung des Phasenüberganges ohne Bedeutung.

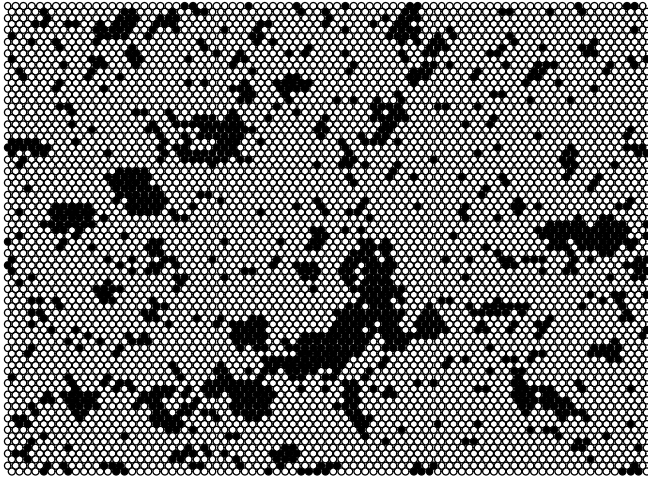
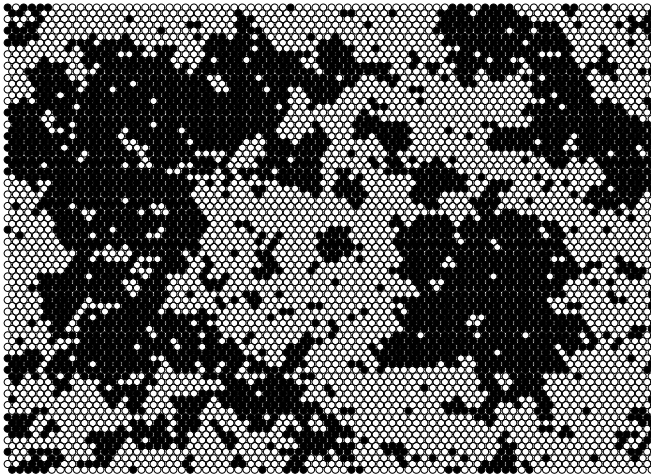
Die folgende Abbildung zeigt zur Veranschaulichung des Phasenüberganges einige typische Domänenstrukturen des simulierten DMPC-Systems bei unterschiedlichen Temperaturen:

$T=T_m-1.9\text{ K}$



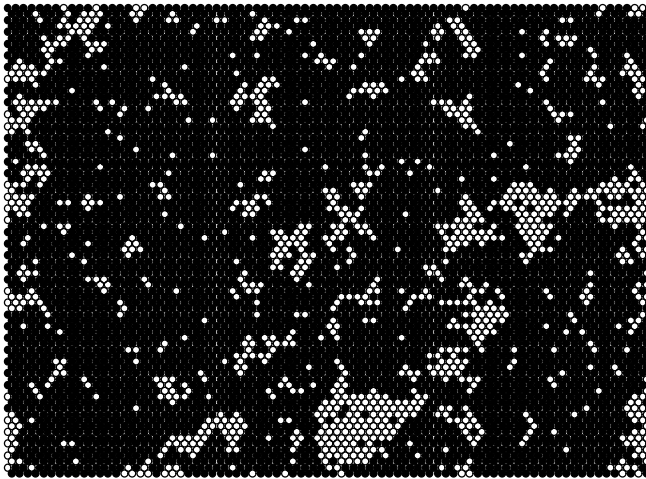
$T=T_m-0.9\text{ K}$



$T = T_m - 0.5 \text{ K}$  $T = T_m$ 



$$T = T_m + 0.5 \text{ K}$$



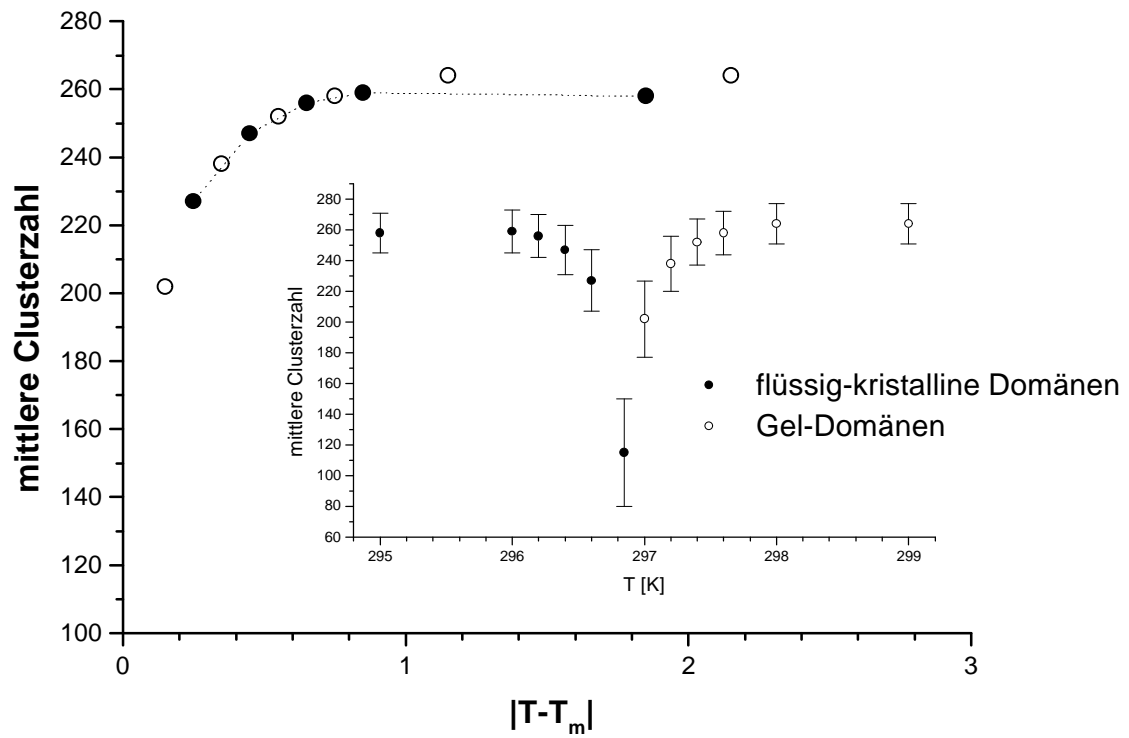
**Abbildung 37:** *Verschiedene Mikrokonfigurationen eines aus  $80 \times 80$  Teilchen bestehenden Ensembles bei unterschiedlichen Temperaturen; in der Simulation wurden die für DMPC angepaßten bzw. experimentell gemessenen Daten verwendet ( $T_m = 296.9$  K,  $\Delta H_{um} = 23.7$  kJ/mol,  $w_{GA} = 1290$  J/mol); die weißen Punkte stehen dabei jeweils für ein Lipid in der Gelphase, die schwarzen für ein Lipid in der flüssig-kristallinen Phase.*

Da es sich bei den abgebildeten Mikrokonfigurationen nur um Momentaufnahmen und nicht um statistische Mittelwerte handelt, können allein aus Abb. 37 noch keine Aussagen über die durchschnittliche Anzahl bzw. Größe der auftretenden Cluster gemacht werden, allerdings erkennt man deutlich, daß auch in einiger Entfernung von  $T_m$  durchaus eine sporadische Domänenbildung stattfindet. Gemäß der Phasenregel von *Gibbs* wäre eine solche Koexistenz für ein Einkomponentensystem eigentlich verboten [Mouritsen, 1983], allerdings muß man hierbei bedenken, daß der Begriff „Phase“ einen durch makroskopische Variablen charakterisierten Zustand beschreibt [Kortüm und Lachmann, 1981] und es sich hier um hochdynamische Fluktuationen auf mikroskopischer Ebene handelt, die dieser Definition daher nicht gerecht werden.

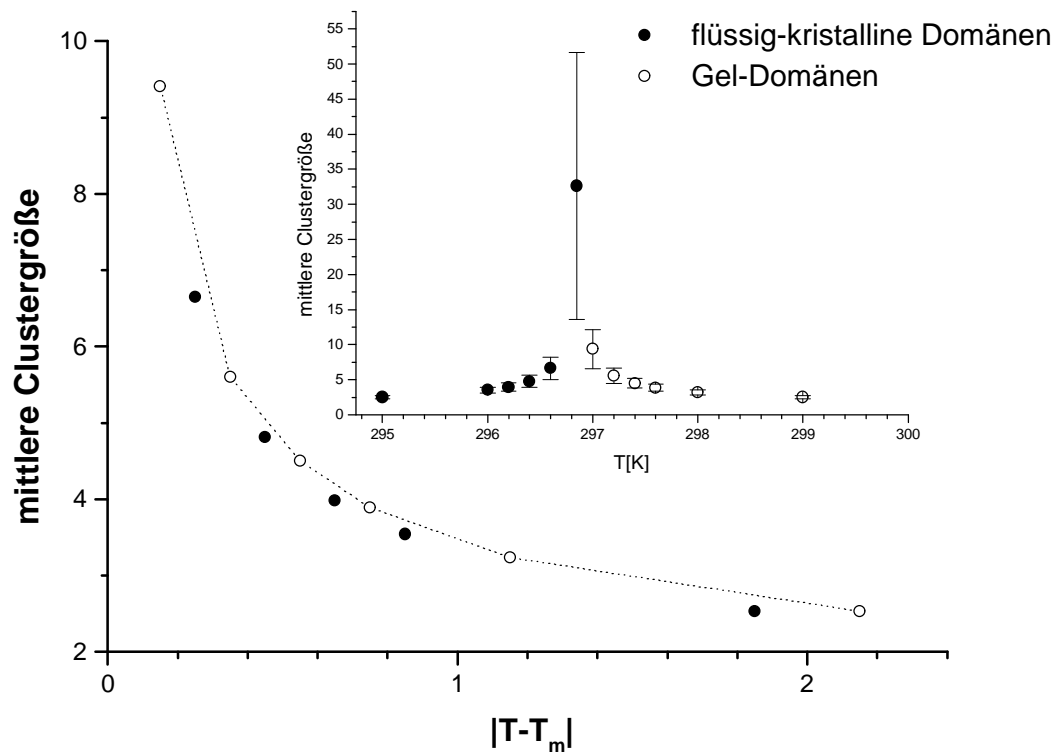
Weit interessanter – aber auch weniger spektakulär – als die Dokumentation des Phasenüberganges durch einzelne „Momentaufnahmen“ gestaltet sich die detaillierte statistische Untersuchung der Fluktuationen mittels der bereits weiter oben beschriebenen Cluster-Algorithmen. Erstaunlicherweise betritt man damit völliges Neuland, da das hier verwendete Zweizustandsmodell in seiner praktischen Anwendung bisher lediglich – soweit sich dies durch die erschienenen Publikationen beurteilen läßt – zur Simulation von makroskopischen

Variablen (wie z. B. der Wärmekapazität) bzw. zur Veranschaulichung einzelner Mikrokonfigurationen verwendet wurde [Heimburg und Marsh, 1996; Heimburg und Biltonen, 1996], und auch *Sugár et al.* [1994b] beziehen sich eher auf das Simulationsmodell an sich als auf die Deutung experimenteller Phänomene.

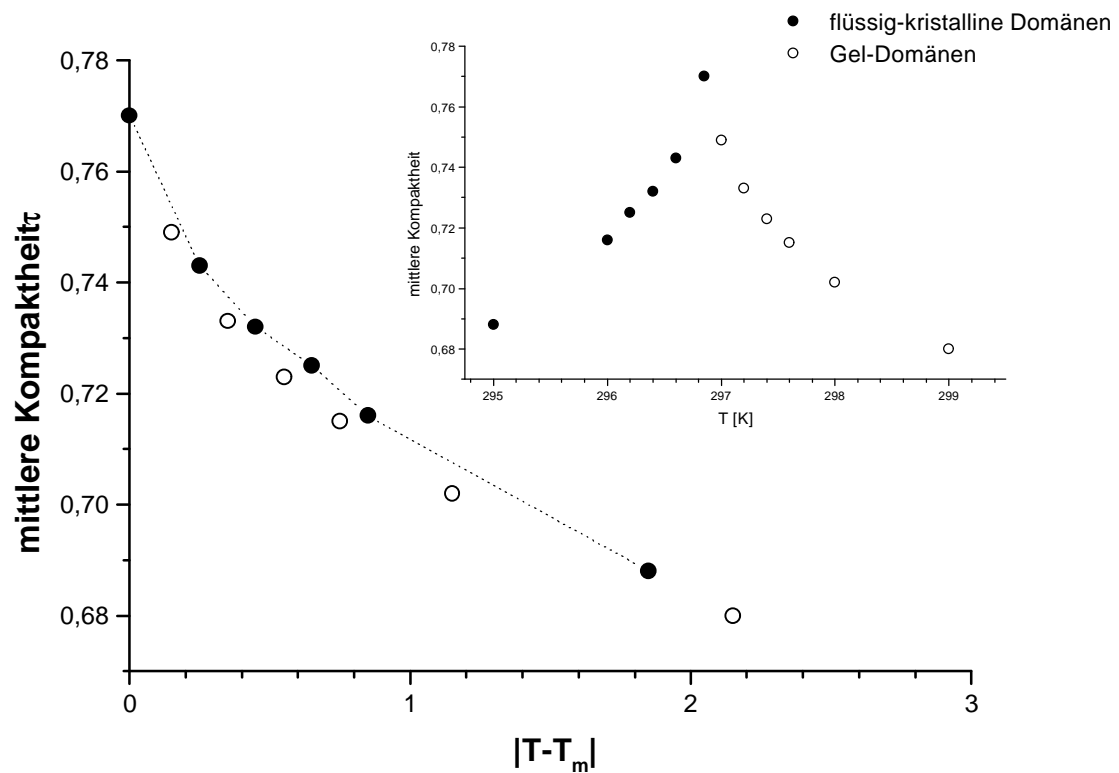
Für die Clusteranalyse wurden für DMPC bei verschiedenen Temperaturen Einzelsimulationen hinreichender Länge durchgeführt und Anzahl, Häufigkeit und die Kompaktheit  $\tau$  der jeweils entstehenden Domänen aufgezeichnet. Hierbei wurde stets der bei gegebener Temperatur in der Minderheit befindliche Phasenzustand als domänenbildend definiert, d. h. bis einschließlich  $T = T_m$  waren Cluster von flüssig-kristallinen Teilchen, bei höheren Temperaturen entsprechend in der Gelphase befindliche Teilchen von Interesse. Jeder gemessene Wert wurde über 20000 einzelne Stichproben gemittelt und als Ergebniss in den Abbildungen 38, 39 und 40 zusammengefaßt:



**Abbildung 38:** mittlere Clusterzahl aus der Simulation von reinem DMPC mit einem Ensemble von 6400 Teilchen als Funktion der Temperatur bzw. der Abweichung von  $T_m$ ; für jeden Meßpunkt wurde über 20000 Meßwerte gemittelt; die beobachtete Streuung wurde in dem kleinen Diagramm durch die Fehlerbalken wiedergegeben und in dem großen Diagramm zur besseren Übersicht ignoriert; die gepunktete Linie ist eine reine Hilfslinie ohne physikalische Bedeutung.

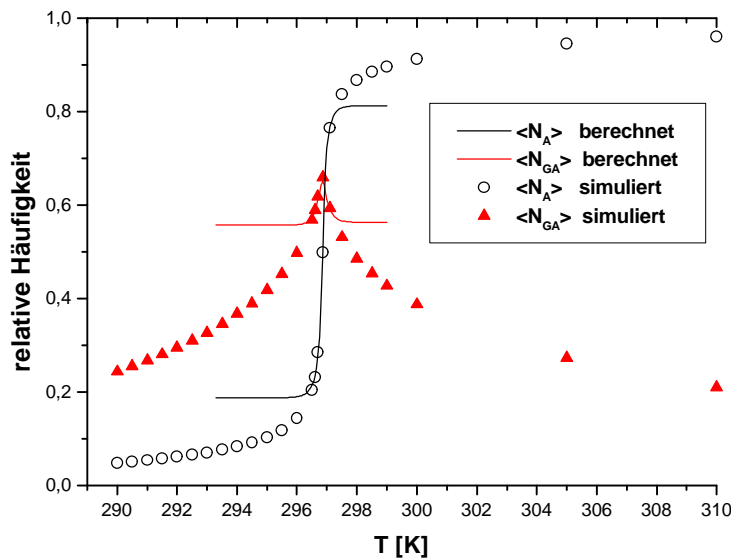


**Abbildung 39:** mittlere Clustergröße aus der Simulation von reinem DMPC mit einem Ensemble von 6400 Teilchen als Funktion der Temperatur bzw. der Abweichung von  $T_m$ ; für jeden Meßpunkt wurde über 20000 Meßwerte gemittelt; die beobachtete Streuung wurde in dem kleinen Diagramm durch die Fehlerbalken wiedergegeben und in dem großen Diagramm zur besseren Übersicht ignoriert; die gepunktete Linie ist eine reine Hilfslinie ohne physikalische Bedeutung.



**Abbildung 40:** mittlere Kompaktheit aus der Simulation von reinem DMPC mit einem Ensemble von 6400 Teilchen als Funktion der Temperatur bzw. der Abweichung von  $T_m$ ; für jeden Meßpunkt wurde über 20000 Meßwerte gemittelt; es wurden nur Cluster mit mehr als sechs Molekülen untersucht; die gepunktete Linie ist eine reine Hilfslinie ohne physikalische Bedeutung.

Bereits ein kurzer Blick auf die kleineren Diagramme in den obigen Abbildungen läßt klar erkennen, daß sich die Fluktuationscharakteristik bei  $T_m$  offensichtlich dramatisch von den Clusterstrukturen bei anderen Temperaturen unterscheidet, aber auf welche Weise erreicht nun ein Lipidsystem, das sich z. B. weit in der Gelphase befindet, diesen ausgezeichneten Zustand? Um diese Frage zu klären, ist es hilfreich, sich zusätzlich die jeweilige Gesamtzahl der Teilchen in den unterschiedlichen Phasen als Funktion von  $T$  zu vergegenwärtigen:



**Abbildung 41:** Simulation der mittleren Anzahl von Lipidmolekülen in der Gel- (Zustand G) bzw. flüssig-kristallinen Phase (Zustand A) als Funktion der Temperatur; die durchgezogenen Linien ergeben sich aus der Berechnung mittels der Methode von Ferrenberg und Swendsen [1988];

Vom theoretischen Standpunkt aus gesehen fällt in Abb. 41 auf, daß sich mit der Skaliermethode nach Gleichung (49) für die Analyse von Absolutteilchenzahlen nur in einem sehr engen Bereich um  $T_m$  akkurate Werte berechnen lassen, was jedoch für das zur  $c_p$ -Ermittlung benötigte Schwankungsquadrat (Gleichung (48)) vollkommen ausreicht, da offensichtlich in größerem Abstand von  $T_m$  (wo  $c_p$  ohnehin gegen null geht und somit keine relevante Information mehr beinhaltet) die Differenz zweier „falscher“ Werte dennoch das richtige Ergebnis liefert.

Bei  $T = 295$  K befinden sich zu einem bestimmten Zeitpunkt erwartungsgemäß nur wenige Moleküle in der flüssig-kristallinen Phase und bilden eine große Anzahl von sehr kleinen Domänen mit durchschnittlich nur etwa einem weiteren Nachbarn. Absolut gesehen, bestehen die meisten „Cluster“ sogar nur aus einem einzigen Molekül (die entsprechenden Daten sind nicht dargestellt), was die Vermutung nahelegt, daß die Lebensdauer der flüssig-kristallinen Zustände aufgrund der ungünstigen G-A-Wechselwirkungen relativ kurz ist, also ständig einzelne „Domänen“ entstehen und gleich darauf wieder verschwinden. Bei Erhöhung der Temperatur auf  $T = 296$  K bemerkt man bereits einen sehr interessanten Effekt: Während nämlich sowohl  $N_A$  als auch die mittlere Clustergröße geringfügig aber deutlich zunehmen, bleibt die Clusterzahl dennoch konstant, ergo verläuft die Phasenumwandlung in

dem verwendeten Modell über das Wachstum von bereits vorhandenen Domänen (die dementsprechend auch auf der Zeitachse stabiler werden) und nicht über eine zunehmende Erhöhung der Domänenzahl. Von experimenteller Seite konnte dieses Verhalten mittels Temperatursprung-Methoden und Kryo-Elektronenmikroskopie für reine DMPC-Vesikel [Groll et al., 1996] sowie mit FRAP [Schram et al., 1996] und ESR-Spektroskopie [Sankaram et al., 1992] für Lipidgemische bestätigt werden, und auch andere theoretische Ansätze weisen in diese Richtung [Marsh et al., 1977], wogegen neueste mit AFM und Neutronenstreuung durchgeführte Untersuchungen – allerdings ebenfalls an binären Systemen – für eine Zunahme der Domänenzahl bei Annäherung an  $T_m$  sprechen [Gliss et al., 1998]. Rein anschaulich betrachtet scheint jedoch für ein sehr reines Einkomponentensystem ohne Kondensationskeime – wie es zweifellos in der Simulation vorliegt – das Wachstum bereits vorhandener Cluster mit steigender Temperatur die energetisch günstigere Alternative zu sein, da der Phasenzustand der Nachbarpartikel bei den in Reinstoffen vorliegenden hohen Kooperativitätsparametern sehr stark in die Berechnung von  $\Delta E$  eingeht, was die Vergrößerung einer bestehenden Domäne gegenüber einer Neuentstehung favorisiert.

Erhöht man die Temperatur weiter in Richtung  $T_m$ , so beginnen die immer größer werdenden Domänen zu fusionieren (hierin herrscht allgemeine Übereinstimmung) und die mittlere Zahl der Cluster geht deutlich zurück. Gleichzeitig steigt deren Kompaktheit, denn mit zunehmendem Entropiebeitrag durch die höhere Beweglichkeit der Ketten [Doniach, 1978; Mouritsen, 1984] strebt der Ausdruck  $(\Delta H - T\Delta S)$  immer weiter gegen null, so daß der Term  $\Delta N_{GA}$  zum bestimmenden Faktor in Gleichung (47) wird und damit die Tendenz besteht, die Zahl der G-A-Paare zu minimieren. Insgesamt gesehen resultiert aber dennoch ein leichter Anstieg der Zahl ungleicher Nachbarn (siehe Abb. 41), da mit steigendem  $T$  auch die Entstehungsfrequenz neuer Domänen zunimmt, was  $N_{GA}$  wiederum erhöht und das Kompaktheitsbestreben offensichtlich überkompensiert.

Bei der Umwandlungstemperatur  $T_m$  schließlich liegen die Moleküle im zeitlichen Mittel mit gleicher Häufigkeit in den Zuständen G bzw. A vor und es entstehen wenige aber dafür sehr große Domänen, welche überproportional starken Fluktuationen unterworfen sind, wie man aus den entsprechenden langen „Fehlerbalken“ als Maß für die Streuung der Meßwerte entnehmen kann.

Dennoch läßt sich aus der durchgeführten Statistik nicht erkennen, ob diese Cluster nun tatsächlich koexistieren oder ob das System abwechselnd zwischen zwei metastabilen Zuständen mit sehr hohem G- bzw. A-Anteil hin und her springt. Mit Hilfe der Abbildungen 35 und 37 erkennt man jedoch, daß ersteres der Fall ist und der Phasenübergang somit eine höhere Ordnung als eins besitzt. Die Frage nach der tatsächlichen Ordnung dieser Umwandlung wird in der Literatur vielfach kontrovers diskutiert: Während zum einen die These vertreten wird, daß bei reinen Lipidsystemen ein Phasenübergang erster Ordnung vorliegt [z. B. Albon und Sturtevant, 1978; Ipsen et al., 1990; Zhang et al., 1992; Mouritsen und Kinnunen, 1996], weisen neuere Monte Carlo-Simulationen von Lipidmolekülen [Sugár et al., 1994b; Jerala et al., 1996] und Lipidvesikeln [Dammann und Ipsen, 1997] sowie einige ältere experimentelle Daten [Freire und Biltonen, 1978; Biltonen, 1990] auf eine Phasenumwandlung zweiter Ordnung hin. Ein allgemeiner Konsens besteht allerdings zumindest darin, daß sich die Kooperativität in reinen Lipidsystemen sehr nahe (und zwar entweder oberhalb oder unterhalb) an einem „kritischen Wert“ befindet [Mouritsen et al., 1995b], bei dessen Übersteigen sich die Ordnung des Phasenüberganges erhöht. Dies bestätigte sich auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten DMPC-Simulationen, denn bei sukzessiver Zunahme von  $\omega_{GA}$  erreicht man sehr bald einen Punkt, bei dem die entsprechende Verteilungsfunktion die für eine Umwandlung erster Ordnung charakteristischen zwei Maxima ausbildet (Daten nicht dargestellt). Eine Entscheidung in der oben angerissenen Diskussion können wohl letztendlich nur experimentelle Daten liefern, allerdings ist eine zweifelsfreie praktische Identifikation einer Phasenumwandlung in der unmittelbaren Nähe des kritischen Punktes mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden [Zhang et al., 1992], da sich z. B. bei DSC-Messungen die Trägheit des Meßgerätes und geringste Verunreinigungen auf die Halbwertsbreite der untersuchten Umwandlungen auswirken können.

Mit Hilfe von Abb. 39 lassen sich zusätzlich Informationen über die „kooperative Einheit“ – also die Anzahl von Molekülen, welche gleichzeitig bei  $T = T_m$  ihren Phasenzustand wechseln [Sugár, 1987] – gewinnen, wenn man von der Prämisse ausgeht, daß die simulierte mittlere Clustergröße in direktem Zusammenhang hiermit steht [Mouritsen, 1990]. Bei näherer Überlegung erscheint diese Annahme allerdings nur für Phasenübergänge erster Ordnung exakt gültig zu sein, da nur dann auch gewährleistet ist, daß wirklich die gesamte Domäne „in einem Rutsch“ in die andere Phase übergeht und keine Moleküle - wie bei einem Übergang zweiter Ordnung - zurückbleiben. Nichtsdestotrotz kann man mit den vorhandenen

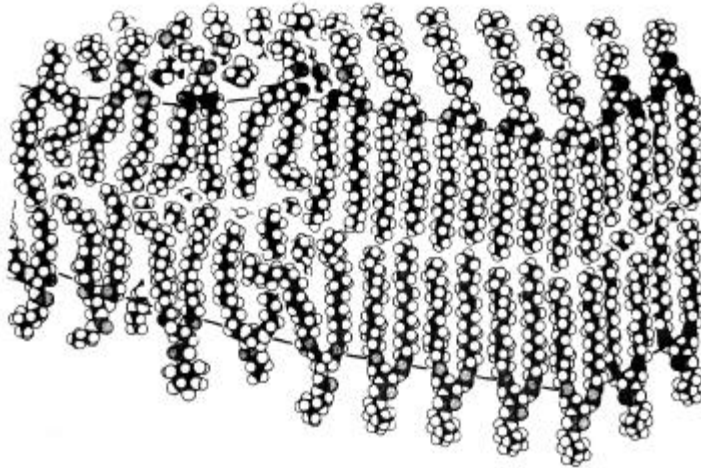


Daten eine grobe Abschätzung durchführen, wenn man die aus Abb. 39 resultierende mittlere Clustergröße als einen oberen Grenzwert ansieht. Nimmt man weiter an, daß die größten der bei der DSC-Messung untersuchten multilamellaren Vesikel eine Oberfläche mit ca.  $5 \cdot 10^5$  Lipidmolekülen besitzen [Biltonen, 1990] und alle eingeschlossenen kleineren Vesikel entsprechend weniger, so ergibt sich als absolute Obergrenze für die kooperative Einheit ein Wert von etwa 2500. Angesichts der Tatsache, daß kalorimetrische Messungen mit extrem niedrigen Heizraten für hochreines DPPC eine kooperative Einheit von etwa 1400 [Albon und Sturtevant, 1978] liefern, scheint sich dieser Betrag in einem durchaus realistischen Rahmen zu bewegen.

Vergleicht man die mittleren Domäneneigenschaften der Gel- bzw. flüssig-kristallinen Cluster in relativer Entfernung zu  $T_m$  untereinander (wie es in den Abbildungen 38 bis 40 geschehen ist), so lassen sich noch einige interessante Effekte erkennen: So nimmt die Anzahl der Geldomänen mit wachsendem Abstand zur Umwandlungstemperatur offensichtlich stärker zu, als dies bei den flüssig-kristallinen Clustern der Fall ist. Die gezeigte Abweichung beruht allerdings hauptsächlich darauf, daß die Anzahl der einzelnen Moleküle, welche zufällig umgewandelt werden und bei der nächsten Untersuchung gleich wieder verschwinden, durch die Zunahme der absoluten Temperatur anwächst (Daten nicht dargestellt). Dies kann man sich leicht plausibel machen, denn der temperaturabhängige Term in Gleichung (47) verhält sich offensichtlich linear bezüglich des Abstandes zu  $T_m$  und wirkt somit in gleicher Weise auf die Gel- bzw. flüssig-kristallinen Cluster, während dies für das Monte Carlo-Entscheidungskriterium  $\exp(-\Delta E/kT)$  nicht der Fall ist (siehe Kapitel 3), was zu der erwähnten Asymmetrie führt. Auch bezüglich der Domänengröße zeigen sich dahingehend Unterschiede, daß bei gleicher Entfernung von  $T_m$  die Gelcluster im Durchschnitt weniger dicht gepackt sind und geringfügig aber reproduzierbar mehr Lipidmoleküle als ihre flüssig-kristallinen Pendants beinhalten. Dieses Phänomen konnte tatsächlich auch experimentell mittels ESR-Studien beobachtet werden [Sankaram et al., 1992] und zeigt damit eine unerwartete Übereinstimmung zwischen theoretischen und praktischen Methoden. Vom rein mathematischen Standpunkt aus gesehen, sind die Geldomänen sehr wahrscheinlich als Folge der höheren Temperatur größer und verzweigter, da der Term  $\exp(-\Delta E/kT)$  somit einen kleineren Exponenten besitzt und Zustandsänderungen entsprechend leichter akzeptiert werden. Anschaulich gesehen bedeutet das, daß bei einer bestimmten Temperatur  $T_1 > T_m$  die Wahrscheinlichkeit, daß ein neues Gelteilchen an der Grenze eines

Gelclusters entsteht, größer ist als bei der analogen Situation für einen flüssig-kristallinen Cluster bei  $T_2 < T_m$  (wobei  $T_1 - T_m = T_m - T_2$  gilt). Dieser „offensivere“ Expansionsdrang der Geldomänen führt damit zwangsläufig sowohl zu einer Vergrößerung als auch zu einer stärkeren Verzweigung, denn einige der neu entstandenen (energetisch ungünstigen) Gelteilchen werden im folgenden Monte Carlo-Schritt durch weitere zufällig in der Nachbarschaft entstehende Gelteilchen stabilisiert, und somit bleiben einige der neuen Strukturen eher erhalten als dies bei den flüssig-kristallinen Domänen der Fall ist.

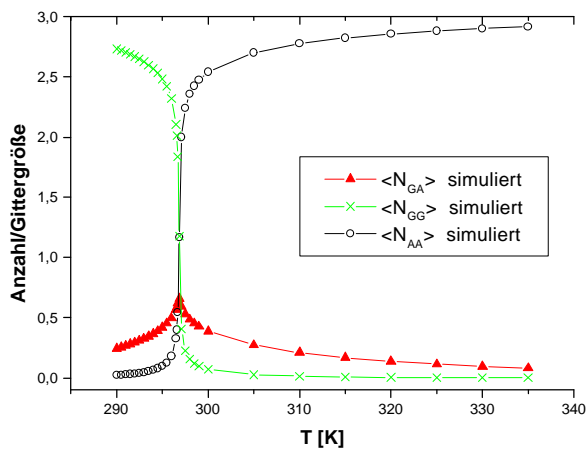
Die Beobachtung, daß bei der Umwandlungstemperatur  $T_m$  große und stark fluktuierende Domänen unterschiedlicher Phasen koexistieren, wird heute durch viele Untersuchungen bestätigt [z. B. Mouritsen und Kinnunen, 1996; Dolainsky et al., 1997], erste Überlegungen in diese Richtung wurden jedoch schon vor einiger Zeit von *Papahadjopoulos et al.* [1973] bei Permeabilitätsmessungen von  $\text{Na}^+$ -Ionen aus Lipidvesikeln unternommen. Der Grund hierfür war der, daß bei den entsprechenden  $T_m$ -Werten der Vesikel jeweils ein deutliches Maximum (und eben kein kontinuierlicher Anstieg) der Permeabilität festgestellt werden konnte, woraus die These geboren wurde, daß die Diffusion möglicherweise durch das Vorhandensein von Domänengrenzen zwischen koexistierenden Molekülen in unterschiedlichen Phasen und den damit verbundenen Fehlstellen begünstigt wird (Abb. 42).



**Abbildung 42:** *Kalottenmodell einer Phospholipid-Membran, in der eine Geldomäne (rechts) und eine flüssig-kristalline Domäne (links) miteinander koexistieren [Mouritsen et al., 1995b].*

Diese Idee fand vorerst wenig Anklang [z. B. Nagle und Scott, 1978], später konnte allerdings auch mit Hilfe von Monte Carlo-Simulationen gezeigt werden, daß sich in die Membran eingelagerte Fremdmoleküle bevorzugt zwischen den koexistierenden Domänen aufhalten [Jørgensen et al., 1991], weil die Raumaufteilung bei gleichphasigen Nachbarn offenbar deutlich effizienter ist als bei ungleichphasigen und zwischen letzteren somit mehr freies Volumen zur Verfügung stehen, was wiederum die Permeation begünstigt. Diese Fehlstellen haben aufgrund der starken Fluktuationen bei  $T_m$  nur eine sehr geringe Lebensdauer von ca.  $10^{-4}$  Sekunden für reine Lipide [Mouritsen und Kinnunen, 1996], was aber bei genügend schnellen Prozessen durchaus für eine Diffusion ausreichen kann.

Die obigen Ausführungen lassen daher vermuten, daß es mit Hilfe der aus der DMPC-Simulation gewonnenen Daten für  $N_G$ ,  $N_A$  und  $N_{GA}$  eigentlich möglich sein sollte, Aussagen über das Permeabilitätsverhalten des reinen Lipides bei unterschiedlichen Temperaturen zu machen, zumal unter Verwendung der Gleichungen (24) und (25) direkt die entsprechenden Mittelwerte für  $N_{AA}$  bzw.  $N_{BB}$  ermittelt werden können (Abb. 43).



**Abbildung 43:** *Mittlere relative Anzahl der G-G-, A-A- und G-A-Paare für DMPC als Funktion der Temperatur; die Daten wurden mit Hilfe der Gleichungen (24) und (25) aus den Simulationsergebnissen berechnet; es gilt stets:  $N_{GG} + N_{AA} + N_{GA} = 6/2$ .*

In obigem Diagramm wird noch einmal deutlich, daß die Anzahl der gleichphasigen Nachbarn mit Annäherung an  $T_m$  deutlich stärker zunimmt als die entsprechende Phasengrenzfläche, also die Umwandlung – wie schon erwähnt – durch Vergrößerung bereits vorhandener Cluster und nicht durch die Entstehung neuer Domänen voranschreitet.

Trotz der massiven Domänenfluktuationen ist man also somit in der Lage, durch eine große Zahl von Stichproben ein relativ genaues Bild von den jeweiligen Strukturen der existierenden Phasen zu bekommen und hierüber direkte Rückschlüsse über die Anzahl der entstehenden Fehlstellen zu ziehen. Um aus diesen Informationen nun unmittelbar die entsprechenden Permeabilitäten zu berechnen, müssen jedoch noch einige Modellannahmen gemacht werden [Cruzeiro-Hansson und Mouritsen, 1988]:

Bezüglich der Membranpermeabilität können in dem beobachteten Lipidsystem drei ausgezeichnete Orte unterschieden werden, nämlich eine reine Gel- bzw. flüssig-kristalline Umgebung (mitten in einer Domäne) und das Grenzgebiet zwischen zwei Domänen. Jedem dieser Orte kann eine Zahl  $P$  zugeordnet werden, mit der dort ein Permeationsvorgang stattfindet. Die Gesamtwahrscheinlichkeit  $P_{ges}$  für das untersuchte Lipidsystem ergibt sich somit zu

$$P_{\text{ges}}(T) = \frac{N_{\text{GG}}(T) \cdot P_{\text{G}} + N_{\text{AA}}(T) \cdot P_{\text{A}} + N_{\text{GA}}(T) \cdot P_{\text{GA}}}{N} \quad (50)$$

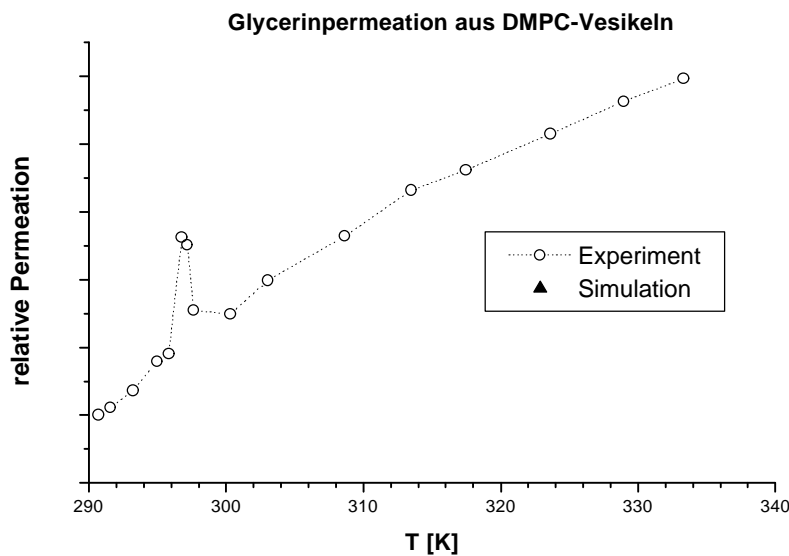
$P_{\text{G}}$ ,  $P_{\text{A}}$  und  $P_{\text{GA}}$  bezeichnen hierbei die jeweiligen Permeationswahrscheinlichkeiten für Geldomänen, flüssig-kristalline Domänen und den Grenzbereich. Um nun diese Gleichung mit experimentellen Daten verknüpfen zu können und konstante Faktoren zu eliminieren, definiert man eine relative Permeabilität  $Y$  bezüglich eines willkürlichen Standardzustandes ( $^{\circ}$ ) und erhält somit unter Berücksichtigung von *Mouritsen et al.* [1995b]:

$$Y = \sqrt{\frac{T \cdot A_{\text{ges}}(T)}{T^{\circ} \cdot A_{\text{ges}}^{\circ}}} \frac{P_{\text{G}}(N_{\text{GG}} - N_{\text{GG}}^{\circ}) + P_{\text{A}}(N_{\text{AA}} - N_{\text{AA}}^{\circ}) + P_{\text{GA}}(N_{\text{GA}} - N_{\text{GA}}^{\circ})}{(P_{\text{G}}N_{\text{GG}}^{\circ} + P_{\text{A}}N_{\text{AA}}^{\circ} + P_{\text{GA}}N_{\text{GA}}^{\circ})} \quad (51)$$

Der Term unter der Wurzel repräsentiert einen zusätzlichen Faktor, der die Gleichung noch bezüglich der Temperatur wichtet, wobei  $A_{\text{ges}}$  hierin für die Gesamtfläche des untersuchten Teilchenensembles steht. Zur Berechnung wurde daher für DMPC ein durchschnittlicher Flächenbedarf pro Molekül von  $48 \text{ \AA}^2$  für die Gel- und  $60 \text{ \AA}^2$  für die flüssig-kristalline Phase angenommen [Petrache et al., 1998] und entsprechend mit der jeweiligen Anzahl der Teilchen pro Phase multipliziert und anschließend addiert. Wegen der sprunghaften Änderung von  $N_{\text{G}}$  bzw.  $N_{\text{A}}$  beim Überschreiten der Phasenumwandlungstemperatur wird  $A_{\text{ges}}$  somit ebenfalls einen sigmoiden Verlauf besitzen, womit der Tatsache Rechnung getragen wird, daß durch die größeren Abstände der Kopfgruppen untereinander die Permeation für ein Fremdmolekül in der flüssig-kristallinen Phase erleichtert wird. Nun mag es auf den ersten Blick befremdlich erscheinen, daß man plötzlich die Flächenänderung der einzelnen Teilchen mit dem Phasenübergang berücksichtigt, die benötigten Werte für  $N_{\text{G}}$  und  $N_{\text{A}}$  jedoch durch Simulation auf einem festen Gitter ermittelt. Hierbei muß allerdings bedacht werden, daß das verwendete Modell diese Änderung sehr wohl miteinbezieht – sie steckt nämlich nach Gleichung (47) implizit in der Größe  $\Delta N_{\text{GA}}$  und hat somit einen direkten Einfluß auf das untersuchte Molekül – wogegen der feste Abstand der Teilchen auf dem Gitter für die Simulation ohne Bedeutung ist und lediglich der Wahrung des Eigenvolumens dient. Aus diesem Grund wäre es daher beispielsweise auch mit gleichem Ergebnis möglich (wenn auch etwas unanschaulich), ein quadratisches Gitter zu verwenden und trotzdem sechs Nachbarn für jedes Molekül zu untersuchen, obwohl sie in diesem Fall keine äquivalenten Abstände zu dem jeweiligen Zentralteilchen besäßen.

Der große Bruch in Gleichung (51) beinhaltet im Grunde die Information, auf welche Weise sich die Struktur der vorhandenen Domänen als Funktion der Temperatur verändert, allerdings ist über die Absolutwerte der Permeationswahrscheinlichkeiten nichts bekannt [Cruzeiro-Hansson und Mouritsen, 1988], so daß diese als anpaßbare Parameter, jedoch mit der oben begründeten Restriktion  $P_{GA} \gg P_G, P_A$ , verwendet werden.

Um die Stichhaltigkeit des Modells zu testen, wurden experimentelle Permeationsdaten für die Diffusion von Glycerin-Molekülen durch DMPC-Vesikel verwendet und auf einen Standardzustand bei 290.7 K normiert [Elbert, persönliche Mitteilung], so daß nur die relative Veränderung der Permeabilität als Funktion der Temperatur von Bedeutung war. Anschließend wurde eine Simulation der Y-Werte unter Variation von  $P_A, P_B$  und  $P_{AB}$  bei den entsprechenden Temperaturen durchgeführt, und die so berechnete Kurve durch Fehlerquadratminimierung an die Meßdaten angepaßt. Das Ergebnis ist in Abb. 44 zusammengefaßt:



**Abbildung 44:** Relative Glycerinpermeation aus DMPC-Vesikeln [Elbert, persönliche Mitteilung], simuliert mit Hilfe von Gleichung (51) unter Variation von  $P_G, P_A$  und  $P_{GA}$ ; es ergibt sich:  $P_G:P_A:P_{GA} = 1:1:67.5$ .

Wenn man den hier vorgestellten Ansatz zur Anpassung von theoretischen Ergebnissen an experimentelle Daten verwendet, so wird man mit Sicherheit keine „richtigen“ Absolutwerte für die Permeation bzw. die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten erhalten (dazu ist das Modell viel zu einfach konstruiert), daher werden in obiger Abbildung auch nur relative

Werte verwendet und die wenig aussagekräftigen Zahlenangaben auf der Ordinate nicht dargestellt. Vielmehr interessiert hier die Frage, ob es mit den implementierten fundamentalen Annahmen über das Verhalten der Lipidmoleküle auf molekularer Basis möglich ist, die makroskopisch beobachtete Reaktion des Systems nachzuvollziehen und somit unter Umständen erklärbar zu machen. Wie man aus Abb. 44 entnehmen kann, sind die Werte der Permeationskurve in dem Bereich bis kurz nach  $T_m$  recht gut wiedergegeben, im weiteren Verlauf jedoch zeigen die simulierten Daten eine falsche Temperaturabhängigkeit und entfernen sich immer weiter von den experimentellen. Der Grund hierfür ist möglicherweise darin zu sehen, daß die Permeationswahrscheinlichkeiten – anders als in dem verwendeten Modell angenommen – ebenfalls eine Funktion der Temperatur sind, was in dem „unspektakulären“ Bereich bei  $T > T_m$  mit den immer geringer werdenden Änderungen von  $N_{GG}$ ,  $N_{AA}$  und  $N_{GA}$  zunehmend an Bedeutung gewinnt, so daß ein stark mit  $T$  zunehmendes  $P_A$  durchaus eine weit bessere Anpassung liefern könnte. Auf eine genauere Untersuchung diesbezüglich wurde jedoch verzichtet, da die Einführung von drei weiteren anpaßbaren Parametern bezüglich der Temperaturabhängigkeit zwar vermutlich hervorragende Simulationen liefern, aber andererseits auch die Aussagekraft des verwendeten Modells deutlich schmälern würde, denn schließlich läßt sich mit einer hinreichenden Zahl von variablen Größen beinahe jede Kurve nachbilden. Die entscheidende Beobachtung ist vielmehr die, daß man mit Hilfe der Annahme einer bevorzugt an Domänengrenzen ablaufenden Diffusion von Fremdmolekülen in der Lage ist, das scharfe Maximum der Permeationskurve bei  $T = T_m$  unter Verwendung des simulierten mikroskopischen Domänenverhaltens nachzuvollziehen. Für das Verhältnis  $P_G:P_A:P_{GA}$  ergibt sich dabei 1:1:67.5, was einerseits der Forderung genügt, daß  $P_{GA}$  weitaus am größten sein muß, aber andererseits wegen dem eher unlogischen Ausdruck  $P_G = P_A$  auch den Verdacht einer nicht berücksichtigten Temperaturabhängigkeit bestätigt. In der Literatur findet sich bei der Anpassung an eine experimentelle Permeationskurve von *Papahadjopoulos et al.* [1973] ein ähnliches Verhältnis [Cruzeiro-Hansson und Mouritsen, 1988; Mouritsen et al., 1995b], leider ist der Kurvenverlauf dort jedoch nur bis kurz nach  $T_m$  dargestellt, so daß nicht nachvollzogen werden kann, wie die Güte der Simulation bei höheren Temperaturen ist, zumal *Papahadjopoulos et al.* in ihrem Artikel darauf hinweisen, daß die Permeabilität auch hier mit steigender Temperatur oberhalb von  $T_m$  weiter zunimmt. Die absoluten Beträge der P-Werte weichen allerdings deutlich von den in dieser Arbeit gefundenen ab, was damit zusammenhängt, daß Gleichung (51) zwar auf dem

Gedankengang von *Cruzeiro-Hansson und Mouritsen* fußt, dort aber ein formelmäßig anderer Weg beschritten wurde, was jedoch auf die relativen Werte keinen Einfluß hat, und dementsprechend liegt auch das Verhältnis von  $P_G$  bzw.  $P_A$  zu  $P_{GA}$  in derselben Größenordnung. Ohnehin wird in der oben durchgeführten Monte Carlo-Simulation die zweite Hälfte der Doppelschicht bei der Untersuchung der Lipiddomänen gar nicht berücksichtigt, da sich die beiden Hälften diesbezüglich als unabhängig erwiesen haben [Sillerud und Barnett, 1982]. Die Diffusion eines Fremdmoleküls aus einem DMPC-Vesikel erfolgt jedoch zwangsläufig durch die gesamte Doppelschicht, was aber bei der Betrachtung relativer Größen keine Auswirkungen auf das angewendete Prinzip hat.

#### 4.2.2.1.2 Fazit

Mit dem oben beschriebenen simplen Zweizustandsmodell lassen sich nach Anpassung an experimentelle Meßwerte wie z. B.  $c_p$ -Kurven eine ganze Reihe interessanter Informationen bezüglich des mikroskopischen Domänenverhaltens der Lipidmoleküle gewinnen. Dabei kann man sich wiederum den Umstand zunutze machen, daß die aus der hohen Kooperativität der Einzelteilchen resultierenden kollektiven Eigenschaften mit sehr einfachen mathematischen Ansätzen relativ gut beschreibbar sind, zumal andernfalls eine entsprechende Monte Carlo-Simulation wegen des hohen Rechenaufwands gar nicht durchführbar wäre. Die Einfachheit des gewählten Modells ermöglicht es zudem auch, zusätzliche Komplikationen wie beispielsweise integrale oder periphere Proteine in das Lipidensemble miteinzubeziehen und ihre Auswirkungen auf die entstehenden Domänenstrukturen zu untersuchen [Heimburg und Marsh, 1996].

#### 4.2.2.2 Das Pink-Modell

Im Gegensatz zu dem oben verwendeten Ansatz, bei welchem der Versuch unternommen wird, makroskopisch meßbare Daten (DSC-Kurven) direkt mit mikroskopischen Strukturen zu korrelieren, beschreitet das erstmals von *Pink und Chapman* [1976] vorgeschlagene Modell einen anderen Weg: Die Grundstrategie besteht darin, auf molekularer Ebene möglichst alle für das kollektive Verhalten der Lipidmoleküle maßgeblichen Wechselwirkungen zu berücksichtigen und in einer Rechenvorschrift zusammenzufassen, mit der sich dann ein entsprechendes Teilchenensemble beschreiben läßt. Der Abgleich zwischen Theorie und Experiment erfolgt hier also nicht über die Anpassung der simulierten Daten an



makroskopische Meßergebnisse sondern man „füttert“ vielmehr das System mit experimentellen Informationen auf molekularer Basis und beobachtet dann anhand von Antwortfunktionen (wie z. B. Umwandlungstemperatur und Wärmekapazität), ob sich das Ensemble während der Simulation wie ein „richtiges“ Lipidsystem verhält. Ist dies der Fall, so können aufgrund der generierten Daten wiederum Rückschlüsse auf experimentell sehr schwer oder gar nicht zugängliche Phänomene (wie z. B. die mittlere Domänengröße) gezogen werden.

#### 4.2.2.2.1 Herleitung des Modells

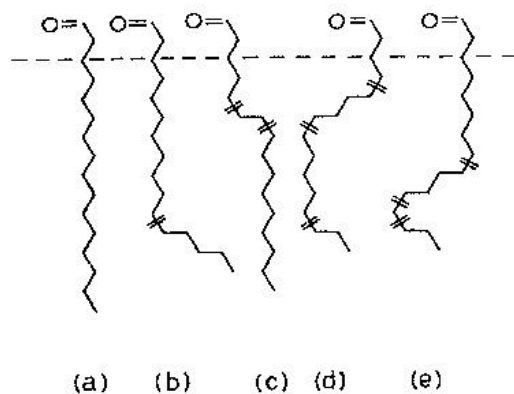
Grundsätzlich wird auch in den hier ausgeführten Überlegungen ein zweidimensionales trianguläres Gitter mit periodischen Grenzen zugrunde gelegt, allerdings mit dem Unterschied, daß sich auf jedem Gitterpunkt jetzt eine einzelne Acylkette statt eines gesamten Moleküls befindet [Pink und Chapman, 1979] und die Bindungswinkel zwischen den Kohlenstoffatomen im folgenden der Einfachheit halber stets mit  $120^\circ$  angesetzt werden. Die chemische Verknüpfung über das Glycerin-„Rückgrat“ wird dabei vernachlässigt, ein entsprechender Beitrag für die Kopfgruppenwechselwirkungen geht aber dennoch in die Simulation jeder Kette mit ein. Außerdem wird wegen der bereits erwähnten geringen gegenseitigen Beeinflussung der Lipidschichten wiederum nur eine Hälfte der Doppelschicht untersucht, und es werden auch wieder nur Wechselwirkungen zwischen nächsten Nachbarn zugelassen.

Um die Details des *Pink*-Modells zu verstehen, ist es sinnvoll, sich zunächst die allgemeine Struktur des entsprechenden Energieoperators  $\Omega$  für ein Ensemble aus  $N$  Teilchen eines Einkomponenten-/Zweiphasensystemes zu vergegenwärtigen [Dammann et al., 1994]:

$$\Omega = \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^K [(\Lambda_k + \Pi A_k) \mathbf{d}_{ik}] - \frac{J}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^K (V_{kl} \mathbf{d}_{ik} \mathbf{d}_{jl}). \quad (52)$$

Die auf den ersten Blick etwas verwirrende Gleichung gliedert sich offensichtlich in zwei Terme, von denen letzterer eine gewisse Ähnlichkeit mit Gleichung (27) aufweist, denn auch hier wird anscheinend die Wechselwirkung eines jeden Teilchens mit seinen sechs nächsten Nachbarn untersucht. In der Tat ist dies der Fall, nur geht der hier vorgestellte Ansatz noch weiter und berücksichtigt, daß die Kohlenwasserstoffketten in  $K$  unterschiedlichen Rotationsisomeren vorliegen können und sich die *van der Waals*-Wechselwirkungen somit durch zunehmende Abweichung von der all-trans Konformation immer stärker

reduzieren [Pink et al., 1980a].  $\underline{V}$  beschreibt daher eine  $K \cdot K$  große dimensionslose Matrix, welche die entsprechenden Parameter enthält, und die Summen über  $k$  und  $l$  sowie die *Kronecker*-Operatoren  $\delta_{xy}$  sorgen lediglich dafür, daß das jeweils passende Element  $V_{kl}$  „herausgefischt“ wird. Auf diese Weise wird die gesamte Information bezüglich der Kettenkonformeren in die  $V$ -Matrix gepackt, und die Simulation läßt sich auf einem zwei- statt auf einem dreidimensionalen Gitter ausführen, was den Rechenaufwand erheblich reduziert. Zuvor stellt sich aber noch die Frage, nach welchen Kriterien  $\underline{V}$  konstruiert werden soll, denn es müssen zwei grundlegende Effekte bei den Wechselwirkungen der Ketten untereinander beachtet werden, wie man sich anhand von Abb. 45 verdeutlichen kann:



**Abbildung 45:** Schematische Darstellung von fünf unterschiedlichen Rotationsisomeren einer Kohlenwasserstoffkette zur Verdeutlichung des Pink-Modells [Caillé et al., 1980]; die C-C-Bindungswinkel werden vereinfachend mit  $120^\circ$  angesetzt und die eingezeichneten Doppelbalken markieren die Bindungen, um welche eine gauche-Rotation stattgefunden hat, wobei die Kettensegmente oberhalb der gestrichelten Linie als unbeweglich definiert werden.

Zum einen ist es offensichtlich, daß die Anzahl der gauche-Konformeren die Gesamtwechselwirkung beeinflusst, zum anderen spielt aber auch deren Position im Molekül eine ganz entscheidende Rolle, wie beispielsweise bei einem Vergleich von (a) mit (d) bzw. (e) deutlich wird, da alle der ersten gauche-Bindung nachfolgenden Segmente aufgrund ihrer räumlichen Orientierung wesentlich geringere *van der Waals*-Wechselwirkungen mit ihrem Nachbarn eingehen können, als wenn zwei all-trans-Ketten parallel zueinander liegen. Außerdem muß man noch bedenken, daß mit der Einführung von gauche-Bindungen zwar die effektive Länge abnimmt, aber durch die thermische Bewegung der Raumbedarf in der Breite dementsprechend zunimmt, wodurch sämtliche Wechselwirkungen – auch die zwi-

schen den noch vorhandenen parallelen Kettensegmenten – zusätzlich abgeschwächt werden. Die mathematische Formulierung dieser Einflüsse zwischen zwei Ketten in den Zuständen  $k$  bzw.  $l$  erfolgt nach *Mouritsen et al.* [1983] mit Hilfe der folgenden Gleichung:

$$V_{kl} = \left( \frac{r_G^{Zy}}{\sqrt{r_k^{Zy} r_l^{Zy}}} \right)^5 \frac{\sum_{p=1}^{M-1} (S_{kp}) \sum_{q=1}^{M-1} (S_{lq})}{\sum_{p=1}^{M-1} (S_{Gp}) \sum_{q=1}^{M-1} (S_{Gq})}. \quad (53)$$

$M$  beschreibt dabei die Zahl der in der Acylkette vorhandenen C-Atome, und  $S_{xy}$  ist ein Ordnungsparameter, welcher den mittleren Winkel  $\theta$  zwischen den einzelnen C-C-Bindungen und der Membrannormalen – welche als Parallele zu dem ersten auf die Carboxylgruppe folgenden Kettensegment definiert ist [Seelig und Seelig, 1974] – beinhaltet, wobei sich der Index  $G$  auf den Grundzustand (eine all-trans-Kette) bezieht [Caillé et al., 1980]:

$$S_{xy} = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{xy} - 1). \quad (54)$$

Während hierdurch Anzahl und Position der gauche-Konformerer in das Modell eingehen, wird der oben erwähnten zunehmenden Entfernung der Ketten voneinander dadurch Rechnung getragen, daß sie theoretisch wie Zylinder mit konstantem Volumen behandelt werden [Corvera et al., 1993]. Eine Verkürzung der effektiven Kettenlänge führt damit direkt zu einer entsprechenden Vergrößerung des fiktiven Radius  $r^{Zy}$ , woraus sich wegen der  $r^5$ -Abhängigkeit der *van der Waals*-Wechselwirkungen zwischen Kettenmolekülen [Israelachvili, 1992] der in Gleichung (53) dargestellte Klammerausdruck ergibt.  $r_G^{Zy}$  bezeichnet analog den Radius eines all-trans-Zylinders und hängt somit direkt mit dem Flächenbedarf der entsprechenden Kopfgruppe zusammen. Der Parameter  $J$  in Gleichung (52) schließlich beinhaltet einen Energiebetrag für die Wechselwirkung zweier all-trans-Ketten der Länge  $M$ , welcher dann mit dem entsprechenden dimensionslosen Faktor aus der  $V$ -Matrix gewichtet wird.

Die erste Doppelsumme in Gleichung (52) ist hingegen unabhängig von der Konformation der nächsten Nachbarn und außerdem positiv, in ihr sind also somit - im Gegensatz zu der vorher betrachteten Vierfachsumme - die repulsiven Wechselwirkungen zu finden. Diese

setzen sich zusammen aus einer zu der Anzahl der gauche-Konformerer proportionalen Energiegröße  $\Lambda$  für die sterischen Wechselwirkungen der Ketten, sowie einem Beitrag für sowohl sterische als auch elektrostatische Wechselwirkungen der Kopfgruppen untereinander, welcher eine Funktion des jeweiligen Flächenbedarfs  $A$  ist [Corvera et al., 1993]. Alle restlichen Faktoren diesbezüglich steckt man in einen konstanten Term  $\Pi$ , der wegen seiner Dimension auch als „innerer Druck“ des Systems bezeichnet wird [Mouritsen et al., 1983].

Um den Energieoperator  $\Omega$  in eine etwas handlichere Form zu bringen erscheint es weiterhin angebracht, wieder eine Variablentransformation von  $\delta$  in  $\sigma$  gemäß Gleichung (28) durchzuführen, und so die bereits simulationstechnisch vertrauten Gefilde des *Ising*-Modells zu erreichen, zumal die in der Literatur angewendete Vorgehensweise entweder gar nicht oder nur äußerst nebulös beschrieben wird. Deshalb geht man zunächst der Einfachheit halber wieder davon aus, daß die Lipidmoleküle lediglich zwei Zustände – einen Grundzustand  $G$  (Gelpase) und einen angeregten Zustand  $A$  (flüssig-kristalline Phase) – einnehmen können (also  $K = 2$ ), so daß sich die Summen über  $k$  und  $l$  entsprechend vereinfachen und man nach einiger Umformung in Analogie zu Gleichung (33) den folgenden Ausdruck erhält:

$$\dot{U} = E_0 - \frac{J}{8} (V_{GG} - 2V_{GA} + V_{AA}) \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 (\delta_i \delta_j) - h \sum_{i=1}^N \delta_i, \quad (55)$$

mit

$$h = \frac{6J}{4} (V_{GG} - V_{AA}) + \frac{1}{2} \Pi (A_A - A_G) + \frac{1}{2} (\Lambda_A - \Lambda_G). \quad (56)$$

Gleichung (55) läßt nun in ihrer Struktur wieder eine deutliche Analogie zu (33) erkennen, der Klammerausdruck vor der Doppelsumme verkörpert dabei offensichtlich eine Art Nichtidealitätsparameter, welcher entsprechend mit der Konformation der nächsten Nachbarn zusammenhängt, wogegen der immer positive Ausdruck  $h$  ein Maß für die allgemeine Energiedifferenz zwischen dem Grund- und dem angeregten Zustand darstellt.  $E_0$  repräsentiert wieder einen von  $\sigma$  unabhängigen Term, welcher bei den folgenden Untersuchungen jedoch ohne Bedeutung ist. Bei den ganzen bisherigen Ausführungen wurde allerdings noch nicht berücksichtigt, daß der angeregte Zustand der Kohlenwasserstoffketten energetisch entartet ist, d. h. es gibt sehr viele Konformationen, die dieselbe Gesamtenergie aufweisen

[Pink und Chapman, 1979]. Da der Entartungsgrad  $g$  des entsprechenden Energiezustandes in der Zustandssumme vor der Exponentialfunktion steht, wie es schematisch in Gleichung (57) dargestellt ist (siehe auch Kapitel 3) [Mouritsen et al., 1983]

$$Z = \sum_K g_K \cdot e^{-\frac{\tilde{U}(K)}{kT}}, \quad (57)$$

kann man diesen auch mit Hilfe der Logarithmusregeln als  $\exp[\ln(g)]$  in den Energieoperator ziehen und erhält für den Übergang eines Teilchens von einem Zustand in den anderen ( $\sigma^{\text{neu}} = -\sigma^{\text{alt}}$ ) den folgenden Ausdruck für die hiermit verbundene Energiedifferenz  $\Delta E = E(\sigma^{\text{neu}}) - E(\sigma^{\text{alt}})$ :

$$\Delta E = \mathbf{s}^{\text{alt}} \left[ \frac{J}{4} (V_{\text{GG}} - 2V_{\text{GA}} + V_{\text{AA}}) \sum_{j=1}^6 (\mathbf{s}_j) + \left\{ 2h - kT \ln \left( \frac{g^{\text{neu}}}{g^{\text{alt}}} \right) \right\} \right]. \quad (58)$$

Bei genauerer Betrachtung der Formelstruktur zeigen sich sehr deutliche Parallelen zu der Schlüsselgleichung (47) für das bereits untersuchte Zweizustandsmodell, denn der Term  $\sigma^{\text{alt}}$  ließe sich bei dem hier verwendeten Formalismus ja entweder durch '+' oder '-' ersetzen, und der Klammerausdruck vor der Summe über die nächsten Nachbarn entspricht vom Inhalt her dem Kooperativitätsparameter  $\omega_{\text{GA}}$ . Besonders interessant ist jedoch der Vergleich des Ausdrucks in den geschweiften Klammern mit seinem Analogon in (47): Berücksichtigt man nämlich, daß für die statistische Definition der Entropie die Beziehung

$$S = k \cdot \ln(g) \quad (59)$$

gilt [Wedler, 1987] und  $h$  wie bereits erwähnt die Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand beschreibt, so stellt der Klammerausdruck nichts anderes dar als die auf der *Gibbs-Helmholtz*-Gleichung (21) beruhende Definition von  $\Delta G$ . Diese Beobachtung ist für die Erstellung des Simulationsmodells von großer Bedeutung, denn durch sie kann man, da  $\Delta G$  für  $T = T_m$  verschwindet, sofort die folgende Forderung aufstellen:

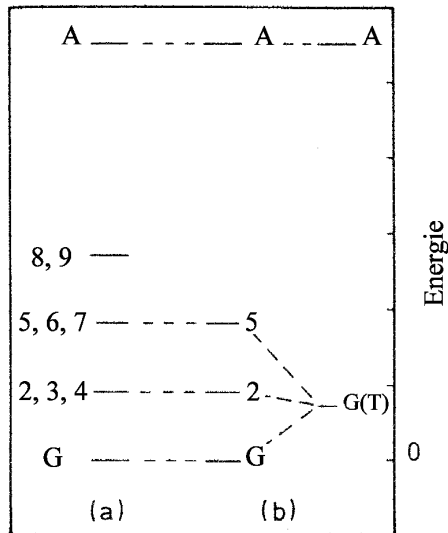
$$2h = \frac{6J}{2} (V_{\text{GG}} - V_{\text{AA}}) + \Pi(A_A - A_G) + (\Lambda_A - \Lambda_G) = kT_m \ln \left( \frac{g_A}{g_G} \right). \quad (60)$$

Diese Beziehung ist deshalb so wichtig, da – wie später noch gezeigt wird – alle vorkommenden Größen bis auf den Wechselwirkungsparameter  $J$  bekannt sind, so daß dieser hierdurch an die entsprechende experimentell ermittelte Umwandlungstemperatur angepaßt werden kann. Der Grund für die Verwendung von  $g_A$  und  $g_G$  in Gleichung (58) anstelle der Ausdrücke  $g^{\text{alt}}$  und  $g^{\text{neu}}$  ist der, daß im weiteren Verlauf zwischen dem all-trans- und dem flüssig-kristallinen Zustand der Acylketten noch acht der Gelphase zuzuordnende Zwischenzustände mit unterschiedlichen Konformationen und unterschiedlichem  $g$  (bis  $K = 10$ ) eingeführt werden, sich die Entropieänderung in Gleichung (60) jedoch unverändert nur auf die Gesamtdifferenz  $A-G$  bezieht und  $J$  als Maß für die Wechselwirkung zwischen zwei all-trans-Ketten [Corvera et al., 1993] ohnehin von der Anzahl der intermediären Zustände unabhängig sein sollte.

Die Monte Carlo-Simulation auf Grundlage des *Pink*-Modells erfolgt nun ebenso wie bei dem Zweizustandsmodell in Kapitel 4.1.2.1 nach der *Glauber*-Methode mit der Schlüsselgleichung (58) – in Analogie zu (47) – zur Beschreibung der jeweils auftretenden Energiedifferenzen. Der Kooperativitätsparameter  $J$  wird allerdings im Gegensatz zu  $\omega_{GA}$  nicht durch den Vergleich der theoretischen mit der experimentellen Antwortfunktion (DSC-Kurve) individuell ermittelt, sondern bereits vor der Simulation aufgrund von mikroskopischen Größen und dem experimentellen  $T_m$ -Wert pauschal festgelegt, so daß die Frage besonders interessant scheint, ob sich hiermit tatsächlich ein kooperatives Verhalten der Lipidmoleküle nachvollziehen läßt.

Die oben hergeleiteten Beziehungen (58) und (60) sind allerdings nur anwendbar, wenn bei der Simulation lediglich zwei Zustände berücksichtigt werden ( $K = 2$ ), da im Falle eines Ansatzes mit  $K > 2$  bereits die Variablentransformation (28) in dieser Art nicht mehr durchgeführt werden kann und die gesamte Herleitung somit hinfällig wird. Um nun trotzdem den Einfluß der unterschiedlichen Kettenkonformerer mit dem hier verwendeten Modell zu berücksichtigen, kann man sich jedoch den Umstand zunutze machen, daß die Übergänge zwischen den oben erwähnten neun Gelphasenkonformationen in Wirklichkeit etwa um den Faktor  $10^4$ - $10^5$  schneller erfolgen als generell zwischen der Gel- und der flüssig-kristallinen Phase [Lookmann et al., 1982], so daß man – wenn das Augenmerk auf dem Hauptphasenübergang liegt – das Zehnzustandsmodell wie ein Zweizustandsmodell behandeln kann, bei dem sich die Parameter  $V_G$ ,  $\Lambda_G$ ,  $A_G$  und  $g_G$  aus den temperaturabhängigen Mittelwerten der

unterschiedlichen Grundzustände zusammensetzen. Dabei ist es nach *Pink et al.* [1980b] nicht einmal notwendig, alle neun Gelphasenzustände in die Berechnung miteinzubeziehen, sondern man kann sich mit der Mittelung über drei ausgewählte Konformationen begnügen, welche formal den Zuständen G, 2 und 5 entsprechen. Zur Veranschaulichung dieser Argumentation ist das entsprechende Energiediagramm in Abb. 46 wiedergegeben:



**Abbildung 46:** Schematisches Energiediagramm der zehn Zustände des Pink-Modells (a) und der drei ausgewählten Gelphasenkonformationen G, 2 und 5 (b) für das Zweizustandsmodell mit temperaturabhängigem Grundzustand  $G(T)$ ; Diagramm nach *Pink et al.* [1980b].

Anschaulich gesehen lassen sich die drei ausgewählten Konformationen einer all-trans-Kette (G), einer Kette mit einer gauche-Bindung in der Nähe der Methylgruppe (2) und einer Kette mit einer gauche<sup>±</sup>-trans-gauche<sup>±</sup>-Sequenz (5) zuordnen, welche zusammen eine Auftrittswahrscheinlichkeit von annähernd eins besitzen, so daß die Vernachlässigung der anderen Zustände nicht signifikant ins Gewicht fällt [*Pink et al.*, 1980b]. Für den temperaturabhängigen Mittelwert einer Eigenschaft O ergibt sich somit

$$O(T) = \frac{\sum_{i=G,2,5} \left[ O_i \cdot g_i \cdot e^{-\left(\frac{\Pi A_i + \Lambda_i}{kT}\right)} \right]}{\sum_{i=G,2,5} \left[ g_i \cdot e^{-\left(\frac{\Pi A_i + \Lambda_i}{kT}\right)} \right]}, \quad (61)$$

wobei auf die Ermittlung und den Betrag der dabei verwendeten physikalischen Daten im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

#### 4.2.2.2 Auswahl der mikroskopischen Größen

Wie bereits erwähnt, kann man nach *Pink et al.* [1980a] außer den Zuständen G (strikte all-trans-Konformation der Lipidkette) und A (Lipid in der flüssig-kristallinen Phase mit einer großen Anzahl von gauche-Konformeren) noch acht weitere definieren, welche alle samt intermediäre Konformationen mit eins bis drei gauche-Bindungen repräsentieren und energetisch in der Gelphase anzuordnen sind. Zu den beiden Grundannahmen für diese Auswahl gehört zum einen die Festlegung, daß die ersten beiden Bindungen an der Carboxylgruppe (oberhalb der gestrichelten Linie in Abb. 45) immer die trans-Position einnehmen [Pink et al., 1980a] und sich außerdem die Lipidketten nie in Richtung Kopfgruppe zurückfalten [Caillé et al., 1980].

Unter diesen Voraussetzungen lassen sich dann die Entartungsgrade  $g$  der einzelnen Zustände  $K$  in Abhängigkeit von der Kettenlänge  $M$  abschätzen, wie in Tab. 2 dargestellt ist [Zuckermann und Pink, 1980]:

Zustand K	G	2	3	4	5	6	7	8	9	A
$M_{\text{eff}}(\mathbf{K})$ [1.33 Å]	M-1	M-2	M-3	M-4	M-2	M-3	M-4	M-3	M-4	$M_{\text{eff}}^A$
$g(\mathbf{K})$	1	4	4	4	2M-12	2M-16	2M-20	8M-64	16M-120	$6 \cdot 3^{(M-6)}$

**Tabelle 2:** *Abgeschätzte Entartungsgrade  $g$  und effektive Kettenlänge  $M_{\text{eff}}$  für das Zehnzustandsmodell ( $K=10$ ) nach Pink [Zuckermann und Pink, 1980];  $M_{\text{eff}}$  bezeichnet die Länge der Projektion der Acylkette auf die Normale zur Membranoberfläche in C-C-Bindungseinheiten (1.33 Å pro Bindung bei einem angenommenen Bindungswinkel von 120°).*

Die effektive Länge  $M_{\text{eff}}$  einer aus  $M$  C-Atomen bestehenden all-trans-Kette beträgt also genau  $M-1$ , wobei hierfür die Projektion einer C-C-Bindung (mit einem Atomabstand von 1.54 Å [Stryer, 1991]) auf die die Doppelschicht „aufspießende“ Normale zur Membranoberfläche als Maßeinheit fungiert, welche bei einem vereinfachten fiktiven Bindungswinkel von 120° einer Länge von etwa 1.33 Å entspricht. Über  $M_{\text{eff}}^A$  ist zwar a priori noch nichts



bekannt, aber die Acylketten werden ja als Zylinder mit konstantem Volumen behandelt [Mouritsen et al., 1983], und der jeweilige Flächenbedarf der Kopfgruppe im Zustand G ( $A_G$ ) bzw. A ( $A_A$ ) ist ebenfalls aus experimentellen Messungen bekannt, so daß man mit dem einfachen Verhältnis

$$A_K = A_G \frac{M_{\text{eff}}^G}{M_{\text{eff}}^K} \quad (62)$$

sowohl die einzelnen  $A_K$  (mit  $2 \leq K \leq 9$ ) als auch  $M_{\text{eff}}^A$  (mit  $A_K = A_A$ ) berechnen kann. [Caillé et al., 1980].

Der laterale Druck  $\Pi$  hingegen wird auf der Grundlage von NMR-Messungen und Molekularfeldberechnungen [Marcelja, 1974] pauschal mit einem Wert von  $3 \cdot 10^{-2}$  N/m angesetzt und als unabhängig von dem simulierten Lipidtyp angesehen [Risbo et al., 1995].

Zur Bestimmung der  $\Lambda$ -Werte bedient man sich des RIS-Modells von Flory [1989], in welchem den Kettengliedern lediglich drei definierte durch Rotation um jeweils  $120^\circ$  erreichbare Konformationen (trans, gauche<sup>+</sup> und gauche<sup>-</sup>) erlaubt werden. Dabei ist eine gauche-Konformation energetisch gesehen um einen Betrag von etwa 2-3 kJ/mol ungünstiger als die entsprechende trans-Anordnung, so daß für die Arbeit mit dem *Pink*-Modell dementsprechend ein mittlerer Wert von  $\Lambda_{\text{gauche}} = 4.5 \cdot 10^{-21}$  J angenommen wurde [Pink et al., 1980a]. Da gemäß Gleichung (58) – in welcher  $h$  ja eine Funktion von  $\Lambda$  ist – für die Durchführung der Simulation lediglich Energiedifferenzen von Bedeutung sind, erhält der Parameter  $\Lambda_G$  zur Beschreibung der all-trans-Kette per definitionem den Wert null, und den Zuständen zwei bis neun werden je nach Konformation die entsprechenden Vielfachen von  $\Lambda_{\text{gauche}}$  zugeordnet. Einzig für  $\Lambda_A$  ist die Ermittlung eines geeigneten Betrages mit gewissen Schwierigkeiten verbunden, daher dient er gewöhnlich als anpaßbarer Parameter, um sicherzustellen, daß sich die „kritische Temperatur“ des simulierten Ensembles – also die Temperatur, bei der sich die Ordnung des Phasenüberganges ändert – in der Nähe des jeweiligen  $T_m$ -Wertes befindet [z. B. Mouritsen et al., 1983]. Da jedoch aus der Literatur nicht ersichtlich ist, was „in der Nähe“ eigentlich genau bedeutet, wird im folgenden auf einen von Corvera et al. [1993] gefundenen Zusammenhang zurückgegriffen, welcher mit den gesamten  $\Lambda$ -Werten in Tab. 3 dargestellt ist.

Zustand <b>K</b>	<b>G</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>A</b>
$\Lambda(\mathbf{K}) [\cdot \Lambda_{\text{gauche}}]$	$\pm 0$	1	1	1	2	2	2	3	3	$[(0.42 \cdot M) - 3.94] / 0.45$

**Tabelle 3:** *Abgeschätzte Energiebeträge  $L$  als Vielfache des Energiebetrages einer gauche-Bindung relativ zu der trans-Konformation  $L_{\text{gauche}}$  ( $= 4.5 \times 10^{-21}$  J) für das Zehnzustandsmodell ( $K = 10$ ) nach Pink;  $M$  bezeichnet die Anzahl der C-Atome pro Acylkette; die Formel zur Bestimmung von  $L_A$  beruht auf empirischen Untersuchungen; Angaben nach Corvera et al. [1993].*

Somit verbleiben als letzte unbekannte Größe noch die zur Berechnung der V-Matrix nach Gleichung (53) notwendigen Ordnungsparametersummen, da sich die ebenfalls hierfür verwendeten Zylinderradien  $r^{\text{Zy}}$  auf triviale Weise aus den Werten der entsprechenden Flächen (Gleichung (62)) ergeben.

Mit Hilfe des in diesem Modell verwendeten idealisierten C-C-C-Bindungswinkels von  $120^\circ$  lassen sich erstere jedoch direkt mit der effektiven Kettenlänge  $M_{\text{eff}}$  verknüpfen, wobei man sich den in Abb. 45 erkennbaren Umstand zunutze macht, daß der Winkel  $\theta$  für alle möglichen C-C-Bindungen mit der Membrannormalen, welche durch die Richtung des ersten Kettensegmentes nach der Carboxylgruppe definiert ist, nur entweder  $60^\circ$  oder  $0^\circ$  annehmen kann [Seelig und Seelig, 1974]. Aus den von *Seelig und Seelig* aufgestellten Beziehungen läßt sich dann mit einigen Umformungen die folgende Gleichung für die Ordnungsparametersumme einer Kette im Zustand  $k$  ableiten:

$$\sum_{p=1}^{M-1} S_{kp} = (M-1) - \left[ 2.25 \left( (M-1) - \frac{M_{\text{eff}}}{(C-C)_{\text{eff}}} \right) \right]. \quad (63)$$

$(C-C)_{\text{eff}}$  bezeichnet die Länge der Projektion einer C-C-Bindung auf die Senkrechte zur Membranoberfläche und besitzt bei dem hier vereinfacht angenommenen Bindungswinkel von  $120^\circ$  einen Wert von etwa  $1.33 \text{ \AA}$ . Im Falle einer all-trans-Kette wird die Differenz in den großen runden Klammern für jedes Segment null, d. h.  $S_{Gp}$  nimmt den Wert eins an und die entsprechende Summe wird somit zu  $(M-1)$ .

Mit den oben ausgeführten Zusammenhängen lassen sich nun alle benötigten Größen ermitteln, so daß mit der Durchführung der Simulationen begonnen werden kann.

#### 4.2.2.3 Exemplarische Anwendung

Vor dem Beginn der Monte Carlo-Rechnungen ist es zunächst angebracht, sich kurz mit der folgenden Problematik zu beschäftigen und gewisse Entscheidungen bezüglich der weiteren Vorgehensweise zu treffen: Zur Simulation von Phospholipiden mit Hilfe des *Pink*-Modells wurde in der Literatur bisher ausschließlich das Zehnzustandsmodell verwendet [z. B. Mouritsen 1990; Mouritsen et al., 1995a], allerdings erwies sich eine Rekonstruktion auf der Basis der erschienen Publikationen als recht unfruchtbar, da eine Transformation in ein einfaches *Ising*-System bei zehn Zuständen nicht ohne größere Schwierigkeiten möglich ist und sich auch ein Äquivalent für die Schlüsselgleichung (60) nicht klar erkennen läßt, was bei den durchgeführten Versuchen den Effekt zur Folge hatte, daß der Phasenübergang ohne unlogische Modifikation des Ansatzes viel zu „flach“ ausfiel und kaum erkennbar war. Aus diesem Grunde wurde dem Zweizustandsmodell mit temperaturabhängigem Grundzustand [Pink et al., 1980b] der Vorzug gegeben, da sich alle für die Simulation notwendigen Zusammenhänge mit der gleichen bereits auf Seite 44ff. verwendeten Technik eindeutig und klar verständlich herleiten lassen und außerdem ebenfalls wie bei der expliziten Berücksichtigung von zehn Zuständen unterschiedliche Kettenkonformationen in die Simulation miteinfließen.

Die erwähnte Diskrepanz zwischen dem hier verwendeten Modell und den Ansätzen in der Literatur hat allerdings auch zur Folge, daß man bezüglich der anpaßbaren Parameter (z. B.  $J$ ) keine Orientierungswerte hat, da sich die publizierten Daten auf einen anderen mathematischen Ansatz beziehen und daher nicht einfach übertragbar sind. So wird in dem einzigen Artikel, der sich etwas näher mit der Konstruktion des Zehnzustandsmodells befaßt [Mouritsen et al., 1983], der Parameter  $J$  dadurch ermittelt, daß der Wert für die kritische Temperatur  $T^*$  des Systems über den  $T_m$  Wert des untersuchten Lipids angehoben wird, damit der Phasenübergang die Ordnung eins besitzt, wobei der Absolutwert von  $T^*$  jedoch mehr oder weniger willkürlich auf 369 K (353 K nach *Caillé et al.*, [1980]) für DPPC festgelegt wird. Zudem variieren *Mouritsen et al.*  $J$  teilweise auch ohne eine entsprechende Kompensation durch  $\Lambda_A$  (was sich bei dem in der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Formelgebäude gemäß Gleichung (60) absolut verbietet) und führen zusätzlich noch einen Satz von anpaßbaren Parametern in die  $V$ -Matrix ein, um die jeweiligen Elemente modifizieren zu können.

Bei dieser Vielzahl an Variationsmöglichkeiten fällt es daher nicht leicht, eine geeignete Auswahl zu treffen, ohne die Stringenz des Ansatzes (und den Glauben an das Modell) zu verwässern, so daß für alle weiteren Simulationen die folgende Vereinbarung getroffen wurde: Da bereits die Verwendung des auf Seite 74ff. untersuchten Zweizustandsmodell eine sehr gute Anpassung an experimentelle  $c_p$ -Kurven liefert (siehe auch Seite 82), wird bei dem hier verwendeten *Pink*-Modell auf jegliches „Feintuning“ durch zusätzliche Parameter verzichtet und damit eine bzgl. der Absolutwerte deutliche Abweichung von den experimentellen Daten bewußt in Kauf genommen. Der Hauptgrund hierfür ist die Überlegung, daß die relativ detailreiche Darstellung des Energieoperators (55) mit zunehmender Zahl von willkürlich anpaßbaren Größen immer mehr ihren Sinn verliert und damit ebensogut durch einen einfacheren Ansatz ersetzt werden könnte. Somit erhält auch das Ziel der im folgenden durchgeführten Simulationen einen abstrakteren Charakter als bisher, es wurde nämlich jetzt der Versuch unternommen, mit Hilfe eines einzigen Modells Lipidsysteme mit unterschiedlichen Kettenlängen (und später auch deren Gemische) zu untersuchen und die aus der Simulation erhaltenen Eigenschaften untereinander zu vergleichen. Als Basis für die Wahl des Parameters  $J$  diente des weiteren auch nicht eine kritische Temperatur, sondern – da die Gleichungen (47) und (58) in ihrer Struktur gleich sind – der für DMPC mit dem Zweizustandsmodell ermittelte  $\omega_{GA}$ -Wert, woraus die entsprechenden Größen für die Lipide mit anderen Kettenlängen gemäß *Pink und Chapman* [1979] durch lineare Skalierung hieraus errechnet wurden.

Insgesamt wurden vier gleichkettige Phospholipide mit Fettsäureketten der Länge 12 (DLPC), 14 (DMPC), 16 (DPPC) und 18 (DSPC) auf der Basis des *Zweizustands-Pink*-Modells mit und ohne temperaturabhängigen Grundzustand untersucht, wobei die hierfür verwendeten Parameter in der folgenden Tabelle zusammengefaßt sind:

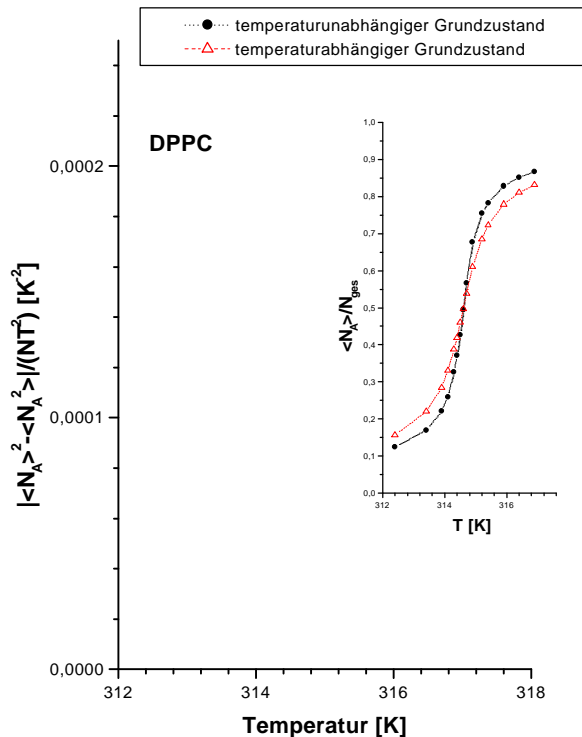
Parameter	DLPC	DMPC	DPPC	DSPC
$T_m$ [K]	271.4 <sup>a</sup>	296.9 <sup>b</sup>	314.6 <sup>a</sup>	328.1 <sup>a</sup>
$J$ [ $\cdot 10^{-20}$ J]	0.821	0.897 <sup>d</sup>	0.973	1.04
$M_G$ [ $\cdot 1.33$ Å]	11	13	15	17
$M_2$ [ $\cdot 1.33$ Å]	10	12	14	16
$M_5$ [ $\cdot 1.33$ Å]	10	12	14	16
$M_A$ [ $\cdot 1.33$ Å]	6.6	7.8	9	10.2
$\Lambda_G$ [ $\cdot 10^{-20}$ J]	0	0	0	0
$\Lambda_2$ [ $\cdot 10^{-20}$ J]	0.45	0.45	0.45	0.45
$\Lambda_5$ [ $\cdot 10^{-20}$ J]	0.90	0.90	0.90	0.90
$\Lambda_A$ [ $\cdot 10^{-20}$ J]	1.1 <sup>c</sup>	1.94 <sup>c</sup>	2.78 <sup>c</sup>	3.62 <sup>c</sup>
$A_G$ [Å <sup>2</sup> ]	20.4	20.4	20.4	20.4
$A_2$ [Å <sup>2</sup> ]	21.86	21.86	21.86	21.86
$A_5$ [Å <sup>2</sup> ]	21.86	21.86	21.86	21.86
$A_A$ [Å <sup>2</sup> ]	34	34	34	34
$g_G$ [ ]	1	1	1	1
$g_2$ [ ]	4	4	4	4
$g_5$ [ ]	12	16	20	24
$g_A$ [ ]	4374	39366	354294	3188646

**Tabelle 4:** *Verwendete Daten für die Simulation von Lipidsystemen unterschiedlicher Kettenlänge mit Hilfe des Pink-Modells; <sup>a</sup>Daten aus Mabrey und Sturtevant [1976]; <sup>b</sup>eigene Messung; <sup>c</sup>Berechnung nach Corvera et al. [1993], später Anpassung an  $J$  gemäß Gleichung (60); <sup>d</sup>errechnet aus dem Vergleich mit  $w_{GA} = 1290$  J/mol (Seite 82) bei der Simulation von DMPC mit dem Zweizustandsmodell.*

Vor der Durchführung der eigentlichen Simulationen wurden wiederum – wie bereits weiter oben ausführlich geschildert – Testläufe zur Ermittlung der benötigten Äquilibrierungszeiten und der geeigneten Systemgröße gemacht (auf welche im folgenden jedoch nicht weiter eingegangen wird), und es stellte sich heraus, daß ein Ensemble von 6400 Teilchen und eine Rechendauer von  $15.6 \cdot 10^7$  Monte Carlo-Schritten mit 5000 Meßzyklen pro Gitterplatz zur Beschreibung der Gleichgewichtseigenschaften vollkommen ausreicht, was mit den Beobachtungen an dem Zehnzustandsmodell übereinstimmt [Zuckermann und Mouritsen, 1987].

Die Simulation der einzelnen Lipidtypen erfolgte je einmal mit dem Zweizustandsmodell mit bzw. ohne temperaturabhängigen Grundzustand, wobei die signifikanten Unterschiede

zwischen den beiden Ansätzen am Beispiel von DPPC exemplarisch verdeutlicht werden sollen:



**Abbildung 47:** großes Diagramm: mittleres Schwankungsquadrat der Anzahl der Lipidketten in der flüssig-kristallinen Phase ( $N_A$ ) dividiert durch die Gesamtteilchenzahl  $N$  und die absolute Temperatur; die aufgetragene Größe hängt gemäß Gleichung (48) direkt mit der entsprechenden Wärmekapazität  $c_p$  des simulierten Systems zusammen; kleines Diagramm: relative Anzahl der flüssig-kristallinen Acylketten als Funktion der Temperatur; Simulationsdauer pro Datenpunkt: OCTANE: 248 s, INDIGO: 1786 s.

In dem großen Diagramm in Abb. 47 ist eine der Wärmekapazität gemäß Gleichung (48) proportionale Größe als Funktion der Temperatur aufgetragen, aus welcher man direkt erkennen kann, daß die Phasenumwandlung bei dem Ansatz mit temperaturunabhängigem Grundzustand (zukünftig vereinfachend als „Ansatz 1“ bezeichnet) einen steileren Verlauf als bei einem temperaturabhängigen Grundzustand besitzt (Ansatz 2). Dies ist durchaus verständlich, denn bei Ansatz 2 ist die Energiebarriere zwischen Gel- und flüssig-kristalliner Phase per definitionem geringer, wodurch bereits in größerer Entfernung von  $T_m$  eine vergleichsweise höhere Fluktuation ermöglicht wird. Andererseits bewirkt aber diese Verringerung der Energiedifferenz konsequenterweise auch eine Herabsetzung der Kooperativität, so daß in unmittelbarer Nähe zu  $T_m$  – wenn die konstante Größe in der geschweiften Klammer in Gleichung (58) gegen null geht – Ansatz 1 klar die stärkeren Fluktuationen aufweist. Aus

theoretischer Sicht folgt dieser Sachverhalt direkt aus dem Term  $kT \ln(g_A/g_G)$ , da  $g_G$  für den Ansatz 1 eins beträgt und für Ansatz 2 deutlich größer ist und die lineare Annäherung an den Wert null für  $T \rightarrow T_m$  somit moderater verläuft.

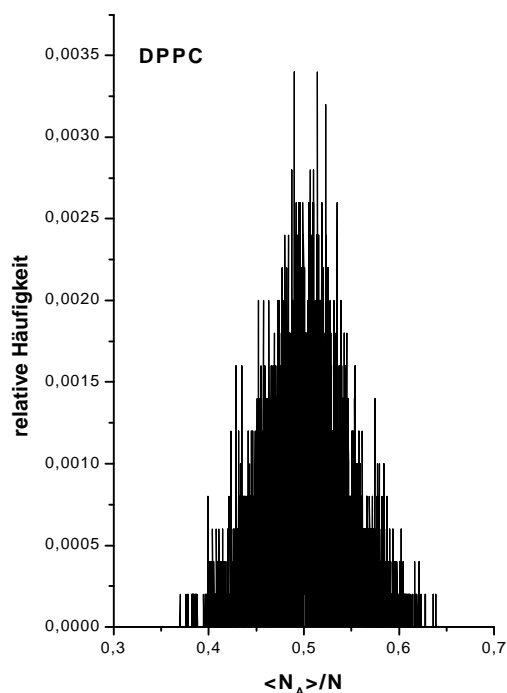
Das kleine Diagramm in Abb. 47 zeigt die mittlere relative Anzahl der Acylketten  $N_A$ , welche sich in der flüssig-kristallinen Phase befinden, als Funktion der Temperatur und läßt die für die Phasenumwandlung typische sigmoide Form erkennen [z. B. Mouritsen, 1984], wobei die Umwandlungskurve von Ansatz 2 erwartungsgemäß etwas flacher verläuft. Diese Beobachtung stimmt qualitativ mit dem von *Mouritsen et al.* [1983] durchgeführten Vergleich zwischen dem Ein- und dem Zehnzustandsmodell überein, allerdings fallen die Unterschiede dort gravierender aus. Die Begründung hierfür ist zum einen in den unterschiedlichen Kriterien für die Wahl des Wechselwirkungsparameters  $J$  zu sehen – worauf bei der Untersuchung der Ordnung des Phasenüberganges noch näher eingegangen wird – und zum anderen in der Tatsache, daß bei einer zunehmenden Anzahl von unabhängigen koexistierenden Zuständen die Umwandlung ohnehin zwangsläufig flacher verläuft, da das Ensemble viel subtiler auf geringe Temperaturänderungen reagieren kann (siehe auch *Mouritsen* [1983] für die Untersuchung des *Pink*-Modells mit ein bis zehn Zuständen). Als logische Konsequenz hieraus würde man für ein Zehnzustandsmodell auch erwarten, daß die angeregten Gelphasenzustände ( $K = 2-9$  nach der weiter oben verwendeten Nomenklatur) überwiegend als „Puffer“ zwischen den energetisch stark unterschiedlichen all-trans und flüssig-kristallinen Domänen gebildet werden, was auch in der Tat der Fall ist [z. B. Mouritsen, 1991].

Mit Hilfe der oben ermittelten Werte für  $\langle N_A \rangle$  lassen sich die entsprechenden Erwartungswerte für eine Observable  $O(T)$  (z. B.  $\Lambda(T)$  oder  $A(T)$ ) gegebenenfalls sofort durch die einfache Beziehung

$$\langle O(T) \rangle = \frac{N - \langle N_A \rangle}{N} O_G(T) + \frac{\langle N_A \rangle}{N} O_A \quad (64)$$

berechnen, wobei der jeweilige Kurvenverlauf ebenfalls einen sigmoiden Charakter besitzt, welcher allerdings durch die Temperaturabhängigkeit der Gelphasenobservablen etwas steiler verläuft als bei  $\langle N_A \rangle$  allein.

Eine nähere Untersuchung der Fluktuationserscheinungen bei  $T = T_m$  zeigt für alle mit den Ansätzen 1 und 2 untersuchten Lipide, daß mit den in der vorliegenden Arbeit gewählten Parametern der Phasenübergang stets eine höhere Ordnung als eins aufweist, wie das folgende Diagramm am Beispiel von DPPC illustriert:



**Abbildung 48:** relative Häufigkeit als Funktion der relativen Anzahl von flüssig-kristallinen Acylketten am Beispiel von DPPC bei  $T = T_m$ ; die Simulation erfolgte auf Grundlage des Pink-Modells (Ansatz 2), 5000 Werte wurden berücksichtigt.

Wie leicht erkennbar ist, steht das Histogramm in deutlicher Analogie zu dem in Abb. 35 und unterscheidet sich somit signifikant von der in Abb. 33 dargestellten Verteilungsfunktion für eine Phasenumwandlung erster Ordnung. Dieses Verhalten ist auch verständlich, denn schließlich wurde ja der Wechselwirkungsterm  $J$  für DMPC ( $= J_{14}$ ) in Übereinstimmung mit dem Kooperativitätsparameter  $\omega_{GA}$  aus dem vorher untersuchten Zweizustandsmodell gewählt, in welchem ebenfalls ein Übergang zweiter Ordnung vorliegt, und die Skalierung auf  $J_{16}$  fällt nicht so gravierend aus, daß eine Änderung in der Charakteristik der Verteilungsfunktion zu erwarten gewesen wäre.

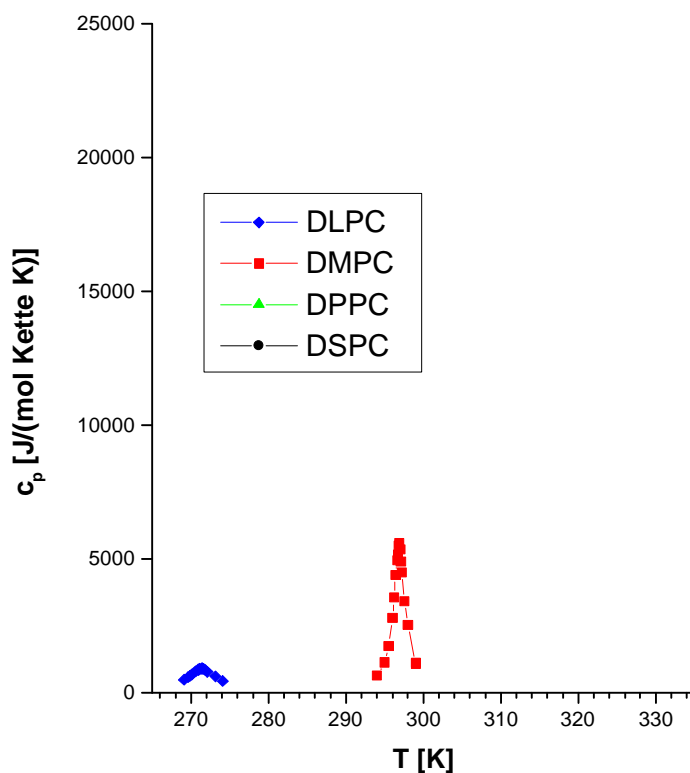


Die strategische Entscheidung, nicht wie *Mouritsen et al.* [1983] zwangsläufig einen Phasenübergang erster Ordnung für das *Pink*-Modell zu verlangen, wurde nach reiflicher Überlegung gefällt, bei welcher die folgenden Argumente maßgeblich waren:

Da die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Simulationsmodelle möglichst ein in sich schlüssiges Gesamtbild ergeben sollen, erscheint es in diesem Zusammenhang wenig sinnvoll, zuerst bei der Simulation von DMPC auf einen Phasenübergang zweiter Ordnung zu schließen, nur um wenig später dann genau von der gegenteiligen Annahme auszugehen. Abgesehen davon zeigt das *Pink*-Modell in seiner reinen Form ohne eine weitere Modifikation der verwendeten physikalischen Größen keine Umwandlung erster Ordnung [Mouritsen et al., 1983], so daß eine Änderung dieses Phasenverhaltens auch mit der Zielsetzung kollidieren würde, das Modell möglichst in seiner ursprünglichen Form zu verwenden und die angesetzten Wechselwirkungsterme nicht mit zusätzlichen Parametern zu verfälschen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Überlegung, daß ein echter Phasenübergang erster Ordnung strenggenommen nur bei einem unendlich großen System auftreten kann, da anderenfalls die Korrelationslänge immer durch Grenzeffekte beeinflußt wird [Challa et al., 1986]. Obwohl eine entsprechende Skalierung zwar mit einigem Aufwand mathematisch möglich ist [Lee und Kosterlitz, 1991], zeigen experimentelle Systeme dennoch zwangsläufig – selbst wenn sie theoretisch ein Phasenverhalten erster Ordnung besäßen – eine kontinuierliche Umwandlung [Zuckermann und Mouritsen, 1987], so daß eine Simulation auf der Basis eines Phasenübergangs zweiter Ordnung möglicherweise sogar praxisorientierter ist.

Die eben ausgeführten Überlegungen waren somit auch der Grund dafür, daß die Skalierung für die Beträge von  $J$  für DLPC, DPPC und DSPC – welche wie von *Pink und Chapman* [1979] vorgegeben proportional zu der jeweiligen Kettenlänge erfolgte – ausgehend von dem gesetzten Wert für  $J_{14}$  derart gewählt wurde, daß selbst DSPC mit der größten Kooperativität immer noch den geforderten Übergang zweiter Ordnung aufwies. Bei dem Wert, den man aufgrund der Formel aus Tab. 3 erhalten würde ( $J_{18} = 1.14 \cdot 10^{-20}$  J), traten nämlich mit dem hier verwendeten Ansatz 2 bereits deutliche Metastabilitäten bei  $T = T_m$  auf (Daten nicht dargestellt), womit auch die auf Seite 92 erwähnte vielzitierte Vermutung bestätigt wird, daß sich die Umwandlungstemperatur von Lipidsystemen in der Nähe eines kritischen Punktes befindet.

Mit Hilfe der so festgelegten und in Tabelle 4 dokumentierten J-Werte ist man somit in der Lage,  $c_p$ -Kurven für die verschiedenen Lipidsysteme ohne weitere zusätzliche Anpassungen des Modells zu generieren, was – da ja simulationstechnisch gesehen ein einfaches Zweizustandsmodell vorliegt – wiederum unter Verwendung von Gleichung (48) geschehen kann (Abb. 49).



**Abbildung 49:** Auf der Basis von Ansatz 2 simulierte Wärmekapazitätskurven für Lipide mit unterschiedlichen Kettenlängen; die verwendeten physikalischen Daten sind in Tabelle 4 wiedergegeben; für jeden Datenpunkt wurden nach der Äquilibrierungszeit 5000 Einzelwerte gesammelt.

Der zur Berechnung der Wärmekapazitäten in Beziehung (48) benötigte Wert für  $\Delta H_{um}$  entspricht dabei – wie ein Vergleich der Ausdrücke (47) und (58) ergibt – bei dem hier verwendeten *Pink*-Modell gerade der Größe  $2h$ , so daß die gewünschten Kurven problemlos ermittelt werden können. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, inwieweit die durch Integration der  $c_p$ -Daten ermittelten Umwandlungsenthalpien mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen. Dabei muß man berücksichtigen, daß die Fläche unter den Wärmekapazitätskurven zwar natürlich direkt mit  $2h$  korreliert ist, aber im Endeffekt etwas geringer ausfällt, so daß sich die Absolutwerte ein wenig unterscheiden. Aus diesem Grund mußte bei der auf Seite 82ff. durchgeführten Anpassung der simulierten Kurve an das Expe-

riment der entsprechende Wert für  $\Delta H_{\text{um}}$  auch leicht um einen konstanten Betrag nach oben korrigiert werden, um eine flächenmäßige Übereinstimmung zu erzielen.

Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Lipide und die jeweiligen experimentellen Vergleichswerte sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

Lipid	2h [J/(mol Kette)]	$\Delta H_{\text{um}}^{\text{sim}}$ [kJ/(mol Lipid)]	$\Delta H_{\text{um}}^{\text{exp}}$ [kJ/(mol Lipid)]	$\Delta H_{\text{um}}^{\text{sim,ref}}$ [kJ/(mol Lipid)]
<b>DLPC</b>	15004 <sup>a</sup>	6.86	7.18 <sup>b</sup>	-
<b>DMPC</b>	20873 <sup>a</sup>	25.39	23.72 <sup>c</sup>	-
<b>DPPC</b>	26989 <sup>a</sup>	36.56	36.43 <sup>b</sup>	28.89 <sup>d</sup>
<b>DSPC</b>	33487 <sup>a</sup>	48.14	44.38 <sup>b</sup>	-

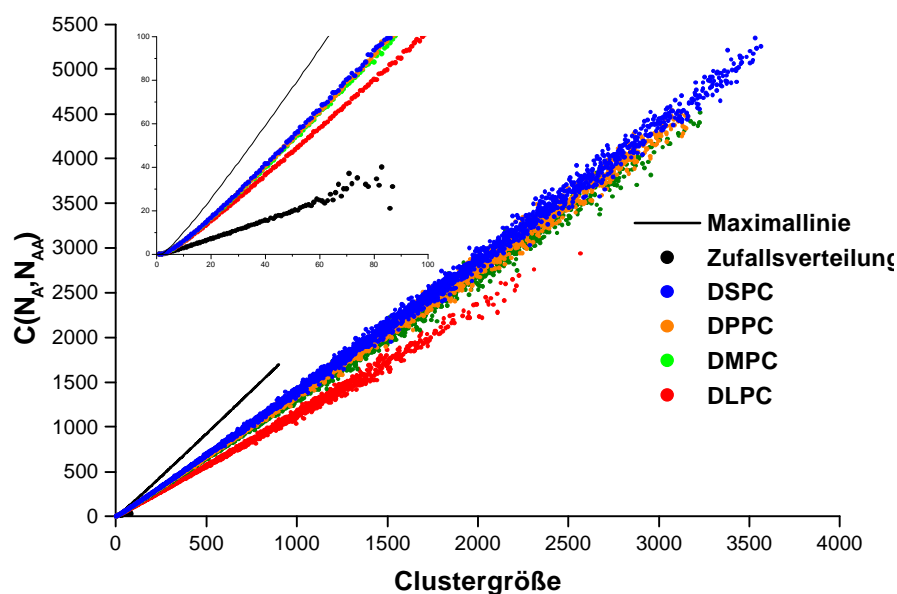
**Tabelle 5:** Vergleich der nach dem Pink-Modell (Ansatz 2) simulierten mit den experimentellen Umwandlungsenthalpien; <sup>a</sup>Daten berechnet mit Hilfe von Gleichung (60); <sup>b</sup>experimentelle Werte nach Mabrey und Sturtevant [1976]; <sup>c</sup>eigene Messung; <sup>d</sup>simuliert mit dem Zehnzustandsmodell nach Mouritsen et al. [1983].

Überraschenderweise stimmen die simulierten Daten ohne eine weitere Einflußnahme durch anpaßbare Größen mit den experimentellen Umwandlungsenthalpien recht gut überein und liegen im Falle von DPPC sogar deutlich besser als die Resultate aus dem Zehnzustandsmodell, wobei *Mouritsen et al.* [1983] allerdings explizit einen möglichen Weg zur Verbesserung des Ergebnisses vorschlagen (Modifikation der V-Matrix mit zusätzlichen Parametern).

Vergleicht man die  $c_p$ -Kurven für die unterschiedlichen Lipide in Abb. 49 miteinander, so erkennt man analog zu den Beobachtungen an dem Zehnzustandsmodell von *Mouritsen et al.* [1995a], daß der Verlauf der Phasenumwandlung mit zunehmender Kettenlänge immer schärfer wird, d. h. in einiger Entfernung zu  $T_m$  besitzen die Lipidsysteme mit den kürzeren Ketten die verhältnismäßig größeren Domänenfluktuationen. Dies ist direkt eine Folge des von DLPC bis DSPC kontinuierlich wachsenden Wertes für 2h, welcher das mittlere Schwankungsquadrat für  $T \neq T_m$  immer mehr unterdrückt, andererseits durch seine Präsenz in Gleichung (48) (anstelle von  $\Delta H_{\text{um}}$ ) aber auch (neben J) für die stetig mit der Kettenlänge erfolgende Zunahme des  $c_p$ -Wertes bei  $T = T_m$  verantwortlich ist. Während die letztere Beobachtung mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmt (siehe z. B. Kapitel 5 für DMPC und DPPC), werden die gemessenen DSC-Kurven jedoch keineswegs mit wachsen-

der Kettenlänge immer schmaler [Ipsen et al., 1990; Kapitel 5], so daß das Modell in diesem Punkt etwas von der Realität abweicht.

Ein anderer interessanter Gesichtspunkt ist ein Vergleich der mittleren Domänenstrukturen der verschiedenen Lipide untereinander, daher sind zur Veranschaulichung in der folgenden Abbildung die in dem jeweiligen Ensemble vorkommenden Clustergrößen und deren Zyklomatische Zahlen  $C$  gemäß Gleichung (40) dargestellt:



**Abbildung 50:** mittlere Zyklomatische Zahl  $C$  als Funktion der Clustergröße bei  $T = T_m$  für Lipide unterschiedlicher Kettenlänge in einem simulierten Ensemble von 6400 Acylketten; Simulation nach dem Pink-Modell (Ansatz 2) mit je 5000 Meßpunkten pro Lipid; das kleine Diagramm zeigt vergrößert die jeweils ersten 100 Einheiten jeder Achse.

Wie man klar erkennen kann, zeigen alle untersuchten Lipide eine ausgeprägte Tendenz zur Domänenbildung (alle Werte für  $C$  liegen oberhalb der Zufallslinie), wobei gleichzeitig auch die maximale Größe der auftretenden Cluster und deren Zyklomatische Zahl kontinuierlich von DLPC nach DSPC zunimmt. Das gleiche trifft auch auf die jeweilige mittlere Kompaktheit  $\tau$  und die mittlere Domänengröße zu (Daten nicht dargestellt), so daß man nach Mouritsen [1990] hieraus direkt folgern kann, daß auch die kooperative Einheit mit wachsender Kettenlänge zunimmt. Dies steht im Gegensatz zu den von Mabrey und Sturtevant [1976] durchgeführten Untersuchungen, nach welchen diese Tendenz gerade umgekehrt verläuft, wobei allerdings die Methode, nach der die entsprechenden

Berechnungen erfolgten, nicht näher angegeben ist. Untersuchungen von *Tenchov* [1985] und *Garidel und Blume* [1998] zeigen hingegen zumindest für DMPC und DPPC ein mit den Monte Carlo-Simulationen übereinstimmendes Ergebnis.

#### 4.2.2.2.4 Fazit

Generell betrachtet stellt das hier verwendete Zweizustandsmodell mit temperaturabhängigem Grundzustand eine recht brauchbare Möglichkeit dar, um das Phasenumwandlungsverhalten von reinen Lipidsystemen auch ohne die Verwendung von zahlreichen anpaßbaren Parametern grobqualitativ zu beschreiben. Dabei enthält der zugrunde liegende Ansatz trotz der relativ großen Anzahl an einfließenden physikalischen Daten weiterhin eine Fülle von unvermeidlichen Vereinfachungen und Abstraktionen, um den technischen Aufwand der Simulationen gering zu halten. So schließt man beispielsweise bei der Berücksichtigung der Kettenbewegungen solche Konformationen aus, die ein Zurückfallen der Kette zur Folge hätten (*gauche*<sup>+</sup>-*gauche*<sup>-</sup>-Sequenzen), obwohl diese – neueren Molekulardynamik-Simulationen zufolge – in signifikanter Anzahl auftreten [Stouch, 1993]. Ebenso werden die ersten beiden C-C-Bindungen ausgehend von der Kopfgruppe jeder Acylkette stets als all-trans angenommen, womit allerdings die Tatsache ignoriert wird, daß die erste Methylengruppe der *sn*-2-Kette von beispielsweise DPPC annähernd parallel zur Membranoberfläche orientiert ist, was die effektive Kettenlänge um etwa drei Einheiten verkürzt [Seelig und Seelig, 1980] und die simulierten Acylketten somit eigentlich keineswegs als äquivalent anzusehen sind. Außerdem nimmt man die der flüssig-kristallinen Phase zugeordneten Größen ( $g_A$ ,  $\Lambda_A$  und  $A_A$ ) als temperaturunabhängig an, was streng genommen natürlich nicht der Fall ist, da die Zahl der *gauche*-Konformerer mit steigender Temperatur (und  $T > T_m$ ) ebenfalls zunimmt (siehe Kapitel 5). Auf der anderen Seite wiederum vernachlässigt man spezielle Packungseigenschaften wie z. B. die Tatsache, daß bei DPPC die Acylketten in der Gelphase nicht senkrecht zur Membranoberfläche stehen, sondern um einen Winkel von etwa 35° hierzu gekippt sind [z. B. Casal und Mantsch, 1984], woraus man ersehen kann, daß die Stärke des *Pink*-Modells eher in der Beschreibung des Phasenumwandlungsbereiches als in der genauen Wiedergabe von weit von  $T_m$  entfernten Zuständen liegt [Ipsen et al., 1990].

### 4.2.3 ZWEIKOMPONENTEN-/ZWEIPHASENSYSTEME

Eine logische Konsequenz aus den oben gemachten Ausführungen stellt der Versuch dar, das Mischungsmodell auf pseudobinäre Systeme auszudehnen. Dies erscheint auf den ersten Blick recht trivial, allerdings muß man die Tatsache bedenken, daß ein Teilchen (z. B. der Komponente A) nun nicht mehr zwei, sondern vier unterschiedliche Arten von Nachbarn haben kann ( nämlich  $A_{\text{gel}}$ ,  $A_{\text{flüssig-kristallin}}$ ,  $B_{\text{gel}}$  und  $B_{\text{flüssig-kristallin}}$ ), was programmtechnisch gesehen einige Schwierigkeiten (z. B. bei der Clusteranalyse) aufwirft, da viele einfache Zusammenhänge (wie die Gleichungen (24) und (25)) ihre Gültigkeit verlieren und umständlich ersetzt werden müssen. Hierdurch wird dann allerdings der Rechenaufwand erheblich gesteigert und damit bei einigen Milliarden Monte Carlo-Schritten auch die zeitliche Dauer der Simulation deutlich verlängert.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Modifikation der entsprechenden Schlüsselgleichungen des Systems, denn zusätzlich zu den Energieoperatoren der reinen Komponenten müssen nun auch noch die entsprechenden Exzeßterme für die Mischungseffekte berücksichtigt werden, was zwangsläufig dazu führt, daß auch an dieser Stelle zusätzliche (zeitaufwendige) Komplikationen auftreten. Die maßgeblichen Formeln wurden dabei eigenständig durch simple Überlegungen und Koeffizientenvergleich auf der Basis des Zweizustandsmodells mit temperaturabhängigem Grundzustand entworfen (worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird), in der Literatur hingegen fanden bereits Untersuchungen an pseudobinären Systeme mit und ohne Proteineinlagerungen mit Hilfe des Zehnzustandsmodells statt (z. B. von *Sperotto und Mouritsen* [1993] bzw. *Risbo et al.* [1995]), so daß die entsprechenden Ergebnisse als Vergleichswerte herangezogen werden konnten.

#### *4.2.3.1 Herleitung des Modells*

Wie bereits weiter oben angedeutet, hat man bei den hier untersuchten binären Mischungssystemen zusätzlich zu den auftretenden Phasen G (Gelphase) und A (flüssig-kristalline Phase) noch zwischen den beiden auftretenden Komponenten zu differenzieren, so daß diese im folgenden mit I bzw. II deklariert werden.

Der entsprechende Gesamtenergieoperator des Ensembles  $\Omega$  setzt sich dann zusammen aus den entsprechenden Operatoren der Reinsysteme gemäß Gleichung (52) plus einem

Exzeßterm  $\Omega_{I,II}$ , welcher die Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Acylketten beschreibt:

$$\Omega = \Omega_I + \Omega_{II} + \Omega_{I,II}. \quad (65)$$

Der Operator  $\Omega_{I,II}$  besitzt dabei nach *Jørgensen et al.* [1993] die folgende Form

$$\begin{aligned} \Omega_{I,II} = & -\frac{J_{I,II}}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^K \left( V_{kl}^{I,II} \mathbf{d}_{ik}^I \mathbf{d}_{jl}^{II} \right) + \\ & + \frac{g}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^6 \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^K \left( \left| M_{ik}^I - M_{jl}^{II} \right| \mathbf{d}_{ik}^I \mathbf{d}_{jl}^{II} + \left| M_{ik}^{II} - M_{jl}^I \right| \mathbf{d}_{ik}^{II} \mathbf{d}_{jl}^I \right), \end{aligned} \quad (66)$$

$M$  bezeichnet die bereits erwähnte effektive Kettenlänge, und  $J_{I,II}$  stellt einen zu  $J$  in Gleichung (52) analogen attraktiven Parameter zur Beschreibung der *van der Waals*-Kräfte zwischen den Ketten dar.  $\gamma$  hingegen beinhaltet die repulsiven Wechselwirkungen, welche durch die Packungseffekte zwischen unterschiedlich langen Nachbarn auftreten.

Mit den so vorgegebenen Denkanstößen stellt sich nun die Frage, wie man hieraus eine für die Monte Carlo-Simulation geeignete Rechenvorschrift ableiten kann, ohne dabei das oben verwendete Zweizustandsmodell mit dem dazugehörigen Formelgebäude vollkommen verwerfen zu müssen. Da eine exakte mathematische Behandlung von Gleichung (65) sehr schnell zu extrem unübersichtlichen und komplizierten Ausdrücken führt, besteht eine sehr interessante Alternative darin, den Ausdruck (66) nicht direkt zu berücksichtigen, sondern lediglich seinen „geistigen Inhalt“ zu übertragen und in eine für das Modell geeignetere Form zu transformieren. Die hierbei angestellten Überlegungen lassen sich folgendermaßen formulieren: Angenommen, es liegt ein entsprechendes binäres Teilchenensemble vor, dann berechnet sich die Gesamtenergie des Systems wie weiter oben vorgegeben durch die Rechenvorschrift (65). Für die Durchführung der Monte Carlo-Simulation ist aber lediglich die Wechselwirkungsenergie des jeweils ausgewählten Teilchens mit seinen sechs nächsten Nachbarn von Bedeutung. Betrachtet man nun dieses nachbarschaftliche Verhältnis näher, so gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, bei denen der erste Term in Gleichung (52) aber grundsätzlich immer zu Buche schlägt: Ist der betreffende Nachbar vom selben Typ (I oder II) wie das Zentralteilchen, so wird auch der zweite Term in (52) berücksichtigt und der Mischungsausdruck wird wegen der *Kronecker*-Operatoren genau null, ist dies jedoch nicht

der Fall, so wird der zweite Term in (52) genau null und durch den entsprechenden Ausdruck aus Gleichung (66) ersetzt. Die Pointe der Überlegung besteht nun darin, daß man zuerst einmal so tut, als hätte man lediglich ein Einkomponentensystem mit dem dazugehörigen Operator

$$\Omega = \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^K [(\Lambda_k + \Pi A_k) \mathbf{d}_{ik}] + \text{Joker} \quad (67)$$

vorliegen, hiermit dann den entsprechenden Ausdruck für  $\Delta E$  ermittelt und erst anschließend fallorientiert entscheidet, welcher Term für „Joker“ einzusetzen ist. Diese Vorgehensweise führt beispielsweise für ein Zentralteilchen der Komponente I zu der allgemeinen Gleichung

$$\begin{aligned} \Delta E = \mathbf{s}_{\text{alt}}^I & \left[ \frac{J}{4} (V_{GG} - 2V_{GA} + V_{AA}) \sum_{j=1}^6 (\mathbf{s}_j^I) + \frac{J_{I,II}}{4} (V_{GG}^{I,II} - V_{GA}^{I,II} - V_{AG}^{I,II} + V_{AA}^{I,II}) \sum_{j=1}^6 (\mathbf{s}_j^{II}) - \right. \\ & \left. - \frac{g}{4} (\Delta M_{GG}^{I,II} - \Delta M_{GA}^{I,II} - \Delta M_{AG}^{I,II} + \Delta M_{AA}^{I,II}) \sum_{j=1}^6 (\mathbf{s}_j^{II}) + \left\{ 2h^{I,II} - kT \ln \left( \frac{g^{\text{neu}}}{g^{\text{alt}}} \right) \right\} \right], \quad (68) \end{aligned}$$

mit

$$h^{I,II} = \sum_I \left[ \frac{J}{4} (V_{GG} - V_{AA}) \right] + \sum_{II} \left[ \frac{J_{I,II}}{4} (V_{GG}^{I,II} - V_{AA}^{I,II}) \right] + \frac{1}{2} \Pi (A_A - A_G) + \frac{1}{2} (\Lambda_A - \Lambda_G). \quad (69)$$

Die Summenausdrücke in Gleichung (69) ermitteln hierbei die Anzahl der Nachbarn des Typs I bzw. II, und  $\Delta M$  in Gleichung (68) bezeichnet den Absolutwert der effektiven Kettenlängendifferenzen zwischen den ungleichen Acylketten.

Mit der so aufgestellten Beziehung für  $\Delta E$  läßt sich nun analog zu dem Einkomponentenmodell die entsprechende *Glauber*-Statistik durchführen, allerdings reicht dies für eine „realistische“ Simulation bei einem System mit zwei Komponenten nicht aus, da der Platzwechsel zwischen verschiedenartigen Teilchen auf diese Weise nicht berücksichtigt wird und daher die Zahl der I-II-Paare immer konstant bliebe. Um diesen Mangel zu beheben, muß das Ensemble daher noch zusätzlich mit Hilfe der bereits beschriebenen *Kawasaki*-



Methode untersucht werden (Seite 46ff.), welche ja die laterale Diffusion benachbarter Teilchen berücksichtigt und wie folgt auf die hiesige Situation übertragen werden kann:

Geht man wieder von Abb. 19 aus und betrachtet beispielsweise die Vertauschung des Zentralteilchens  $i$  vom Typ I in der Gelphase G mit einem zufällig ausgewählten Nachbarteilchen  $j$  (Typ II, ebenfalls Gelphase), so gilt für den hierfür relevanten Energiebetrag der Ausgangssituation  $E_{\text{alt}}$  unter Berücksichtigung der Gleichungen (52) und (65) die Beziehung

$$\begin{aligned}
E_{\text{alt}} = & -\frac{1}{2} \left[ J_{\text{I}} V_{\text{GG}}^{\text{I}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{I}}) + J_{\text{I}} V_{\text{GA}}^{\text{I}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{I}}) + J_{\text{II}} V_{\text{GG}}^{\text{II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{II}}) + J_{\text{II}} V_{\text{GA}}^{\text{II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{II}}) + \right. \\
& + J_{\text{II}} V_{\text{GG}}^{\text{II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{II}}) + J_{\text{II}} V_{\text{GA}}^{\text{II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{II}}) + J_{\text{I,II}} V_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{I}}) + J_{\text{I,II}} V_{\text{GA}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{I}}) \left. \right] + \\
& + \frac{g}{2} \left[ \Delta M_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{II}}) + \Delta M_{\text{GA}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{II}}) + \Delta M_{\text{AG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{I}}) + \Delta M_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{I}}) \right], \quad (70)
\end{aligned}$$

wobei die Summen jeweils über die sechs nächsten Nachbarn der in den geschweiften Klammern stehenden Zentralteilchen laufen. Da für obigen Ausdruck keinerlei Variablentransformation im Sinne von Gleichung (28) stattgefunden hat, beschreibt  $N$  lediglich die Anzahl der Moleküle mit den entsprechenden Eigenschaften und kann demzufolge auch nur Werte von null bis sechs annehmen. Nach der Vertauschung von  $i$  und  $j$  besitzt der relevante Energiebetrag dann die Form

$$\begin{aligned}
E_{\text{neu}} = & -\frac{1}{2} \left[ J_{\text{I,II}} V_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{I}}) + J_{\text{I,II}} V_{\text{GA}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{I}}) + J_{\text{II}} V_{\text{GG}}^{\text{II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{II}}) + J_{\text{II}} V_{\text{GA}}^{\text{II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{II}}) + \right. \\
& + J_{\text{I,II}} V_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{II}}) + J_{\text{I,II}} V_{\text{GA}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{II}}) + J_{\text{I}} V_{\text{GG}}^{\text{I}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{I}}) + J_{\text{I}} V_{\text{GA}}^{\text{I}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{I}}) \left. \right] + \\
& + \frac{g}{2} \left[ \Delta M_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{I}}) + \Delta M_{\text{GA}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{I}}) + \Delta M_{\text{AG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{A}}^{\text{II}}) + \Delta M_{\text{GG}}^{\text{I,II}} \sum_{\{j\}} (N_{\text{G}}^{\text{II}}) \right], \quad (71)
\end{aligned}$$

und die für die *Kawasaki*-Statistik benötigte Energiegröße  $\Delta E$  kann nun aus der Differenz  $E_{\text{neu}} - E_{\text{alt}}$  erhalten werden, womit sich dann die Simulationen analog zu den Ausführun-

gen auf Seite 46ff. durchführen lassen. Die obigen Gleichungen berücksichtigen allerdings nur eine mögliche Konstellation von  $i$  und  $j$  (nämlich  $\text{Gel}^I \leftrightarrow \text{Gel}^II$ ), alle anderen Varianten können natürlich ebenfalls vorkommen und müssen entsprechend untersucht werden, die jeweiligen Formeln weichen dann zwar auch von den oben dargestellten ab, das Prinzip bleibt jedoch das gleiche, so daß hier auf eine weitere Auflistung verzichtet wird.

Die simultane Anwendung von sowohl *Glauber*- als auch *Kawasaki*-Statistik eröffnet somit eine Möglichkeit, die beiden grundsätzlich auftretenden Ordnungsphänomene [Ipsen et al., 1989] des Acylkettenensembles (laterale Diffusion einerseits und Kettenkonformation andererseits) gleichzeitig zu untersuchen, wobei man allerdings im Hinterkopf behalten muß, daß die jeweiligen Prozesse in Wirklichkeit mit vollkommen unterschiedlichen Geschwindigkeiten ablaufen [Jørgensen und Mouritsen, 1995], während sie dagegen in der Simulation stets direkt nacheinander ausgeführt werden. Dieser Umstand erscheint jedoch nicht weiter problematisch, da ja im folgenden keine Relaxationseffekte, sondern lediglich Gleichgewichtseigenschaften untersucht werden, so daß der Weg, wie diese erreicht werden (und vor allem, wie schnell sie erreicht werden), ohnehin ohne Bedeutung ist.

#### 4.2.3.2 Exemplarische Anwendung

Nach dem Austesten des *Glauber*- bzw. *Kawasaki*-Moduls und der Festlegung einer geeigneten Systemgröße bzw. Äquilibrationszeit (Daten nicht dargestellt), muß man sich vor dem Beginn der eigentlichen Simulationen noch mit der Frage beschäftigen, welcher Betrag den beiden neu auftretenden Parameter  $J_{I,II}$  und  $\gamma$  zugewiesen werden soll. Was die Berechnung von  $J_{I,II}$  betrifft, so erscheint es sinnvoll, einen direkten Zusammenhang zu den entsprechenden  $J$ -Werten der Reinkomponenten herzustellen, daher wird bei der Verwendung des Zehnzustandsmodells in der Literatur auch stets deren geometrischer Mittelwert verwendet [z. B. Risbo et al., 1995] :

$$J_{I,II} = \sqrt{J_I J_{II}}. \quad (72)$$

Diese Vorgehensweise war auch prinzipiell bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell die Methode der Wahl, allerdings diente die Einführung des neuen Parameters – da ansonsten keinerlei Modifikationen bzgl. der  $V$ -Matrix o. ä. stattfand – wie weiter unten beschrieben zusätzlich dazu, eine Verbesserung der Anpassung an die experimentellen Da-

ten zu erreichen, so daß der Wurzelausdruck in Gleichung (72) letztendlich noch mit einem konstanten Faktor (1.09) multipliziert wurde.

Die Festlegung von  $\gamma$  erfolgte mit einem Betrag von  $0.05 \cdot 10^{-20}$  J und liegt damit – wie auch die verwendeten J-Werte – über den entsprechenden für das Zehnzustandsmodell angesetzten Daten [Damman et al., 1994]. Der Faktor 1.33 (Å), welcher die Länge der Projektion eines all-trans C-C-Segments auf die Normale der Membranoberfläche (bei einem fiktiven Bindungswinkel von  $120^\circ$ ) beschreibt, ist hierin bereits berücksichtigt, was die Berechnung der entsprechenden dimensionslosen  $\Delta M$ -Werte direkt aus Tabelle 4 ermöglicht.  $\gamma$  selbst bleibt dabei für jedes untersuchte Gemisch stets konstant, so daß eine Veränderung des jeweiligen Energiebeitrages allein durch die auftretenden Kettenlängendifferenzen hervorgerufen wird. Diese Herangehensweise unter Verwendung eines „universalen“ Parameters wurde für pseudobinäre Lipidgemische erstmals erfolgreich von *Ipsen und Mouritsen* [1988] bei dem Versuch angewendet, mit Hilfe der Theorie der regulären Mischungen einen generalisierten formalen Ansatz zur Beschreibung unterschiedlicher Phasendiagramme zu entwickeln, und später dann auch zur Durchführung von Monte Carlo-Simulationen mit dem Zehnzustandsmodell eingesetzt [Risbo et al., 1995].

Mit der erfolgten Festlegung von  $J_{\text{LII}}$  und  $\gamma$  sind alle für die Simulation erforderlichen Ausgangsdaten komplett, so daß man sich nun der eigentlichen Fragestellung widmen kann, ob man mit Hilfe des abgeleiteten Modells ohne jede weitere Art von zusätzlichen Parametern in der Lage ist, das Mischungsverhalten von unterschiedlichen Lipidgemischen grobqualitativ korrekt zu beschreiben. Als experimentelle Referenz dienen hierzu die aus DSC-Daten ermittelten Phasendiagramme der pseudobinären Gemische DLPC/DSPC, DMPC/DSPC und DMPC/DPPC nach einem Artikel von *Mabrey und Sturtevant* [1976], da dort die entsprechenden Meßmethoden sowie das Auswerteverfahren für alle drei Systeme in sich konsistent sind, was bei dem Vergleich der analogen Daten aus neueren Messungen aber unterschiedlichen Arbeitskreisen (z. B. DMPC/DSPC mittels Neutronenstreuung aus *Knoll et al.* [1981]; DMPC/DPPC mittels DSC aus *Garidel und Blume* [1998]) eher nicht zutrifft.

Um die theoretischen Phasendiagramme aus den erzeugten Monte Carlo-Daten zu ermitteln, bieten sich ebenfalls mehrere Möglichkeiten an, von denen die mathematisch aufwendigste (und präziseste) über die Berechnung der mittleren Freien Energie der jeweiligen

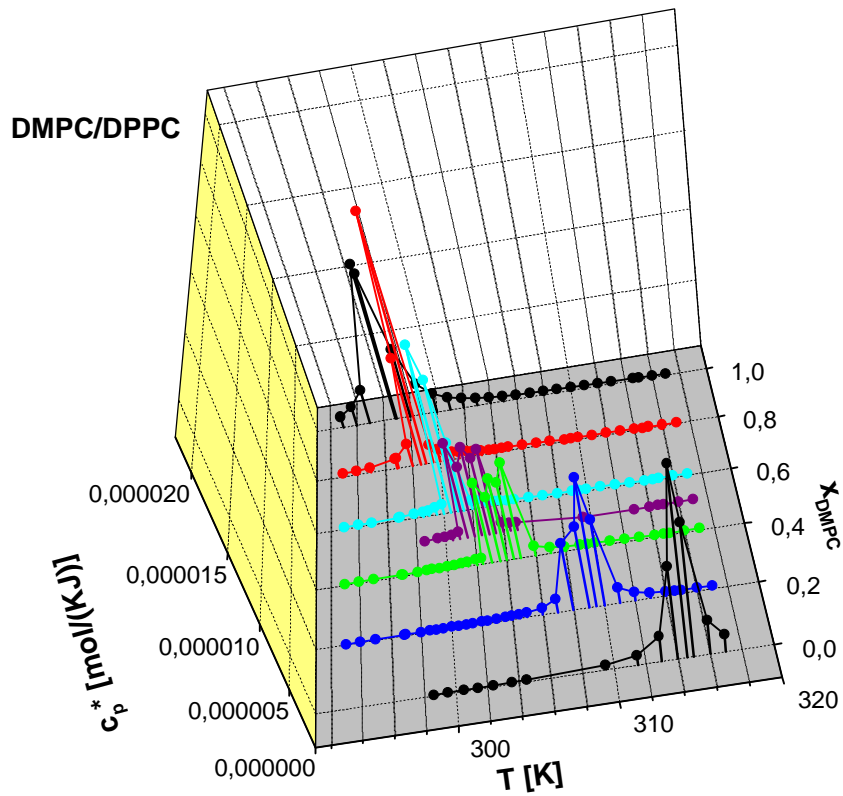
Mikrokonfigurationen führt [Zhang et al., 1993]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch – analog zu *Jørgensen et al.* [1993] für das Zehnzustandsmodell – der Weg über die Simulation der  $c_p$ -Kurven gewählt, wobei allerdings das Problem auftritt, daß Gleichung (48) für ein Zweikomponentensystem nicht mehr ohne weiteres verwendet werden kann und man statt dessen das mittlere Schwankungsquadrat des Gesamtenergieoperators zu berücksichtigen hat [Risbo et al., 1995]. Dies ist jedoch aus zwei Gründen wenig erstrebenswert, denn erstens muß  $\Omega$  bei jeder Einzelmessung umständlich (und zeitaufwendig!) ermittelt werden, während  $N_A$  bei jedem Monte Carlo-Schritt sehr einfach quasi nebenher bestimmt werden kann (und daher keine größeren Berechnungen notwendig werden), und zweitens geht die Transparenz der Simulation teilweise verloren, da man nicht mehr erkennt, welche Komponente nun welchen Beitrag zu der jeweiligen Wärmekapazität liefert. Aus diesen Gründen wurde im folgenden eine zu  $c_p$  proportionale Größe  $c_p^*$  verwendet, welche sich über die Summe der mittleren Schwankungsquadrate der Reinkomponenten definiert:

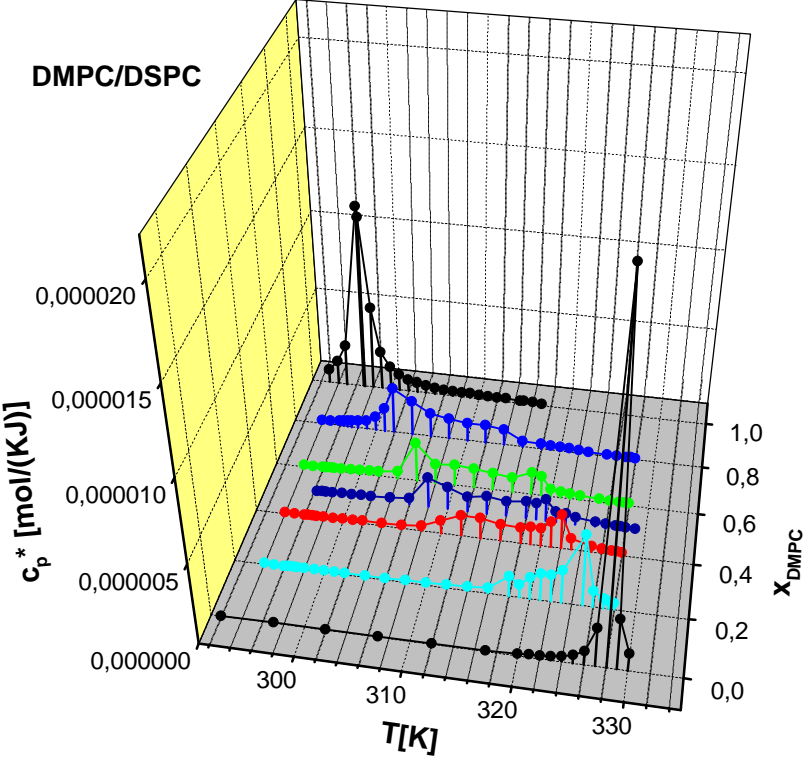
$$c_p^* = \frac{\left| \langle N_{A,I}^2 \rangle - \langle N_{A,I} \rangle^2 \right|}{N_I RT^2} + \frac{\left| \langle N_{A,II}^2 \rangle - \langle N_{A,II} \rangle^2 \right|}{N_{II} RT^2}. \quad (73)$$

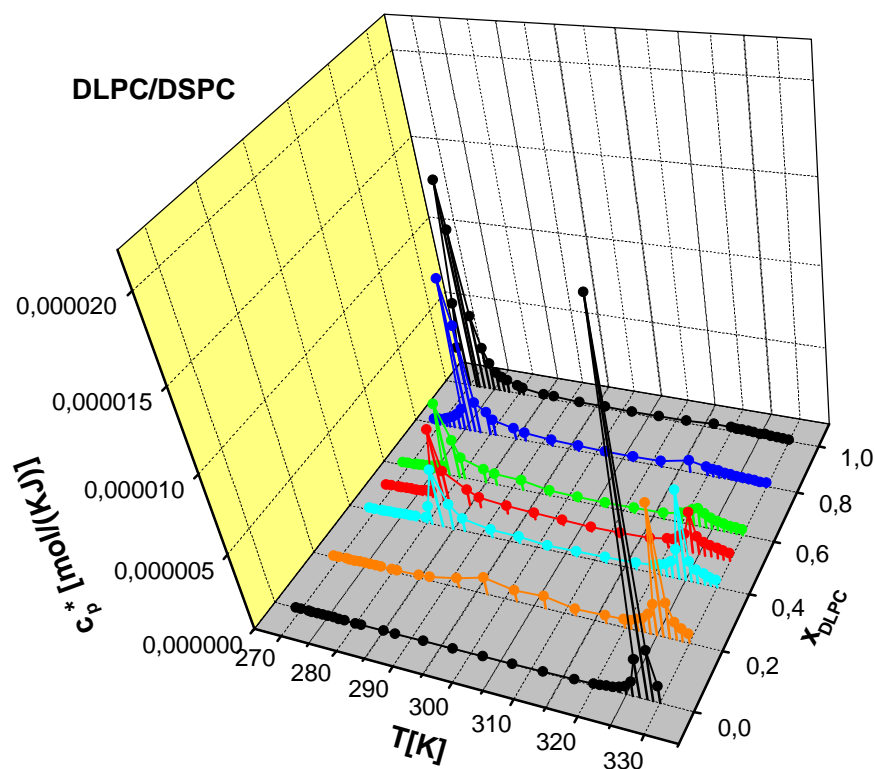
Da die für I und II unterschiedlichen konstanten Faktoren für  $\Delta H_{um}$  in dieser Beziehung nicht berücksichtigt sind, reflektiert Gleichung (73) im Gegensatz zu (48) lediglich die auftretenden Fluktuationen, um so einen unverfälschteren Eindruck von dem tatsächlichen Phasenverhalten der einzelnen Teilchen ohne den störenden Einfluß differierender Multiplikatoren zu bekommen. Auftretende Mischungseffekte werden bei dieser Vorgehensweise implizit dadurch berücksichtigt, daß sich die Einflüsse der nächsten Nachbarn in jedem Fall direkt auf  $N_A$  auswirken und damit auch in das Schwankungsquadrat miteingehen.

Die einmalige Festlegung von  $J_{I,II}$  erfolgte auf der Grundlage der simulierten  $c_p^*$ -Kurve des äquimolaren DMPC/DSPC-Gemisches, für das Anfangs- und Endtemperatur der Umwandlung grob mit den experimentellen DSC-Daten abgeglichen wurden, und stellt somit auch nur eine von mehreren Anpassungsmöglichkeiten zur qualitative Wiedergabe der experimentellen Ergebnisse dar. Dieser Unsicherheit in Bezug auf absolute Werte stehen jedoch einige interessante Beobachtungen bezüglich der relativen Eigenschaften der untersuchten Gemische gegenüber, welche im folgenden näher ausgeführt werden.

Nach der oben erwähnten groben Festlegung von  $J_{I,II}$  wurden die  $c_p^*$ -Kurven für die Gemische DLPC/DSPC, DMPC/DSPC und DMPC/DPPC nach dem abgeleiteten Modell bei jeweils unterschiedlichen Molenbrüchen ohne weitere „Eingriffe“ simuliert, wobei die Rechenzeit pro Gemisch etwa 36 Stunden auf der OCTANE und etwa eineinhalb Wochen (!) auf der INDIGO betrug. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:

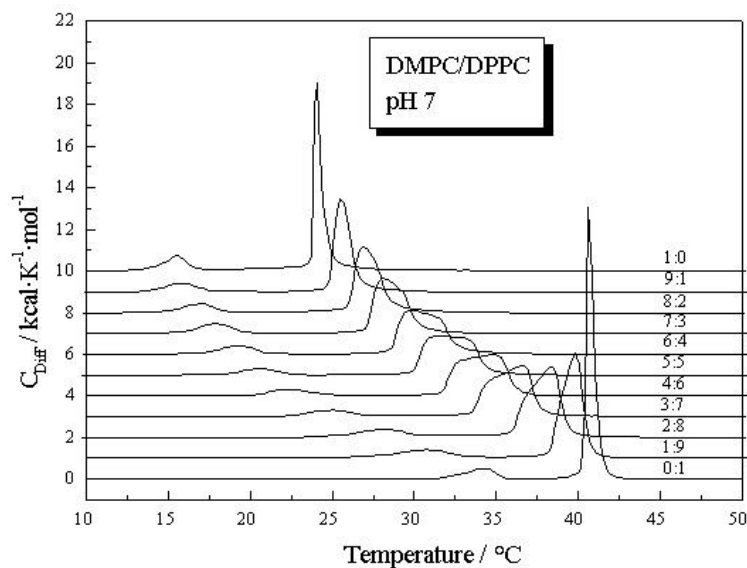






**Abbildung 51:** Simulation der  $c_p^*$ -Kurven bei verschiedenen Molenbrüchen nach Gleichung (73) für unterschiedliche pseudobinäre Lipidgemische; pro Datenpunkt wurden bei einer Gesamtzahl von jeweils  $1 \times 10^8$  Monte Carlo-Schritten 6250 Meßwerte aufgenommen; die durchgezogenen Linien dienen lediglich der besseren Veranschaulichung und besitzen keine physikalische Bedeutung.

Bereits bei oberflächlicher Betrachtung der Diagramme erkennt man sofort, daß die Simulation offenbar in der Lage ist, das Kernproblem der Mischungsreihe – nämlich die mit der Kettenlängendifferenz zunehmende Abweichung von der Idealität [Mabrey und Sturtevant, 1976] – vernünftig zu reproduzieren. Dabei stimmt der Verlauf der  $c_p^*$ -Kurven für DLPC/DSPC und DMPC/DSPC auch sehr gut mit den mit Hilfe des Zehnzustandsmodells generierten Daten [Jørgensen et al., 1993] sowie qualitativ mit den in Mabrey und Sturtevant [1976] gemessenen DSC-Kurven überein, wobei im Falle von DMPC/DPPC in der Literatur allerdings keine entsprechenden Monte Carlo-Vergleichswerte gefunden werden konnten. Bei der Simulation des letztgenannten Gemisches zeigt sich außerdem noch eine interessante Eigenheit: Geht man anfänglich von reinem DPPC aus, so nehmen die  $c_p^*$ -Kurven mit zunehmendem  $x_{\text{DMPC}}$  (bis etwa 0.5) analog zu den experimentellen Daten (Abb. 52) kontinuierlich an Breite zu und an Höhe ab, um dann allerdings bei überwiegendem DMPC-Anteil sogar noch schmäler als die entsprechende Reinsubstanz zu werden.



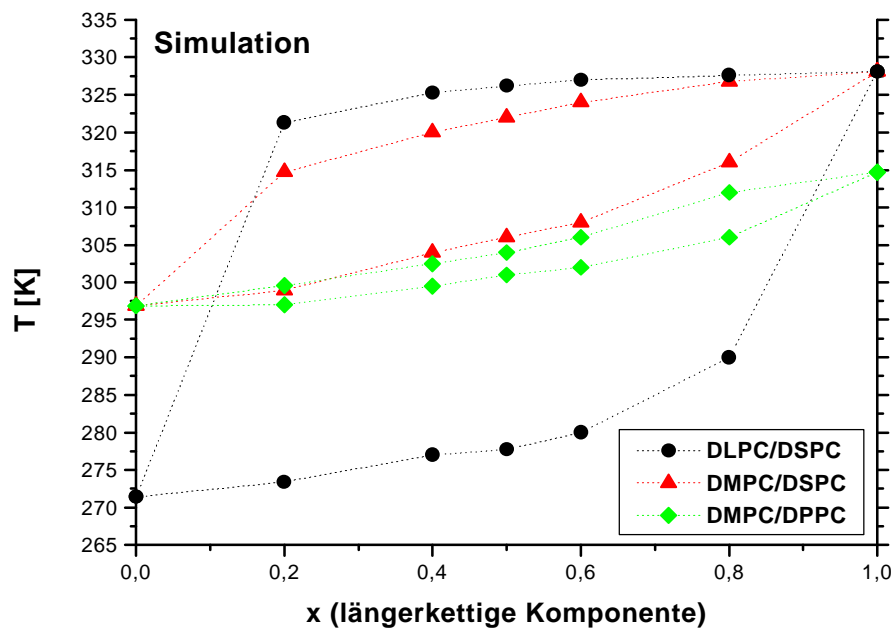
**Abbildung 52:** Experimentelle DSC-Kurven für das pseudobinäre Gemisch DMPC/DPPC, Daten aus Garidel und Blume [1998].

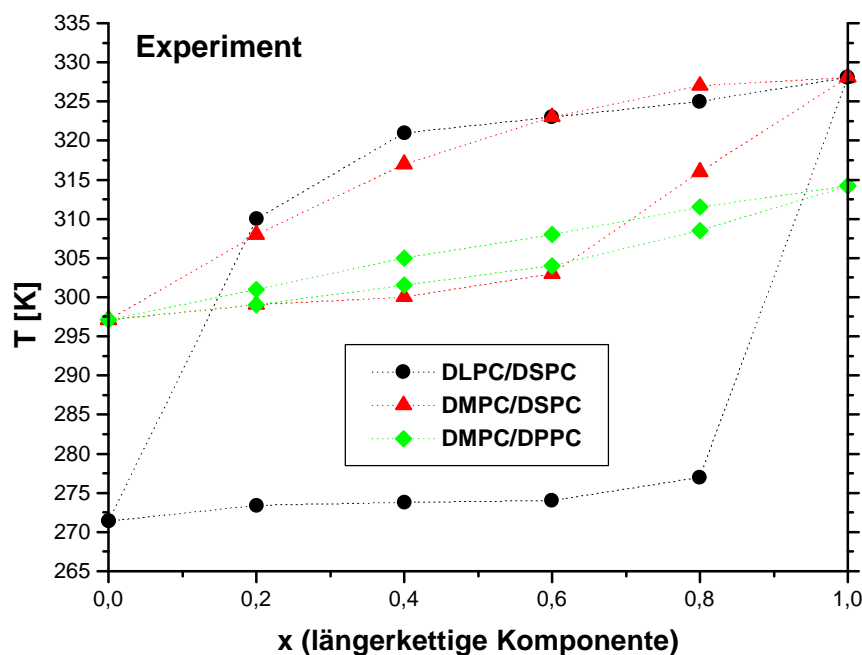
Obwohl dies nicht der Realität entspricht, läßt sich das simulierte asymmetrische Verhalten in abgeschwächter Form ebenfalls in Abb. 52 erkennen, denn auch hier sind die Umwandlungskurven mit wenig DMPC breiter als die analogen Kurven mit wenig DPPC. Zumindest für das verwendete Modell kann man dieses Phänomen möglicherweise dadurch erklären, daß bei tiefen Temperaturen unter ca. 300 K sich so gut wie alle DPPC-Moleküle (bzw. die eigentlich simulierten  $C_{16}$ -Acylketten) in der Gelphase befinden (Daten nicht dargestellt) und durch die annähernd ideale Mischbarkeit mit DMPC offensichtlich in der Lage sind, die Fluktuationen der kurzkettingen Majorität derart stark zu hemmen, daß bei  $T_m^{\text{DMPC}}$  die Phasenumwandlung fast vollständig unterdrückt wird [Risbo et al., 1995]; da aber das vorliegende Lipidgemisch sehr homogen ist, findet dafür bei einer höheren Temperatur ein um so schärferer Übergang der vielen gleichartigen  $(\text{DMPC})_x\text{-(DPPC)}_y\text{-„Nachbarschaften“}$  statt. Mit zunehmender Menge an DPPC hingegen zeigt die Analyse der parallel zu den  $c_p^*$ -Werten aufgenommenen statistischen Daten (nicht dargestellt) eine kontinuierlich wachsende Kluft zwischen den relativen Größen  $N_{A,I}/N_I$  und  $N_{A,II}/N_{II}$ , d. h. bedingt durch die relativ hohen Temperaturen eilt die Umwandlung der Myristoylketten – bei weiterhin annähernd idealer Mischbarkeit – bei  $x_{\text{DMPC}} = 0.2$  bereits um etwa ein Kelvin voraus und bewirkt somit bereits zwangsläufig eine Verbreiterung der beobachteten Fluktuationenkurven, wobei dieser Effekt durch die zunehmende Konformerenvielfalt der jeweils nächsten Nachbarn (sowohl



$N_{A,I}$ , als auch  $N_{A,II}$  sind jetzt ebenfalls wahrscheinlich!) und die damit verbundene unterschiedliche Absenkung der Aktivierungsenergie noch zusätzlich verstärkt wird.

Durch Bestimmung der Anfangs- und Endtemperaturen der jeweiligen Fluktuationbereiche der  $cp^*$ -Kurven als Funktion des Molenbruchs kann man die entsprechenden Phasendiagramme grob ermitteln und im Hinblick auf ihre Form mit den experimentellen Daten vergleichen, wobei eine exaktere Untersuchung diesbezüglich unter den gegebenen Umständen nicht sinnvoll erscheint, da – neben der hier verwendeten stark vereinfachten Vorgehensweise – die von *Mabrey und Sturtevant* [1976] angewendete Methode zur Analyse der DSC-Kurven ebenfalls mit gewissen Unsicherheiten behaftet ist [Johann et al., 1996]. Der Vergleich von Simulation und Praxis ist in den folgenden Diagrammen dargestellt, wobei eine Reduzierung der theoretischen Daten aus Abb. 51 um die Breite der reinen Komponenten wie bei den experimentellen Referenzwerten von *Mabrey und Sturtevant* nicht stattfand, da diese Korrektur bereits vor der Simulation implizit mit der Wahl von  $J_{I,II}$  und  $\tau$  vorgenommen wurde.





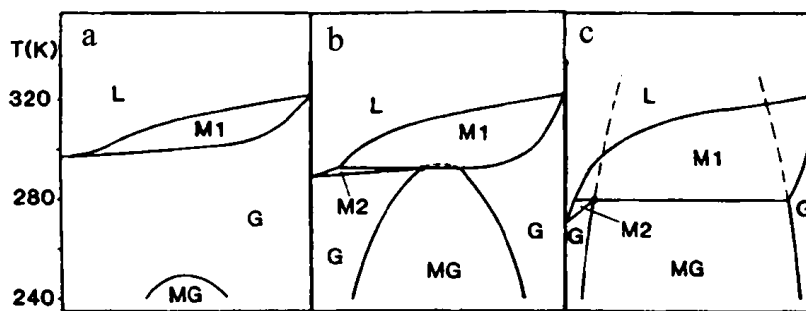
**Abbildung 53:** Phasendiagramme unterschiedlicher pseudobinärer Lipidgemische; die experimentellen Werte wurden aus DSC-Daten ermittelt [Mabrey und Sturtevant, 1976]; die simulierten Punkte stammen aus den  $c_p^*$ -Kurven in Abb. 51, wobei im Falle der Reinsubstanzen die jeweiligen Maximalwerte und ansonsten Anfangs- und Endtemperatur der jeweiligen Umwandlungskurven verwendet wurden; die gepunkteten Linien dienen der Anschaulichkeit und sind ohne physikalische Bedeutung.

Die Betrachtung der dargestellten Phasendiagramme macht die gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment nochmals deutlich. Allerdings zeigen sich dabei kleinere Abweichungen im Falle des DMPC/DPPC-Gemisches, bei welchem die für ein ideal mischbares System typische linsenförmige Gestalt durch die bereits erwähnte Asymmetrie des simulierten Ensembles – welche zwar auch bei dem mit Hilfe der regulären Mischungstheorie errechneten Phasendiagramm auftritt [Ipsen und Mouritsen, 1988], aber in diesem Zusammenhang keine weitere Erwähnung findet – nicht optimal reproduziert wird.

Solidus- und Liquidus-Kurve können bei den theoretischen Phasendiagrammen in Abb. 53 alternativ dadurch ermittelt werden, daß man entsprechende Simulationen innerhalb des Koexistenzbereichs durchführt und die jeweiligen Zusammensetzungen der Gel- bzw. flüssig-kristallinen Domänen untersucht. Stichproben für die äquimolaren Gemische DMPC/DPPC und DLPC/DSPC stimmen sehr gut mit den über die Analyse der  $c_p$ -Kurven bestimmten Werten überein, im Falle von DLPC/DSPC wird jedoch deutlich, daß die

Liquidus-Kurve bei  $x_{\text{DSPC}} < 0.2$  nicht so steil abfällt, wie es durch die (physikalisch bedeutungslose) gepunktete Linie in obiger Abbildung suggeriert wird.

Bereits die Zunahme der Kettenlängendifferenz  $\Delta M$  um weitere zwei Methylengruppen (DMPC/DSPC) führt zu einem peritektischen Mischungsverhalten [z. B. Vaz et al., 1989], welches nach *Sugár und Monticelli* [1985] für PC/PC-Gemische dadurch hervorgerufen wird, daß sich eine Gelphasen-Mischungslücke mit steigendem  $\Delta M$  immer mehr in den Koexistenzbereich des Phasendiagrammes schiebt (Abb.54), bis schließlich ein monotekti-sches System (DLPC/DSPC) entsteht [Mabrey und Sturtevant, 1976].

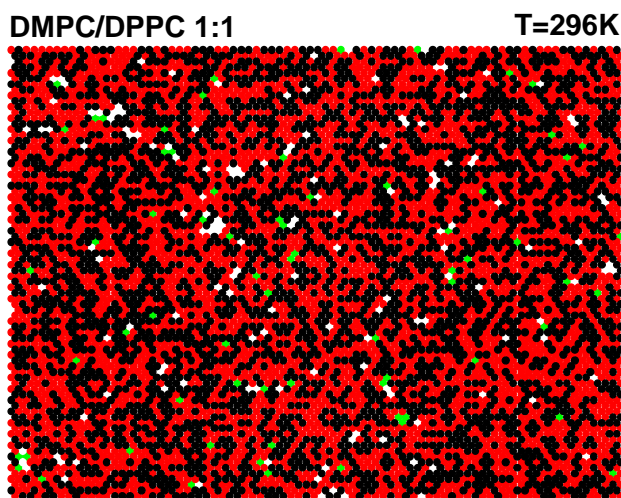


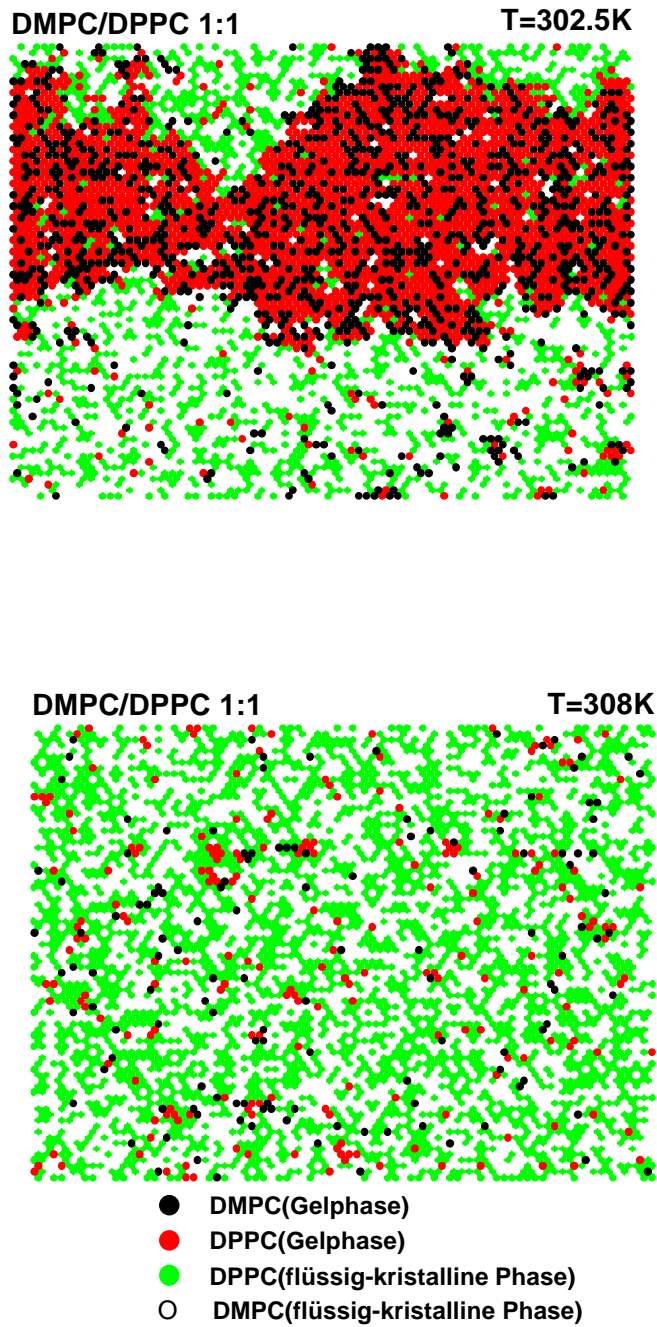
**Abbildung 54:** Theoretische Beschreibung des Mischungsverhaltens von PC/PC-Systemen auf der Grundlage von Berechnungen mit Hilfe der Landau-Theorie [aus *Sugár und Monticelli, 1985*]: Mit zunehmender Kettenlängendifferenz (a@b@c) schiebt sich die Mischungslücke MG immer mehr in den Koexistenzbereich M1 bzw. M2.

Diesem Trend folgen auch die Ergebnisse der Simulation, allerdings ist der Verlauf der Solidus-Kurven im Falle von DLPC/DSPC und DMPC/DSPC bei niedrigen x-Werten nicht so streng horizontal wie die experimentellen Daten dies vorgeben, d. h. das simulierte Gemisch verhält sich hier – ebenso wie die Ergebnisse aus der Simulation von DMPC/DSPC mit dem Zehnzustandsmodell [Mouritsen, 1991] – noch etwas idealer als das tatsächlich beobachtete. Im Hinblick auf die recht subjektive Art, nach welcher die Phasendiagramme in *Mabrey und Sturtevant* [1976] konstruiert werden mußten, ist diese Diskrepanz jedoch vermutlich viel zu gering um sinnvoll interpretiert zu werden, trotzdem sollte man sich aber vergegenwärtigen, daß bei den experimentellen Systemen stets mindestens zwei gleiche Acylketten nebeneinander liegen (weil sie ja zu demselben Molekül gehören), bei den simulierten Ensembles jedoch nicht gegeben ist, wodurch eine geringfügig bessere Durchmischung ermöglicht wird. Interessanterweise führt eine Substitution von

DMPC/DSPC durch SMPC/MSPC in der Praxis zu einem deutlich idealeren Mischungsverhalten in der Gelphase [Tenchov, 1985], was auch durchaus nachvollziehbar ist, denn in diesem Fall tritt gerade das entgegengesetzte Phänomen auf, daß jede Acylkette immer mindestens einen ungleichen Nachbarn besitzt. Mit dem Simulationsmodell bewegt man sich daher zwischen diesen beiden Extrema, wobei sich durch die einmalige Anpassung von  $J_{I,II}$  und  $\tau$  das Verhalten der Acylketten bereits fast vollständig auf die entsprechenden experimentellen Ergebnisse abstimmen läßt.

Neben der Analyse von Abb. 53 kann man noch weitere Informationen über den jeweiligen Verlauf der Phasenumwandlung erhalten, indem man sich den Vorteil einer Computersimulation zunutze macht und direkt einen Blick auf die Mikrokonfigurationen eines Gemisches bei unterschiedlichen Temperaturen (hier  $T_m - 5$  K,  $T_m$  und  $T_m + 5$  K) wirft, wie dies in den folgenden Diagrammen für ein äquimolares DMPC/DPPC-Gemisch getan wurde. Parallel zu diesen „Momentaufnahmen“ wurde außerdem eine umfangreiche statistische Untersuchung bzgl. Clusterstruktur und -kompaktheit durchgeführt, welche jedoch nicht explizit dargestellt, sondern lediglich in die weiteren Erläuterungen miteinbezogen wird.





**Abbildung 55:** *Simulierte Mikrokonfigurationen (6400 Teilchen) für das äquimolare DMPC/DPPC-Gemisch im thermodynamischen Gleichgewicht bei drei unterschiedlichen Temperaturen ( $T_m - 5$  K,  $T_m$ ,  $T_m + 5$  K); jeder Punkt korrespondiert dabei der Anschaulichkeit halber mit einem entsprechenden Lipidmolekül mit zwei identischen Acylketten, obwohl diese eigentlich einzeln untersucht wurden.*

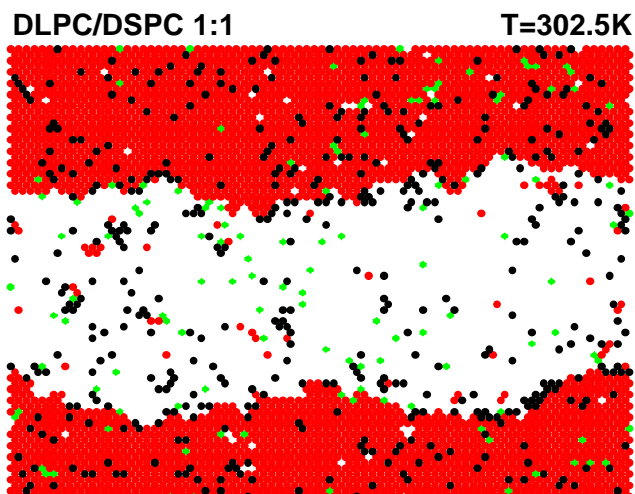
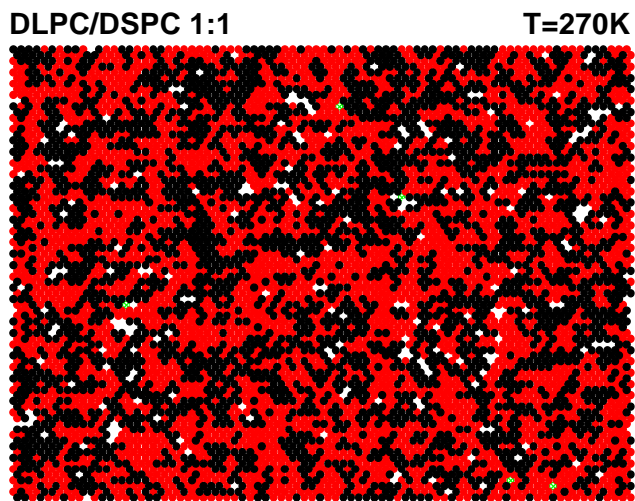
Bei 296 K erkennt man für das dargestellte System die erwartete gute Mischbarkeit zwischen den unterschiedlichen Komponenten, wobei sich der Anteil an den bereits auftretenden angeregten Konformeren ebenfalls in etwa die Waage hält.

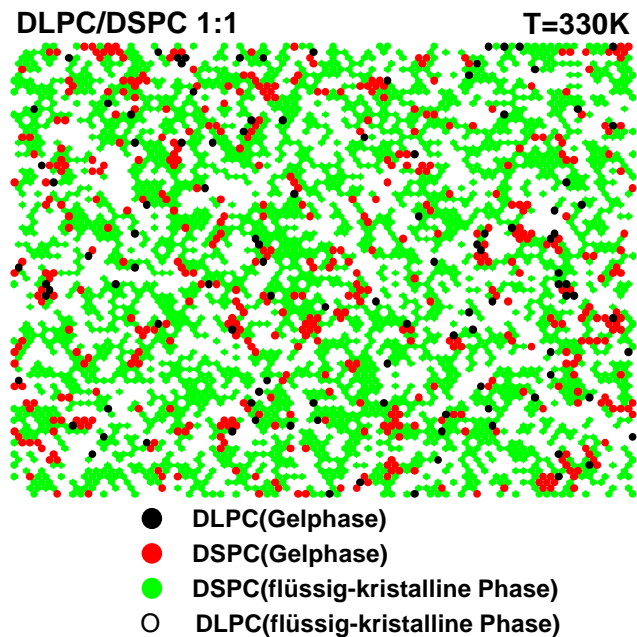
Erhöht man die Temperatur auf 302.5 K, womit man sich mitten im Koexistenzbereich von Gel- und flüssig-kristalliner Phase befindet, so hat offenbar ein kontinuierliches Aufschmelzen der Acylketten eingesetzt, von dem sowohl DMPC als auch DPPC etwa gleichermaßen betroffen sind. Die Umwandlung verläuft also – wie experimentell beispielsweise durch ESR-Messungen untermauert ist [Sankaram et al., 1992] – über die Ausbreitung bereits vorhandener flüssig-kristalliner Domänen (statistische Untersuchungen nicht dargestellt) und nicht über die Entstehung vieler neuer „Inseln“, denn in diesem Fall wäre in Abb. 55 keine derart große zusammenhängende Geldomäne mehr erkennbar. In einer Untersuchung an dem 1:1-Gemisch aus DMPC und DPPC mittels FRAP [Vaz et al., 1990] wurde außerdem der Konnektivitätspunkt, an welchem die vorhandenen flüssig-kristallinen Domänen zu fusionieren beginnen, etwa in der Mitte des Koexistenzbereiches gefunden, was in der Simulation gerade der hier verwendeten Temperatur von 302.5 K entsprechen würde (die experimentellen Werte liegen geringfügig darüber). Nach dem mittleren Diagramm in Abb. 55 zu urteilen, liegt die Fusionstemperatur bei dem verwendeten Modell jedoch offensichtlich etwas niedriger als in der Realität, denn wie leicht erkennbar hat der Zusammenschluß der einzelnen Cluster bei der vorliegenden Konfiguration bereits größtenteils stattgefunden.

Außer der ins Auge springenden Beobachtung, daß die Umwandlung über eine ausgeprägte Domänenbildung gleichphasiger Teilchen, jedoch unter annähernder Beibehaltung der idealen Mischungseigenschaften zwischen unterschiedlichen Komponenten erfolgt, läßt sich bei genauerem Hinsehen ein weiteres Phänomen entdecken, welches bei der Simulation von nichtidealen Systemen (z. B. DMPC/DSPC) mit dem Zehnzustandsmodell noch deutlicher erkennbar ist und in der entsprechenden Literatur als „wetting-effect“ bezeichnet wird [z. B. Mouritsen et al., 1995a]. Unter diesem Ausdruck ist zum einen das bevorzugte Auftreten intermediärer Kettenkonformationen an den Phasengrenzen zu verstehen (was allerdings nur bei einem Modell mit mehr als zwei Zuständen beobachtet werden kann) und zum anderen das Bestreben der flüssig-kristallinen Teilchen der höher schmelzenden Komponente (bzw. der Gelteilchen der tiefer schmelzenden Komponente), sich direkt an Gelpha-

sen-Domänen (bzw. flüssig-kristalline Domänen) anzulagern. In der oben dargestellten Abbildung wird dieses Verhalten dadurch deutlich, daß sich besonders viele grüne Punkte an die große Geldomäne bei 302.5 K anlagern und damit zu einer Erniedrigung der Grenzflächenspannung beitragen, wodurch die Lebensdauer des Clusters erhöht wird [Jørgensen et al., 1993].

Nach dieser Betrachtung eines annähernd ideal mischbaren Lipidsystems ist es von einigem Interesse, sich zum Vergleich mit den analogen Mikrokonfigurationen ( $T_m - 5$  K,  $T_m$ ,  $T_m + 5$  K) von DLPC/DSPC (1:1) auseinanderzusetzen, welche in der folgenden Abbildung dargestellt sind:





**Abbildung 56:** *Simulierte Mikrokonfigurationen (6400 Teilchen) für das äquimolare DLPC/DSPC-Gemisch im thermodynamischen Gleichgewicht bei drei unterschiedlichen Temperaturen ( $T_m - 5$  K,  $T_m$ ,  $T_m + 5$  K); jeder Punkt korrespondiert dabei der Anschaulichkeit halber mit einem entsprechenden Molekül mit zwei identischen Acylketten, obwohl diese eigentlich einzeln untersucht wurden.*

Zu den abgebildeten Diagrammen existieren in diesem Fall auch analoge Daten aus dem Zehnzustandsmodell [Jørgensen et al., 1993], welche in der Gelphase eine deutlich ausgeprägtere Separation zwischen den unterschiedlichen Komponenten aufweisen als dies in Abb. 56 der Fall ist, obwohl man auch dort im Vergleich zu DMPC/DPPC eine weitaus stärkere Domänenbildung erkennen kann (statistischer Beweis nicht dargestellt). Diese Tendenz war auch aufgrund der Form der Phasendiagramme (Abb. 53) zu erwarten, da die Solidus-Kurven der Gemische DMPC/DSPC bzw. DLPC/DSPC wie bereits erwähnt etwas steiler als die experimentellen Werte verlaufen und somit eine bessere Mischbarkeit implizieren. Für die beiden letztgenannten Systeme ließe sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell das Phasenverhalten ohne weiteres durch eine angemessene Erhöhung des Parameters  $\tau$  (bzw. eine Erniedrigung von  $J_{I,II}$ ) einstellen, allerdings würde sich die Kettenlängendifferenz in dem ebenfalls untersuchten DMPC/DPPC-Gemisch dann ebenfalls deutlich gravierender auswirken und dort letztendlich zu einem unrealistischeren Phasenverhalten führen. Dieses Dilemma ist möglicherweise auch der Grund für die Tatsache, daß in allen gesichteten Publikationen über das Zehnzustandsmodell dieses System nie mittels Monte Carlo untersucht wurde, sondern sich die Analysen stets auf die weniger idealen Ge-



mische beschränkte, welche durch ihr ähnliches Verhalten somit auch besser durch universale Parameter ( $\tau$ ) angepaßt werden können.

Eine Erhöhung der Temperatur auf 302.5 K (Mittelpunkt der Koexistenzkurve) führt dann allerdings zu dem gleichen Erscheinungsbild wie in *Jørgensen et al.* [1993]: Die niedriger schmelzende Komponente liegt zum größten Teil in der flüssig-kristallinen Phase vor, was wegen der daraus resultierenden ungünstigeren Wechselwirkungen mit den in der Gelphase befindlichen längeren Acylketten zu einer ausgeprägten Phasenseparation führt. Dabei besteht der gravierende Unterschied zu der analogen Konfiguration von DMPC/DPPC (Abb. 55) darin, daß hier eine sehr langlebige Struktur auftritt, während bei dem idealeren Gemisch Gel- und fluide Domänen im Vergleich dazu sehr schnell entstehen und verschwinden, wie man beispielsweise bei 302.5 K an dem deutlich höheren  $c_p^*$ -Wert als Maß für die Fluktuationsrate im Falle von DMPC/DPPC erkennt (Abb. 50). Der Hauptgrund hierfür ist der, daß bei dem letztgenannten Gemisch die Zusammensetzung der koexistierenden Phasen annähernd gleich ist und somit einen schnellen Austausch über relativ niedrige Energiebarrieren – fast wie bei einem Einkomponentensystem – ermöglicht, wogegen sich in dem DLPC/DSPC-System wegen der großen Differenz der  $T_m$ -Werte die eine Komponente bereits weit in der Gelphase befindet, während die andere noch deutlich von der Phasenumwandlung entfernt ist, so daß die auftretenden Fluktuationen nur sehr gering ausfallen können.

Der „wetting-effect“ ist in dem mittleren Diagramm von Abb. 56 ebenfalls – analog zu *Jørgensen et al.* [1993] – deutlich vorhanden und daran zu erkennen, daß sich die vorhandenen Gelphasenteilchen der kürzerkettigen Komponente bevorzugt an der Phasengrenze anlagern, um die dort auftretenden Energiedifferenzen abzumildern. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf einen Wert oberhalb des Koexistenzbereiches (330 K) führt zu einem kontinuierlichen Aufschmelzen der langkettigen Geldomäne und hierdurch wieder – ebenfalls analog zu *Jørgensen et al.* [1993] – zu einer Verbesserung der Mischungseigenschaften mit den flüssig-kristallinen DLPC-Teilchen, wobei allerdings weiterhin eine signifikante Clusterbildung gleicher Komponenten erhalten bleibt (statistischer Beweis nicht dargestellt).

Von experimenteller Seite aus gesehen wurde bis jetzt vorwiegend das System DMPC/DSPC, welches in seinen Eigenschaften zwischen den hier ausgeführten Beispielen steht (Daten nicht dargestellt), als Prototyp für nichtideales Mischungsverhalten mittels z. B.

ESR [Sankaram et al., 1992], FRAP [Almeida et al., 1992] und NMR [Dolainsky et al., 1997] untersucht und dabei festgestellt, daß die simulierten Gelphasendomänen auch tatsächlich im Koexistenzbereich auftreten und dort die Diffusion der fluiden Teilchen merklich behindern. Diese laterale Beweglichkeit wird bei den Monte Carlo-Simulationen durch die Verwendung der *Kawasaki*-Methode berücksichtigt und führt offensichtlich zu einem analogen Ergebnis, denn andernfalls würde eine solch eindeutige Phasenseparation wie in Abb. 56 nicht auftreten. Des weiteren konnte in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen (Daten nicht dargestellt) anhand von Neutronenstreuexperimenten festgestellt werden, daß das Mischungsverhalten von DMPC mit DSPC auch in der flüssig-kristallinen Phase einen deutlich nichtidealen Charakter besitzt [Knoll et al., 1981], so daß im Falle von DLPC/DSPC ein ähnliches Verhalten ebenfalls anzunehmen ist.

#### 4.2.3.3 Fazit

Das mit Hilfe von einfachen Überlegungen hergeleitete Mischungsmodell ist recht gut in der Lage, die elementaren experimentellen Befunde der Systeme DMPC/DPPC, DMPC/DSPC und DLPC/DSPC qualitativ wiederzugeben, was um so erstaunlicher ist, da außer den individuellen physikalischen Daten lediglich generalisierte Parameter verwendet wurden. Dies zeigt sehr anschaulich, daß die kollektiven Eigenschaften der untersuchten Lipidgemische auch in binären Mischungen offensichtlich sehr einfachen Grundprinzipien folgen und sich so durch lineare Skalierung der verwendeten anpassbaren Größen für verschiedene Kettenlängendifferenzen vorhersagen lassen.

Allerdings darf man nicht vergessen, daß nach wie vor – wie bei der Analyse der Einkomponentensysteme (Seite 121) ausgeführt – zahlreiche zum Teil gravierende Vereinfachungen gemacht werden müssen, um überhaupt eine Simulation durchführen zu können, und daher die Ermittlung von Absolutwerten weiterhin mit Vorsicht zu genießen ist. Für ein Gemisch mit stark differierenden Kettenlängen kommt noch erschwerend hinzu, daß die sonst zu vernachlässigenden transversalen Wechselwirkungen mit der gegenüberliegenden Doppelschichthälfte [Mouritsen, 1990] durch mögliche Verzahnungseffekte an Bedeutung gewinnen können [Jørgensen und Mouritsen, 1995] und somit unter Umständen eine zusätzliche Fehlerquelle darstellen.

---

## 5 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

---

### 5.1 DSC-MESSUNGEN

Da in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk der experimentellen Arbeiten auf der Untersuchung des Mischungsverhaltens flüssig-kristalliner PC/PE- und PC/PG-Systeme liegt, ist es für eine nähere Analyse recht hilfreich, wenn die jeweiligen Phasendiagramme der einzelnen Gemische bekannt sind. Ein Teil der hierfür notwendigen Messungen wurde bereits von *Garidel et al.* [1997a] und *Garidel und Blume* [1998] durchgeführt, so daß im folgenden lediglich die PC/PE-Gemische mit ungleichen Kopfgruppen sowie das System DMPC/DPPG dargestellt sind.

#### 5.1.1 Probenvorbereitung und meßtechnische Details

Zur Herstellung der Mischungsreihen wurden zuerst Stammlösungen der Reinsubstanzen (in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  4:1 v/v) angesetzt und hiernach die entsprechenden Gemische mit Hilfe eines Dosimeters derart hergestellt, daß die Gesamtmasse an Lipid genau 2 mg pro Probe betrug. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Erhitzen (auf ca. 55° C) im Stickstoffstrom entfernt, wobei man bei den PC/PE-Gemischen wegen der deutlich geringeren Löslichkeit von PE ein zu schnelles Abdampfen vermeiden muß, da dieses andernfalls durch die hiermit verbundene Kühlung zuerst ausfällt. Hierdurch würde eine makroskopische Phasenseparation auftreten, welche sich auch bei der weiteren Behandlung der Probe nicht mehr aufheben ließe. Nach der Verflüchtigung des Lösungsmittels wurden die Lipidgemische über Nacht im Hochvakuum vollständig getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung unter Lichtausschluß gelagert.

Vor Beginn der Messung wurde das entsprechende Lipidgemisch mit 2 ml entgastem Reinstwasser (bzw. 0.1 M entgaster NaCl-Lösung im Falle von DMPC/DPPG) versetzt, im Wasserbad ca. 30 s auf eine Temperatur etwa 10° C oberhalb von  $T_m$  erhitzt und anschließend mit Hilfe einer Rüttelapparatur (Jahnke&Kunkel VF2) 30 s dispergiert. Dieser Zyklus wurde so lange wiederholt, bis die gesamte Probe vollkommen homogenisiert war. Insbesondere bei den Systemen mit DPPE mußte teilweise zusätzlich ein Ultraschallbad

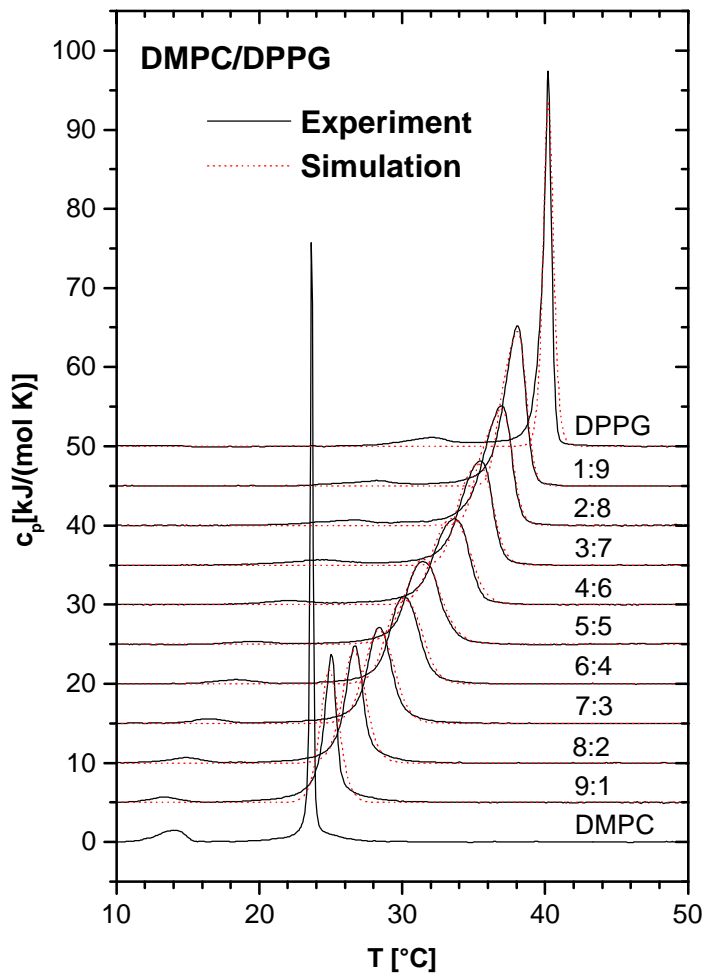
(Transonic 310/H) zur Zerkleinerung der recht stabilen „Lipidklumpen“ eingesetzt werden, wobei nach einer solchen Behandlung stets noch eine längere Zeit gerüttelt wurde, um den entstandenen kleinen Vesikeln wieder die Möglichkeit zur Fusion zu geben. Abschließend wurde das Lipidgemisch zusammen mit der entsprechenden Referenz noch 2 min unter leichtem Vakuum entgast. Der pH-Wert der PC/PG-Proben lag zwischen 5.8 und 7 und wurde auch nicht genauer eingestellt, da unter den vorliegenden Bedingungen das DPPG in diesem Bereich stets eine Partialladung von -1 aufweist [Boggs, 1987] und sich die  $T_m$ -Werte ebenfalls nicht signifikant verändern [Blume, 1991].

Die Untersuchung der Probe erfolgte in einem VP-DSC-Kalorimeter der Firma Microcal [Plotnikov et al., 1997] bei einer Heizrate von  $60^\circ/\text{h}$  und einem Filter von 4. Zusätzlich wurde die Ansprechzeit der Probenheizung auf den niedrigsten möglichen Wert eingestellt, um auch scharfe Umwandlungen mit hoher Genauigkeit registrieren zu können. Die Referenzzelle wurde zum Ausgleich von Verdampfungsverlusten vor Beginn der Messung stets neu gefüllt. Für jedes Gemisch wurden drei Aufheizkurven aufgenommen, wobei eine signifikante Änderung der Kurvenform jedoch bei keinem der untersuchten Gemische festgestellt werden konnte.

### **5.1.2 Das System DMPC/DPPG**

Nach der experimentellen Ermittlung der  $c_p$ -Kurven wurden diese analog zu *Garidel et al.* [1998] mit Hilfe eines thermodynamischen Ansatzes (dem Programm SIFA) simuliert, um auf diese Weise eine Aussage über die jeweiligen Nichtidealitätsparameter  $\rho_G$  bzw.  $\rho_L$  der Gel- bzw. flüssig-kristallinen Phase machen zu können [Johann et al., 1996]. Zusätzlich lieferte diese Anpassung einen objektiveren Wert für Beginn und Ende der Phasenumwandlung ( $T_-$  bzw.  $T_+$ ) als die übliche molenbruchgewichtete Reduktion um die Breite der reinen Komponenten [z. B. Tenchov, 1985] und diente somit als Grundlage für die Konstruktion des entsprechenden Phasendiagramms.

Die theoretischen und experimentellen Thermogramme sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:



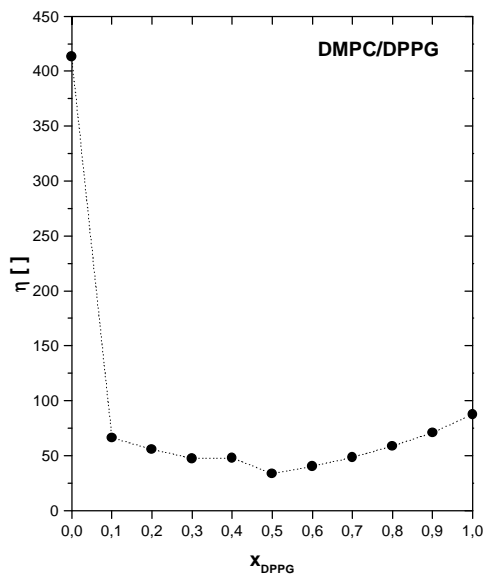
**Abbildung 57:** Experimentelle  $c_p$ -Kurven für das System DMPC/DPPG, vermessen in 0.1 M NaCl-Lösung, und die entsprechenden mit dem Programm SIFA nach Johann *et al.* [1996] durchgeführten Anpassungen; die Umwandlungskurve von reinem DMPC ist so scharf, daß sie nicht simuliert werden konnte.

Wie man erkennt, verschieben sich die  $c_p$ -Kurven kontinuierlich mit dem Molenbruch, und es treten außerdem auch keine zusätzlichen Maxima bei der Hauptumwandlung auf, so daß man auf eine sehr gute Mischbarkeit der beiden Komponenten schließen kann. Auch die theoretischen  $c_p$ -Kurven geben die jeweiligen Phasenübergänge für alle Gemische recht brauchbar wieder. Im Falle von reinem DMPC versagt allerdings die Simulation, da die experimentelle Kurve eine derart hohe Kooperativität aufweist, daß die Anpassung in letzter Iteration zu einem physikalisch unsinnigen unendlich schmalen Signal führt. Aus diesem Grunde ist es auch nicht möglich, mit Hilfe von SIFA den exakten Betrag für die *van't Hoff*-Enthalpie der Phasenumwandlung zu berechnen, so daß im Falle von DMPC die Näherung

$$\Delta H_{\text{vH}} \approx \frac{28.9 \cdot T_m^2}{\Delta T_{1/2}} \left[ \frac{\text{J}}{\text{mol}} \right] \quad (74)$$

zur Berechnung der kooperativen Einheit  $\eta$  verwendet wird [vgl. Blume, 1988a], wobei  $\Delta T_{1/2}$  der Halbwertsbreite der gemessenen Wärmekapazitätskurve entspricht.

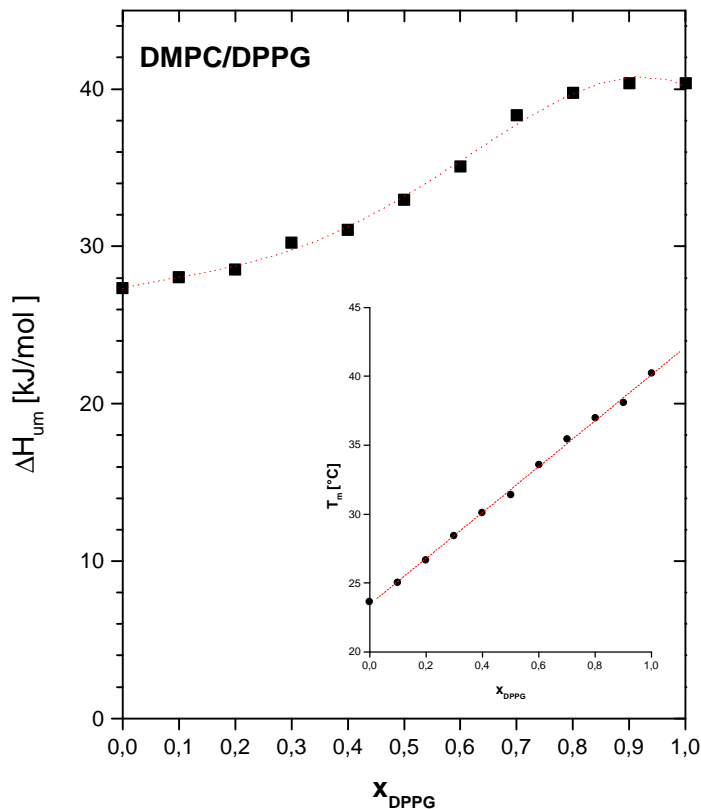
Generell versteht man unter der kooperativen Einheit die (theoretische) Anzahl der Teilchen, die ihren Phasenzustand bei  $T = T_m$  gleichzeitig ändern [Sugár, 1987] (Abb. 58):



**Abbildung 57:** kooperative Einheit  $\eta$  nach Johann et al. [1996] als Funktion des Molenbruchs; die Angabe für reines DMPC wurde mit Hilfe von Gleichung (74) berechnet.

Der Verlauf der  $\eta$ - $x$ -Kurve zeigt die für binäre Lipidgemische typische U-Form [Sugár, 1987] mit der kontinuierlichen Abnahme der Kooperativität bis  $x = 0.5$  durch das verstärkte Auftreten der zweiten Komponente in der Mischung.

Die aus Abbildung 57 durch Integration erhaltenen Umwandlungsenthalpien sowie die  $T_m$ -Werte der einzelnen Gemische sind in dem folgenden Diagramm zur besseren Übersicht noch einmal gesondert dargestellt, wobei  $T_m$  jeweils als Maximalwert der entsprechenden  $c_p$ -Kurve definiert wird:

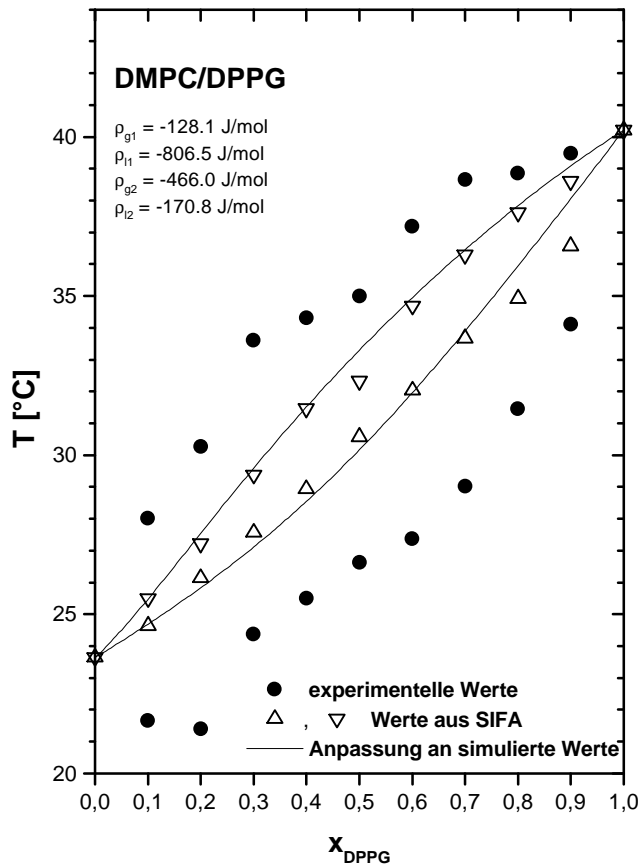


**Abbildung 59:** Umwandlungsenthalpien und  $T_m$ -Werte des Systems DMPC/DPPG als Funktion des Molenbruchs; die gepunkteten Linien dienen der besseren Anschaulichkeit und besitzen keine physikalische Bedeutung.

Während sich  $T_m$  – wie aufgrund der DSC-Kurvenformen erwartet – fast linear mit dem Molenbruch verhält, zeigt die Umwandlungsenthalpie einen kontinuierlichen aber sigmoiden Verlauf zwischen den Werten der beiden Reinsubstanzen. Dieses Verhalten konnte von *Chen et al.* [1998] wenige Wochen nach den eigenen Messungen bestätigt werden.

Aus den in Abb. 57 dargestellten theoretischen Anpassungen erhält man wie bereits erwähnt auf relativ objektive Weise die Anfangs- und Endtemperaturen der jeweiligen Phasenumwandlungen. Diese können dann ihrerseits wieder als Ausgangswerte für die Simulation des Phasendiagramms genommen werden, welches in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Programms FASE [Johann et al., 1996] unter Verwendung von vier

anpaßbaren Nichtidealitätsparametern (zwei für jede Phase) berechnet wurde. Die folgende Abbildung faßt die theoretischen Ergebnisse zusammen, wobei zum Vergleich auch die „manuell“ ermittelten  $T_+$  - bzw.  $T_-$ -Werte aufgeführt sind, welche auf herkömmliche Weise durch die molenbruchgewichtete Korrektur der  $c_p$ -Kurven um die Breite der Reinumwandlungen erhalten werden [z. B. Mabrey und Sturtevant, 1976; Chen et al., 1998]:



**Abbildung 60:** Anpassung des Phasendiagramms mit dem Programm FASE an die theoretisch ermittelten Anfangs- und Endtemperaturen der  $c_p$ -Kurven (offene Dreiecke) bei unterschiedlichen Molenbrüchen; die aus dieser Simulation erhaltenen Nichtidealitätsparameter  $r$  sind im Diagramm angegeben; die ausgefüllten Kreise zeigen das Ergebnis der „manuellen“ Ermittlung von  $T_+$  und  $T_-$  durch Reduktion um die Breite der Reinumwandlungen.

Im Gegensatz zu den experimentellen Daten zeigen die mit SIFA ermittelten Temperaturwerte einen recht kontinuierlichen Kurvenverlauf mit deutlich geringeren „Ausreißern“, welcher sich mit einem fast ideal linsenförmigen Phasendiagramm simulieren läßt. Dieses Ergebnis ist vollkommen analog zu dem von *Chen et al.* [1998], wobei dort die Breite des Koexistenzbereiches aufgrund des verwendeten experimentellen Auswerteverfahrens etwas größer ist.



Mit den in Abb. 60 angegebenen Nichtidealitätsparametern lassen sich zudem gewisse Aussagen über das Mischungsverhalten der beiden Komponenten machen, wobei zur anschaulicheren Interpretation die folgenden Zusammenfassungen vorgenommen werden [Johann et al., 1996]:

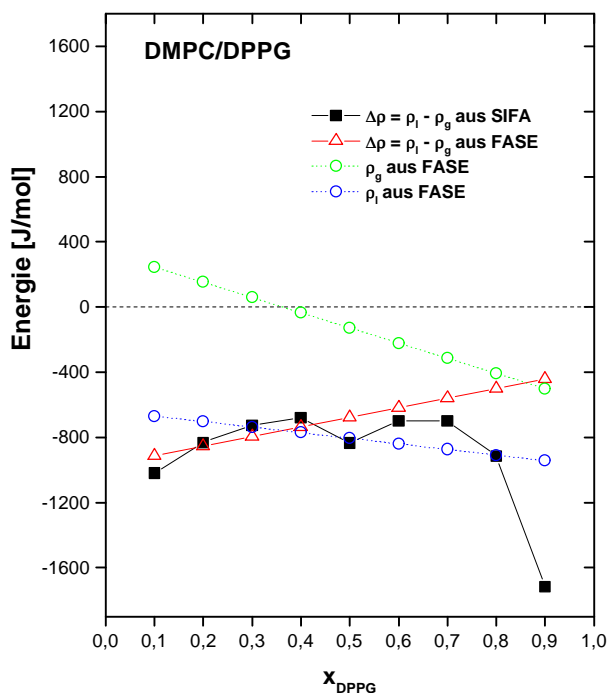
$$\rho_g = \rho_{g1} + (2 \cdot X_{DPPG} - 1) \cdot \rho_{g2}, \quad (75)$$

$$\rho_l = \rho_{l1} + (2 \cdot X_{DPPG} - 1) \cdot \rho_{l2} \quad (76)$$

und

$$\Delta\rho = \rho_l - \rho_g. \quad (77)$$

Die Indizes g und l bezeichnen hierbei die Gel- bzw. flüssig-kristalline Phase, und der Parameter mit dem Index 2 beschreibt einen Asymmetrieterm, welcher den Einfluß des Molenbruchs auf das Mischungsverhalten berücksichtigt. Eine entsprechende Zusammenstellung der nach den obigen Gleichungen ermittelten Kenngrößen findet sich zusammen mit den  $\Delta\rho$ -Werten aus den Einzelsimulationen der  $c_p$ -Kurven (wobei allerdings lediglich ein Nichtidealitätsparameter pro Phase verwendet wurde) in dem nachfolgenden Diagramm:



**Abbildung 61:** Darstellung der  $\Delta\rho$ -Werte aus der Einzelsimulation der  $c_p$ -Kurven (Programm SIFA) und der Simulation des Phasendiagramms (Programm FASE) als Funktion des Molenbruchs; die aus FASE ermittelten  $\rho_g$ - und  $\rho_l$ -Werte sind ebenfalls der Anschaulichkeit halber dargestellt.

### 5.1.2.1 Diskussion

Wie die hier vermessenen DSC-Kurven zeigen, weist das System DMPC/DPPG über den gesamten Molenbruchbereich ein recht ideales Mischungsverhalten auf, was mit den Ergebnissen von *Garidel et al.* [1997a] für die Systeme DMPC/DMPG, DPPC/DPPG und DPPC/DMPG (welche sich ebenfalls annähernd ideal verhalten) im Einklang steht. Bei der Analyse der Meßkurven ist außerdem die Tatsache sehr interessant, daß die in der vorliegenden Arbeit für DMPC gefundene kooperative Einheit deutlich über dem Wert von DPPG liegt. Für diesen hohen Absolutwert spricht auch die Tatsache, daß man mit anderen Methoden für die Kooperativität von DMPC ebenfalls hohe Beträge bis etwa 650 findet [Marsh et al., 1977].

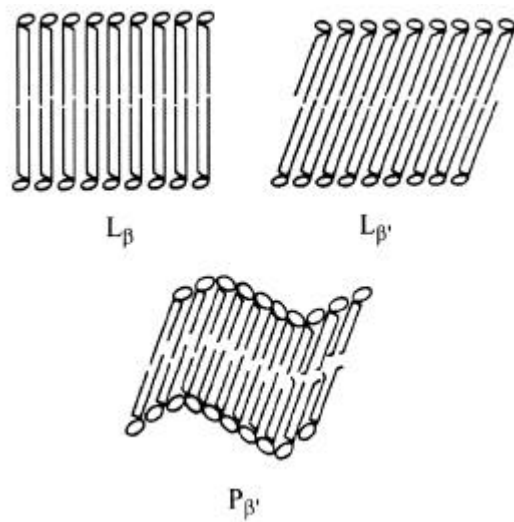
Im direkten Vergleich mit DPPC/DMPG zeigt das hier untersuchte Gemisch DMPC/DPPG eine etwas idealere Form des Phasendiagramms. Die direkt hieraus ermittelten  $\Delta\rho$ -Werte besitzen zwar in beiden Fällen eine positive Steigung mit

zunehmendem  $x_{PG}$ , liegen aber für das letztgenannte System sehr nahe bei null, was somit die Vermutung nahelegt, daß sich die Mischungseigenschaften bei einem Phasenübergang – im Gegensatz zu DPPC/DMPG – nur geringfügig ändern. Wagt man eine Interpretation der absoluten  $\rho$ -Werte, welche allerdings aufgrund des Simulations-Algorithmus mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet sind, so zeigt sich bei beiden Gemischen in der Gelphase (und in abgeschwächter Form auch in der flüssig-kristallinen Phase), daß eine geringe Konzentration an langkettiger Komponente offensichtlich stärker zur Clusterbildung neigt, als dies umgekehrt bei einer kurzkettingen Minorität der Fall ist. Da man eine analoge Tendenz auch bei dem System DMPC/DPPC beobachten kann [Garidel und Blume, 1998], liegt die Vermutung nahe, daß Ladungseffekte bei PC/PG-Gemischen verglichen mit den Dispersionswechselwirkungen eher eine untergeordnete Rolle spielen, so daß die Kopfgruppendifferenzen kaum ins Gewicht fallen. Zu einem ähnlichen Schluß kommen auch *Nibu et al.* [1995] aufgrund von kalorimetrischen Untersuchungen von Lipidsystemen mit unterschiedlichen Kopfgruppen. Allerdings sind aber die Absolutwerte von  $\rho_{g1}$  und  $\rho_{l1}$  bei dem hier untersuchten Gemisch beide negativ, was sehr wohl auf eine vorhandene ladungsinduzierte Abstoßung hindeutet, auch wenn dies jedoch bei der Untersuchung von DPPC/DMPG nicht bestätigt wird [Garidel et al., 1997a].

### **5.1.3 Das PC/PE-System**

PC und PE bilden zusammen den Löwenanteil aller in eukaryontischen Membranen vorkommenden Phospholipide [Dowhan, 1997], so daß der Untersuchung ihres Mischungsverhaltens auch ein besonderes praktisches Interesse zukommt. Aus diesem Grunde wurde auch bereits vor recht langer Zeit damit begonnen, die entsprechenden PC/PE-Gemische kalorimetrisch zu vermessen [z. B. Blume und Ackermann, 1974; Chapman et al., 1974], was letztendlich zur Folge hat, daß für alle in der vorliegenden Arbeit relevanten Systeme bereits entsprechende Vergleichsdaten aus früheren Untersuchungen existieren. Auf eine Wiederholung der DSC-Messungen wurde aber dennoch nicht verzichtet, da zum einen die Kalorimeterqualität deutlich gestiegen ist und zum anderen eine einheitliche Vermessung der unterschiedlichen PC/PE-Gemische ohnehin unvermeidlich wird, wenn man mit Hilfe der Simulation von  $c_p$ -Kurven und Phasendiagrammen nach *Johann et al.* [1996] sinnvolle Vergleiche anstellen will.

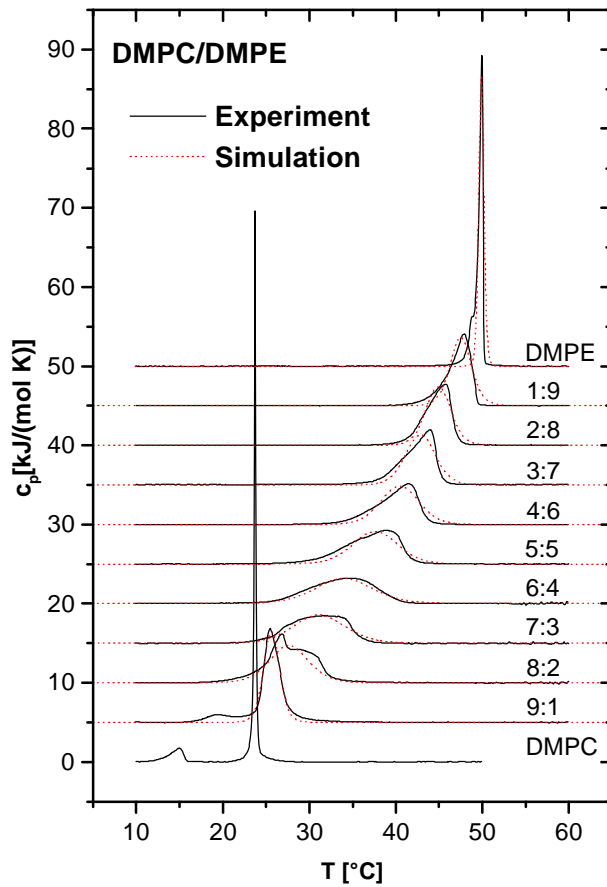
Obwohl beide Kopfgruppen zwitterionisch aufgebaut sind und dementsprechend keine resultierende Partialladung aufweisen, existieren dennoch einige gravierende Unterschiede, welche man sich bei der Interpretation des Mischungsverhaltens vergegenwärtigen muß [Seddon, 1990]: So besitzt das PE durch seine quartäre Ammoniumgruppe die Möglichkeit, Wasserstoffbrücken mit benachbarten Phosphatgruppen (von PE oder PC) auszubilden, während die Cholin Kopfgruppe hierzu nicht in der Lage ist. Dies bewirkt neben einer deutlichen Erhöhung der Umwandlungstemperatur auch eine Abnahme der Hydratation und führt zusammen mit dem im Vergleich zu PC geringeren Volumen der Kopfgruppe dazu, daß der gesamte Raumbedarf des Moleküls nicht mehr einem Zylinder (wie bei PC) sondern eher einem Kegel entspricht, was die Entstehung hexagonaler Phasen begünstigt. Unter den gegebenen Bedingungen tritt eine solche Umwandlung für DMPE jedoch gar nicht und für DPPE erst bei etwa 121° C auf [Koynova und Caffrey, 1994], so daß sie bei den hier angestellten Untersuchungen nicht berücksichtigt werden müssen. Ein weiterer Unterschied zeigt sich in der Struktur der Gelphase: Während nämlich die verwendeten PCs wie auch PG [Garidel und Blume, 1998] unter Meßbedingungen in einer  $L_{\beta}$  bzw. (nach der Vorumwandlung)  $P_{\beta}$ -Phase vorliegen, befinden sich die PE-Moleküle in einer  $L_{\beta}$ -Phase mit nahezu senkrecht zur Membranoberfläche angeordneten Acylketten [Koynova und Caffrey, 1994, 1998], wie in Abb. 62 illustriert ist:



**Abbildung 62:** Schematische Darstellung unterschiedlicher Gelphasenstrukturen; Diagramm aus Cevc und Marsh [1987].

Neben der biologischen Relevanz besteht also durchaus auch ein akademisches Interesse an der Frage, wie sich pseudobinäre Mischungen zweier derart unterschiedlicher Moleküle verhalten.

## 5.1.3.1 Das System DMPC/DMPE

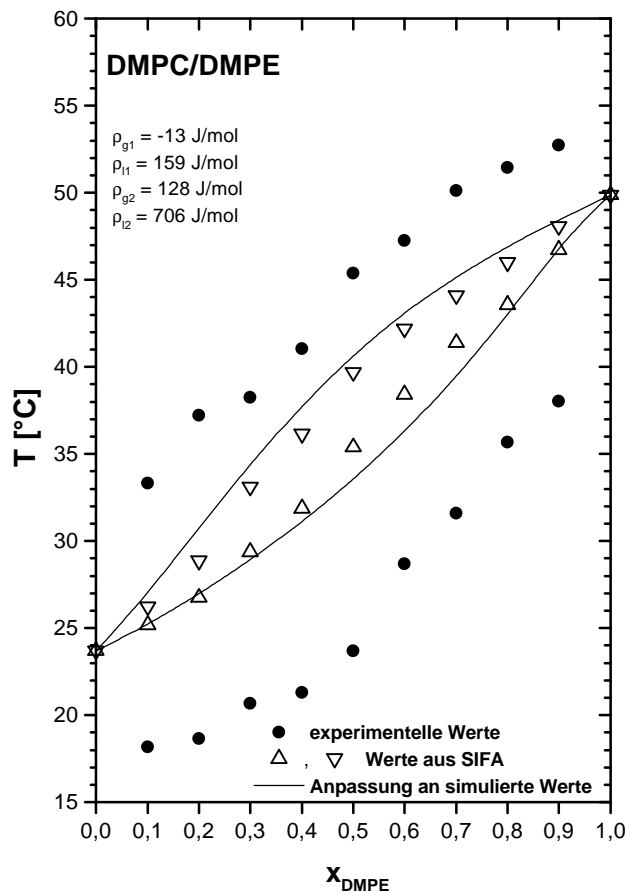


**Abbildung 63:** Experimentelle  $c_p$ -Kurven für das System DMPC/DMPE und die entsprechenden mit dem Programm SIFA nach Johann et al. [1996] durchgeführten Anpassungen; die Umwandlungskurve von reinem DMPC ist so scharf, daß sie nicht simuliert werden konnte.

Bereits bei der Betrachtung der DSC-Kurven fällt auf, daß zwar übereinstimmend mit Fluoreszenzmessungen an unilamellaren Vesikeln [Lentz und Litman, 1978] keine makroskopische Phasenseparation auftritt, aber das System dennoch ein deutlich weniger ideales Mischungsverhalten zeigt als etwa DMPC/DMPG bei pH 7 [Garidel et al., 1997a]. Besonders bemerkenswert ist zudem die auftretende starke Asymmetrie: So führt bereits eine geringe Menge an DMPE zu einem vollständigen Verschwinden der Vorumwandlung und einer extremen Verbreiterung des Hauptphasenüberganges, während die  $c_p$ -Kurven im umgekehrten Fall (geringe Menge an DMPC) eine eher kontinuierliche Veränderung erfahren. Dieses Phänomen wurde auch bei kalorimetrischen Messungen von *Chapman et al.* [1974] und *Blume* [1988a] gefunden und ist möglicherweise dadurch erklärbar, daß sich bereits eine geringe Menge PE sehr gut mit der gesamten PC-Matrix mischt, weil die Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbildung ohnehin mit jeder Phosphatgruppe von PC oder PE gegeben ist. Diese weiträumige Verteilung führt dann offensichtlich dazu, daß die räumliche Struktur der PC-Domänen in der Gelphase großflächig verändert wird und daher auch keine Vorumwandlung für den Übergang von  $L_{\beta}$  in  $P_{\beta}$  [Koynova und Caffrey, 1998] mehr erkennbar ist. Zudem ist auch die Hauptphasenumwandlung bei PC-reichen Gemischen deutlich von dieser Strukturänderung geprägt, wie man anhand der gravierenden Verbreiterung der  $c_p$ -Kurven in diesem Bereich erkennen kann.

Auf der anderen Seite zeigt die Zugabe von geringen Mengen an PC in eine PE-Matrix keinen beobachtbaren Einfluß auf die Gelphasenstruktur von PE. Folgt man der obigen Argumentation, so sollte eine PC-Minorität eine größere Tendenz zur Clusterbildung aufweisen als die entsprechende PE-Minorität, da PC keine neue Bindungsart „zu bieten hat“ und eine bessere Durchmischung das Aufbrechen von bereits zwischen den PE-Molekülen bestehenden H-Brücken erfordert. Außerdem sind die Dispersionswechselwirkungen zwischen den in der  $L_{\beta}$ -Phase befindlichen PE-Molekülen aufgrund ihrer parallelen Anordnung vermutlich stärker als zwischen PE und PC, wodurch eine Clusterung ebenfalls wahrscheinlich wird. Umgekehrt werden bei einem PC-System in der  $P_{\beta}$ -Phase die *van der Waals*-Wechselwirkungen bereits aufgrund der Packungseinschaften merklich reduziert [Koynova und Caffrey, 1998], was die Wechselwirkung mit PE-Molekülen begünstigt und daher eine gute Durchmischung bei kleinem  $x_{PE}$  bewirkt.

Einen genaueren Aufschluß über dieses Verhalten geben die Nichtidealitätsparameter, welche in der folgenden Abbildung zusammen mit dem Phasendiagramm dargestellt sind:



**Abbildung 64:** Anpassung des Phasendiagramms mit dem Programm FASE an die theoretisch ermittelten Anfangs- und Endtemperaturen der  $c_p$ -Kurven (offene Dreiecke) bei unterschiedlichen Molenbrüchen; die aus dieser Simulation erhaltenen Nichtidealitätsparameter  $r$  sind im Diagramm angegeben; die ausgefüllten Kreise zeigen das Ergebnis der „manuellen“ Ermittlung von  $T_+$  und  $T_-$  durch Reduktion um die Breite der Reinumwandlungen.

Die simulierte Liquidus-Kurve gibt den tendenziellen Verlauf der Meßpunkte wieder, während hingegen die Gemische mit  $x_{PE} = 0.5-0.7$  durch die Solidus-Linie nicht so gut angenähert werden. Eine Rechtfertigung für diese Abweichung besteht jedoch in der Tatsache, daß auch die Simulation der  $c_p$ -Kurven mit SIFA gerade in dem angegebenen Bereich auf der Gelphasenseite „zu kurz“ ausfällt (Abb. 63) und diese Ungenauigkeit durch die hier vorgenommene Anpassung teilweise wieder korrigiert wird.

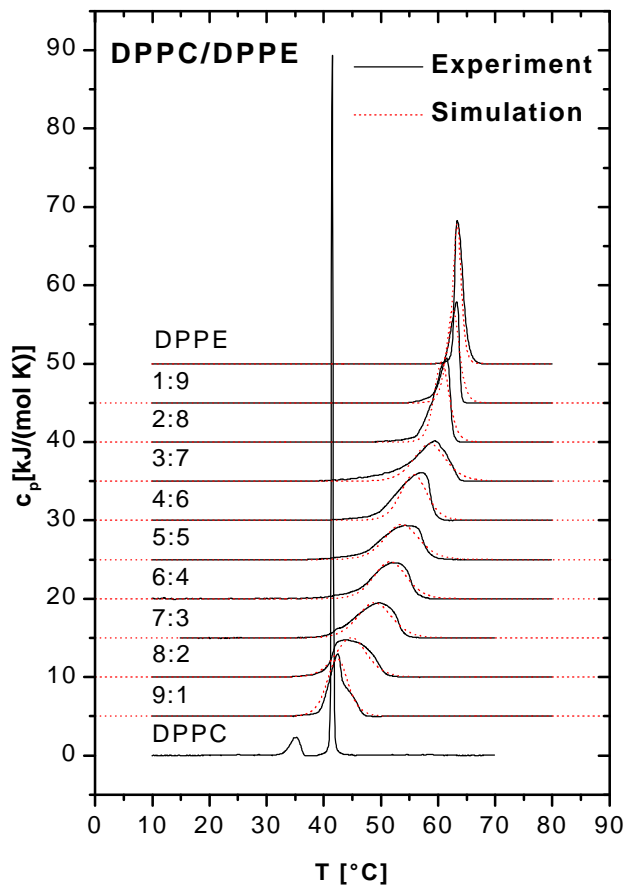


Was die resultierende Form betrifft, so stimmt das Phasendiagramm mit dem von *Blume* [1988a] mit ähnlichen Methoden simulierten überein, unterscheidet sich aber deutlich von Anpassungen auf der Basis anderer theoretischer Ansätzen [Lee, 1977b; Sugár und Monticelli, 1983], wobei allerdings ein allgemeiner Konsens in der Beobachtung besteht, daß bei dem System DMPC/DMPE über den gesamten Molenbruchbereich hinweg keine Entmischungserscheinungen zu beobachten sind.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den errechneten Nichtidealitätsparametern wider, welche ebenfalls in Abb. 64 aufgeführt sind: Für den Differenzbetrag  $\Delta\rho_1 = \rho_{l1} - \rho_{g1}$ , welcher bei der Simulation im Vergleich zu den Absolutwerten einer deutlich kleineren Streuung unterworfen ist [Johann et al., 1996], ergibt sich nur ein relativ geringer Betrag von 164 J/mol, was zeigt, daß sich das Mischungsverhalten in Gel- und flüssig-kristalliner Phase sehr stark ähnelt. Zudem bestätigen die positiven  $\rho_2$ -Werte die bereits erwähnte Asymmetrie zwischen den Systemen mit geringer PC- bzw. PE-Konzentration, da das Einsetzen in eine zu (75) bzw. (76) analoge Gleichung dazu führt, daß bei höherer PE-Konzentration eine größere Tendenz zur Clusterbildung besteht als bei kleinem  $x_{PE}$ .

In Abb. 64 fällt außerdem – wie bei allen hier untersuchten PC/PE-Gemischen – auf, daß die experimentell ermittelte Koexistenzkurven bei niedrigem  $x_{PE}$  wesentlich breiter verlaufen, als dies bei niedrigem  $x_{PC}$  der Fall ist. Verantwortlich hierfür ist die  $L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$  Vorumwandlung der PC-reichen Gemische, welche bei der Analyse der  $c_p$ -Kurven nicht von der eigentlichen Hauptumwandlung getrennt werden kann und daher für die Erniedrigung der  $T_c$ -Werte im Phasendiagramm verantwortlich ist. Mit zunehmender PE-Konzentration verschwindet jedoch die Vorumwandlung, da die gesamte Gelphase mehr und mehr eine  $L_{\beta}$ -Struktur (wie reines PE) einnimmt, und die Breite der Koexistenzkurven verringert sich entsprechend [z. B. Luna und McConnell, 1978].

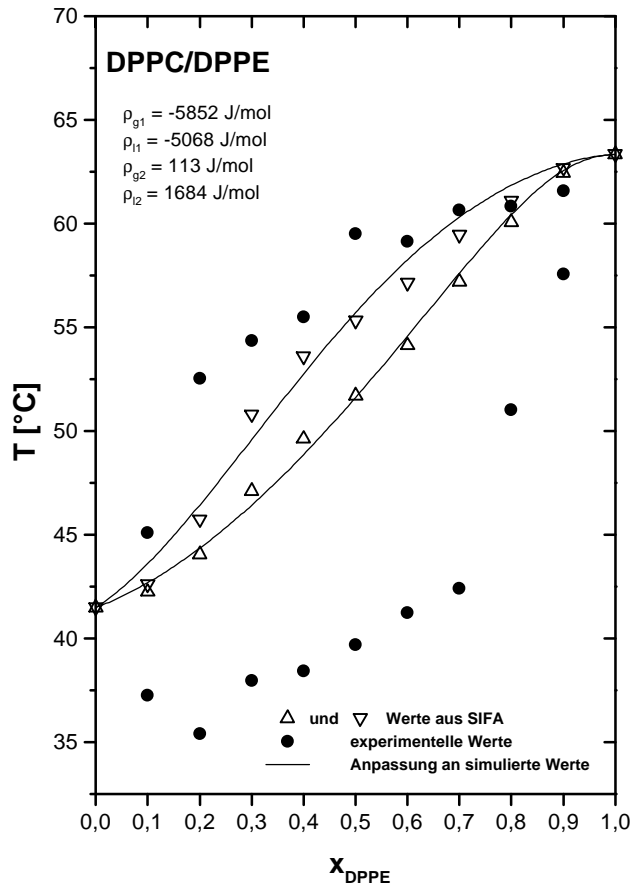
## 5.1.3.2 Das System DPPC/DPPE



**Abbildung 65:** Experimentelle  $c_p$ -Kurven für das System DPPC/DPPE und die entsprechenden mit dem Programm SIFA nach Johann et al. [1996] durchgeführten Anpassungen; die Umwandlungskurve von reinem DPPC ist so scharf, daß sie nicht simuliert werden konnte.

Die Eigenschaften des DPPC/DPPE-Gemisches zeigen erwartungsgemäß eine große Ähnlichkeit mit dem bereits beschriebenen analogen C<sub>14</sub>-System: Auch hier besitzt das Mischungsverhalten die bereits beschriebene deutliche Asymmetrie, da schon geringe Mengen an PE einen weitaus größeren Einfluß auf das Phasenverhalten des Gemisches haben als umgekehrt geringe Mengen an PC. NMR-Spektroskopische Untersuchungen an dem hier beschriebenen System legen dabei den Verdacht nahe, daß mit sukzessiver Erhöhung der PE-Konzentration bis etwa 0.5 eine L<sub>β</sub>-Anordnung der Moleküle in der Gelphase induziert wird [Blume et al., 1982b], wodurch einerseits die Vorumwandlung von PC verschwindet und andererseits bereits bei kleinem x<sub>PE</sub> der Koexistenzbereich der Phasenumwandlung verbreitert wird, da vermutlich je nach lokaler Anordnung der PE-Teilchen strukturell unterschiedliche Domänen mit entsprechend differierenden T<sub>m</sub>-Werten entstehen.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch die Analyse des aus den c<sub>p</sub>-Kurven gewonnenen Phasendiagramms, welches in der folgenden Abbildung wiedergegeben ist:



**Abbildung 66:** Anpassung des Phasendiagramms mit dem Programm FASE an die theoretisch ermittelten Anfangs- und Endtemperaturen der  $c_p$ -Kurven (offene Dreiecke) bei unterschiedlichen Molenbrüchen; die aus dieser Simulation erhaltenen Nichtidealitätsparameter  $r$  sind im Diagramm angegeben; die ausgefüllten Kreise zeigen das Ergebnis der „manuellen“ Ermittlung von  $T_+$  und  $T_-$  durch Reduktion um die Breite der Reumwandlungen.

Die „manuell“ ermittelten  $T_+$ - und  $T_-$ -Werte (ausgefüllte Kreise) zeigen noch viel stärker als bei dem System DMPC/DMPE (Abb. 64) eine weit ausladende Solidus-Kurve aufgrund der auftretenden Vorumwandlung [vgl. Seite 157; Blume und Ackermann, 1974; Lee, 1977b]. Ein vollkommen anderes Bild – welches auch durch ESR-Messungen eher favorisiert wird [Shimshick und McConnell, 1973] – ergibt sich jedoch, wenn man die analogen Daten aus der Simulation der  $c_p$ -Kurven mit dem Programm SIFA betrachtet (offene Dreiecke): Das Phasendiagramm zeigt einen wesentlich idealeren Verlauf und ist zudem deutlich schmäler, als dies für DMPC/DMPE (Abb. 64) der Fall ist. Eine Verlängerung der Kohlenwasserstoffketten führt zwangsläufig dazu, daß der Einfluß der Kopfgruppenwechselwirkungen im Verhältnis zu den Dispersionskräften zwischen den Ketten abnimmt [Koynova und Caffrey, 1994], und aus diesem Grund liegen auch die  $T_m$ -

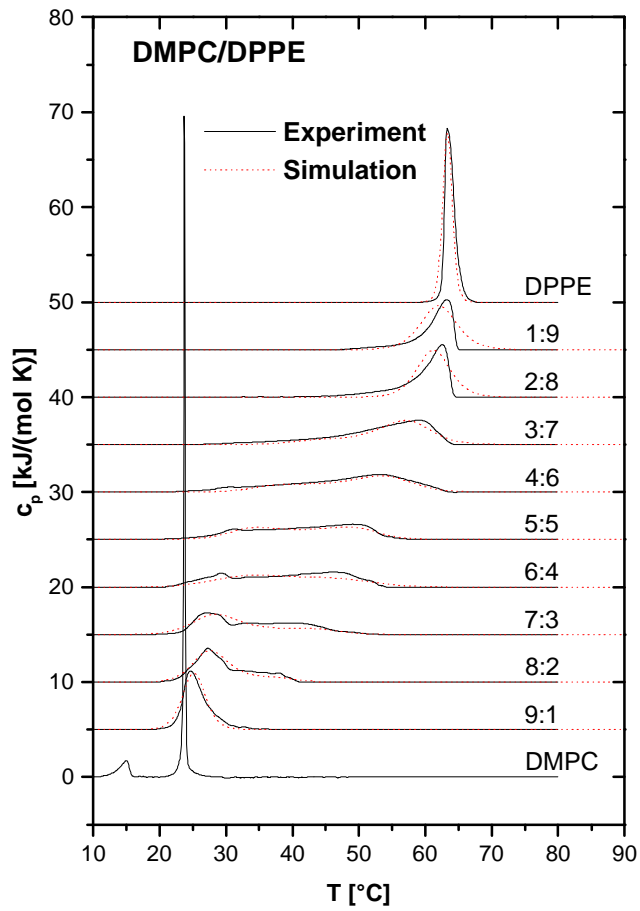
Werte der Reinsubstanzen näher beieinander als bei dem System DMPC/DMPE. Da sich die Moleküle somit „ähnlicher“ werden, erscheint die auftretende Verringerung des Koexistenzbereiches mit wachsender Kettenlänge auch durchaus logischer als die „manuell“ ermittelte Verschlechterung des Mischungsverhaltens bei Zunahme dieser gemeinsamen Eigenschaft. Insofern erweist sich das in *Blume* [1988a] bzw. *Johann et al.* [1996] näher beschriebene theoretische Verfahren, bei welchem die experimentelle Verbreiterung der  $c_p$ -Kurven quasi herausgerechnet wird, als sehr gut zur Beschreibung der gleichkettigen PC/PE-Systeme geeignet, da offensichtlich experimentelle Verbreiterungen konsequent und in sich konsistent eliminiert werden können. Obwohl der in Abb. 66 errechnete Verlauf der Solidus-Kurve (offene Dreiecke) auch von anderen Simulationen auf der Basis der regulären Mischungstheorie nachvollzogen werden kann [Lee, 1977b], bleibt bei der Berechnung dennoch die Tatsache unberücksichtigt, daß DPPE und DPPC strukturell unterschiedliche Gelphasen bilden (vgl. Seite 157 und Abb. 62), so daß eine Verlängerung der Acylketten unter Umständen doch einen packungsbedingten heterogenen Effekt auf das binäre Gemisch ausüben und nicht nur eine relative Verminderung der unterschiedlichen Moleküleigenschaften bewirken könnte. Anzeichen hierfür wurden in der durchgesehenen Literatur jedoch nicht gefunden, allerdings liefert die Untersuchung der Solidus-Kurve von DPPC/DPPE mit verschiedenen spektroskopischen Methoden teilweise recht unterschiedliche Ergebnisse [Blume et al., 1982b], wogegen die entsprechenden Daten für die Liquidus-Kurve im großen und ganzen gut übereinstimmen.

Das auf der Basis der theoretisch ermittelten  $T_+$ - und  $T_-$ -Werte simulierte Phasendiagramm spiegelt die Mischbarkeit des Systems über den gesamten Molenbruchbereich wider, zeigt aber vor allem aufgrund seiner sigmoideren Solidus-Kurve eine größere Abweichung von der idealen Linsenform als das DMPC/DMPE-Gemisch. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die mit SIFA errechneten Daten für den Anfang und das Ende der Phasenumwandlung bei geringen Mengen von DPPC bzw. DPPE sehr dicht zusammenliegen (Abb. 66) und das durch Fehlerquadratminimierung angepaßte Phasendiagramm somit in die beschriebene Form gezwungen wird.

Die erhaltenen Asymmetrieparameter  $\rho_{g2}$  bzw.  $\rho_{l2}$  sind erwartungsgemäß analog zu DMPC/DMPE positiv, ebenso die Differenzgrößen  $\Delta\rho_1$  und  $\Delta\rho_2$ , wobei letztere jedoch bei gleichem Vorzeichen betragsmäßig etwas größer als bei dem entsprechenden  $C_{14}$ -System

ausfallen. Anschaulich betrachtet bedeutet dies, daß sich im Falle des C<sub>16</sub>-Systems das Mischungsverhalten in Gel- und flüssig-kristalliner Phase stärker unterscheidet als bei DMPC/DMPE, wobei der Grund hierfür in der bereits angesprochenen Veränderung der Solidus-Kurve zu suchen ist. Da für die untersuchten gleichkettigen PC/PE-Gemische stets  $\Delta\rho_1 > 0$  gilt, kann man aus der Simulation zusätzlich folgern, daß sich die beiden Komponenten in der Gelphase geringfügig besser mischen – also in ihrem Verhalten ähnlicher sind – als dies in der flüssig-kristallinen Phase möglich ist. Diese Beobachtung stimmt mit den aus NMR-, Filmwaage- und Dilatometriemessungen erhaltenen Daten überein [Blume et al., 1982a; Boggs, 1987], nach denen PEs in der L<sub>α</sub>-Phase dichter gepackt sind und somit eine höhere konformationelle Ordnung aufweisen, wogegen die PC-Moleküle beim Phasenübergang eine größere Veränderung des zuvor ähnlichen spezifischen Volumens erfahren und so die Bildung von Mikrodomänen gleichartiger Teilchen im Verhältnis zur Gelphase begünstigt wird. Neuere Monte Carlo-Rechnungen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Kopfgruppenkonformationen von PC und PE – allerdings ohne die Implementierung von Wasserstoffbrücken – bestätigen ebenfalls dieses Bild [Pink et al., 1997].

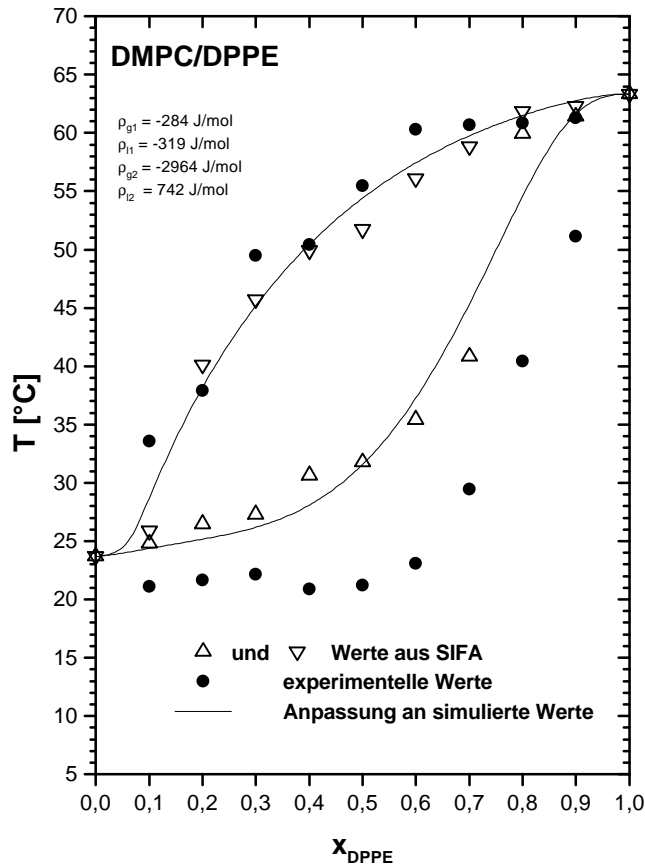
## 5.1.3.3 Das System DMPC/DPPE



**Abbildung 67:** Experimentelle  $c_p$ -Kurven für das System DMPC/DPPE und die entsprechenden mit dem Programm SIFA nach Johann et al. [1996] durchgeführten Anpassungen; die Umwandlungskurve von reinem DMPC ist so scharf, daß sie nicht simuliert werden konnte.

Die Umwandlungstemperaturen von DMPC und DPPE liegen um 40° C auseinander und weisen damit die größte Differenz aller hier untersuchten Mischungen auf. Bereits bei der Betrachtung der  $c_p$ -Kurven erkennt man deutlich, daß die strukturellen Unterschiede von Kopfgruppe und Kettenlänge zu einer signifikanten Verbreiterung des Koexistenzbereiches führen, wobei das bereits bei den gleichkettigen Gemischen beobachtete asymmetrische Mischungsverhalten bei kleinem bzw. großem  $x$  auch hier klar erkennbar zutage tritt. Bezüglich des resultierenden Phasendiagramms zeigt sich im Vergleich zu den bereits untersuchten Systemen ebenfalls eine veränderte Mischbarkeit, wie aus Abb. 68 deutlich wird:





**Abbildung 68:** Anpassung des Phasendiagramms mit dem Programm FASE an die theoretisch ermittelten Anfangs- und Endtemperaturen der  $c_p$ -Kurven (offene Dreiecke) bei unterschiedlichen Molenbrüchen; die aus dieser Simulation erhaltenen Nichtidealitätsparameter  $r$  sind im Diagramm angegeben; die ausgefüllten Kreise zeigen das Ergebnis der „manuellen“ Ermittlung von  $T_+$  und  $T_-$  durch Reduktion um die Breite der Reinumwandlungen.

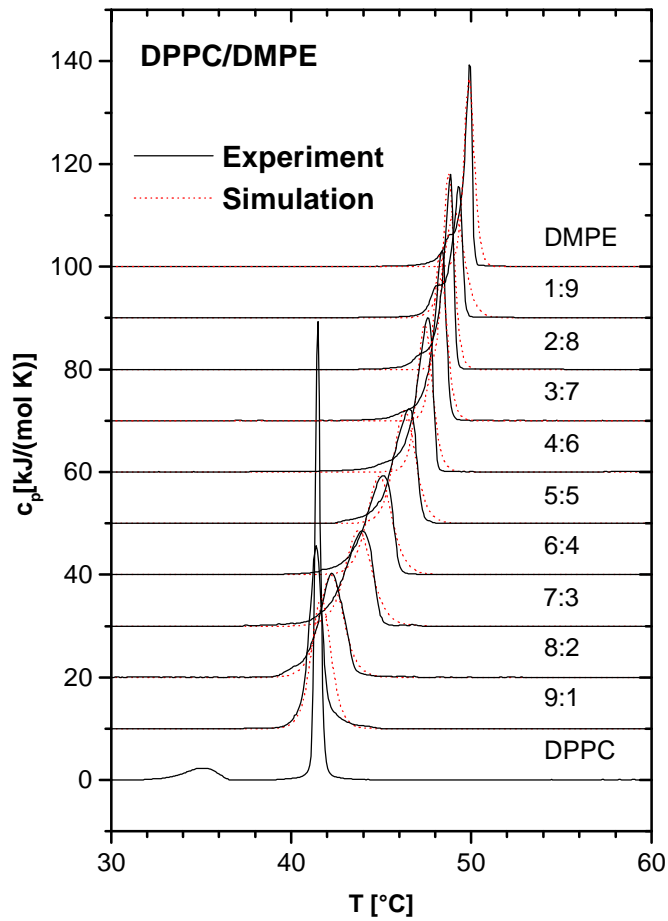
Schon bei oberflächlicher Betrachtung fällt auf, daß die theoretisch und „manuell“ ermittelten  $T_+$ -Werte der Liquidus-Kurve wie bei allen bisher untersuchten Gemischen deutlich geringer voneinander abweichen, als dies für die Solidus-Kurve der Fall ist. Im Gegensatz zu den gleichkettigen Systemen weisen in Abb. 68 jedoch sowohl die simulierten als auch die experimentellen Ergebnisse auf ein peritektisches Phasenverhalten mit einer Mischungslücke bei niedriger PE-Konzentration hin, wobei die mit SIFA ermittelten Werte sehr gut mit den ESR-Daten aus *Shimshick und McConnell* [1973] und den Fluoreszenzdaten aus *Lee* [1976] übereinstimmen und somit wiederum den eher subjektiv festgelegten „manuellen“ Anfangstemperaturen überlegen zu sein scheinen. Das generelle Auftreten einer Gelphasenentmischung bei DMPC/DPPE steht zudem auch in Übereinstimmung mit theoretischen und gefrierbruchmikroskopischen Untersuchungen

[Sugár und Monticelli, 1985; Luna und McConnell, 1978], ohne daß in der Literatur eine anderslautende Meinung gefunden werden konnte. Für die auftretende Mischungslücke wird mit den gerade erwähnten Methoden ein Bereich von  $0.0 \leq x_{PE} \leq 0.4$  gefunden [siehe auch Tenchov, 1985], was mit der Simulation in Abb. 68 ebenfalls recht gut nachvollzogen werden kann, während die „manuell“ ermittelten Temperaturwerte einen deutlich breiteren Entmischungsbereich bis  $x_{PE} \approx 0.6$  suggerieren.

Bei den errechneten Nichtidealitätsparametern fällt in erster Linie der sehr große negative Asymmetrieterm  $\rho_{g2}$  auf, welcher gemäß Gleichung (75) für die Beschreibung der abgeflachten Solidus-Kurve bei kleinem  $x_{PE}$  verantwortlich ist.  $\rho_{12}$  hingegen liegt betraglich sehr nahe bei dem entsprechenden Wert für DMPC/DMPE, so daß – wenn man die etwas ungenauen Absolutwerte interpretieren will – die Vermutung naheliegt, daß die Verlängerung der PE-Ketten offensichtlich keine signifikanten Auswirkungen auf die Struktur der flüssig-kristallinen Domänen hat. Ein Vergleich mit den entsprechenden absoluten Beträgen des Systems DPPC/DPPE erscheint hierbei allerdings schwierig, da für diesen Fall durch die relativ schmalen DSC-Kurven bei kleinem bzw. großem  $x$  (Abb. 66) der mit SIFA ermittelte Koexistenzbereich äußerst gering ausfällt und die Form des simulierten Phasendiagramms daher gewissen Zwängen unterworfen ist, welche sich deutlich auf die Werte der Nichtidealitätsparameter auswirken.

Aufgrund der partiellen Entmischung in der Gelphase ist der Differenzbetrag  $\Delta\rho_1$  erwartungsgemäß kleiner als null, da in der flüssig-kristallinen Phase offensichtlich eine geringere Tendenz zur Clusterbildung vorliegt und  $\rho_{11}$  daher eine absolut gesehen niedrigere Energie besitzt als  $\rho_{g1}$ .

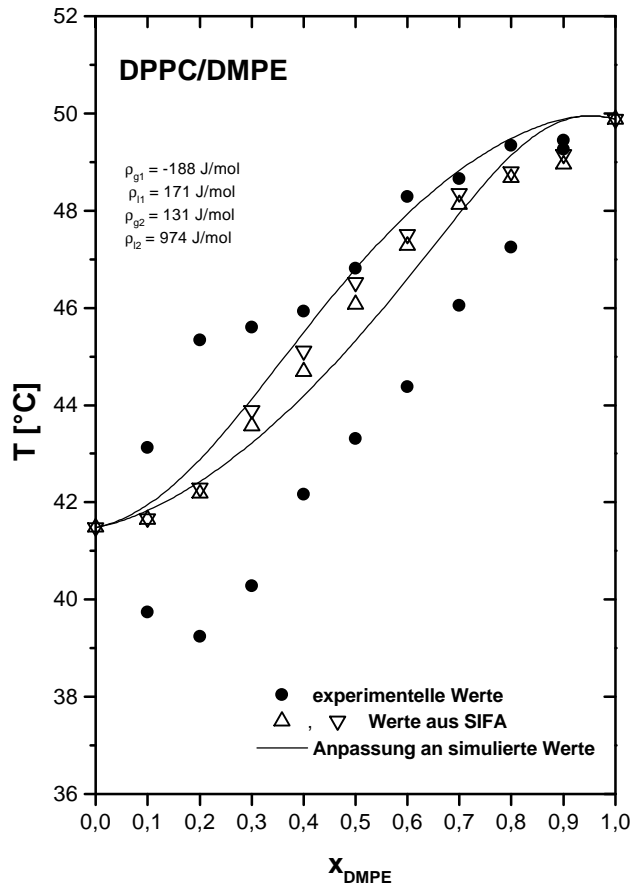
## 5.1.3.4 Das Gemisch DPPC/DMPE



**Abbildung 69:** Experimentelle  $c_p$ -Kurven für das System DPPC/DMPE und die entsprechenden mit dem Programm SIFA nach Johann et al. [1996] durchgeführten Anpassungen; die Umwandlungskurve von reinem DPPC ist so scharf, daß sie nicht simuliert werden konnte.

Die Differenz zwischen den Phasenumwandlungstemperaturen von DPPC und DMPE ist mit  $8.5^\circ\text{C}$  die geringste aller untersuchten PC/PE-Gemische, dementsprechend sind auch die Koexistenzbereiche der Mischungen weitaus schmaler, als dies für DMPC/DPPE der Fall ist. Allerdings ist die bei den bisher untersuchten PC/PE-Systemen stets auftretende Asymmetrie auch hier zu beobachten, denn die Vorumwandlung von DPPC ist bereits bei  $x_{\text{PE}} = 0.1$  nicht mehr erkennbar, und die  $c_p$ -Kurven sind bei niedriger PE-Konzentration deutlich kleiner und breiter als umgekehrt bei niedriger PC-Konzentration.

Im Gegensatz zu der Aussage von *Tenchov* [1985], daß bei pseudobinären Lipidsystemen, in welchen sich die Einzelkomponenten bezüglich Kopfgruppe und Kettenlänge unterscheiden, stets eine Gelphasenentmischung auftritt, deuten die in Abb. 69 dargestellten DSC-Kurven jedoch nicht auf eine Phasenseparation hin, sondern sprechen vielmehr für ein annähernd ideales Mischungsverhalten des Systems. Eine Analyse der  $T_+$ - und  $T_-$ -Werte (Abb. 70) erlaubt eine genauere Interpretation dieses Sachverhalts:



**Abbildung 70:** Anpassung des Phasendiagramms mit dem Programm FASE an die theoretisch ermittelten Anfangs- und Endtemperaturen der  $c_p$ -Kurven (offene Dreiecke) bei unterschiedlichen Molenbrüchen; die aus dieser Simulation erhaltenen Nichtidealitätsparameter  $r$  sind im Diagramm angegeben; die ausgefüllten Kreise zeigen das Ergebnis der „manuellen“ Ermittlung von  $T_+$  und  $T_-$  durch Reduktion um die Breite der Reinumwandlungen.

Betrachtet man zunächst nur die „manuell“ ermittelten Temperaturwerte (ausgefüllte Kreise), so zeigt sich bei kleinem  $x_{PE}$  in Analogie zu *Blume und Ackermann* [1974] ein deutliches Absinken von  $T_-$ , was aber vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß sich die Vorumwandlung der PC-Komponente in den Hauptumwandlungsbereich hineinschiebt und somit eine Erniedrigung der Anfangstemperatur vorspiegelt. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß dieser Effekt mit steigender PE-Konzentration sehr schnell wieder verschwindet, was jedoch von *Blume und Ackermann* nicht beobachtet werden konnte. Eine interessante Parallele zeigt sich hingegen in der Form der „manuell“ ermittelten Liquidus-Kurve: In dem Intervall  $0.3 < x_{PE} < 0.5$  findet man nämlich bei beiden Untersuchungen einen signifikanten Temperatursprung, an dessen Stelle in theoretischen Simulationen des

Phasendiagramms mit Hilfe der Landau-Theorie die Lage eines eutektischen Punktes vermutet wird [Sugár und Monticelli, 1983, 1985]. Das Auftreten einer hiermit verknüpften breiten Gelphasenentmischung in dem Bereich  $0.0 < x_{PE} < 0.5$  [Tenchov, 1985] kann jedoch aus Abb. 70 nicht nachvollzogen werden, zumal die mit SIFA ermittelten Daten (offene Dreiecke) für ein sehr ideales Mischungsverhalten über den gesamten Molenbruchbereich sprechen. Dieses Beispiel zeigt abermals deutlich die gravierenden Unterschiede zwischen der „manuellen“ Festlegung der Phasengrenzen und ihrer mathematischen Berechnung durch Dekonvolution der experimentellen  $c_p$ -Kurven.

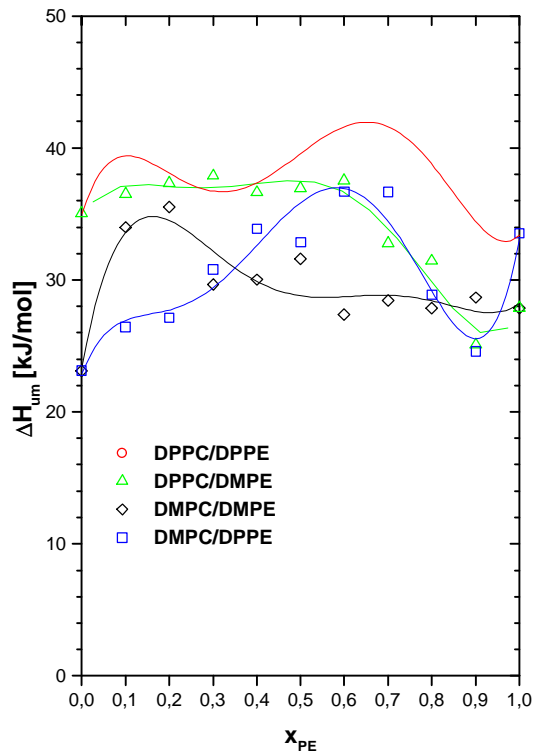
Die Simulation von Solidus- und Liquidus-Kurve auf Grundlage der theoretisch ermittelten  $T_+$ - und  $T_-$ -Werte (offene Dreiecke) ist aufgrund der sehr kleinen Koexistenzbereiche lediglich in der Lage, die allgemeine Form des Phasendiagramms befriedigend wiederzugeben, während bei der Anpassung an die einzelnen Meßpunkte gewisse Abstriche gemacht werden müssen, was das tendenzielle Verhalten der Nichtidealitätsparameter jedoch nicht signifikant beeinträchtigen sollte.

Für die errechneten  $\rho$ -Werte ergeben sich keine besonderen Überraschungen, die Asymmetrieparameter  $\rho_{g2}$  und  $\rho_{l2}$  sind beide wiederum positiv, und  $\Delta\rho_1$  ist ebenfalls größer als null. Die Form des simulierten Phasendiagramms und das Verhältnis der Nichtidealitätsparameter zueinander zeigen eine große Ähnlichkeit mit den entsprechenden Daten des Systems DPPC/DPPE (Abb. 66), wobei man insgesamt den Eindruck gewinnt, daß durch die Annäherung der  $T_m$ -Werte infolge der Verkürzung der PE-Ketten die ohnehin schon gute Mischbarkeit noch zunimmt, da zum einen der auftretende Koexistenzbereich deutlich schmaler wird und zum anderen auch die Werte für  $\Delta\rho_1$  und  $\Delta\rho_2$  wesentlich geringer ausfallen, die Mischungseigenschaften vor und nach dem Phasenübergang also zunehmend ähnlicher werden.

#### 5.1.3.5 Allgemeiner Vergleich

Neben der eben durchgeführten Betrachtung der einzelnen Gemische stellt sich nun noch die Frage, ob sich darüber hinaus in der Gesamtheit der untersuchten PC/PE-Systeme gewisse allgemeine Trends erkennen lassen. Eine mögliche Kennzahl, um diese Informationen zu erhalten, ist dabei die molare Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{um}$ , welche man

durch Integration der gemessenen  $c_p$ -Kurven erhält. Sie gibt bei den hier vorliegenden Systemen den aufzuwendenden Energiebetrag an, um ein Mol Lipidgemisch im wäßrigen Medium von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase zu befördern. Von experimenteller Seite stellt sich dabei allerdings das Problem, daß die Masse des eingesetzten Lipids möglichst genau bekannt sein muß, was wegen leichter Inhomogenitäten der Probe bzw. Volumenverlust durch Entgasen mit gewissen Ungenauigkeiten verbunden ist, da eine exakte Phosphatbestimmung nach den einzelnen DSC-Messungen nicht durchgeführt wurde. Um trotzdem vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Probenvorbereitung durchweg möglichst einheitlich durchgeführt, so daß die auftretenden Fehler eher systematischer Natur sein sollten. Die für die PC/PE-Gemische gefundenen Umwandlungsenthalpien sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:



**Abbildung 71:** Umwandelungsenthalpien der vermessenen PC/PE-Gemische und der jeweiligen Reinsubstanzen in kJ pro Mol Lipid. Die durchgezogenen Linien simulieren lediglich den Kurvenverlauf und besitzen keine physikalische Bedeutung.

Die für die reinen PC- bzw. PE-Systeme erhaltenen  $T_m$ - und  $\Delta H_{um}$ -Werte stimmen mit den entsprechenden Literaturwerten überein [Koynova und Caffrey, 1998 bzw. Blume, 1991], und im Falle von DMPC/DMPE ist der in Abb. 71 dargestellte Kurvenverlauf mit den DSC-Messungen von *Chapman et al.* [1974] ebenfalls fast identisch. Lediglich die Gemische DPPC/DPPE und DPPC/DMPE zeigen bei kleinem  $x_{PE}$  deutliche Abweichungen von den Daten in *Blume und Ackermann* [1974], was sich aber möglicherweise auf den Einfluß der Vorumwandlung zurückführen läßt, welche sich anfänglich mit steigender PE-Konzentration in die Hauptumwandlung „schiebt“ und somit bei der Integration der  $c_p$ -Kurve nicht mehr separiert werden kann (vgl. Abb. 66 und 70). Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten hochreinen Lipide und das sehr empfindliche Kalorimeter tritt dieser Effekt daher vermutlich stärker zutage und verursacht den gerade erwähnten Unterschied.



Behält man diesen Sachverhalt im Hinterkopf und betrachtet das scheinbare Liniengewirr in Abb. 71 etwas genauer, so lassen sich einige recht interessante Zusammenhänge erkennen: Grundsätzlich ist bekannt, daß DMPC bzw. DPPC kurz vor ihrer Hauptphasenumwandlung in einer relativ ungeordneten  $P_{\beta}$ -Phase vorliegen (Abb. 62) und daß durch sukzessive Zugabe von PE eine stabilere Gelphase ( $L_{\beta}$ ) induziert wird [Blume et al., 1982b]. Die entsprechenden Umwandlungsenthalpien bei niedrigem  $x_{PE}$  sollten also zunehmen, wobei man für diese Zunahme  $\Delta\Delta H_{um}$  unter Berücksichtigung der Kettenlängendifferenzen die folgende Hierarchie erwarten würde:

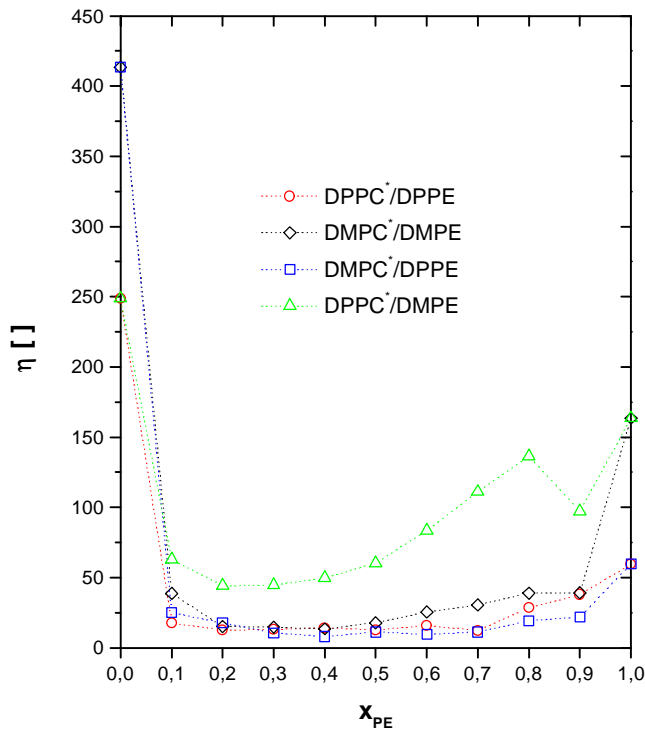
$$DMPC/DPPE > DMPC/DMPE > DPPC/DPPE > DPPC/DMPE. \quad (78)$$

Genau dieser Zusammenhang läßt sich auch in Abb. 71 erkennen, wobei allerdings die ersten beiden Gemische in Gleichung (78) aufgrund der Phasenseparation bei DMPC/DPPE ihre Plätze tauschen. Berücksichtigt man außerdem den bereits erwähnten Einfluß der Vorumwandlung bei den letzten beiden Systemen, so scheint zumindest bei DPPC/DMPE sogar ein negatives  $\Delta\Delta H_{um}$  wie in *Blume und Ackermann* [1974] möglich, was anschaulich bedeuten würde, daß die Verkürzung der Kettenlänge bei PE den stabilisierenden Effekt durch Induktion einer  $L_{\beta}$ -Phase sogar überkompensiert.

Geht man auf der anderen Seite von reinem PE aus, so bewirkt eine kontinuierliche Zugabe von PC erst ein leichtes Absinken der Umwandlungsenthalpie unter den entsprechenden Wert der Reinsubstanz um anschließend – bis auf DMPC/DMPE – bei  $x_{PE} \approx 0.6$  einen Maximalwert zu erreichen. Auch dieses Verhalten läßt sich unter Vernachlässigung der experimentellen Ungenauigkeiten versuchsweise interpretieren: Berücksichtigt man, daß das H-Brückennetzwerk von reinem PE während des Phasenübergangs weitgehend erhalten bleibt [Boggs, 1987] und daß die Asymmetrieparameter aus der Simulation der Phasendiagramme für eine Neigung zur Clusterbildung bei hoher PE-Konzentration sprechen, so würden die existierenden PC-Domänen dieses Netzwerk in gewissem Umfang zerstören und hierdurch für ein leichtes Absinken von  $\Delta H_{um}$  sorgen, welches durch die erzwungene  $L_{\beta}$ -Phase der PC-Cluster offensichtlich nicht ausgeglichen werden kann. Eine weitere Erniedrigung von  $x_{PE}$  in Richtung 0.5 verstärkt die Durchmischung (da  $\rho_{g2}$  gegen null geht) und führt so zu einer steigenden Zahl von PC-PE-Wasserstoffbrücken. Beim Übergang in die flüssig-kristalline

Phase nimmt die Beweglichkeit und das spezifische Volumen der PC-Moleküle im Vergleich zu PE allerdings stärker zu [Wilkinson und Nagle, 1981; Pink et al., 1997], was nach den Simulationsergebnissen ( $\Delta\rho > 0$ ) dazu führen sollte, daß eine leichte Umorientierung (und damit eine Erhöhung von  $\Delta H_{\text{um}}$ ) dahingehend stattfindet, daß gleichartige Nachbarn im Vergleich zur Gelphase geringfügig bevorzugt werden. Eine Ausnahme bildet hierbei das Gemisch DMPC/DMPE, wo dieser Effekt möglicherweise durch die allgemein höhere Beweglichkeit aufgrund der kürzeren Ketten nicht erkennbar ist, so wie er auch im Falle von DPPC/DMPE niedriger ausfallen sollte als für DPPC/DPPE. Diese Argumentation steht zwar in einem gewissen Gegensatz zu *Blume und Ackermann* [1974], ermöglicht aber andererseits auch eine Interpretation der Nichtidealitätsparameter, zumal NMR-Studien an PC/PE-Gemischen mit deuterierten Kopfgruppen ebenfalls auf das Vorhandensein von Mikrodomänen in der flüssig-kristallinen Phase hindeuten [Shin et al., 1995].

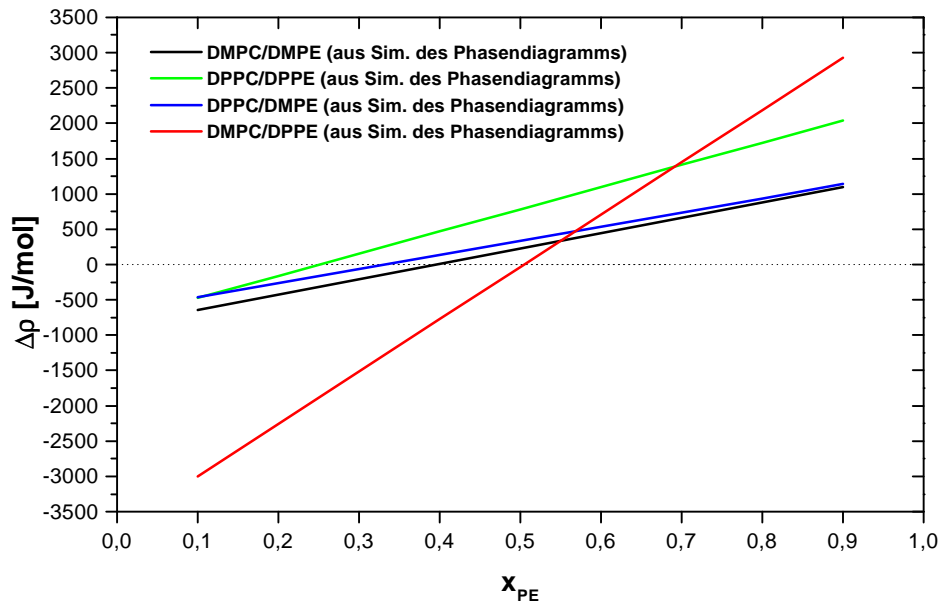
Die nach *Johann et al.* [1996] berechneten kooperativen Einheiten  $\eta$  der untersuchten PC/PE-Gemische sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:



**Abbildung 72:** kooperative Einheit  $h$  nach Johann et al. [1996] als Funktion des Molenbruchs; \*die Angabe für reines DMPC bzw. reines DPPC beruht auf der Berechnung mit Hilfe von Gleichung (74).

Man erkennt analog zu Garidel und Blume [1998], daß die reinen PCs eine wesentlich höhere Kooperativität aufweisen, als dies bei PE der Fall ist. Die binären PC/PE-Gemische liefern dabei wie erwartet ein deutlich niedrigeres  $\eta$  als die entsprechenden Reinstoffe und zeigen bis auf das System DPPC/DMPE nur geringe Abweichungen voneinander. Da sich die Größe der kooperativen Einheit reziprok zu der Breite des Koexistenzbereiches verhält [Sugár, 1987] und DPPC/DMPE aufgrund der geringen  $T_m$ -Differenz sehr schmale  $c_p$ -Kurven liefert (Abb. 69), sind die signifikant größeren  $\eta$ -Werte in Abb. 72 zudem nicht überraschend.

Um die gemeinsamen Tendenzen der durch Simulation des Phasendiagramms erhaltenen vier Nichtidealitätsparameter nachvollziehen zu können, werden diese gemäß Gleichung (75) bis (77) zu weniger fehlerbehafteten Kenngrößen  $\Delta\rho$  verschmolzen [Garidel et al., 1997b], welche in Abb. 73 dargestellt sind und mit den durch SIFA ermittelten Daten (nicht dargestellt) ebenfalls gute Übereinstellungen zeigen:



**Abbildung 73:** Differenzen der Nichtidealitätsparameter als Funktion des Molenbruchs; die Geraden wurden mit Hilfe der Gleichungen (75)-(77) aus den Ergebnissen der Simulation der jeweiligen Phasendiagramme errechnet.

Aus dem Diagramm lassen sich zwei grundlegende Beobachtungen herauslesen: Erstens besitzen alle  $\Delta p$ -Graphen eine positive Steigung mit Vorzeichenwechsel, und zweitens verlaufen diese Funktionen mit Ausnahme von DMPC/DPPE sehr nahe an der Nulllinie. Letzteres läßt sich recht einfach interpretieren und bedeutet im Prinzip nichts anderes, als daß sich die relativen Wechselwirkungsenergien zwischen den ungleichen Nachbarn in der Gel- und der flüssig-kristallinen Phase jeweils stark ähneln. Die bereits beschriebene Untersuchung der Phasendiagramme zeigt zudem, daß diese Ähnlichkeit auf einem eher idealen Mischungsverhalten beruht und nicht etwa auf der Bildung makroskopischer Domänen in beiden Phasen.

Weit weniger anschaulich ist hingegen der allgemeine Verlauf der  $\Delta p$ - $x$ -Kurven, so daß es hier sinnvoll erscheint, zur näheren Analyse die analog zu Gleichung (75) bzw. (76) ermittelten Wert für  $\rho_g$  bzw.  $\rho_l$  heranzuziehen (Daten nicht dargestellt). Läßt man das System DMPC/DPPE außen vor, so gilt für die untersuchten PC/PE-Gemische ganz allgemein:

$$\frac{dr_g}{dx_{PE}} \wedge \frac{dr_l}{dx_{PE}} > 0 \quad (79)$$

und

$$\frac{dr_g}{dx_{PE}} < \frac{dr_l}{dx_{PE}}. \quad (80)$$

Die Tendenz zur Domänenbildung zwischen gleichartigen Nachbarn nimmt also mit steigender PE-Konzentration zu (Gleichung (79)), wobei die flüssig-kristalline Phase hiervon stärker betroffen ist als die Gelphase (Gleichung (80)), was wie bereits erwähnt möglicherweise mit der im Verhältnis zu PE stärkeren Zunahme an „Unordnung“ bei den PC-Molekülen zusammenhängt. Betrachtet man in Abb. 73 einmal die  $\Delta\rho$ -Werte an der Stelle  $x_{PE} = 0.5$ , an welcher  $\rho_2$  keine Rolle spielt, so zeigt es sich, daß die entsprechenden Werte alle dicht beisammen und nahe an null liegen. Für die größeren Abweichungen sind also hauptsächlich die relativ hohen Asymmetrieparameter verantwortlich, die außerdem laut Gleichung (79) positive Werte besitzen müssen und zu dem bereits ausführlich beschriebenen Mischungsverhalten bei kleinen bzw. großen  $x$ -Werten führen. Interessanterweise treffen die Gleichungen (79) und (80) auch auf die gleichköpfigen Gemische DMPC/DPPC und DMPE/DPPE zu [Garidel und Blume, 1998], wenn man hier ebenfalls die „geordnetere“ Komponente (in diesem Fall das entsprechende  $C_{16}$ -Lipid) mit  $x$  bezeichnet, so daß die beiden aufgestellten Beziehungen offenbar über die (mischbaren) PC/PE-Systeme hinaus eine allgemeinere Gültigkeit besitzen.

DMPC/DPPE läuft dem gemeinsamen Trend lediglich dadurch zuwider, daß  $\rho_g$  (aufgrund der Phasenseparation bei niedriger PE-Konzentration) eine negative Steigung mit stark positiven Werten bis  $x_{PE} \approx 0.4$  aufweist. Da zusätzlich  $\rho_l$  sehr flach und nahe an null verläuft, kommt bei der Bildung von  $\Delta\rho$  die steile Funktion in Abb. 73 zustande, welche zwar dieselbe Steigung wie die anderen Gemische besitzt, jedoch aus ganz anderen Gründen. Dieses Beispiel zeigt somit anschaulich, wie wichtig es bei der Interpretation von  $\Delta\rho$  ist, auch einen Blick auf die Entstehung dieser Größe zu werfen und nicht nur die absoluten Daten zu vergleichen.

## 5.2 SPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN

Die im vorherigen Abschnitt ausgeführten Beobachtungen bezüglich der PC/PE-Gemische bzw. des Systems DMPC/DPPG ermöglichen in Verbindung mit den Arbeiten von *Garidel et al.* [1997a] und *Garidel und Blume* [1998] einen umfassenden Überblick über das makroskopische Mischungsverhalten der untersuchten Systeme in der Nähe ihrer jeweiligen Phasenumwandlungstemperaturen. Um jedoch detailliertere Informationen auf mikroskopischer Ebene zu erhalten, ist man auf theoretische Simulationen [z. B. Damodaran und Merz, 1994] oder spektroskopische Methoden angewiesen. Letztere wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die kalorimetrisch untersuchten PC/PE- und PC/PG-Gemische in der flüssig-kristallinen Phase angewendet, wobei jeweils eines der eingesetzten Lipide mit perdeuterierten Acylketten versehen war, so daß die einzelnen Komponenten getrennt voneinander beobachtet werden konnten. Obwohl es sich bei den verwendeten IR- und NMR-Methoden um nichtinvasive Techniken handelt, führt die Substitution von Wasserstoff durch Deuterium dennoch zu einer Abschwächung der *van der Waals*-Wechselwirkungen zwischen den Ketten und damit auch zu einer Erniedrigung der entsprechenden  $T_m$ -Werte [Petersen et al., 1975]. Um daher sicherzugehen, daß sich hierdurch nicht auch das Phasenverhalten der entsprechenden Gemische signifikant verändert, wurde jede Probe nach Abschluß der Spektroskopie kalorimetrisch bezüglich Kurvenform und  $T_m$ -Wert untersucht (Daten nicht dargestellt), wobei jedoch im Einklang mit der gängigen Literaturmeinung [z. B. Seelig und Seelig, 1980] keine gravierenden Unterschiede zu den undeuterierten Systemen erkennbar waren.

### 5.2.1 Probenvorbereitung und meßtechnische Details

#### 5.2.1.1 $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Die Herstellung der binären Lipidgemische erfolgte in einem 0.9 cm langen NMR-Röhrchen nach der bei den DSC-Messungen angewandten Methode (Seite 143), wobei je nach Verfügbarkeit zwischen 5 und 10 mg an perdeuteriertem Lipid pro Experiment eingesetzt wurden. Für jedes PC/PE- bzw. PC/PG-System wurde immer nur das äquimolare Gemisch anhand zweier Proben mit jeweils einer deuterierten Komponente untersucht. Vor

Beginn der Messung wurde das getrocknete Lipidgemisch mit der doppelten Menge (w/w) entdeutertem Wasser (E. Merck KGaA) versetzt und mit einem Mikrospatel so lange durchgerührt, bis eine gelartige Konsistenz ohne feste Klumpen erreicht war. Auf eine zusätzliche Beschallung wurde gemäß *Seelig und Seelig* [1974] verzichtet, um die Bildung kleiner, stark gekrümmter Doppelschichten zu vermeiden. Nach dem gründlichen Verschließen der Probe erfolgte eine 30minütige Inkubation in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von etwa zehn Grad über dem jeweiligen  $T_m$ -Wert des angesetzten Gemisches.

Als Meßgerät diente ein AMX 400 Spektrometer der Firma Bruker GmbH mit einer magnetischen Flußdichte von 9.4 T ( $\nu_L = 400$  MHz für  $^1\text{H}$ ) und einem speziell angefertigten Festkörper-Probenkopf [Holzhäuser, 1995]. Die eingestrahlte Resonanzfrequenz betrug 61.42 MHz, und die Leistung des Sendepulses wurde mit Hilfe eines Zusatzverstärkers (Doty Scientific) auf etwa 900 W erhöht. Das Quadrupolecho-Programm (Kapitel 3) arbeitete mit einer Pulslänge von 2.5  $\mu\text{s}$  bei einer Wartezeit von 40  $\mu\text{s}$ . Bei einer vorgegebenen Temperatur oberhalb von  $T_m$  wurde alle 150 ms eine neue Messung gestartet und in Abhängigkeit von der eingesetzten Lipidmenge jeweils 2000-4000 FIDs mit einer spektralen Bandbreite (SWH) von 83.3 kHz aufgenommen, was bei einer Anzahl (TD) von 2048 Punkten für den Realteil des Spektrums einem Abstand von etwa 41 Hz zwischen zwei Datenpunkten entspricht. Jeder Messung ging dabei eine Temperierung von 15 min voraus, und insgesamt wurden pro Gemisch drei bis vier unterschiedliche Temperaturen untersucht. Die Thermostat-Einheit des Spektrometers selbst wurde zudem in regelmäßigen Abständen neu geeicht, so daß man von einer absoluten Abweichung während der Messung von maximal 1.5° C ausgehen kann.

Alle Experimente wurden mehrmals durchgeführt, wobei besonders bei den PC/PG-Gemischen noch zusätzlich – wegen der etwas breiten DSC-Kurve von  $d_{54}$ -DMPG in Abb. 127 – gekaufte perdeuterte Lipide (Avanti Polar Lipids) zum Einsatz kamen, ohne daß jedoch ein deutlicher Unterschied zu den selbst synthetisierten Proben erkennbar war. Die Auswertung der Spektren und das *De-Pake*-ing erfolgte mit dem Programm NMRWIN [Ziegler und Blume, 1994].

### 5.2.1.2 FTIR-Spektroskopie

Für die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein FTS 165 Spektrometer der Firma Bio-Rad mit einem externen Probenraum und MCT-Detektor verwendet. Bei jeder Messung wurden 256 Interferogramme aufaddiert, mit einer Dreieck-Funktion apodisiert und die Anzahl der Datenpunkte anschließend vor der *Fourier*-Transformation durch das Anhängen von Nullen verdoppelt. Die Geräteauflösung betrug dabei  $2\text{ cm}^{-1}$ . Als Meßzelle diente eine demontierbare temperierte Küvette mit integriertem Temperatursensor [Johann, 1995], und für die Fenster wurde wegen der geringen Reflexionsverluste und der Wasserunlöslichkeit [Amey und Chapman, 1984]  $\text{CaF}_2$  (Dr. Karl Korth oHG, Kiel) eingesetzt.

Die bei den NMR-Messungen eingesetzten Proben wurden direkt für die IR-Messungen weiterverwendet, wobei die einzelnen Gemische zur Vermeidung von Luftblasen zusätzlich mit einigen  $\mu\text{l}$  Wasser verdünnt werden mußten. Dieses Problem tauchte besonders bei den PC/PG-Gemischen auf, da diese bei geringem Wassergehalt eine ausgesprochen zähe Konsistenz besitzen und daher die eingeschlossenen Hohlräume nicht ausgefüllt werden können. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurden die betroffenen Gemische auf dem Küvettenfenster bis zum Platzen der Blasen getrocknet und anschließend wieder mit der entsprechenden Wassermenge versetzt. Jede so behandelte Probe wurde zudem vor Beginn der Messung einige Minuten oberhalb von  $T_m$  inkubiert.

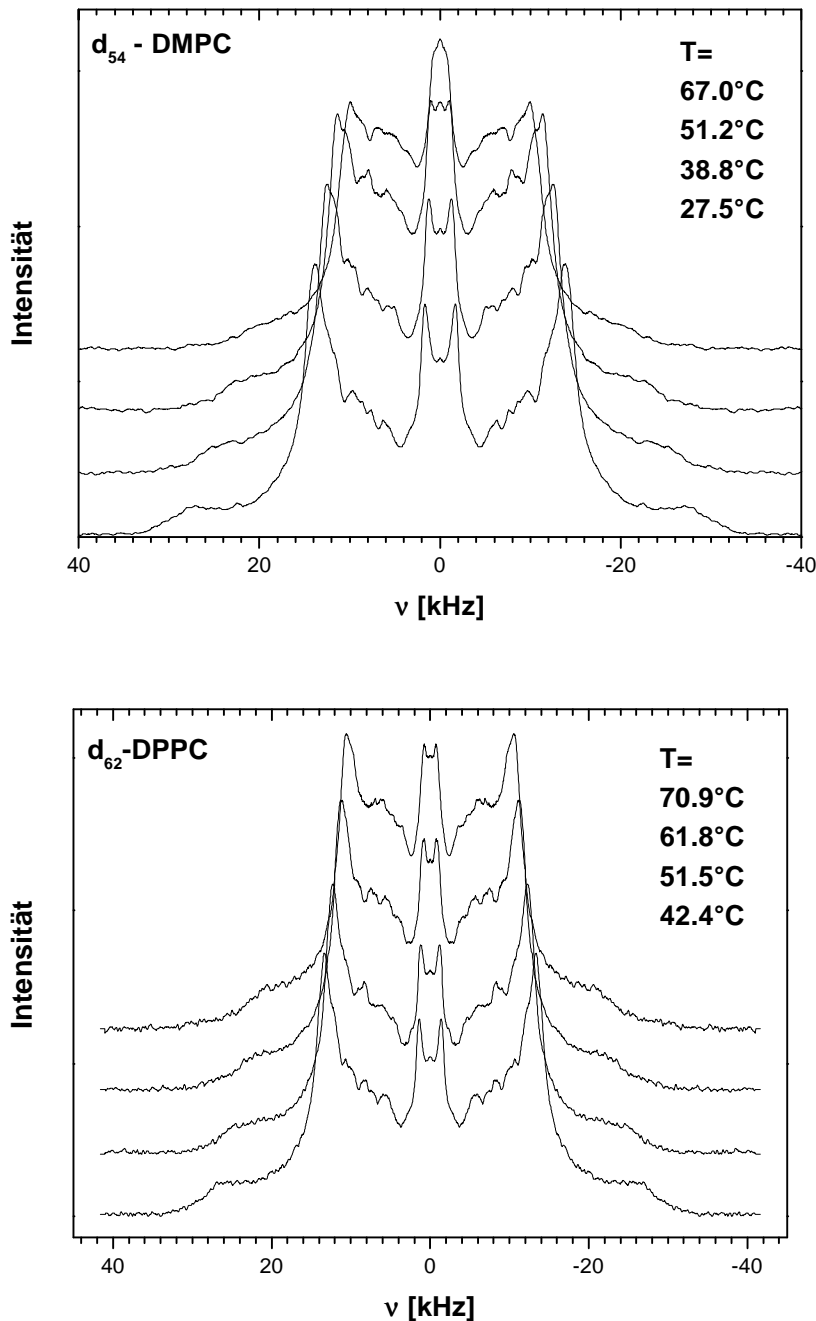
Für jedes Lipidgemisch wurde unter Verwendung eines  $10\text{ }\mu\text{m}$  dicken Teflon-Spacers (Dupont de Nemours, Luxemburg) zwischen  $5^\circ\text{ C}$  und  $70^\circ\text{ C}$  in Schritten zu je  $2^\circ\text{ C}$  eine Heiz- und eine Kühlkurve über einen Spektralbereich von  $4000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen und anschließend zur genaueren Detektion der Kippschwingungsbanden eine analoge Heizkurve mit einem  $50\text{ }\mu\text{m}$  Spacer in einem Bereich von  $1600\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ . Die Simulation der Kurvenformen wurde mit Hilfe des Programms IRFIT42 [Ziegler und Blume, 1995] durchgeführt.



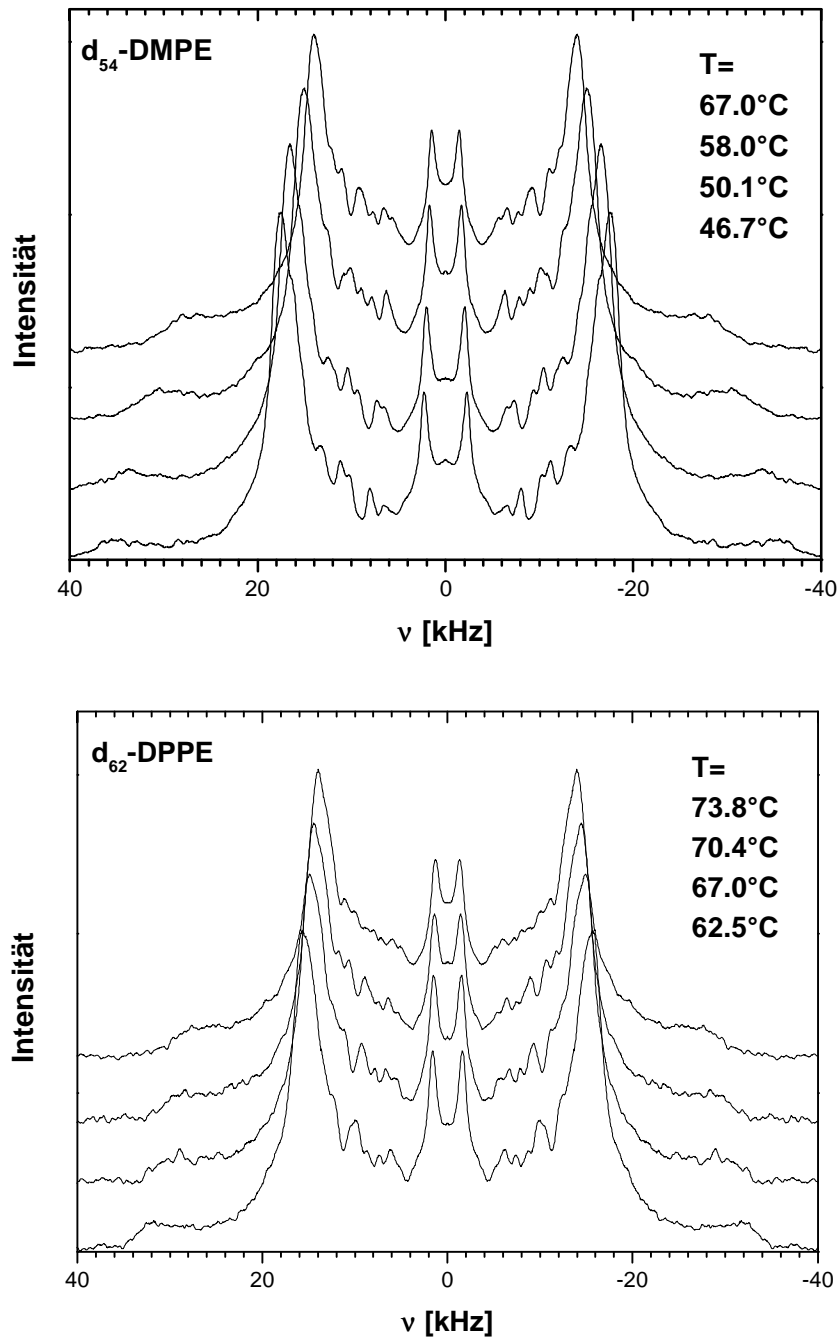
## 5.2.2 Das PC/PE-System

### 5.2.2.1 $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

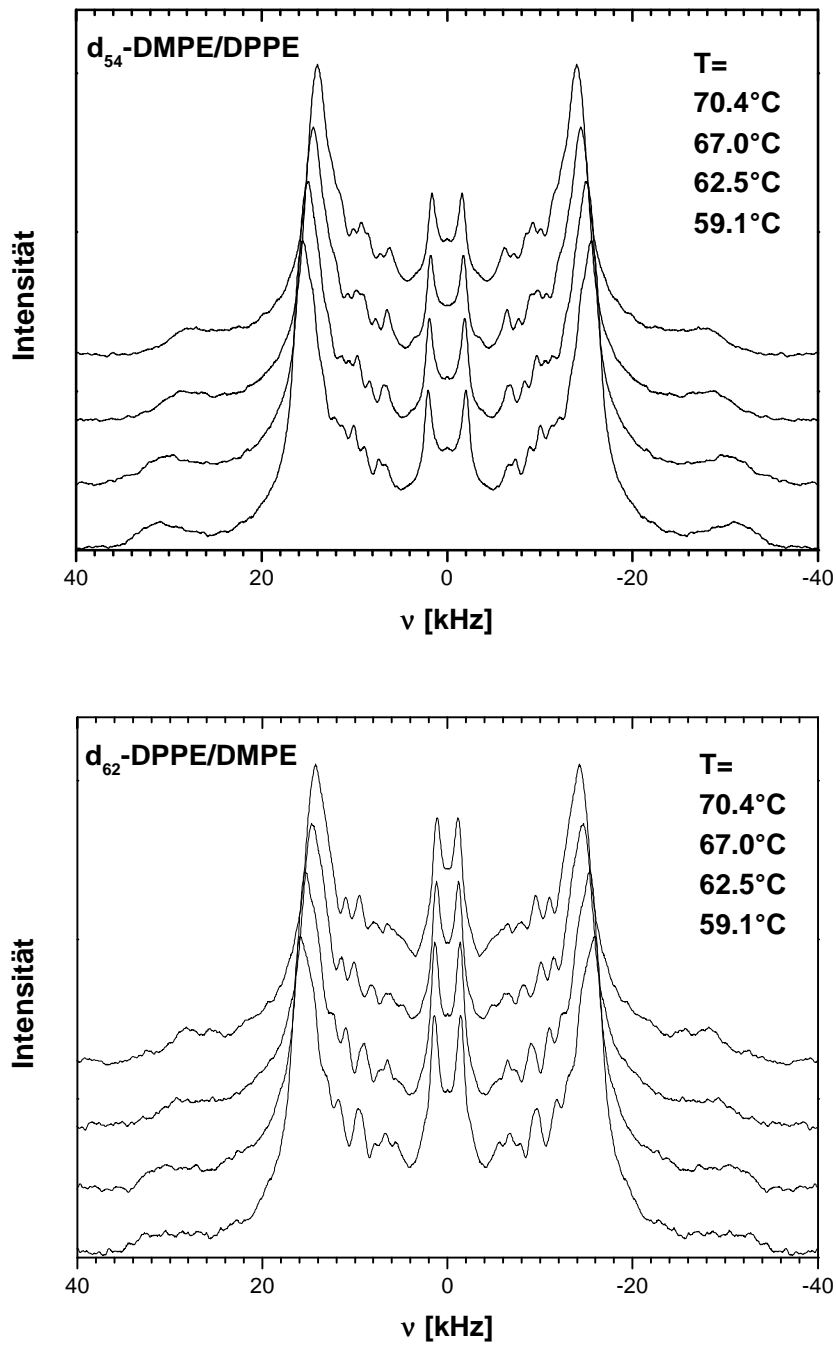
In der folgenden Abbildung sind die bei verschiedenen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase erhaltenen Ergebnisse der NMR-Messungen dargestellt:



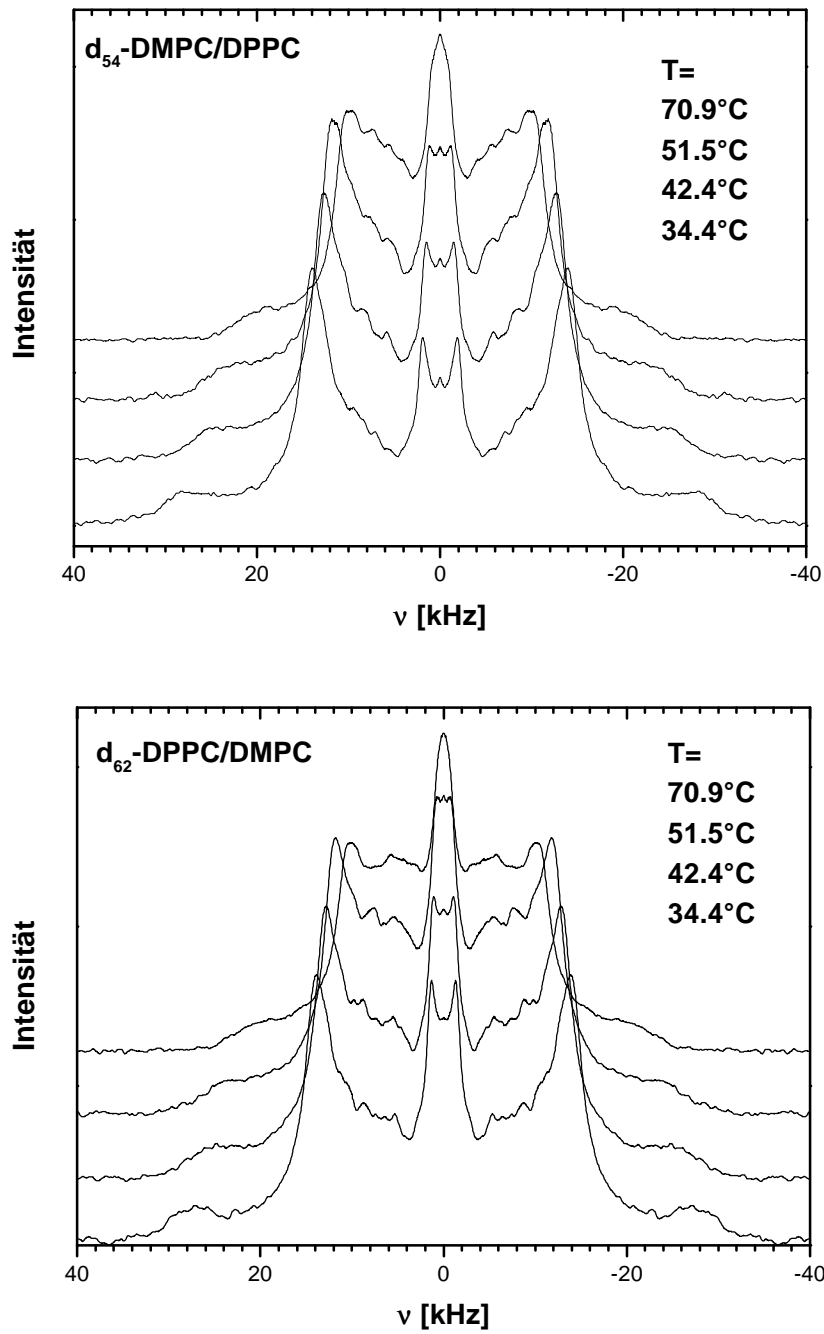
**Abbildung 74:** Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten reinen perdeutერიerten PCs bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.



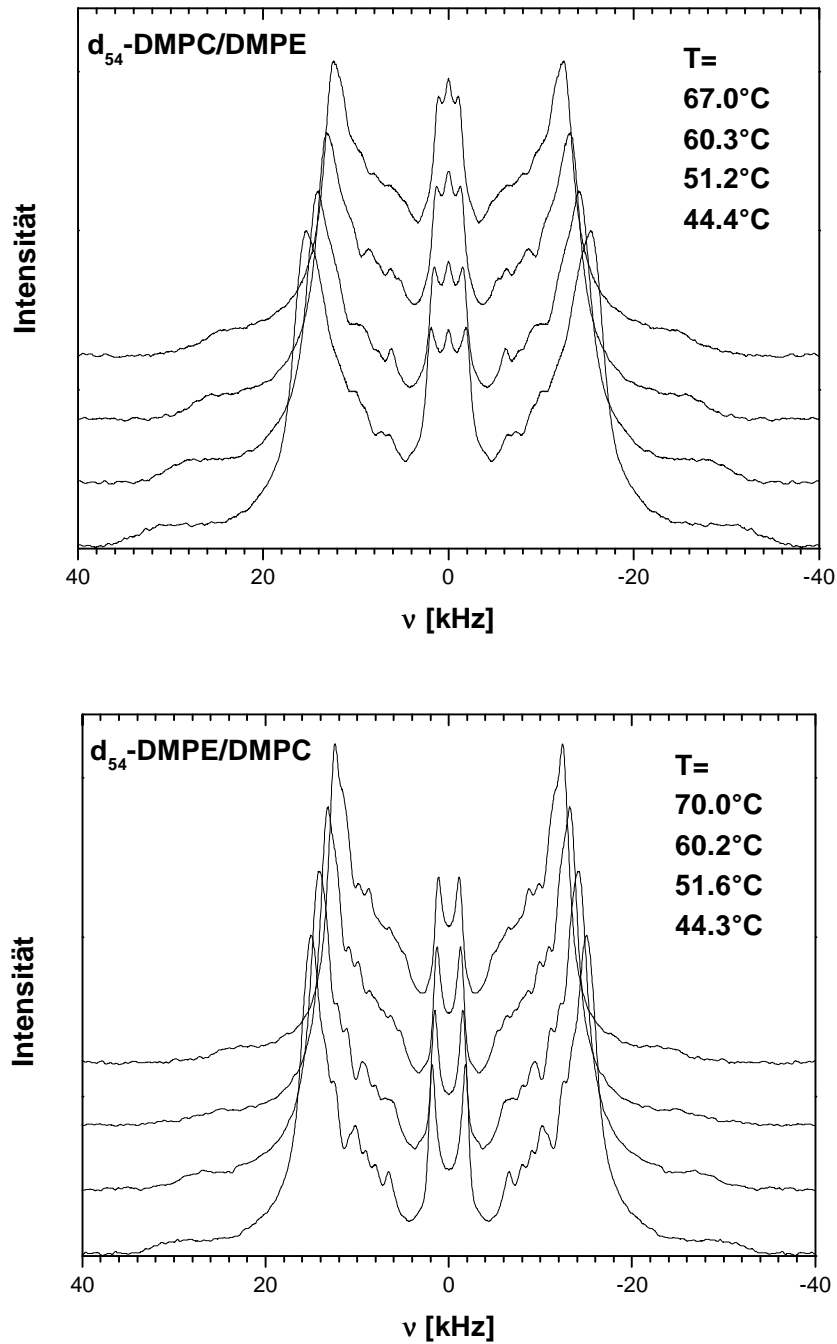
*Abbildung 75: Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten reinen perdeuterierten PEs bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*



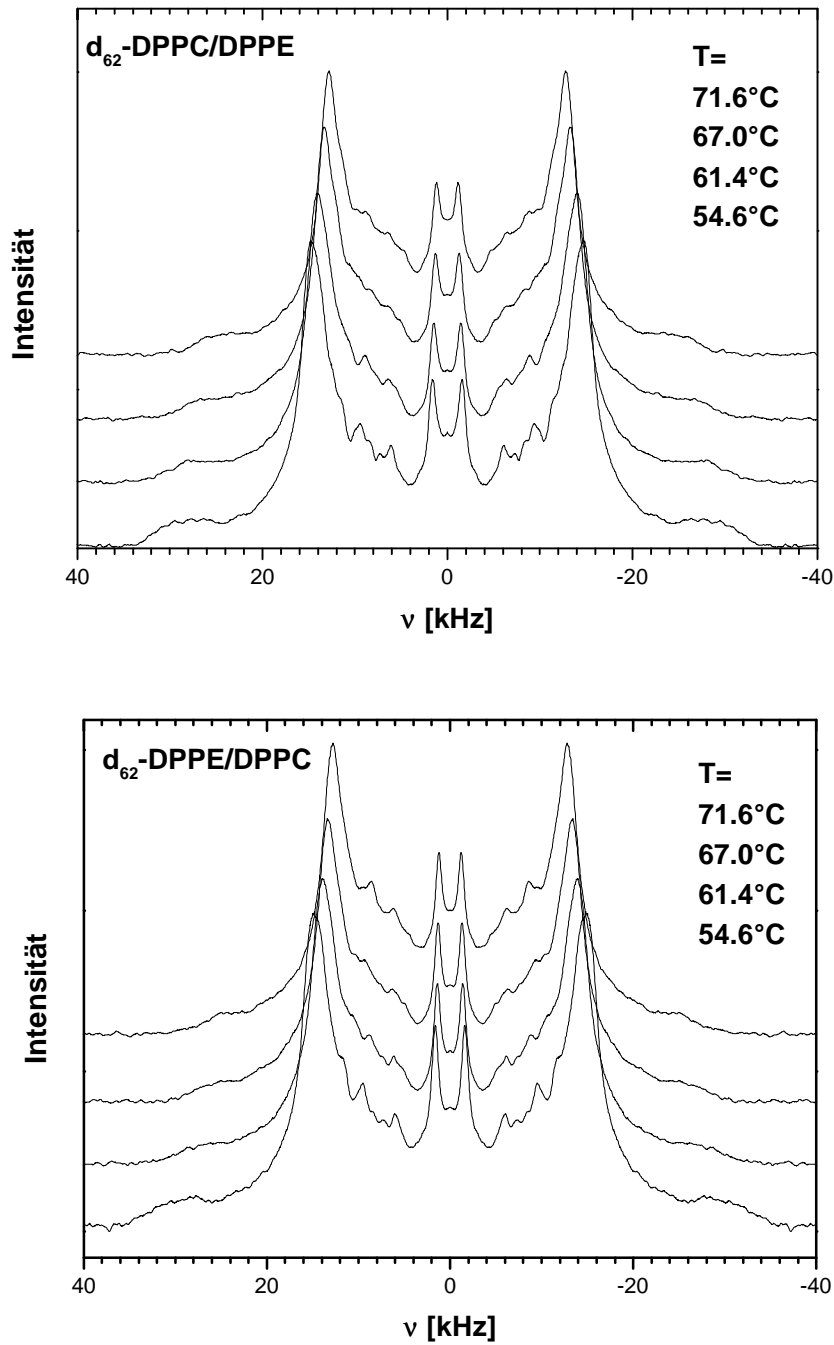
**Abbildung 76:** Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPE/DPPE-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.



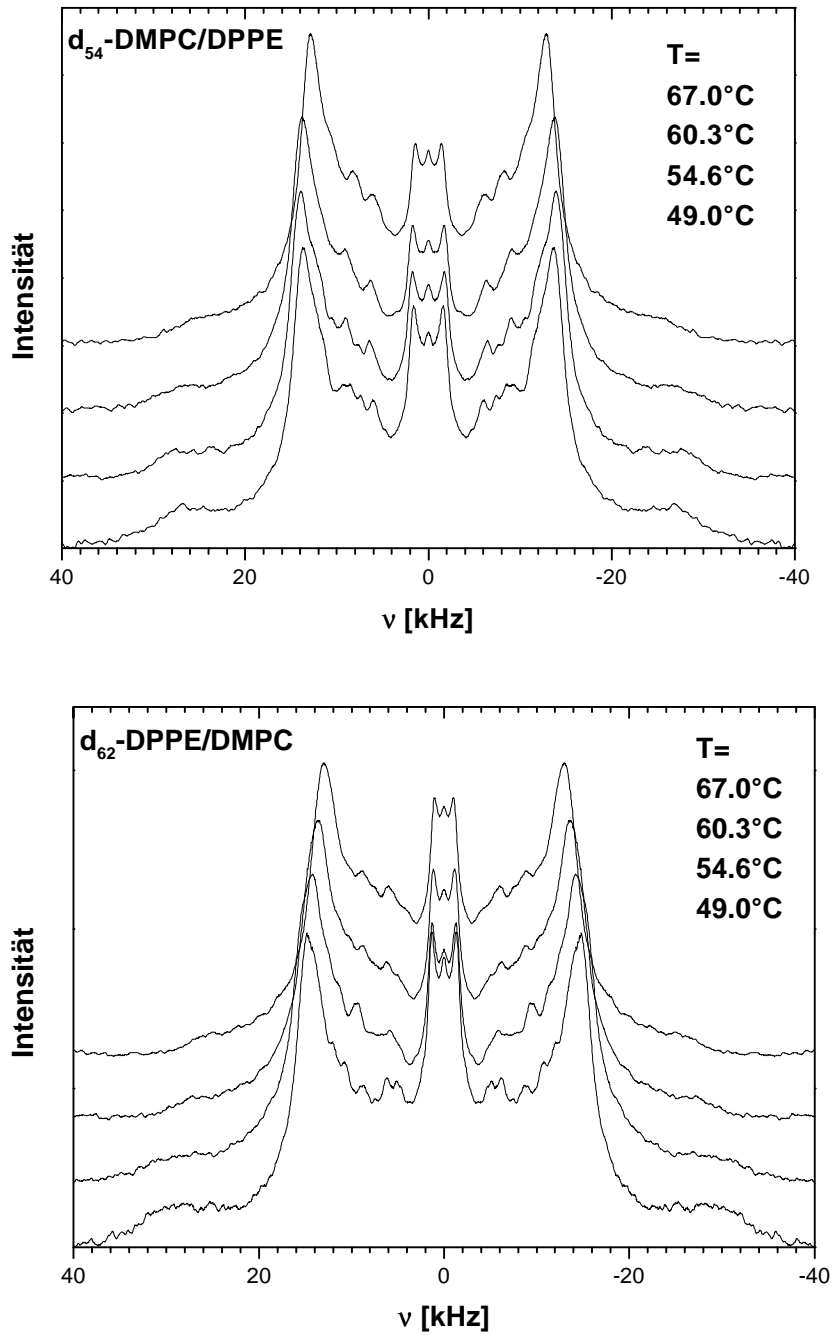
**Abbildung 77:** *Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPC/DPPC-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*



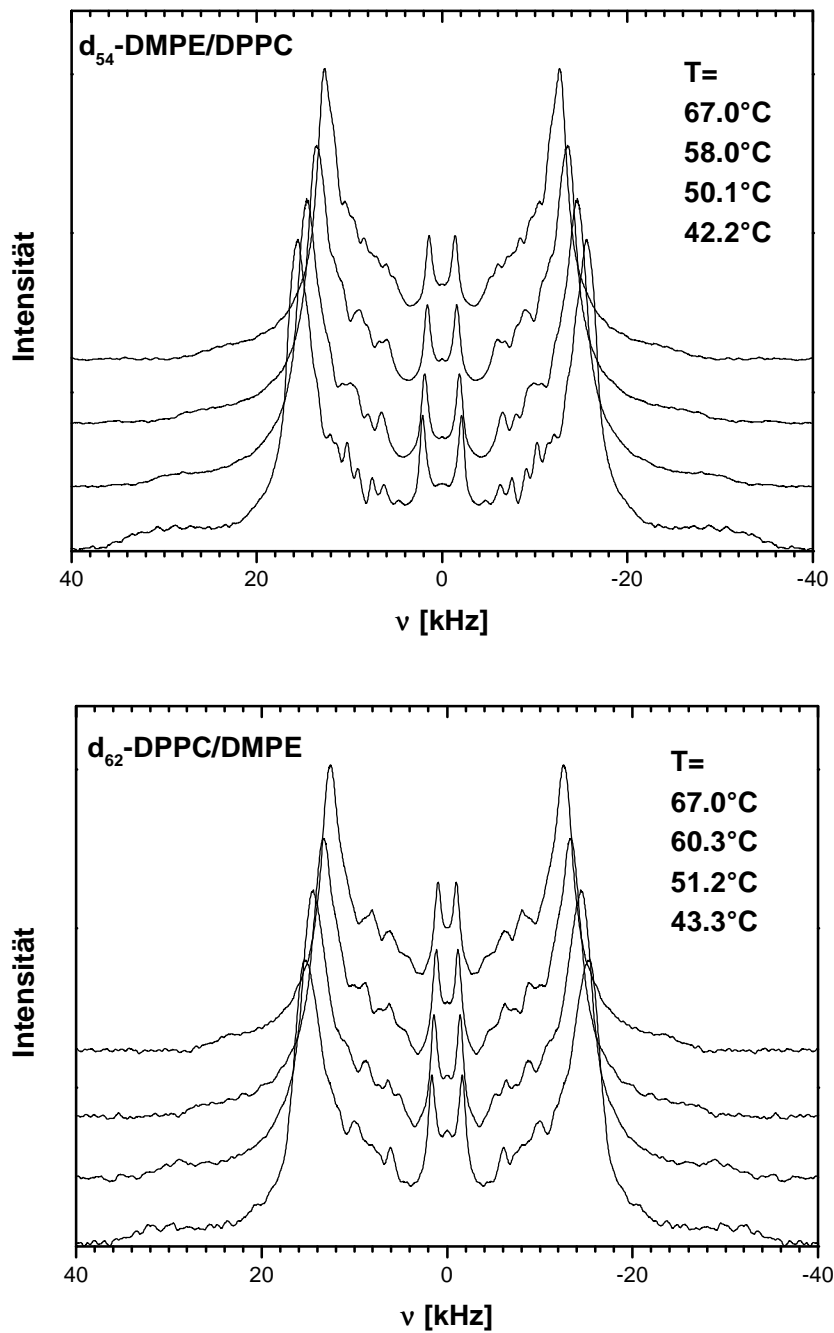
**Abbildung 78:** *Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPC/DMPE-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*



**Abbildung 79:** *Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DPPC/DPPE-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*



**Abbildung 80:** *Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPC/DPPE-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*

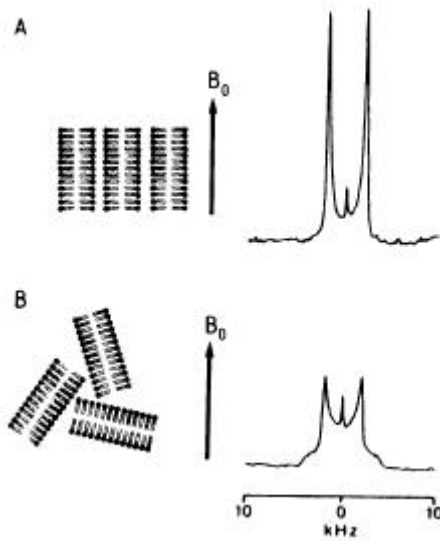


**Abbildung 81:** Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPE/DPPC-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.



Alle gemessenen Spektren weisen dabei eine ausgeprägte Dublettstruktur auf, da die einzelnen C-D-Bindungen der Acylketten offensichtlich durch die Bildung von relativ starren Lipiddoppelschichten nur stark anisotrope Bewegungen ausführen können (vgl. Kapitel 3). Die Beweglichkeit der Methylengruppen hängt zudem stark von der räumlichen Lage innerhalb des Lipidmoleküls ab, da die einzelnen Kettensegmente unterschiedliche Ordnung und damit auch unterschiedlich breite Aufspaltungen besitzen, was dazu führt, daß sich die beobachteten Spektren aus einer Überlagerung dieser sogenannten *Pake*-Spektren zusammensetzen. Durch das Vermeiden von Beschallung bei der Probenvorbereitung sind die entstandenen Aggregate zudem zu groß, um z. B. durch schnelle Rotation – wie im Falle kleiner Vesikel – eine vollständige Mittelung der C-D-Orientierungen herbeizuführen und damit die Breite der Quadrupolaufspaltung bis zum vollständigen Informationsverlust zu reduzieren [Bayerl und Bloom, 1990]. Eine exakte Zuordnung dieser Aufspaltungen zu den einzelnen Kettenpositionen läßt sich durch die Synthese von selektiv deuterierten Lipiden gewinnen, wie dies für DPPC [z. B. Seelig und Seelig, 1974] und DPPE [z. B. Blume et al., 1982a] auch größtenteils geschehen ist. Generell zeigt es sich, daß die endständigen Methylgruppen der untersuchten Phospholipide die größte Beweglichkeit und damit die geringste Quadrupolaufspaltung  $\Delta\nu_Q$  besitzen, während die  $\Delta\nu_Q$ -Werte für die ersten sechs bis acht  $CD_2$ -Segmente nach der Carboxylgruppe einen „Plateaubereich“ mit der niedrigsten Beweglichkeit und der größten Aufspaltung bilden [z. B. Thurmond et al., 1991].

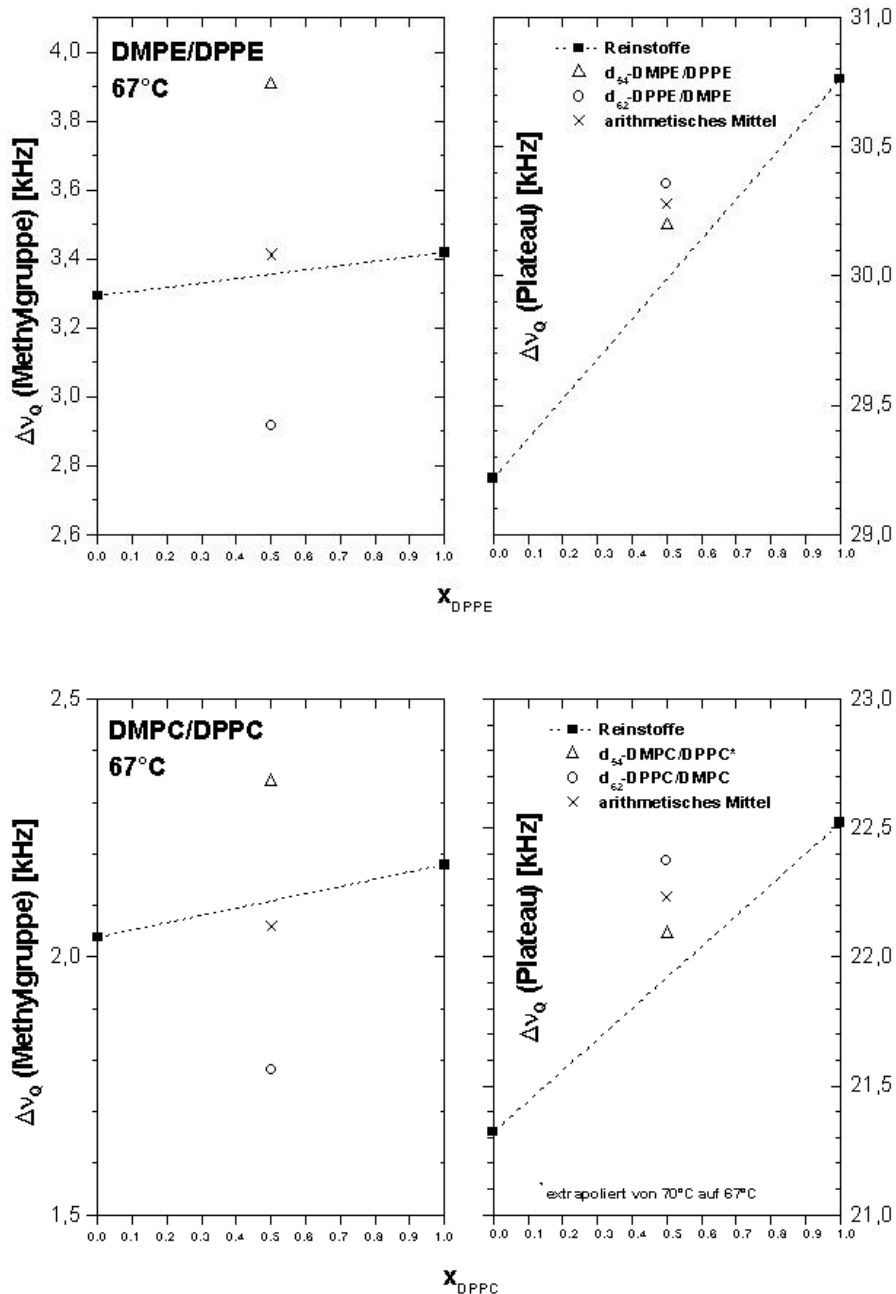
Vor diesem Hintergrund können nun die in Abb. 74 bis 81 gezeigten Daten interpretiert werden, wobei es in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist, wie sich das Ordnungsverhalten der Reinstoffe durch die Mischung mit einer zweiten Lipidkomponente verändert. Dazu wird zunächst zur Verbesserung der Auflösung eine numerische Entfaltung (*De-Pake-ing*) der einzelnen Spektren durchgeführt (Daten nicht dargestellt) und die resultierenden  $\Delta\nu_Q$ -Werte anschließend analysiert. Nach *Schäfer et al.* [1998] ist allerdings zu bedenken, daß durch das starke Magnetfeld bei der NMR-Messung eine bevorzugte Orientierung (mit der Doppelschichtnormalen senkrecht zur Feldrichtung) in der Probe induziert wird, was zu einer elliptischen Verformung der Vesikel führt [Seelig und Macdonald, 1987; Brumm et al., 1992]. Für die beobachteten Spektren bedeutet das anschaulich eine Intensitätssteigerung im „Plateaubereich“ (Überbetonung der  $\nu_{Q\perp}$ -Werte) bei gleichzeitiger Verringerung der Seitenbanden ( $\Delta\nu_{Q\parallel}$ ) im Vergleich zu dem Idealfall einer vollkommen isotropen Orientierung der Lipidschichten:



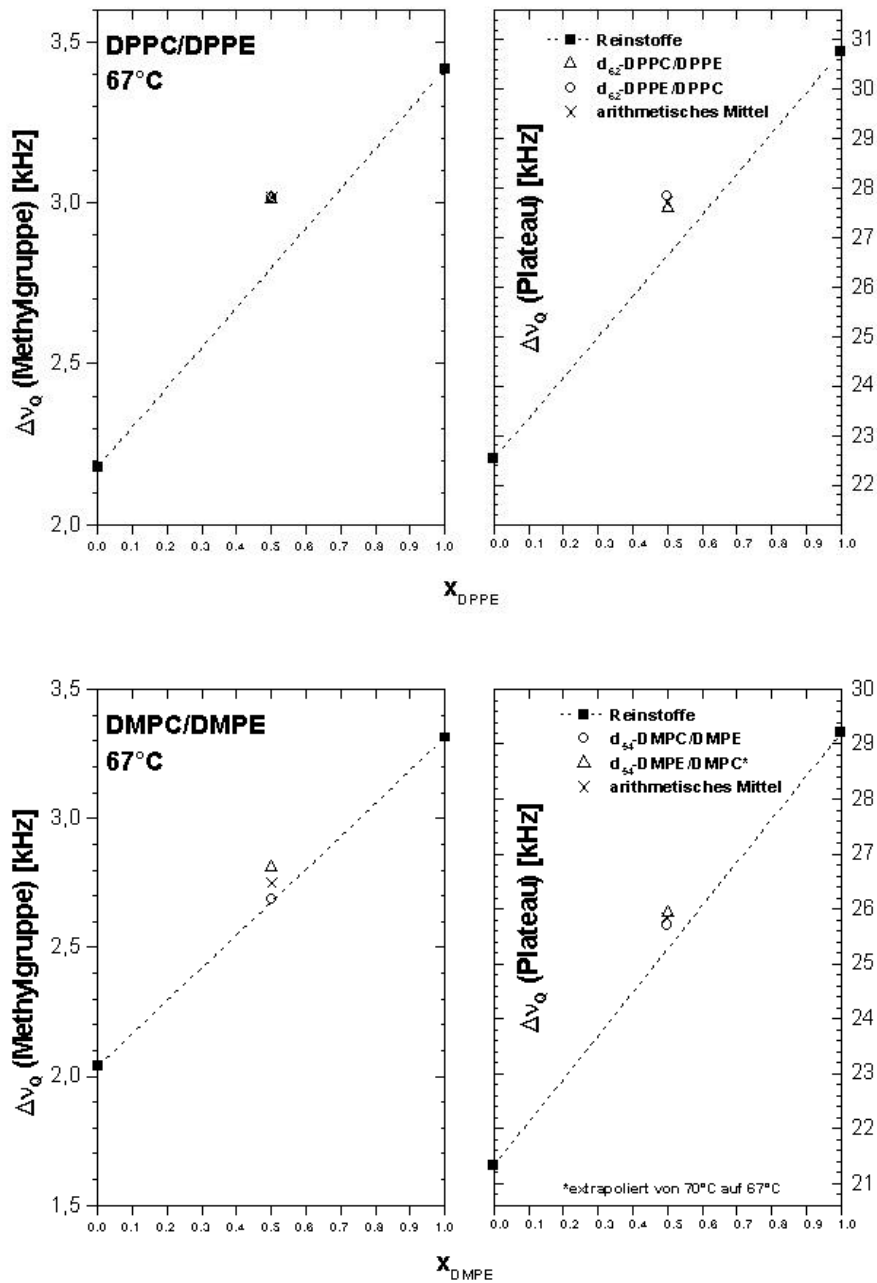
**Abbildung 82:** Schematische Darstellung zur Abhängigkeit der Spektrenformen von der Orientierung der Lipiddoppelschichten; A: Ausrichtung in Feldrichtung, B: keine Vorzugsrichtung; Diagramm nach Seelig und Macdonald [1987].

Da die De-Pake-Prozedur aber gerade von sphärischen Vesikeln ausgeht, zeigen die mit dieser Technik aus den experimentellen (anisotropen) Werten generierten Datensätze teilweise Artefakte mit negativer Intensität [Ziegler und Blume, 1995; Schäfer et al., 1998], was jedoch für die hier durchgeführten Untersuchungen unerheblich ist, da die einzelnen Quadrupolaufspaltungen trotzdem korrekt wiedergegeben werden.

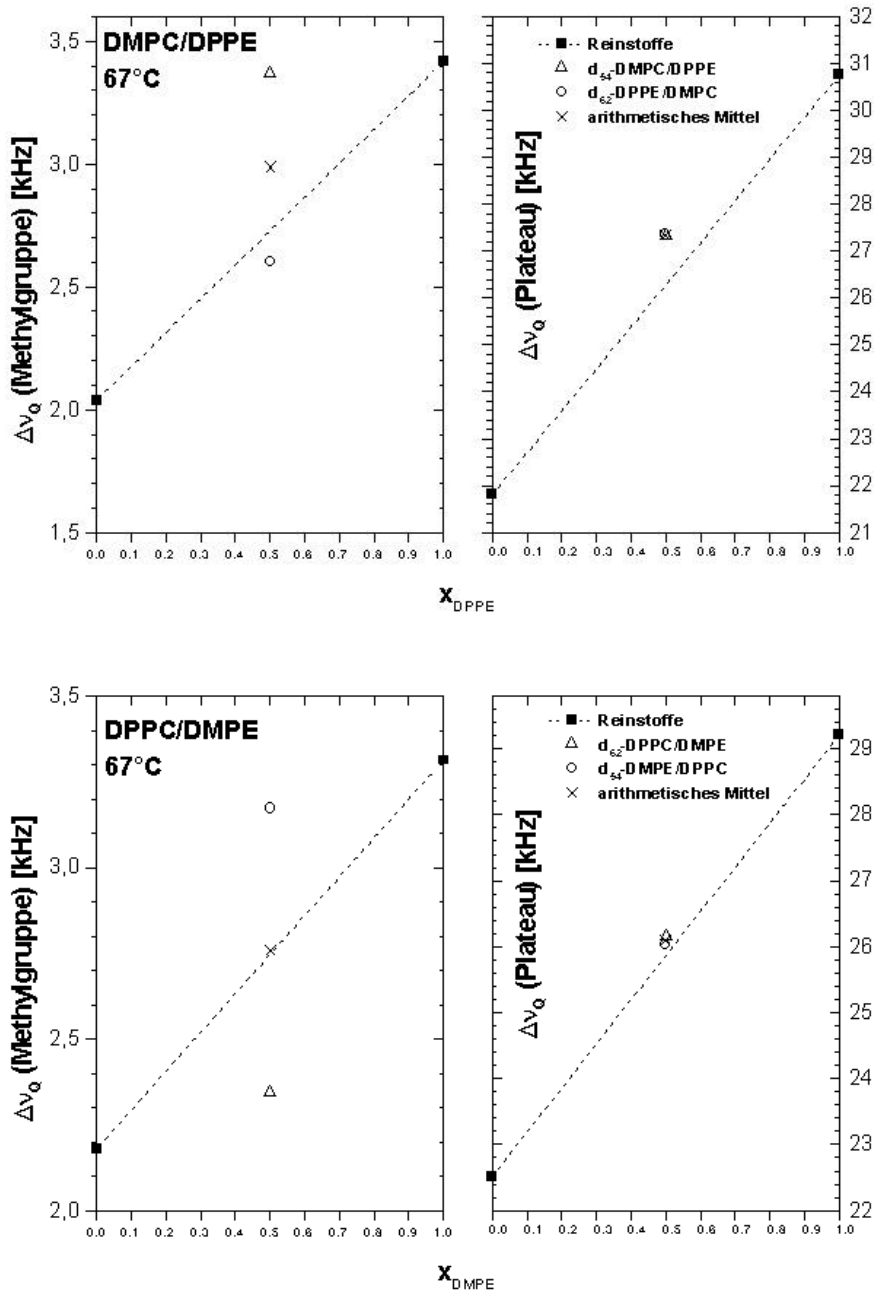
In der folgenden Abbildung sind die  $\Delta\nu_Q$ -Werte für den „Plateaubereich“ und die terminale Methylgruppe der Acylketten in den unterschiedlichen PC/PE-Gemischen verglichen mit den entsprechenden Reinsubstanzen dargestellt:



**Abbildung 83:** *Quadrupolaufspaltungen des „Plateaubereichs“ sowie der terminalen Methylgruppen bei 67°C für die gleichköpfigen äquimolaren PC- bzw. PE-Gemische und die entsprechenden Reinsubstanzen; die gestrichelte Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung; eventuelle Extrapolationen erfolgten linear zwischen den Aufspaltungen bei den benachbarten Temperaturen.*



**Abbildung 84:** *Quadrupolaufspaltungen des „Plateaubereichs“ sowie der terminalen Methylgruppen bei 67° C für die gleichkettigen äquimolaren PC/PE-Gemische und die entsprechenden Reinsubstanzen; die gestrichelte Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung; eventuelle Extrapolationen erfolgten linear zwischen den Aufspaltungen bei den benachbarten Temperaturen.*



**Abbildung 85:** *Quadrupolaufspaltungen des „Plateaubereichs“ sowie der terminalen Methylgruppen bei 67° C für gemischt-kettige äquimolare PC/PE-Gemische und die entsprechenden Reinstoffe; die gestrichelte Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung; eventuelle Extrapolationen erfolgten linear zwischen den Aufspaltungen bei den benachbarten Temperaturen.*

Vergleicht man zunächst einmal die Aufspaltungen der Reinstoffe untereinander, so erkennt man, daß bei der gewählten Temperatur von 67° C die beiden PEs am Anfang wie am Ende ihrer Acylketten – und zwar unabhängig von deren Länge – eine durchweg höhere Ordnung aufweisen als die untersuchten PC-Moleküle. Dieser Effekt muß zwangsläufig mit den unterschiedlichen Kopfgruppen zusammenhängen und beruht auf zwei grundsätzlichen strukturellen Differenzen: Die erste besteht darin, daß die PE-Moleküle Wasserstoffbrücken ausbilden können, was offensichtlich auch in der flüssig-kristallinen Phase noch in großem Maße geschieht [z. B. Blume et al., 1982a] und somit die Beweglichkeit der Kopfgruppen im Vergleich zu PC deutlich herabsetzt [Browning, 1981], so daß die Ketten ebenfalls in ihrer Bewegung behindert werden. Ausgehend von dem Glycerin-Gerüst nimmt mit zunehmender Annäherung an die terminale Methylgruppe dieser restriktive Einfluß dann immer mehr ab, wodurch auch der Unterschied der Quadrupolaufspaltungen ( $\Delta\Delta\nu_Q$ ) zwischen PE und PC immer geringer wird, wie man anhand von Abb. 84 auch leicht erkennen kann. Für einen Vergleich zwischen den absoluten  $\Delta\nu_Q$ -Werte von „Plateau“ und terminaler Methylgruppe muß man allerdings bedenken, daß letztere durch auftretende Rotationseffekte noch zusätzlich um den Faktor drei verkleinert wird und entsprechend umgerechnet werden muß [Ziegler und Blume, 1995].

Der zweite Grund für die höhere Ordnung besteht in der Tatsache, daß die PE Kopfgruppe verglichen mit PC einen wesentlich geringeren Flächenbedarf besitzt [z. B. Gawrisch und Holte, 1996] und dadurch für die einzelnen Acylketten einfach weniger Raum zur Verfügung steht und eine dichtere Packung somit erzwungen wird.

Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich zwischen den gleichkettigen Komponenten, wenn man nicht die  $\Delta\nu_Q$ -Werte bei einer absoluten Temperatur untersucht, sondern von einem gemeinsamen reduzierten Wert  $T_{\text{red}} = (T - T_m) / T_m$  ausgeht. Hier zeigt jedoch eine Analyse der in Abb. 84 dargestellten Spektren bei  $T_{\text{red}} = 0.09$  in Übereinstimmung mit den Literaturdaten [Marsh et al., 1983; Thurmond et al., 1991], daß selbst bei einer Differenz von 28° C zwischen den C<sub>14</sub>- bzw. 24° C zwischen den C<sub>16</sub>-Komponenten das PE stets die größere Aufspaltung besitzt (Daten nicht dargestellt). Anders hingegen stellt sich das Ergebnis bei einem Vergleich der Reinkomponenten mit gleicher Kopfgruppe aber unterschiedlicher Kettenlänge dar, hier zeigt die Palmitoylverbindung bei beiden Systemen auf der absoluten Temperaturskala die höhere Ordnung, während bei

gleichem  $T_{\text{red}}$  jeweils die kürzerkettige Komponente das deutlich größere  $\Delta v_Q$  aufweist (Daten nicht dargestellt). Dieser Effekt wurde für unterschiedliche PCs auch von *Gawrisch und Holte* [1996] gefunden und zeigt, daß sich eine Temperaturerhöhung auf der reduzierten Skala auf längere Ketten offensichtlich deutlich stärker auswirkt. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der mit der Länge erhöhten Möglichkeit, gauche-Konformere auszubilden, da – anschaulich gesprochen – in einer  $C_{16}$ -all-trans-Kette ja auch mehr Ordnung existiert als in einer vergleichbaren  $C_{14}$ -Kette und somit bei gleichem  $T_{\text{red}}$  eine größere Unordnung induziert werden kann. Die thermische Bewegung der verkrümmten Acylketten führt bei DPPX zudem dazu, daß sich die Nachbarmoleküle gegenseitig stärker behindern als bei DMPX [Seddon, 1990], was zu einem erhöhten freien Volumen pro Molekül und damit ebenfalls zu einer stärkeren Isomerisierung führt.

Bei einer Betrachtung der gleichköpfigen Lipidsysteme bei  $67^\circ\text{C}$  (Abb. 83) findet man zwischen den Aufspaltungen der Reinkomponenten im „Plateaubereich“ ein deutlich größeres  $\Delta\Delta v_Q$  als zwischen den terminalen Methylgruppen, da die Beweglichkeit der  $\text{CD}_2$ -Segmente in den oberen Regionen durch die verlängerte Kette wesentlich mehr eingeschränkt wird als dies am Ende der Fall ist [Gawrisch und Holte, 1996]. Die zusätzlich reduzierte Beweglichkeit der Kopfgruppe bei PE scheint diesen Effekt noch zu verstärken, wie sich anhand der etwas ausgeprägteren  $\Delta v_Q$ -Differenzen vermuten läßt. Auch die äquimolaren DMPX/DPPX-Gemische zeigen sowohl für PC als auch für PE ein sehr ähnliches Verhalten: Im „Plateaubereich“ findet eine deutliche Annäherung der Quadrupolaufspaltungen statt, da durch die sehr gute Mischbarkeit der Komponenten [Garidel und Blume, 1998] offenbar die Beweglichkeit von DPPX zunimmt, während gleichzeitig die benachbarten DMPX-Moleküle stärker behindert werden. Die  $\Delta v_Q$ -Werte für die  $\text{CD}_2$ -Gruppen in der „Plateau“-Region für die gleichköpfigen Gemische liegen dabei sehr nahe beieinander (worüber der kleine Maßstab für DMPX/DPPX in Abb. 83 und eine Fehlertoleranz von ca.  $\pm 0.15\text{ kHz}$  hinwegtäuschen), was ebenfalls auf ein annähernd ideales Mischungsverhalten hindeutet. Interessanterweise befinden sich – will man diese geringen Abweichungen interpretieren – bei beiden Systemen die „Plateau“-Aufspaltungen stets signifikant oberhalb der fiktiven linearen Verbindungslinie (gestrichelt in Abb. 83), auf welcher ein vollkommen ideales Gemisch zu finden sein müßte [Hübner und Blume, 1987]. Da man bei einer reinen trans-gauche-Isomerisierung eher erwarten würde, daß die beobachteten  $\Delta v_Q$ -Werte unter dieser Linie liegen, weil die Einführung von neuen gauche-

Konformerer energetisch günstiger sein sollte als auf der anderen Seite eine Zunahme an trans-Bindungen in der kürzeren Kette [Sankaram und Thompson, 1992], scheinen hier noch andere dynamische Einflüsse eine gewisse Rolle zu spielen. Auf der Hand liegen hierfür die Rotations- und Wackelbewegungen der Acylketten, welche aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit in gemittelter Form in die relativ langsamen NMR-Messung miteingehen und sich somit auch auf die  $\Delta v_Q$ -Werte auswirken [Tuchtenhagen et al., 1994; Ziegler und Blume, 1995], so daß die verhältnismäßig hohen Ordnungsparameter für den „Plateaubereich“ der kürzeren Ketten von DMPX/DPPX möglicherweise auf eine relativ stärkere Behinderung dieser Bewegungen durch die längere Komponente zurückzuführen sind.

Auch die Aufspaltungen der Methylgruppen sprechen für ein sehr homogenes Gemisch zwischen den gleichköpfigen Lipiden: Beide Systeme zeigen nämlich eine eindeutige Zunahme der Beweglichkeit bei der  $CD_3$ -Gruppe von DPPX, während im Gegenzug die Ordnung des analogen Segmentes im Falle von DMPX in gleichem Maße erhöht wird (vgl. *Ziegler und Blume* [1995] für DMPC/DPPC), so daß sich der arithmetische Mittelwert der beiden  $\Delta v_Q$ -Werte (Kreuz in Abb. 83) fast genau auf der gestrichelten „Ideallinie“ befindet. Offensichtlich erhalten also die Enden der Palmitoylketten durch ihre kleineren Nachbarn mehr freies Volumen für ihre Isomerisierung, während andererseits die Methylgruppen von DMPX eingeklemmt werden und somit wesentlich weniger Freiheit besitzen. Dieser Sachverhalt deutet damit gleichzeitig darauf hin, daß in transversaler Richtung zwischen den Molekülen der Doppelschicht bei den untersuchten Temperaturen keine Verzahnung auftritt, da man in dieser Situation nicht ein derart deutliches Absinken von  $\Delta v_Q$ (DPPX) beobachten würde. Im Falle von DMPC/DPPC wäre eine solche Verzahnung nicht ganz unwahrscheinlich, denn durch die Orientierung der Kopfgruppe bleibt der in der Gelphase auch bei PE auftretende Knick in der *sn*-2 Kette in der Nähe von  $T_m$  erhalten, wodurch sich eine intramolekulare Längendifferenz von etwa drei Methylengruppen ergibt [Seelig und Seelig, 1980], welche zusammen mit den unterschiedlichen Kettenlängen der Reinsubstanzen in dem Gemisch durchaus für eine Verschachtelung sprechen würde. Neuere Untersuchungen mittels  $^2H$ -NMR-Spektroskopie und Neutronenstreuung zeigen allerdings, daß im Falle von PC bereits bei einer Temperatur von etwa  $T_m + 15^\circ C$  die beiden Ketten eines Lipidmoleküls die gleiche Länge besitzen [Douliez et al., 1996] während diese Situation bei PE vermutlich schon beim Übergang in die flüssig-kristallinen Phase durch



eine Umorientierung des Glyceringerüsts eintritt [Tuchtenhagen et al., 1994]. Damit sollten bei allen in Abb. 74-81 dargestellten Spektren keine signifikanten Unterschiede in der Länge von *sn*-1- und *sn*-2-Kette bestehen und somit auch das Mischungsverhalten der binären Systeme hierdurch nicht beeinflusst werden.

Die gleichkettigen Systeme DMPC/DMPE und DPPC/DPPE verhalten sich ebenfalls vollkommen analog zueinander (Abb. 84) und stehen im Einklang mit den Beobachtungen, welche von *Blume et al.* [1982b] an selektiv deuterierten DPPC/DPPE Gemischen gemacht wurden: Beide Komponenten besitzen in der Mischung eine fast identische Quadrupolaufspaltung sowohl im „Plateaubereich“ als auch am Ende der Acylketten und legen damit – ebenso wie die DSC-Messungen auf Seite 154 bzw. 158 – den Schluß nahe, daß in der flüssig-kristallinen Phase ein annähernd ideales Mischungsverhalten auftritt. Ob nun auf molekularer Ebene tatsächlich eine zufällige Verteilung oder aber stark fluktuierende Mikrodomänen eines Lipidtyps [Shin et al., 1995] vorliegen, läßt sich mit den vorhandenen Informationen allerdings nicht sagen, da bei den verwendeten Temperaturen die laterale Diffusion der Moleküle für die angewendete NMR-Meßtechnik viel zu schnell vonstatten geht, so daß man aus den aufgenommenen Spektren lediglich zeitlich gemittelte Informationen erhält [Hübner und Blume, 1987]. Auffälligerweise liegen auch bei den gleichkettigen Gemischen die  $\Delta\nu_Q$ -Werte stets oberhalb der gestrichelten „Ideallinie“ (Abb. 84), also scheint PE bezüglich der Molekülordnung einen etwas stärkeren Einfluß auf PC zu besitzen als die umgekehrt der Fall ist. Dieser Effekt tritt mit 0.6 bzw. 1.0 kHz für DMPC/DMPE bzw. DPPC/DPPE verglichen mit den gleichköpfigen Lipidgemischen deutlicher zutage (0.3 kHz für DMPC/DPPC und DMPE/DPPE) und könnte darauf beruhen, daß wegen der Einführung der kleineren PE-Kopfgruppen zwischen die voluminösen PC-Moleküle eine überproportional dichtere Packung der Lipide ermöglicht wird [Blume et al., 1982b]. Außerdem existiert zwischen den Phosphatgruppen der PC-Moleküle eine repulsive Wechselwirkung in der Membranebene, welche von den Cholingruppen nicht ausgeglichen werden kann [Boggs, 1987], und daher sollte auch aus diesem Grunde durch die Einlagerung von PE bzw. die Bildung von PC-PE-Wasserstoffbrücken ein zusätzlicher ordnender Effekt erkennbar sein.

Nachdem nun die auftretenden Effekte der gleichkettigen bzw. gleichköpfigen Lipidgemischen untersucht wurden, stellt sich als nächstes die Frage, ob aus den hieraus

gewonnenen Informationen direkte Vorhersagen für die Systeme DMPC/DPPE und DPPC/DMPE abgeleitet werden können. Als einfachster Ansatz bietet es sich hierfür an, einmal die Veränderungen der  $\Delta\nu_Q$ -Werte aus der Sicht der reinen Komponenten in einer Tabelle zusammenzufassen:

	Anstieg $\Delta\nu_Q(\text{Plateau})$ [kHz]	Absinken $\Delta\nu_Q(\text{Plateau})$ [kHz]
<b>Kettenlängeneffekt PC</b>	+0.8 (für DMPC)	-0.1 (für DPPC)
<b>Kettenlängeneffekt PE</b>	+1.0 (für DMPE)	-0.3 (für DPPE)
<b>Kopfgruppeneffekt C<sub>14</sub></b>	+4.6 (für DMPC)	-3.4 (für DMPE)
<b>Kopfgruppeneffekt C<sub>16</sub></b>	+5.2 (für DPPC)	-3.0 (für DPPE)

**Tabelle 6:** Auswirkungen der Kettenlängen- und Kopfgruppeneinflüsse auf die Quadrupolaufspaltungen der Reinsubstanzen; Daten aus Abb. 83 und 84.

Aus den dargestellten Zahlenwerten wird noch einmal deutlich, daß die Kettenlängeneffekte in den PC- bzw. PE-Gemischen fast identisch sind, während bei den gleichkettigen Systemen etwas größere Differenzen zwischen dem C<sub>14</sub>- und dem C<sub>16</sub>-System auftreten. Absolut gesehen wirkt sich die Substitution der Kopfgruppe also vereinfacht ausgedrückt im „Plateaubereich“ etwa um den Faktor fünf stärker auf die Kettenordnung aus als eine Verlängerung der Acylketten um zwei Methylengruppen.

Welche Prognose bezüglich der  $\Delta\nu_Q$ -Werte läßt sich jetzt aber für DMPC/DPPE stellen? Geht man ganz naiv vor und betrachtet zuerst das DMPC, so würde man gemäß Tab. 6 eine Erhöhung der Ordnung aufgrund der längeren Ketten von DPPE erwarten (+0.8) plus einem zusätzlichen Effekt durch die PE-Kopfgruppe von +4.6, was einen Gesamtwert von +5.4 kHz ergibt. Umgekehrt errechnet man für das DPPE ein Absinken der Quadrupolaufspaltung um 0.3 (Kettenlänge) + 3.0 (Kopfgruppe) = 3.3 kHz. Die Auswertung von Abb. 85 liefert interessanterweise die experimentellen Werte +5.6 und -3.4 (!), welche mit den vorhergesagten nahezu übereinstimmen und die Vermutung nahelegen, daß die gemachte Annahme einer einfachen Addierbarkeit von Kopf- und Ketteneffekten durchaus im Bereich des Möglichen liegt. Abgesehen von dieser Tatsache zeigt das System außerdem

aufgrund der für beide Komponenten identischen Quadrupolaufspaltung im „Plateaubereich“ eine gute Mischbarkeit und weist damit in dieselbe Richtung wie die kalorimetrischen Daten (Seite 165). Offensichtlich hat die in der Gelphase auftretende Mischungslücke also keinen Einfluß auf die flüssig-kristalline Phase. Zu diesem Schluß kamen auch *Hübner und Blume* [1987] für das noch extremere System DMPC/DSPE, was indirekt ebenfalls für die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen an dem „idealeren“ Gemisch DMPC/DPPE spricht.

Die starken Änderungen der Methylgruppenaufspaltungen sind ebenfalls ein Anzeichen dafür, daß eine große Zahl von AB-Paaren auftritt und infolgedessen die Myristoylketten eingeklemmt werden, während den Enden der Palmitoylketten mehr Raum zur Verfügung steht und sie daher freier rotieren können. Analog zu Tab. 6 kann man auch die Änderung der  $CD_3$ -Aufspaltungen für gleichköpfige bzw. gleichkettige Gemische wieder als Basis für eine Prognose verwenden, wobei man allerdings bedenken muß, daß die in Tab. 7 zusammengefaßten Daten wegen der geringen Absolutwerte mit einem größeren relativen Fehler behaftet sind:

	Anstieg $\Delta\nu_Q(CD_3)$ [kHz]	Absinken $\Delta\nu_Q(CD_3)$ [kHz]
<b>Kettenlängeneffekt PC</b>	+0.3 (für DMPC)	-0.4 (für DPPC)
<b>Kettenlängeneffekt PE</b>	+0.6 (für DMPE)	-0.5 (für DPPE)
<b>Kopfgruppeneffekt <math>C_{14}</math></b>	+0.8 (für DMPC)	-0.5 (für DMPE)
<b>Kopfgruppeneffekt <math>C_{16}</math></b>	+0.8 (für DPPC)	-0.4 (für DPPE)

*Tabelle 7: Auswirkungen der Kettenlängen- und Kopfgruppeneinflüsse auf die Quadrupolaufspaltungen der Reinsubstanzen; Daten aus Abb. 83 und 84.*

Zwar ist für PC noch immer erkennbar, daß sich die Substitution durch PE stärker als eine Kettenverlängerung auf die Beweglichkeit der Methylgruppe auswirkt, allerdings fallen diese Unterschiede deutlich geringer aus als in Tab. 6, da der hier betrachtete Teil des Moleküls weit von der Kopfgruppe entfernt ist und gleichzeitig die Änderung der Kettenlänge in diesem Bereich an Bedeutung gewinnt. Für DMPC ergibt sich nach Tab. 7

eine erwartete Zunahme von  $\Delta\nu_Q$  um 1.1 kHz (Experiment: 1.4 kHz) und für DPPE eine Abnahme um 0.9 kHz (Experiment: 0.8 kHz). Auch im Bereich der Kettenenden zeigt es sich also unter Berücksichtigung der Fehlertoleranz, daß die experimentell beobachtete Aufspaltung mit Hilfe einer einfachen Addition von Kopfgruppen- und Ketteneffekten recht gut erklärt werden kann.

Bei dem System DPPC/DMPE hingegen sollte gerade der umgekehrte Fall, nämlich eine partielle Kompensation zwischen Kopf und Kette, eintreten. Nach den Daten aus Tab. 6 wäre für die „Plateau“-Aufspaltung von DPPC eine Steigerung von 5.1 kHz und für DMPE ein Absinken um 2.4 kHz zu erwarten, was allerdings bedeuten würde, daß das DPPC in dem Gemisch plötzlich eine höhere Aufspaltung aufweisen würde als das im Reinzustand geordnetere DMPE. Dies ist sehr unwahrscheinlich und wird auch durch die experimentellen Beobachtungen widerlegt, welche Änderungen von +3.6 kHz (DPPC) und -3.1 kHz (DMPE) liefern und analog zu dem ermittelten Phasendiagramm (Seite 70) wiederum für eine sehr gute Mischbarkeit der beiden Komponenten in der flüssig-kristallinen Phase sprechen. Die theoretische Ableitung der  $\Delta\nu_Q$ -Werte weist hier zwar qualitativ in die richtige Richtung, liegt aber quantitativ gesehen im Falle von DPPC deutlich daneben, da die Limitierung durch das auf der  $\Delta\nu_Q$ -Skala „entgegenkommende“ DMPE in der Rechnung nicht berücksichtigt wird, denn die Möglichkeit, daß die Quadrupolaufspaltung der DPPC-„Plateau“-Region plötzlich unter der von DMPE liegt, erscheint vom experimentelle Standpunkt aus sehr unlogisch. Tut man dies jedoch, so reduzieren sich die 5.1 kHz für DPPC auf 4.2 kHz, und die Aufspaltungen von DMPE und DPPC treffen sich bei  $\Delta\nu_Q \approx 26.8$  kHz, wobei dieser Betrag nun wieder deutlich besser mit dem Experiment (26.2 kHz aus Abb. 85) übereinstimmt.

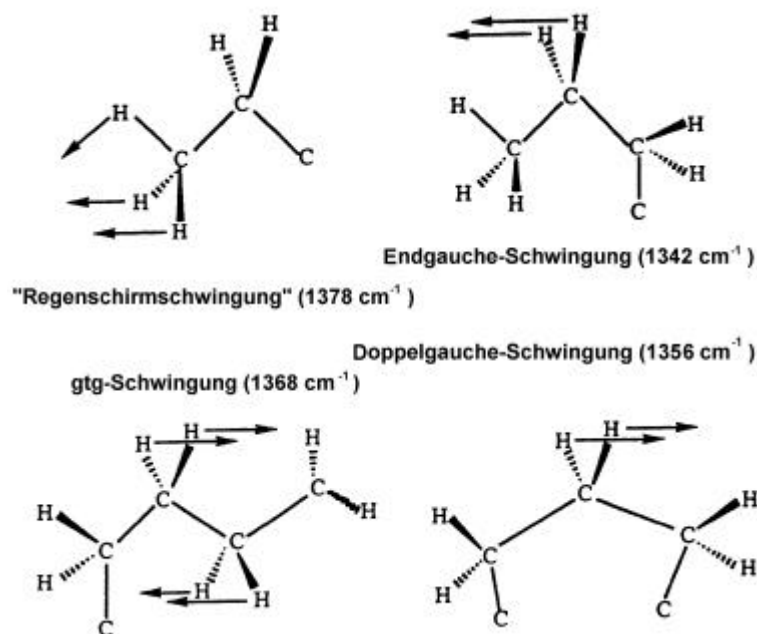
Besonders interessant bei der Untersuchung von DPPC/DMPE ist die Frage, wie sich die Methylgruppen der einzelnen Komponenten in der Mischung verhalten: Wird das DMPE zwischen den Palmitoylketten zusätzlich behindert und  $\Delta\nu_Q$  erhöht sich noch weiter? Kann das DPPC die durch die kürzeren Nachbarn entstandenen Freiräume trotz der PE-Kopfgruppen für mehr Beweglichkeit nutzen? Durch reine Überlegung läßt sich hierauf – im Gegensatz zu dem System DMPC/DPPE – keine Antwort finden, daher kann man wieder Tab. 7 zu Rate ziehen und erhält für DPPC eine Änderung im Vergleich zur reinen Komponente von +0.4 kHz und analog für DMPE +0.1 kHz. Die experimentell beobachteten

Werte betragen +0.1 kHz bzw. -0.1 kHz, womit für das kürzerkettige Lipid eine falsche Tendenz vorhergesagt wird, wenngleich der Abstand von 0.2 kHz im Bereich der Fehlertoleranz liegt. Es scheint also für den CD<sub>3</sub>-Bereich so zu sein, daß sich die gegenläufigen Effekte teilweise kompensieren und die Methylgruppen von DPPC zwar mehr Freiraum erhalten, aber andererseits durch die benachbarten PE-Moleküle die gesamte Kette so stark behindert wird, daß sich im Endeffekt eine leichte Erhöhung der Ordnung ergibt. Umgekehrt wird die Packungsdichte der CD<sub>3</sub>-Gruppen von DMPE durch die PC-Moleküle trotz deren größerer Länge aufgelockert und somit eine geringfügig bessere Beweglichkeit als in der Reinsubstanz ermöglicht.

Eine ergänzende Betrachtung der auftretenden Mischungsphänomene kann anhand der FTIR-Spektroskopie vorgenommen werden und ist im nächsten Kapitel beschrieben.

#### 5.2.2.2 FTIR-Spektroskopie

Da eine detaillierte Analyse sämtlicher aufgenommenen IR-Spektren den Rahmen der vorliegenden Arbeit bei weitem sprengen würde [vgl. Blume, 1996], beschränkt sich die folgende Untersuchung auf den Bereich der CH<sub>2</sub>-Kippschwingungen zwischen 1300 und 1400 cm<sup>-1</sup>. Diese Bewegungen verlaufen mit ca. 10<sup>13</sup> Hz wesentlich schneller als die trans-gauche-Isomerisierungen der Kettensegmente (etwa 10<sup>10</sup> Hz nach *Kodati und Lafleur* [1993]), und da die IR-Spektroskopie eine sehr schnelle Meßmethode darstellt, können auf diese Weise ergänzend zu den NMR-Messungen Aussagen über die mittleren Konformerenverhältnisse in einer Probe gemacht werden, ohne daß störende Mittelungseffekte auftreten. Voraussetzung ist dabei natürlich, daß man die im Spektrum auftretenden Signale den unterschiedlichen Kettenkonformeren zuordnen kann, wie dies von *Snyder* [1967] durch den Vergleich von Normalkoordinatenanalyse und Experiment an langkettigen Kohlenwasserstoffen durchgeführt wurde. Dabei konnten die folgenden in Abb. 86 dargestellten konformationssensitiven Schwingungsmoden identifiziert werden:



**Abbildung 86:** Vektorielle Darstellung der  $\text{CH}_3$ -„Regenschirmschwingung“ sowie der  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungen für unterschiedliche Kettenkonformationen und ihre charakteristischen Wellenzahlen; Diagramm nach Mendelsohn und Senak [1993].

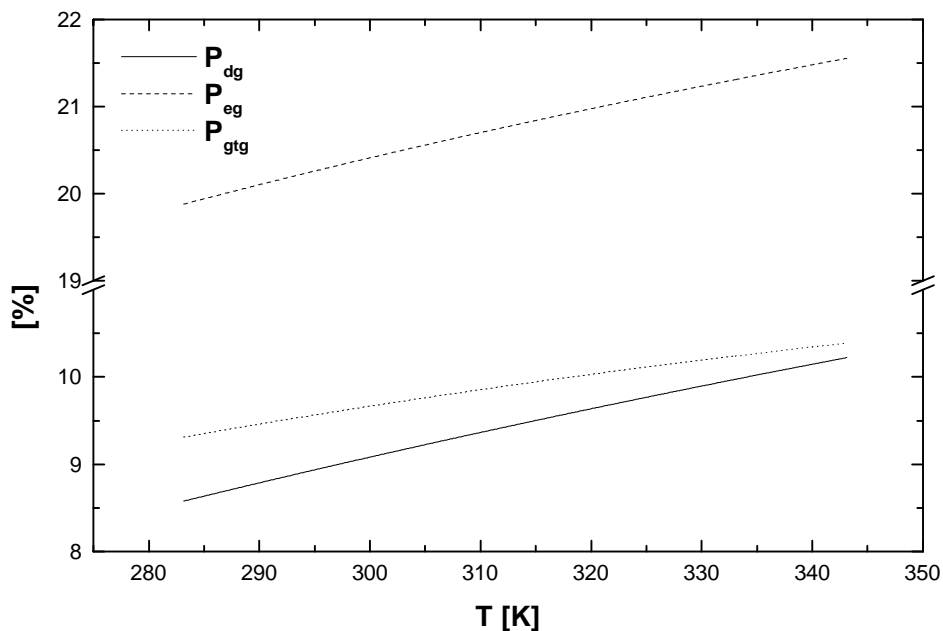
Da das IR-Spektrum von beispielsweise n-Paraffin eine Momentaufnahme der untersuchten Teilchen bezüglich ihrer trans-gauche-Isomerisierung liefert, findet man somit bei den in Abb. 86 angegebenen Wellenzahlen Signale mit unterschiedlicher Intensität, wobei diese durch die Anzahl der entsprechenden Konformeren in der Probe bestimmt wird. Über die Position dieser Konformeren in den Acylketten läßt sich ohne den Einsatz selektiv deuterierter Verbindungen jedoch keine Aussage machen. Der prozentuale Anteil  $P$  an doppelgauche (gg)-, endgauche (eg)- oder kink (gtg)-Konformeren kann dabei unter Verwendung des RIS-Modells [Flory, 1989] mit Hilfe der folgenden Polynome angenähert werden [Senak et al., 1991]:

$$P_{\text{gg}} = -7.364 + 8.859 \cdot 10^{-2}T - 1.388 \cdot 10^{-4}T^2 + 8.741 \cdot 10^{-8}T^3; \quad (81)$$

$$P_{\text{eg}} = -4.522 + 1.620 \cdot 10^{-1}T - 3.468 \cdot 10^{-4}T^2 + 2.855 \cdot 10^{-7}T^3; \quad (82)$$

$$P_{\text{gtg}} = -9.092 + 12.49 \cdot 10^{-2}T - 2.732 \cdot 10^{-4}T^2 + 2.176 \cdot 10^{-7}T^3; \quad (83)$$

T steht hierbei für die absolute Temperatur in K ( $273 \text{ K} \leq T \leq 373 \text{ K}$ ). Zur besseren Veranschaulichung ist der Kurvenverlauf obiger Funktionen in Abb. 87 dargestellt:



**Abbildung 86:** Nach den Polynomen (81), (82) und (83) berechneter prozentualer Anteil  $P$  an doppelgauche (gg)-, endgauche (eg)- und kink (gtg)-Konformeren bei  $n$ -Alkanen.

Die Anzahl  $n$  der unterschiedlichen Konformeren pro Alkankette ergibt sich dann zu

$$n_{gg} = P_{gg} \cdot (N_{C-C} - 3) / 100, \quad (84)$$

$$n_{eg} = 4P_{eg} / (100 \cdot (1 + P_{eg})) \quad (85)$$

$$\text{und } n_{gtg} = P_{gtg} \cdot (N_{C-C} - 4) / 100, \quad (86)$$

wobei  $N_{C-C}$  die Anzahl der C-C-Bindungen beschreibt.

Die gewonnenen Informationen lassen sich nun auch auf Phospholipide anwenden, wenn man sich den Umstand zunutze macht, daß die „Regenschirmschwingung“ der terminalen Methylgruppen unabhängig von der Konformation der übrigen Kettenglieder stets bei ca.  $1378 \text{ cm}^{-1}$  liegt und daher als Normierungsstandard genutzt werden kann [z. B. Mendelsohn und Snyder, 1996]:

Zuerst berechnet man für verschiedene Kettenlängen (hier C<sub>14</sub> und C<sub>16</sub>) die entsprechenden Werte von  $n_{gg}$ ,  $n_{eg}$  und  $n_{gtg}$  bei der gewünschten Temperatur (hier 67° C). Da sich die so ermittelten Zahlenwerte aber nur auf n-Alkane beziehen, werden sie noch zusätzlich durch die integralen Intensitätsverhältnisse  $I(x)/I(1378\text{ cm}^{-1})$  der jeweiligen Konformerbanden dividiert (Fig. 3, 5 und 6 aus *Senak et al.*, [1991]) und anschließend mit dem Faktor 0.5 multipliziert, da Phospholipide im Gegensatz zu den Alkanen ja nur eine terminale Methylgruppe pro Alkylkette besitzen [Ziegler, 1994]. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

	dg (67° C)	eg (67° C)	gtg (67° C)
C <sub>14</sub>	1.61	1.87	1.22
C <sub>16</sub>	1.47	1.87	1.16

**Tabelle 8:** Nach *Senak et al.* [1991] berechnete Konversionsfaktoren für die Umrechnung der normierten integralen Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden in die absolute Anzahl der entsprechenden Konformer pro Kette.

Um nun aus den IR-Spektren der Phospholipide die mittlere Anzahl der entsprechenden Konformerentypen zu erhalten, wird die Intensität der jeweiligen Kippschwingungsbande einfach auf die der „Regenschirmschwingung“ normiert und hiernach mit dem geeigneten Konversionsfaktor aus Tab. 8 multipliziert.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings eine gewisse Vorsicht angebracht, da die beschriebene Methode trotz ihrer experimentellen Einfachheit einige Unzulänglichkeiten enthält: So erzeugen gauche-Bindungen mit mehr als drei trans-Segmenten Abstand voneinander in dem untersuchten Bereich keine Schwingungsbanden und können daher auch nicht beobachtet werden [Mantsch und McElhaney, 1991]. Tatsächlich treten diese Konformationen aber in signifikanter Zahl auf [Tuchtenhagen et al., 1994], was die Ermittlung eines absoluten Wertes für die Anzahl an gauche-Konformeren aus den aufgenommenen Spektren unmöglich macht. Hinzu kommt noch, daß die gtg-Schwingungsbande bei ca. 1368 cm<sup>-1</sup> nach Berechnungen von *Cates et al.* [1994] fast ausschließlich durch g<sup>+</sup>tg<sup>+</sup>-Sequenzen hervorgerufen wird, da die sterisch wesentlich günstigeren – und damit häufigeren – g<sup>+</sup>tg<sup>-</sup>-Konformationen ein Symmetriezentrum



bezüglich der CH<sub>2</sub>-Kippschwingungen besitzen und damit IR-inaktiv sein sollten. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Abkürzung „gtg“ dennoch weiterverwendet, ebenso wie die doppelgauche-Bande bei 1354 cm<sup>-1</sup> mit „gg“ bezeichnet wird, obwohl sie strenggenommen nur g<sup>+</sup>g<sup>+</sup>-Sequenzen beinhaltet [Mendelsohn und Senak, 1993] und die um den Faktor neun seltener vorkommenden g<sup>+</sup>g<sup>-</sup>-Konformationen nicht berücksichtigt [Stouch, 1993].

Trotz der großen Ungenauigkeit in Bezug auf Absolutwerte kann man durch einen Vergleich der IR-Spektren unterschiedlicher Gemische über die auftretenden Intensitätsunterschiede der einzelnen Banden zusätzliche Informationen bezüglich der relativen Ordnungsunterschiede in den jeweiligen Komponenten gewinnen. Dabei ist es jedoch von besonderer Wichtigkeit, daß die Vorgehensweise bei der Spektrenauswertung für jede der untersuchten Proben identisch ist, damit es nicht zu ungleichen auswertungsbedingten Intensitätsveränderungen kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde diesbezüglich ein neuer Weg beschritten, welcher im folgenden kurz beschrieben wird:

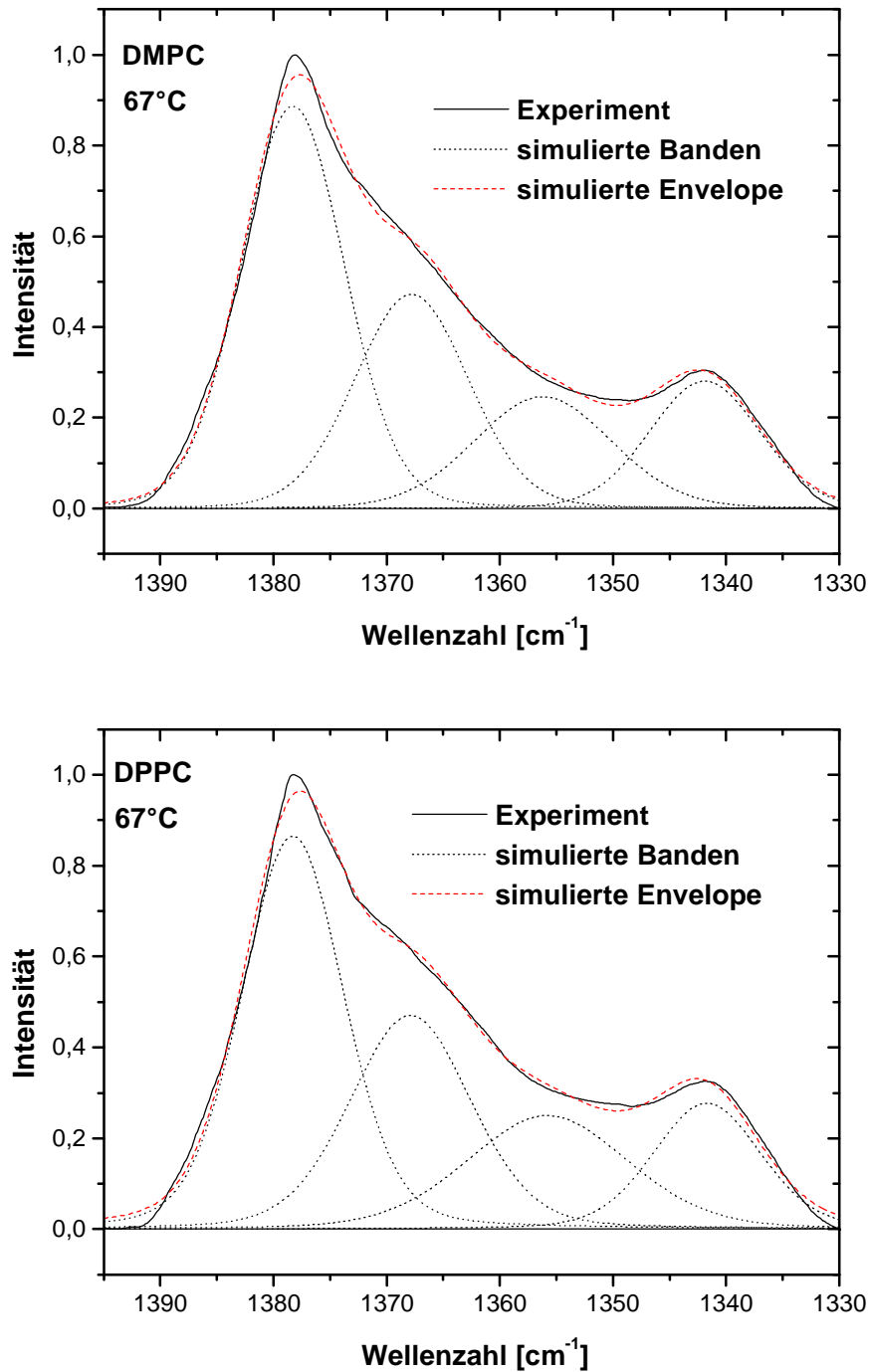
Neben den reinen Lipiden lag das Hauptaugenmerk der durchgeführten IR-Messungen speziell auf den binären Gemischen aus per- bzw. undeuterten Komponenten. Da die Absorptionen der CD<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben sind, sollte somit in dem untersuchten Wellenzahlbereich nur die protonierte Komponente zu sehen und damit eine getrennte Beobachtung des Verhaltens der einzelnen Lipide möglich sein. Nach *Lewis et al.* [1994] besteht jedoch bei Experimenten dieser Art das Problem, daß infolge unvollständiger Deuterierung auch CHD-Schwingungen auftreten, welche die interessierenden CH<sub>2</sub>-Banden teilweise überlagern, so daß bei den Untersuchungen von *Ziegler und Blume* [1995] stets zuerst das Spektrum der reinen perdeuterten Komponente von dem des binären Gemisches subtrahiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nach einigem Ausprobieren auf diese Vorgehensweise verzichtet, da die verwendeten Fettsäuren ohnehin einen Deuterierungsgrad von über 98% aufwiesen, während *Ziegler* [1994] mit nur etwa 80% auskommen mußte. Ein weiterer Vorteil der käuflich erworbenen Produkte besteht darin, daß das Verhältnis D/H bei unterschiedlichen Chargen so gut wie keinen Schwankungen unterworfen ist und damit lediglich ein geringer systematischer Fehler auftritt, welcher jedoch den relativen Vergleich der einzelnen Gemische untereinander nicht beeinträchtigen sollte. Da die CH<sub>2</sub>-

Kippschwingungsbanden außerdem eine relativ geringe Intensität besitzen, erscheint es zudem sinnvoll, möglichst wenig Korrekturmaßnahmen an den Originalspektren durchzuführen, um eine eventuelle Verfälschung der experimentellen Daten so gering wie möglich zu halten.

Die Basislinienkorrektur erfolgte in der vorliegenden Arbeit ähnlich wie in *Lewis et al.* [1994] durch die Simulation (zwischen 1395 und 1305  $\text{cm}^{-1}$ ) und anschließende Subtraktion der bei 1220-1250  $\text{cm}^{-1}$  angeregten antisymmetrischen  $\text{PO}_2$ -Streckschwingung [z. B. Blume, 1996], auf deren Ausläufer sich die  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungsbanden befinden. Diese Anpassung wurde mittels einer manuell variierbaren polynomischen Basislinie des Auswerteprogramms Win-IR der Firma BIO-RAD durchgeführt und erwies sich im Falle der untersuchten PC/PE-Systeme trotz eines gewissen subjektiven Einflusses als sehr konsistent, da die Spielräume bei der Bandensimulation doch recht begrenzt sind und die Schwankungen ausnahmslos im Rahmen der Fehlertoleranz liegen.

Nach dem Abzug der Phosphatbande wurde der Spektralbereich zwischen 1395 und 1330  $\text{cm}^{-1}$  ausgeschnitten und mit Hilfe einer linearen Basislinie auf null normiert. Die weitere Behandlung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit dem Programm IRFIT [Ziegler und Blume, 1994]. Zuerst wurde hiermit eine spline-Interpolation auf 512 Punkte zusammen mit einer *Savitsky-Golay*-Glättung (9 Punkte) durchgeführt [vgl. Press et al., 1986] und danach die Banden bei 1378, 1368, 1356 und 1342  $\text{cm}^{-1}$  mit *Gauß-Lorentz*-Funktionen unterschiedlicher Zusammensetzung nach dem Kriterium des kleinsten Fehlerquadrates simuliert [Ziegler, 1994]. Der Lage der Bandenmaxima wurde dabei ebenfalls ein Spielraum von  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$  zugestanden. Die so erhaltenen integralen Intensitäten der einzelnen Schwingungsbanden wurden auf die der jeweiligen „Regenschirmschwingung“ normiert und wie bereits beschrieben mit den entsprechenden Konversionsfaktoren multipliziert.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse dieser Prozedur für die reinen PC- bzw. PE-Komponenten:



**Abbildung 88:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für reine undeuterierte PCs.

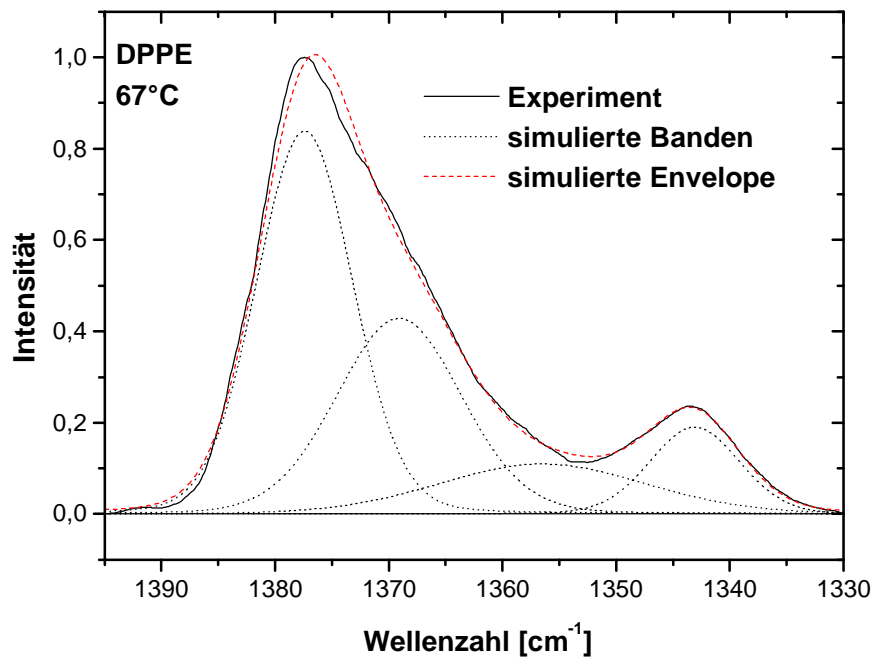
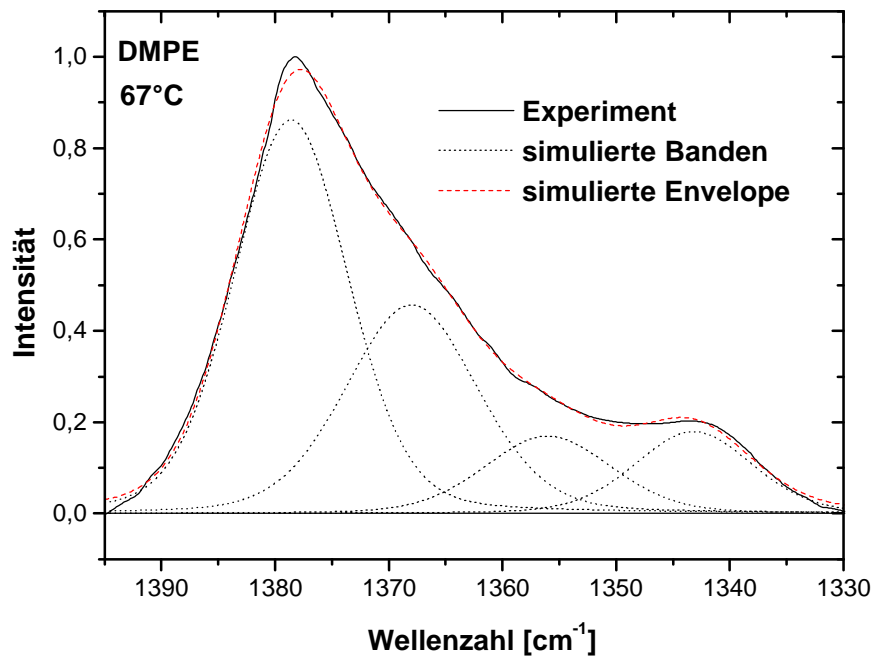
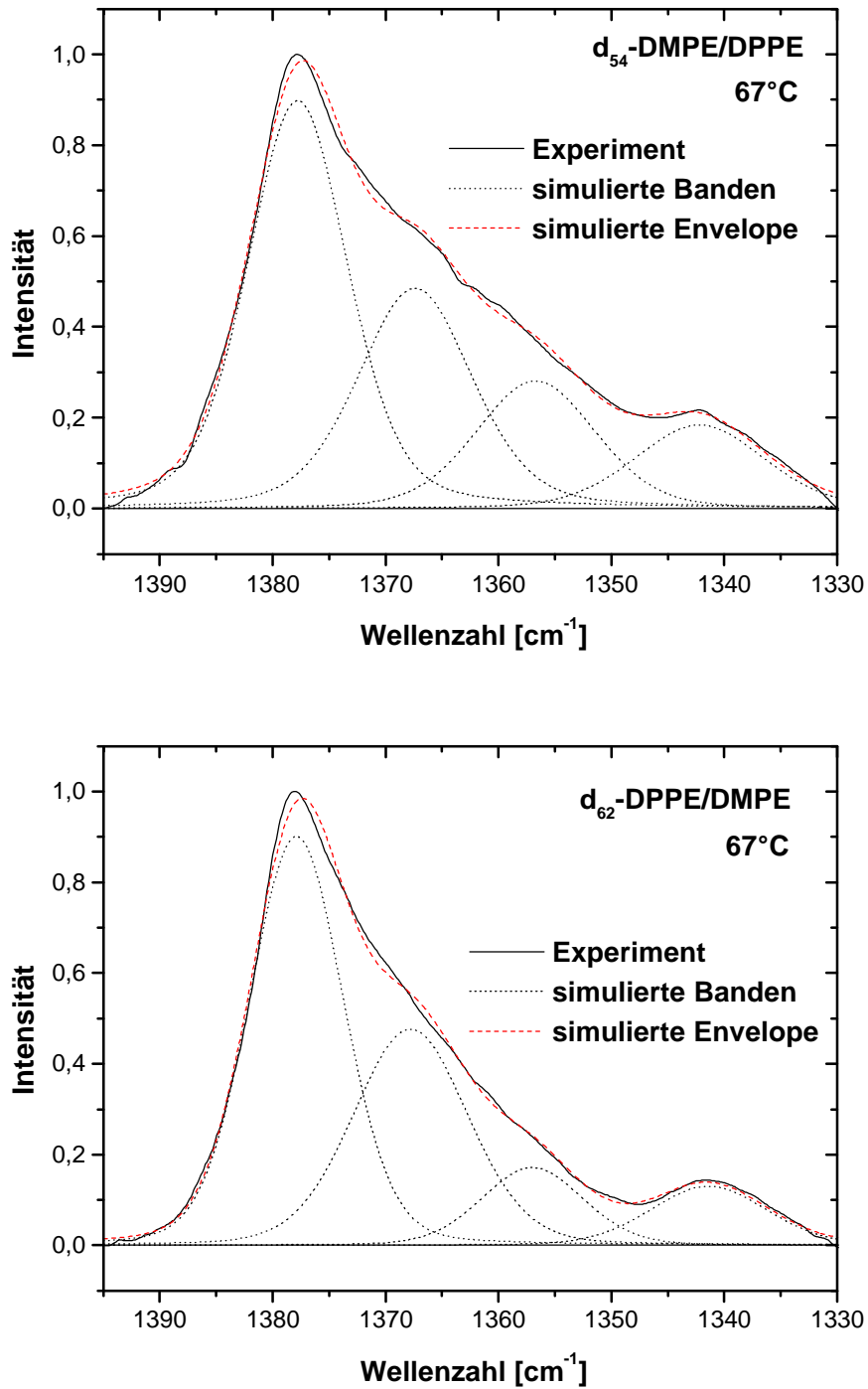


Abbildung 89: Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungsbanden für reine undeutierte PEs.

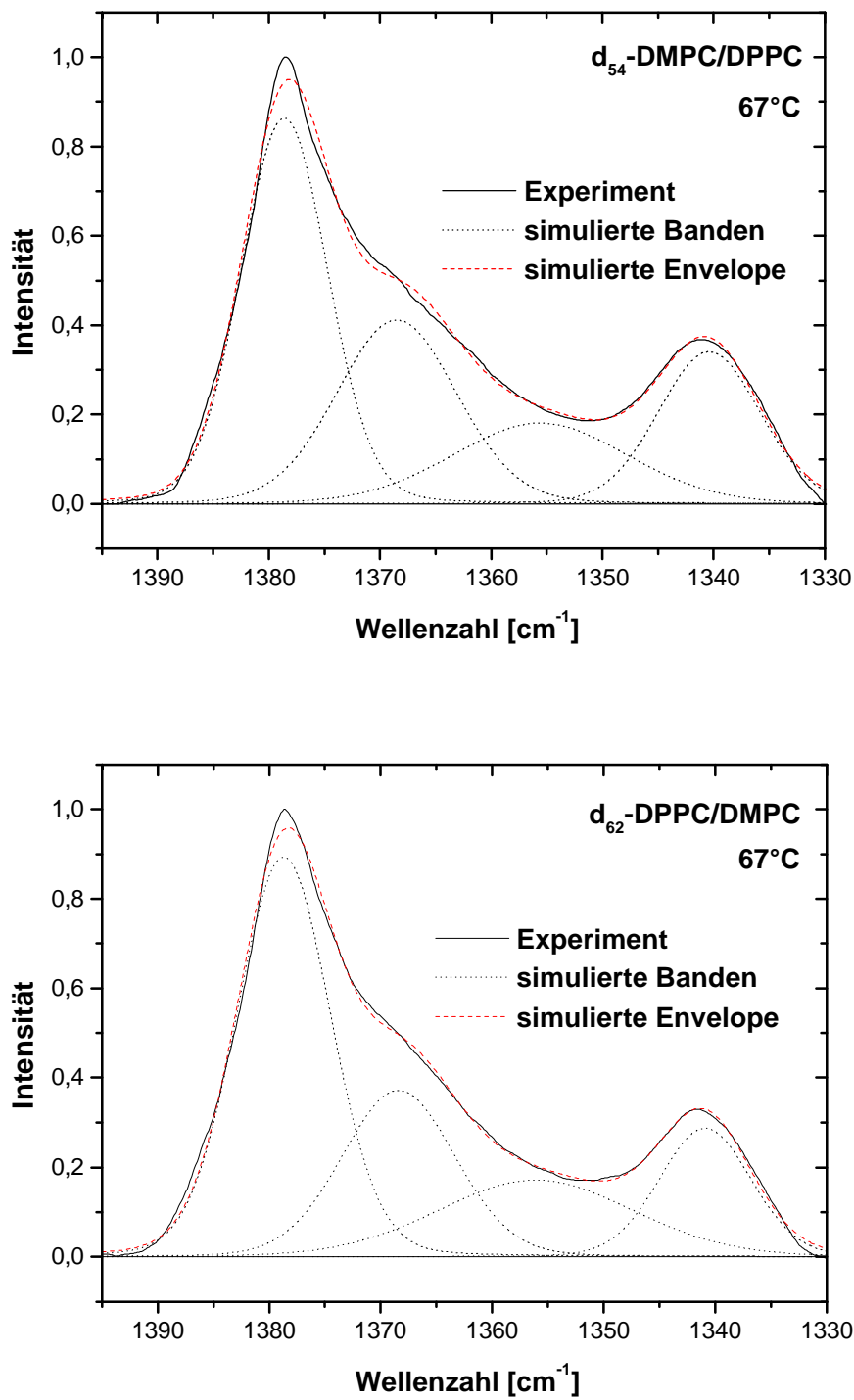
Aus der grobqualitativen Betrachtung der abgebildeten Spektren kann man bereits ohne die Analyse von Zahlenwerten einige Informationen herauslesen. Zunächst einmal zeigt der Vergleich mit den in der Literatur abgebildeten Kippschwingungsbanden von DPPC eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten aus Abb. 88 [Lewis et al., 1994; Blume, 1996], während jedoch für DPPE ein deutlicher Intensitätsunterschied zu *Tuchtenhagen et al.* [1994] bei niedrigen Wellenzahlen erkennbar ist. Diese Diskrepanz kommt dadurch zustande, daß in der vorliegenden Arbeit zuerst noch der Ausläufer der Phosphatbande wegsubtrahiert wird, wogegen in der erwähnten Literaturstelle sofort eine lineare Basislinie zwischen 1395 und 1330  $\text{cm}^{-1}$  gelegt wird und damit den Banden bei 1356 bzw. 1342  $\text{cm}^{-1}$  eigentlich im Verhältnis zu den anderen Signalen Intensität verlorengelassen, wodurch möglicherweise das Ergebnis verfälscht wird.

Aus Abb. 88 bzw. 89 läßt sich zudem klar erkennen, daß die Anzahl der detektierbaren gauche-Konformeren in den PEs wie erwartet deutlich geringer ausfällt als bei den analogen PCs, wobei dieser Abfall hauptsächlich auf einem signifikanten Rückgang der doppelgauche- bzw. endgauche-Konformerenzahl beruht, während der gtg-Anteil annähernd konstant bleibt. Diese Beobachtung deckt sich exakt mit den IR-Untersuchungen von *Mendelsohn und Senak* [1993] an DPPC und DPPE und kann hier auch für die C<sub>14</sub>-Komponenten bestätigt werden.

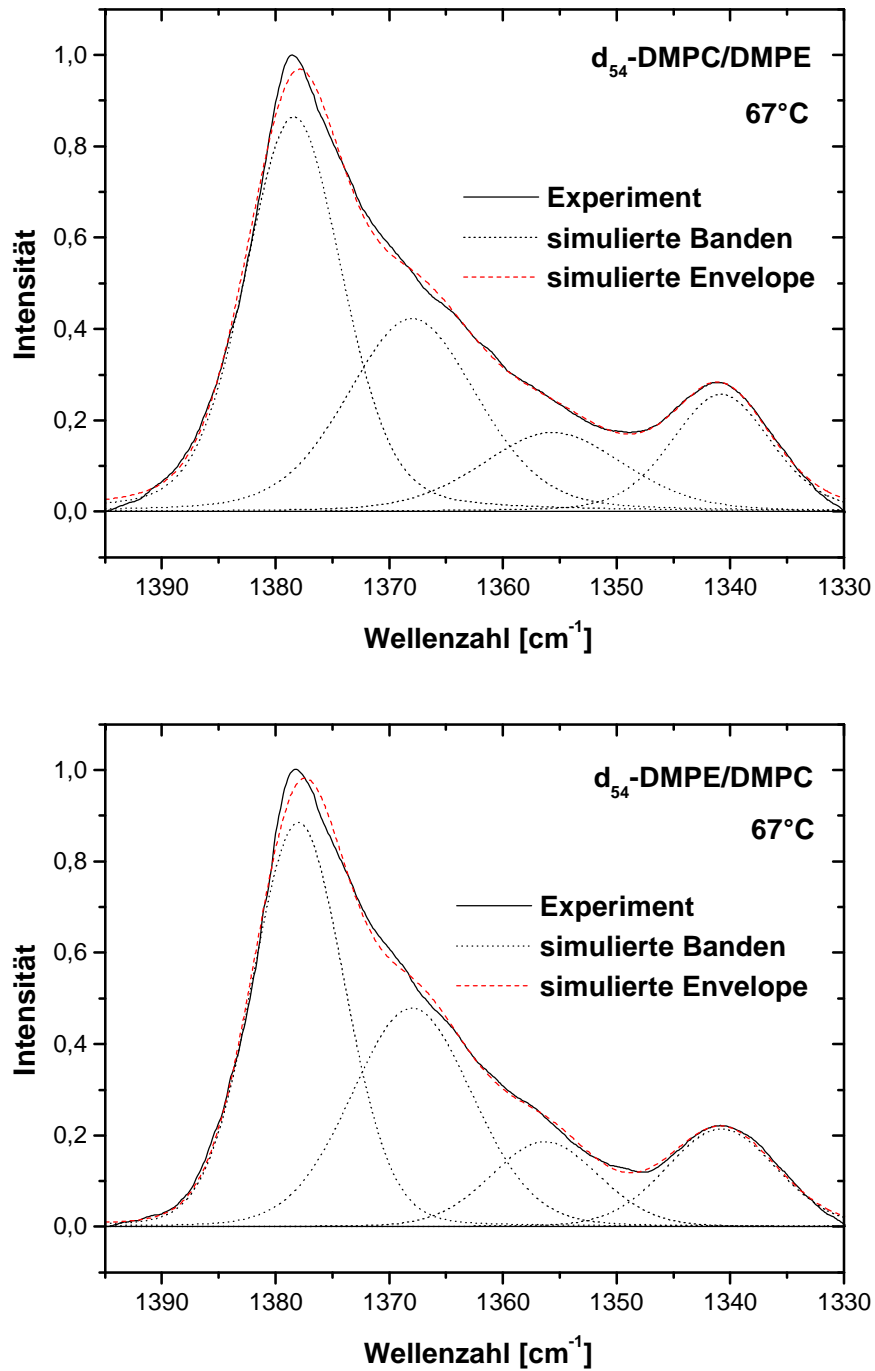
Die CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden der äquimolaren PC/PE-Gemische sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:



**Abbildung 90:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPE/DPPE-Gemische.

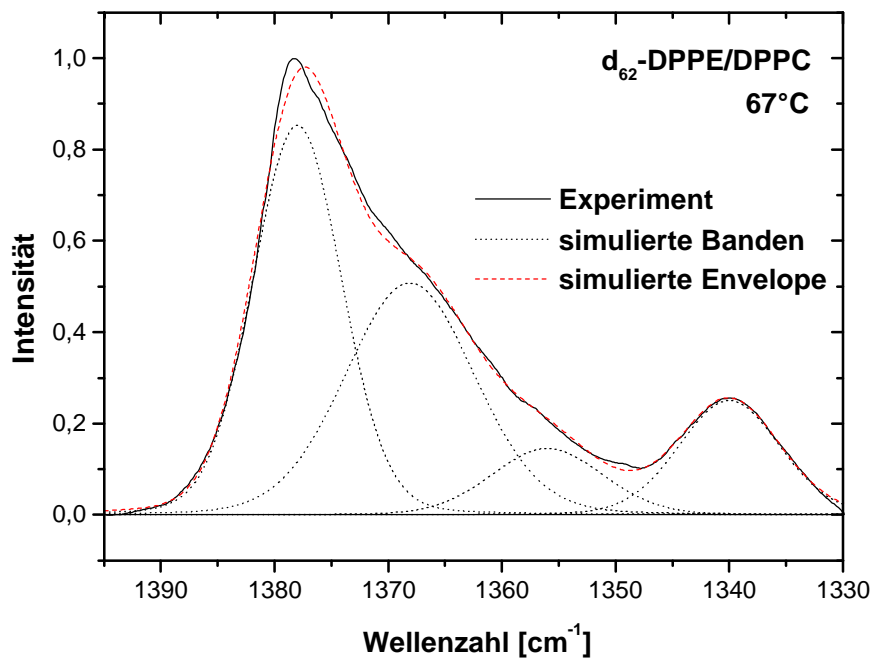
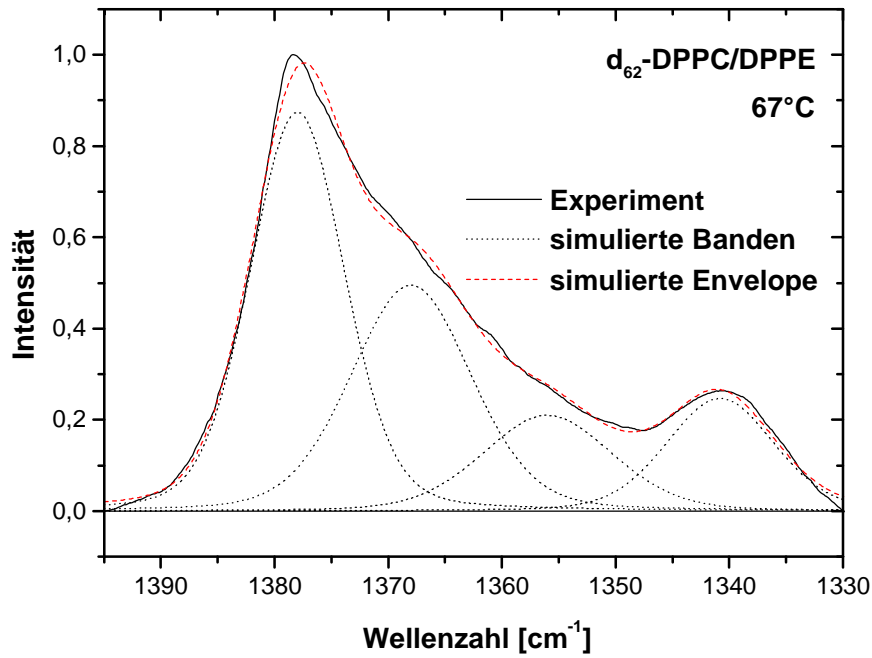


**Abbildung 91:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPC/DPPC-Gemische.

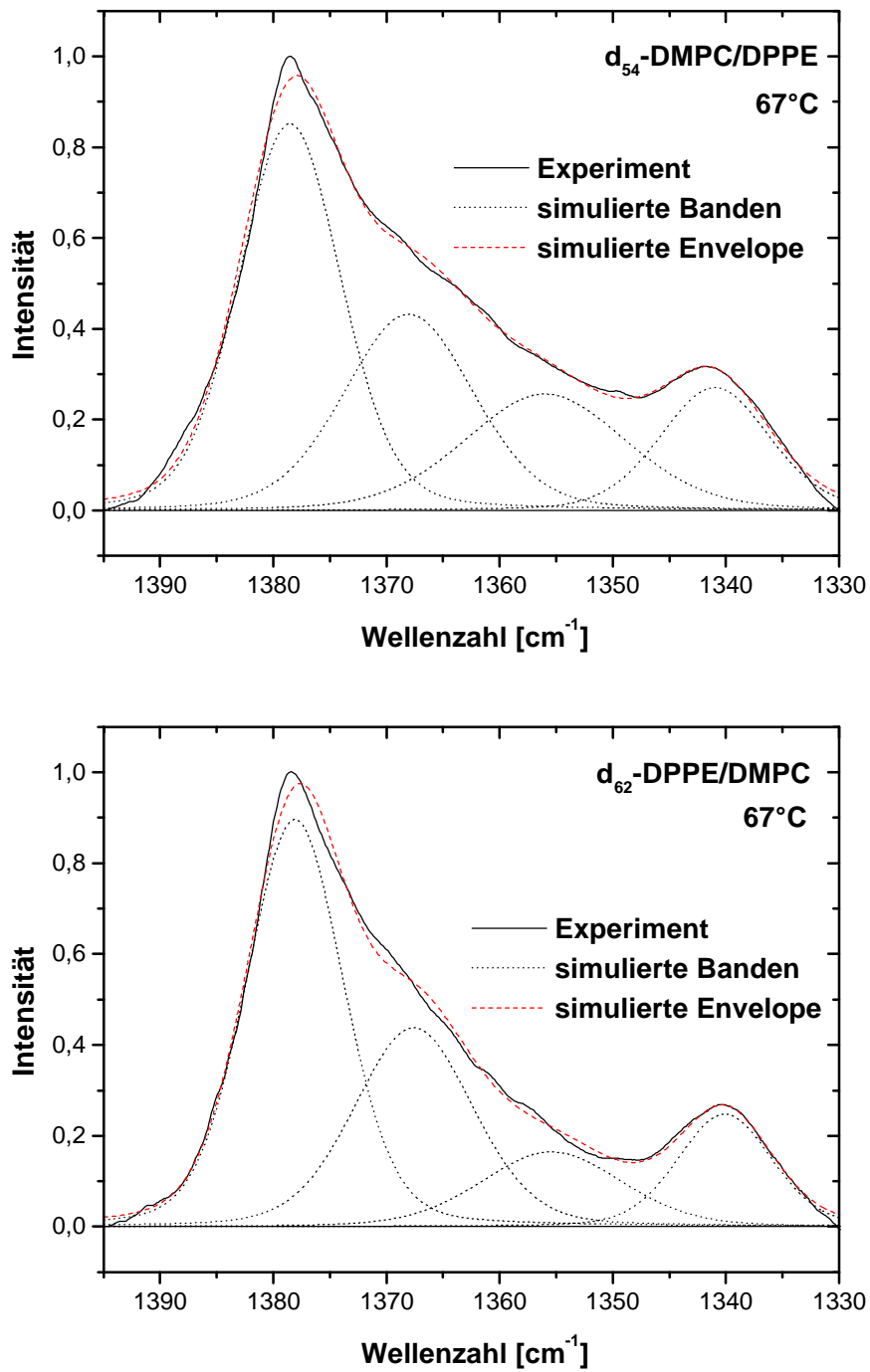


**Abbildung 92:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPC/DMPE-Gemische.

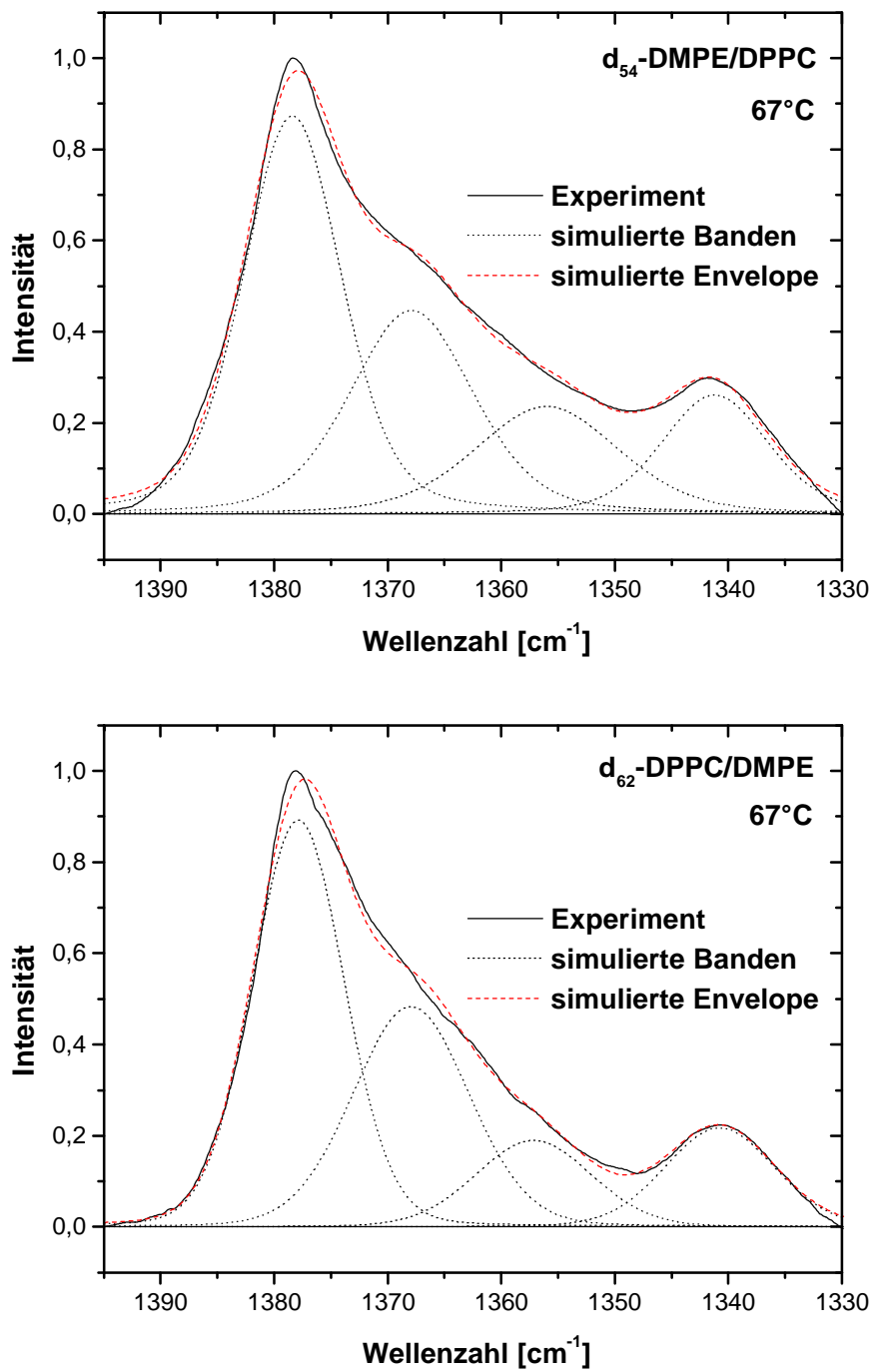




**Abbildung 93:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungsbanden für äquimolare DPPC/DPPE-Gemische.



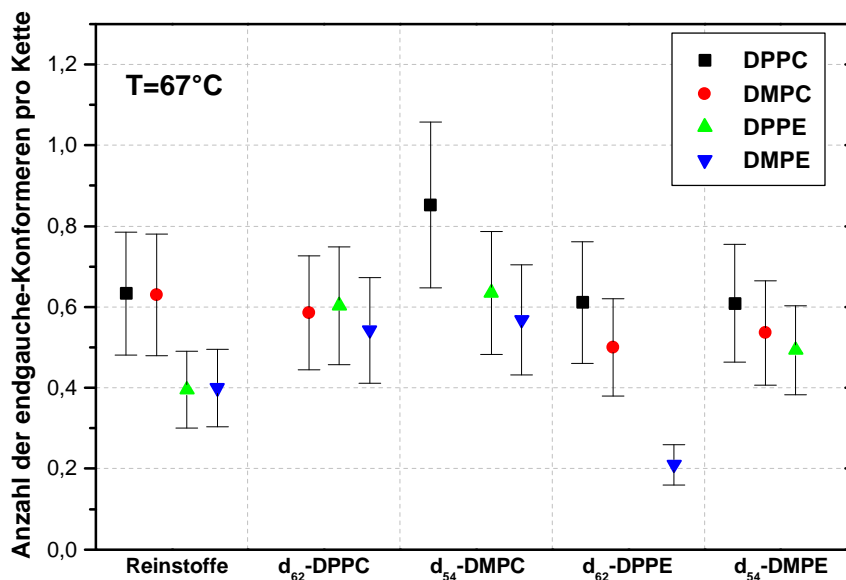
**Abbildung 94:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPC/DPPE-Gemische.



**Abbildung 95:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DPPC/DMPE-Gemische.

Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren besser zu verdeutlichen, sind in den folgenden Diagrammen die jeweils mit Hilfe von Tab. 8 errechneten Konformerenzahlen pro Acylkette dargestellt. Da die hierfür angesetzten relativen Fehler direkt aus Ziegler [1994] übernommen wurden und wegen der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten hochreinen perdeuterierten Fettsäuren eher etwas pessimistisch ausfallen, ist es aber dennoch hilfreich, bei dem Vergleich der Datenpunkte zusätzlich die Kurvenformen aus Abb. 88-95 zu betrachten, damit eine Interpretation der Werte trotz der großen Fehlerbalken sinnvoll erscheint.

Abb. 96 faßt die errechnete mittlere Anzahl an endgauche-Konformeren (24% relativer Fehler) zusammen:



**Abbildung 96:** Mit Hilfe von Tab. 8 errechnete mittlere Anzahl an endgauche-Konformeren pro Acylkette für äquimolare PC/PE-Gemische und die entsprechenden Reinstoffe.

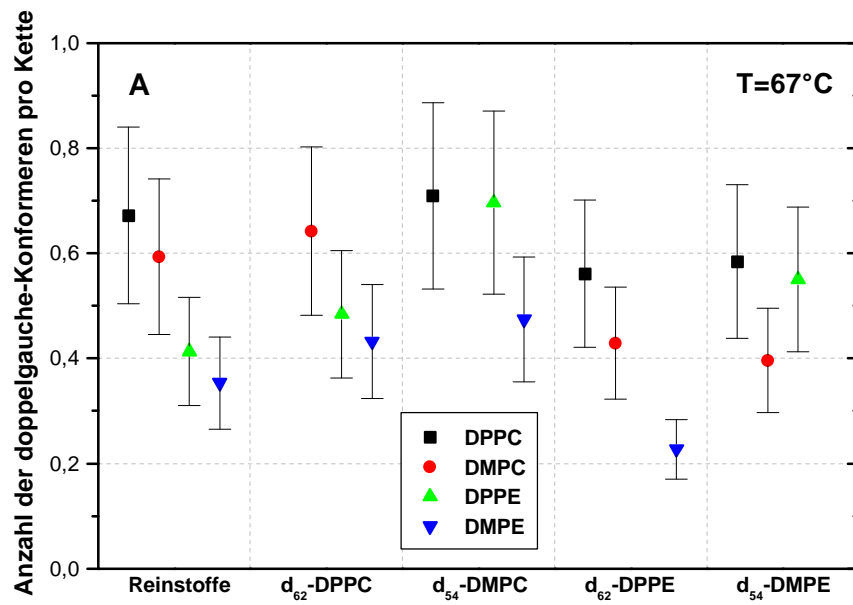
Wie man bereits aus den Abbildungen 88 und 89 ersehen konnte, ist die mittlere Anzahl an endgauche-Konformeren  $n_{eg}$  für DMPX und DPPX so gut wie identisch, während jedoch zwischen PC und PE ein signifikanter Unterschied erkennbar ist. Dieses Ergebnis stimmt exakt mit dem von *Tuchtenhagen et al.* [1994] bei 69° C überein, wobei dort die Absolutwerte aufgrund der anders ermittelten Basislinie um einen konstanten Betrag von etwa 0.2 tiefer liegen.

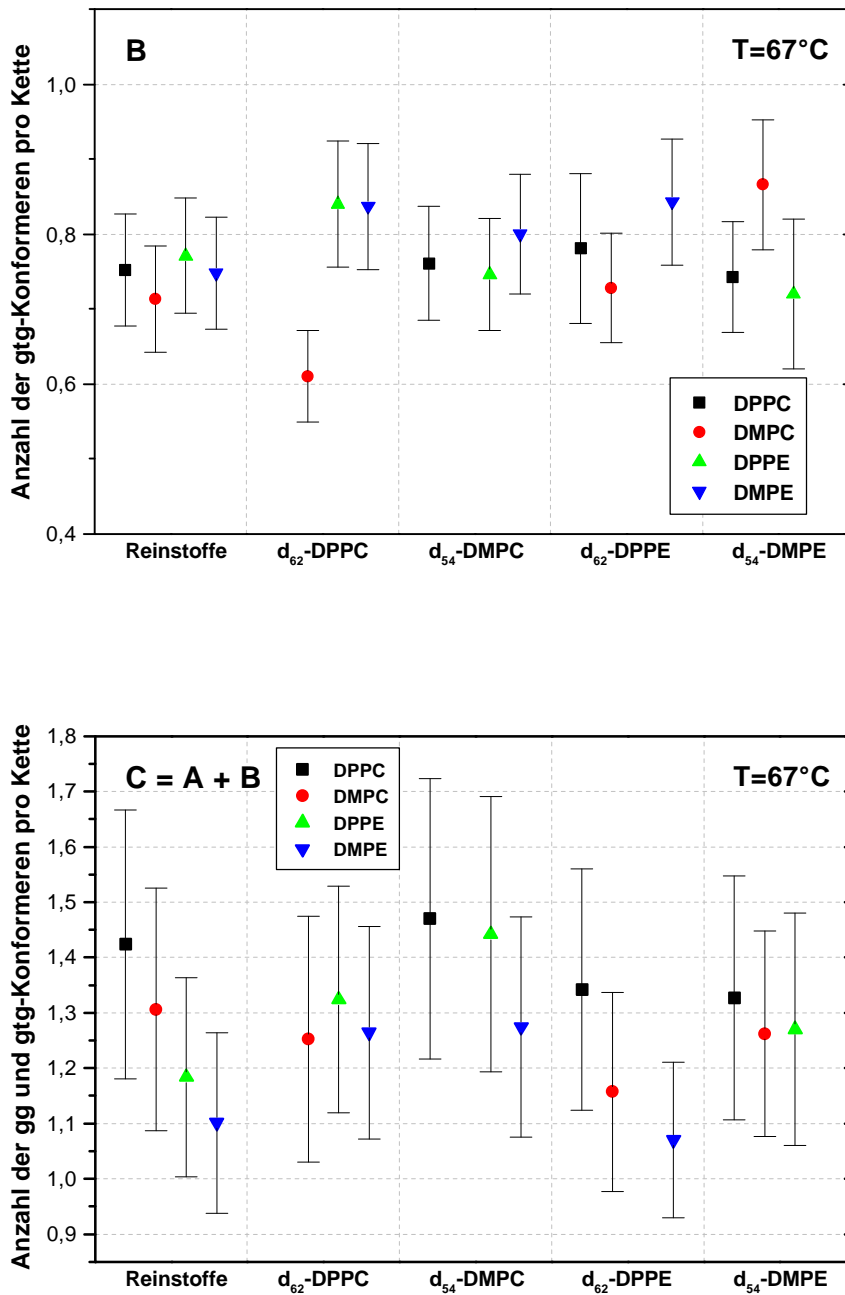
Bei der Betrachtung der binären Systeme fällt zuerst auf, daß  $n_{eg}$  für die PE-Komponenten (blaue und grüne Symbole) in jeder Mischung stets niedriger als bei den analogen PC-Molekülen (rote und schwarze Symbole) mit demselben perdeutierten Gegenstück liegt, wobei erstere bei Mischungen mit  $d_x$ -PC jedoch stets größer sind als bei reinem PE. Damit weisen die  $CH_2$ -Kippschwingungsbanden in die gleiche Richtung wie die zuvor untersuchten Quadrupolaufspaltungen der terminalen  $CD_3$ -Gruppen: Der Einfluß der PC-Kopfgruppe führt also selbst am Kettenende der benachbarten PE-Moleküle zu einer deutlichen Erhöhung der Bewegungsfreiheit. Auch der umgekehrte Schluß – eine Erniedrigung der Bewegungsfreiheit für PC bei Mischung mit PE – ist in Abb. 96 für DMPC ebenfalls deutlich und für DPPC ansatzweise zu erkennen. Besonders auffällig ist im Falle der gleichköpfigen Gemische die signifikante Zunahme der endgauche-Konformeren bei DPPC, während die entsprechende Abnahme bei DMPC zwar rechnerisch wesentlich geringer ausfällt, aber dennoch aus Abb. 91 nachzuvollziehen ist. Da das analoge Phänomen bei den DMPE/DPPE-Gemischen ebenfalls klar erkennbar ist, unterstützen die Daten für die Kippschwingungsbanden die NMR-Ergebnisse auch dahingehend, daß offensichtlich bei der untersuchten Temperatur keine Verzahnung aufgrund der vorhandenen Kettenlängendifferenzen auftritt (vgl. Seite 196). Dieses Ergebnis steht bezüglich des PC-Systems im Widerspruch zu *Ziegler* [1994], so daß speziell für  $d_{54}$ -DMPC/DPPC mehrere Untersuchungen durchgeführt wurden, welche jedoch alle die deutliche Erhöhung von  $n_{eg}$  im Verhältnis zur reinen Komponente bestätigten.

Bei den gleichkettigen PC/PE-Systemen scheint die mittlere Zahl an endgauche-Konformeren für beide Komponenten eines Gemisches jeweils gleich zu sein und befindet sich außerdem zwischen den Werten der Reinkomponenten, was in Übereinstimmung mit den NMR- und DSC-Daten auf eine sehr gute gegenseitige Mischbarkeit der unterschiedlichen Moleküle hindeutet.

Der Vergleich der Ergebnisse für DMPC/DPPE und DPPC/DMPE mit den bereits vorhandenen Informationen ist ebenfalls recht interessant: DMPC zeigt ein deutlich stärkeres Absinken von  $n_{eg}$  als in Verbindung mit DPPC, wogegen im Falle von DPPE eine wesentlich größere Zunahme als im Gemisch mit DMPE zu verzeichnen ist. Die Addition von Kopfgruppen- und Kettenlängeneffekten ist also in Analogie zu den NMR-Daten (Seite 198) auch durch die Betrachtung der in Abb. 94 dargestellten  $CH_2$ -Kippschwingungsbanden zu erkennen. Bei DPPC/DMPE hingegen deuten die Quadrupolaufspaltungen aus Abb. 85 darauf hin, daß sich diese Effekte kompensieren und letztendlich für die  $CD_3$ -Gruppe von DPPC sogar zu einer leichten Erhöhung der Ordnung führen, während DMPE gleichzeitig geringfügig an Beweglichkeit gewinnt. Auch diese Beobachtung scheint sich durch die Kippschwingungsbanden zu bestätigen (Abb. 95). Eindeutig erkennbar ist zudem die Tatsache, daß  $n_{eg}$  für DPPC trotz der kürzerkettigen Nachbarn nicht signifikant über den entsprechenden Wert des Reinstoffes ansteigt sondern eher darunter liegt, wie sich auch durch rein anschauliche Betrachtung der Originalspektren (Abb. 88 bzw. 95) feststellen läßt.

Die Ergebnisse für die  $gtg$ - und  $gg$ -Konformerenzahlen der untersuchten PC/PE-Gemische sind in Abb. 97 zusammengefaßt. Bei der Bestimmung der Absolutwerte tritt hier allerdings das Problem auf, daß sich die Intensitäten der simulierten Banden sehr stark gegenseitig beeinflussen und die erhaltenen Ergebnisse für  $n_{gg}$  und  $n_{gtg}$  daher mit einer größeren Ungenauigkeit behaftet sind, als dies für  $n_{eg}$  der Fall ist. Aus diesem Grunde ist in der folgenden Abbildung (Diagramm C) noch die Summe ( $n_{gg} + n_{gtg}$ ) getrennt dargestellt, um diese gegenseitige Einflußnahme bei der Interpretation berücksichtigen zu können.





**Abbildung 97:** Mit Hilfe von Tab. 8 errechnete mittlere Anzahl an doppelgauche- bzw. gtg-Konformeren pro Acylkette für äquimolare PC/PE-Gemische und die entsprechenden Reinstoffe; die angesetzten relativen Fehler betragen 25% für A und 10% für B [Ziegler, 1994].



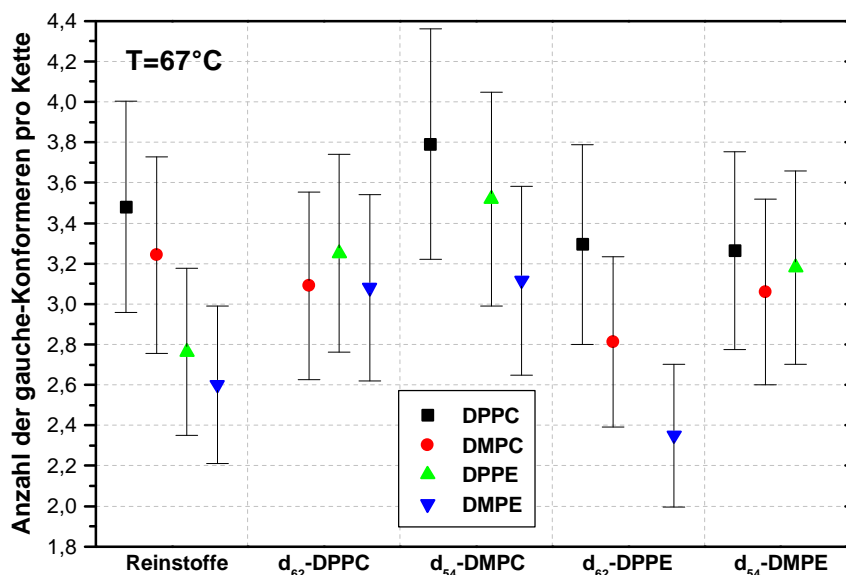
Wie obige Abbildung erkennen läßt, treten doppelgauche-Sequenzen trotz ihrer unvorteilhaften sterischen Eigenschaften in allen untersuchten Lipidsystemen in signifikanter Anzahl auf, was auch durch Molekulardynamik-Simulationen an PCs bestätigt wird [Stouch, 1993]. Bei den Reinstoffen in Abb. 97A zeigt sich zudem noch einmal deutlich der geringere  $n_{gg}$ -Wert der untersuchten PEs im Vergleich zu PC. *Mendelsohn und Senak* [1993] finden für DPPC (80° C) etwa 0.6 und für DPPE (65° C) etwa 0.2 doppelgauche-Konformere pro Acylkette, während *Tuchtenhagen et al.* [1994] für DPPE bzw. DMPE bei 69° C auf eine Zahl von etwa 0.3 bzw. 0.2 doppelgauche-Konformeren pro Acylkette kommen. In der vorliegenden Arbeit liegen die PE-Werte etwas höher, was mit der bereits erwähnten anders durchgeführten Basislinienkorrektur der Rohspektren zusammenhängt. Trotzdem ist jedoch klar erkennbar, daß der Einfluß der Kettenlänge sowohl bei  $n_{gg}$  als auch bei  $n_{eg}$  eine deutlich geringere Rolle als der der Kopfgruppe spielt. Die Betrachtung der binären PC/PE-Systeme liefert zudem klare Hinweise dafür, daß die PE-Moleküle auch in den Gemischen eine geringere Beweglichkeit beibehalten, denn  $n_{gg}$  liegt bei allen untersuchten Systemen stets unterhalb der entsprechenden Beträge der gleichlangen PC-Moleküle. Bei den  $gtg$ -Sequenzen hingegen (Abb. 97B) ist keine derartige Tendenz mehr bei den Reinsubstanzen bzw. den Gemischen festzustellen (wobei man bei ersteren mit gutem Willen noch eine gewisse Kettenlängenabhängigkeit feststellen kann [vgl. Mantsch und McElhaney, 1991]). Offensichtlich ist die durch die PE-Kopfgruppe induzierte höhere Kettenordnung also hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß die Bildung der energetisch sehr aufwendigen doppelgauche-Konformeren [Snyder, 1967] vermindert wird. Anschaulich betrachtet erscheint dies auch recht plausibel, denn durch den geringeren Raumbedarf der Kopfgruppe und der damit verbundenen dichteren Packung der Moleküle besitzen auch die einzelnen Kettensegmente einen geringeren lateralen Spielraum, so daß die sterisch anspruchsvolle Bildung von  $gg$ -Sequenzen sicher erschwert wird. Für die PC-Moleküle in den Gemischen würde dies – gute Mischbarkeit vorausgesetzt – dann dazu führen, daß sie durch die vielen PE-Nachbarn ebenfalls weniger Bewegungsfreiheit besitzen und somit im Vergleich zu den Reinsubstanzen geringere  $n_{gg}$ -Werte aufweisen sollten. Ein Blick auf Abb. 97A bestätigt auch tatsächlich diese Überlegung und liefert damit ergänzend zu den NMR-Daten eine mögliche Erklärung für die Art und Weise, wie die erhöhte Kettenordnung zustande kommt.

Außerdem läßt sich anhand der Kippschwingungsbanden feststellen, daß gtg-Sequenzen in allen untersuchten Systemen eindeutig am häufigsten anzutreffen sind und daher zusammen mit den IR-inaktiven  $g^+tg^-$ -Konformeren vermutlich auch die bevorzugt auftretenden Abweichungen der Acylketten von der all-trans-Konformation darstellen [Mendelsohn und Senak, 1993], da die ebenfalls nicht erkennbaren einzelnen gauche-Bindungen aufgrund des hiermit verbundenen sterischen Aufwandes eher selten sein sollten [Casal und McElhaney, 1990].

Die Gesamtzahl der detektierbaren gauche-Konformeren pro Kette  $n_{\text{gauche}}$  ergibt sich durch einfache Überlegungen zu

$$n_{\text{gauche}} = 2 \cdot n_{\text{gtg}} + 2 \cdot n_{\text{gg}} + n_{\text{eg}} \quad (87)$$

und ist für die untersuchten PC/PE-Systeme in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:



**Abbildung 98:** Mit Hilfe von Gleichung (87) errechnete mittlere beobachtete Anzahl an gauche-Konformeren pro Acylkette für äquimolare PC/PE-Gemische und die entsprechenden Reinstoffe; die angesetzten relativen Fehler betragen 15% [Ziegler, 1994].

Für die abgebildeten Reinkomponenten finden sich in der Literatur zahlreiche Vergleichsdaten, welche jedoch je nach Auswertetechnik um einiges voneinander differieren. So schwanken die Beobachtungen im Falle von DPPC zwischen ca. 2.4 [Tuchtenhagen et al., 1994] und ca. 4.2 [Lewis et al., 1994], während der selbstermittelte Wert von etwa 3.5 am ehesten mit den Untersuchungen von *Casal und McElhaney* [1990] übereinstimmt (ca. 3.7). Dieses Beispiel zeigt noch einmal deutlich, daß die errechneten Absolutwerte mit einiger Skepsis betrachtet werden müssen und es daher aussagekräftiger ist, sich mit den relativen Änderungen zu beschäftigen. Zudem beinhalten die soeben erwähnten Ergebnisse für  $n_{\text{gauche}}$  nicht die doch erheblichen Beiträge von gtttg- oder einzeln auftretenden gauche-Konformationen, wodurch sie für eine realistische Abschätzung ohnehin deutlich (um etwa 1.4) nach oben korrigiert werden müßten [Tuchtenhagen et al., 1994]. So wurden etwa für DPPC in der flüssig-kristallinen Phase aufgrund von  $^2\text{H}$ -NMR-Daten zwischen vier und fünf gauche-Konformere pro Acylkette gefunden [Seelig und Seelig, 1980], was mit dem Wert aus Abb. 98 allerdings recht gut im Einklang steht ( $3.5 + 1.4 = 4.9$ ).

Betrachtet man die gauche-Konformerenzahlen in Abb. 98 relativ zueinander, so findet man eine deutliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen der NMR-Messungen: Bei den Reinsubstanzen ist sowohl ein Kopfgruppen- als auch ein Kettenlängeneffekt erkennbar (wobei ersterer dominiert), und in den gleichkettigen Lipidgemischen zeigen beide Komponenten in etwa die gleiche Anzahl an gauche-Bindungen, was wiederum für die gute Mischbarkeit der einzelnen Komponenten spricht. In den Gemischen der gleichköpfigen Moleküle ist außerdem ein Anstieg der Ordnung im kürzerkettigen Lipid erkennbar, während gleichzeitig die  $\text{C}_{16}$ -Verbindungen an Beweglichkeit gewinnen. Das System DMPC/DPPE liefert ebenfalls wie bei den NMR-Messungen einen verstärkten Effekt im Vergleich zu DMPC/DPPC, wogegen im Falle von DPPC/DMPE für DPPC wie erwartet kein Anstieg sondern ein Absinken von  $n_{\text{gauche}}$  festzustellen ist.

All diese Beobachtungen dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß neben der Festlegung der Basislinie auch die Simulation der Schwingungsbanden mit einigen Ungenauigkeiten behaftet ist, so daß die in Abb. 98 angegebenen Fehlerbalken durchaus ihre Berechtigung haben. Zwar lassen sich die oben gemachten Aussagen durch die einfache visuelle Betrachtung der Originalspektren (Abb. 88 bis 95) nachvollziehen, aber dennoch

tritt bei der mathematischen Simulation der einzelnen Kippschwingungen eine deutliche gegenseitige Beeinflussung benachbarter Banden auf, welche dann auch zu entsprechenden Intensitätsverschiebungen führt. Um das Ausmaß dieser wechselseitigen Abhängigkeit abschätzen zu können, wurde am Beispiel von DPPC (bei 51° C) mit Hilfe des Programms Scientist 2.01 der Firma MicroMath eine genauere statistische Analyse der insgesamt 16 auftretenden Variablen durchgeführt. Jede der vier Banden (bei 1378, 1368, 1356 und 1342 cm<sup>-1</sup>) besitzt dabei je vier davon, welche im folgenden mit L (Bandenlage), H (Höhe der Bande), B (Halbwertsbreite) und G (Gauß-Anteil) abgekürzt werden.

Für die bei der Simulation mit IRFIT gefundenen Werte ergeben sich hiernach folgende Standardabweichungen:

$$\begin{array}{llll}
 L_{1378} = 1378 \pm 0.32 & L_{1368} = 1368 \pm 0.37 & L_{1356} = 1356 \pm 3.37 & L_{1342} = 1341 \pm 0.52 \\
 H_{1378} = 0.081 \pm 0.004 & H_{1368} = 0.032 \pm 0.021 & H_{1356} = 0.024 \pm 0.006 & H_{1342} = 0.02 \pm 0.010 \\
 B_{1378} = 11.8 \pm 0.48 & B_{1368} = 10.7 \pm 2.97 & B_{1356} = 19.5 \pm 13.00 & B_{1342} = 10.08 \pm 1.63 \\
 G_{1378} = 0.95 \pm 0.08 & G_{1368} = 0.95 \pm 0.47 & G_{1356} = 0.95 \pm 0.60 & G_{1342} = 0.95 \pm 0.42
 \end{array}$$

Man erkennt leicht, daß sich die beiden äußeren Banden bei 1378 bzw. 1342 cm<sup>-1</sup> recht gut bestimmen lassen, während es bei den mittleren zu sehr deutlichen Schwankungen kommen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde diese theoretische Variationsbreite allerdings noch dadurch eingeschränkt, daß scheinbar optimale Ergebnisse mit kleinem Fehlerquadrat aber unrealistischen (weil z. B. viel zu breiten) Bandenformen zugunsten „realistischerer“ Resultate verworfen wurden. Die Standardabweichungen für die Gaußanteile wurden ohne die Beschränkung von G auf den Bereich zwischen null und eins berechnet, so daß die ermittelten Werte etwas zu groß ausfallen.

Inwieweit die Änderung eines Parameters die anderen 15 beeinflusst, läßt sich anhand einer Korrelationsmatrix ermitteln, welche ebenfalls mit Hilfe von Scientist errechnet werden kann:

L <sub>1378</sub>	L <sub>1368</sub>	L <sub>1356</sub>	L <sub>1342</sub>	H <sub>1378</sub>	H <sub>1368</sub>	H <sub>1356</sub>	H <sub>1342</sub>	B <sub>1378</sub>	B <sub>1368</sub>	B <sub>1356</sub>	B <sub>1342</sub>	G <sub>1378</sub>	G <sub>1368</sub>	G <sub>1356</sub>	G <sub>1342</sub>
1															
0,52	1														
0,85	0,02	1													
0,60	-0,03	-0,78	1												
-0,61	-0,15	0,56	-0,03	1											
0,85	0,11	-0,97	0,87	-0,41	1										
-0,81	-0,07	0,96	-0,82	0,45	-0,98	1									
0,60	0,04	-0,77	0,95	0,05	0,88	-0,85	1								
-0,97	-0,53	0,79	-0,50	0,69	-0,77	0,73	-0,46	1							
0,89	0,12	-0,99	0,80	-0,54	0,99	-0,97	0,80	-0,82	1						
-0,72	-0,02	0,89	-0,95	0,15	-0,96	0,93	-0,97	0,60	-0,91	1					
0,54	0,04	-0,70	0,92	0,13	0,83	-0,80	0,98	-0,39	0,74	-0,94	1				
-0,10	-0,36	0,01	-0,41	-0,67	-0,20	0,14	-0,54	-0,00	-0,08	0,38	-0,59	1			
-0,69	0,03	0,85	-0,54	0,72	-0,81	0,89	-0,55	0,66	-0,85	0,68	-0,49	-0,25	1		
0,32	0,13	-0,42	0,70	0,35	0,59	-0,62	0,86	-0,15	0,49	-0,74	0,89	-0,74	-0,33	1	
-0,33	-0,12	0,42	-0,74	-0,34	-0,59	0,61	-0,85	0,17	-0,49	0,73	-0,84	0,70	0,30	-0,94	1

Die unterschiedliche Farbgebung dient dabei lediglich der besseren Orientierung, da die Beschriftung von Zeilen und Spalten identisch ist, aber aus Platzmangel hier nur einmal aufgeführt wird. Ein Korrelationskoeffizient von eins bedeutet eine absolute Korrelation, ein Wert von null entsprechend eine vollkommene Unabhängigkeit der betrachteten Größen. Das Vorzeichen gibt an, ob sich die korrelierten Daten gleich- oder entgegengerichtet ändern. Beispielsweise ergibt sich für die Höhe der Bande bei  $1356\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1356}$ ) mit  $H_{1368}$  einen Koeffizienten von  $-0,98$ , was bedeutet, daß das Ansteigen des einen Wertes eine deutliche Erniedrigung der anderen bewirkt. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Matrixelemente findet man in vielen Fällen eine ausgeprägte gegenseitige Beeinflussung der benachbarten Banden, wovon diejenigen mit zwei Nachbarn natürlich entsprechend stärker betroffen sind.

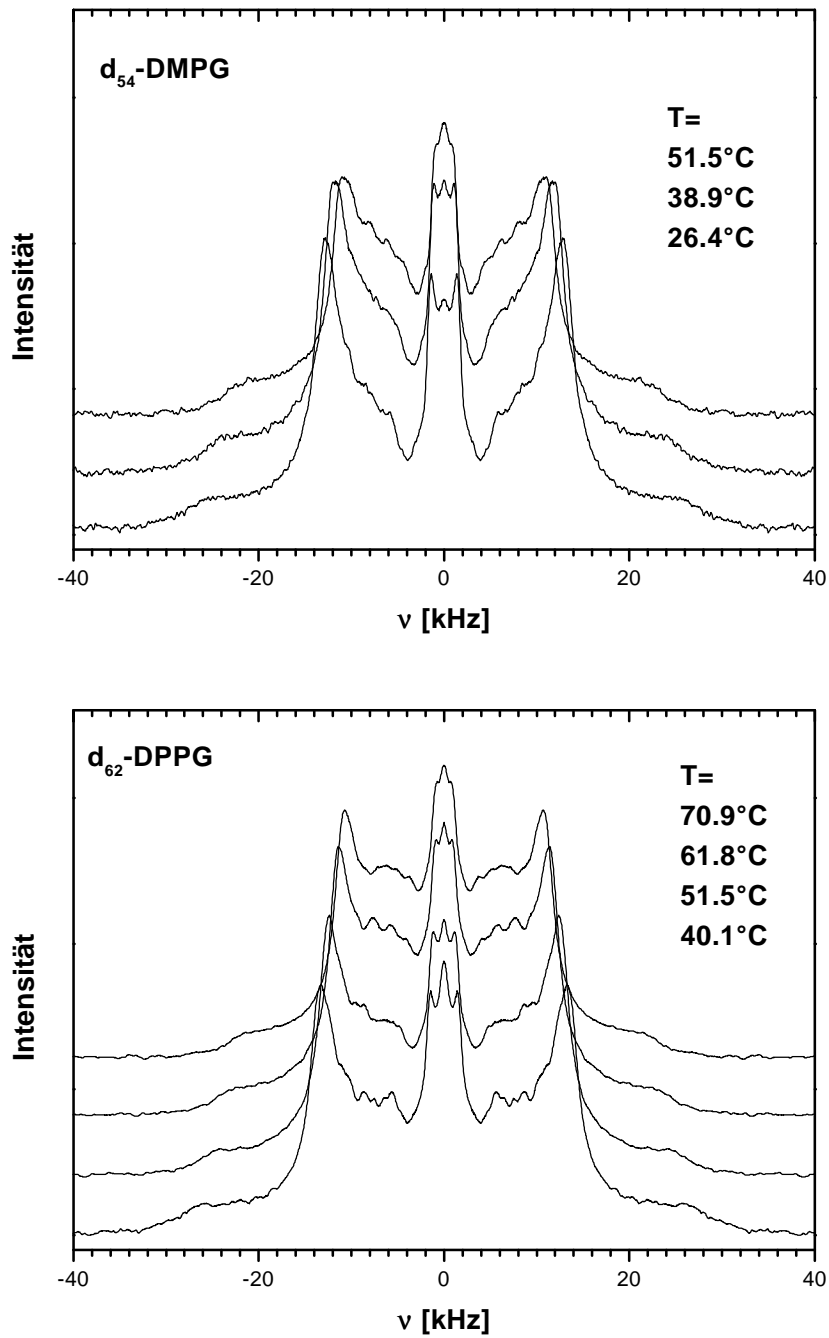
Insgesamt gesehen müssen die hier dargestellten IR-Daten mit etwas größerer Vorsicht als die vergleichsweise genauen NMR-Werte interpretiert werden, wengleich sich durch Fehlerquadratminimierung verbunden mit visueller Kontrolle sicher einige generelle Aussagen machen lassen.

### **5.2.3 Das PC/PG-System**

Im Gegensatz zu den DSC-Messungen konnte bei den NMR- bzw. IR-Proben auf die Zugabe von NaCl verzichtet werden, da die auftretende Ionenstärke durch die hohe Lipidkonzentration bereits weit über einem Wert von 0.1 mol/l lag. Auch von der genauen Einstellung des pH-Wertes der PC/PG-Systeme auf 7.0 wurde abgesehen. Der Grund hierfür bestand einerseits darin, daß dieses Vorhaben bei der vorliegenden Probenkonsistenz recht aufwendig ist und andererseits die pH-Werte der einzelnen Gemische stets etwa zwischen 6 und 6.4 lagen, wodurch ohnehin garantiert ist, daß die PGs eine Partialladung von -1 besitzen [Boggs, 1987].

#### *5.2.3.1 <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie*

Die gemessenen Quadrupolaufspaltungen der PC/PG-Gemische sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt, wobei die Daten für DMPC und DPPC bereits dargestellt wurden (Abb. 74) und hier daher unberücksichtigt bleiben:



**Abbildung 99:** *Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten reinen perdeuterten PGs bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*

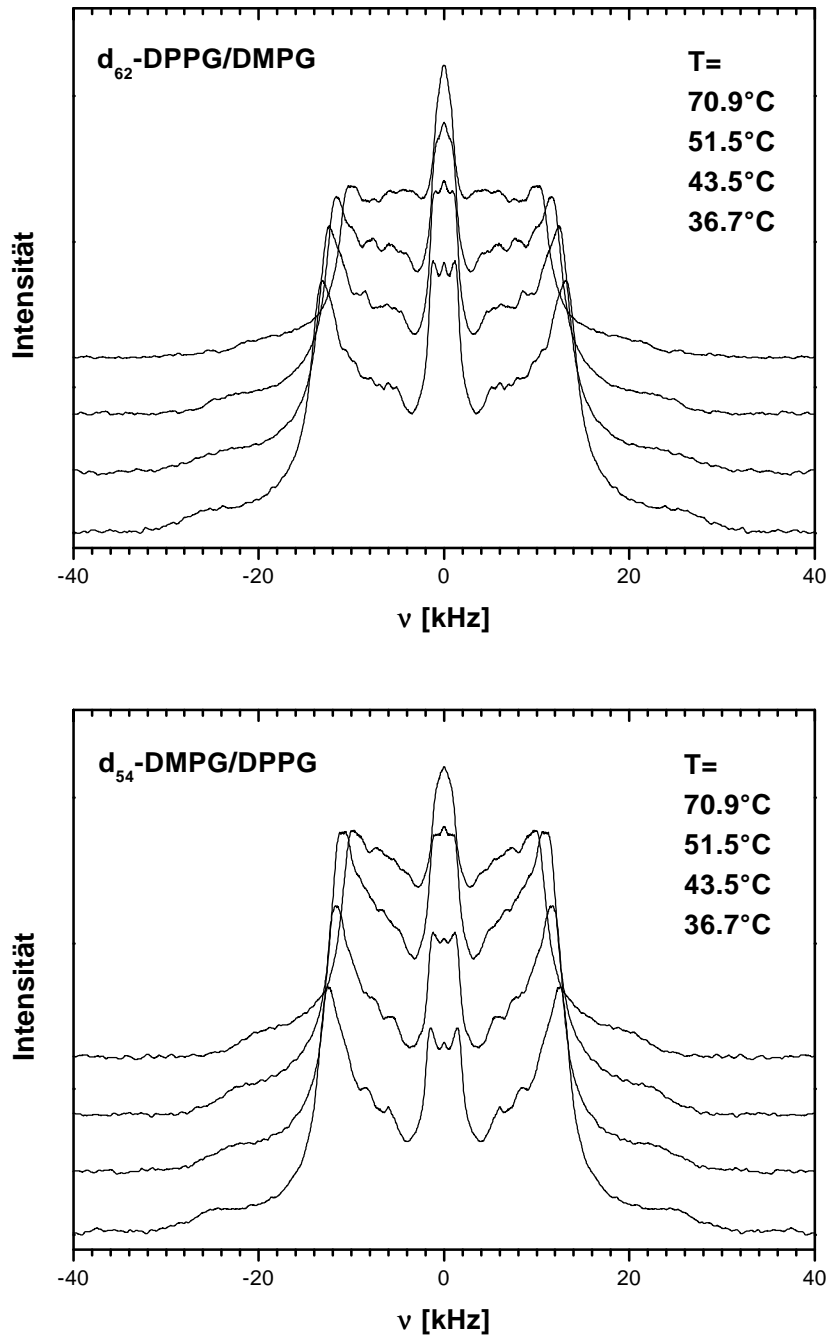
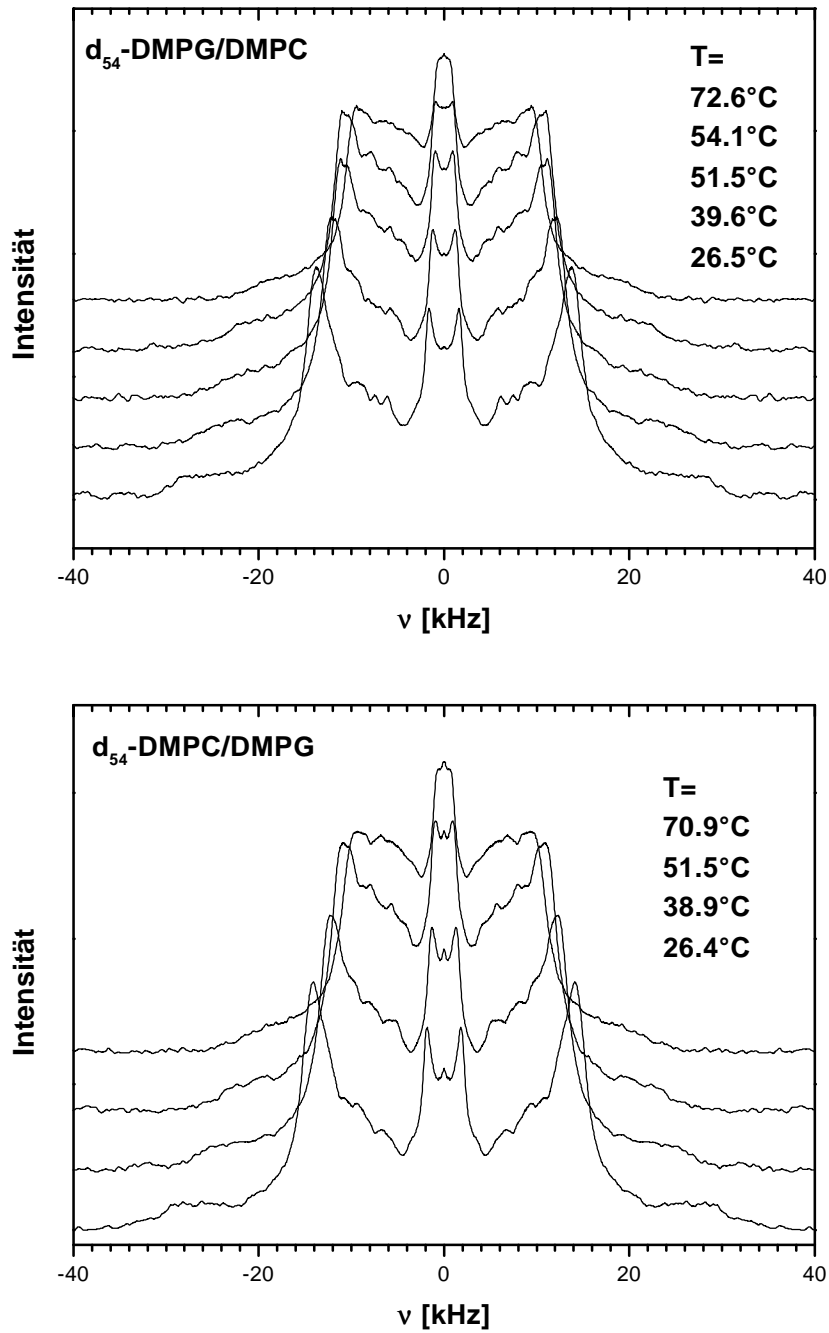


Abbildung 100: Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPG/DPPG-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.





**Abbildung 101:** Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H-NMR}$ -Spektren der untersuchten äquimolaren DMPC/DMPG-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.

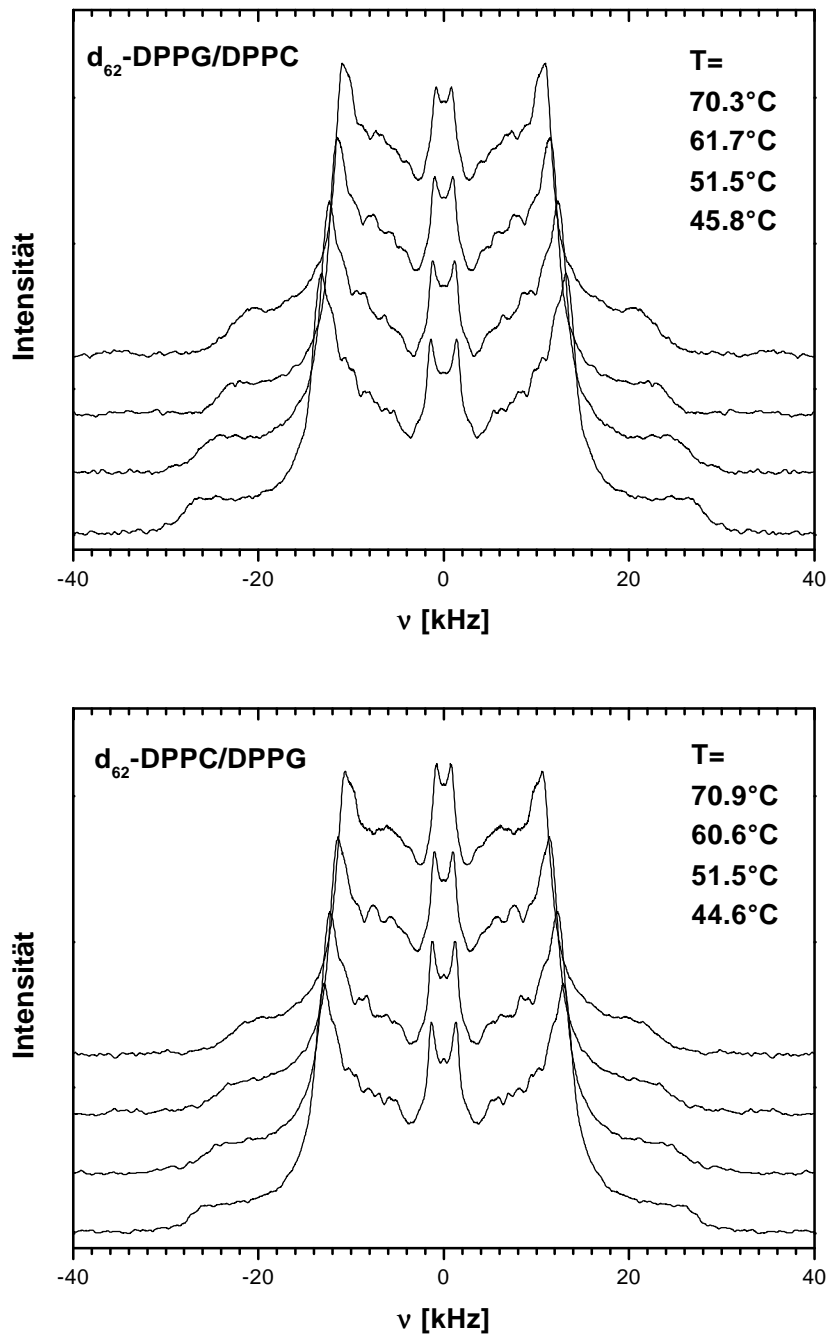
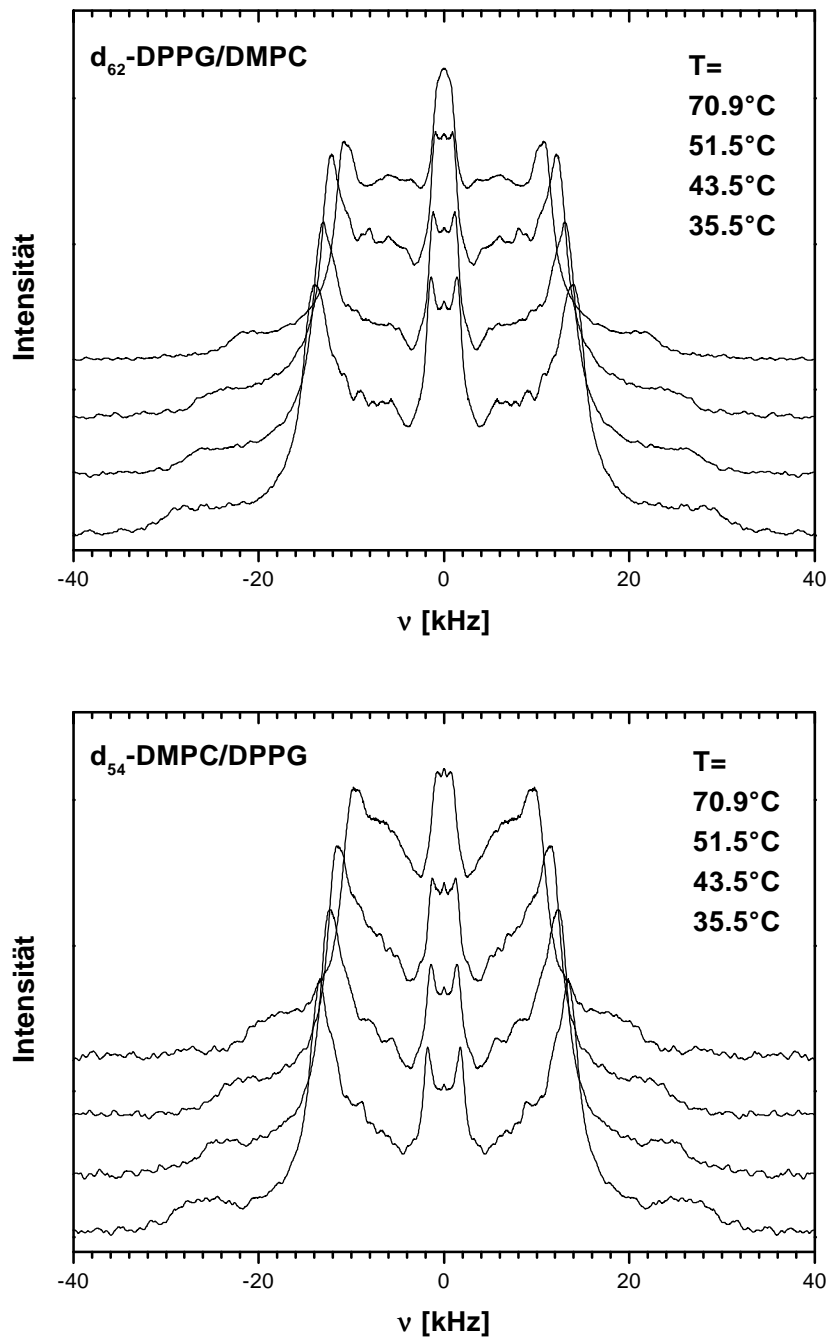
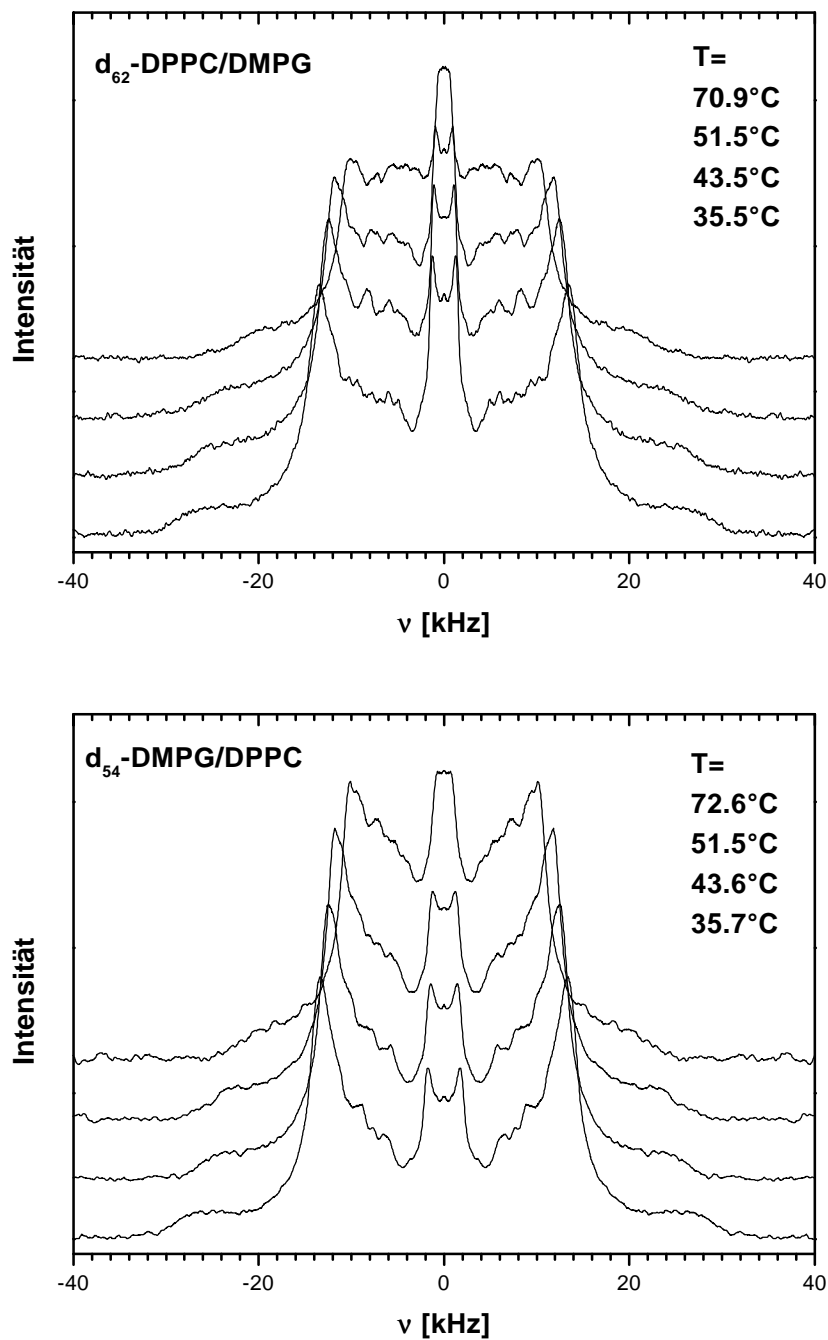


Abbildung 102: Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H-NMR}$ -Spektren der untersuchten äquimolaren DPPC/DPPG-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.



*Abbildung 103: Phasenkorrigierte und symmetrisierte <sup>2</sup>H-NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPC/DPPG-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.*

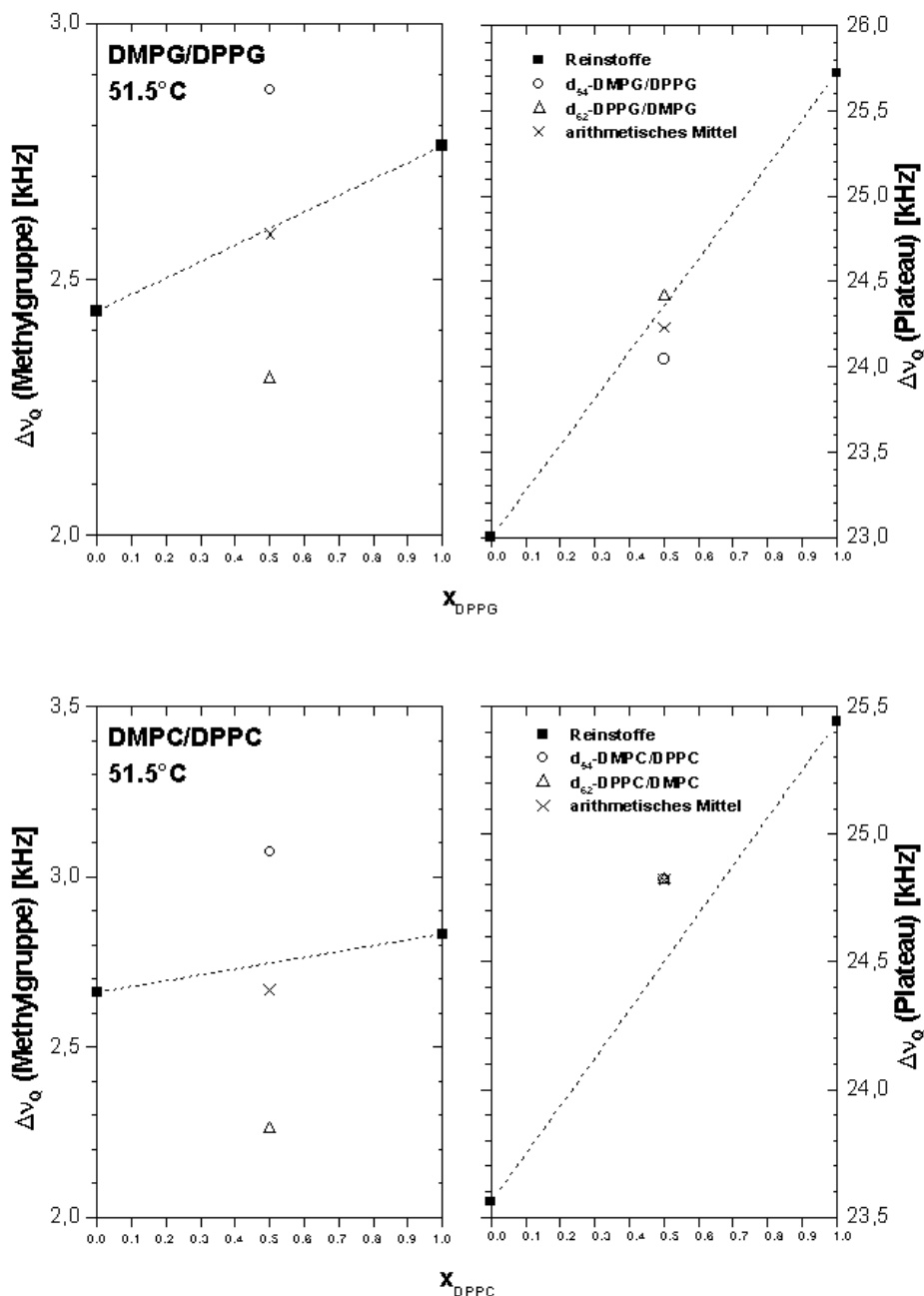


**Abbildung 104:** Phasenkorrigierte und symmetrisierte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der untersuchten äquimolaren DMPG/DPPC-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase.

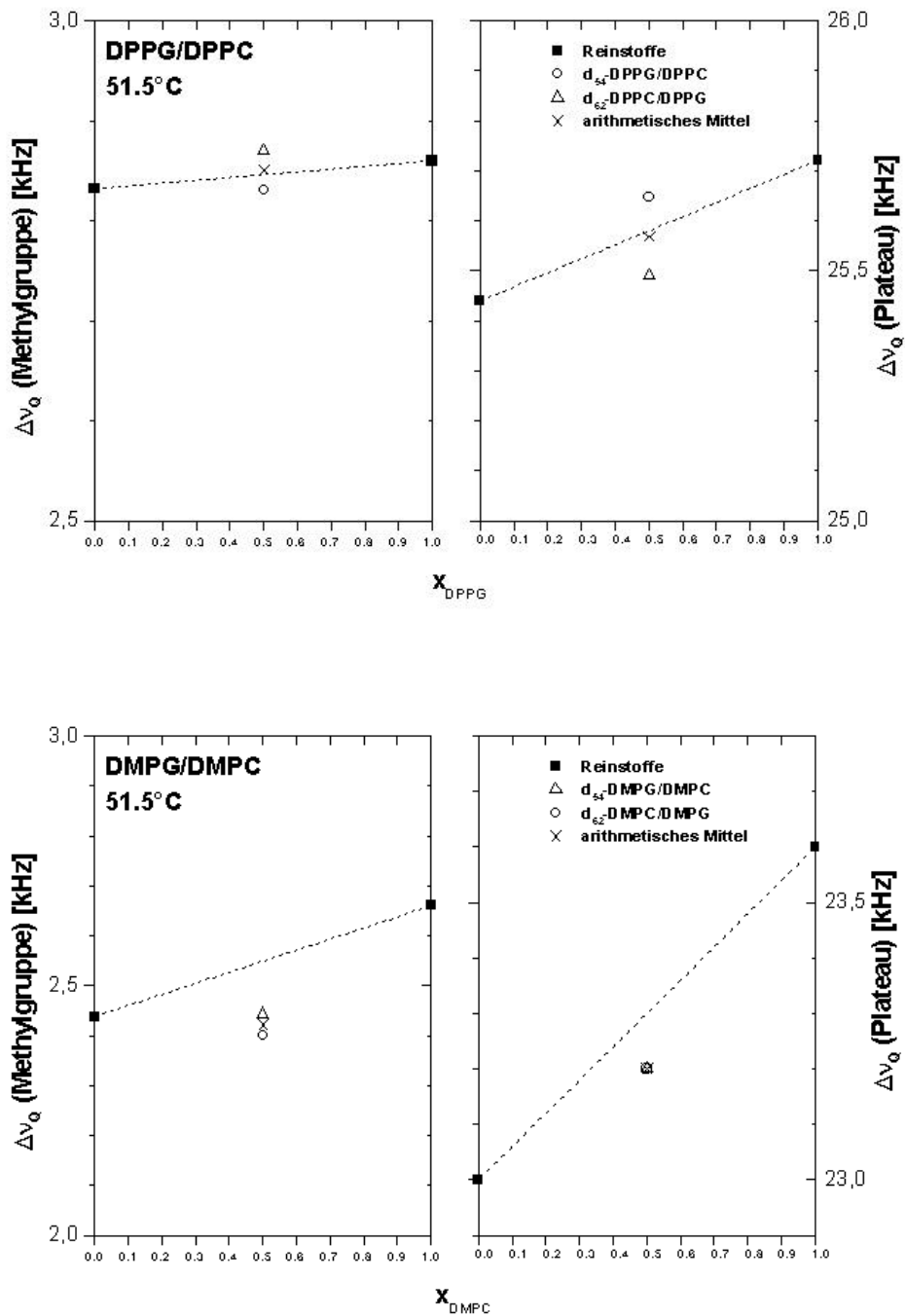
Die Änderung der einzelnen Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur entspricht erwartungsgemäß der der PC/PE-Systeme. Ein Vergleich der Reinstoffe von PE, PC und PG zeigt allerdings, daß bei ersteren die Aufspaltungen der einzelnen Kettensegmente recht

deutlich ausgeprägt sind (vgl. Abb. 75), während dies für PCs und PGs weniger der Fall ist. Dies hängt vermutlich mit der bereits erwähnten geringeren Ordnung der Acylketten im Vergleich zu PE zusammen, so daß durch die unterschiedlichen Bewegungsmöglichkeiten der einzelnen Segmente eine teilweise „Versmierung“ der Signale eintritt.

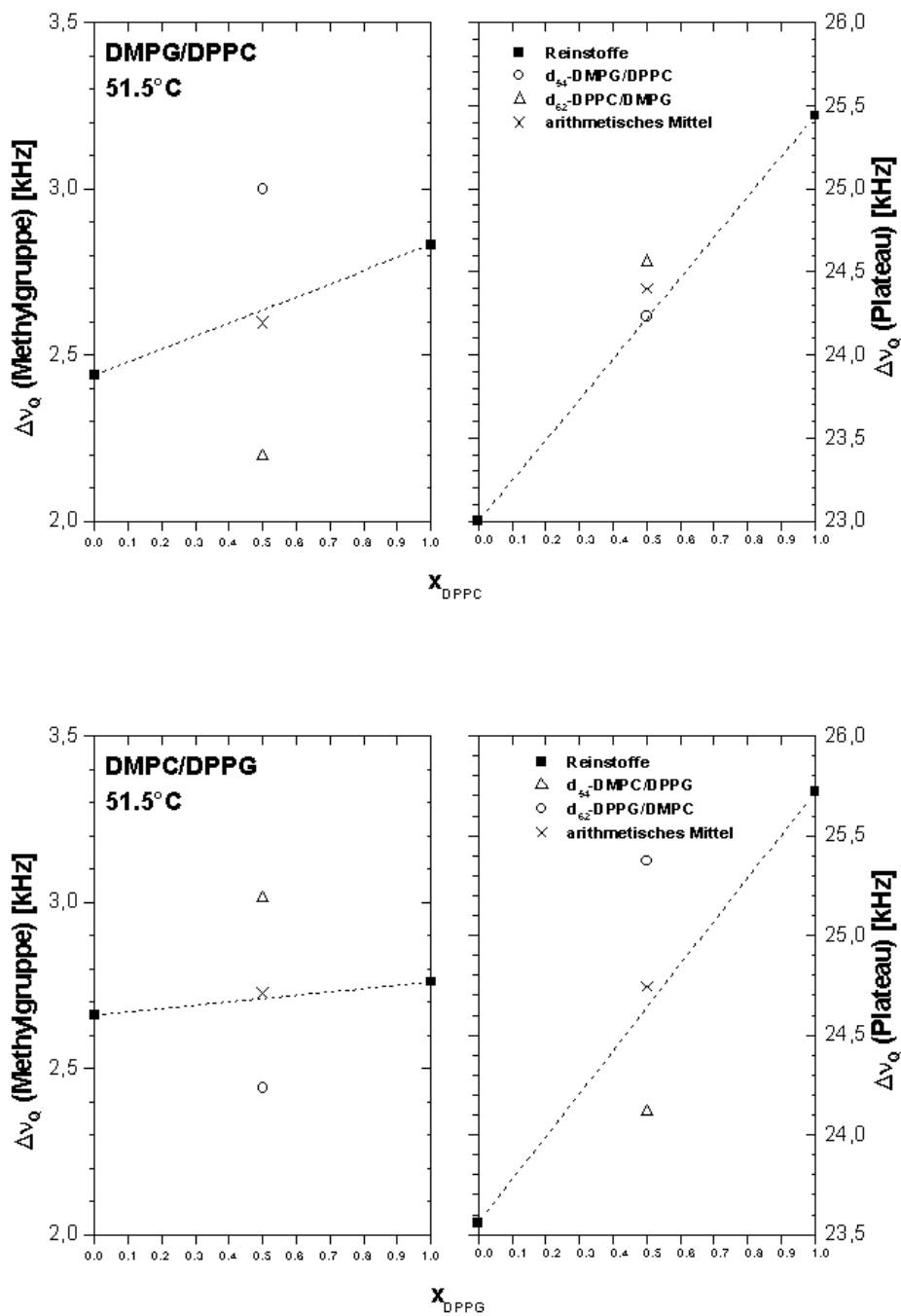
Zur genaueren Analyse der PC/PG-Systeme dient die folgende Abbildung, in der die jeweiligen  $\Delta v_Q$ -Werte der „Plateaubereiche“ bzw. CD<sub>3</sub>-Gruppen für die unterschiedlichen Gemische bei einer Referenztemperatur von 51.5° C detailliert aufgeführt sind:



**Abbildung 105:** *Quadrupolaufspaltungen des „Plateaubereichs“ sowie der terminalen Methylgruppen bei 51.5°C für die gleichköpfigen äquimolaren PC- bzw. PG-Gemische und die entsprechenden Reinsubstanzen; die gestrichelte Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung; eventuelle Extrapolationen erfolgten linear zwischen den Aufspaltungen bei den benachbarten Temperaturen.*



**Abbildung 106:** *Quadrupolaufspaltungen des „Plateaubereichs“ sowie der terminalen Methylgruppen bei 51.5°C für die gleichkettigen äquimolaren PC- bzw. PG-Gemische und die entsprechenden Reinsubstanzen; die gestrichelte Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung; eventuelle Extrapolationen erfolgten linear zwischen den Aufspaltungen bei den benachbarten Temperaturen.*



**Abbildung 107:** *Quadrupolaufspaltungen des „Plateaubereichs“ sowie der terminalen Methylgruppen bei 51.5°C für gemischt-kettige äquimolare PC/PG-Gemische und die entsprechenden Reinsubstanzen; die gestrichelte Linie dient der besseren Veranschaulichung und besitzt keine physikalische Bedeutung; eventuelle Extrapolationen erfolgten linear zwischen den Aufspaltungen bei den benachbarten Temperaturen.*



Vergleicht man zunächst die Quadrupolaufspaltungen der gleichkettigen Reinstoffe untereinander, so fällt sofort auf, daß die auftretenden Unterschiede wesentlich geringer als bei den PC/PE-Gemischen ausfallen. Die Differenzen zwischen DPPC und DPPG liegen sogar im Bereich der Fehlertoleranz (ca.  $\pm 0.15$  kHz) und lassen somit auf nahezu identische Kopfgruppeneinflüsse bezüglich der Kettenbeweglichkeit schließen. Auf welchen intermolekularen Wechselwirkungen diese große Ähnlichkeit aber tatsächlich beruht, ist jedoch noch weitgehend unklar und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ein Grund für das analoge Verhalten von PC und PG ist dabei sicherlich der ähnlichere Raumbedarf der Kopfgruppen von PC ( $101 \text{ \AA}^3$ ) und PG ( $83 \text{ \AA}^3$ ) im Vergleich zu der von PE ( $67 \text{ \AA}^3$ ) [Homan und Pownall, 1988] sowie möglicherweise die Tatsache, daß PG in der flüssig-kristallinen Phase nur noch in sehr geringem Maße Wasserstoffbrücken ausbildet [Boggs, 1987] und damit ein gravierender ordnender Faktor im Gegensatz zu PE ebenfalls verlorengeht. Zudem besitzt PG bei den hier vorgegebenen Bedingungen eine negative Partialladung, was durch die elektrostatische Abstoßung ebenfalls mehr Platz für eine erhöhte Kettenbeweglichkeit schaffen sollte. Nach *Boggs* [1987] tritt dieser Effekt als weitere Gemeinsamkeit auch bei Phosphatidylcholinen auf, da die sterisch sehr aufwendige  $\text{NMe}_3^+$ -Gruppe nicht in der Lage ist, in der Kopfgruppenebene für einen vollständigen Ladungsausgleich zu sorgen.

Neuere FTIR-spektroskopische Untersuchungen von *Hübner und Blume* [1998] lassen hingegen darauf schließen, daß H-Brücken bei reinen PGs doch in signifikanter Zahl auftreten und unterstützen hiermit die Überlegung von *Zhang et al.* [1997], welche von einem Kompensationseffekt zwischen elektrostatischer Abstoßung und Wasserstoffbrücken bei PG einerseits, und elektrostatischer Anziehung zwischen Phosphat- und Cholingruppe bei PC andererseits ausgehen und auf diese Weise die Ähnlichkeit im Verhalten der beiden unterschiedlichen Lipide begründen.

Auch die Gelphasenstrukturen von PG ( $L_{\beta'}$ ,  $P_{\beta'}$ ) stimmen mit denen der PCs überein [z. B. *Watts et al.*, 1978], so daß es hier vermutlich im Gegensatz zu den PC/PE-Systemen zu keinen Fehlorderungen aufgrund von Packungsdifferenzen kommt. Die Orientierung des P-N-Dipols bezüglich der Membranoberfläche hängt im Falle von binären Gemischen jedoch stark von einer eventuellen Partialladung der zweiten Komponente ab, wie sich anhand von NMR-Messungen mit kopfgruppendeuterten PCs sehr schön erkennen läßt

[Macdonald, 1997]. Für die hier untersuchten PC/PG-Systeme würde dies bedeuten, daß sich die positiv geladene Cholingruppe der Membranoberfläche nähert und mit einem benachbarten PG-Molekül eine Art 1:1-Komplex bilden kann, wodurch eine sehr gute Mischbarkeit ermöglicht wird. Dennoch sieht man im Falle der kürzerkettigen Komponenten DMPC und DMPG – bei welchen die unterschiedlichen Eigenschaften der Kopfgruppen stärker zur Geltung kommen – einen meßbaren Unterschied der  $\Delta v_Q$ -Werte, was zeigt, daß die PG-Moleküle trotz aller Gemeinsamkeiten im Vergleich zu ihren PC-Pendants etwas lockerer gepackt sind. ESR-Studien an DMPC und DMPG bestätigen diese Beobachtung ebenso wie FTIR-Messungen in der Gelphase unterschiedlicher PGs [Tajima et al., 1996 bzw. Zhang et al., 1997].

Die Aufspaltungen der äquimolaren gleichkettigen PC/PG-Gemische spiegeln im Rahmen der Fehlertoleranz genau das Verhalten wider, welches auch in den entsprechenden DSC-Kurven von *Garidel et al.* [1997a] zu erkennen ist, nämlich eine vollkommen ideale Mischbarkeit der beiden Komponenten in der flüssig-kristallinen Phase. Dies gilt ebenso für die gleichköpfigen Systeme [vgl. Garidel und Blume, 1998], wobei hier bei den  $CD_3$ -Gruppen wiederum das Phänomen auftritt, daß die Beweglichkeit im Falle der  $C_{16}$ -Ketten durch die kürzeren Nachbarn erhöht ist, während hingegen die Methylgruppen der Myristoylketten stärker eingeengt werden. Für DMPC/DPPC ist dieser Effekt etwas deutlicher ausgeprägt, was möglicherweise mit der bereits erwähnten leicht geringeren Packungsdichte in PG zusammenhängt, wodurch sich die Änderung der Kettenlänge nicht so stark auf benachbarte Moleküle auswirkt. Eine Verzahnung der Lipidmonoschichten ist somit bei keinem der verschiedenkettigen Gemische erkennbar.

Nach diesen wenig überraschenden Ergebnissen sollte man für die Gemische DMPC/DPPG und DPPC/DMPG aufgrund der DSC-Daten auf Seite 145 bzw. in *Garidel et al.* [1997a] eigentlich ebenfalls eine ideale Mischbarkeit erwarten, tatsächlich jedoch zeigen diese Systeme ein sehr interessantes Verhalten, welches von den bisher gemachten Beobachtungen abweicht:

Zunächst kann man wiederum eine Prognose der zu erwartenden  $\Delta v_Q$ -Werte auf der Grundlage der Reinsubstanzen (vgl. Seite 197) versuchen, wobei diese jedoch aufgrund der geringen Aufspaltungsdifferenzen mit einem wesentlich größeren Fehler als bei den PC/PE-

Gemischen behaftet ist. Die hierfür benötigten Daten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

	Anstieg $\Delta\nu_Q(\text{Plateau})$ [kHz]	Absinken $\Delta\nu_Q(\text{Plateau})$ [kHz]
<b>Kettenlängeneffekt PC</b>	+1.3 (für DMPC)	-0.6 (für DPPC)
<b>Kettenlängeneffekt PG</b>	+1.0 (für DMPG)	-1.3 (für DPPG)
<b>Kopfgruppeneffekt C<sub>14</sub></b>	-0.4 (für DMPC)	+0.2 (für DMPG)
<b>Kopfgruppeneffekt C<sub>16</sub></b>	+0.1 (für DPPC)	-0.1 (für DPPG)
	Anstieg $\Delta\nu_Q(\text{CD}_3)$ [kHz]	Absinken $\Delta\nu_Q(\text{CD}_3)$ [kHz]
<b>Kettenlängeneffekt PC</b>	+0.4 (für DMPC)	-0.6 (für DPPC)
<b>Kettenlängeneffekt PG</b>	+0.4 (für DMPG)	-0.5 (für DPPG)
<b>Kopfgruppeneffekt C<sub>14</sub></b>	-0.3 (für DMPC)	-0.0 (für DMPG)
<b>Kopfgruppeneffekt C<sub>16</sub></b>	+0.0 (für DPPC)	+0.1 (für DPPG)

**Tabelle 9:** Auswirkungen der Kettenlängen- und Kopfgruppeneinflüsse auf die Quadrupolaufspaltungen der Reinsubstanzen; Daten aus Abb. 105 und 106.

Berücksichtigt man die angenommene Fehlertoleranz von  $\pm 0.15$  kHz, so kann man aus der Tabelle die Tendenz erkennen, daß sich die Kettenlängeneffekte etwa in gleichem Maße auf DMPX und DPPX auswirken, während die unterschiedlichen Kopfgruppeneigenschaften bei den C<sub>14</sub>-Komponenten noch Auswirkungen zeigen, im Falle der C<sub>16</sub>-Systeme aber verschwindend gering sind.

Die Vorhersage der Quadrupolaufspaltungen des Systems DMPG/DPPC aufgrund von Tab. 9 ergibt für DMPG eine Änderung von +0.5 kHz (terminale Methylgruppe) bzw. +0.9 kHz („Plateaubereich“) gegenüber einer tatsächlichen Verschiebung von +0.6 bzw. +1.2 kHz. Bei DPPC sind es -0.6 und -0.9 kHz im Vergleich zu den experimentellen Werten von -0.8 und -1.0 kHz. Damit liegen die theoretischen Werte alle im

Toleranzbereich des Experiments, so daß man zumindest vermuten kann, daß die hier verwendete simple Prognosemethode wie auch bei den PC/PE-Systemen recht gut funktioniert, wenn auch aufgrund der allgemein geringen Aufspaltungen bei PC/PG diese Feststellung mit einer gewissen Vorsicht zu genießen ist. Die NMR-Daten scheinen also auch bei diesem Gemisch mit den kalorimetrischen Ergebnissen aus *Garidel et al.* [1997a] insofern übereinzustimmen, daß sich die beiden Komponenten trotz unterschiedlicher Kopfgruppe und Kettenlänge annähernd ideal mischen.

Überraschenderweise macht man hingegen bei dem Gemisch DMPC/DPPG eine vollkommen andere Beobachtung: Während die DSC-Daten wiederum auf eine ideale Mischbarkeit der Komponenten schließen lassen [Abb. 57 bzw. Chen et al., 1998], ergeben die NMR-Spektren in Abb. 103 für Prognose und Experiment die folgenden Werte:

DMPC: Prognose: +0.5 kHz (Methylgruppe), +1.3 kHz („Plateaubereich“)

Experiment: +0.4 bzw. +0.6 kHz

DPPG: Prognose: -0.5 kHz (Methylgruppe), -1.1 kHz („Plateaubereich“)

Experiment: -0.4 bzw. -0.4 kHz

Aus diesen Zahlenwerten kann man – wie auch anhand von Abb. 107 – klar erkennen, daß hier offensichtlich keine ideale Mischung vorliegt, sondern anscheinend Domänen gleicher Moleküle bevorzugt werden. Um diese Beobachtung zu erhärten, wurden die Gemische  $d_{54}$ -DMPC/DPPG und  $d_{62}$ -DPPG/DMPC noch einmal mit gekauften Lipiden hergestellt und vermessen, wobei sich das Ergebnis jedoch nicht signifikant veränderte. Schließt man einen systematischen Fehler bei der Probenpräparation aus, so könnte man die DSC- und NMR-Ergebnisse übereinstimmend so erklären, daß makroskopisch gesehen zwar eine annähernd ideale Mischbarkeit vorliegt, auf mikroskopischer Ebene jedoch die Bildung von Domänen gleicher Komponenten bevorzugt wird. Der aus den kalorimetrischen Daten ermittelte Nichtidealitätsparameter  $\rho_1$  von etwa -800 J/mol (vgl. Seite 148) würde bei einer Monte Carlo-Simulation allerdings gerade das entgegengesetzte Ergebnis (Tendenz zur Bildung von AB-Paaren) liefern und zeigt somit sehr anschaulich, wie problematisch ein derartiger Rückschluß von thermodynamischen Beobachtungen auf molekulare Strukturen sein kann.

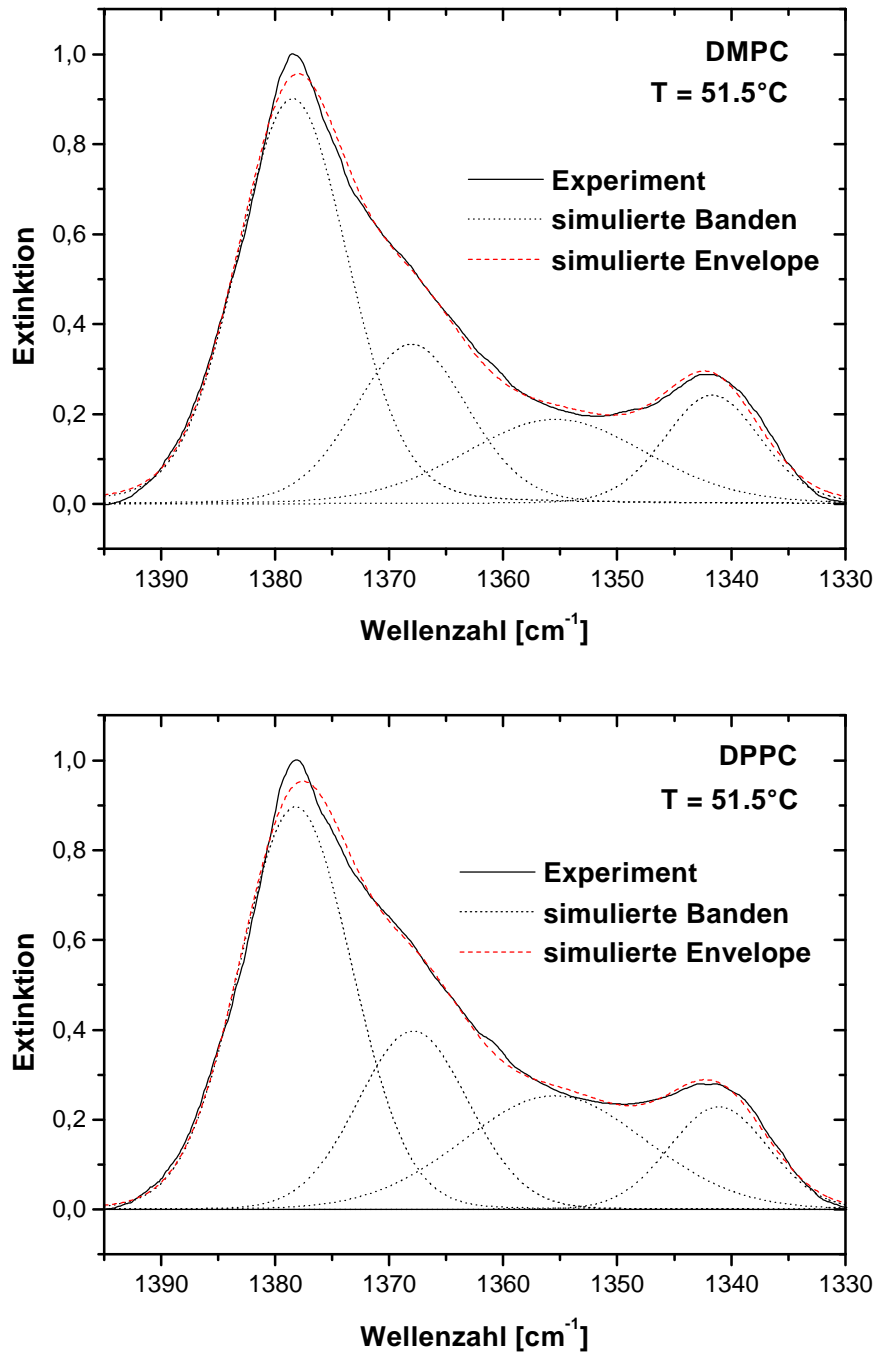
Für das Auftreten von nichtidealer Mischbarkeit in PC/PG-Systemen gibt es in der Literatur noch weitere Hinweise: So kamen *Shin et al.* [1995] nach  $^2\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopischer Untersuchung von enzymatisch hergestellten PC/PG-Gemischen mit selektiv deuterierten Kopfgruppen zu dem Schluß, daß es hier zu der bevorzugten Ausbildung von Mikrodomänen gleicher Komponenten kommt, obwohl makroskopisch gesehen eine annähernd ideale Mischbarkeit vorliegt. Diese Beobachtung bezieht sich jedoch nicht nur auf DMPC/DPPG allein, sondern sollte zumindest auch für das Gemisch DMPG/DPPC gelten, was nach Abb. 107 allerdings selbst unter Berücksichtigung der Fehlertoleranz kaum nachzuvollziehen ist. Zumindest bliebe auch in diesem Fall die Frage offen, warum die Bildung von Domänen für DMPC/DPPG wesentlich intensiver ist als bei DMPG/DPPC.

Eine seit langem bekannte Methode, eine Phasenseparation in PC/PG-Systemen zu induzieren, besteht in der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [Findlay und Barton, 1978], allerdings kann dieser Effekt bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben ausgeschlossen werden, da lediglich hochreines entdeutertes Wasser zur Präparation verwendet wurde und keine weiteren Ca-Quellen ersichtlich sind. Da zudem zwischen DMPC und DPPG nicht einmal die größte  $T_m$ -Differenz vorliegt (dies ist für DMPG/DPPC der Fall), scheint es mit den vorhandenen Informationen nicht möglich zu sein, das ungewöhnliche Verhalten dieses Gemisches schlüssig zu erklären, so daß man hier auf weitere Experimente angewiesen ist.

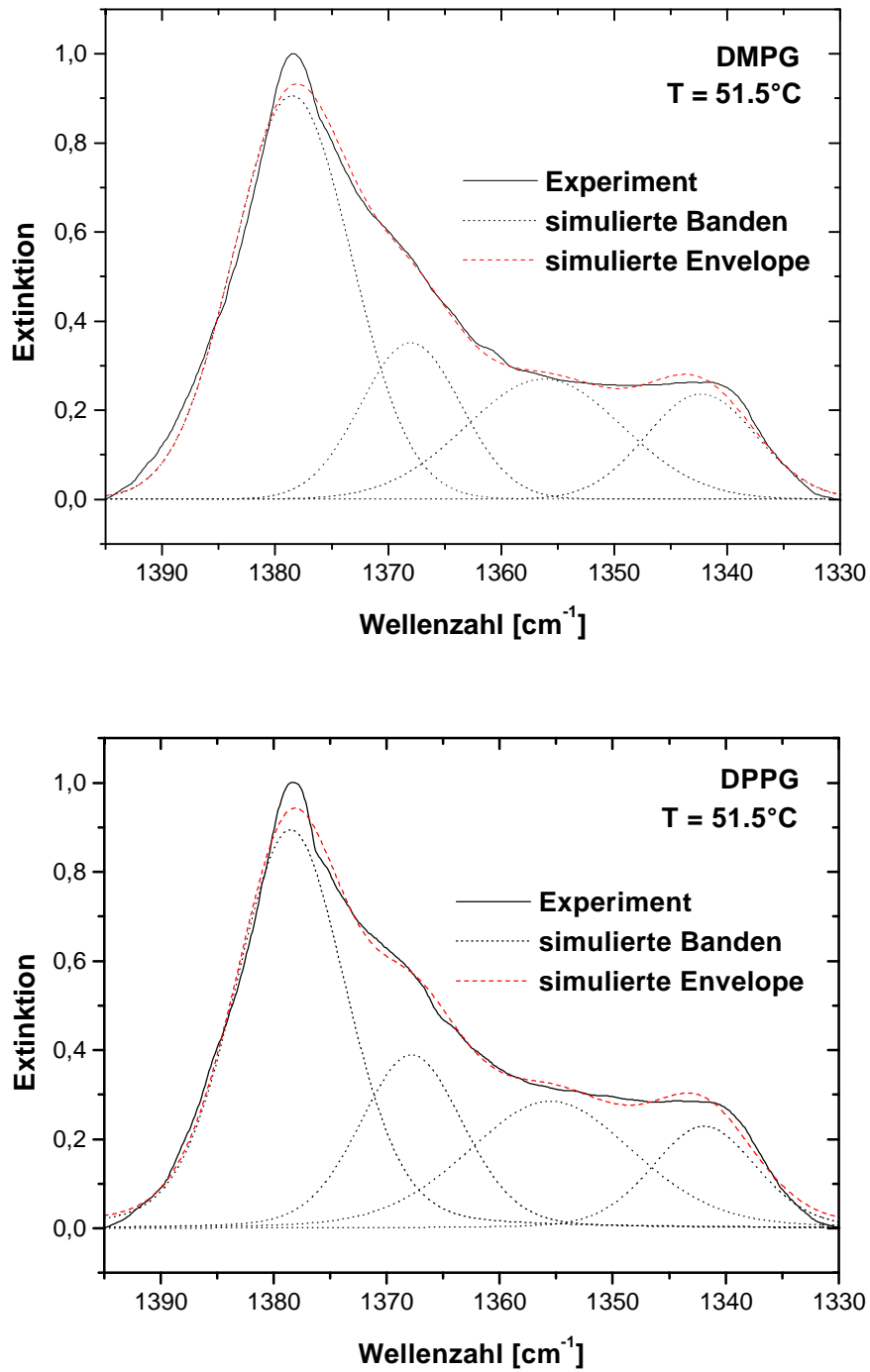
#### 5.2.3.2 FTIR-Spektroskopie

Bei der Betrachtung der Kippschwingungsbanden von PC/PG-Gemischen stellt sich als erstes die Frage, ob die beiden  $\text{CH}_2$ -Segmente der Cholin-kopfgruppe in dem untersuchten Wellenzahlbereich ebenfalls angeregt werden. Während dies bei den PC/PE-Systemen wegen der ähnlichen Struktur der Kopfgruppen lediglich zu einem systematischen Fehler geführt hätte, würde hier nun allerdings eine relative Verschiebung der Intensitäten zueinander auftreten und das Ergebnis verfälschen. Nach Untersuchungen von *Tuchtenhagen et al.* [1994] läßt sich ein Einfluß dieser beiden Methylengruppen auf den hier betrachteten Spektralbereich jedoch ausschließen, so daß die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben gewahrt bleibt.

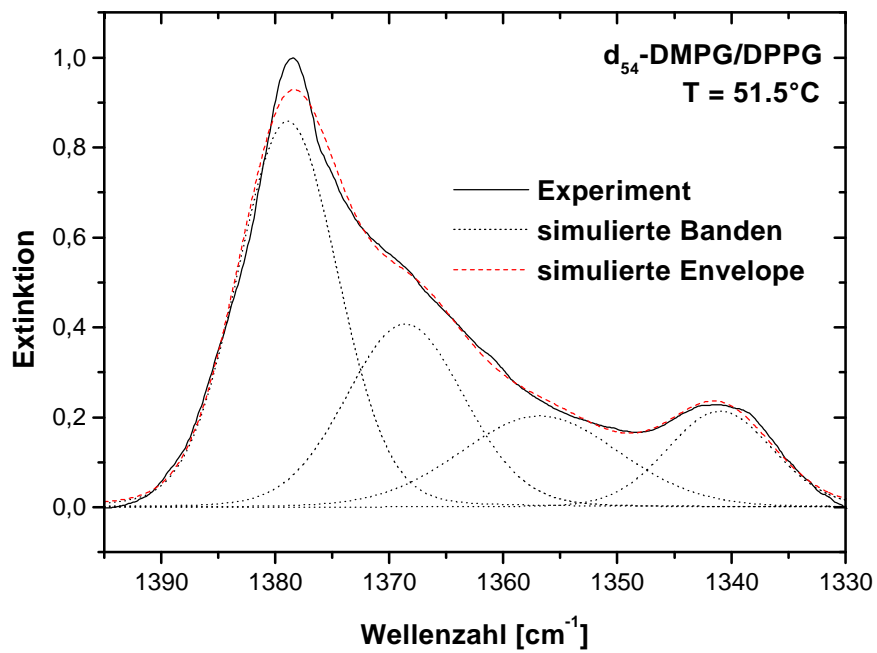
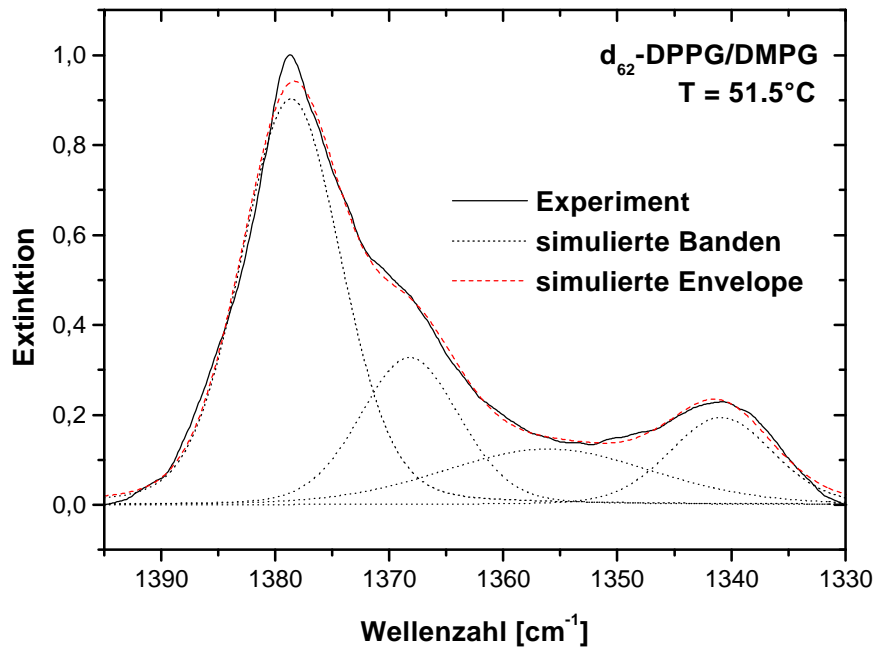
Abbildung 109 faßt die beobachteten Kippschwingungsbanden zusammen:



**Abbildung 108:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für reine undeuterierte PCs.



**Abbildung 110:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für reine undeuterierte PGs.



**Abbildung 111:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPG/DPPG-Gemische.



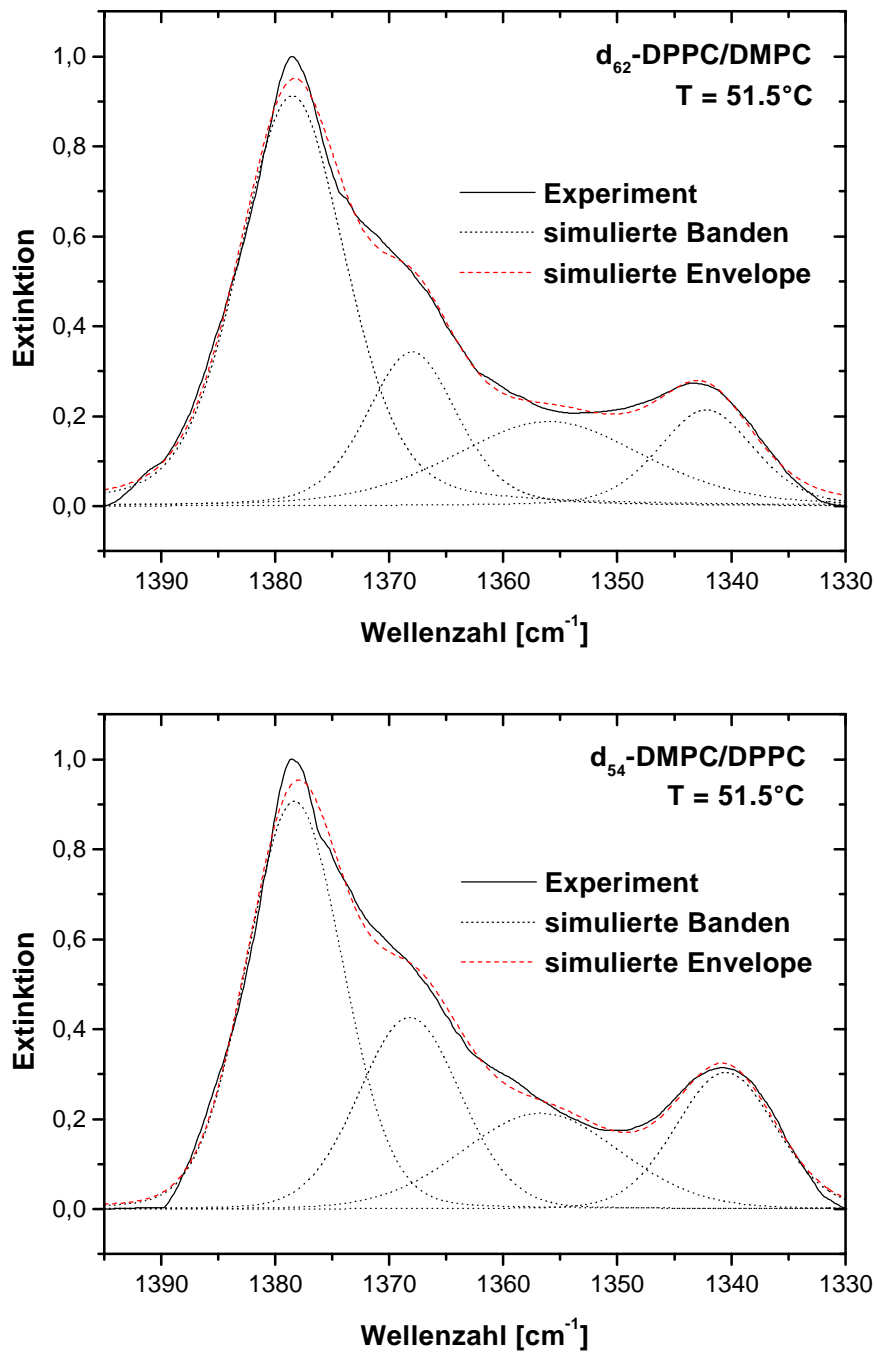
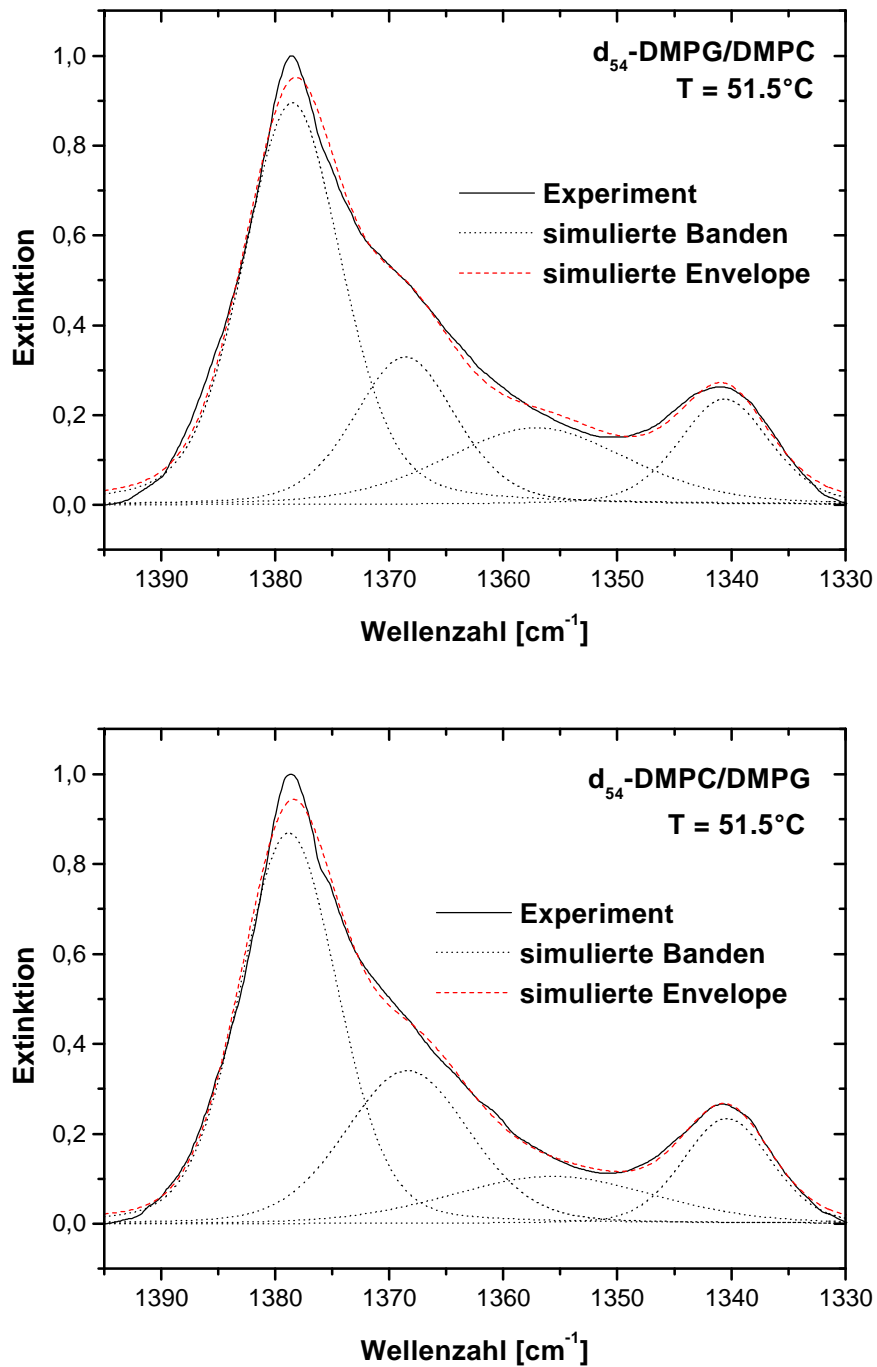


Abbildung 112: Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPC/DPPC-Gemische.



**Abbildung 113:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPC/DMPG-Gemische.

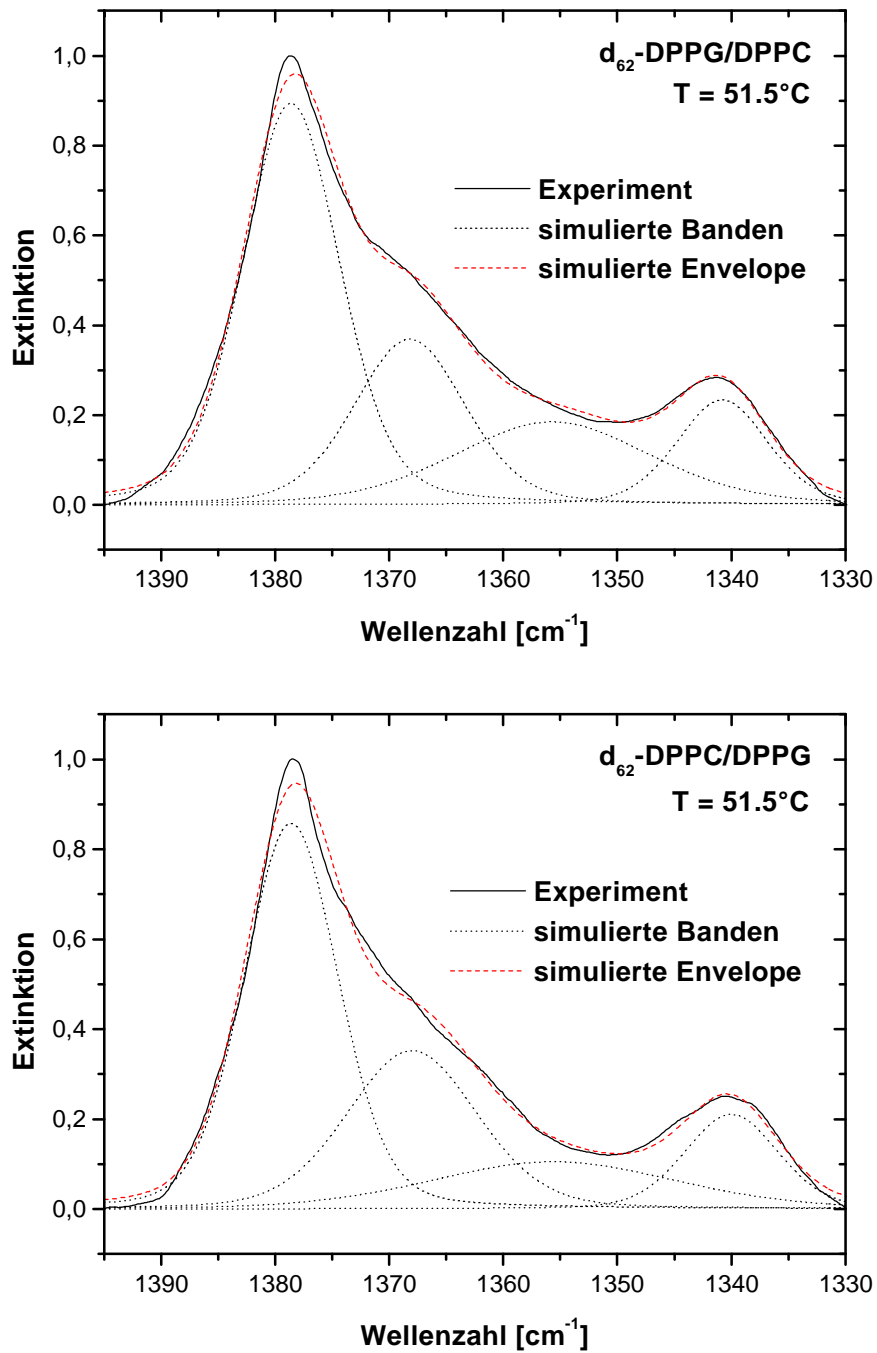
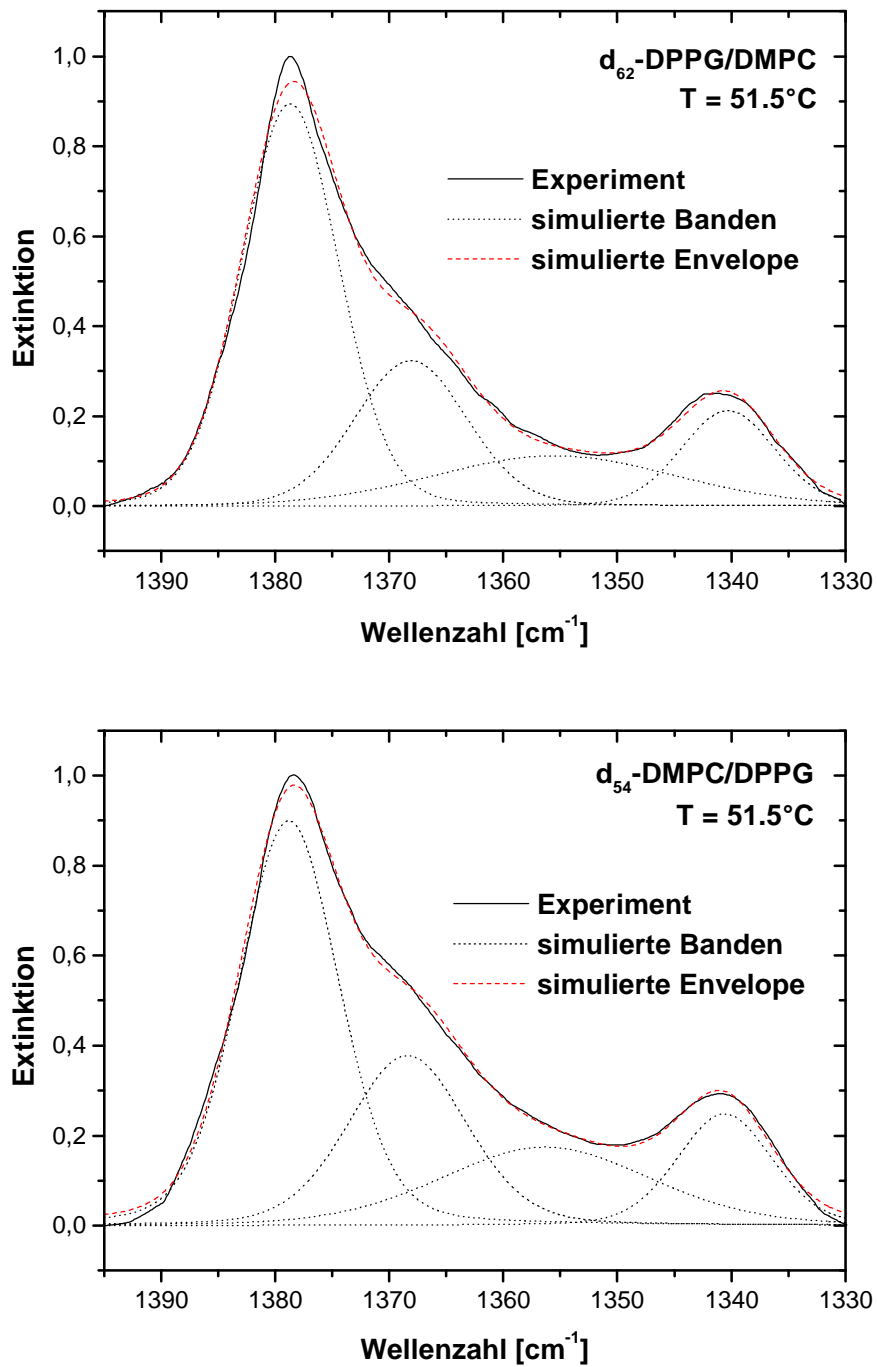
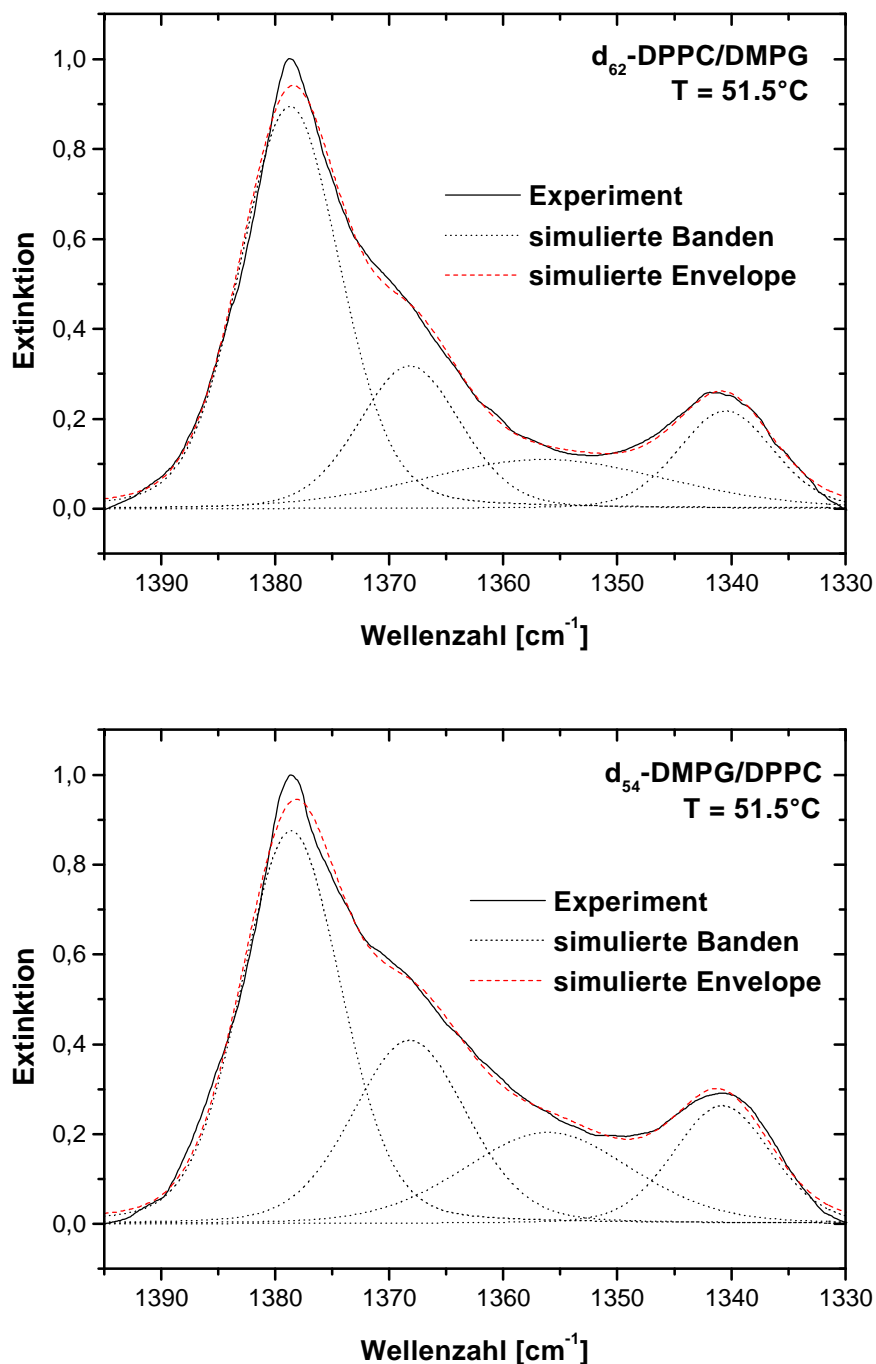


Abbildung 114: Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DPPC/DPPG-Gemische.



**Abbildung 115:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPC/DPPG-Gemische.

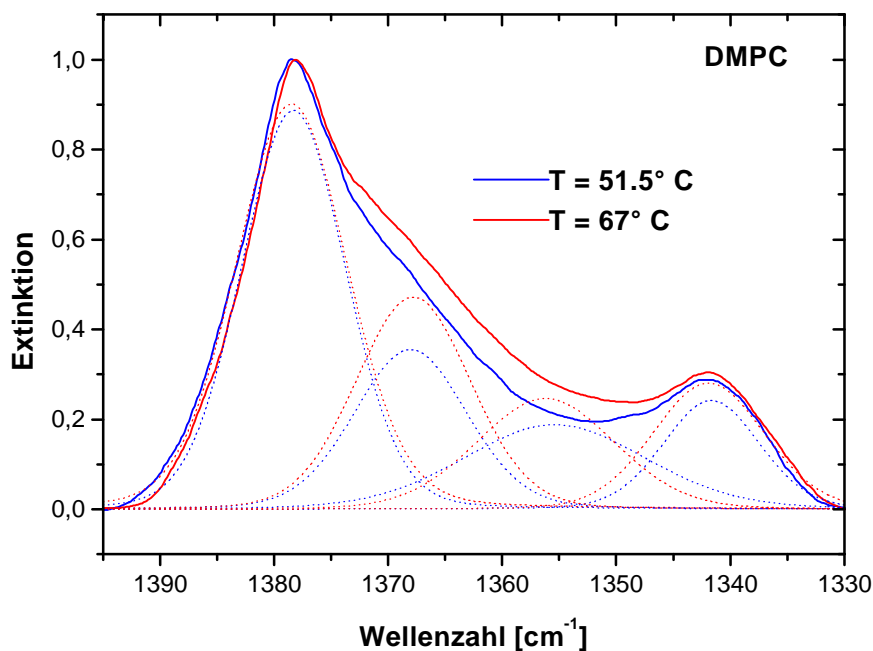


**Abbildung 116:** Normierte experimentelle Envelope und hieraus analog zu Ziegler [1994] simulierte CH<sub>2</sub>-Kippschwingungsbanden für äquimolare DMPG/DPPC-Gemische.

Auffällig bei der Betrachtung der Banden ist vor allem die (reproduzierbare) Tatsache, daß bei reinen PGs die doppelgauche-Schwingung (1356 cm<sup>-1</sup>) verhältnismäßig stark ausgeprägt ist, wohingegen die DMPG/DPPG-Spektren wieder „normal“ aussehen. Ob dies

mit speziellen räumlichen Strukturen der Reinstoffe zusammenhängt, kann mit den vorhandenen Informationen jedoch nicht geklärt werden.

Neben einem Vergleich der verschiedenen Lipide untereinander ist es außerdem recht interessant, sich anhand der Abbildungen 88 und 108 am Beispiel DMPC einmal die Auswirkungen der Temperatur auf die Form der Spektren zu vergegenwärtigen:



**Abbildung 117:** Experimentelle Spektren und simulierte Banden von DMPC bei zwei verschiedenen Temperaturen in der flüssig-kristallinen Phase; Daten aus Abb. 88 und 108.

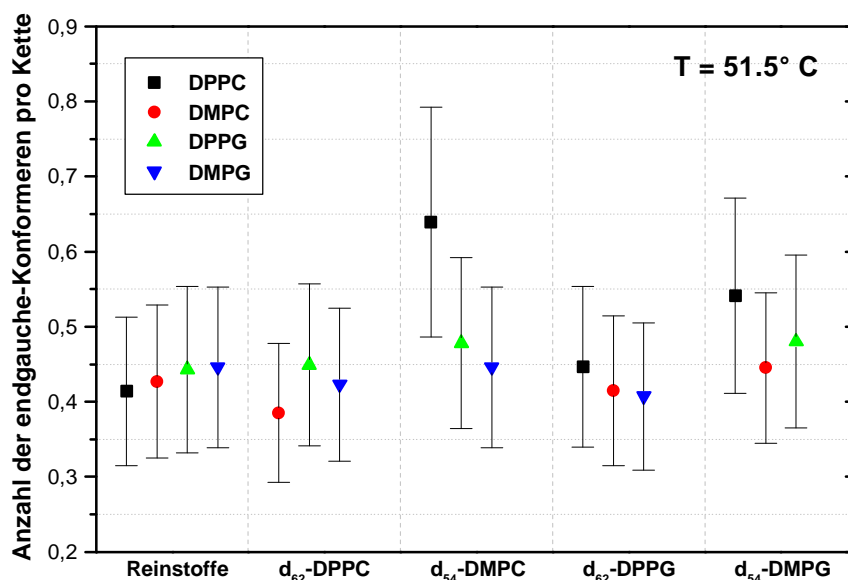
Wie erwartet zeigt Bande für die „Regenschirmschwingung“ bei  $1378\text{ cm}^{-1}$  keine Temperaturabhängigkeit, während hingegen bei den gtg- und gg-Konformeren – welche wie bereits erwähnt stark miteinander korrelieren und hier daher als zusammengehörig betrachtet werden – ein deutlich stärkerer Zuwachs zu erkennen ist als für die der endgauche-Konformeren. Dieses Ergebnis erscheint auch durchaus logisch, da letztere die Packung der Acylketten nur in geringem Maße beeinflussen und daher schon bei niedrigeren Temperaturen in signifikanter Zahl auftreten, wohingegen die sterisch aufwendigen gtg- und gg-Sequenzen eine größere Kettenbeweglichkeit und mehr freies Volumen benötigen, so daß sie erst bei höheren Temperaturen verstärkt realisiert werden.

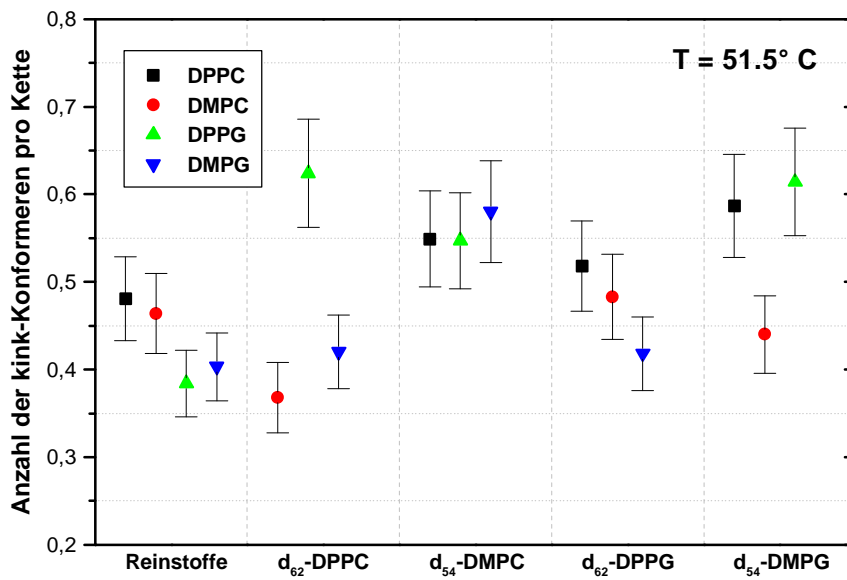
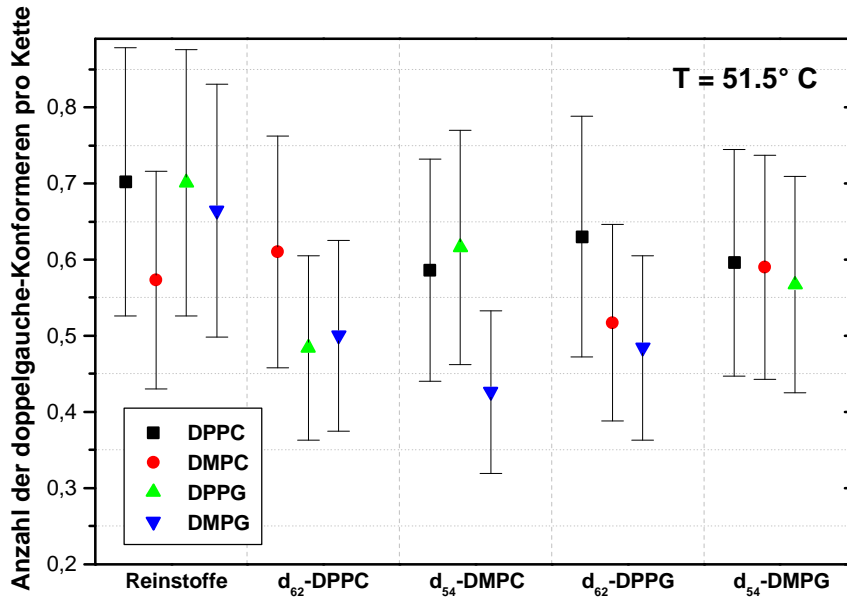
Zur detaillierteren Untersuchung der Kippschwingungsbanden in den Abbildungen 108 bis 116 müssen zuerst noch die entsprechenden Konversionsfaktoren für die hier verwendete Referenztemperatur von  $51.5^\circ\text{C}$  berechnet werden. Dies geschieht nach den bereits auf Seite 202f. angegebenen Gleichungen und ergibt die folgenden Werte:

	dg ( $51.5^\circ\text{C}$ )	eg ( $51.5^\circ\text{C}$ )	gtg ( $51.5^\circ\text{C}$ )
$C_{14}$	1.68	1.84	1.17
$C_{16}$	1.52	1.84	1.11

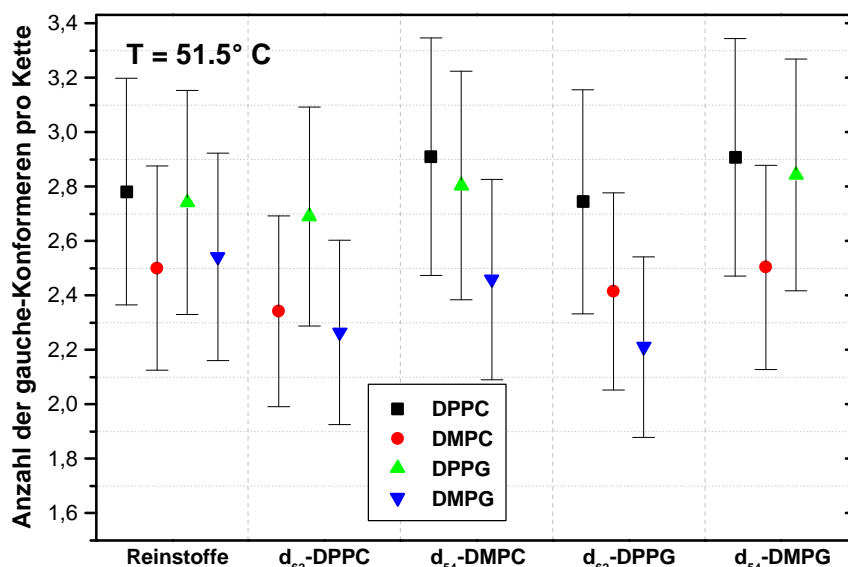
**Tabelle 10:** Nach Senak et al. [1991] berechnete Konversionsfaktoren für die Umrechnung der normierten integralen Intensitäten der  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungsbanden in die absolute Anzahl der entsprechenden Konformeren pro Kette.

Mit den Daten aus Tab. 10 können nun wiederum die einzelnen Konformerenzahlen aus den Schwingungsbanden in den Abbildungen 108 bis 116 ermittelt werden, was zu dem folgenden Ergebnis führt:









**Abbildung 118:** Mit Hilfe von Tab.10 errechnete mittlere Anzahl der entsprechenden Konformer pro Acylkette für äquimolare PC/PG-Gemische und die entsprechenden Reinstoffe.

Die IR-Daten der Reinstoffe unterstreichen die bereits erwähnte Ähnlichkeit zwischen PC und PG, da bezüglich der hier beobachteten gauche-Konformerenzahlen keinerlei Kopfgruppenabhängigkeit zu erkennen ist. Den NMR-Daten aus Abb. 106 zufolge sollte sich zwar zwischen DMPC und DMPG ein gewisser Ordnungsunterschied aufgrund der differierenden „Plateau“-Aufspaltungen ergeben, dieser ist jedoch in Abb. 118 viel zu klein, um eine eindeutige Aussage machen zu können. Als mögliche Erklärung hierfür bietet sich zum einen die große Fehlertoleranz bei der Auswertung der Kippschwingungen an und zum andern die Tatsache, daß die Quadrupolaufspaltungen gerade bei den Methylengruppen in der Nähe der Esterbindung von wesentlich mehr Bewegungsarten beeinflußt werden als die hier beobachteten Schwingungsbanden [z. B. Winter und Noll, 1998], so daß ein direkter Vergleich ohnehin problematisch ist.

Die Palmitoylketten besitzen hingegen eine erkennbar größere Zahl an gauche-Konformerenzahlen als ihre kürzeren Homologen, wobei dieser Effekt aufgrund der NMR-Daten wohl darauf zurückzuführen ist, daß im Gegensatz zu C<sub>14</sub> einfach mehr Methylengruppen vorhanden sind und damit die Wahrscheinlichkeit einer Konformationsänderung entsprechend höher liegt. Im Gegensatz zu den PC/PE-Systemen ist der Kettenlängeneffekt bei PC/PG somit deutlich dominanter als der unterschiedliche Einfluß der Kopfgruppen. Am

freien Ende der Acylketten verschwindet jedoch auch diese Differenz [vgl. Mendelsohn und Senak, 1993], so daß die Anzahl der endgauche-Konformeren für die vier Komponenten nicht zu unterscheiden ist. Diese Beobachtung stimmt unter Berücksichtigung der jeweiligen Fehlertoleranzen auch mit den bereits untersuchten  $CD_3$ -Aufspaltungen aus den NMR-Messungen überein, unterscheidet sich jedoch von den Ergebnissen in *Tuchtenhagen et al.* [1994], welche ebenfalls die  $CH_2$ -Kippschwingungsbanden von DMPC und DMPG untersuchten und dabei einen deutlichen Unterschied im endgauche-Bereich feststellten. Eine Ursache für diese Diskrepanz besteht jedoch möglicherweise darin, daß die Autoren bei der Bearbeitung der Spektren eine lineare Basislinie angelegt haben, was – wie bereits bei den PE-Systemen erwähnt – unter Umständen zu einer unverhältnismäßigen Intensitätsverringern der endgauche-Bande führen kann. Eine interessante Analogie zu dieser Betrachtung liefert die Molekulardynamik-Simulation einer ebenfalls negativ geladenen Lipiddoppelschicht (DPPS) im Vergleich zu der entsprechenden DPPC-Membran [Cascales et al., 1996]: Hier findet man, daß sich ausgehend vom Glyceringerüst etwa ab der sechsten  $CH_2$ -Gruppe die (theoretischen und experimentellen) Ordnungsparameter der Methylen-Segmente immer mehr ähneln und am Kettenende so gut wie identisch sind, was vom Prinzip her für die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit spricht.

Bei den äquimolaren gleichköpfigen Gemischen erkennt man in Übereinstimmung mit den NMR-Daten eine Zunahme der berechneten gauche-Konformerenzahl für die länger-kettige Komponente, während die Beweglichkeit der kürzeren Lipide abnimmt, so daß man auch aufgrund der Kippschwingungsbanden auf eine sehr gute Mischbarkeit dieser Systeme schließen kann. Dieser Effekt der längeren bzw. kürzeren Nachbarn kann anhand der endgauche-Werte in Abb. 118 gut nachvollzogen werden, wobei hier eine verhältnismäßig stärkere Änderung der  $C_{16}$ -Methylgruppen im Gegensatz zu  $C_{14}$  erkennbar ist. Im Falle von DMPC/DPPC läßt sich diese Tendenz zwar auch bei der Betrachtung der Quadrupolaufspaltungen erahnen (Abb. 105), für eine nähere Interpretation ist dieser Unterschied allerdings viel zu gering. Fest scheint jedoch zu stehen, daß bei DMPC/DPPC und DMPG/DPPG keine Verzahnung der Monoschichten auftritt, da die Isomerisierung der  $C_{16}$ -Methylgruppen sonst stärker eingeschränkt wäre.

Vergleicht man die Daten der gleichkettigen Lipidgemische mit denen der entsprechenden Reinstoffe, so zeigen die Intensitäten der endgauche-Schwingungen

keinerlei interpretierbare Unterschiede. Auch die Gesamtzahl der gauche-Segmente variiert in Übereinstimmung mit den NMR-Daten nicht erkennbar. Bezüglich der gg und gtg-Sequenzen beinhaltet Abb. 118 sehr uneinheitliche Informationen, was wiederum auf die bereits erwähnte starke Korrelation bei der Simulation dieser Banden zurückzuführen ist. Offensichtlich lassen sich bei derart ähnlichen Lipiden wie PC und PG keine klaren Trends mehr in diesem Bereich herauslesen, wobei die Summe dieser Banden für die Gesamtzahl der gauche-Konformerer jedoch trotzdem sinnvolle Ergebnisse liefert.

Besonders interessant ist vor allem die Frage, ob sich das in den NMR-Messungen auftretende unterschiedliche Verhalten der Systeme DMPC/DPPG und DPPC/DMPG auch in den Kippschwingungsbanden widerspiegelt. Bei letzterem läßt sich aufgrund der  $\Delta\nu_Q$ -Werte wiederum eine annähernd ideale Mischbarkeit vermuten, was durch die IR-Daten unterstützt wird: Die Gesamtzahl der gauche-Konformerer für DPPC nimmt in der Mischung erkennbar zu und im Falle von DMPG deutlich ab, so daß man von einer großen Zahl an AB-Paaren im System ausgehen kann. Auch für die endgauche-Konformerer zeigt sich eine signifikant erhöhte Zahl, wohingegen allerdings DMPG im Vergleich zu den NMR-Werten nur eine sehr kleine Verringerung der endgauche-Konformererzahl erfährt.

Welche Beobachtungen lassen sich nun für das „Ausnahmesystem“ DMPC/DPPG machen? Die Quadrupolaufspaltungen deuten darauf hin, daß eine Art mikroskopische Phasenseparation auftritt, welche jedoch auf makroskopischer Ebene (DSC) nicht zu erkennen ist (vgl. Abb. 57 bzw. *Chen et al.* [1998]). Da die IR-Messungen im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie Momentaufnahmen der Teilchenbewegungen liefern, müßte ein solch nichtideales Verhalten in jedem Fall auch dort zu sehen sein und sollte dazu führen, daß sich die Anzahl der gauche-Konformerer der einzelnen Komponenten im Reinstoff und im Gemisch nicht stark unterscheidet. Betrachtet man nun Abb. 118, so zeigt sich tatsächlich nur eine sehr geringe Änderung bezüglich der endgauche- bzw. gesamtgauche-Konformererzahlen. Aufgrund der großen Fehlertoleranzen bei der Auswertung der IR-Banden ist dies zwar sicherlich kein eindeutiger Beweis für das Auftreten einer Mikrophasenseparation, schließt aber zumindest die NMR-Ergebnisse nicht aus. Auf der anderen Seite erscheint es natürlich verwunderlich, warum ausgerechnet DMPC/DPPG dieses ausgefallene Verhalten zeigt, während sich alle anderen untersuchten PC/PG-Systeme so gut wie ideal verhalten. Neueste Untersuchungen von *Garidel et al.* [persönl. Mitteilung]

lassen allerdings auf ein weitaus vielschichtigeres Phasenverhalten von PC/PG-Gemischen schließen als bisher angenommen, so daß man zur endgültigen Klärung dieses Sachverhalts weitere Informationen abwarten muß. Denkbar wäre beispielsweise eine NMR-Untersuchung mit kopfgruppenmarkiertem DMPC, da die positiv geladene Cholingruppe sehr sensibel auf benachbarte anionische Lipide reagiert und über die gemessenen  $\Delta\nu_Q$ -Werte somit Aufschlüsse über die Art der benachbarten Moleküle erhalten werden können [vgl. Macdonald, 1997].

### 5.3 SYNTHESSEN

#### 5.3.1 Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
• Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2	Leybold Heraeus, Köln
• Ultraschallbad Bransonic 1200	Branson Europa BV, Niederlande
• Zentrifuge BIOfuge 17 RS	Heraeus Instruments, Hanau

#### 5.3.2 Verwendete Chemikalien

In der nachfolgenden Aufstellung sind die für die präparativen Arbeiten verwendeten Chemikalien zusammengefaßt. Sie wurden jeweils – soweit nicht anders vermerkt – ohne weitere Reinigung eingesetzt.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
• Aceton, p. a.	Baker und Deventer, Niederlande
• Aluminiumoxid, basisch	ICN Biomedicals, Eschwege
• Ammoniak, (25 %)	BASF AG, Ludwigshafen/Rhein
• Benzol, p. a.	Riedel-de-Haën AG, Seelze
• Cadmiumchlorid, p. a.	E. Merck KGaA, Darmstadt
• Calciumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
• Carboxymethyl-Cellulose	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

- N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, p. s. E. Merck KGaA, Darmstadt
- DMPC Nattermann Phospholipid GmbH, Köln
- DMPE Nattermann Phospholipid GmbH, Köln
- DPPC Nattermann Phospholipid GmbH, Köln
- DPPE Nattermann Phospholipid GmbH, Köln
- DPPG Lipoid GmbH, Ludwigshafen
- Diethylether, p. a. Riedel-de-Haën AG, Seelze
- N,N-Dimethyl-4-aminopyridin E. Merck KGaA, Darmstadt
- Essigsäure, p. a. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Ethanol, p. a. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Ethanolamin E. Merck KGaA, Darmstadt
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, als Dinatriumsalz) Riedel-de-Haën AG, Seelze
- Glycerin, p. a. E. Merck KGaA, Darmstadt
- L- $\alpha$ -Glycerophosphatidylcholin Nattermann Phospholipid GmbH, Köln
- Hydraziniumsulfat, p. a. E. Merck KGaA, Darmstadt
- Kieselgel 60 F<sub>254</sub> DC-Fertigplatten E. Merck KGaA, Darmstadt
- Kieselgel 60 reinst, Korngröße 0.063-0.200 mm E. Merck KGaA, Darmstadt
- Methanol, p. a. Riedel-de-Haën AG, Seelze

- Myristinsäure-d<sub>27</sub> (98% deuteriert) Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA.
- Natriumhydroxid, p. a. Riedel-de-Haën AG, Seelze
- Natriummolybdat, p. a. E. Merck KGaA, Darmstadt
- Palmitinsäure-d<sub>31</sub> (98% deuteriert) Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA.
- Petrolether Schuster & Sohn GmbH, Kaiserslautern
- Phosphorpentoxid Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Salzsäure, p. a. (37%) Baker und Deventer, Niederlande
- Schwefelsäure, p. a. (95-97%) Baker und Deventer, Niederlande
- Tetrachlormethan, p. a. Riedel-de-Haën AG, Seelze
- Trichlormethan, p. a. Riedel-de-Haën AG, Seelze

### **5.3.3 Darstellung des Phosphat-Reagenzes**

Um den Reaktionsverlauf der Lipidsynthesen besser verfolgen zu können, wurde bei der Dünnschicht-Chromatographie ein Reagenz eingesetzt, welches mit Phosphat bei hohen Temperaturen einen tiefblauen Komplex bildet („Molybdänblau“). Die Darstellung dieser Verbindung erfolgte nach einer Vorschrift von *Hahn und Luckhaus* [1956]:

In einem 1000 ml-Becherglas werden 6.85 g Natriummolybdat-dihydrat und 400 mg Hydraziniumsulfat in 100 ml Wasser gelöst. Anschließend stellt man den Behälter in ein Eisbad und gibt unter starkem Rühren innerhalb von etwa 30 Minuten schrittweise 100 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzu, wobei die farblose Lösung schlagartig dunkelblau wird und sich auf ca. 50° C erwärmt. Nach diesem Vorgang füllt man das Becherglas langsam mit kaltem Wasser auf 1000 ml auf. Für die gesamte Prozedur benötigt man etwa 40 Minuten,

eine eventuelle Zerstörung des aktiven Komplexes durch die schnelle Zugabe der Säure und die damit verbundene Temperaturerhöhung konnte trotz zahlreicher Ansätze nicht beobachtet werden.

#### **5.3.4 Isolierung von Phospholipase D**

Die Isolierung von Phospholipase D wurde auf der Grundlage von *Eibl und Kovatchev* [1981] wie folgt durchgeführt:

Die inneren weißen Blätter eines möglichst frischen Wirsings (etwa 300 g bei einem 700 g schweren Wirsing) werden mit 250 ml eisgekühltem bidestilliertem Wasser versetzt und ca. drei Minuten vorsichtig mit einem Pürierstab homogenisiert, wobei während dieses Vorganges in regelmäßigen Abständen etwas Eis hinzugegeben wird, um die Lipase nicht durch Erwärmung zu zerstören. Anschließend nutschts man die festen Bestandteile ab und wäscht mit etwa 100 ml bidestilliertem Eiswasser nach. Die grünbraune Lösung wird zentrifugiert (30 min bei 4500 rpm und 2 °C) und von dem braunen Niederschlag abpipettiert.

Um die Lipase in eine konzentriertere Form zu bringen und gezielter einsetzen zu können, empfiehlt sich zusätzlich zu *Eibl und Kovatchev* die folgende weitere Vorgehensweise:

Damit andere noch vorhandene Enzyme zerstört werden [Davidson und Long, 1958], rührt man die leicht bräunliche Lösung 15 Minuten in einem 50 °C warmen Wasserbad und zentrifugiert anschließend nochmals (30 min bei 4500 rpm und 2 °C). Der verbleibende milchig grüne Überstand wird von dem bräunlichen Niederschlag abdekantiert und anschließend auf 0 °C gekühlt und mit etwa der gleichen Menge Aceton versetzt. Es entsteht sofort ein weißer, flockiger Niederschlag, welcher von der grünlich klaren Lösung abzentrifugiert (30 min bei 4500 rpm und 0 °C) und in bidestilliertem Eiswasser suspendiert wird. Die gesammelte Suspension wird hiernach nochmals zentrifugiert (90 min bei 4500 rpm und 0 °C) und die überstehende klare Lösung abdekantiert und gefriergetrocknet. Man erhält die Lipase als grünlich-weißen Rückstand, welcher mehrere Monate bei -20° C ohne beobachtbaren Aktivitätsverlust gelagert werden kann, wobei allerdings *Comfurius und Zwaal* [1977] von einem Rückgang der Effektivität um etwa 20% pro Monat ausgehen.



### **5.3.5 Synthese von d<sub>54</sub>-DMPC**

Die Darstellung von perdeutierten Phosphatidylcholinen spielt in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle, da alle anderen Lipidtypen (PA, PG und PE) ausnahmslos über enzymatische Transphosphatidierungsreaktionen aus PC synthetisiert werden, wobei noch erschwerend hinzukommt, daß die als Ausgangssubstanz dienenden perdeutierten Fettsäuren recht teuer sind und somit nur in geringen Mengen eingesetzt werden können. Dieser Sachverhalt erfordert daher eine sehr sorgfältige Arbeitsweise und möglichst optimierte Synthesebedingungen. Letztere konnten aufgrund von zahlreichen Experimenten und Blindproben ermittelt werden und sind in der nachfolgenden Vorschrift detailliert beschrieben. Die prinzipielle Vorgehensweise läßt sich dabei gedanklich in zwei Schritte zerlegen, nämlich zum einen die chemische Aktivierung der Fettsäuren und zum anderen deren nukleophile Addition an das L- $\alpha$ -Glycerophosphatidylcholin (GPC), welches wegen der besseren Handhabung in Form eines Cadmiumkomplexes eingesetzt wird. Was die Aktivierung betrifft, so hat sich der Weg über das Säureanhydrid als sehr geeignet erwiesen, wohingegen die Bildung eines Carbonsäureimidazolids nach *Rürup et al.* [1994] eine deutlich schlechtere Ausbeute liefert.

#### *5.3.5.1 Vorbehandlung der Lösungsmittel*

Die zur Lipidsynthese verwendeten Lösungsmittel Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform werden etwa drei Tage über Phosphorpentoxid unter Rückfluß getrocknet [Gupta et al., 1977] und vor ihrer Verwendung jeweils frisch destilliert. Um die Bildung von Radikalen bzw. die Aufnahme von Wasser zu verhindern, wurden beide Substanzen während dieser Zeit unter Lichtausschluß (Alufolie) und Schutzgasatmosphäre gelagert. Da handelsübliches Chloroform zur Stabilisierung mit rund einem Volumenprozent Ethanol versetzt ist, muß dieses vor der Trocknung entfernt werden, was am besten dadurch geschieht, daß man das CHCl<sub>3</sub> in einem Verhältnis von 90:1 (w/w) über eine Säule mit basischem Aluminiumoxid schickt [Moskovitz, 1980], das zuvor mehrere Tage bei 250 °C ausgeheizt wurde.

Während der absolutierte Tetrachlorkohlenstoff ohne merkliche Qualitätseinbußen mehrere Wochen verwendet werden kann, zeigen einige Experimente, daß sich bei Chloroform das Fehlen eines Stabilisators bereits nach einigen Tagen wegen der Bildung

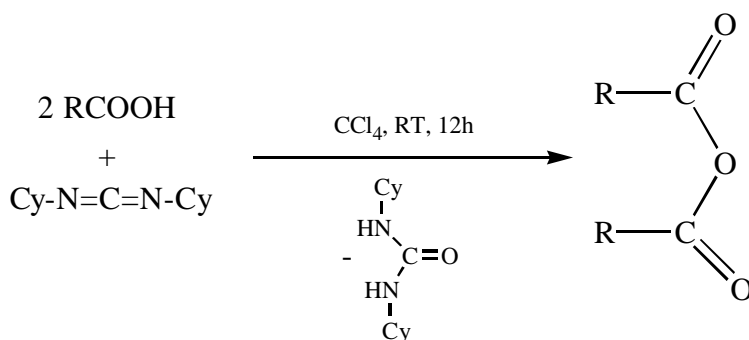
von Phosgen in Form von geringeren Ausbeuten negativ bemerkbar macht, so daß dieses Lösungsmittel stets vor jeder Synthese erneuert wurde.

### 5.3.5.2 Darstellung des L- $\alpha$ -Glycerophosphatidylcholin-Cadmiumkomplexes

Nach *Baer und Kates* [1948] nimmt man 5.8 g (31.6 mmol) Cadmiumchlorid-dihydrat in 4 ml bidestilliertem Wasser auf und gibt 65 ml Ethanol hinzu. Diese Lösung versetzt man unter Rühren mit 5.4 g (211 mmol) L- $\alpha$ -Glycerophosphatidylcholin (GPC) in 75 ml Ethanol und kühlt anschließend auf 0 °C ab, wobei der GPC-Cadmiumkomplex ausfällt. Der Niederschlag wird abgefrittet, mit Ethanol und Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Da das entstandene rein weiße Produkt sehr hygroskopische Eigenschaften besitzt [Chadha, 1970], ist eine Aufbewahrung unter Schutzgas unumgänglich. Kurz vor jedem Einsatz wurde außerdem zusätzlich – um die Restfeuchtigkeit zu entfernen – die für die Synthese verwendete Substanzmenge nochmals in wenig Benzol suspendiert, etwa zwei Stunden im Hochvakuum trockengezogen und hiernach direkt umgesetzt.

### 5.3.5.3 Darstellung von $d_{54}$ -Myristinsäureanhydrid

Die Synthese erfolgt auf der Grundlage von *Selinger und Lapidot* [1966] gemäß der folgenden Reaktionsgleichung:



**Abbildung 119:** Synthese von  $d_{54}$ -Myristinsäureanhydrid ( $R = C_{13}D_{27}$ ,  $\text{Cy} = \text{Cyclohexyl}$ ,  $\text{RT} = \text{Raumtemperatur}$ ).

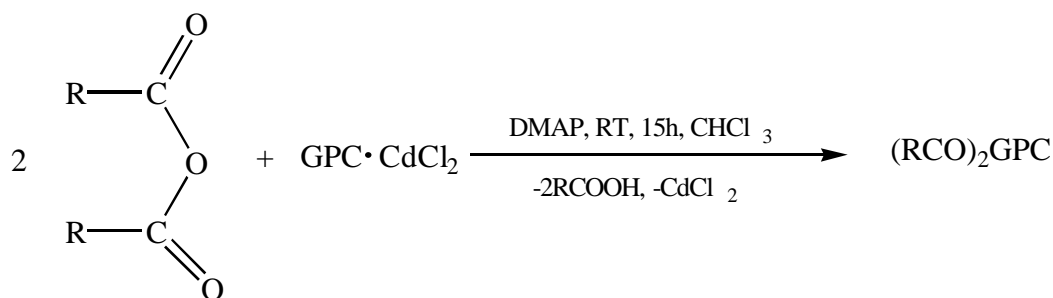
In einem 100 ml-Kolben mit Hahn löst man unter Schutzgasatmosphäre etwa 505 mg (2.45 mmol) azeotrop getrocknetes N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in etwa 50 ml

absoluiertem Tetrakohlenstoff und gibt die entstandene farblose Lösung in einen weiteren 100 ml-Kolben mit 1 g (3.92 mmol) azeotrop getrockneter  $d_{54}$ -Myristinsäure. Anschließend schützt man das Reaktionsgefäß mittels Alufolie vor Licht und läßt das Gemisch etwa zwölf Stunden unter Inertgas rühren, wobei bereits nach wenigen Minuten eine erste Trübung eintritt. Der Verlauf der Reaktion kann mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf einer Kieselgelplatte und einem Petrolether (30-74 °C)/Diethylether-Gemisch (4:1 v/v) als Eluent verfolgt werden. Durch Veraschen des Chromatogramms können die jeweiligen  $R_f$ -Werte für das Anhydrid (etwa 0.7) und die Säure (etwa 0.2) leicht bestimmt und die Mengenverhältnisse in etwa abgeschätzt werden. Das eingesetzte Ethergemisch wird nur bei diesem Reaktionsschritt verwendet, für alle weiteren DC-Untersuchungen dient das System  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  (65:25:5 v/v/v) als Laufmittel.

Nach Beendigung der Reaktion wird die klare Lösung von dem ausgefallenen Harnstoffderivat über eine vorher gewogene D4-Fritte im Schutzgasstrom abgetrennt, der Niederschlag mit wenig absoluiertem Tetrachlorkohlenstoff gewaschen und das Filtrat anschließend zur Trockne einrotiert. Das farblose wasserempfindliche Anhydrid wird anschließend im Hochvakuum getrocknet und bis zur weiteren Umsetzung (welche möglichst noch am selben Tag erfolgen sollte) unter Schutzgas gelagert. Durch Wiegen des auf der Fritte verbliebenen Harnstoffes läßt sich die Ausbeute der Reaktion feststellen (allerdings muß man diese wegen der großen molekularen Masse von Tetrachlorkohlenstoff vorher sehr sorgfältig trocknen), sie betrug bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Synthesen meist über 95% bezogen auf die eingesetzte Fettsäure.

#### 5.3.5.4 Darstellung von $d_{54}$ -DMPC

Abgesehen von einigen Modifikationen wurde die Veresterung des Glycerinderivates durch die perdeutერიerten Fettsäuren nach einer Vorschrift von *Gupta et al.* [1977] gemäß der folgenden Reaktionsgleichung durchgeführt:



**Abbildung 120:** Synthese von  $d_{54}$ -DMPC ( $R = C_{13}D_{27}$ ,  $(\text{RCO})_2\text{GPC} = d_{54}\text{-DMPC}$ ,  
 RT = Raumtemperatur, DMAP = N,N-Dimethyl-4-aminopyridin.

Ein halbes Äquivalent des GPC-Cadmiumkomplexes ( $M = 439.8 \text{ g/mol}$ ) im Verhältnis zu der eingesetzten Menge an Anhydrid ( $M = 489.25 \text{ g/mol}$ ) wird in einem geeigneten Kolben mit Hahn azeotrop getrocknet. Dabei ist es sinnvoll, bei der Abschätzung der vorhandenen Anhydridmenge eher einen pessimistischer Wert (meist 95% der eingesetzten Fettsäuremenge) anzunehmen, um später die Bildung von Lyso-PC zu vermindern.

In einem weiteren Kolben werden etwa 7.5 Äquivalente N,N-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP) ( $M = 122.17 \text{ g/mol}$ ) bezogen auf das eingesetzte Anhydrid ebenfalls azeotrop getrocknet. Da ersteres sehr lichtempfindlich ist, muß es vor der Nutzung mehrfach aus Aceton umkristallisiert und unter Lichtausschluß aufbewahrt werden. Zur Beschleunigung der Synthese und Erhöhung der Ausbeute wird in der Literatur teilweise ein zehnfacher Überschuß an DMAP eingesetzt [Mangroo und Gerber, 1988], allerdings wurde bei den eigenen Experimenten auf solch hohe Konzentrationen verzichtet, da hierdurch die spätere Reinigung noch zusätzlich erschwert wird.

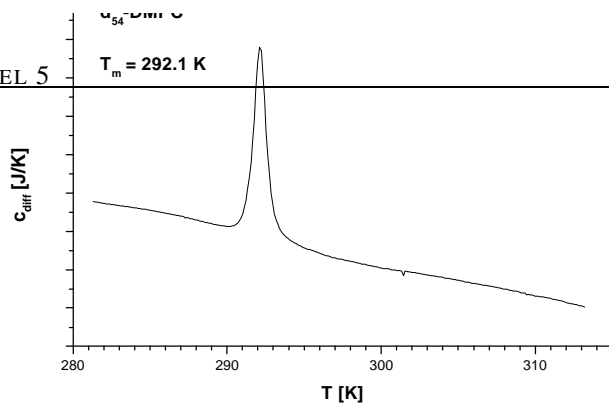
Unter Schutzgasatmosphäre werden anschließend DMAP und Anhydrid in wenigen ml frisch destilliertem absolutiertem Chloroform aufgenommen und zu dem unlöslichen GPC-Komplex gegeben. Die entstandene DMAP-Lösung sollte sich dabei keinesfalls gelb färben, da dies auf eine unzureichende Reinigung zurückzuführen ist und die Ausbeute beeinträchtigt. Das heterogene Gemisch wird etwa 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt [Singh, 1990] um die Reaktionsfläche zu vergrößern, und hiernach für ungefähr 15 Stunden unter Lichtausschluß und Schutzgasatmosphäre heftig gerührt.

Die Synthese kann bequem mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überwacht werden, wobei man in diesem Fall das Gemisch  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  (65:25:5 v/v/v) als Laufmittel verwendet. Besprühen der getrockneten DC-Platten mit dem bereits beschriebenen Phosphat-Reagenz und anschließendes Erwärmen mittels Heißluftgebläse zeigt das entstandene Produkt als tiefblauen Fleck bei einem  $R_f$ -Wert von etwa 0.3, wogegen das entsprechende Lyso-Produkt (sofern überhaupt vorhanden) nur als schwacher blauer Schatten ( $R_f \approx 0.1$ ) zu erkennen ist. Zusätzlich läßt sich die nicht umgesetzte Fettsäure durch Veraschen sichtbar machen ( $R_f \approx 0.9$ ), eventuell noch vorhandenes GPC kann mit den verwendeten Methoden allerdings nicht detektiert werden.

Nach Beendigung der Umsetzung verdünnt man das Reaktionsgemisch mit etwa 100 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (4:1 v/v) und schüttelt zur Entfernung des Cadmiums mit 100 ml 0.1 molarer EDTA-Lösung (pH 8-9) aus. Die Phasentrennung der entstehenden milchig weißen Emulsion kann mehrere Stunden in Anspruch nehmen, wobei sich dieser Vorgang jedoch durch die portionsweise Zugabe von Methanol und nochmaligem Schütteln deutlich beschleunigen läßt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Fraktion so lange mit je ca. 30 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (4:1 v/v) extrahiert, bis bei der DC der eingengten Waschphase kein Produktfleck mehr auftritt (etwa vier- bis fünfmal). Die vereinigten organischen Phasen werden mit etwa 50 ml kaltem bidestilliertem Wasser gewaschen, zur Trockne einrotiert und bis zur Aufarbeitung bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

#### 5.3.5.5 Chromatographische Reinigung

Die Trennung des entstandenen Phospholipids von den restlichen Bestandteilen erfolgt chromatographisch (20 g Kieselgel bei einem Säulendurchmesser von 5 cm), wobei das eingesetzte Kieselgel vor seiner Verwendung jeweils drei Tage bei  $250^\circ \text{C}$  ausgeheizt wurde. Das Produktgemisch wird in wenigen ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1 v/v) aufgenommen und auf die Säule gebracht. Anschließend eluiert man mit Hilfe eines Chloroform/Methanol-Gemisches der Gradienten 100:0 und 9:1 (jeweils etwa 1 l) die nicht umgesetzte Fettsäure und das DMAP, bis bei den regelmäßig angefertigten DCs (alle 250 ml) keine Substanzflecken mehr erkennbar sind. Eventuell noch vorhandene Harnstoffreste werden dabei auf der Säule als weiße fraktale Gebilde sichtbar, welche in größeren Mengen eventuell die Trennwirkung beeinträchtigen können.

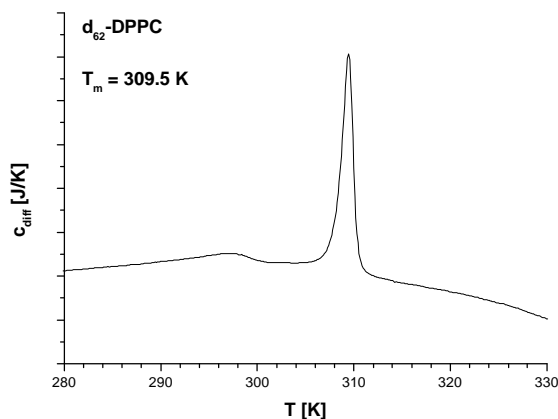


**Abbildung 121:** DSC-Kurve von synthetisiertem  $d_{54}$ -DMPC (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur.

Bei einem Gradienten von 4:1 (etwa 2.5 l) läßt sich das DMPC von der Säule waschen, bevor gegen Ende dieser Fraktion auch erste Spuren von Lyso-PC erhalten werden. Letzteres wird hiernach mit einem 1:1-Gemisch vollständig eluiert und kann zusammen mit der Fettsäure wieder eingesetzt werden. Die gesammelten Produkt-Fractionen werden einrotiert und das reinweiße  $d_{54}$ -DMPC anschließend durch Zugabe von Benzol azeotrop getrocknet, wobei die höchste erzielte Ausbeute hierbei 91% bezogen auf die eingesetzte Menge an GPC betrug.

### **5.3.6 Darstellung von $d_{62}$ -DPPC**

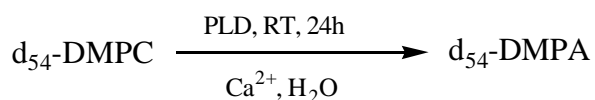
Die Darstellung von perdeutertem DPPC erfolgt analog zu der oben ausgeführten Synthese von  $d_{54}$ -DMPC, allerdings bewirken die längeren Acylketten der verwendeten Palmitinsäure eine reproduzierbare drastische Verringerung der Ausbeute auf etwa 30% bezogen auf das eingesetzte GPC.



*Abbildung 122: DSC-Kurve von synthetisiertem  $d_{62}$ -DPPC (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur.*

### 5.3.7 Darstellung von $d_{54}$ -DMPA

Die Synthese von  $d_{54}$ -DMPA aus dem entsprechenden DMPC erfolgt relativ problemlos mit Hilfe der aus Wirsing gewonnenen Phospholipase D nach dem folgenden Reaktionsschema [Comfurius und Zwaal, 1977]:



*Abbildung 123: Synthese von  $d_{54}$ -DMPA (PLD = Phospholipase D (gewonnen aus Wirsing), RT = Raumtemperatur).*

Im Prinzip handelt es sich dabei um eine Transphosphatidylierungsreaktion, bei der die Cholin-Kopfgruppe enzymatisch abgespalten und durch die OH-Gruppe eines Wassermoleküls ersetzt wird.

Für die Aktivität der Lipase ist die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen essentiell [Yamamoto et al., 1995], daher stellt man vor Beginn der eigentlichen Umsetzung eine Pufferlösung her, welche 0.1 M Calciumchlorid-dihydrat und 0.1 M Natriumacetat enthält und mittels Essigsäure bzw. NaOH auf einen optimalen pH von 5.6 eingestellt wird [Comfurius und Zwaal, 1977].

Die eigentliche Reaktion muß in einem Zweiphasensystem durchgeführt werden, da das eingesetzte Phospholipid in Wasser unlöslich ist und die Lipase in einem nicht-wässrigen Medium ihre Reaktivität verliert [Klibanov et al., 1977]. Man legt daher in einem 50 ml-Kolben 30 mg Phospholipase D in etwa 14 ml Pufferlösung vor und gibt 200 mg  $d_{54}$ -DMPC (270  $\mu$ mol) in etwa 10 ml Diethylether hinzu, wobei dieser vorher durch mehrfaches Ausschütteln mit Wasser oder Trocknen über  $\text{CaCl}_2$  von eventuell vorhandenem Ethanol getrennt werden muß [Lee et al., 1985]. Danach dunkelt man den Kolben ab und läßt das Reaktionsgemisch etwa 24 Stunden heftig rühren. Auf die Zugabe von 2-Butanol als Phasentransferkatalysator [Eibl und Kovatchev, 1981] wird hierbei verzichtet, nachdem bei einer Testreaktion signifikante Mengen an Isobutylester ( $R_f \approx 0.6$ ) entstanden.

Nach Beendigung der Reaktion hat sich ein weißer Niederschlag gebildet. Der Ether wird vorsichtig abrotiert, der Niederschlag durch Ultraschallbehandlung in einem warmen Chloroform/Methanol-Gemisch (4:1 v/v) gelöst und die wässrige Phase mehrmals mit einem  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Gemisch (4:1 v/v) ausgeschüttelt, bis bei den angefertigten DCs keine blauen Flecken mehr erkennbar sind. Nach dem Zusammenführen der organischen Phasen wäscht man mit 30 ml einer 0.1 M EDTA-Lösung (pH 8-9) und rotiert anschließend zur Trockne ein.

Die Aufarbeitung des weißen Rückstandes erfolgt chromatographisch über eine Carboxymethyl-Cellulose-Säule [Comfurius und Zwaal, 1977]: Der Rückstand wird in wenig warmem Chloroform gelöst und auf die Säule gebracht, anschließend eluiert man mit etwa 500 ml  $\text{CHCl}_3$  eventuelle Verunreinigungen und mit etwa 800 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5 v/v) das nicht umgesetzte DMPC. Bei einem Gradienten von 3:2 erhält man im Anschluß daran das entstandene  $d_{54}$ -DMPA mit einer Ausbeute von 85% bezogen auf das eingesetzte  $d_{54}$ -DMPC.

Mittels DC können die beiden Lipide leicht voneinander unterschieden werden, mit dem verwendeten Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  (65:25:5 v/v/v) besitzen die PCs nämlich einen  $R_f$ -Wert von etwa 0.3, während im Falle von PA keine Wanderung zu erkennen ist.



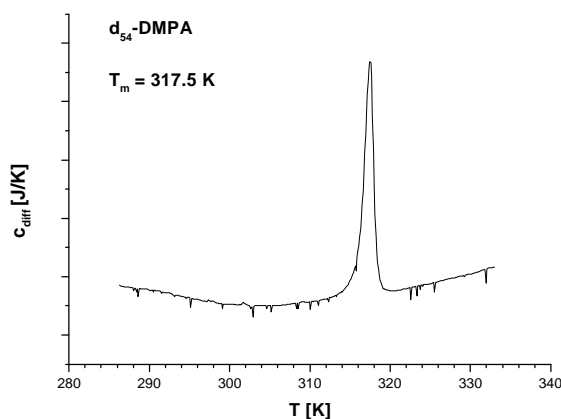


Abbildung 124: DSC-Kurve von synthetisiertem  $d_{54}$ -DMPA (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur.

### 5.3.8 Darstellung von $d_{54}$ -DMPG

Bei der Darstellung von DMPG muß die Cholin-Kopfgruppe mit Hilfe der eingesetzten Lipase durch ein Glycerin-Molekül ersetzt werden. Ein Ansatz analog zu der oben ausgeführten PA-Synthese in Gegenwart von Glycerin liefert allerdings lediglich eine sehr geringe Ausbeute [siehe auch Lee et al., 1985], was die Synthese aufgrund der wertvollen Ausgangssubstanz unökonomisch macht. Da das selektive Verhalten der Phospholipase D (PLD) jedoch stark von dem Organismus abhängt, welcher sie produziert [Nakajima et al., 1994], können mit Hilfe einer nicht käuflichen PLD aus einem *streptomyces species*-Stamm wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Das verwendete Enzym (mit einer Aktivität von 115 u/mg) wurde freundlicherweise durch den Arbeitskreis Schmid des Instituts für Biochemie der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt, und die Synthese basiert mit einigen Veränderungen auf den Untersuchungen von Pisch [1996]:

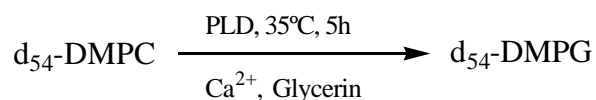


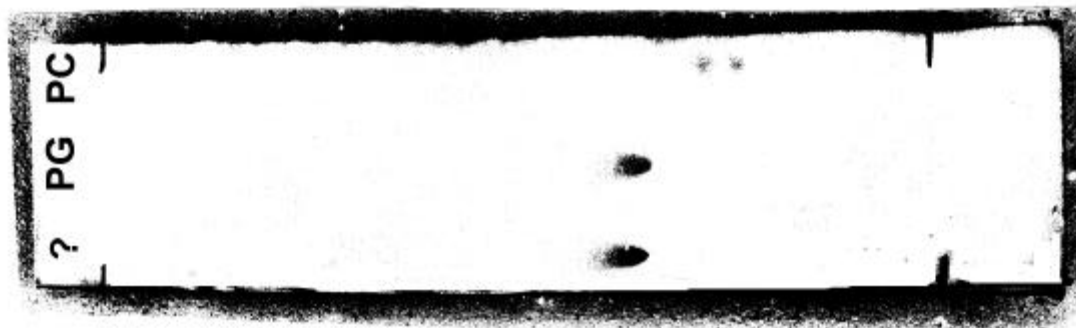
Abbildung 125: Synthese von  $d_{54}$ -DMPG (PLD = Phospholipase D (gewonnen durch *streptomyces species*)).

In einem 50 ml-Kolben löst man 0.86 mg Phospholipase D in 20 ml der bereits beschriebenen Pufferlösung und gibt hierzu 3.2 ml Glycerin. Anschließend versetzt man mit 13 ml mehrfach mit Wasser ausgeschütteltem (oder absolutiertem) Chloroform [Laane et al.,

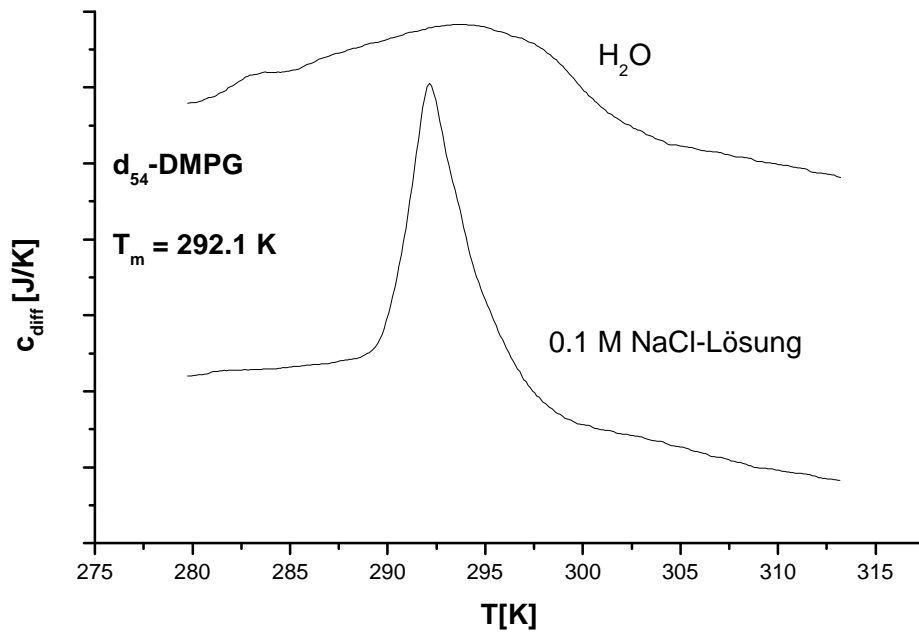
1987], in dem 90.5 mg (123.6 mmol)  $d_{54}$ -DMPC gelöst wurden. Bei diesem Schritt ist zu beachten, daß sich die Lipase stets in einer wässrigen Umgebung befinden muß (ein Vorlegen der Chloroformlösung hat eine totale Deaktivierung des Enzyms zur Folge) und daß nicht ausgeschütteltes käufliches Chloroform zur Stabilisierung stets Ethanol enthält, wodurch bei der Synthese deutliche Mengen an Phosphatidylethanol ( $R_f \approx 0.9$ ) entstehen. Das heterogene Reaktionsgemisch wird in einem 35°C warmem Wasserbad für fünf Stunden heftig gerührt. Die DC zeigt nach dieser Zeit eine quantitative Umsetzung in  $d_{54}$ -DMPG ( $R_f \approx 0.6$ ).

Nach der Reaktion wird das Gemisch wie bei der PA-Synthese beschrieben aufgearbeitet und über 10 g Kieselgel (Durchmesser 5 cm) gesäult. Dabei werden die Verunreinigungen mit jeweils einem Liter  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (v/v) der Gradienten 98:2 und 95:5 eluiert und das Produkt anschließend mit 92:8 herausgewaschen. Bei den kontinuierlich durchgeführten DC-Kontrollen konnte hierbei kein mitlaufendes PC detektiert werden.

Als Ergebnis erhält man 40 mg (53.8 mmol) reinweißes Produkt, was einer Ausbeute von etwa 44% bezogen auf das eingesetzte PC entspricht.



**Abbildung 126:** *Dünnschichtchromatogramm (Wanderungsrichtung von rechts nach links) des synthetisierten  $d_{54}$ -DMPG (unten) im Vergleich zu den Referenzwerten von DMPG (mitte) und DMPC (oben); bei DMPC erkennt man deutlich das Auftreten von Lyso-PC (rechter Fleck).*



*Abbildung 127: DSC-Kurve von synthetisiertem  $d_{54}$ -DMPG (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur, gemessen in Wasser bzw. 0.1 M NaCl-Lösung.*

### 5.3.9 Darstellung von d<sub>62</sub>-DPPG

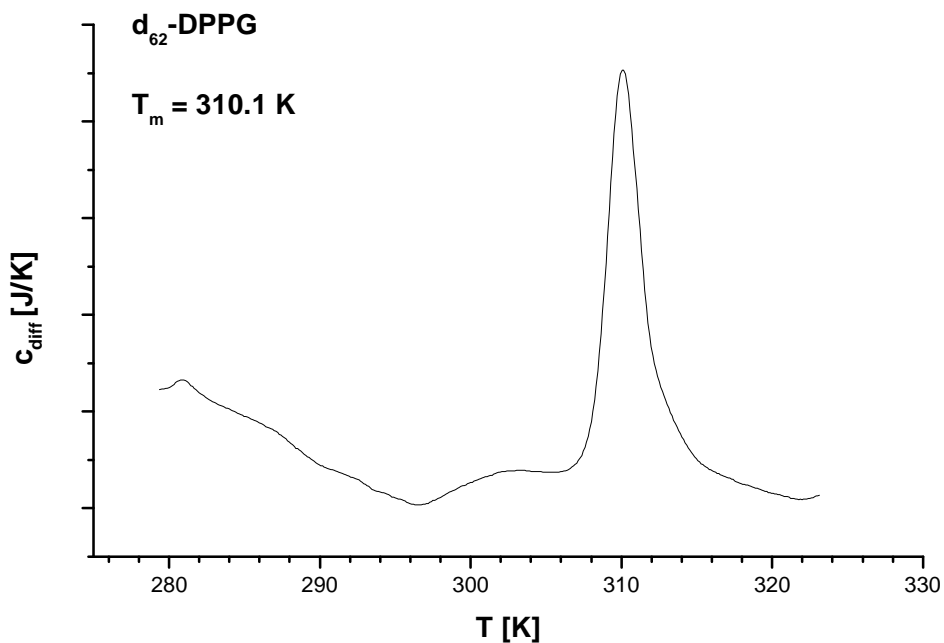


Abbildung 128: DSC-Kurve von synthetisiertem d<sub>62</sub>-DPPG (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur, gemessen in 0.1 M NaCl-Lösung.

Die Synthese von d<sub>62</sub>-DPPG erfolgt analog zu der von d<sub>54</sub>-DMPG. Bei den durchgeführten Umsetzungen konnte allerdings eine Ausbeute von etwa 60% erzielt werden.

### 5.3.10 Darstellung von d<sub>54</sub>-DMPE

Analog zu den bereits beschriebenen Transphosphatidylierungsreaktionen wurde für die Synthese von d<sub>54</sub>-DMPE wieder Phospholipase D von *streptomyces species* verwendet:

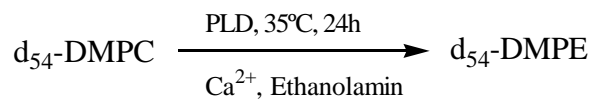
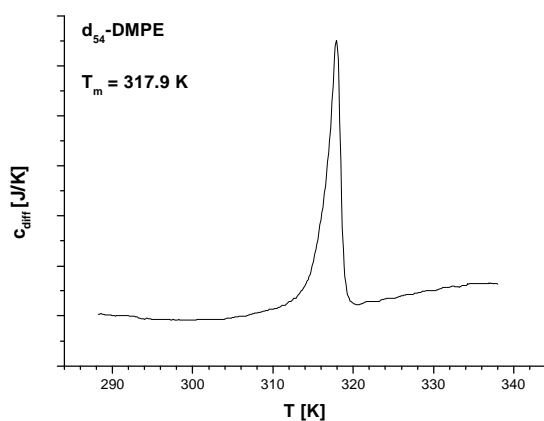


Abbildung 129: Synthese von d<sub>54</sub>-DMPE (PLD = Phospholipase D (gewonnen durch *streptomyces species*)).

Die Umsetzung verläuft analog zu der Synthese von d<sub>54</sub>-DMPG, allerdings werden anstelle von Glycerin etwa 30 Volumenprozent Ethanolamin (bezogen auf die Pufferlösung)

eingesetzt. Da letzteres jedoch sehr stark basisch ist ( $\text{pH} > 12$ ), zerstört es bei direkter Verwendung die Lipase und muß daher zuvor (mit konzentrierter HCl) auf einen pH von etwa 5.6 eingestellt werden, wobei eine tiefgelbe Färbung eintritt. Das  $d_{54}$ -DMPE entsteht bei den gewählten Bedingungen annähernd quantitativ ( $R_f \approx 0.7$ ), ohne daß mittels DC eine Verunreinigung mit PA oder PC detektiert werden konnte.

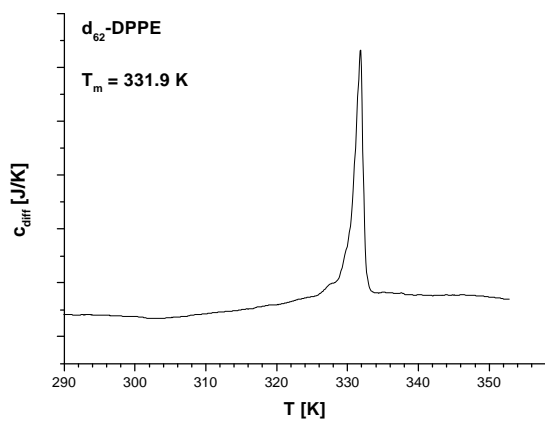
Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgt wie bereits beschrieben. Gesäult wird über Kieselgel, wobei bei einem Gradienten von 95:5 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  v/v) das noch vorhandene Ethanolamin eluiert wird. Bei einem Verhältnis von 94:6 wird das Produkt von der Säule gewaschen, welches allerdings aufgrund des geringen Gradientenunterschiedes noch eine leicht gelbliche Färbung aufweist.



*Abbildung 130: DSC-Kurve von synthetisiertem  $d_{54}$ -DMPE (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur.*

### 5.3.11 Darstellung von $d_{62}$ -DPPE

Die Reaktion verläuft vollkommen analog zu der Umsetzung von  $d_{54}$ -DMPE und liefert annähernd quantitativ das gewünschte Produkt, welches allerdings nach der chromatographischen Reinigung ebenfalls einen leichten Gelbstich aufweist.



**Abbildung 131:** DSC-Kurve von synthetisiertem  $d_{62}$ -DPPE (Reaktionskontrolle) ohne Basislinienkorrektur.

---

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

### 6.1 THEORETISCHE ARBEITEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die grundlegende Software für die Durchführung von Monte Carlo-Simulationen zu entwickeln, so daß auf dieser Basis unterschiedliche physikalische Modelle zur Untersuchung von wässrigen Lipidmonoschichten implementiert und die hieraus erhaltenen Ergebnisse analysiert werden konnten.

In einem ersten Schritt wurden Einphasen-/Zweikomponentensysteme mit und ohne makroskopische Phasenseparation (DMPC/DMPE bzw. DMPC/DPPE) bei konstanter Temperatur und verschiedenen Molenbrüchen betrachtet. Als experimentelle Vorgabe dienten hierbei kalorimetrisch ermittelte Informationen in Form von Nichtidealitätsparametern, welche durch die Simulation in experimentell nur schwer zugängliche mikroskopische Ergebnisse bezüglich Domänenstruktur und Mischungsasymmetrie transformiert werden konnten.

Zur Untersuchung von PC/PG-Gemischen wurden zusätzlich *Coulomb*-Wechselwirkungen über 90 nächste Nachbarn in das Modell integriert und anschließend Rechnungen mit variabler Partialladung durchgeführt, um auf diese Weise generelle Informationen über rein elektrostatisch bedingtes Mischungsverhalten zu gewinnen. Dabei stellte sich heraus, daß die geladenen Teilchen trotz der existierenden repulsiven Kräfte Domänenstrukturen bilden. Außerdem scheinen die *Coulomb*-Kräfte in PC/PG-Systemen offenbar eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, wie der Vergleich mit den kalorimetrisch ermittelten Nichtidealitätsparametern zeigt.

Zur Simulation von Zweiphasen-/Einkomponentensystemen wurden unterschiedliche Modelle herangezogen, nämlich ein einfaches Zweizustandssystem auf der Basis von kalorimetrisch ermittelten Daten und ein komplexeres Modell („*Pink*-Modell“) mit temperaturabhängigem Grundzustand und spezifischen molekularen Größen als physikalische Grundlage. Ersteres wurde zur Simulation des Hauptphasenübergangs von DMPC verwendet, wobei in diesem Zusammenhang detaillierte statistische Untersuchungen

bezüglich des Domänenverhaltens vorgenommen wurden, welche mit den vorhandenen experimentellen Daten überwiegend gut übereinstimmen. Ferner wurde versucht, die experimentell ermittelte Permeabilität von DMPC-Vesikeln in direkter Abhängigkeit von der Anzahl der simulierten Gel-fluid-Grenzflächen zu beschreiben, was bis zu einer Temperatur knapp oberhalb von  $T_m$  auch sehr gut gelang.

Mit dem *Pink*-Modell konnten nach einigen grundlegenden Annahmen (Umwandlung zweiter Ordnung, lineare Skalierung des Wechselwirkungsparameters  $J$ ) die Phasenübergänge von DLPC, DMPC, DPPC und DSPC ohne die manuelle Variation eines einzigen anpaßbaren Parameters in überraschend guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten simuliert werden.

Des weiteren wurde das Ziel erreicht, durch geeignete Modifikation des *Pink*-Modells die Simulation von Zweiphasen-/Zweikomponentensystemen zu ermöglichen. Mit Hilfe der Parameter aus der Simulation der Einkomponentensysteme war somit die Berechnung von Wärmekapazitätskurven und Phasendiagrammen pseudobinärer PC/PC-Systeme ohne weitere äußere Einflußnahme möglich und lieferte eine sehr gute qualitative Übereinstimmung mit den kalorimetrischen Ergebnissen. Aufgrund dieser Tatsache wurde auch hier für die Extrembeispiele DMPC/DPPC und DLPC/DSPC eine umfassende Domänenstrukturanalyse durchgeführt, wobei sich unter anderem zeigt, daß der Phasenübergang bevorzugt über die Vergrößerung bereits vorhandener Domänen und nicht über deren Neuentstehung verläuft.



## 6.2 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Im Rahmen der präparativen Arbeiten wurden zahlreiche perdeuterierte Phospholipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen aus den entsprechenden Fettsäuren synthetisiert, wobei Ausbeute und Dauer der Reaktion im Vergleich zu den Literaturangaben optimiert werden konnten.

Im Mittelpunkt der physikalisch-chemischen Untersuchungen stand die Analyse des Mischungsverhaltens von wässrigen PC/PE- und PC/PG-Gemischen in der flüssig-kristallinen Phase mit je zwei acylierten Palmitin- bzw. Myristinsäureeinheiten pro Molekül. Hierzu wurden zuerst die im Arbeitskreis noch nicht vorhandenen kalorimetrischen Daten für die PC/PE-Systeme sowie für das Gemisch DMPC/DPPG ermittelt. Des Weiteren wurden äquimolare PC/PC-, PC/PE-, PE/PE-, PC/PG- und PG/PG-Gemische aus je einer perdeuterierten und einer undeuterierten Komponente hergestellt und zusammen mit den Reinstoffen sowohl  $^2\text{H}$ -NMR- als auch FTIR-spektroskopisch vermessen. Auf diese Weise war es möglich, die einzelnen Lipidkomponenten in der Mischung getrennt voneinander zu beobachten.

Im Falle von PC und PE findet man mit allen verwendeten Methoden übereinstimmend eine sehr gute Mischbarkeit zwischen gleichköpfigen bzw. gleichkettigen Komponenten, wobei jedoch das PE auch bei gleicher reduzierter Temperatur eine deutlich höhere Kettenordnung als das analoge PC aufweist. Einzig das Phasendiagramm von DMPC/DPPE deutet auf eine makroskopische Entmischung in der Gelphase hin, welche in der flüssig-kristallinen Phase jedoch nicht mehr zu beobachten ist. Zusätzlich läßt sich bei allen PC/PE-Systemen eine deutliche Mischungsasymmetrie feststellen, da bereits geringe Mengen an PE die Wärmekapazitätskurven von PC signifikant beeinflussen, während dies umgekehrt weitaus weniger der Fall ist. Anhand der  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren gelingt es zudem in recht guter Näherung, den Einfluß von Kopfgruppen- und Kettenlängeneffekten in definierte Beträge aufzuschlüsseln und durch einfache Addition dieser Terme gezielt Vorhersagen für die Systeme DMPC/DPPE und DPPC/DMPE zu machen.

Die kalorimetrisch ermittelten Phasendiagramme der PC/PG-Systeme zeigen ausnahmslos eine sehr gute Mischbarkeit der jeweiligen Komponenten, was sich auch durch die spektroskopischen Daten bestätigt. Eine ausgeprägte Mischungsasymmetrie wie im Falle

von PC/PE ist hierbei nicht zu beobachten. Zudem liefern die Spektren der gleichkettigen Reinstoffe Informationen, die auf eine sehr ähnliche Kettenordnung der beiden Lipidtypen schließen lassen. Eine unerwartete Ausnahme bildet jedoch das Gemisch DMPC/DPPG, bei welchem die  $^2\text{H}$ -NMR-Daten auf die Bildung von Mikrodomänen gleicher Moleküle hinweisen. Die Analyse der IR-spektroskopisch ermittelten  $\text{CH}_2$ -Kippschwingungsbanden scheint diesen Sachverhalt zu bestätigen, ist aber wegen der großen Fehlertoleranz nicht als Grundlage geeignet, um eine eindeutige Entscheidung zu treffen.

---

## 7 VERWENDETE LITERATUR

---

- Albon, N. und J. M. Sturtevant, *Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978), 75, 2258.
- Alexandrowicz, Z., *Computer-Oriented Approach to the Ensemble Theory*, J. Stat. Phys. (1972), 5, 19.
- Allen, M. P. und D. J. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids* (1987), Oxford University Press, Oxford, England.
- Almeida, P. F. F., W. L. C. Vaz und T. E. Thompson, *Lateral Diffusion and Percolation of the Solid-Phase Domains In-Plane and Across the Lipid Bilayer*, Biochemistry (1992), 31, 7198.
- Amey, R. L. und D. Chapman, *Infrared spectroscopic studies of model and natural biomembranes*, in D. Chapman (Hrsg.), *Biomembrane Structure and Function* (1984), VCH, Weinheim.
- Baer, E. und M. Kates, *L- $\alpha$ -Glycerophosphorylcholine*, J. Am. Chem. Soc. (1948), 70, 1394.
- Bak, P., *Doing physics with microcomputers*, Physics Today (1983), Dezemberausgabe, 25.
- Bayerl, T. M. und M. Bloom, *Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads*, Biophys. J. (1990), 58, 357.
- Binder, K. und D. Stauffer, *A Simple Introduction to Monte Carlo Simulation and Some Specialized Topics*, in K. Binder (Hrsg.), *Applications of the Monte Carlo Method in Statistical Physics* (1984), Topics in Current Physics, 36, Springer-Verlag, Berlin.
- Binder, K. und D. W. Heermann, *Monte Carlo Simulation in Statistical Physics* (1988), Springer-Verlag, Berlin.
- Blokzijl, W. und J. B. F. N. Engberts, *Hydrophobe Effekte – Ansichten und Tatsachen*, Angew. Chem. (1993), 105, 1610.

- Blume, A. und T. Ackermann, *A Calorimetric Study of the Lipid Phase Transitions in Aqueous Dispersions of Phosphorylcholine-Phosphorylethanolamine Mixtures*, FEBS Lett. (1974), 43(1), 71.
- Blume, A., D. M. Rice, R. J. Wittebort und R. G. Griffin, *Molecular Dynamics and Conformation in the Gel and Liquid-Crystalline Phases of Phosphatidylethanolamine Bilayers*, Biochemistry (1982a), 21, 6220.
- Blume, A., R. J. Wittebort, S. K. Das Gupta und R. G. Griffin, *Phase Equilibria, Molecular Conformation, and Dynamics in Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine Bilayers*, Biochemistry (1982b), 24, 6243.
- Blume, A., *Applications of Calorimetry to Lipid Model Membranes*, in C. Hidalgo (Hrsg.), *Physical Properties of Biological Membranes and their Functional Implications* (1988a), Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
- Blume, A.,  *$^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Lipid Model Membranes*, in C. Hidalgo (Hrsg.), *Physical Properties of Biological Membranes and their Functional Implications* (1988b), Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
- Blume, A., *Biological calorimetry: membranes*, Thermochem. Acta (1991), 193, 299.
- Blume, A., *Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies*, Curr. Opin. Colloid and Interface Sci. (1996), 1, 64.
- Boggs, J. M., *Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function*, Biochim. Biophys. Acta (1987), 906, 353.
- Browning, J. L., *Motions and Interactions of Phospholipid Head Groups at the Membrane Surface. 3. Dynamic Properties of Amine-Containing Head Groups*, Biochemistry (1981), 20, 7144.
- Brush, S. G., *History of the Lenz-Ising Model*, Rev. Mod. Phys. (1967), 39(4), 883.
- Brumm, T., A. Möps, C. Dolainsky, S. Brückner und T. M. Bayerl, *Macroscopic orientation effects in broadline NMR-spectra of model membranes at high magnetic field strength*, Biophys. J. (1992), 61, 1018.

- Caillé, A., D. Pink, F. de Verteuil und M. J. Zuckermann, *Theoretical models for quasi-two-dimensional mesomorphic monolayers and membrane bilayers*, Can. J. Phys. (1980), 58(5), 581.
- Casal, H. L. und H. H. Mantsch, *Polymorphic Phase Behaviour of Phospholipid Membranes Studied by Infrared Spectroscopy*, Biochim. Biophys. Acta (1984), 779, 381.
- Casal, H. L. und R. N. McElhaney, *Quantitative Determination of Hydrocarbon Chain Conformational Order in Bilayers of Saturated Phosphatidylcholines of Various Chain Lengths by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Biochemistry (1990), 29, 5423.
- Cascales, J. J. L., J. García de la Torre, S. J. Marrink und H. J. C. Berendsen, *Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane*, J. Chem. Phys. (1996), 104(7), 2713.
- Cates, D. A., H. L. Strauss und R. G. Snyder, *Vibrational Modes of Liquid n-Alkanes: Simulated Isotropic Raman Spectra and Band Progressions for C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>H<sub>42</sub> and C<sub>16</sub>D<sub>34</sub>*, J. Phys. Chem. (1994), 98, 4482.
- Cevc, G. und D. Marsh, *Properties of the electrical double layer near the interface between a charged bilayer membrane and electrolyte solution: Experiment vs. theory*, J. Phys. Chem. (1983), 87, 376.
- Cevc, G. und D. Marsh, *Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models* (1987), John Wiley and Sons, New York.
- Cevc, G., *Effect of Lipid Headgroups and (Nonelectrolyte) Solution on the Structural and Phase Properties of Bilayer Membranes*, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. (1988), 92, 953.
- Chadha, J. S., *Preparation of Crystalline L- $\alpha$ -Glycerophosphorylcholine-Cadmium Chloride Adduct from Commercial Egg Lecithin*, Chem. Phys. Lipids (1970), 4, 104.
- Challa, M. S. S., D. P. Landau und K. Binder, *Finite-size effects at temperature-driven first-order transitions*, Phys. Rev. B (1986), 34(3), 1841.
- Chandler, D., *Introduction to Modern Statistical Mechanics* (1987), Oxford University Press, New York, USA.

- Chapman, D., J. Urbina und K. M. Keough, *Biomembrane Phase Transitions*, J. Biol. Chem. (1974), 249(8), 2512.
- Chen, J. W., F. S. Liu und F. Hwang, *Effects of anisodamine on the phase behavior of DPPG/DMPC binary mixtures*, Chem. Phys. Lipids (1998), 91, 119.
- Chong, P. L.-G., D. Tang und I. Sugár, *Exploration of Physical Principles Underlying Lipid Regular Distribution: Effects of Pressure, Temperature, and Radius of Curvature on E/M Dips in Pyrene-labeled PC/DMPC Binary Mixtures*, Biophys. J. (1994), 66, 2029.
- Cohen, M. H. und F. Reif, *Quadrupole Effects in Nuclear Magnetic Resonance Studies of Solids*, Solid State Phys. (1957), 5, 321.
- Comfurius, P. und R. F. A. Zwaal, *The Enzymatic Synthesis of Phosphatidylserine and Purification by CM-Cellulose Column Chromatography*, Biochim. Biophys. Acta (1977), 488, 36.
- Corvera, E., M. Laradji und M. J. Zuckermann, *Application of finite-size scaling to the Pink model for lipid bilayers*, Phys. Rev. E (1993), 47(1), 696.
- Cullis, P. R., M. J. Hope und C. P. S. Tilcock, *Lipid Polymorphism and the Role of Lipids in Membranes*, Chem. Phys. Lipids (1986), 40, 127.
- Cruzeiro-Hansson, L. und O. G. Mouritsen, *Passive ion permeability of lipid membranes modelled via lipid-domain interfacial area*, Biochim. Biophys. Acta (1988), 944, 63.
- Dammann, B., H. C. Fogedby, J. H. Ipsen, C. Jeppesen, K. Jørgensen, O. G. Mouritsen, J. Risbo, M. C. Sabra, M. M. Sperotto und M. J. Zuckermann, *Computer Simulation of the Thermodynamic and Conformational Properties of Liposomes*, in Y. Barenholz und D. Lasic (Hrsgg.), *Nonmedical Application of Liposomes* (1994), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Dammann, B. und J. H. Ipsen, *An ensemble of vesicles in two dimensions*, Europhys. Lett. (1997), 40, 99.
- Damodaran, K. V. und K. M. Merz Jr., *A Comparison of DMPC- and DLPE-Based Lipid Bilayers*, Biophys. J. (1994), 66, 1076.

- Davidson, F. M. und C. Long, *Structure of the natural occurring phosphoglycerides. IV. Action of cabbage-leaf phospholipase D on oolecithin and related substances*, Biochem. J. (1958), 69, 458.
- Davis, J. H., K. R. Jeffrey, M. Bloom, M. I. Valic und T. P. Higgs, *Quadrupolar Echo Deuteron Magnetic Resonance Spectroscopy in Ordered Hydrocarbon Chains*, Chem. Phys. Letters (1976), 42(2), 390.
- Davis, J. H., *The Description of Membrane Lipid Conformation, Order and Dynamics by <sup>2</sup>H-NMR*, Biochim. Biophys. Acta (1983), 737, 117.
- Dolainsky, C., P. Karakatsanis und T. Bayerl, *Lipid domains as obstacles for lateral diffusion in supported bilayers probed at different time and length scales by two-dimensional exchange and field gradient solid state NMR*, Phys. Rev. E (1997), 55(4), 4512.
- Doniach, S., *Thermodynamic fluctuations in phospholipid bilayers*, J. Chem. Phys. (1978), 68(11), 4912.
- Douliez, J.-P., A. Léonard und E. J. Dufourc, *Conformational Order of DMPC sn-1 versus sn-2 Chains and Membrane Thickness Approach to Molecular Protrusion by Solid State <sup>2</sup>H-NMR and Neutron Diffraction*, J. Phys. Chem. (1996), 100, 18450.
- Dowhan, W., *Molecular Basis for Membrane Phospholipid Diversity: Why Are There So Many Lipids?*, Annu. Rev. Biochem. (1997), 66, 199.
- Duniec, J. T. und S. W. Thorne, *Effects of Discrete Charges and Dielectric Properties of Membrane-Water Interface on Electric Potentials Inside Membranes*, FEBS Lett. (1981), 126(1), 1.
- Eibl, H. und S. Kovatchev, *Preparation of Phospholipids and Their Analogs by Phospholipase D*, Methods Enzymol. (1981), 72, 632.
- Engelke, F., *Aufbau der Moleküle* (1992), 2. Auflage, Teubner Verlag, Stuttgart.
- Ernst, R. R., *Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie (Nobel-Vortrag)*, Angew. Chem. (1992), 104(7), 817.

- Feller, W., *Probability Theory and its Applications* (1950), John Wiley and Sons, New York, USA.
- Ferrenberg, A. M. und R. Swendsen, *New Monte Carlo Technique for Studying Phase Transitions*, Phys. Rev. Lett. (1988), 61(23), 2635.
- Findlay, E. J. und P. G. Barton, *Phase Behavior of Synthetic Phosphatidylglycerols and Binary Mixtures with Phosphatidylcholines in the Presence and Absence of Calcium Ions*, Biochemistry (1978), 17(12), 2400.
- Fishman, G. S., *Multiplicative Congruential Random Number Generators with Modulus  $2^b$ : An Exhaustive Analysis for  $b=32$  and a Partial Analysis for  $b=48$* , Math. Comp. (1990), 189, 331.
- Flory, P. J., *Statistical Mechanics of Chain Molecules* (1989), Carl Hanser Verlag, New York, USA.
- Freire, E. und R. Biltonen, *Estimation of Molecular Averages and Equilibrium Fluctuations in Lipid Bilayer Systems from the Excess Heat Capacity Function*, Biochim. Biophys. Acta (1978), 514, 54.
- Freire, E. und B. Snyder, *Estimation of the Lateral Distribution of Molecules in Two-Component Lipid Bilayers*, Biochemistry (1980a), 19, 88.
- Freire, E. und B. Snyder, *Monte Carlo Studies of the Lateral Organization of Molecules in Two-Component Lipid Bilayers*, Biochim. Biophys. Acta (1980b), 600, 643.
- Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung* (1992), 2. Auflage, VCH, Weinheim.
- Friedberg, R. und J. E. Cameron, *Test of the Monte Carlo Method: Fast Simulation of a Small Ising Lattice*, J. Chem. Phys. (1970), 52(12), 6049.
- Galla, H.-J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie* (1988), Thieme Verlag, Stuttgart.



- Garidel, P. und A. Blume, *Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: Effects of headgroup structure and headgroup charge*, *Biochim. Biophys. Acta* (1998), 1371, 83.
- Garidel, P., Ch. Johann, L. Mennicke und A. Blume, *The mixing behavior of pseudobinary phosphatidylcholine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and chain length*, *Eur. Biophys. J.* (1997a), 26, 447.
- Garidel, P., Ch. Johann und A. Blume, *Nonideal Mixing and Phase Separation in Phosphatidylcholine-Phosphatidic Acid Mixtures as a Function of Acyl Length and pH*, *Biophys. J.* (1997b), 72, 2196.
- Garidel, P., Ch. Johann und A. Blume, *Induction of Fluid-Fluid Immiscibility in Phospholipid Model Membranes: A Calorimetric Study and Thermodynamic Analysis*, *J. Liposome Research* (1998), 8, 58.
- Gawrisch, K. und L. Holte, *NMR investigations of non-lamellar phase promoters in the lamellar phase state*, *Chem. Phys. Lipids* (1996), 81, 105.
- Glauber, R. J., *Time-Dependent Statistics of the Ising Model*, *J. Math. Phys.* (1963), 4(2), 294.
- Gliss, C., H. Clausen-Schaumann, R. Günther, S. Odenbach, O. Randl und T. M. Bayerl, *Direct Detection of Domains in Phospholipid Bilayers by Grazing Incidence Diffraction of Neutrons and Atomic Force Microscopy*, *Biophys. J.* (1998), 74, 2443.
- Gottwald, W. und G. Wachter, *IR-Spektroskopie für Anwender* (1997), Wiley-VCH, Weinheim.
- Griffin, R. G., *Solid State Nuclear Magnetic Resonance of Lipid Bilayers*, *Methods Enzymol.* (1981), 72, 108.
- Groll, R., A. Böttcher, J. Jäger und J. F. Holzwarth, *Temperature dependent intermediate structures during the main phase transition of dimyristoyl phosphatidylcholine vesicles a combined iodine laser-temperature jump and time resolved cryo-electron microscopy study*, *Biophys. Chem.* (1996), 58, 53.

- Gruner, S., *Stability of Lyotropic Phases with Curved Interfaces*, J. Phys. Chem. (1989), 93, 7562.
- Günzler, H. und H. M. Heise, *IR-Spektroskopie: Eine Einführung* (1996), 3. Auflage, VCH, Weinheim.
- Gupta, C. M., R. Radhakrishnan und G. Khorana, *Glycerophospholipid synthesis: Improved general method and new analogs containing photoactivable groups*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977), 74(10), 4315.
- Hahn, F. L. und R. Luckhaus, *Ein vorzügliches Reagens zur colorimetrischen Bestimmung von Phosphat und Arsenat*, Z. anal. Chem. (1956), 149, 172.
- Hardy, B. J. und R. W. Pastor, *Conformational Sampling of Hydrocarbon and Lipid Chains in an Orienting Potential*, J. Comput. Chem. (1994), 15, 208.
- Harris, J. und S. A. Rice, *A lattice model of a supported monolayer of amphiphile molecules: Monte Carlo simulations*, J. Chem. Phys. (1988), 88(2), 1298.
- Hastings, W. K., *Monte Carlo sampling methods using Markov chains, and their applications*, Biometrika (1970), 57, 97.
- Heimburg, T. und D. Marsh, *Thermodynamics of the Interaction of Proteins with Lipid Membranes*, in K. M. Merz Jr. und B. Roux (Hrsgg.), *Biological Membranes* (1996), Birkhäuser Verlag, Boston, USA.
- Heimburg, T. und R. L. Biltonen, *A Monte Carlo Simulation of Protein-Induced Heat Capacity Changes and Lipid-Induced Protein Clustering*, Biophys. J. (1996), 70, 84.
- Herres, W. und J. Gronholz, *Understanding FT-IR Data Processing Part 1: Data Acquisition and Fourier Transformation*, Comp. Appl. Lab. (1984), 2, 216.
- Hetzer, M., S. Heinz, S. Grage und T. M. Bayerl, *Asymmetric Molecular Friction in Supported Phospholipid Bilayers Revealed by NMR Measurements of Lipid Diffusion*, Langmuir (1998), 14, 982.

- Hinderliter, A. K., J. Huang und G. W. Feigenson, *Detection of Phase Separation in Fluid Phosphatidylserine/phosphatidylcholine Mixtures*, Biophys. J. (1994), 67, 1906.
- Holzhäuser, J., *Entwicklung und Bau eines Probenkopfes mit variabler Temperierung für die <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie* (1995), Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Homan, R. und H. J. Pownall, *Transbilayer diffusion of phospholipids: dependence on headgroup structure and acyl chain length*, Biochim. Biophys. Acta (1988), 938, 155.
- Huang, J., J. E. Swanson, A. R. G. Dibbie, A. K. Hinderliter und G. W. Feigenson, *Nonideal mixing of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in the fluid lamellar phase*, Biophys. J. (1993), 64, 413.
- Huang, J. und G. W. Feigenson, *Monte Carlo Simulation of Lipid Mixtures: Finding Phase Separation*, Biophys. J. (1993), 65, 1788.
- Hübner, W. und A. Blume, *<sup>2</sup>H-NMR-Spectroscopic Investigations of Phospholipid Bilayers*, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. (1987), 91, 1127.
- Hübner, W. und A. Blume, *Interactions at the lipid-water interface*, Chem. Phys. Lipids (1998), 96, 99.
- Ipsen, J. H. und O. G. Mouritsen, *Modelling the phase equilibria in two-component membranes of phospholipids with different acyl-chain lengths*, Biochim. Biophys. Acta (1988), 944, 121.
- Ipsen, J. H., O. G. Mouritsen und M. J. Zuckermann, *Decoupling of crystalline and conformational degrees of freedom in lipid monolayers*, J. Chem. Phys. (1989), 91(3), 1855.
- Ipsen, J. H., K. Jørgensen und O. G. Mouritsen, *Density fluctuations in saturated phospholipid bilayers increase as the acyl-chain length decreases*, Biophys. J. (1990), 58, 1099.
- Ising, E., *Beitrag zur Theorie des Ferromagnetismus*, Z. Phys. (1925), 31, 253.

- Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces* (1992), 2. Auflage, Academic Press, London, England.
- Jan, N., T. Lookman und D. A. Pink, *On Computer Simulation Methods Used to Study Models of Two-Component Lipid Bilayers*, *Biochemistry* (1984), 23, 3227.
- Jerala, R., P. F. F. Almeida und R. L. Biltonen, *Simulation of the Gel-Fluid Transition in a Membrane Composed of Lipids with Two Connected Acyl Chains: Application of a Dimer-Move Step*, *Biophys. J.* (1996), 71, 609.
- Johann, Ch., *Theoretische Berechnung von Phasendiagrammen und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen an pseudobinären Gemischen von Lipiden mit  $\omega$ -Cyclohexylacylketten* (1995), Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Johann, Ch., P. Garidel, L. Mennicke und A. Blume, *New approaches to the simulation of heat-capacity curves and phase-diagrams of pseudobinary phospholipid mixtures*, *Biophys. J.* (1996), 71, 3215.
- Jørgensen, K., J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen, D. Bennett und M. J. Zuckermann, *The effects of density fluctuations on the partitioning of foreign molecules into lipid bilayers: Application to anaesthetics and insecticides*, *Biochim. Biophys. Acta* (1991), 1067, 241.
- Jørgensen, K., M. M. Sperotto, O. G. Mouritsen, J. H. Ipsen und M. J. Zuckermann, *Phase equilibria and local structure in binary lipid bilayers*, *Biochim. Biophys. Acta* (1993), 1152, 135.
- Jørgensen, K. und O. G. Mouritsen, *Phase Separation Dynamics and Lateral Organization of Two-Component Lipid Membranes*, *Biophys. J.* (1995), 95, 942.
- Jørgensen, W. L., *Monte Carlo vs. Molecular Dynamics for Conformational Sampling*, *J. Phys. Chem.* (1996), 100, 14508.
- Kawasaki, K., *Kinetics of Ising Models*, in C. Domb und M. S. Green (Hrsgg.), *Phase Transitions and Critical Phenomena* (1972), Band 2, Academic Press, New York, USA.

- Kerth, A., *Stopped-Flow-Untersuchungen zur Kinetik des Einbaus des Detergens n-Octyl-b-D-glucopyranosid in 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin-Vesikel (1997)*, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Klibanov, A. M., G. P. Samokhin, K. Martinek und I. V. Berezin, *A New Approach to Preparative Enzymatic Synthesis*, *Biotechnol. Bioeng.* (1977), 19, 1351.
- Knoll, W., K. Ibel und E. Sackmann, *Small-angle neutron scattering study of lipid phase diagrams by the contrast variation method*, *Biochemistry* (1981), 20, 6379.
- Knuth, D., *The art of computer programming* (1973), 2. Auflage, Addison-Wesley, Reading, MA, USA.
- Kodati, V. R. und M. Lafleur, *Comparison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers*, *Biophys. J.* (1993), 64, 163.
- Kortüm, G. und H. Lachmann, *Einführung in die chemische Thermodynamik* (1981), 7. Auflage, VCH, Weinheim.
- Koynova, R. und M. Caffrey, *Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines*, *Chem. Phys. Lipids* (1994), 69, 1.
- Koynova, R. und M. Caffrey, *Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines*, *Biochim. Biophys. Acta* (1998), 1376, 91.
- Laane, C., S. Boeren, K. Vos und C. Veeger, *Rules for Optimization of Biocatalysts in Organic Solvents*, *Biotechnol. Bioeng.* (1987), 30, 81.
- Lafleur, M., M. Bloom, E. F. Eikenberry, S. M. Gruner, Y. Han und P. R. Cullis, *Correlation Between Lipid Plane Curvature and Lipid Chain Order*, *Biophys. J.* (1996), 70, 2747.
- Langner, M., D. Cafiso, S. Marcelja und S. McLaughlin, *Electrostatics of phosphoinositide bilayer membranes*, *Biophys. J.* (1990), 57, 335.
- Lee, A. G., *Interaction between Anesthetics and Lipid Mixtures. Normal Alcohols*, *Biochemistry* (1976), 15(11), 2448.

- Lee, A. G., *Lipid Phase Transitions and Phase Diagrams I. Lipid Phase Transitions*, Biochim. Biophys. Acta, (1977a), 472, 237.
- Lee, A. G., *Lipid Phase Transitions and Phase Diagrams II. Mixtures Involving Lipids*, Biochim. Biophys. Acta, (1977b), 472, 285.
- Lee, A. G., *Calculation of Phase Diagrams for Non-Ideal Mixtures of Lipids, and a Possible Non-Random Distribution of Lipids in Lipid Mixtures in the Liquid Crystalline Phase*, Biochim. Biophys. Acta (1978), 507, 433.
- Lee, J. und J. M. Kosterlitz, *Finite-size scaling and Monte Carlo simulations of first-order phase transitions*, Phys. Rev. B (1991), 43(4), 3265.
- Lee, S. Y., N. Hibi, T. Yamané und S. Shimizu, *Phosphatidylglycerol Synthesis by Phospholipase D in a Microporous Membrane Bioreactor*, J. Ferment. Technol. (1985), 63(1), 37.
- Lentz, B. R. und B. J. Litman, *Effect of Head Group on Phospholipid Mixing in Small, Unilamellar Vesicles: Mixtures of Dimyristoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylethanolamine*, Biochemistry (1978), 17(25), 5537.
- Lewis, R. N. A. H., R. N. McElhaney, M. A. Monck und P. R. Cullis, *Studies of Highly Asymmetric Mixed-Chain Diacyl Phosphatidylcholines that Form Mixed-Interdigitated Gel Phases: Fourier Transform Infrared and  $^2\text{H}$  NMR Spectroscopic Studies of Hydrocarbon Chain Conformation and Orientational Order in the Liquid-Crystalline State*, Biophys. J. (1994), 67, 197.
- Lookman, T., D. A. Pink, E. W. Grundke, M. J. Zuckermann und F. deVerteuil, *Phase Separation in Lipid Bilayers Containing Integral Proteins. Computer Simulation Studies*, Biochemistry (1982), 21, 5593.
- Luna, E. J. und H. M. McConnell, *Multiple Phase Equilibria in Binary Mixtures of Phospholipids*, Biochim. Biophys. Acta (1978), 509, 462.

- Mabrey, S. und J. M. Sturtevant, *Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976), 73(11), 3862.
- Macdonald, P. M., *Deuterium NMR and the Topography of Surface Electrostatic Charge*, Acc. Chem. Res. (1997), 30, 196.
- Mangroo, D. und G. E. Gerber, *Phospholipid synthesis: effects of solvents and catalysts on acylation*, Chem. Phys. Lipids (1988), 48, 99.
- Mantsch, H. H. und R. N. McElhaney, *Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy*, Chem. Phys. Lipids (1991), 57, 213.
- Marcelja, S., *Chain Ordering in Liquid Crystals II. Structure of Bilayer Membranes*, Biochim. Biophys. Acta (1974), 367, 165.
- Marsh, D., A. Watts und P. F. Knowles, *Cooperativity of the Phase Transition in Single and Multibilayer Lipid Vesicles*, Biochim. Biophys. Acta (1977), 465, 500.
- Marsh, D., A. Watts und C. P. Smith, *Dynamic Structure and Phase Behavior of Dimyristoylphosphatidylethanolamine Bilayers Studied by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance*, Biochemistry (1983), 22, 3023.
- Mendelsohn, R. und L. Senak, *Quantitative Determination of Conformational Disorder in Biological Membranes by FTIR Spectroscopy*, in R. H. J. Clark und R. E. Hester (Hrsgg.), *Biomolecular Spectroscopy Part A* (1993), John Wiley and Sons, New York, USA.
- Mendelsohn, R., G. L. Liang, H. L. Strauss und R. G. Snyder, *IR Spectroscopic Determination of Gel State Miscibility in Long-Chain Phosphatidylcholine Mixtures*, Biophys. J. (1995), 69, 1987.
- Mendelsohn, R. und R. G. Snyder, *Infrared Spectroscopic Determination of Conformational Disorder and Microphase Separation in Phospholipid Acyl Chains*, in K. Merz Jr. und B. Roux (Hrsgg.), *Biological Membranes* (1996), Birkhäuser Verlag, Boston, USA.

- Metropolis, N. und S. Ulam, *The Monte Carlo Method*, J. Am. stat. Ass. (1949), 44, 335.
- Metropolis, N., A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller und E. Teller, *Equation of State Calculations by Fast Computing Machines*, J. Chem. Phys. (1953), 21(6), 1087.
- Milik, M., Kolinski, A. und Skolnick, *Monte Carlo dynamics of a dense system of chain molecules constrained to lie near an interface. A simplified model*, J. Chem. Phys. (1990), 93(6), 4440.
- Moskovitz, M., *Preparation of high-purity solvents*, American Laboratory (1980), Oktoberausgabe, 142.
- Mouritsen, O. G., *Studies on the Lack of Cooperativity in the Melting of Lipid Bilayers*, Biochim. Biophys. Acta (1983), 731, 217.
- Mouritsen, O. G., A. Boothroyd, R. Harris, N. Jan, T. Lookman, L. MacDonald und D. A. Pink, *Computer simulation of the main gel-fluid phase transition of lipid bilayers*, J. Chem. Phys. (1983), 79(4), 2027.
- Mouritsen, O. G., *Computer Studies of Phase Transitions and Critical Phenomena* (1984), Springer -Verlag, Berlin.
- Mouritsen, O. G., *Computer Simulation of Cooperative Phenomena in Lipid Membranes*, in R. Brasseur (Hrsg.), *Molecular Description of Biological Membranes by Computer Aided Conformational Analysis*, Band I (1990), CRC Press, Boca Raton, USA.
- Mouritsen, O. G., *Theoretical models of phospholipid phase transitions*, Chem. Phys. Lipids (1991), 57, 179.
- Mouritsen, O. G., B. Damman, H. C. Fogedby, J. H. Ipsen, C. Jeppesen, K. Jørgensen, J. Risbo, M. C. Sabra, M. M. Sperotto und M. J. Zuckermann, *The computer as a laboratory for the physical chemistry of membranes*, Biophys. Chem. (1995a), 55, 55.
- Mouritsen, O. G., K. Jørgensen und Thomas Hønger, *Permeability of Lipid Bilayers Near the Phase Transition*, in E. A. Disalvo und S. A. Simon (Hrsgg.), *Permeability and Stability of Lipid Bilayers* (1995b), CRC Press, Boca Raton, USA.



- Mouritsen, O. G. und P. K. J. Kinnunen, *Role of Lipid Organization and Dynamics for Membrane Functionality*, in K. Merz Jr. und B. Roux (Hrsgg.), *Biological Membranes* (1996), Birkhäuser-Verlag, Boston, USA.
- Nagle, J. F. und H. L. Scott, *Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers. Theory of membrane permeability*, *Biochim. Biophys. Acta* (1978), 513, 236.
- Nagle, J. F. und M. C. Wiener, *Structure of fully hydrated bilayer dispersions*, *Biochim. Biophys. Acta* (1988), 942, 1.
- Nakajima, J., T. Nakashima, Y. Shima, H. Fukuda und T. Yamane, *A Facile Transphosphatidylolation Reaction Using a Culture Supernatant of Actinomyces Directly as a Phospholipase D Catalyst with a Chelating Agent*, *Biotechnol. Bioeng.* (1994), 44(10), 1193.
- Nibu, Y., T. Inoue und I. Motoda, *Effect of headgroup type on the miscibility of homologous phospholipids with different acyl chain lengths in hydrated bilayer*, *Biophys. Chem.* (1995), 56, 273.
- Papahadjopoulos, D., K. Jakobson, S. Nir und T. Isac, *Phase Transitions in Phospholipid Vesicles. Fluorescence Polarization and Permeability Measurements Concerning the Effect of Temperature and Cholesterol*, *Biochim. Biophys. Acta* (1973), 311, 330.
- Pastor, R. W., *Molecular dynamics and Monte Carlo simulations of lipid bilayers*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1994), 4, 486.
- Pedersen, S., K. Jørgensen, T. R. Bækmark und O. G. Mouritsen, *Indirect Evidence for Lipid-Domain Formation in the Transition Region of Phospholipid Bilayers by Two-Probe Fluorescence Energy Transfer*, *Biophys. J.* (1996), 71, 554.
- Petersen, N. O., P. A. Kroon, M. Kainosho und S. I. Chan, *Thermal Phase Transitions in Deuterated Lecithin Bilayers*, *Chem. Phys. Lipids* (1975), 14, 343.
- Petrache, H. I., S. Tristram-Nagle und J. F. Nagle, *Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers*, *Chem. Phys. Lipids* (1998), 95, 83.

- Pink, D. A. und D. Chapman, *Protein-Lipid interactions in bilayer membranes: A lattice model*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 76(4), 1542.
- Pink, D. A., T. J. Green und D. Chapman, *Raman Scattering in Bilayers of Saturated Phosphatidylcholines. Experiment and Theory*, Biochemistry (1980a), 19, 349.
- Pink, D. A., A. Georgallas und M. J. Zuckermann, *Phase Transitions and Critical Indices of a Phospholipid Bilayer Model*, Z. Physik B - Condensed Matter (1980b), 40, 103.
- Pink, D. A., T. Lookman, A. L. Macdonald, M. J. Zuckermann und N. Jan, *Lateral Diffusion of Gramicidin S. M-13 Coat Protein and Glycophorin in Bilayers of Saturated Phospholipids. Mean Field and Monte Carlo Studies*, Biochim. Biophys. Acta (1982), 687, 42.
- Pink, D. A., M. Belaya, V. Levadny und B. Quinn, *A Model of Polar Group Statics in Lipid Bilayers and Monolayers*, Langmuir (1997), 13, 1701.
- Pink, D. A., S. McNeil, B. Quinn und M. J. Zuckermann, *A model of hydrogen bond formation in phosphatidylethanolamine bilayers*, Biochim. Biophys. Acta (1998), 1368, 289.
- Pisch, S., *Synthese von Phospholipiden ungewöhnlicher Fettsäuren durch Transphosphatidylierung mit Phospholipase D* (1996), Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- Plotnikov, V. V., J. M. Brandts, L.-N. Lin und J. F. Brandts, *A New Ultrasensitive Calorimeter*, Anal. Biochem. (1997), 250, 237.
- Pütz, M., *Der Rauigkeits-Phasenübergang im 3d-Ising-Modell* (1995), Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Press, W. H., B. B. Flannery, S. A. Teukolsky und W. T. Vetterling, *Numerical Recipes* (1986), 2. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Prigogine, I. und R. Defay, *Chemische Thermodynamik* (1962), VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.

- Risbo, J., M. M. Sperotto und O. G. Mouritsen, *Theory of phase equilibria and critical mixing points in binary lipid bilayers: Free energy, enthalpy, specific heat, and interfacial tension*, J. Chem. Phys. (1995), 103, 3643.
- Rürup, J., M. Mannova, G. Brezesinski und R. D. Schmid, *Properties of unusual phospholipids: I. Synthesis, monolayer investigations and calorimetry of diacylglycerophosphatidylcholines containing monoacetylenic acyl chains*, Chem. Phys. Lipids (1994), 70, 187.
- Sankaram, M. B., D. Marsh und T. E. Thompson, *Determination of fluid and gel domain sizes in two-component, two-phase lipid bilayers. An electron spin resonance spin label study*, Biophys. J. (1992), 63, 340.
- Sankaram, M. B. und T. E. Thompson, *Deuterium Magnetic Resonance Study of Phase Equilibria and Membrane Thickness in Binary Phospholipid Mixed Bilayers*, Biochemistry (1992), 31(35), 8259.
- Schäfer, H., B. Mädler und E. Sternin, *Determination of Orientational Order Parameters from  $^2\text{H}$  NMR Spectra of Magnetically Partially Oriented Lipid Bilayers*, Biophys. J. (1998), 74, 1007.
- Schram, V., H.-N. Lin und T. E. Thompson, *Topology of Gel-phase Domains and Lipid Mixing Properties in Phase-Separated Two-Component Phosphatidylcholine Bilayers*, Biophys. J. (1996), 71, 1811.
- Schneider, K.-P. und J. Keller, *Computer simulation of the orientation of lipid headgroups*, Chem. Phys. Lett. (1997), 275, 63.
- Scott, H. L., *Statistical Mechanics and Monte Carlo Studies of Lipid Membranes*, in K. Merz Jr. und B. Roux (Hrsgg.), *Biological Membranes* (1996), Birkhäuser-Verlag, Boston, USA.
- Seddon, J. M., *Structure of the inverted hexagonal ( $H_{II}$ ) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids*, Biochim. Biophys. Acta (1990), 1031, 1.

- Seddon, J. M., *Lyotropic Phase Behaviour of Biological Amphiphiles*, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. (1996), 100, 380.
- Seelig, A. und J. Seelig, *The Dynamic Structure of Fatty Acyl Chains in a Phospholipid Bilayer Measured by Deuterium Magnetic Resonance*, Biochemistry (1974), 13(23), 4839.
- Seelig, J., *Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes*, Quart. Rev. Biophys. (1977), 10(3), 353.
- Seelig, J. und A. Seelig, *Lipid conformation in model membranes and biological membranes*, Quart. Rev. Biophys. (1980), 13(1), 19.
- Seelig, J. und P. M. Macdonald, *Phospholipids and Proteins in Biological Membranes. <sup>2</sup>H NMR as a Method To Study Structure, Dynamics, and Interactions*, Acc. Chem. Res. (1987), 20, 221.
- Selinger, Z. und Y. Lapidot, *Synthesis of fatty acid anhydrides by reaction with dicyclohexylcarbodiimide*, J. Lipid Res. (1966), 7, 174.
- Senak, L., M. A. Davies und R. Mendelsohn, *A Quantitative IR Study of Hydrocarbon Chain Conformation in Alkanes and Phospholipids: CH<sub>2</sub> Wagging Modes in Disordered Bilayer and H<sub>II</sub> Phases*, J. Phys. Chem. (1991), 95, 2565.
- Shimshick, E. J. und H. M. McConnell, *Lateral Phase Separation in Phospholipid Membranes*, Biochemistry (1973), 12(12), 2351.
- Shin, K., H. Maeda, T. Fujiwara und H. Akutsu, *Molecular miscibility of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in binary mixed bilayers with acidic phospholipids studied by <sup>2</sup>H- and <sup>31</sup>P-NMR*, Biochim. Biophys. Acta (1995), 1238, 42.
- Shinitzky, M., *Biomembranes. Physical Aspects*. (1993), VCH, Weinheim.
- Sillerud, L. O. und R. E. Barnett, *Lack of Transbilayer Coupling in Phase Transitions of Phosphatidylcholine Vesicles*, Biochemistry (1982), 21, 1756.
- Singh, A., *An efficient synthesis of phosphatidylcholines*, J. Lipid Res. (1990), 31, 1522.

- Snyder, R. G., *Vibrational Study of the Chain Conformation of the Liquid n-Paraffins and Molten Polyethylene*, J. Chem. Phys. (1967), 47(4), 1316.
- Sperotto, M. M. und O. G. Mouritsen, *Lipid enrichment and selectivity of integral membrane proteins in two-component lipid bilayers*, Eur. Biophys. J. (1993), 22, 323.
- Spiess, H. W., *Deuteron NMR – A new Tool for Studying Chain Mobility and Orientation in Polymers*, Advances in Polymer Science (1985), 66, 23.
- Sternin, E., M. Bloom und A. MacKay, *De-Pake-ing of NMR Spectra*, J. Mag. Res. (1983), 55, 274.
- Stouch, T. R., *Lipid Membrane Structure and Dynamics Studied by All-Atom Molecular Dynamics Simulation of Hydrated Phospholipid Bilayers*, Mol. Sim. (1993), 10(2-6), 335.
- Stryer, L., *Biochemie* (1991), 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sugár, I. P. und G. Monticelli, *Landau Theory of Two-Component Phospholipid Bilayers I. Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine Mixtures*, Biophys. Chem. (1983), 18, 281.
- Sugár, I. P. und G. Monticelli, *Interrelationships Between the Phase Diagrams of the Two-Component Phospholipid Bilayers*, Biophys. J. (1985), 48, 283.
- Sugár, I. P., *Cooperativity and Classification of Phase Transitions. Application to One- and Two Component Phospholipid Membranes*, J. Phys. Chem. (1987), 91, 95.
- Sugár, I. P., D. Tang und P. L.-G. Chong, *Monte Carlo Simulation of Lateral Distribution of Molecules in a Two-Component Lipid Membrane. Effect of Long-Range Repulsive Interactions*, J. Phys. Chem. (1994a), 98, 7201.
- Sugár, I. P., R. L. Biltonen und N. Mitchard, *Monte Carlo Simulations of Membranes: Phase Transition of Small Unilamellar Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles*, Methods Enzymol. (1994b), 240, 569.

- Swendsen, R. H., J.-S. Wang und A. M. Ferrenberg, *New Monte Carlo Methods for Improved Efficiency of Computer Simulations in Statistical Mechanics*, in K. Binder (Hrsg.), *The Monte Carlo Method in Condensed Matter Physics*, Topics in Applied Physics (1992), 71, Springer-Verlag, Berlin.
- Tajima, K., Y. Imai, T. Horiuchi, M. Koshinuma und A. Nakamura, *ESR Study on DMPC and DMPG Bilayers in the ( $L_a + H_2O$ ) Phase*, *Langmuir* (1996), 12, 6651.
- Tenchov, B. G., *Nonuniform Lipid Distribution in Membranes*, *Progr. Surf. Sci.* (1985), 20(4), 273.
- Thurmond, R. L., S. W. Dodd und M. F. Brown, *Molecular areas of phospholipids as determined by  $^2H$  NMR spectroscopy*, *Biophys. J.* (1991), 59, 108.
- Tieleman, D. P., S. J. Marrink und H. J. C. Berendsen, *A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems*, *Biochim. Biophys. Acta* (1997), 1331, 235.
- Torrie, G. M. und J. P. Valleau, *Electrical double layers. I. Monte Carlo study of a uniformly charged surface*, *J. Chem. Phys.* (1980), 73(11), 5807.
- Träuble, H., *Membrane Electrostatics*, in S. Abrahamsson und I. Pascher (Hrsgg.), *Structure of Biological Membranes* (1976), Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
- Träuble, H., M. Teubner, P. Wooley und H. Eibl, *Electrostatic Interactions at Charged Lipid Membranes. I. Effects of pH and Univalent Cations on Membrane Structure*, *Biophys. Chem.* (1976), 4, 319.
- Tuchtenhagen, J., W. Ziegler und A. Blume, *Acyl chain conformational ordering in liquid-crystalline bilayers: comparative FT-IR and  $^2H$ -NMR studies of phospholipids differing in headgroup structure and chain length*, *Eur. Biophys. J.* (1994), 23, 323.
- Vaz, W. L. C., E. C. C. Melo und T. E. Thompson, *Translational diffusion and fluid domain connectivity in a two-component, two-phase phospholipid bilayer*, *Biophys. J.* (1989), 56, 869.

- Vaz, W. L. C., E. C. C. Melo und T. E. Thompson, *Fluid phase connectivity in an isomorphous, two-component, two-phase phosphatidylcholine bilayer*, Biophys. J. (1990), 58, 273.
- Watts, A., K. Harlos, W. Maschke und D. Marsh, *Control of the Structure and Fluidity of Phosphatidylglycerol Bilayers by pH Titration*, Biochim. Biophys. Acta (1978), 510, 63.
- Wedler, G., *Lehrbuch der Physikalischen Chemie* (1987), 3. Auflage, VCH, Weinheim.
- Wilkinson, D. A. und J. F. Nagle, *Dilatometry and Calorimetry of Saturated Phosphatidylethanolamine Dispersions*, Biochemistry (1981), 20, 187.
- Winter, R., *Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen*, Chemie in unserer Zeit (1990), 2, 71.
- Winter, R. und F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie* (1998), Teubner Verlag, Stuttgart.
- Wood, W. W. und F. R. Parker, *Monte Carlo Equation of State of Molecules Interacting with the Lennard-Jones Potential. I. A Supercritical Isotherm at about Twice the Critical Temperature*, J. Chem. Phys. (1957), 27(3), 720.
- Yamamoto, I., A. Konto, T. Handa und K. Miyajima, *Regulation of phospholipase D activity by neutral lipids in egg-yolk phosphatidylcholine small unilamellar vesicles and by calcium ion in aqueous medium*, Biochim. Biophys. Acta (1995), 1233, 21.
- Zhang, Y.-P., R. N. A. H. Lewis und R. N. McElhaney, *Calorimetric and Spectroscopic Studies of the Thermotropic Phase Behavior of the n-Saturated 1,2-Diacylphosphatidylglycerols*, Biophys. J. (1997), 72, 779.
- Zhang, Z., M. Laradji, H. Guo, O. G. Mouritsen und M. J. Zuckermann, *Phase behavior of pure lipid bilayers with mismatch interactions*, Phys. Rev. A (1992), 45(10), 7560.
- Zhang, Z., M. M. Sperotto, M. J. Zuckermann und O. G. Mouritsen, *A microscopic model for lipid / protein bilayers with critical mixing*, Biochim. Biophys. Acta (1993), 1147, 154.

- Ziegler, W., *<sup>2</sup>H-NMR- und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen zu Ordnung und Phasenverhalten von Phospholipidmodellmembranen (1994)*, Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Ziegler, W. und A. Blume, *Acyl chain conformational ordering of individual components in liquid-crystalline bilayers of mixtures of phosphatidylcholines and phosphatidic acids. A comparative FTIR and <sup>2</sup>H NMR study*, Spectrochim. Acta Part A (1995), 51, 1763.
- Zuckermann, M. J. und D. Pink, *The correlation length and lateral compressibility of phospholipid bilayers in the presence of thermodynamic density fluctuations*, J. Chem. Phys. (1980), 73(6), 2919.
- Zuckermann, M. J. und O. G. Mouritsen, *The effects of acyl chain ordering and crystallisation on the main phase transition of wet lipid bilayers*, Eur. Biophys. J. (1987), 15, 77.



# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name: Christof Johann  
Geburtsdatum: 15.12.1969  
Geburtsort: Ludwigshafen/Rhein  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

08/1976 - 07/1980 Friedrich-Ebert-Grundschule Frankenthal  
08/1980 - 05/1989 Staatliches Karolinengymnasium Frankenthal;  
Abschluß: Abitur

## Wehrdienst:

06/1989-09/1990 Grundwehrdienst;  
Panzerfahrerausbildung bei der Panzerjägerkompanie 340 in Koblenz

## Studium:

10/1990-08/1995 Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern;  
Abschluß: Diplom-Chemiker  
09/1995 Beginn des Promotionsstudiums an der Universität Kaiserslautern in  
der Fachrichtung Physikalische Chemie  
08/1997 Umzug mit dem Arbeitskreis an das Institut für Physikalische Chemie  
in Halle an der Saale  
26.8.1999 Tag der wissenschaftlichen Aussprache

## Danksagung

Alleine zu forschen ist fast unmöglich (und außerdem ziemlich eintönig), daher möchte ich an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, mich bei denen zu bedanken, die mir die Arbeit etwas leichter gemacht haben:

- Meinen Langzeitbürogenossen Dr. Andrea Giehl und Andreas Kerth für die große Hilfsbereitschaft und das äußerst angenehme Arbeitsklima
- Christiane Lischka für die sehr freundliche Atmosphäre und die zahlreichen hochinteressanten Geschichten aus der Vergangenheit
- Den Habilitanten Dr. Arne Gericke und Dr. Wigand Hübner, die für mehr oder weniger schlaue Fragen stets ein offenes Ohr hatten und mit denen immer eine amüsante Unterhaltung möglich war
- Ingrid Kiesevalter und Dr. Ralph Kolling für die große und essentielle Unterstützung bei der Durchführung der NMR-Messungen an zahlreichen Wochenenden
- Dr. Patrick Garidel für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und Dr. Maria Requero für viele interessante Unterhaltungen
- Andreas Lonitz und Norbert Schammelt, die die hauseigene Hard- und Software in Halle mustergültig warteten und hiermit deutlich mein Nervenkostüm entlasteten
- Herrn Prof. Dr. C. Kreiter für die mir entgegengebrachte Kulanz bei der Vergabe der NMR-Meßtermine
- Bernd Thierfelder für die hervorragende Zusammenarbeit im Syntheselabor
- Sandra Pisch für die freundliche Überlassung einer nicht käuflichen und hochwirksamen Phospholipase D

