

**Die Wirkung der Membrankrümmung  
auf die elektroporative Deformation  
sondenmarkierter Lipidvesikel**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
an der Universität Bielefeld

Vorgelegt von

**Thomas Liese**

aus Schloß Holte-Stukenbrock

Bielefeld, Februar 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Neumann  
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Knoche  
Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2002

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN ISO 9706

*Leben ..., die Kunst, aus falschen Voraussetzungen  
die richtigen Schlüsse zu  
ziehen.*

Samuel Butler (1835-1902)

*..... für Sabine & Jan .....*

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
	<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Motivation und Zielsetzung	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Chemikalien	10
2.1.1	Lipide und Membranfarbstoffe	10
2.2	Methoden	11
2.2.1	Präparation der Lipidvesikel und Markierung mit Farbstoffsonden	11
2.2.2	Lichtoptische Methoden	12
2.2.3	Elektroporationstechnik – $\mu\text{s}$ - Pulse	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>17</b>
3.1	Optische Dichte	17
3.1.1	Einfluss der Farbstoffe auf Vesikelmembranen	17
3.2	Elektro-optische Relaxationen in $\mu\text{s}$ - Feldpulsen	20
3.2.1	Radienabhängigkeit der Minus- und Plusmoden der Turbidität und Absorption	22
3.2.2	Linearer Absorptionsdichroismus optischer Membransonden	25
<b>4</b>	<b>Die Verstärkung der Membranelektroporation durch große Membrankrümmungen</b>	<b>35</b>
4.1	Quantifizierung der Vesikeldeformation	35
4.1.1	Thermische Ondulationen und Dehnung der Lipidmembran	36
4.1.2	Charakteristische Zeit der Vesikel-Elongation	39
4.2	Datenanalyse und Diskussion	40
4.2.1	Datenbasis	40
4.2.2	Datenanalyse	42
<b>5</b>	<b>Optische Membransonden als Indikatoren für die elektroporative Vesikeldeformation</b>	<b>49</b>
5.1	Der Absorptionsdichroismus sondenmarkierter Vesikel	49
5.2	Einfluss der Krümmung eines Ellipsoids auf den Sonden-Konuswinkel $\alpha$	53
5.2.1	Die Winkelabhängigkeit der Gesamtkrümmung $H_t$ eines Ellipsoiden	53
5.2.2	Die Differenz der Oberflächendichte in der Schale eines sphärischen Ellipsoiden	55
5.3	Datenanalyse und Diskussion	57
5.3.1	Der relative Oberflächendichtegradient $\Delta\rho(\theta)/\rho_0$ und der mittlere Sonden-Konuswinkel $\alpha$	59

---

5.3.2	Datenbasis	63
5.3.3	Datenanalyse	68
<b>6</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>85</b>
<b>7.1</b>	<b>Elongierung eines Vesikels im elektrischen Feld</b>	<b>85</b>
<b>7.2</b>	<b>Bestimmung des Brechungsindex von Lipidvesikelmembranen</b>	<b>87</b>
<b>7.3</b>	<b>Berechnung der Vesikeldeformation <math>p</math> aus den Turbiditätsdaten</b>	<b>88</b>
<b>7.4</b>	<b>Physikalische Eigenschaften der Vesikelsuspensionen</b>	<b>89</b>
7.4.1	Minimale Annäherungszeit für den Vesikel-Vesikel-Kontakt im Feld	89
7.4.2	Einfluss der Lipidkonzentration auf die elektro-(optischen) Signale	90
<b>7.5</b>	<b>Bestimmung des Absorptionsanteils, <math>A_D</math></b>	<b>91</b>
<b>7.6</b>	<b>Strukturelle und optische Parameter der Membranfarbstoffe</b>	<b>92</b>
<b>7.7</b>	<b>Einbauorte und physikalisch-chemische Eigenschaften der Lipidsonden</b>	<b>94</b>
7.7.1	Einbauorte der Farbstoffe in Lipidmembranen	95
7.7.2	Moleküllängen der Membransonden	95
7.7.3	Übersicht und Einzelcharakterisierung der Farbstoffe	96
7.7.4	Optische Dichte (OD)-Spektren	102
7.7.5	Bestimmung der Bindungsorte von DiI16(3), PATMAN und TMA-DPH durch Fluoreszenz	105
<b>7.8</b>	<b>Physikalische Parameter der Vesikel</b>	<b>111</b>
<b>7.9</b>	<b>Optische Dichte farbstoffmarkierter Vesikelsuspensionen</b>	<b>112</b>
<b>7.10</b>	<b>Elektro-optische Relaxationssignale für Avanti 20-Vesikel</b>	<b>113</b>
7.10.1	Turbidität	113
7.10.2	Absorption	114
7.10.3	Relaxationen und Endwerte des mittleren Konuswinkels $\alpha_E$	115
<b>8</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>119</b>

## Zusammenfassung

Die elektrischen Turbiditätsrelaxationen von kleinen, unilamellaren Vesikeln (SUV) aus dem natürlichen Sojabohnen-Lipidextrakt Lecithin 20% (auch: Avanti 20%) (Avanti Polar Lipids), die in einer wässrigen 0,2 mM NaCl-Lösung hergestellt und elektrischen Rechteck-Feldpulsen der Feldstärke  $2 < E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  ausgesetzt werden, zeigen optisch eine Elektro-Elongation an, die an die Glättung von thermischen Oberflächenondulationen der Lipidmembran, deren Dehnung sowie die Membranelektroporation (MEP) gekoppelt ist. Das Ausmaß und die Rate des elektromechanischen Prozesses für Vesikel mit unterschiedlichen Radien von  $a / \text{nm} = 25, 38, 80$  und  $170$  bei der konstanten, nominalen Transmembranpotentialdifferenz  $\Delta\varphi^N = -1,5 \cdot E \cdot a = -0,3 \text{ V}$  (an den Vesikelpolkappen) sind vom Radius abhängig.

Die Zunahme der Membrankrümmung  $H = 1 / a$  im Bereich  $0,006 \leq H / \text{nm}^{-1} \leq 0,04$  führt zu einem Anstieg des Bruchteils der Elektroporenfläche  $f_p = \Delta S_p / S_0$  in der Membran von  $1 \cdot 10^{-3}$  für  $a = 170 \text{ nm}$  bis auf  $2,9 \cdot 10^{-2}$  bei  $a = 25 \text{ nm}$ . In gleichem Maße wie  $f_p$  nimmt die Elektroporationsrate  $\tau_p^{-1}$  von  $0,07 \mu\text{s}^{-1}$  für  $a = 170 \text{ nm}$  auf  $1,05 \mu\text{s}^{-1}$  für  $a = 25 \text{ nm}$  zu. Das ist in Übereinstimmung mit früheren Daten und theoretischen Analysen (Tönsing et al., 1997). Die Erleichterung der Elektroporation durch die Membrankrümmung wird als Freisetzung der Flächen-Differenz-Elastizitätsenergie (Area difference elasticity energy)  $\Delta_r G_{ADE}$  gedeutet. Bedingt durch die Differenz der relativen Lipidpackungsdichte,  $\Delta\rho/\rho_0$ , zwischen der äußeren und inneren Lipidmonoschicht der Membran, verringert sie sich bei der Bildung eines Mols einer Pore mit dem mittleren Radius  $\bar{r}_p = 0,35 \text{ nm}$  von  $\Delta_r G_{ADE} = 3,3 \text{ RT}$  bei einem Vesikelradius von  $a = 25 \text{ nm}$  auf  $\Delta_r G_{ADE} = 0,5 \text{ RT}$  bei einem Vesikelradius von  $a = 170 \text{ nm}$ . Eine große Membrankrümmung erleichtert demnach die elektrische Porenbildung.

Ein Hauptergebnis der elektro-optischen Feldsprungmessungen ist, dass die erleichterte Elektroporation stark gekrümmter Lipidmembranen sich in den Relaxationen der Membransonden quantitativ wiederfindet. Die Kinetik des - mit einer Ausnahme - negativen, elektrischen Absorptionsdichroismus  $\Delta A$  der Sonden  $\beta$ -DPH pPC, TMA-DPH, DPH, PATMAN, Zeaxanthin und DiIC<sub>16</sub>(3) ist unabhängig vom Farbstofftypus identisch, während sie sich im Ausmaß  $\Delta A/A_0$  unterscheidet. Nur für DiIC<sub>16</sub>(3) ist  $\Delta A/A_0$  unterschiedlich und hat ein positives Vorzeichen. Die Unterschiede  $|\Delta A|$  der Sondentypen für einen gegebenen Vesikelradius und gleiche Feldstärke  $E$  sind mit dem Grad der Ausrichtung der Sonde in der Membran durch den mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  verknüpfbar.

Die Einfeld-Relaxation  $\alpha_E(t)$  besteht aus einer schnellen Ausrichtung der Sonde mit der Zeitkonstante  $\tau \approx 150 \text{ ns}$  in Richtung der Membranflächennormalen, gefolgt von einer entgegengesetzt gerichteten, langsameren Reorientierung, die im Bereich  $4 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  binnen  $t = 10 \mu\text{s}$  ihren Endwert erreicht. Die schnelle Sondenausrichtung ist indirekt durch

Ondulationsausgleich oder Glättung einer sog. "Überstruktur" und durch die direkte Feldeinwirkung bedingt. Die Ausfeld-Relaxation ist bis auf die schnelle Phase analog der Kinetik des Einfeldsignals. Die Einfeld-Endwerte  $\alpha_E(t = 10\mu\text{s})$  aller Sonden zeigen, mit Ausnahme der Vesikel mit  $a = 25\text{ nm}$ , keine Abhängigkeit von der externen Feldstärke. Sie liegen für die weitgehend parallel zur Membrannormalen orientierten Farbstoffe für VET<sub>100</sub> für  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  im Bereich von  $40 \leq \alpha_E(t = 10\mu\text{s}) / \text{deg} \leq 53$ , für das im Mittel orthogonal zur Membrannormalen positionierte DiIC<sub>16</sub>(3) zwischen  $68 \leq \alpha_E(t = 10\mu\text{s}) / \text{deg} \leq 78$ . Die Zunahmen des Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  des transmembranen Farbstoffs Zeaxanthin ( $m(\alpha_E(H)) = 425\text{ deg nm}$ ) und des membranaufgelagerten DiIC<sub>16</sub>(3) ( $m(\alpha_E(H)) = 400\text{ deg nm}$ ) sind bei der konstanten, nominalen Transmembranpotentialdifferenz  $\Delta\varphi^N = -1,5 \cdot E \cdot a = -0,3\text{ V}$  (an den Vesikelpolkappen) linear von der geometrischen Membrankrümmung  $H$  der Vesikel ( $a / \text{nm} = 25, 38, 80$  und  $170$ ) abhängig. Die Ausrichtung der im hydrophoben Membranbereich gelösten Sonde DPH ist dagegen mit  $m(\alpha_E(H)) = 75\text{ deg nm}$  nahezu unabhängig von der Krümmung. Eine lineare Extrapolation von  $\alpha_E(H)$  auf  $H > 0,04$  zeigt, dass sich die Geraden bei  $H = 0,06$ , entsprechend  $\alpha_E(H) \approx 55^\circ$ , also in der Nähe des magischen Winkels  $\alpha = 54,7^\circ$  schneiden. Bei großen Krümmungen liegt offenbar eine Gleichgewichtung aller Sonden-Raumrichtungen vor.

Für die Abhängigkeiten des Sondenkonuswinkel  $\alpha_E$  von der Membrankrümmung  $H$  muß das bestehende ADE-Modell erweitert werden. Die Auswirkung der aus der Krümmung abgeleiteten, winkelabhängigen relativen Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  auf  $\alpha_E$  kann durch die besonderen Krümmungseigenschaften des Ellipsoids in elektro-deformierten Vesikeln erklärt werden. Die Relaxationen  $\alpha_E(t)$  der Sonde Zeaxanthin können auf die lineare Abhängigkeit von  $\alpha_E(H)/H$  zurückgeführt werden.

Optische Titrationen ergeben, dass die kritische, membrangebundene Grenzkonzentration  $c_{\text{krit}}$ , bis zu der die Membraneigenschaften unverändert bleiben, für alle Sonden  $c_{\text{krit}}(\text{Sonde}) \leq 10\text{ }\mu\text{M}$  sein muß. Die elektro-optischen Daten zeigen, dass DiIC<sub>16</sub>(3) den geringsten Einfluss auf die Biegesteifigkeit der Membran hat, während von den anderen Sonden besonders Zeaxanthin schon für Konzentrationen von  $[\text{Zeax}] = 5\text{ }\mu\text{M}$  die Membran, ähnlich wie Cholesterol, versteift. Die Auswertung statischer Fluoreszenzmessungen zeigt, dass der Bindungsort des Sonden-Chromophors von DiIC<sub>16</sub>(3) die Membran / Wassergrenzfläche ist, und für PATMAN der Bereich der Lipidglycerolgruppen.

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

a	Radius der Vesikel
A	Absorption
b	kurze Achse des elongierten Vesikels
C	geschlossene Struktur der Vesikel
c	lange Achse des elongierten Vesikels; als Index kritischer Wert
$[c]_{\text{crit}}$	kritische Membransondenkonzentration
C	geschlossene Membranstruktur
$C_M$	Membrankapazität
$c_p$	spezifische Wärmekapazität
d	Membrandicke, Abstand
$e_0$	elektrische Elementarladung
E	elektrische Feldstärke
$E_c, E_d$	krümmungselastische Energie, elektrische Energie der Deformation
F, $F_{90}$	Faradaykonstante, Fluoreszenz im Winkel von $90^\circ$ zur Anregung gemessen
$f(\lambda)$	Leitfähigkeitsterm
$f_p$	Bruchteil porierter Oberfläche der Membran
$G_0$	Grundleitwert
h, $h_0$	Abstand zwischen den Zentren zweier Vesikel im Feld und bei $E = 0$
H	Membrankrümmung
HO	hydrophobe Poren
K	Gleichgewichtskonstante, Dehnungsmodul der Membran
$k_B$	Boltzmannkonstante
LUV	large unilamellar vesicle
MEP	Membranelektroporation
MLV	multilamellare Vesikel
N	Zahl der Poren pro Vesikel
$N_A$	Avogadrokonstante
n	Zahl der Teilchen im Einheitsvolumen
$n^{\text{in}}, n^{\text{out}}$	Stoffmenge des Elektrolyten im Vesikelinneren und im Außenmedium
OD, $OD_0, OD_\lambda$	optische Dichte, optische Dichte einer Vesikelsuspension, $\sim$ bei der Wellenlänge $\lambda$ /nm
p	Achsenverhältnis $p = c / b$
P	permeable (porierte) Struktur der Vesikel
R	elektrischer Widerstand
$r_p, \bar{r}_p$	Porenradius, mittlerer $\sim$
$S_p, S_{ss}$	Fläche der Elektroporen, Fläche der Membranondulation und -Dehnung

$S, S_0$	Vesikeloberfläche im Feld, $\sim$ bei $E = 0$ , neutrale Oberfläche der Lipidmembran
$t$	Zeit
STB	Standardbedingungen
SUV	small unilamellar vesicle
$T$	absolute Temperatur; Turbidität
$t_E$	Pulsdauer bei der elektrischen Feldstärke $E$
$t_p$	Polarisationszeit
$U$	elektrische Spannung
$v$	elektrische Ionenbeweglichkeit
$V$	Volumen
VET	extrudierte Vesikel (vesicles by extrusion technique)
$VET_n$	durch eine Membran mit $n$ nm Porendurchmesser extrudierte Vesikel ( $n = 50, 100, 200, 400$ nm)
$x$	Molenbruch
$\alpha, \alpha_0, \alpha_E,$	mittlerer Konuswinkel, den das optische Übergangsmoment zur Membrannormalen $\bar{n}$ einnimmt, $\sim$ in einer nicht ondulierten Membran $\sim$ , $\sim$ im elektrischen Feld $E \sim$
$\Delta\varphi(E)$	in $E$ induzierte Transmembranpotentialdifferenz
$\Delta V$	Volumenänderung
$W_b, W_{ss}$	Energie der Biegung, $\sim$ der Dehnung und Glättung von Ondulationen
$\gamma, \gamma_0$	reduzierter Abstand zwischen den Zentren zweier Vesikel im Feld und bei $E = 0$
$\varnothing$	Durchmesser
$\varepsilon$	Optischer Extinktionskoeffizient, Dielektrizitätszahl
$\varepsilon_0$	Permittivität des Vakuums
$\varepsilon_w$	Dielektrizitätszahl des Wassers
$\theta$	Winkel zwischen dem elektrischem Feld- und dem Vesikelradiusvektor
$\kappa$	Biegesteifigkeit der Membran
$\lambda_{ex}, \lambda_{in}, \lambda_M$	Leitfähigkeit des Außenmediums, $\sim$ des Vesikelinneren, $\sim$ der Membran
$\eta$	Viskosität
$\zeta$	Zu-/Abnahme der Deformation in Richtung einer Halbachse
$\zeta_0$	Gleichgewichtswert der Zunahme einer Halbachse in Feldrichtung
$\rho$	Massendichte, Oberflächendichte
$\tau_{app}$	Annäherungszeit der Vesikel im Feld
$\tau_d$	Zeitkonstante der Vesikeldeformation
$\tau_p$	Zeitkonstante der Vesikelpolarisation
$\parallel$	parallel zur Feldrichtung
$\perp$	senkrecht zur Feldrichtung

# 1 Einleitung

Die Methode der Membranelektroporation dient zur Einbringung von Wirkstoffen oder Genen in Zellen und Gewebe und ist in der Zellbiologie und Medizin weit verbreitet (Neumann, 1992). Die jüngst zum Mechanismus der elektrischen Porenbildung in Lipidmembranen und zum Membrantransport erarbeiteten Forschungsergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur Interpretation der bei der Elektroporation auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse (Griese, 2001). Trotz zahlreicher Modellvorschläge in der Vergangenheit, konnte bisher aber kein vollständiges Modell der bei der Elektroporation auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse konstruiert werden (Glaser et al., 1988), (Chernomordik et al., 1987), (Neumann et al., 2001). Die Messung und Deutung der Ergebnisse elektro-optischer und konduktometrischer Untersuchungen an mit optischen Sonden markierten unilamellaren Vesikeln, die als Modellsysteme für Zellen stehen, bilden die Grundlagen zum Verständnis des elektrischen Feldeffekts (Neumann et al., 1991), (Kakorin et al., 1998), (Neumann and Kakorin, 1996), (Griese, 2001).

Diese Arbeit fokussiert sich auf zwei wichtige Teilaspekte zur Methodik und theoretischen Behandlung elektro-optischer Feldsprungdaten von unilamellaren Lipidvesikeln mit optischer Sondenmarkierung (Neumann et al., 1998):

Zunächst wird der quantitative Zusammenhang zwischen der elektroporativen Deformation und der Membrankrümmung von Lipidvesikeln erarbeitet. In diesem Rahmen trägt ein neuer kinetischer Ansatz dazu bei, die elektroporativ bedingte Zunahme der Membranoberfläche separat von dem durch Membrandehnung und Ondulationsglättung entstandenen Anteil zu bestimmen. In dem neuen Modell wird die geometrische Krümmung als wesentlicher Faktor zur Erhöhung des Ausmaßes und der Rate der Elektroporation von Lipidvesikeln berücksichtigt.

Der zweite Teil behandelt die Absorptionsänderungen, die durch lipidmembrangebundene Sondenmoleküle in polarisiertem Licht im elektrischen Feldsprung hervorgerufen werden. Es stellt sich heraus, dass der Absorptionsdichroismus aller untersuchten Sondenmoleküle unabhängig vom Sondentypus, die gleiche Relaxationskinetik mit unterschiedlichem Ausmaß anzeigt. Weiterhin wird der sog. mittlere Konuswinkel  $\alpha_E(t)$  jeder Sonde, also der Winkel den das optische Übergangsdipolmoment des Chromophors mit der Membranflächennormalen einschliesst, aus den elektrischen Turbiditäts- und Absorptionsdaten für unterschiedliche Vesikelgrößen berechnet. Der mittlere Sonden-Konuswinkel liefert Informationen zur membranintrinsic Sondendynamik im elektrischen Feld. Mittels eines Modells für die  $\alpha(t)$ -Relaxationen können die Ergebnisse auf die durch die globale Vesikeldeformationen

hervorgerufenen Unterschiede in der relativen Lipidpackungsdichte und die Membranelektroporation zurückgeführt werden.

Die elektro-optischen Untersuchungen an Lipidvesikeln liefern einen Beitrag zum Verständnis des elektromechanischen Verhaltens von Zellen in elektrischen Feldern (Neumann et al., 1998; Neumann and Kakorin, 1999). Die elektrischen und mechanischen Eigenschaften von biologischen Membranen zeigen in vielen Fällen eine gute Übereinstimmung mit denen der Lipidvesikel (Sackmann, 1994). Kummrow und Helfrich (1991) haben die Elektrodeformation von Riesenvesikeln (LUV) mit Durchmessern von  $\varnothing = 10 - 20 \mu\text{m}$  im elektrischen Wechselstromfeld langfristig über die Vesikelkonturen im Lichtmikroskop verfolgt. Unsere neuen elektrooptischen Daten von Lipidvesikelsuspensionen mit Vesikelradien von  $a = 25 - 170 \text{ nm}$  ermöglichen nun auch die Deutung der Elektroelongation sehr kleiner Vesikel im Zusammenhang mit spezifischen Membraneigenschaften (Neumann et al., 1998).

Die große Membrankrümmung kleiner Vesikel führt zu einem relativen Dichtegradienten,  $\Delta\rho/\rho_0$ , der Lipidmoleküle entlang der Membrannormalen (Swairjo et al., 1994). Daher ändert sich, im Vergleich zu Vesikeln mit großem Durchmesser, sowohl die Biegesteifigkeit  $\kappa$  und der Kompressionsmodul  $K$  der Membran, wie auch das Ausmaß und die Rate der Membranelektroporation (MEP). Unlängst wurde der quantitative Effekt der Spontankrümmung  $c_0$  einer Membran auf das Ausmaß und die Rate der Membranelektroporation erarbeitet (Neumann and Kakorin, 1999). Das Ergebnis war, dass ein endlicher Wert für die Spontankrümmung  $c_0$ , die Membranelektroporation erleichtert. Analog Helfrichs Spontankrümmung  $c_0$ , sagt die Theorie vorher, dass die geometrische Krümmung  $H = 1/a$  der Membran ebenfalls zu einer Zunahme im Ausmaß und der Rate der elektrischen Porenbildung führen soll. Weiterhin stützen experimentelle Ergebnisse die Annahme, dass große Membrankrümmungen eine Vorbedingung für die Membranelektroporation sein können (Correa and Schelly, 1998). Methodisch liefert das elektrooptische Relaxationsexperiment für hohe elektrische Feldstärken den Grad der Vesikel-Elektrodeformation als Funktion der Zeit. Im allgemeinen spiegelt die Deformationsantwort von Vesikeln und Zellen im elektrischen Feld einen komplexen Prozess wider, der Informationen über die Glättung von thermischen Membranondulationen, die Dehnung der Membran, ebenso wie die Elektroporation enthält (Neumann et al., 1998). Glücklicherweise laufen die Prozesse der Membranondulationsglättung und Membranelektroporation auf unterschiedlichen kinetischen Zeitskalen ab, so dass dies eine Separierung der Prozesse ermöglicht. Unter Einhaltung der Randbedingung  $E \cdot a = \text{konst.}$ , kann der Effekt der Krümmung  $H$  auf die Membranelektroporation durch die Änderung der Feldstärke  $E$  bei unterschiedlichen Vesikelradien  $a$  und konstanter Transmembranpotentialdifferenz

$\Delta\phi = -1,5 \cdot E \cdot a$  an den Polkappen und für den Leitfähigkeitsfaktor  $f_\lambda = 1$  quantifiziert werden.

In dieser Arbeit werden membrangebundene, optische Sondenmoleküle benutzt. In einem elektro-optischen Feldsprungexperiment lassen sich feldinduzierte Restrukturierungen der Vesikelmembran beobachten. Ursprünglich wurde der negative Dichroismus von  $\beta$ -DPH pPC-markierten Vesikeln hauptsächlich als lokale Restrukturierung von Lipid- und Sondenmolekülen in den Rändern von Elektroporen interpretiert (Kakorin et al., 1996a). Eine detaillierte Analyse zeigt jedoch, dass der Hauptteil der Signaländerung des negativen Absorptionsdichroismus von  $\beta$ -DPH pPC quantitativ nur mit der globalen elektroporativen Vesikeldeformation gedeutet werden kann (Neumann and Kakorin, 1996), (Kakorin and Neumann, 1998), (Tönsing et al., 1997).

Eine präzise Bestimmung der Vesikeldeformation setzt jedoch die Kenntnis der räumlichen Orientierung der Sonden in der Membran voraus. Die vergleichende Analyse der Amplituden des Absorptionsdichroismus liefert bei gleicher Vesikelelongierung den mittleren Konuswinkel  $\alpha$  des optischen Übergangsmoments eines Sondenmoleküls, relativ zur Membrannormalen. Ergänzend dazu ist es möglich, bei Kenntnis der zeitlichen Abhängigkeit der Vesikeldeformation  $p(t)$  und  $\Delta A/A_0(t)$ , sowie unter Zuhilfenahme des Modells der elektroporativen Deformation, direkt die Relaxation  $\alpha_E(t)$  zu berechnen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass über den Einbau verschiedener optisch-anisotroper Sonden Strukturinformationen über unterschiedliche Regionen der Lipidmembran zugänglich sind. Die Sonde dient als Indikator zur Anzeige von Positionsänderungen der Lipidmoleküle in diesen Membranbereichen. Mit geeigneten Sondenstrukturen läßt sich der Membranbindungsort und die Ausrichtung der Sonde zur Membranflächennormalen bestimmen. Während sich das transmembrane, vermutlich an beiden wässrigen Grenzflächen der Membran durch hydrophile Hydroxyfunktionen fixierte Zeaxanthin (s.Abb. 34-E) z.B. im Mittel kollinear zur Membranflächennormalen ausrichtet (Milon et al., 1986), liegt das der Membran aufgelagerte Carbocyanin DiIC<sub>16</sub>(3) (s.Abb. 34-F) hauptsächlich orthogonal zu dieser Achse (Axelrod, 1979). Zeaxanthin besitzt nicht nur Sondencharakter, sondern verkoppelt lokal durch den transmembranen Durchgriff zu den hydrophilen Grenzflächen auch die beiden Monoschichten der Lipiddoppelschicht eines Vesikels miteinander. Dies führt zu einer nicht unerheblichen Versteifung der Membran, die dem Effekt durch Cholesterol gleichkommt (Brinkmann, 1998), weshalb Zeaxanthin auch als *Doppelcholesterol* bezeichnet wird (Lazrak et al., 1987). Dieser Effekt wird in der  $\alpha_E(t)$ -Relaxation für VET<sub>100</sub> deutlich sichtbar (s. Abb. 25-B, vgl. mit 25A,  $\beta$ -DPH pPC), da die feldinduzierte Änderung von  $\alpha$  wesentlich geringer ist, als bei allen anderen Farbstoffen. Cholesterol in der Lipidmembran, in der  $\beta$ -DPH pPC als Indikatorsonde benutzt wird, verringert die Deformation des Vesikels

mit steigendem Cholesterolgehalt und erhöht die Ausrichtung der Sonde in Richtung der Membranflächennormalen (Brinkmann, 1998). Im Gegensatz hierzu beeinflusst das Carbocyanin DiIC<sub>16</sub>(3) die Membran am geringsten, da lediglich zwei C<sub>16</sub>-Kohlenwasserstoffketten zur Bindung in den hydrophoben Teil der Membran reichen. Der Chromophor verbleibt auf der Membranoberfläche. TMA-DPH und PATMAN (s.Abb. 34-C+D) integrieren sich ähnlich wie das lipidanaloge  $\beta$ -DPH pPC (s.Abb. 34-A) parallel zu den Kohlenwasserstoffketten jeweils in eine Monoschicht der Membran (Pebay-Peyroula et al., 1994), (van Langen et al., 1989), (Lakowicz et al., 1983), (Kaiser and London, 1998). Das nicht an einer Membrangrenzfläche oder an einem Lipidmolekül befestigte DPH befindet sich frei gelöst im hydrophoben Teil der Membran. Entgegen früherer Annahmen (Cranney et al., 1983) gibt es zwei Grenzausrichtungen für das Molekül: senkrecht, zwischen den Lipidmonoschichten und parallel zur Membranflächennormalen. Die Anteile beider Ausrichtungen hängen stark vom physikalischen Zustand der Membran ab (s.Abb. 34-B) (van der Heide et al., 1996).

Die elektrischen Absorptionsdichroismen sondenmarkierter Vesikel zeigen, dass zwei Typen von Sondenorientierungsänderungen auftreten: (a) eine globale, korrelierte Reorientierung aller Sonden durch Mitführungseffekte der Membran, die den wesentlichen Anteil zu den optischen Signaländerungen ausmachen und die Vesikelelongierung anzeigen, sowie (b) die lokale Reorientierung, die den direkten Einfluss der zur Sonde benachbarten Lipidmoleküle widerspiegelt. Komplementär zum Absorptionsdichroismus liefert der Turbiditätsdichroismus (konservativer Dichroismus) das Ausmaß der Vesikelelongierung im elektrischen Feld. Unser mathematisches Modell des Absorptionsdichroismus (konsumptiver Dichroismus) erlaubt es, den Beitrag der Vesikeldeformation am Gesamtsignal der Absorption von dem der Membrandehnung, der Glättung von Ondulationen und der Elektroporation zu separieren. Dazu muss das Ausmaß der Vesikelelongierung bekannt sein. Die Analyse der Relaxationen des Absorptionsdichroismus liefert den mittleren Konuswinkel  $\alpha$  zwischen dem optischen Übergangsmoment der Membransonden und der Membranflächennormalen zu verschiedenen Zeitpunkten der elektroporativen Vesikeldeformation (Neumann et al., 1998), (Kakorin and Neumann, 1998), (Kakorin et al., 1998).

## 1.1 Motivation und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den spezifischen Effekt großer Membrankrümmungen auf die elektroporative Vesikeldeformation zu quantifizieren. Die Ergebnisse verbessern das Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Bildung von Elektroporen in Zellen und einfachen Lipidmembranen beitragen. Dazu werden farbstoffmarkierte und nicht markierte,

kleine unilamellare Vesikeln (LUV) mit unterschiedlichen Radien mittels elektrischer Turbiditäts- und Absorptionsrelaxationsmessungen untersucht. Neue Farbstoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften dienen hierbei als Reportersonden der Membrandynamik im elektrischen Feld. Die polarisationsoptische Bestimmung der molekularen Orientierungsänderungen liefert auch strukturelle Details über die Lipidmembran. In Kombination mit den Turbiditätsdaten erhält man Auskunft über die Vesikeldeformation und die Änderung der Vesikeloberfläche. Die chemische Umgebungsänderung durch den elektrisch getriebenen Eintritt von kleinen Ionen und Wasser in die Membran wird im chemischen Anteil der Absorptionsänderung der Sonde erfasst. Dadurch werden die Membranversteifungen durch adsorbierte bzw. inkorporierte membrangebundene Proteine, hochgeladene Kationen, wie auch durch Sucrose oder Cholesterol auf der Ebene der Sondenmoleküle zugänglich. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Quantifizierung der Positionsänderung der Chromophore in der Membran, so wie die Krümmung  $H$  der Membran und die Elektroporation.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammen von den Firmen E. Merck AG (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) und Serva FeinBiochemica GmbH (Deisenhofen) und sind, wenn nicht anders spezifiziert, in p.A.-Qualität und werden ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt. Die Herstellung wäßriger Lösungen und Suspensionen erfolgt mit bidestilliertem Wasser ( $\text{pH} \approx 6,5$ ).

NaCl (Merck, p. A.),  $M_r = 58,44$

Chloroform, (J. T. Baker;  $> 99\%$ )

Ethanol, (J. T. Baker;  $> 99\%$ )

#### 2.1.1 Lipide und Membranfarbstoffe

Das natürliche Lipidgemisch "Lecithin 20%" (im folgenden als Avanti 20  $\equiv$  Soy20 bezeichnet),  $M_r \approx 780$ , (Avanti Polar Lipids, Alabama (USA)) ist ein getrockneter  $\text{CHCl}_3$ /Methanol-Extrakt aus Sojabohnen mit den Hauptbestandteilen (Avanti Polar Lipids, 2001): Phosphatidylcholin PC (24,0 %), Phosphatidsäure PA (4,3 %), Phosphatidylethanolamin PE (18,6 %), Phosphatidylinositol PI (11,5 %), Lyso-PC LPC (4,6 %); Anteil an Lipid-Nebenbestandteilen 37 % (w/w). Eine Kontrolluntersuchung zum Restproteingehalt mittels Coomassie-Blue- und Silberanfärbung (Silverstain) eines Trenngels zeigt, daß der Proteinanteil von Avanti 20 unter der Nachweisgrenze beider Verfahren liegt (Proteinanteil in Av20  $< 0,1$  ppm). Der pH-Wert einer wäßrigen 1 mM Av20-Suspension (200  $\mu\text{M}$  NaCl) beträgt  $\text{pH} = 6,5$  bei  $T = 293\text{ K}$  (20 °C). Wässrige Suspensionen von Avanti 20 zeigen im Temperaturbereich von  $T = 283 - 313\text{ K}$  (10 – 30 °C) keine Lipidphasenumwandlung und liegen unter Standardbedingungen (STB) im flüssig-kristallinen Zustand vor.

#### **Membranfarbstoffe**

Die zur Markierung von Lipidvesikelmembranen benutzten optisch anisotropen Farbstoffe sind in Tab. 1 aufgeführt:

Tab. 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Kürzel, die IUPAC-Namen, relativen Molmassen und die Bezugsquellen der Membranfarbstoffsonden.

Kürzel	IUPAC-Name	M <sub>r</sub>	Bezugsquelle
DPH	All-trans-1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien	232	Aldrich
β-DPH pPC	2-(3-(Diphenylhexatrienyl)-propanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	782	Molecular Probes (Oregon, USA)
TMA-DPH	1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien-p-toluolsulfonat	463	Molecular Probes (Oregon, USA)
PATMAN	6-Hexadecanoyl-2-(((2-(trimethylammonium)ethyl)methyl)-amino)naphthalinchlorid	517	Molecular Probes (Oregon, USA)
DiIC <sub>16</sub> (3)	1,1'-Dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat	878	Molecular Probes (Oregon, USA)
Zeaxanthin	(3R,3'R)-β,β-carotin-3,3'-diol	569	Hoffmann-La Roche

Strukturformeln der Farbstoffe, sowie Angaben zu den lichteoptischen Eigenschaften und den Einbauorten in Lipidmembranen finden sich im Anhang 7.6, 7.7 und 7.7.1.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation der Lipidvesikel und Markierung mit Farbstoffsonden

Das Lipid wird zunächst in Chloroform gelöst und durch anschließendes Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum als feiner Film auf der Glasoberfläche der Kolbeninnenseite aufgezogen. Die Resuspension des trockenen Lipidfilms erfolgt am Rotationsverdampfer oberhalb der Lipidphasenumwandlungstemperatur (flüssig-kristalline Phase), durch Abschälen mit Hilfe kleiner Glaskugeln ( $\varnothing \approx 0,5$  mm) in bidestilliertem Wasser, 0,2 mM NaCl. Nach fünf Einfrier-Auftau-Zyklen (Flüssig-Stickstoff; 40 °C Wasserbad) zur Erhöhung des Einschlussvolumens der Vesikel (Olson et al., 1979) wird die Stammsuspension (20 mg Lipid/ml Lösungsmittel) aus multilamellaren Vesikeln in einem Miniextruder (LiposoFast) 21mal durch zwei übereinandergelegte Polycarbonatmembranen (Avestin/Milch) mit Porendurchmessern im Bereich von  $\varnothing = 50 - 400$  nm extrudiert (MacDonald et al., 1991) (Mayer et al., 1986). Man erhält so unilamellare Vesikel, VET (vesicles by extrusion techniques), die in der dynamischen Lichtstreuung eine enge Größenverteilung zeigen.

### **Markierung mit Farbstoffsonden**

Für die elektro-optischen Feldsprungmessungen werden die Vesikel mit sechs unterschiedlichen linearen, anisotropen Membranfarbstoffsonden markiert, die jeweils unterschiedliche Membraneinbauorte (s. Anhang 7.7.1) besetzen.

Zur Herstellung einer homogenen, sondenmarkierten Lipidsuspension (s. o.) ersetzt man einen Teil des Lipids bei der Einwaage durch die entsprechende Sonde, so daß man, je nach Sondentyp, ein molares Verhältnis Sonde : Lipid im Bereich von 1 : 10 bis 1 : 800 erhält. Bei Bedarf werden die Farbstoffe in Ethanol gelöst. Diese Stammlösungen werden zur Lipid/Chloroform-Lösung vor dem Abdestillieren hinzupipettiert.

Alle Farbstoffe werden bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gelagert und bis zur Verwendung im Experiment lichtgeschützt aufbewahrt.

## **2.2.2 Lichtoptische Methoden**

### **OD-Messungen**

Die optische Dichte (OD) wird in einem Doppelstrahl-UV/VIS-Spektrophotometer (KONTRON UVIKON 860 bzw. 946) in Quarzküvetten mit einer optischen Weglänge von  $\ell = 1\text{ cm}$  durchgeführt.

Die optische Dichte hat einen Absorptions- und einen Turbiditätsanteil

$$\text{OD} = -\log \frac{I}{I_0} = A + T, \quad (1.1)$$

wobei  $I$  und  $I_0$  die Lichtintensitäten bei  $\ell$  und  $\ell = 0$  sind, hier im Wellenlängenbereich von  $\lambda = 220 - 700\text{ nm}$ .

Die Absorptionsspektren sind die Differenzen der OD-Spektren der markierten,  $\text{OD}(\text{V}, \text{D})$ , und unmarkierten,  $\text{OD}(\text{V})$ , Vesikelsuspensionen (s. Anhang 7.5).

$$A_{\text{D}} = \text{OD}(\text{V}, \text{D}) - \text{OD}(\text{V}) \quad (1.2)$$

### **Fluoreszenz-Messungen**

Die Messung der stationären Fluoreszenz der Membransonden erfolgt an einem Einstrahl-Fluoreszenzspektrophotometer des Typs Hitachi F 4010 (Fa. Hitachi Ltd., Tokyo). Das eingestrahlte Licht ( $I_0$ ) stammt von einer 150 W Xenon-Hochdrucklampe. Das emittierte Fluoreszenzlicht ( $I_{90}$ ) von Vesikelsuspensionen wird im Winkel von  $90^{\circ}$  zur Einstrahlrichtung ( $I_0$ )

detektiert.  $I_{90}$  kann neben dem echten Fluoreszenzlicht,  $F_{90}$ , auch Rayleigh-,  $S_{90}$ , oder Raman-Streulicht ( $R_{90}$ ) enthalten.

$$I_{90} = F_{90} + S_{90} + R_{90} \quad (1.3)$$

Die gemessene (relative) Fluoreszenzintensität wird auf einer Skala von 0 - 9999 (Geräteeinheiten) angegeben. Die von Vesikelsuspensionen gemessenen Fluoreszenzspektren enthalten keine Basislinienkorrektur, da der Beitrag unmarkierter Vesikel in allen Fällen weniger als 0,5 % der Gesamtintensität beträgt.

Die Spaltbreiten betragen bei allen Messungen 3 nm, die Aufzeichnungsgeschwindigkeit liegt bei 120 nm/min bei einer Antwortzeit von 2 s.

### ***Dynamische Lichtstreuung und Bestimmung des Brechungsindex von Av20***

Mittels quasi-elastischer Lichtstreuung werden die mittleren Vesikeldurchmesser für die aus Avanti 20 hergestellten Large unilamellar vesicles (SUV) bestimmt. Die mit Hilfe der Extrusion durch Polycarbonatmembranen mit 50-, 100-, 200- und 400-nm Porendurchmesser erzeugten SUV, weisen Durchmesser von  $\varnothing$  /nm = 50 ( $\pm 15$ ), 76 ( $\pm 20$ ), 160 ( $\pm 45$ ), 340 ( $\pm 94$ ) auf. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der von Mayer et al. (1986) bzw. Tönsing et al. (1997) für LUV gefundenen Größenverteilungen.

Die Bestimmung des Brechungsindex von Lipidvesikelsuspensionen aus Avanti 20 erfolgt mittels eines thermostatisierten Abbe-Refraktometers (Fa. Zeiss, Jena). Siehe hierzu Anhang 7.2.

## **2.2.3 Elektroporationstechnik – $\mu$ s - Pulse**

### ***Pulsinduzierte Temperaturerhöhung der Vesikelsuspension***

Elektrische Pulse in ionischen Lösungen verursachen *Joulesche Wärme* und somit eine Temperaturerhöhung. Für Rechteckpulse gilt bei kleinen Temperaturänderungen und unter Annahme eines konstanten Leitwertes  $G_0$  für die Temperaturdifferenz  $\Delta T$ :

$$\Delta T = \frac{U^2 \cdot t_E \cdot G_0}{c_p \cdot \rho \cdot V} \quad [\Delta T \gg T; G_0(T + \Delta T) \approx G_0(T)] \quad (1.4)$$

wobei  $U$  die angelegte Spannung,  $t_E$  die Pulsdauer,  $G_0$  ( $G_0^{-1} = R$ , elektrischer Widerstand) der Grundleitwert,  $V$  ( $\text{cm}^3$ ) das Probenvolumen,  $c_p = 4,18 \text{ J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$  die spezifische Wärme und  $\rho = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  die Dichte von Wasser bei  $T = 293$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sind.

Bei typischen elektrischen Leitwerten  $G_0 \approx 50 - 150 \text{ } \mu\text{S}$  und applizierten Spannungen von  $U \leq 30 \text{ kV}$  ist der bei  $t_E = 10 \text{ } \mu\text{s}$  in der Vesikelsuspensionen hervorgerufene Temperaturanstieg  $\Delta T_{\text{max}} \approx 0,33 \text{ K}$  also vernachlässigbar klein.

Dieser geringe Temperaturanstieg kann ausserhalb des Phasenumwandlungsbereichs bei den untersuchten Systemen in keinem Fall eine Lipidphasenumwandlung bewirken.

### ***Elektro-optische Messungen***

Rechteckpulse mit einer Pulsdauer von  $t_E = 10 \text{ } \mu\text{s}$  und Feldstärken von bis zu  $8,5 \text{ MV m}^{-1}$  werden durch eine Kabelentladung über eine Meßzelle mit zwei plan-parallelen Graphitelektroden erzeugt. Hierbei werden die Proben mittels einer Thermostatisierungseinheit auf der gewünschten Temperatur  $T = 293 \text{ K}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gehalten. Eine Beschreibung des Aufbaus der Feldsprungapparatur und deren Hard- und Softwaresteuereinheiten zur Messdatenerfassung und -verarbeitung findet sich bei (Griese, 2001).

Für alle elektro-optischen Relaxationsmessungen werden Messzellen mit einem Plexiglaskorpus, konischen Quarzfenstern und planparallelen Graphitelektroden im Abstand von  $d = 0,3$  und  $0,5$  sowie  $0,9 \text{ cm}$  verwendet. Die feldinduzierten Änderungen der Lichtintensität,  $I$ , von linear polarisiertem Licht werden, je nach verwendeter Sonde, bei den Wellenlängen  $\lambda = 365, 436$  und  $545$  bzw.  $578 \text{ nm}$  (Hg-Linie) aufgezeichnet.

Die Änderung der Lichtintensität der parallel ( $\parallel$ ) und senkrecht ( $\perp$ ) zum angelegten Feld polarisierten Komponente (Polarisationswinkel  $\sigma^{\parallel} = 0^\circ$  und  $\sigma^{\perp} = 90^\circ$ ) ergibt die Änderung der optischen Dichte  $\Delta OD^\sigma$  nach:

$$\Delta OD^\sigma = OD^\sigma(E) - OD_0^\sigma = -\log\left(1 + \frac{I^\sigma(E) - I^\sigma}{I^\sigma}\right) \quad (1.5)$$

Dabei sind  $OD^\sigma(E)$  bzw.  $I^\sigma(E)$  die Signale im elektrischen Feld und  $OD_0^\sigma$  bzw.  $I^\sigma$  die Signale ohne angelegtes Feld ( $E = 0$ ). Gl. (1.5) beschreibt die OD als Summe von Absorption ( $A$ ) und Turbidität ( $T$ ). Bei kleinen Sondenkonzentrationen beeinflussen die Sondenmoleküle die lichtoptischen Eigenschaften der Vesikel, und somit die Turbidität der Vesikelsuspension, nicht. Unter der Voraussetzung gleicher Lipidkonzentration und Vesikelgröße ist die Absorption  $A^\sigma$  der membrangebundenen Sonde die Differenz  $A^\sigma = OD^\sigma(V, D) - OD^\sigma(V)$  der

OD der unmarkierten Vesikelsuspension,  $OD^\sigma(V)$ , und der OD der sondenmarkierten Vesikelsuspension,  $OD^\sigma(V, D)$  (s. Anhang 7.5).

Die feldinduzierten Änderungen  $\Delta A^\sigma$  der Absorption sind die entsprechenden Differenzen der Änderungen der OD der unmarkierten und markierten Vesikelsuspension:

$$\Delta A^\sigma = \Delta(\Delta OD^\sigma) = \Delta OD^\sigma(V, D) - \Delta OD^\sigma(V). \quad (1.6)$$

Die durch das applizierte elektrische Feld in der Vesikelsuspension induzierten Absorptionsänderungen,  $\Delta A^\sigma = \Delta(\Delta OD^\sigma)$ , lassen sich zum einen auf Orientierungsänderungen ( $\Delta OD^\sigma_{OR}$ ) des optischen Übergangsdipolmoments des Chromophors und zum anderen auf Änderungen ( $\Delta OD^\sigma_{CH}$ ) der chemischen Umgebung des Sonde zurückführen.

$$\Delta OD^\sigma = \Delta OD^\sigma_{OR} + \Delta OD^\sigma_{CH} \quad (1.7)$$

Sowohl der konservative Dichroismus ( $\Delta A = \Delta A^\parallel_{OR} - \Delta A^\perp_{OR}$ ), als auch der konsumptive Dichroismus ( $\Delta T = \Delta T^\parallel_{OR} - \Delta T^\perp_{OR}$ ) sind klassisch aber nur für Orientierungsänderungen definiert worden (Stoylov and Neumann, 1992):

$$\Delta OD = \Delta OD^\parallel_{OR} - \Delta OD^\perp_{OR}. \quad (1.8)$$

Die Differenzmoden  $\Delta T^-$  und  $\Delta A^-$  sind nach Gleichung (1.7) gegeben durch (Kakorin and Neumann, 1996):

$$\Delta A^- = \Delta A^\parallel - \Delta A^\perp = \Delta A + (\Delta A^\parallel_{CH} - \Delta A^\perp_{CH}) \quad (1.9)$$

$$\Delta T^- = \Delta T^\parallel - \Delta T^\perp = \Delta T + (\Delta T^\parallel_{CH} - \Delta T^\perp_{CH}). \quad (1.10)$$

Für kleine Änderungen in der chemischen Umgebung des Chromophors oder für  $\Delta T^\parallel_{CH} \approx \Delta T^\perp_{CH}$  und für  $\Delta A^\parallel_{CH} \approx \Delta A^\perp_{CH}$  sind die Dichroismen durch die Differenzen gegeben:

$$\Delta A^- = \Delta A \text{ und } \Delta T^- = \Delta T.$$

Informationen über Veränderungen in der unmittelbaren Lösungsumgebung des Chromophors erhält man aus der gewichteten Summe  $\Delta A^+$  (Plusmode der Absorption) der gemessenen Absorptionsmoden (Revzin and Neumann, 1974). Sie beruhen weitgehend auf dem feld-induzierten Eintritt von Wasser und kleinen Ionen in die Lipidphase:

$$\Delta A^+ = \frac{(\Delta A^\parallel + 2 \cdot \Delta A^\perp)}{3} \quad (1.11)$$

Ionen erzeugen in der Nähe eines Chromophors ein lokales, inhomogenes elektrisches Feld, in dem die Ladungen des optisch angeregten Chromophors (Übergangsdipol) verschoben werden. Die dabei resultierende, charakteristische feldinduzierte Verschiebung des Absorptionsspektrum des Moleküls bezeichnet man als elektrochromen Effekt.

Änderungen in der Turbiditäts-Plusmode  $\Delta T^+$  resultieren im wesentlichen aus der Variation des Brechungsindex bedingt durch den feldgetriebenen Eintritt von Wasser und Ionen in den Kopfgruppenbereich der Membran, sowie auf Membrandicken-, Form- und Volumenänderungen der Vesikel (Kakorin and Neumann, 1998). Entsprechend Gl. (1.11) gilt:

$$\Delta T^+ = \frac{(\Delta T^{\parallel} + 2 \cdot T^{\perp})}{3} \quad (1.12)$$

Im weiteren werden die reduzierten Dichroismen bzw. Differenzen ( $\Delta T/T_0$  und  $\Delta T^-/T_0$ , sowie  $\Delta A/A_0$  und  $\Delta A^-/A_0$ ) bzw. gewichteten Summen ( $\Delta T^+/T_0$  und  $\Delta A^+/A_0$ ) eingesetzt; sie beziehen sich auf die Absorption ( $A_0$ ) bzw. Turbidität ( $T_0$ ) ohne angelegtes Feld.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Optische Dichte

##### 3.1.1 Einfluss der Farbstoffe auf Vesikelmembranen

Die Dotierung der Lipiddoppelschicht mit den optisch anisotropen Membransonden  $\beta$ -DPH pPC, DPH, TMA-DPH, PATMAN, Zeaxanthin oder DiIC<sub>16</sub>(3) (s. Abb. der Farbstoffstrukturen im Anhang 7.7.1) verändert das OD-Spektrum einer Vesikelsuspension infolge der Absorptionsbeiträge des Chromophors in charakteristischer Weise. Die Abb. 1 zeigt, dass die Farbstoffe im Wellenlängenbereich von  $300 \leq \lambda / \text{nm} \leq 600$  absorbieren.

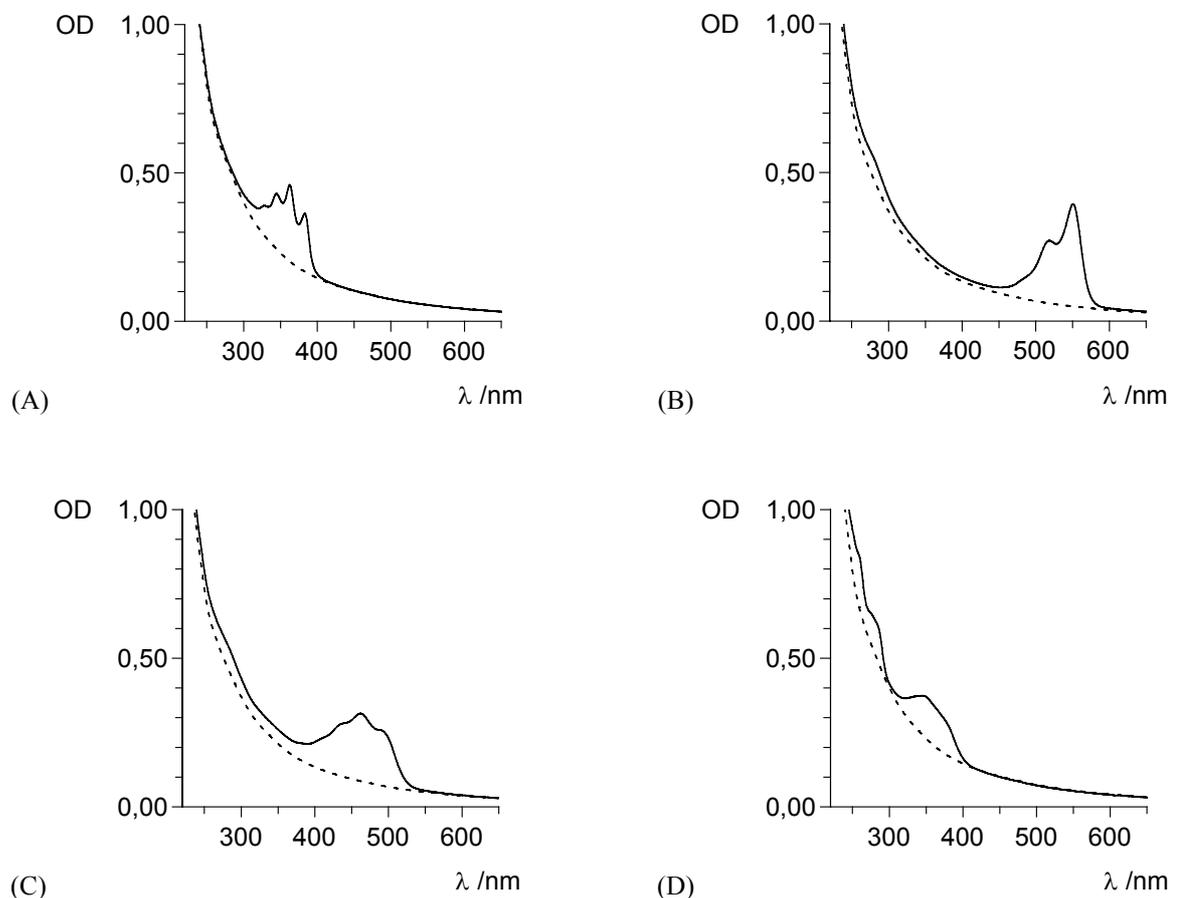


Abb. 1: OD-Spektren wässriger Suspensionen unmarkierter, unilamellarer Vesikel (VET) aus dem Lipid Av20, (- - -), und der gleichen, aber farbstoffmarkierten Suspension (—), als Funktion der Wellenlänge  $\lambda / \text{nm}$ . Vesikelradius:  $a = 38 \text{ nm}$ , Vesikeldichte  $\rho_{\text{VET}} = 7,4 \cdot 10^{14} \text{ L}^{-1}$ ,  $[\text{Av20}]_{\text{T}} = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Farbstoffe: (A)  $[\beta\text{-DHPp PC}] = 5,0 \mu\text{M}$ ; (B)  $[\text{DiIC}_{16}(3)] = 2,5 \mu\text{M}$ ; (C)  $[\text{Zeaxanthin}] = 5,0 \mu\text{M}$ ; (D)  $[\text{PATMAN}] = 10,0 \mu\text{M}$ .

Die Absorptionsspektren von DPH und TMA-DPH sind im Anhang 0 dargestellt. Sie unterscheiden sich nur geringfügig vom für  $\beta$ -DPH pPC (s. Abb. 1A) gezeigten OD-Spektrum.

Ausserhalb der Absorptionsbanden gilt für Sondentotalkonzentrationen von  $[\text{Sonde}]_T \leq 10 \mu\text{M}$  im molaren Verhältnis  $[\text{Sonde}] : [\text{Lipid}] = 1 : 100$  (s. Abb. 1)  $OD_0 = T_0$ . Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für die Bestimmung der elektro-optischen Absorptionsänderungen  $\Delta A$  in Vesikelsuspensionen mittels einer Differenzbildung gemäß  $\Delta A_\lambda = OD_\lambda - T_\lambda$ .

Die statischen optischen Daten enthalten keine Information über den Einfluss der Farbstoffe auf die mechanischen Eigenschaften der Vesikel. Bei der Sondentotalkonzentrationen  $[\text{Sonde}]_T = 10 \mu\text{M}$  erfolgt aber bereits eine merkliche Beeinflussung der Vesikelverformbarkeit.

### ***Auswirkung unterschiedlicher Farbstoffkonzentrationen***

Die Dotierung einer Lipidmembran mit Sondenmolekülen sollte die physikalischen Eigenschaften des markierten Systems nur minimal beeinflussen. Im Idealfall verhält sich die Sonde als reines „Reportermolekül“ und verändert weder andere optische noch mechanische Kenngrößen der Membran.

Ersetzt man in Lipiddoppelschichten von Vesikeln ansteigend jeweils einen definierten Anteil an Lipidmolekülen durch Sondenmoleküle (konstante Totalkonzentration), so ändern sich zunächst weder die Turbidität der Vesikel, noch die Form, Lage und Anzahl der Banden in den Absorptionsspektren (Abb. 2). Die molaren Absorptionskoeffizienten der Farbstoffe in der membrangebundenen Form bleiben gleich (Abb. 38A). Dies gilt jedoch nur unterhalb einer, für jeden Farbstoff spezifischen Grenzkonzentration,  $c_{\text{crit}}(D)$  (Abb. 38B). Überschreitet man  $c_{\text{crit}}(D)$ , so treten Änderungen in den OD-Spektren der Farbstoffmoleküle auf. Die Grenzkonzentration für alle Sonden gibt an, bis zu welcher Konzentration der Sonden- und nicht der Störcharakter der Farbstoffmoleküle den Ausschlag gibt. Das ist bei  $c_{\text{crit}}(D) \approx 10 \mu\text{M}$ , entsprechend einem molaren Verhältnis von  $[\text{Sonde}] : [\text{Lipid}] = 1 : 100$ .

Bei Zeaxanthin weichen die OD-Werte  $OD_{\lambda\text{-in}}([\text{Zeax}])$  innerhalb der Absorptionsbanden oberhalb von  $c_{\text{crit}}(\text{Zeax}) \approx 10 \mu\text{M}$  vom linearen Verhalten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ab (s. Abb. 2A). Gleichzeitig ist aber die außerhalb der Absorptionsbanden gemessene optische Dichte,  $OD_{\lambda\text{-ex}}$ , der markierten Vesikel unabhängig von der Zunahme der Farbstoffkonzentration. Die  $OD_{\lambda\text{-in}}$  zeigt für Zeaxanthin einen linearen Verlauf bis zu einer Sondentotalkonzentration von  $c_{\text{crit}}(\text{Zeax}) = 10 \mu\text{M}$  (Abb. 2A), für das Carbocyanin DiIC<sub>16</sub>(3) bis  $c_{\text{crit}}(\text{DiIC}_{16}(3)) = 20 \mu\text{M}$  (Abb. 2B). Innerhalb des untersuchten Bereichs der Sondenkonzentration ist die optische Dichte der Vesikel,  $OD_{\lambda\text{-ex}}$ , konstant und damit unabhängig von der Membransondenkonzentration. Der Farbstoff Zeaxanthin wird bei Konzentrationen  $[\text{Zeax}] > 10 \mu\text{M}$  nicht mehr quantitativ in die Vesikelmembran eingebaut. Für  $[\text{Zeax}] > 10 \mu\text{M}$  findet man im OD-Spektrum markierter

Vesikel bei  $\lambda \approx 280$  nm eine neue Bande, die kolloidal in Lösung gegangenem Zeaxanthin zugeordnet wird (Abb. 38B) (Lazrak et al., 1987).

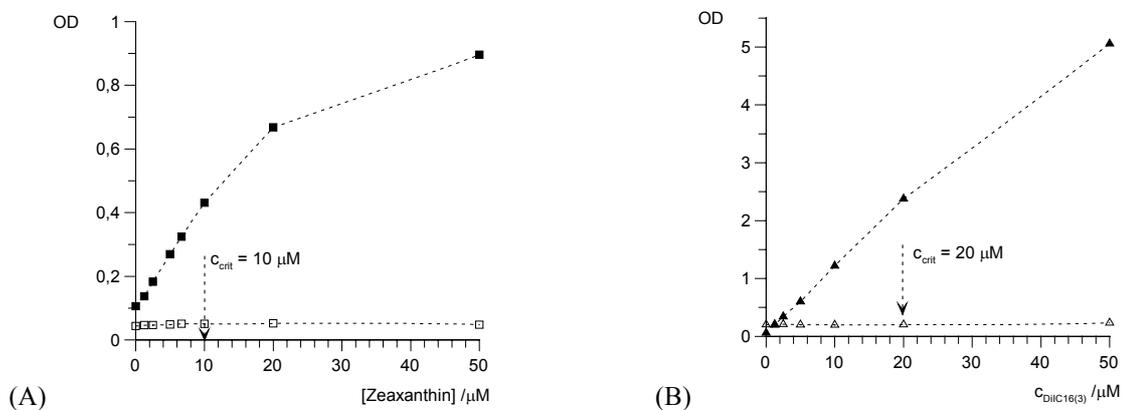


Abb.2: Die optische Dichte,  $OD_{\lambda\text{-in}}$ , (gefüllte Symbole) *innerhalb* der Absorptionsbanden von farbstoffmarkierten Suspensionen unilamellarer Av20-Vesikel als Funktion der Totalkonzentration der Farbstoffe Zeaxanthin (3A) und DiIC<sub>16</sub>(3) (3B) und die optische Dichte,  $OD_{\lambda\text{-ex}}$ , (ungefüllte Symbole) *außerhalb* der Absorptionsbanden der Farbstoffe.

Vesikelradius:  $a = 38$  nm. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 1

(A) Zeaxanthin:  $OD_{\lambda=436\text{nm}}(\text{in}, \blacksquare)$ ;  $OD_{\lambda=578\text{nm}}(\text{out}, \square)$ ;  $\epsilon_{436} = 32460 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

(B) DiIC<sub>16</sub>(3):  $OD_{\lambda=545\text{nm}}(\text{in}, \blacktriangle)$ ;  $OD_{\lambda=365\text{nm}}(\text{out}, \triangle)$ ;  $\epsilon_{545} = 116050 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Im Anhang in Abb. 39 sind die Abhängigkeiten der  $OD_{\lambda\text{-in}}$ - und  $OD_{\lambda\text{-ex}}$ -Werte für  $\beta$ -DPH pPC und PATMAN gezeigt. In beiden Fällen ist auch hier  $OD_{\lambda\text{-ex}}$  konstant. Innerhalb der Absorptionsbanden hängen wiederum die  $OD_{\lambda\text{-in}}$ -Werte für [Sonde] = 0 - 50  $\mu\text{M}$  linear von der Sondentotalkonzentration ab. Es gibt also keine optisch sichtbaren Wechselwirkungen zwischen den Sondenmolekülen.

Allen Membranfarbstoffen ist also gemeinsam, dass  $OD_{\lambda\text{-ex}}$  unabhängig von der Farbstoffkonzentration ist. D.h., die optischen Eigenschaften der Vesikel wie der Brechungsindex der Membran werden durch die Anwesenheit der membrangebundenen Sonden nicht beeinträchtigt.

Die Farbstoffe entsprechen also im Konzentrationsbereich [Sonde]  $\leq 10 \mu\text{M}$  den Anforderungen an inerte Sondenmoleküle.

### 3.2 Elektro-optische Relaxationen in $\mu\text{s}$ - Feldpulsen

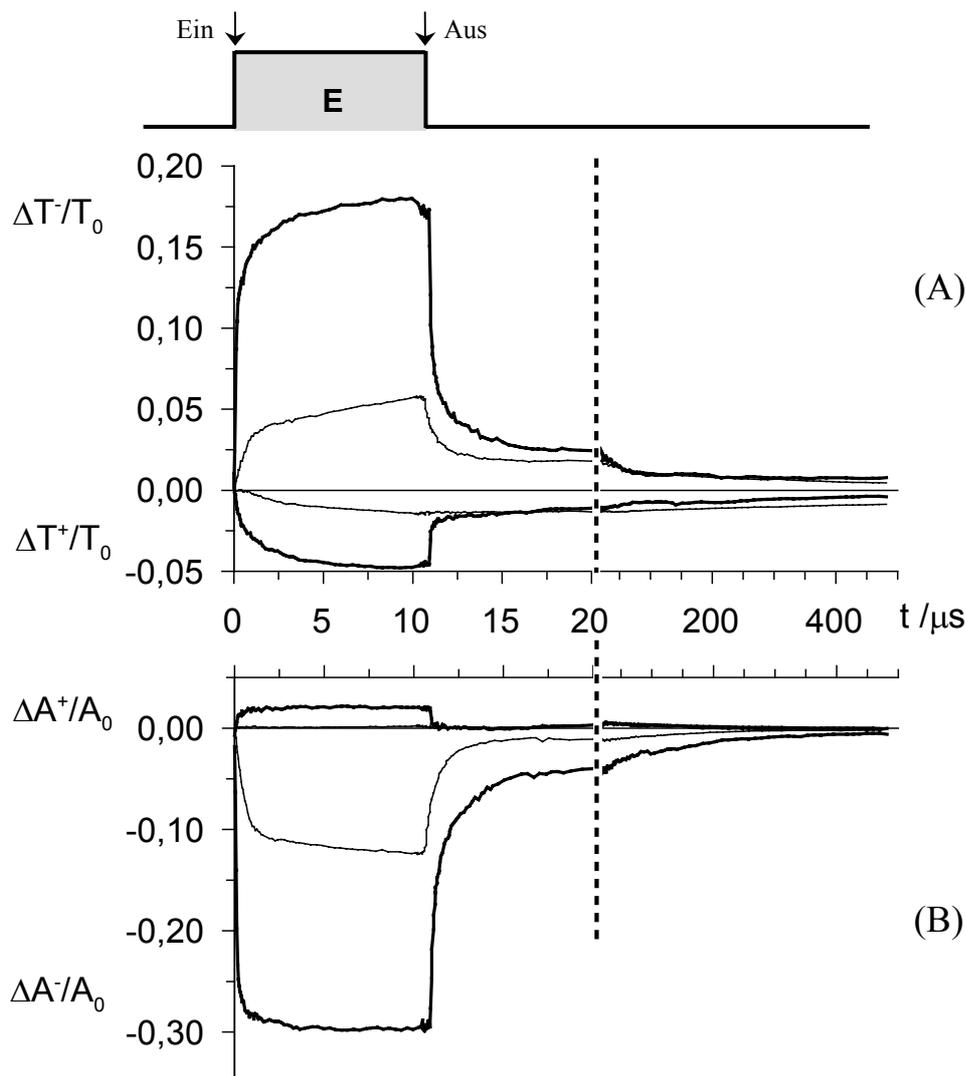


Abb. 3: Die Ein- und Ausfeld-Relaxationen der Minus-, ( $\Delta A^-/A_0$ ,  $\Delta T^-/T_0$ ), und Plusmoden ( $\Delta A^+/A_0$ ,  $\Delta T^+/T_0$ ) der Turbidität,  $T$ , und der Absorption,  $A$ , von  $\beta$ -DPH pPC-markierten (B) und unmarkierten Vesikelsuspensionen (A), gemessen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 365$  nm und den zwei extremen Feldstärken  $E = 2 \text{ MVm}^{-1}$  (dünne Linie) und  $E = 8 \text{ MVm}^{-1}$  (dicke Linie) nach einem Rechteckfeldpuls der Pulsdauer  $t_E = 10 \mu\text{s}$ . Anmerkung: Bei  $t \geq 20 \mu\text{s}$  ändert sich in beiden Graphen die Teilung der Zeitachse.  $a_{\text{VET}} = 38 \text{ nm}$ ,  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5,0 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH} = 6,5$ .

Die visuelle Inspektion der elektro-optischen Daten farbstoffmarkierter und unmarkierter Lipidvesikel zeigt, dass sich die Plus-, wie auch die Minusmode der Absorption und Turbidität aus mindestens zwei Relaxationsmoden, I und II, zusammensetzen (s. Abb. 3). Dabei sind die Moden durch einen Faktor von etwa zehn in der Größenordnung getrennt. Der Signalverlauf

beider Moden dient als Indikator globaler Änderungen der Vesikelform und -umgebung, sowie der strukturellen Veränderungen, die die Lipidmembran im Ein- und Ausfeldbereich durchläuft.

Nach dem Einschalten des elektrischen Feldes steigen die Absorptionsmoden ( $\Delta A^-/A_0$ ,  $\Delta A^+/A_0$ ) im Feldstärkebereich von  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  zunächst innerhalb  $\approx 1 \mu\text{s}$  auf ca. 80 – 85 % ( $E = 2 \text{ MV m}^{-1}$ : 50 - 55 %) des Endwertes bei  $t_E = 10 \mu\text{s}$  an (s. Abb. 3B). Der Betrag der Amplitude der Minusmode der Absorption ist für alle Feldstärken immer wesentlich größer als der der Plusmode ist. Nach dem Abschalten des Feldes relaxiert das Signal ebenfalls in zwei Moden, allerdings erreicht die Minusmode ihren Anfangswert  $\approx 400 \mu\text{s}$ .

Die Moden der Turbidität,  $\Delta T^-/T_0$  und  $\Delta T^+/T_0$ , unterscheiden sich von denen der Minus- und Plusmode der Absorption: Zum einen ist der Signalanstieg innerhalb  $1 \mu\text{s}$  nach dem Einschalten des Feldes bei den Relaxationsmoden I und II der Plus- und Minusmode im Vergleich kleiner als der in der Absorption. Zum anderen unterscheiden sich die Raten der Relaxationsmoden der Minus- und der Plusmode der Turbidität voneinander (s. Abb. 3A). Auch die Minus- und Plusmode der Turbidität erreicht selbst  $400 \mu\text{s}$  nach Abschalten des Feldes nicht wieder den Ausgangswert für  $t_E = 0 \mu\text{s}$ .

Ein Vergleich der relativen Änderungen in den Minusmoden der Turbidität und Absorption liefert ein interessantes Ergebnis (s. Abb. 4): Bereits auf der Ebene der Rohdaten wird deutlich, dass die Minus-Moden  $\Delta T^-/T_0$  und  $\Delta A^-/A_0$  nicht unmittelbar denselben feldinduzierten Prozess widerspiegeln können, da die beiden Relaxationsmoden nach einer Normierung auf ihre jeweiligen Endwerte bei  $t_E = 9,86 \mu\text{s}$  nicht deckungsgleich sind. Die  $\Delta A^-/A_0$ -Mode ist die schnellere von beiden Moden. Die Membransonden können also einen oder mehrere, zusätzliche Prozesse detektieren, die durch die  $\Delta T^-/T_0$ -Moden allein nicht angezeigt werden. Die Normierung ist hier möglich, da bei externen Feldstärken von  $E \leq 5 \text{ MV m}^{-1}$   $\Delta A^+/A_0 \ll \Delta A^-/A_0$  gilt und ebenso  $\Delta T^+/T_0 \ll \Delta T^-/T_0$ . Damit ist auch  $\Delta A/A_0 = \Delta A^-/A_0$ , sowie  $\Delta T/T_0 = \Delta T^-/T_0$ .

Alle farbstoffmarkierten Vesikel zeigen in den Minusmoden der Turbidität und der Absorption unabhängig von ihrem Einbauort und ihrer Lage relativ zur Membranormalen diese Unterschiede.

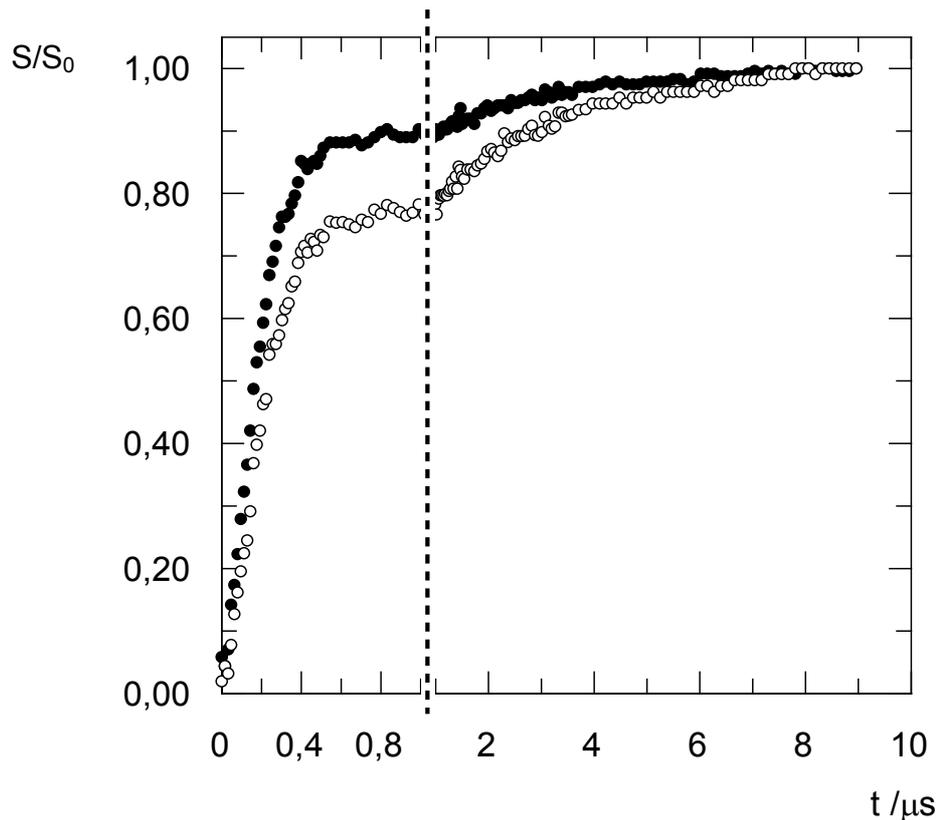


Abb. 4: Die relative Signaländerung,  $S/S_0$ , der Einfeld-Relaxationen des Absorptions-,  $\Delta A/A_0$  (●), und des Turbiditätsdichroismus,  $\Delta T/T_0$  (○), von  $\beta$ -DPH pPC-markierten und unmarkierten Vesikelsuspensionen, normiert auf die jeweils bei  $t_E = 9,86 \mu\text{s}$  erreichten Endwerte der Moden, dargestellt als Funktion der Zeit bei einer Feldstärke von  $E = 5 \text{ MV m}^{-1}$  und der Messwellenlänge  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.

Die elektro-optische Daten der Minus- und Plusmode der Turbidität in den Lipid-/Salzkonzentrationsbereichen von  $0,2 \leq [\text{Lip}]_T / \text{mM} \leq 2,0$  und  $0,1 \leq [\text{NaCl}]_T / \text{mM} \leq 2,0$  zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit keine Konzentrationsabhängigkeit (s. Anhang 7.4.2). Die elektro-optischen Messergebnisse stellen somit additive Feldeffekte über ein Ensemble von Einzelvesikeln dar. Feldinduzierte Vesikel-Vesikelkontakte sind daher unter den gegebenen Bedingungen zu vernachlässigen (s. Anhang 7.4.1).

### 3.2.1 Radienabhängigkeit der Minus- und Plusmoden der Turbidität und Absorption

Der Radius der Vesikel  $a$ , d.h. die Krümmung  $H = 1/a$  beeinflusst die Amplitude und die Relaxationsrate sowohl der elektro-optischen Turbiditäts- als auch der Absorptionssignale. Die Minusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$ , und der Turbidität,  $\Delta T^-/T_0$ , nehmen für eine als konstant gewählte Transmembranspannung, hier  $\Delta\phi_m = -0,3 \text{ V}$ , mit der Vesikelkrümmung  $H$  in Ausmaß und Geschwindigkeit der zugrundeliegenden Prozesse zu (s. Abb. 5A).

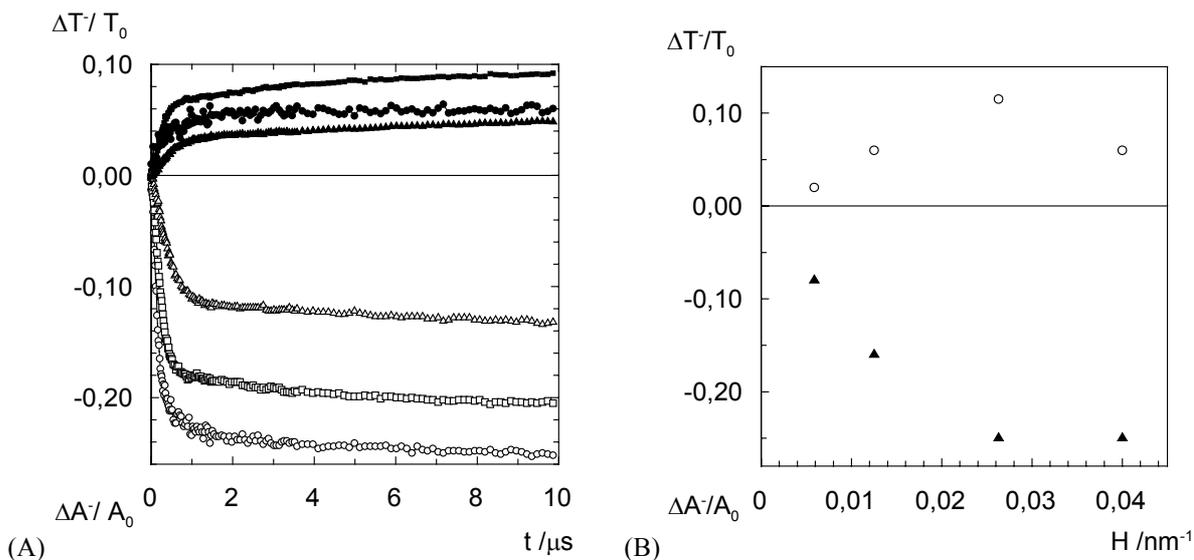


Abb. 5: (A) Die Einfeld-Relaxationen der Minusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$ , und der Turbidität,  $\Delta T^-/T_0$ , dargestellt für die Vesikelradien (Krümmung):  $a/\text{nm}$  ( $H/\text{nm}^{-1}$ ) = 25 ( $\circ$ ) (0,04), 38 ( $\square$ ) (0,02), 80 ( $\triangle$ ) (0,01). Gefüllte Symbole: Turbidität.  
 (B) Die Endwerte der Einfeld-Minusmoden der Absorption ( $\blacktriangle$ ),  $\Delta A^-/A_0$ , und der Turbidität ( $\circ$ ),  $\Delta T^-/T_0$  bei  $t_E = 9,86 \mu\text{s}$  als Funktion der Krümmung  $H$ . Vesikelradien und Krümmung:  $a/\text{nm}$  ( $H/\text{nm}^{-1}$ ) = 25 (0,04), 38 (0,026), 80 (0,0125), 170 (0,0059). Exp. Bed.:  $[\text{Av}20]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  (20 °C),  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5,0 \mu\text{M}$ , Messwellenlänge:  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . Konstante Transmembranspannung:  $\Delta\phi_m = -0,3 \text{ V}$ .

Bei der konstanten Transmembranspannung  $\Delta\phi_m = -0,3 \text{ V}$  wirkt eine geringere Krümmung der Vesikelmembran anscheinend hemmend auf die elektro-induzierten Prozesse. Die Abhängigkeit ändert sich für  $\Delta T^-/T_0$  jedoch nicht monoton mit der Krümmung, vielmehr durchläuft sie bei  $H = 0,026 \text{ nm}^{-1}$  ( $a = 38 \text{ nm}$ ) ein Maximum. Der Betrag von  $|\Delta A^-/A_0|$  (s. Abb. 5B) nimmt hingegen monoton mit steigender Membrankrümmung  $H$  zu.

Stark gekrümmte Lipidmembranen zeigen eine überraschende Besonderheit in der Feldstärke-Abhängigkeit der Minusmoden der Absorption und der Turbidität (s. Abb. 6): Die Endwerte der Minusmode der Turbidität bei  $t_E = 10 \mu\text{s}$  sind bei einer großen Krümmung ( $a = 25 \text{ nm}$ ) unabhängig von der externen Feldstärke. Die Absorption kommt dem Verlauf von  $\Delta A^-/A_0$  mit der Feldstärke  $E$  größerer Vesikel ( $a = 80 \text{ nm}$ ) nahe. Im Feldstärkebereich von  $2 \leq E/\text{MV m}^{-1} \leq 8$  steigt  $\Delta A^-/A_0$  für  $\text{VET}_{50}$  von  $\Delta A^-/A_0 \approx 0,1$  bis auf  $\Delta A^-/A_0 \approx 0,26$ , während  $\Delta T^-/T_0$  für den gleichen Feldstärkebereich mit  $\Delta T^-/T_0 \approx 0,05$  nahezu unverändert bleibt (Relaxationsspektren im Anhang 7.10.1).

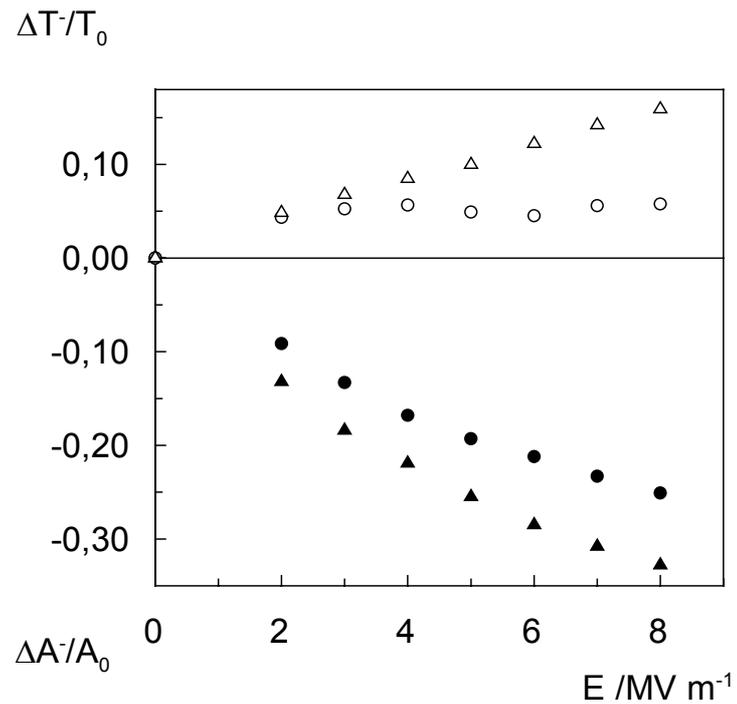


Abb. 6: Die Endwerte der Einfeld-Minusmoden der Absorption (gefüllte Symbole),  $\Delta A^-/A_0$ , und der Turbidität (ungefüllte Symbole),  $\Delta T^-/T_0$ , bei  $t_E = 9,86 \mu s$  als Funktion der externen Feldstärke  $E$  gemessen bei  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . Der Endwert von  $\Delta T^-/T_0$  für Vesikel mit dem Radius  $a = 25 \text{ nm}$  (○) ist offenbar unabhängig von  $E$ , während die Minusmode  $\Delta A^-/A_0$  (●) mit  $E$  deutlich zunimmt. Vesikel mit dem Radius  $a = 80 \text{ nm}$  zeigen die mit steigender Feldstärke  $E$  erwartete Zunahme in beiden Minusmoden (▲, △). Vesikelradien:  $a/\text{nm} = 25$  (○, ●),  $80$  (▲, △).  
Exp. Bed.:  $[Av20]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ ,  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5,0 \mu\text{M}$ .

### 3.2.2 Linearer Absorptionsdichroismus optischer Membransonden

Die individuelle Lokalisierung der Sonden kann Prozesse in unterschiedlichen Regionen der Membran anzeigen. Im Bereich der Vesikeldurchmesser  $\varnothing = 50, 100, 200$  und  $400$  nm wird die Änderung der Signale mit der Konzentration der Farbstoffe erfasst.

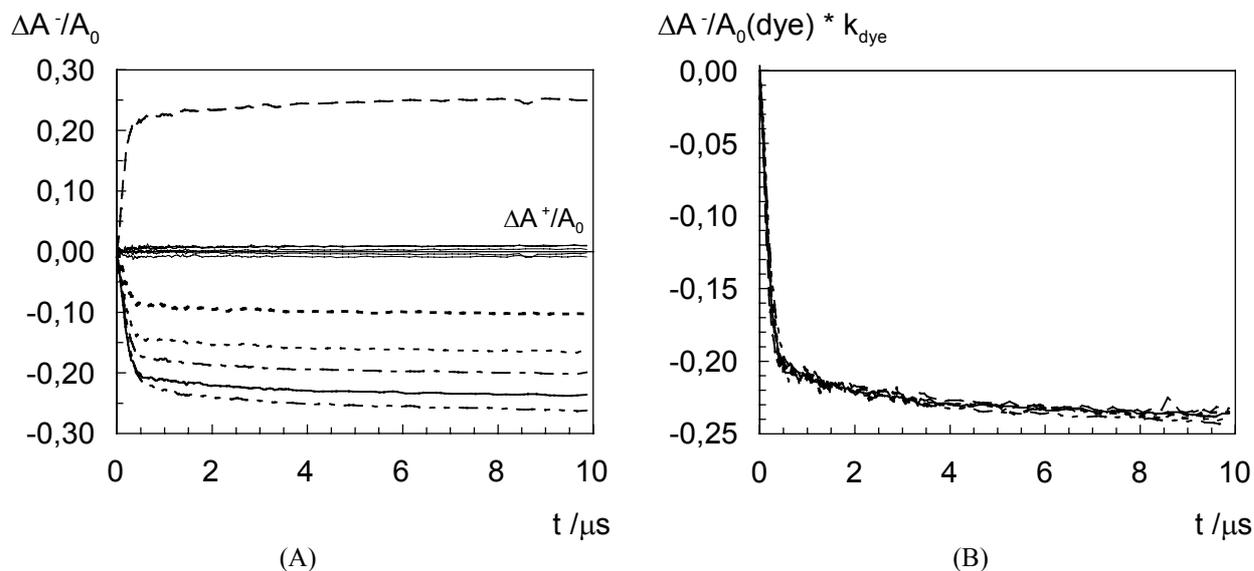


Abb. 7 (A) Die Einfeld-Relaxationen der Minus- und der Plusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$  und  $\Delta A^+/A_0$ , der membrangebundenen Farbstoffe DiIC<sub>16</sub>(3) (— —,  $\lambda = 545$  nm),  $\beta$ -DPH pPC (—,  $\lambda = 365$  nm), TMA-DPH (— —,  $\lambda = 365$  nm), PATMAN (- - -,  $\lambda = 365$  nm), Zeaxanthin (— - -,  $\lambda = 436$  nm) and DPH (- - -,  $\lambda = 365$  nm) in VET<sub>100</sub> als Funktion der Zeit bei der konstanten Feldstärke von  $E = 5$  /MV m<sup>-1</sup>. Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10$   $\mu\text{s}$  wird appliziert.

(B) Der Absorptionsdichroismus,  $\Delta A/A_0$ , der in (A) dargestellten Minusmoden der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$ , der Farbstoffe, skaliert mit dem Koeffizienten  $k_{\text{dye}}$  (relativ zur Minusmode  $\Delta A^-/A_0$  von  $\beta$ -DPH pPC) wobei  $k_{\text{DiIC}_{16}(3)} = -0,93$ ,  $k_{\text{TMA-DPH}} = 1,18$ ,  $k_{\text{PATMAN}} = 1,44$ ,  $k_{\text{ZEAX}} = 0,93$  und  $k_{\text{DPH}} = 2,33$ .

Vesikelradius:  $a/\text{nm} = 38$  nm,  $[\text{Av20}]_T = 1,0$  mM,  $[\text{NaCl}] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K (20°C),  $\text{pH} = 6,5$ ,  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5$   $\mu\text{M}$ ,  $[\text{DPH}] = 3,33$   $\mu\text{M}$ ,  $[\text{TMA-DPH}] = 5$   $\mu\text{M}$ ,  $[\text{PATMAN}] = 10$   $\mu\text{M}$ ,  $[\text{Zeaxanthin}] = 5$   $\mu\text{M}$ ,  $[\text{DiIC}_{16}(3)] = 2,5$   $\mu\text{M}$ .

Die Abb. 7A zeigt typische Einfeldrelaxationen von Minus- und Plusmoden der Absorption der Farbstoffe in VET<sub>100</sub> bei der Feldstärke  $E = 5$  MV m<sup>-1</sup>. Die Signale der unterscheiden sich sowohl in der Amplitude als auch im Vorzeichen. Die Relaxationsraten (siehe hierzu Abb. 7B) fallen im Rahmen der Messgenauigkeit bei der Feldstärke von  $E = 5$  MV m<sup>-1</sup> für alle Sonden in den Bereich zwischen  $2,8 < \tau^{-1}/\mu\text{s}^{-1} < 5$ . Bei Feldstärken von  $2 \leq E/\text{MV m}^{-1} \leq 5$  findet man in

VET<sub>100</sub> für die Plusmoden der Absorption aller Sonden  $|\Delta A^+/A_0| \leq 0.01$ , wobei sowohl positive als auch negative Moden-Vorzeichen auftreten. Bei kleinen Anteilen der Plusmode  $\Delta A^+/A_0$  gilt  $\Delta A^-/A_0 = \Delta A/A_0$  (Kakorin and Neumann, 1996). In Abb. 7A wird deutlich, dass  $\Delta A^+/A_0$  immer mindestens um den Faktor 10 kleiner ist als  $\Delta A^-/A_0$ . Damit ist es gerechtfertigt,  $\Delta A^-/A_0$  mit dem reduzierten Absorptionsdichroismus  $\Delta A/A_0$  gleichzusetzen ( $\Delta A^-/A_0 \approx \Delta A/A_0$ ) (s. a. Abschnitt 2.2.3).

Skaliert man die Absorptionsdichroismen aller Sonden mit dem sondenspezifischen Faktor  $k_{\text{dye}}$  (relativ zu  $\Delta A/A_0(\beta\text{-DPH pPC})$ ) wie in Abb. 7B gezeigt, so erkennt man einen interessanten Zusammenhang: Obwohl die einzelnen Sonden verschiedene molekulare Strukturen besitzen und in unterschiedlichen Membranregionen (s. Abb. 34 im Anhang 7.7.1) gebunden sind, scheinen sie übereinstimmend ein und denselben Prozess der Chromophor-Positionsänderungen anzuzeigen (homotope Kurven). Die Absorptionsdichroismen können konsistent mit der elektroporativen Deformation der Lipidvesikel gedeutet werden (Neumann et al., 1998). Der reduzierte Absorptionsdichroismus  $\Delta A/A_0$  enthält den Winkel, den das optische Übergangsmoment des Chromophors mit der Membrannormalen einschließt (Kinosita, Jr. et al., 1977).

### ***Einfluss des Sondentypus***

Die Daten in Abb. 7A lassen eine Klassifikation im Hinblick auf den Absolutbetrag  $|\Delta A^-/A_0|$  der Endwerte der Einfeld-Minusmoden bei  $t_E = 9,86 \mu\text{s}$  zu. Demnach gehören Zeaxanthin (---) und DiIC<sub>16</sub>(3) (—) in die Gruppe (I), sowie  $\beta\text{-DPH pPC}$  (—), TMA-DPH (—) und PATMAN (- -) in die Gruppe (II). DPH (- -) bildet für sich allein die dritte Gruppe (III). In Abb. 8 ist der Absolutbetrag  $|\Delta A/A_0|$  aller Sonden am Pulsende bei  $t_E = 9.86 \mu\text{s}$  für die Feldstärke  $E = 5 \text{ MV m}^{-1}$  in einem Säulendiagramm aufgetragen. Beim Übergang von der Farbstoff-Gruppe (I) zu (III) nimmt der Absolutbetrag  $|\Delta A/A_0|$  immer weiter ab.

Gruppe (I): Der Betrag der relativen Endwerte des Absorptionsdichroismus ist für Zeaxanthin und DiIC<sub>16</sub>(3),  $|\Delta A/A_0| = 0,26$  und  $0,25$ , nahezu gleich groß und im Gesamtvergleich größer als bei den Farbstoffen der Gruppe (II) & (III).  $\Delta A/A_0(\text{DiIC}_{16}(3))$  in Gruppe (I) besitzt, im Unterschied zu Zeaxanthin, ein positives Vorzeichen für  $\Delta A/A_0$ , während alle anderen Farbstoffe ein negativen Absorptionsdichroismus aufweisen.

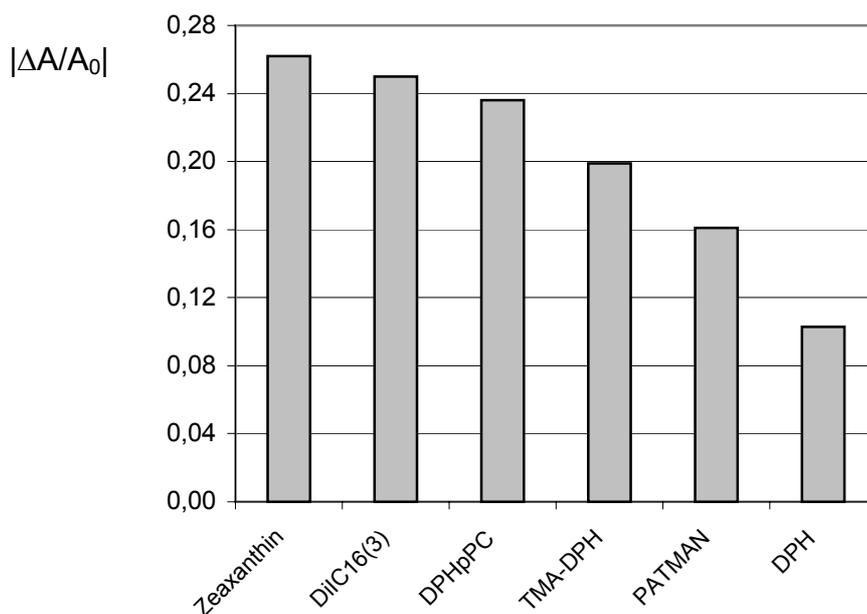


Abb. 8 Der Absolutbetrag des Endwertes des relativen Absorptionsdichroismus  $|\Delta A/A_0|$  der membrangebundenen Farbstoffe Zeaxanthin, DiIC<sub>16</sub>(3),  $\beta$ -DPH pPC, TMA-DPH, PATMAN und DPH am Ende des Feldpulses ( $t_E = 9.86 \mu s$ ) bei einer Feldstärke von  $E = 5 /MV m^{-1}$  in VET<sub>100</sub>. Exp. Bedingungen wie in Abb. 7.

Das optische Übergangsmoment von DiIC<sub>16</sub>(3) ist im Mittel senkrecht zur Membrannormalen ausgerichtet (Axelrod, 1979). Das Zeaxanthin wie auch das gut untersuchte  $\beta$ -DPH pPC (Tönsing, 1997), zeigt einen negativen Absorptionsdichroismus, weil das optische Übergangsmoment primär entlang der Membrannormalen ausgerichtet ist (Milon et al., 1986), (Lazrak et al., 1987).

Gruppe (II): Für  $\beta$ -DPH pPC, TMA-DPH und PATMAN findet man  $|\Delta A/A_0| = 0,24 / 0,2$  und  $0,16$ . Diese Chromophore sind im hydrophoben Bereich der Kohlenwasserstoffketten der Membran lokalisiert (Engel and Prendergast, 1981). Das  $\beta$ -DPH pPC ist strukturell ein Lipidmolekül, bis auf den durch den DPH-Chromophor ersetzten Fettsäurerest. Der DPH-Chromophor erfährt durch die Bindung an das Lipid im Vergleich zu freier Sonde eine Einschränkung in seiner Beweglichkeit (Kaiser and London, 1998). TMA-DPH ist im Gegensatz dazu durch seinen positiv geladenen Trimethylammoniumrest an der Membran-/Lösungsmittelgrenze fixiert, trotzdem bleibt der Chromophor in der Rotation in einem Winkel um seine Längsachse sehr beweglich (Engel and Prendergast, 1981). Die chromophore Gruppe von PATMAN ist im Bereich der Glycerolgruppen der Lipidmoleküle, also nahe der Grenzfläche Membran / Lösungsmittel lokalisiert (Lakowicz et al., 1983).

Gruppe (III): Mit  $|\Delta A/A_0| = 0,1$  liegt DPH um einen Faktor 2,4 niedriger, als  $\beta$ -DPH pPC, obwohl beide Moleküle den gleichen hydrophoben Chromophor besitzen. Allerdings erfährt die molekulare Rotation von DPH nur durch die strukturelle Anisotropie des hydrophoben Teils der Lipidmatrix eine geringfügige Ausrichtung, da es keinerlei funktionelle Gruppen besitzt, die eine Verankerung der Sonde an oder in der Nähe der Membran / Lösungsmittelgrenzfläche ermöglichen (Lopez Cascales et al., 1997), (Pebay-Peyroula et al., 1994). Ausserdem liegen Ergebnisse vor, die eine Verteilung des Übergangsdipolmoments für DPH nahelegen, die die senkrechte und parallele Ausrichtung zu ungefähr gleichen Teilen berücksichtigen (van der Heide et al., 1996).

### ***Feldstärkeabhängigkeit: Amplituden und Relaxationsraten***

Die Amplituden der Minusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$ , zeigen im Feldstärkebereich von  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 8$  für die nominalen Vesikelgrößen VET<sub>50</sub>, VET<sub>100</sub> und VET<sub>200</sub> (VET<sub>50</sub> und VET<sub>200</sub> im Anhang Ax) im Rahmen der Messgenauigkeit für alle Farbstoffe einen linearen Anstieg mit der Feldstärke (s. Abb. 9A+B, oben). Für VET<sub>400</sub> steigen die Amplituden im Bereich  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 6$  ebenfalls linear an, um dann aber für alle Farbstoffe, ausser DiIC<sub>16</sub>(3), im Feldstärkebereich  $7 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 8$  in eine Sättigung überzugehen. Im Fall der Sonde DPH beobachtet man bei  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$  sogar einen leichten „Rücklauf“ von  $\Delta A^-/A_0$  zu kleineren Amplituden.

Mit Ausnahme des Vorzeichens und dem Betrag der Endwerte der Minusmode der Absorption, stimmen die Relaxationsraten im Feldstärkebereich  $E \leq 6 \text{ MV m}^{-1}$  für alle Sonden und Vesikelgrößen praktisch überein ( $2 \leq \tau^{-1} / \mu\text{s}^{-1} \leq 6$ ). Der Rotation der Sonden liegt anscheinend ein gemeinsamer Prozess zugrunde. Einzig Zeaxanthin und DiIC<sub>16</sub>(3) stechen hervor: Das transmembrane Zeaxanthin weist in VET bei Feldstärken  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 8$  im Vergleich die kleinsten Relaxationsraten im Bereich  $2 \leq \tau^{-1} / \mu\text{s}^{-1} \leq 8$  der untersuchten Farbstoffe auf, während die schnellsten Prozesse des membranaufgelagerten DiIC<sub>16</sub>(3) im Bereich  $2 \leq \tau^{-1} / \mu\text{s}^{-1} \leq 11$  (s. Abb. 9A+B, Mitte).

Im Gegensatz zur linearen Abhängigkeit der schnellen, ersten Relaxationsrate  $\tau^{-1}(\text{I})$  von der Feldstärke für VET<sub>50</sub>, VET<sub>100</sub>, VET<sub>200</sub> im Bereich  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 8$  zeigt sich für VET<sub>400</sub> bei Feldstärken von  $E > 4 \text{ MV m}^{-1}$  eine Abweichung in  $\tau^{-1}(\text{I})$  vom linearen Verhalten. Für alle Farbstoffe, außer Zeaxanthin, findet man, dass  $\tau^{-1}(\text{I})$  im Bereich von  $E > 4 \text{ MV m}^{-1}$  gegen einen Sättigungswert läuft. Für Zeaxanthin tritt bei  $E > 7 \text{ MV m}^{-1}$  ein „Rücklauf“ der Rate von  $\tau^{-1}(\text{I}) \approx 7,0 \mu\text{s}^{-1}$  bei  $E = 7 \text{ MV m}^{-1}$  auf  $\tau^{-1}(\text{I}) \approx 6,0 \mu\text{s}^{-1}$  bei  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$  auf.

Bei kleinen Feldstärken,  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 3$ , haben alle Farbstoffe praktisch die gleichen Relaxationsraten  $2 \leq \tau^{-1} / \mu\text{s}^{-1} \leq 4$ .

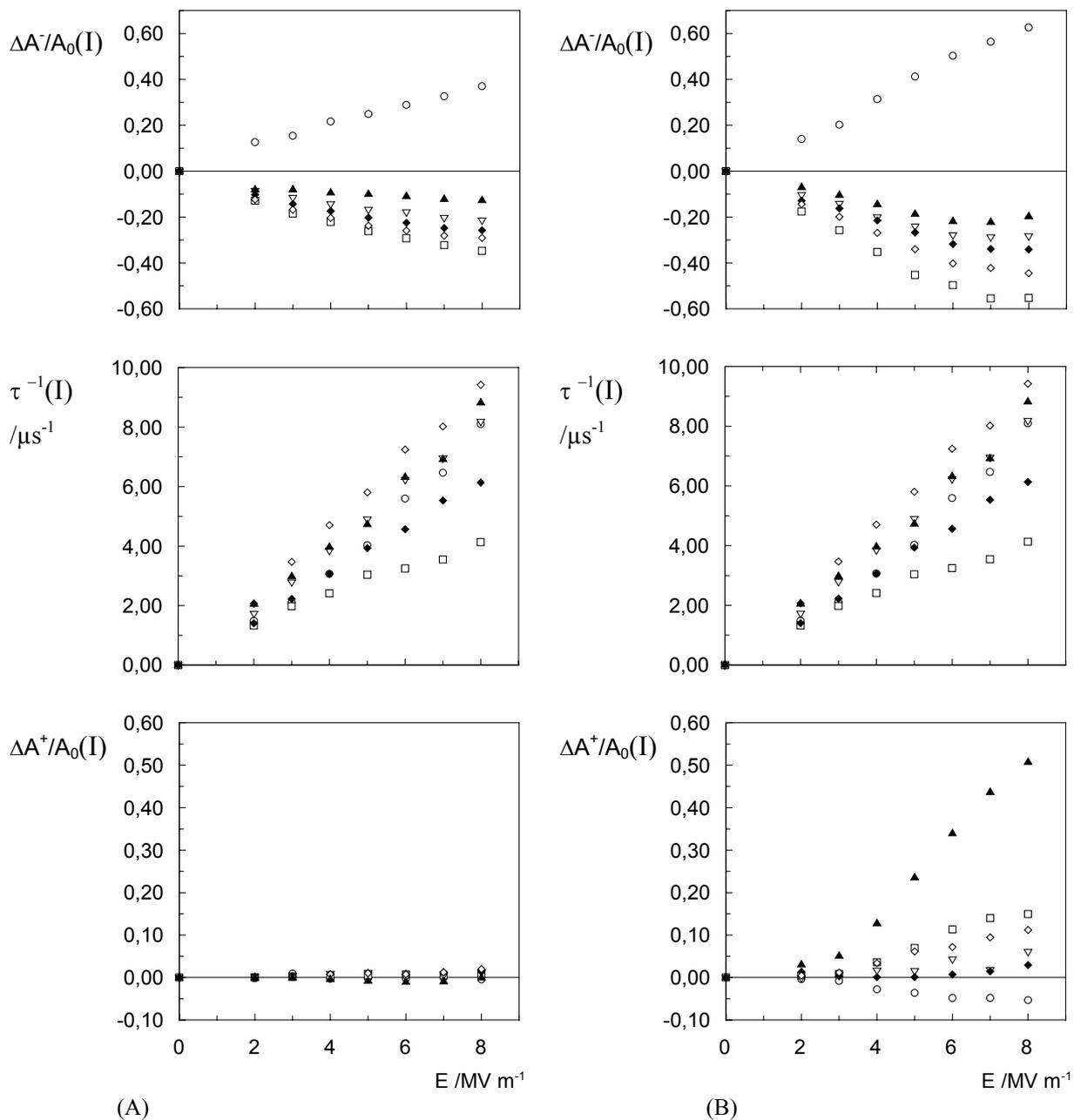


Abb. 9 Die Endwerte der Einfeld-Relaxationen der Minusmode,  $\Delta A^-/A_0$ , und die Amplitudenwerte der Plusmode,  $\Delta A^+/A_0$ , am Ende des Feldpulses bei  $t_E = 9.86 \mu\text{s}$ , sowie die Relaxationsraten,  $\tau^{-1}(I)$ , der schnellen Mode (I), der membrangebundenen Farbstoffe DiIC<sub>16</sub>(3) (○), Zeaxanthin (□),  $\beta$ -DPH pPC (◇), TMA-DPH (◆), PATMAN (▽) und DPH (▲) in VET<sub>100</sub> (A) und VET<sub>400</sub> (B) als Funktion der externen Feldstärke im Bereich  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$ . Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  wird appliziert.

Vesikelradien:  $a / \text{nm} = 38$  (A), 170 (B).  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  (20°C),  $\text{pH} = 6,5$ ,  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{DPH}] = 3.33 \mu\text{M}$ ,  $[\text{TMA-DPH}] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{PATMAN}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Zeaxanthin}] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{DiIC}_{16}(3)] = 2.5 \mu\text{M}$ . Die Relaxationsraten der Minusmode der Absorption wurden durch eine Biexponentialanpassung gemäß  $\Delta A^-/A_0 = \Delta A^-/A_0(I) \cdot (1 - \exp(-t/\tau(I))) + \Delta A^-/A_0(II) \cdot (1 - \exp(-t/\tau(II)))$  in einer Parametrisierung erhalten. (Relaxationsspektren siehe Anhang 7.10.2).

Die Absolutbeträge der Plusmode der Absorption liegen für alle Farbstoffe für VET<sub>50</sub> und VET<sub>100</sub> unterhalb von  $|\Delta A^+/A_0| \approx 0,03$ , wobei DiIC<sub>16</sub>(3) und DPH für VET<sub>100</sub> im Feldstärkebereich  $4 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 7$  ein negatives Vorzeichen aufweisen, während die anderen Farbstoffe positive Vorzeichen zeigen (Abb. 9A, unten). Bei VET<sub>200</sub> (nicht gezeigt) und VET<sub>400</sub> (Abb. 9B, unten) ist hingegen mit zunehmender Feldstärke ein deutlicher, nichtlinearer Anstieg von  $\Delta A^+/A_0$  für alle Farbstoffe mit Ausnahme von DiIC<sub>16</sub>(3) zu erkennen. Im Feldstärkebereich  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 8$  ändert sich die Plusmode im Fall des Farbstoffs DPH in VET<sub>400</sub> drastisch im Bereich von  $0,02 \leq |\Delta A^+/A_0| \leq 0,5$ , während sie beim Farbstoff TMA-DPH im gleichen Feldstärkebereich nur einer Änderung von  $0,005 \leq |\Delta A^+/A_0| \leq 0,025$  unterliegt. In der Reihenfolge Zeaxanthin,  $\beta$ -DPH pPC und PATMAN verringert sich die Änderung im Feldstärkebereich  $2 \leq E / \text{MVm}^{-1} \leq 8$ . Man findet  $\Delta A^+/A_0 \approx 0,15$ ,  $0,1$  und  $0,05$  als Maximalwert bei  $E = 8 \text{ MVm}^{-1}$ .

Auffällig ist, daß DiIC<sub>16</sub>(3) in VET<sub>400</sub> als einziger Farbstoff ein negatives Vorzeichen für  $\Delta A^+/A_0$  besitzt und als Maximalwert bei  $E = 8 \text{ MVm}^{-1}$  nur einen vergleichsweise kleinen Wert von  $\Delta A^+/A_0 = -0,05$  zeigt.

### ***Einfluss der Membrankrümmung***

Die zu den Farbstoffen DiIC<sub>16</sub>(3), Zeaxanthin, DPH und PATMAN erhaltenen Daten (s. Abb. 10) sind in guter Übereinstimmung mit der für  $\beta$ -DPH pPC gefundenen Abhängigkeit für  $\Delta A^+/A_0$  von der Vesikelmembrankrümmung (s. Abb. 5). Auffällig ist hier, dass der Farbstoff DPH im Vergleich offenbar keine so ausgeprägte Abhängigkeit für  $\Delta A^+/A_0$  von der Membrankrümmung  $H$  anzeigt, wie dies die anderen Sonden vermögen.  $\Delta A^+/A_0$  ändert sich für DPH im Bereich der Membrankrümmung  $0,0059 \leq H / \text{nm}^{-1} \leq 0,04$  nur geringfügig um einen Faktor 2 von  $\Delta A^+/A_0 = -0,05$  auf  $-0,1$ . Für DiIC<sub>16</sub>(3) und Zeaxanthin findet man größere Änderungen mit den Faktoren  $\approx 2,5 - 3$ .  $\Delta A^+/A_0$  geht bei Membrankrümmungen von  $H \geq 0,026 \text{ nm}^{-1}$  für alle Farbstoffe in eine Sättigung, während die Minusmode von Zeaxanthin in diesem Bereich auf  $\Delta A^+/A_0 = -0,21$  abnimmt. Die transmembrane Sonde Zeaxanthin zeigt demnach in der Minusmode der Absorption,  $\Delta A^+/A_0$ , im Vergleich mit den anderen untersuchten Sonden die größte Sensitivität für die Membrankrümmung.

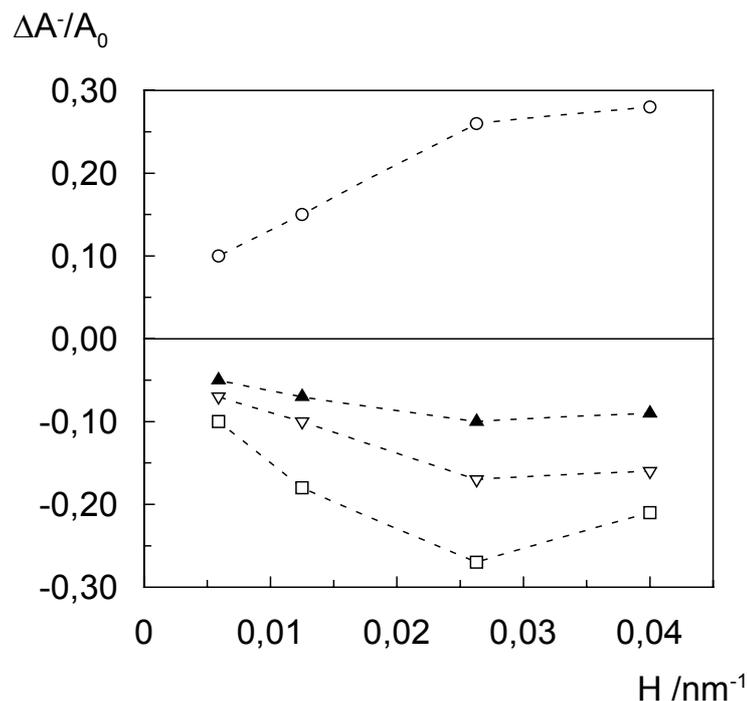


Abb. 10 Die Endwerte der Einfeld-Relaxationen der Minusmode der Absorption,  $\Delta A^- / A_0$ , bei  $t_E = 9.86 \mu\text{s}$  für die Farbstoffe DiIC<sub>16</sub>(3) (O), Zeaxanthin (□), DPH (▲) und PATMAN (▽) bei der konstanten Transmembranspannung von  $\Delta\varphi = -0,3 \text{ V}$  für Vesikel mit unterschiedlichen Radien als Funktion der Krümmung  $H$ . Vesikelradien und Krümmung:  $a / \text{nm}$  ( $H / \text{nm}^{-1}$ ) = 25 (0,04), 38 (0,026), 80 (0,0125), 170 (0,0059). Exp. Bed.:  $[Av20]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  wird appliziert.  $[\text{DiIC}_{16}(3)] = 2,5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Zeaxanthin}] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{DPH}] = 3,33 \mu\text{M}$ ,  $[\text{PATMAN}] = 10 \mu\text{M}$ .

Die Abhängigkeit der Plusmode der Absorption von der Vesikelmembrankrümmung zeigt für alle Farbstoffe bei  $t_E = 9.86 \mu\text{s}$  einen kleinen Endwert im Bereich von  $\Delta A^+ / A_0 \approx 0 - \pm 0,005$ . Die Relaxationssignale sind stark verrauscht und daher nur mit unzureichender Genauigkeit auszuwerten (Daten nicht dargestellt).

### ***Einfluss der membrangebundenen Sonden auf die Vesikelmembran***

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 dargestellt, sind keine Störungen der optischen Eigenschaften einer Lipidmembran bis zu einem molaren Sonden : Lipid-Verhältnis von 1 : 100 zu beobachten. Elektro-optische Messungen mit Vesikelsystemen unterschiedlicher Sondenkonzentrationen inner- und außerhalb der Farbstoffabsorptionsbanden zeigen aber, dass sich die Relaxionskinetik von farbstoffmarkierten Lipidvesikeln auch schon bei geringen Sondenkonzentrationen ändert.

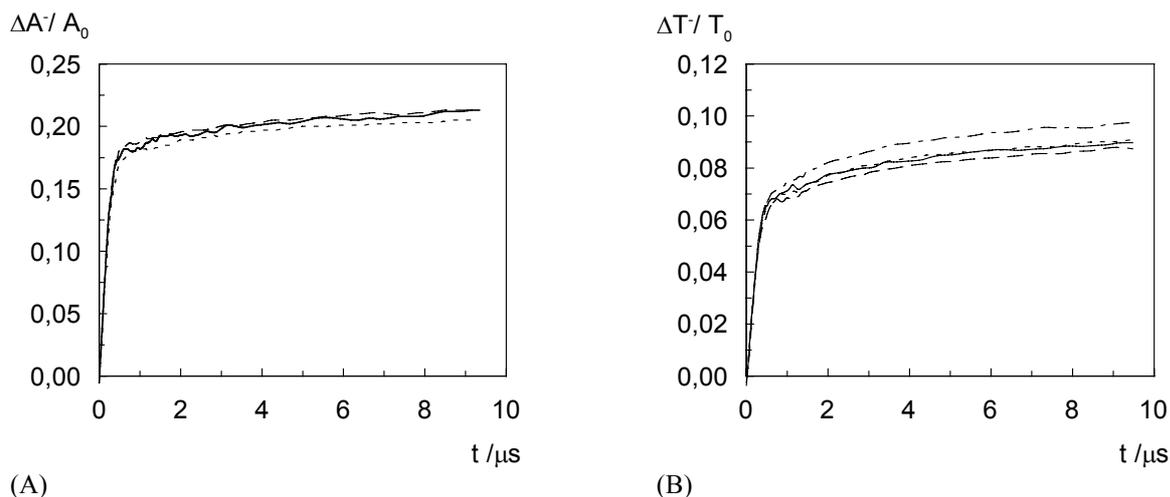


Abb. 11 Vergleich der Einfeld-Relaxationen der Minusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$ , (A) und der Turbidität,  $\Delta T^-/T_0$ , (B) für mit DiIC<sub>16</sub>(3) markierte und unmarkierte Vesikel bei verschiedenen membran- gebundenen Konzentrationen der Sonde.  $\Delta T^-/T_0$  (B) wird bei  $\lambda = 365$  nm *außerhalb* der Absorptionsbanden von DiIC<sub>16</sub>(3) und  $\Delta A^-/A_0$ , (A) *innerhalb* der Absorptionsbanden markierter Vesikel bei  $\lambda = 545$  nm gemessen. Ein Rechteckfeldpuls der Feldstärke  $E = 4$  MV m<sup>-1</sup> mit einer Dauer von  $t_E = 10$  μs wird appliziert. Vesikelradius:  $a = 38$  nm.;  $[Av20]_T = 1.0$  mM,  $[NaCl] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K (20 °C),  $pH = 6,5$ .  $[DiIC_{16}(3)]/\mu M = 0$  (—) 1.25 (— —) 5 (- - -) 20 (— · —).

In Abb. 11(A) ist die Minusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0$ , der an eine Vesikelmembran gebundenen Sonde DiIC<sub>16</sub>(3), bei Konzentrationen von  $0 \leq [DiIC_{16}(3)]/\mu M \leq 20$  für die Feldstärke  $E = 4$  MV m<sup>-1</sup> gezeigt. Bereits durch visuelle Prüfung der Einfeld-Relaxationen wird deutlich, dass auch hier die Sonde selbst bei der höchsten Farbstoffkonzentration von  $[DiIC_{16}(3)] = 20$  μM keinen Einfluss auf die Amplitude  $\Delta A^-/A_0$  und die Relaxationsrate(n) nimmt. Auch hier sind die relativen Signalverläufe nahezu deckungsgleich. Hingegen findet man für die *außerhalb* der Absorptionsbanden (vergl. Abb. 1B) von DiIC<sub>16</sub>(3) bei  $\lambda = 365$  nm gemessene Minusmode  $\Delta T^-/T_0$  (Abb. 11(B)), dass die Amplitude bei einer Konzentration von  $[DiIC_{16}(3)] \geq 10$  μM (s. auch Abb. 12A) geringfügig von  $\Delta T^-/T_0 = 0,09$  auf 0,1 ansteigt, während die Relaxationsrate hiervon unberührt ist.

Die Relaxationsraten  $\tau^{-1}(I)$  der Minusmoden sind im Bereich  $0 \leq [Sonde]/\mu M \leq 10$  nur schwach von der Sondenkonzentration abhängig. So ändert sich die schnelle Mode  $\tau^{-1}(I)/\mu s^{-1}$  in  $\Delta T^-/T_0$  für die Farbstoffsonde  $\beta$ -DPH pPC im genannten Konzentrationsbereich nur um ca. 2 %; für  $\Delta A^-/A_0$  beträgt die Änderung in  $\tau^{-1}(I)/\mu s^{-1} \approx 3$  %.

#### **Die Werte der Minusmode der Absorption und Turbidität am Ende des Feldpulses**

Die in Abb. 12(A-D) gezeigte Abhängigkeit der Minusmoden  $\Delta A^-/A_0$  und  $\Delta T^-/T_0$  von der Sondenkonzentration spiegelt den Einfluss der individuellen Eigenschaften der Sonden wider.

Der Farbstoff DiIC<sub>16</sub>(3) (Abb. 12A) zeigt im Vergleich zu Zeaxanthin (B),  $\beta$ -DPH pPC (C) und PATMAN (D) im Bereich von  $1,25 \leq [\text{DiIC}_{16}(3)] / \mu\text{M} \leq 10$  praktisch idealen Sondencharakter. Weder  $\Delta A^-/A_0$  noch  $\Delta T^-/T_0$  variieren mehr als  $\pm 2\%$  (relative Änderung) um ihren Basiswert bei  $[\text{DiIC}_{16}(3)] = 1,25$  bzw.  $0 \mu\text{M}$ . Die anderen Sonden offenbaren im Bereich von  $1,25 \leq [\text{Sonde}] / \mu\text{M} \leq 20$  einen deutlich ausgeprägten Einfluss auf beide Minusmoden. Für Zeaxanthin (Abb. 12B),  $\beta$ -DPH pPC (C) und PATMAN (D) erfolgt ein Rückgang von  $\Delta T^-/T_0$  um  $\approx 15 - 20\%$ . Für Zeaxanthin (12B) und PATMAN (D) findet man eine Zu-, für  $\beta$ -DPH pPC eine Abnahme des Absolutbetrags von  $\Delta A^-/A_0$ .

Eine zunehmende Konzentration an Zeaxanthin verringert den Betrag der Minusmode der Turbidität im Bereich von  $1,25 \leq [\text{Zeaxanthin}] / \mu\text{M} \leq 20$  von  $\Delta T^-/T_0 = 0,096$  auf  $0,072$  (25% rel. Änderung), während die Minusmode der Absorption im gleichen Konzentrationsbereich eine drastische Zunahme von  $\Delta A^-/A_0 = -0,09$  auf  $-0,23$  um 55% erfährt. Diese extreme Variation in  $\Delta A^-/A_0$  beim Übergang von  $[\text{Zeaxanthin}] = 1,25$  auf  $2,5 \mu\text{M}$  läuft parallel zur Änderung von  $\Delta A^-/A_0$  von  $-0,09$  auf  $-0,2$ . Im Bereich von  $2,5 \leq [\text{Zeaxanthin}] / \mu\text{M} \leq 20$  ist nur noch ein geringer Anstieg im Betrag der Amplitude von  $\Delta A^-/A_0 = -0,2$  auf  $-0,23$  zu verzeichnen. Im Konzentrationsbereich  $[\text{Zeaxanthin}] \geq 2,5 \mu\text{M}$  existiert also nur eine schwach ausgeprägte Abhängigkeit der Absorptions-Minusmode von der Sondenkonzentration.

Die Turbiditäts-Minusmode zeigt im Bereich von  $1,25 \leq [\text{Zeax}] / \mu\text{M} \leq 20$  eine gleichmäßige Abnahme, ohne einen Sprung wie bei der Absorptions-Minusmode. Das Vorzeichen der durch die Sondenkonzentration induzierten Änderung ist in beiden Moden unterschiedlich:  $\Delta T^-/T_0$  wird kleiner,  $\Delta A^-/A_0$  nimmt im Absolutbetrag zu.

Bei  $\beta$ -DPH pPC geht  $\Delta T^-/T_0$  im Bereich  $1,25 \leq [\beta\text{-DPH pPC}] / \mu\text{M} \leq 20$  von  $\Delta T^-/T_0 = 0,09$  auf  $0,075$  zurück. Die Minusmode der Absorption verringert sich im gleichen Konzentrationsintervall im Absolutwert von  $\Delta A^-/A_0 = -0,28$  auf  $-0,22$ , also ca. 21 %. Diese konvergente Korrelation der beiden Minusmoden findet sich nur bei der Sonde  $\beta$ -DPH pPC.

Für PATMAN findet man für die Änderung der Minusmode der Turbidität eine ähnlichen Verlauf wie bei den Farbstoffen Zeaxanthin und  $\beta$ -DPH pPC. Der Endwert bei  $t_E = 9,86 \mu\text{s}$  verringert sich um  $\approx 15\%$  von  $\Delta T^-/T_0 = 0,1$  auf  $0,085$ , während sich  $\Delta A^-/A_0$  um  $\approx 46\%$  von  $-0,08$  auf  $-0,15$  im Konzentrationsbereich  $1,25 \leq [\text{PATMAN}] / \mu\text{M} \leq 20$  vergrößert.

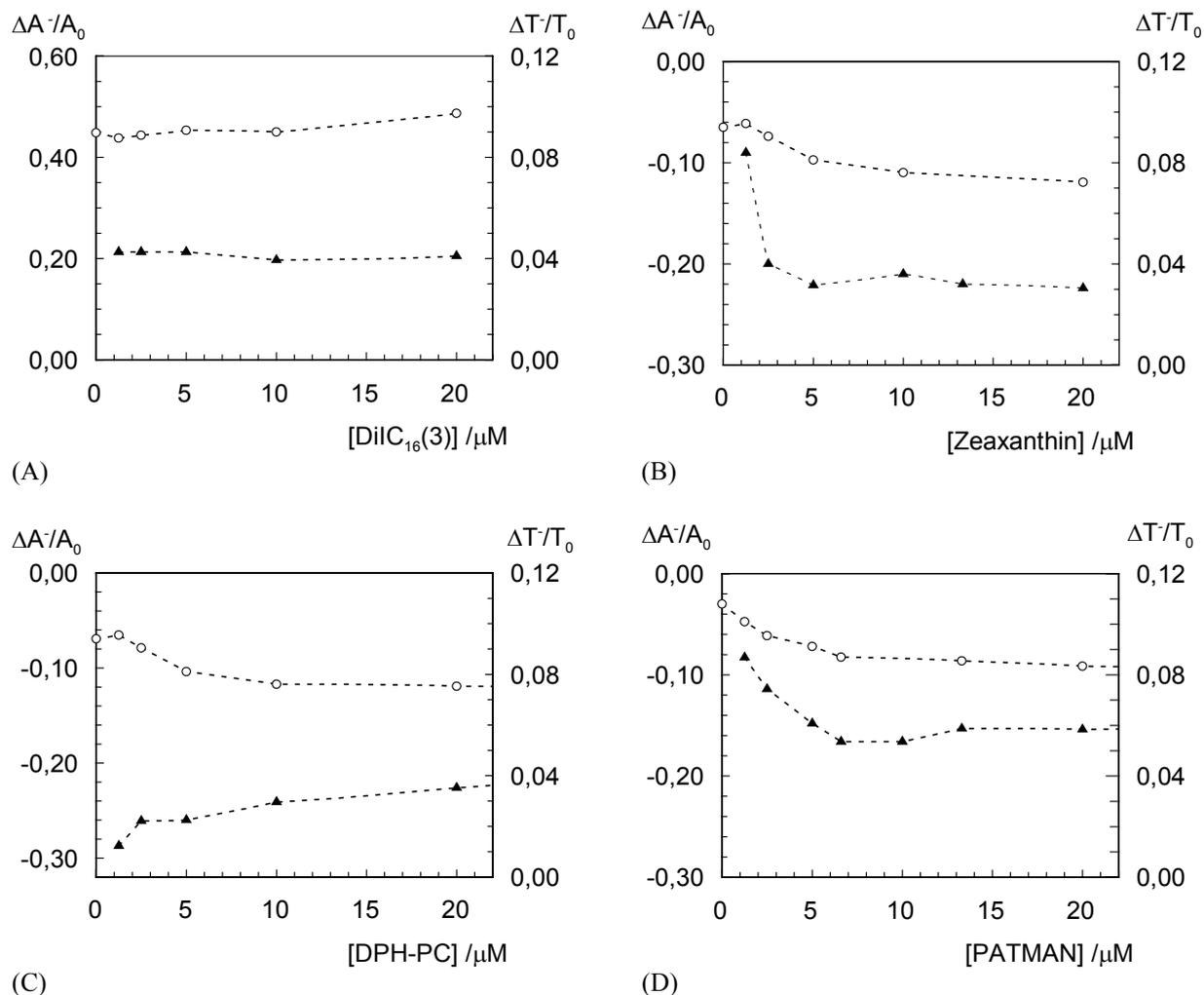


Abb. 12 Die Einfeld-Endwerte der Minusmode der Absorption ( $\blacktriangle$ ),  $\Delta A/A_0$ , und der Turbidität ( $\circ$ ),  $\Delta T/T_0$ , markierter und unmarkierter Vesikel (Referenz) bei  $t_E = 9.86 \mu\text{s}$  für die Farbstoffe DiIC<sub>16</sub>(3) (A), Zeaxanthin (B),  $\beta$ -DPH pPC (C) und PATMAN (D) bei verschiedenen membrangebundenen Konzentrationen der Sonden ( $1,25 \leq [\text{Sonde}] / \mu\text{M} \leq 20$ ).  $\Delta T/T_0$  wird *außerhalb* der Absorptionsbanden der Farbstoffe und  $\Delta A/A_0$  *innerhalb* der Absorptionsbanden markierter Vesikel gemessen. Ein Rechteckfeldpuls der Feldstärke  $E = 5 \text{ MV m}^{-1}$  (DiIC<sub>16</sub>(3):  $E = 4 \text{ MV m}^{-1}$ ) mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  wird appliziert. Vesikelradius:  $a = 38 \text{ nm}$ .  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Messwellenlängen: (A)  $\Delta A/A_0$  bei  $\lambda_{\text{in}} = 545 \text{ nm}$ ;  $\Delta T/T_0$  bei  $\lambda_{\text{out}} = 365 \text{ nm}$ , (B)  $\lambda_{\text{in}} = 436 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{out}} = 578 \text{ nm}$ , (C)  $\lambda_{\text{in}} = 365 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{out}} = 436 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{in}} = 365 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{out}} = 436 \text{ nm}$ .

## 4 Die Verstärkung der Membranelektroporation durch große Membrankrümmungen

### 4.1 Quantifizierung der Vesikeldeformation

Die Ergebnisse zum konservative Turbiditätsdichroismus  $\Delta T/T_0$  (s. Abschnitt 7.9 ff) zeigen, dass die Näherung  $\Delta T/T_0 = \Delta T^-/T_0$  nur in wenigen Fällen benutzt werden kann, da die Plusmode im Vergleich zur Minusmode groß ist ( $|\Delta T^+/T_0| \geq 1/4 |\Delta T^-/T_0|$ ). Zur Bestimmung der Vesikeldeformation werden daher beide Turbiditätsmoden,  $\Delta T^-/T_0$  und  $\Delta T^+/T_0$ , als Eingabedaten mit einem von Farafonov (Farafonov et al., 1996) entwickelten Fortran-Programm (COA98) verarbeitet, das die Lichtstreuung von konfokal ummantelten Spheroiden berechnet (s. Anhang 7.3).

Ein in Richtung des elektrischen Feldvektors  $\vec{E}$  elongiertes Vesikel, läßt sich als Ellipsoid (Prolat) mit den zwei Halbachsen,  $c$  und  $b$  ( $c > b$ ), auffassen (s. Abb. 13). Während der Dauer des Feldpulses ist die lange Halbachse,  $c$ , kollinear zum Feldvektor  $\vec{E}$  orientiert (Neumann et al., 1998). Das Ergebnis eines COA98-Programmlaufs ist das zu den Werten von  $\Delta T^-/T_0$  und  $\Delta T^+/T_0$  gehörige Achsenverhältnis  $p = c / b$ , das die elektromechanische Elongation eines kugelförmigen Vesikels zu einem prolaten Ellipsoiden als Funktion der Zeit liefert (s. Abb. 15b).

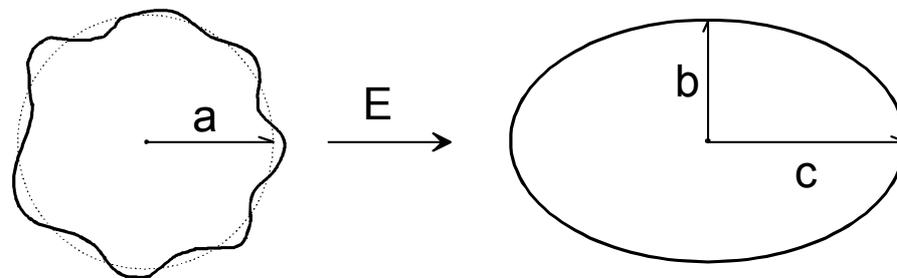


Abb. 13 Elektroelongierung einer ondulierenden Vesikelemembran unter dem Einfluss des elektrischen Maxwell Stress. Die Oberflächenzunahme  $\Delta S = S - S_0 = \Delta S_{ss} + \Delta S_p$  resultiert aus der Membrandehnung und der Glättung der thermischen Ondulationen,  $\Delta S_{ss}$ , sowie der Oberflächenzunahme,  $\Delta S_p$ , durch die Bildung von Elektroporen.  $S_0 = 4 \cdot \pi \cdot a^2$  ist die projizierte Oberfläche der gesamten ondulierenden Fläche  $S = S_0 + \Delta S_{ss} + \Delta S_p$  bei  $E = 0$ .

Die Deformation eines kugelförmigen zu einem ellipsoiden Vesikel kann nur dann stattfinden, wenn entweder a) eine feldinduzierte Zunahme der Membranoberfläche  $\Delta S$  durch die Glättung der Ondulationen, der Membrandehnung oder durch die Elektroporation der Membran auftritt, oder b), eine Abnahme des Vesikelvolumens,  $\Delta V$ , durch den Austritt von

intravesikulärem Medium durch die Elektroporen erfolgt. Allerdings kann die Volumenänderung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen bei intern und extern gleicher Elektrolytkonzentrationen bei einer Pulsdauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  vernachlässigt werden ( $\Delta V \approx 0$ ) (Neumann et al., 1998). Daher muß das Ausmaß der Vesikelelongation an die Zunahme der Fläche  $\Delta S = S - S_0$  gekoppelt sein, wobei  $S_0 = 4 \cdot \pi \cdot a^2$  die projizierte Membranoberfläche und  $S$  die Vesikeloberfläche während des Feldpulses ist (s. Abb. 13). Die Beziehung zwischen der relativen Zunahme der Oberfläche  $\Delta S/S_0$  und dem Achsenverhältnis  $p$  ist bei konstantem Vesikelvolumen  $V$  durch die Gl. (A.5) gegeben.

#### 4.1.1 Thermische Ondulationen und Dehnung der Lipidmembran

Lipidmembranen unilamellarer Vesikel zeigen in wässriger Umgebung im flüssig-kristallinen Zustand thermisch induzierte, langwellige Schwingungsmoden (Ondulationen). Bei Riesenvesikeln ( $\varnothing \approx 10 \mu\text{m}$ ) mit kleinen lateralen Membranspannungen,  $\sigma \approx 0$ , kann man diese Oszillation der Oberfläche mit einem Lichtmikroskop beobachten (Helfrich and Servuss, 1984). Die thermischen Ondulationen reduzieren die Membranbasisfläche  $S$ , d.h. die auf eine Fläche projizierte Vesikelform (s. Abb. 13). Die aus Membrandehnung und Ausgleich der thermischen Ondulationen resultierende Zunahme des Bruchteils  $\Delta S_{ss}/S_0$  der Vesikeloberfläche ist unter Voraussetzung einer endlichen, lateralen Membranspannung  $\sigma$  gegeben durch (Klößen and Helfrich, 1993):

$$\frac{\Delta S_{ss}}{S_0} = \frac{\sigma}{K} + \frac{k_B \cdot T}{8 \cdot \pi \cdot \kappa} \cdot \left[ \ln\left(\frac{S_0}{s}\right) - \ln\left(\frac{\pi^2/s + \sigma/\kappa}{\pi^2/S_0 + \sigma/\kappa}\right) \right], \quad (1.13)$$

wobei  $K$  ( $\text{N m}^{-1}$ ) der Dehnungsmodul,  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $\kappa$  (J) die Biegesteifigkeit,  $T$  (K) die absolute Temperatur und  $s$  die Fläche des Querschnitts eines Lipidmoleküls in der Membran ist. Der erste Term auf der rechten Seite der Gleichung (1.13) berücksichtigt den Beitrag der Membrandehnung unter dem Einfluss der lateralen Spannung  $\sigma$ . Im zweiten Term wird der Oberflächenzunahme  $S$  durch den Ausgleich der thermischen Ondulationen Rechnung getragen. Unter der Bedingung eines konstanten Innenvolumens  $V$  führt die Vesikeldeformation zu einer Zunahme der lateralen Spannung  $\sigma$ , gemäß  $\Delta\sigma = \sigma - \sigma_0$ . Diese verkleinert die thermischen Ondulationen und vergrößert somit die projizierte Vesikeloberfläche um den Betrag  $\Delta S$ . Eine verallgemeinerte Form der Gleichung (1.13) für den Grenzfall einer anfänglich vorhandenen, endlich großen, lateralen Spannung  $\sigma$  (bei  $E = 0$ ) lautet:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{\Delta\sigma}{K} + \frac{1}{L} \cdot \ln \left[ \frac{\pi^2/s + \sigma_0/\kappa}{\pi^2/s + (\sigma_0 + \Delta\sigma)/\kappa} \cdot \frac{\pi^2/S + (\sigma_0 + \Delta\sigma)/\kappa}{\pi^2/S + \sigma_0/\kappa} \right], \quad (1.14)$$

wobei  $L = 8 \cdot \pi \cdot \kappa / (k_B \cdot T)$  ein dimensionsloser Parameter ist.

Für die meisten Fälle von praktischem Interesse gelten folgende Ungleichheiten:

$$\frac{\pi^2}{s} \gg \frac{\sigma_0 + \Delta\sigma}{\kappa} \gg \frac{\pi^2}{S_0}, \quad (1.15)$$

womit sich Gl. (1.14) zu

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{\Delta\sigma}{K} + \frac{1}{L} \cdot \ln\left[1 + \frac{\Delta\sigma}{\sigma_0}\right] \quad (1.16)$$

vereinfacht.

Im allgemeinen Fall liefert Gl. (1.16) unter Berücksichtigung von  $\Delta\sigma$  die Lösung:

$$\Delta\sigma = \frac{K}{L} \cdot \text{LambertW} \left[ \frac{L}{K} \cdot \sigma_0 \cdot e^{\frac{L}{K} \left( \frac{\sigma_0 + \Delta S}{S_0} \right)} \right] - \sigma_0, \quad (1.17)$$

wobei LambertW eine spezielle Funktion ist, die allgemein die Rückkopplung eines evolvierenden Systems auf sich selbst berücksichtigt (Kakorin and Neumann, 1998).

Im allgemeinen Fall, wenn die Bedingung  $\Delta\sigma / \sigma_0 \ll 1$  nicht erfüllt ist, hat lediglich die erste Potenz in  $\Delta\sigma / \sigma_0$  Relevanz und die Entwicklung des Logarithmus in Gl. (1.16) reduziert sich zu:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \Delta\sigma \cdot \left[ \frac{1}{K} + \frac{1}{L \cdot \sigma_0} \right] \quad (1.18)$$

Umstellen von Gl. (1.18) nach  $\Delta\sigma$  ergibt:

$$\Delta\sigma = \frac{\Delta S}{S_0} \cdot \frac{K}{1 + \frac{K}{L \cdot \sigma_0}} \quad (1.19)$$

Das Ausmaß der Gleichgewichtsdeformation  $p_0$  eines Vesikels kann durch die Minimierung der freien Energiedichtedifferenz  $\Delta g = g(E) - g(0)$ , bezogen auf die Membraneinheitsfläche, erhalten werden. Hierbei stehen die Vesikelzustände "0" für  $E = 0$  und "E" für  $E > 0$ . Explizit:

$$\Delta g = \Delta g_{\text{field}} + \Delta g_{\text{bend}} + \Delta g_{\text{ss}} \quad (1.20)$$

Wenn Gl. (1.17) gilt, dann kann der Gleichgewichtswert  $p_0$  durch Bestimmung des Minimums numerisch berechnet werden, z. B. durch Minimierung von Gl. (1.20) gemäß  $(d(\Delta g)/dp)|_{p=p_0} = 0$  bei  $p = p_0$ :

Für den Fall, dass die Näherung aus Gl. (1.19) anwendbar ist, kann  $p_0$  in geschlossener analytischer Form angenähert werden:

$$p_0 \approx \frac{3 \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_w \cdot E^2 \cdot a^3}{62 \cdot \kappa + 10 \cdot \sigma_0 \cdot a^2 \cdot \left(1 + \frac{K}{\sigma_0 + K/L}\right)} + 1 \quad (1.21)$$

Für Vesikelradien im Bereich  $25 \leq a / \text{nm} \leq 170$ , den Feldstärkenbereich  $1,2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8,0$ ,  $\kappa = 2,3 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ,  $K = 0,41 \text{ Nm}^{-1}$  und  $\sigma_0 = 5 \mu\text{N m}^{-1}$  (Kummrow und Helfrich, 1991) kann Gl. (1.21) als gute Näherung zur exakten Berechnung von  $p_0$  verwendet werden (numerische Optimierung); s. Abb. 14.

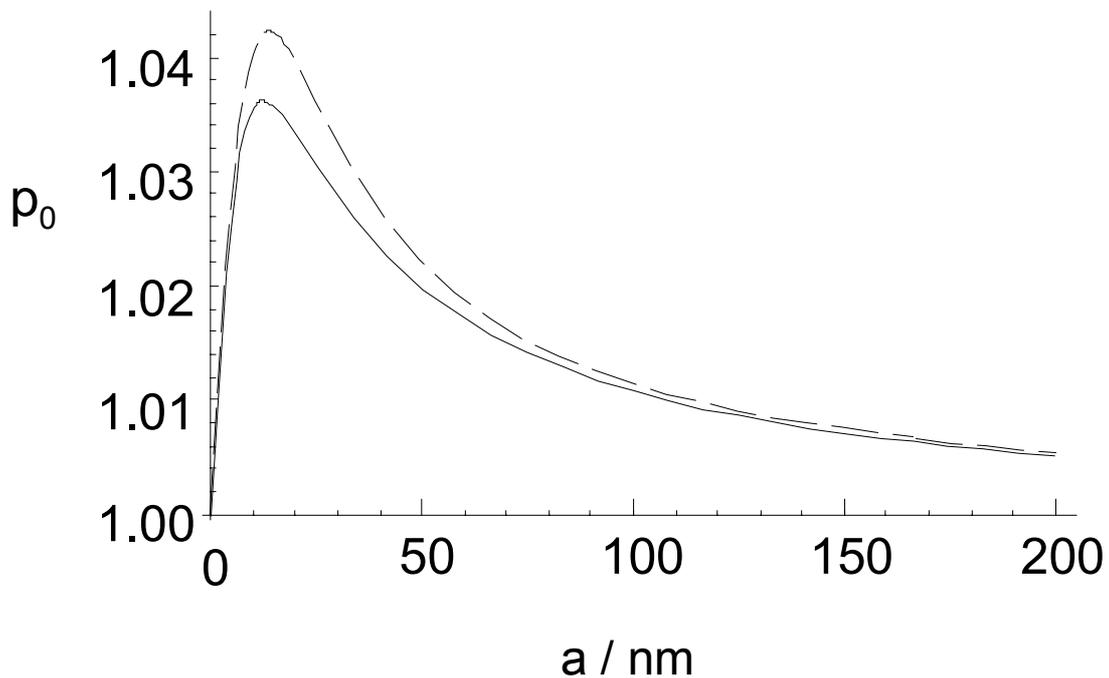


Abb. 14 Das mit Gl. (1.17) berechnete (durchgezogene Linie), exakte und das mit der analytischen Gleichung (1.21) (gestrichelte Linie) berechnete Gleichgewichtsachsenverhältnis  $p_0$ , als Funktion des Vesikelradius bei der konstanten Transmembranpotentialdifferenz  $\Delta\varphi_{\text{konst}} = -1,5 \cdot a \cdot E = -0,3 \text{ V}$  (in den Polkappen bei  $f_\lambda = 1$ ),  $\kappa = 2,3 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ,  $K = 0,41 \text{ Nm}^{-1}$  und  $\sigma_0 = 5 \mu\text{N m}^{-1}$ .

Für  $\sigma_0 > 0$  und  $E \cdot a = \text{konst.}$  geht  $p_0$  als Funktion des Vesikelradius durch ein Maximum. Unter der Bedingung  $E \cdot a = \text{konst.}$  nimmt die elektrische Polarisationsenergie eines Vesikels linear mit dem Radius  $a$  zu. Bei kleinen Vesikelradien  $a \ll a_{\text{crit}}$  ist der kritische Radius gegeben durch :

$$a_{\text{crit}} = \sqrt{\frac{6.2 \cdot \kappa}{\sigma_0 \cdot \left(1 + \frac{K}{\sigma_0 + K/L}\right)}} \quad (1.22)$$

Der Term für die Biegeenergie  $W_b = 62 \cdot \kappa$  in Gl. (1.21) dominiert über den Energieterm  $W_{ss} = 10 \cdot \sigma_0 \cdot a^2 \cdot (1 + K/(\sigma_0 + K/L))$ , der für den Ausgleich der thermischen Ondulationen und der Dehnung der Membran steht; daher folgt  $p_0 \propto a$ . Für  $a \gg a_{crit}$  gilt  $W_{ss} \gg W_b$ , und somit folgt hier  $p_0 \propto a^{-1}$ . Bei zunehmendem Radius  $a$  führt das zur Umkehr der Funktion und damit zu einer Abnahme von  $p_0$ .

#### 4.1.2 Charakteristische Zeit der Vesikel-Elongation

Die charakteristische Zeit  $\tau$  der Vesikeldeformation wird mittels eines Stokes-Formalismus abgeschätzt. Wenn die Näherung in Gl. (1.19) gilt, liefert die Integration der Stokes-Gl. (A.14) eine Näherung für die charakteristische Zeit  $\tau$  der Vesikeldeformation:

$$\tau \approx \frac{3\eta \cdot a^3}{\frac{48 \cdot \kappa}{5} + \frac{3}{2} \sigma_0 \cdot a^2 \cdot \left(1 + \frac{K}{\sigma_0 + K/L}\right)} \quad (1.23)$$

Gl. (1.23) ist im Einklang mit dem Ausdruck für die charakteristische Relaxationszeit der von Komura (1996) berechneten Schwingungsmoden  $n=m=2$  sphärischer Vesikel im flüssigkristallinen Phasenzustand. Im Grenzfall von  $\sigma_0 = 0$ , nähert sich das Ergebnis von Gl. (1.23) sehr gut an die obere Grenze der Formrelaxationszeit  $\tau = 0,38 \cdot \eta \cdot a^3 / \kappa$  für eine deformierte Sphäre an (Klösgen and Helfrich, 1993). Ein interessanter Aspekt der Gl. (1.23) ist, dass die charakteristische Zeit  $\tau$  unabhängig vom externen Feld  $E$  ist. Für den Fall, dass Gl. (1.17) gilt, sollte die Gl. (A.14) aus dem Anhang benutzt werden.

## 4.2 Datenanalyse und Diskussion

### 4.2.1 Datenbasis

Wie bereits erwähnt, liegen die Amplitudenwerte der Minusmode der Turbidität  $\Delta T^-$  bei  $t_E = 10 \mu\text{s}$  auch für unterschiedliche Vesikelradien im Bereich von  $25 \leq a/\text{nm} \leq 170$  und Feldstärken von  $8 \geq E/\text{MVm}^{-1} \geq 1,2$  dicht beieinander (s. Abb. 15a).

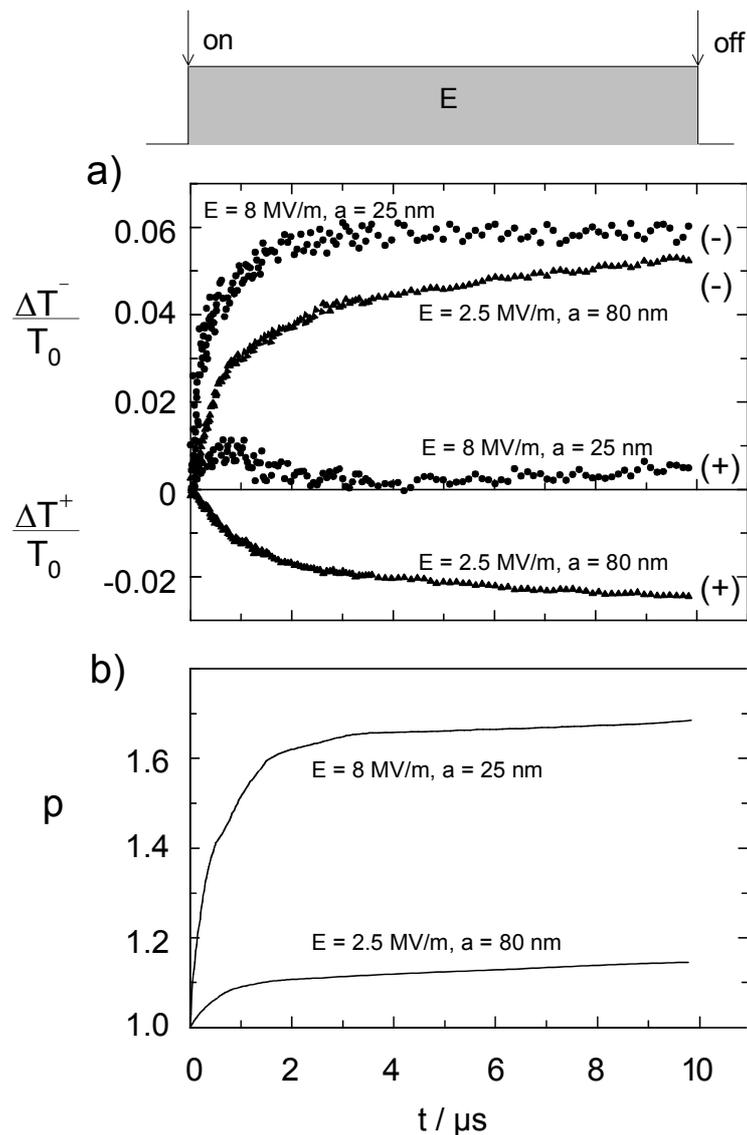


Abb. 15 (a) Die Minus-,  $\Delta T^-/T_0$ , und die Plusmode  $\Delta T^+/T_0$  der Turbiditätsänderungen bei  $\lambda = 365 \text{ nm}$  relativ zur Turbidität  $T_0$ : ( $\blacktriangle$ ) bei den Feldstärken  $E = 2 \text{ MV m}^{-1}$  und dem Vesikelradius  $a = 80 \text{ nm}$ , sowie ( $\bullet$ ) bei  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$  und  $a = 25 \text{ nm}$ . (b) Das für die elongierten Vesikel aus  $\Delta T^-/T_0$  und  $\Delta T^+/T_0$  mit einem Fortran-Programm von Farafonov et al. (1996) berechnete Achsenverhältnis  $p = c / b$ , als Funktion der Pulsdauer  $t$ . Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  wird appliziert. Exp. Bed.:  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), Transmembranspannung:  $\Delta\phi_{\text{konst}} = -0,3 \text{ V}$ .

Der Unterschied im Brechungsindex der Membran von sehr kleinen und großen Vesikel, hier  $n = 1,400$  bei  $a = 25$  nm und  $n = 1,481$  für  $a = 80$  nm, führt zu einem merklichen Unterschied in den numerisch berechneten Achsenverhältnissen  $p$  (s. Abb. 15b). Diese Besonderheit läßt sich auf die unterschiedliche relativen Lipidpackungsdichte in kleinen und großen Vesikeln zurückführen. Offenbar wird der Wassergehalt der Membran durch die Packungsdichte beeinflusst.

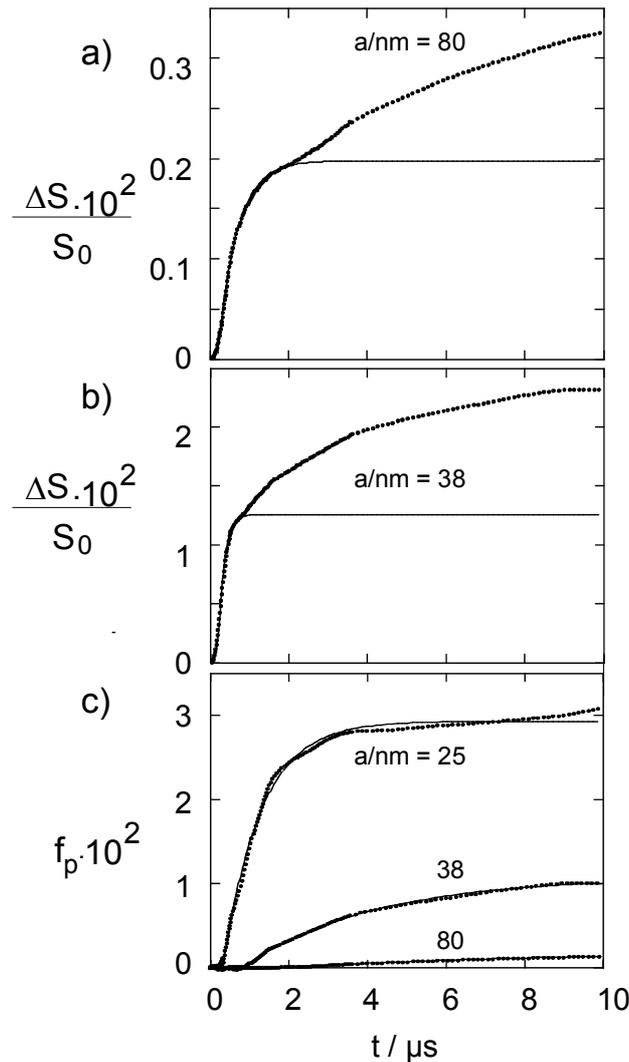


Abb. 16 (a) Die relative Gesamtflächenzunahme  $\Delta S/S_0$  der Vesikel als Funktion der Zeit  $t$  bei einem Vesikelradius  $a = 38$  nm und einer Feldstärke  $E = 2,5$   $\text{MV m}^{-1}$ ; (b)  $\Delta S/S_0$  bei  $a = 80$  nm und  $E = 5,3$   $\text{MV m}^{-1}$ . Die durchgezogenen Linien in (a) und (b) sind theoretische Simulationen der relativen Zunahme der Vesikeloberfläche  $\Delta S_{ss}/S_0$ , die aus der Membrandehnung und der Glättung der Ondulationen stammt. (c) Die relative Zunahme  $f_p = \Delta S_p/S_0 = (\Delta S - \Delta S_{ss})/S_0$  der Vesikeloberfläche, hervorgerufen durch die Bildung von Membranelektroporen, als Funktion der Zeit  $t$ , bei verschiedenen Vesikelradien und Feldstärken:  $a / (\text{nm}) / E / (\text{MV m}^{-1}) = 25 / 8; 38 / 5,3; 80 / 2,5$  bei der konstanten Transmembranpotentialdifferenz  $\Delta\varphi^N = -1,5 \cdot E \cdot a = -0,3$  V.

Im elektrischen Feld besteht die relative Zunahme der Membranoberfläche  $\Delta S/S_0$  (Gl. (A.5)) aus zwei Phasen: einer schnellen, mit einer charakteristischen Zeitkonstante von  $\tau < 1 \mu\text{s}$  und einer langsamen Phase mit  $\tau \gg 1 \mu\text{s}$  (Abb. 16a,b).

Da die charakteristischen Zeitkonstanten der elektrischen Polarisierung, der Membrandehnung und des Ausgleichs thermischer Ondulationen im allgemeinen sehr klein sind ( $\tau < 1 \mu\text{s}$ ) (Kakorin and Neumann, 1998), muß die Zunahme von  $\Delta S/S_0$  bei Zeiten über  $1 \mu\text{s}$  dem Prozess der Membranelektroporation zugeschrieben werden. Die visuelle Inspektion der Daten (Abb. 16a,b) zeigt, dass die langsame Phase, relativ zur schnellen, offenbar verzögert verläuft. Diese Verzögerung ermöglicht die Bestimmung der Amplitude  $\Delta S_{ss}/S_0 = \Delta S(p_0)/S_0$  der schnellen Phase, die der Membrandehnung und Glättung der Ondulationen zugeordnet wird. Um den Effekt der Membrankrümmung auf die Membranelektroporation von dem des Transmembranfeldes zu separieren, wurde die nominale Transmembranpotentialdifferenz  $\Delta\varphi^N = -1,5 \cdot E \cdot a = -0,3 \text{ V}$  (bezogen auf die Polkappen der Vesikel, bei verschwindender Leitfähigkeit der Membran (Tönsing et al., 1997)) für alle Vesikelradien  $a$  gleich gesetzt. Praktisch bedeutet dies für die Analyse, dass die Feldstärken  $E$  und die Vesikelradien  $a$  so gewählt werden, dass sie folgender Bedingung genügen:  $E \cdot a = 0,2 \text{ V}$ . Man findet, dass die Amplitude und Rate der Relaxation von  $f_p$  bei konstantem  $\Delta\varphi^N = -0,3 \text{ V}$  rasch mit zunehmendem Vesikelradius  $a$  abnimmt. Das weist darauf hin, dass  $f_p$  der Porenbildung stark von der Membrankrümmung  $H$  abhängt.

## 4.2.2 Datenanalyse

### *Vesikelelongierung durch Dehnung und Glättung der Membran*

Im Bereich von Vesikelradien von  $25 \leq a/\text{nm} \leq 170$  und Feldstärken von  $1,2 \leq E/\text{MV m}^{-1} \leq 8,0$  ist der maximale Zuwachs  $\Delta\sigma = a \cdot \Delta P/4 = (3/80) \cdot a \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_w \cdot E^2$  der durch den elektrischen Maxwell Stress induzierten lateralen Membranspannung nur gering:  $\Delta\sigma \leq 42 \mu\text{N m}^{-1}$ . In diesem Fall gilt Gl. (1.15) (Kakorin and Neumann, 1998). Für den experimentellen Wert der anfänglichen lateralen Membranspannung  $\sigma_0 = 0,5 \mu\text{N m}^{-1}$  (Kummrow und Helfrich, 1991) ist die Ungleichung  $\Delta\sigma / \sigma_0 \ll 1$  aber nicht erfüllt. Aus diesem Grund muß hier die exakte Gl. (1.17) zur Berechnung von  $p_0$  zur Anwendung kommen. Es zeigt sich, dass bei konstanten Werten für  $\kappa$ ,  $K$  und  $\sigma_0$  keine vollständige Beschreibung der experimentellen Daten durch die exakte numerische Gl. (1.17) im gesamten Bereich der untersuchten Vesikelradien möglich ist (unterbrochene Linie in Abb. 17a). Allerdings sind die experimentellen Daten konsistent mit einer Zunahme von  $\kappa$  und  $K = 48 \cdot \kappa/d^2$  ( $d = 5 \text{ nm}$  ist die Membrandicke) (Goetz et al., 1999), für den Bereich  $2,95 \leq \kappa/10^{20} \text{ J} \leq 11,5$  und  $0,06 \leq K/\text{N} \cdot \text{m}^{-1} \leq 0,22$  für Vesikelradien von  $25 \leq a/\text{nm} \leq 170$  (Abb. 17b). Die kleineren Werte für  $\kappa$  und  $K$  bei abnehmendem Vesikelradius ( $a < 38 \text{ nm}$ )

lassen sich mit der weniger dichten Packung der Lipidmoleküle in der äußeren Monoschicht stark gekrümmter Membranen deuten.

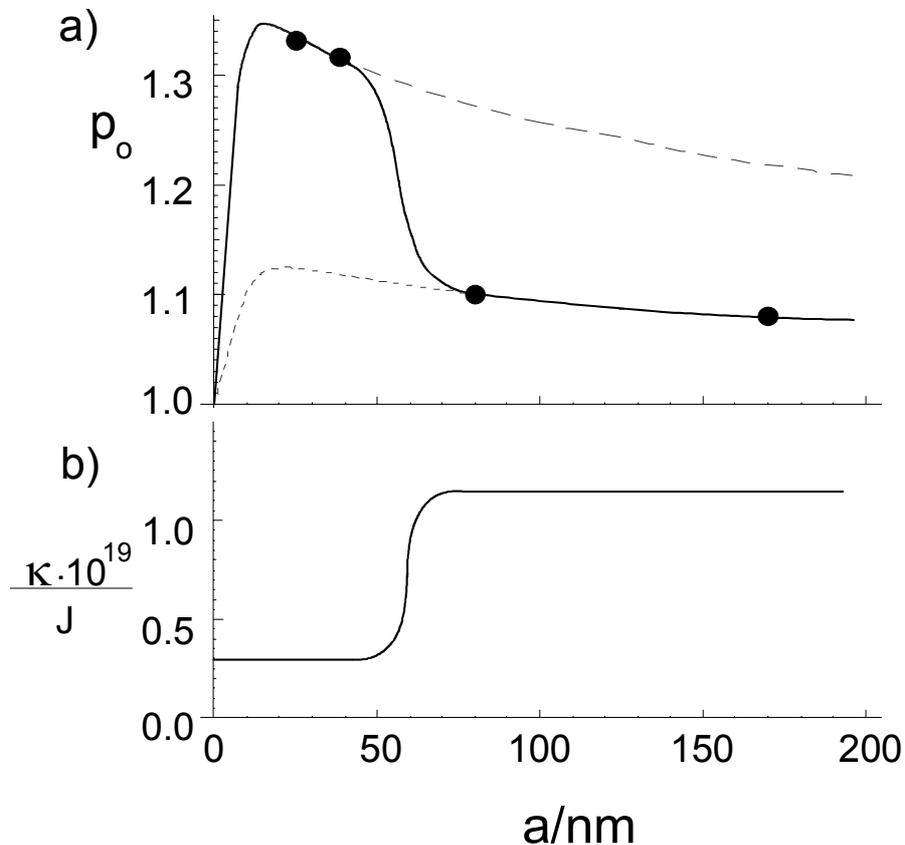


Abb. 17 (a) Das Gleichgewichtsachsenverhältnis  $p_0$  (a) und die Biegesteifigkeit  $\kappa$  (b) der Membran als Funktion des Vesikelradius  $a$  bei der konstanten Transmembranspannung  $\Delta\varphi_{\text{konst}} = -1,5 \cdot a \cdot E = -0,3 \text{ V}$ : (●) experimentelle Daten  $p_0 = p(\Delta S_{\text{ss}}(10\mu\text{s}))$ . Die obere, grob gestrichelte Kurve wurde mit Gl. (1.17) für  $\kappa = 2,95 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ , dem Dehnungsmodul  $K = 0,06 \text{ Nm}^{-1}$  und der lateralen Oberflächenspannung  $\sigma_0 = 0,5 \mu\text{N m}^{-1}$  berechnet. Die untere, fein gestrichelte Kurve bezieht sich auf die Werte  $\kappa = 11,5 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ ,  $K = 0,22 \text{ Nm}^{-1}$  und  $\sigma_0 = 0,5 \mu\text{N m}^{-1}$ . Die durchgezogene Kurve in (a) zeigt, wie sich die Zunahme von  $\kappa$  (b) mit dem Radius  $a$  auswirkt.

Mit den Gl. (1.23) und (A.14) erhält man die charakteristische Zeit  $\tau$  der Vesikelelongierung, ausgedrückt als Membranverschiebung  $\zeta \approx (2/3) \cdot a \cdot (p-1)$  (siehe Anhang Gl. (A.12)). Da die korrespondierende Zunahme  $\Delta S_{\text{ss}}/S_0 \approx (8/45) \cdot (p-1)^2$  der Membranfläche eine quadratische Funktion von  $(p-1)$  ist (Neumann et al., 1998), erhält man die charakteristische Zeit  $\tau_{\text{ss}}$  der  $\Delta S_{\text{ss}}/S_0$ -Relaxation angenähert mit  $\tau_{\text{ss}} \approx 2 \cdot \tau$ . Für den Fall, dass  $\kappa$  vom Vesikelradius abhängt (Abb. 17b) nimmt die charakteristische Zeitkonstante  $\tau_{\text{ss}}$  nicht-linear mit zunehmendem Radius  $a$  zu (Abb. 18). Der Beitrag der charakteristischen Zeit  $\tau_{\text{pol}}$  der

elektrischen Membranpolarisation zur Gesamtzeitkonstanten  $\tau_1$  der ersten Phase kann durch  $\tau_{\text{pol}} = 1,5 \cdot a \cdot C_m \cdot \lambda^{-1}$  berechnet werden, wobei  $C_m = 0,56 \cdot 10^{-2} \text{ F m}^{-2}$  die spezifische Membrankapazität und  $\lambda = \lambda_{\text{in}} = \lambda_{\text{out}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ Sm}^{-1}$  die Leitfähigkeit des Vesikelinneren und -äußeren für  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$  (Neumann et al., 1989) darstellt. In dieser Betrachtung zeigen die beiden Zeitkonstanten  $\tau_{\text{ss}}$  und  $\tau_{\text{pol}}$  sehr ähnliche Werte (Abb. 18). Die vergleichsweise großen Werte von  $\tau_{\text{pol}}$  führen zu einer zeitlichen Verzögerung in der ersten Phase von  $\Delta S_{\text{ss}}/S_0$  (Abb. 16a,b). Die kinetische Analyse der  $\Delta S_{\text{ss}}/S_0$ -Relaxationen zeigt an, dass die gesamte charakteristische Zeit  $\tau_1$  der ersten Phase, inklusive der Verzögerung, die Summe  $\tau_1 = \tau_{\text{ss}} + \tau_{\text{pol}}$  ist. Diese Tatsache steht im Einklang mit der Konvolution der elektrischen Polarisation und der Dehnung und Glättung der Membran.

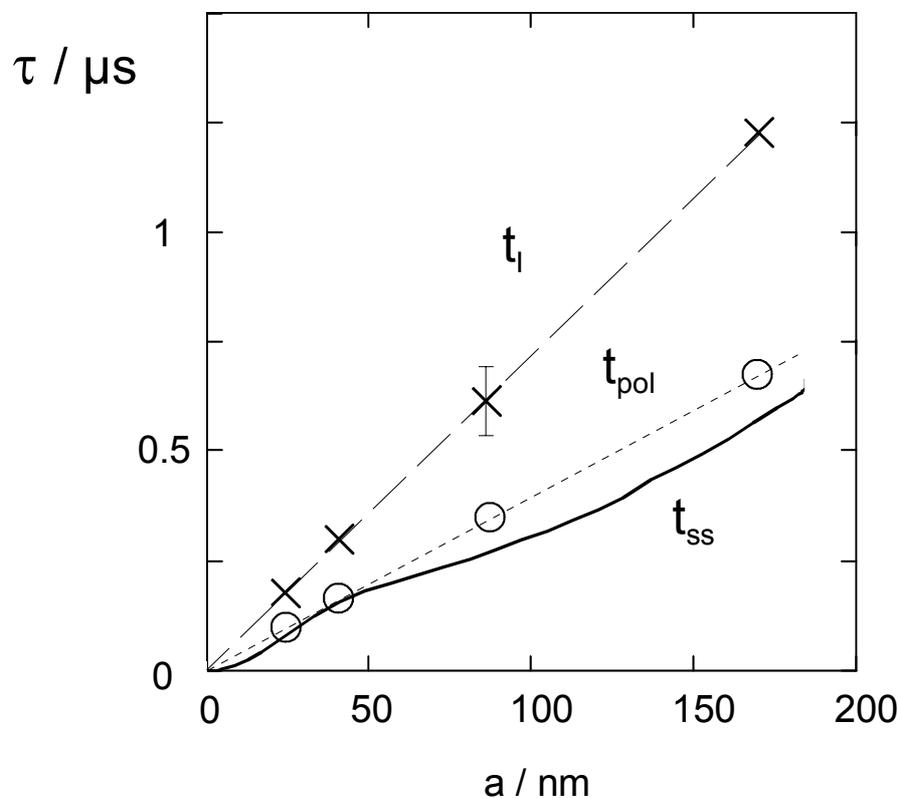


Abb. 18 Die charakteristische Zeit  $\tau_1$  der ersten Phase ( $\times$ ) der relativen Zunahme  $\Delta S/S_0$  der Gesamtoberfläche  $\Delta S_{\text{ss}}/S_0$ , resultierend aus der Dehnung und Glättung der thermischen Membranondulationen (siehe Abb. 16a,b), als Funktion des Vesikelradius  $a$ , bei der konstanten, nominalen Transmembranpotentialdifferenz  $\Delta\varphi_{\text{konst}} = -1,5 \cdot a \cdot E = -0,3 \text{ V}$ . ( $\circ$ ),  $\tau_{\text{pol}}$  der elektrischen Polarisation der Membran. Die durchgezogene Linie ist die Zeit  $\tau_{\text{ss}} = 2 \tau$  der Dehnung und Glättung der Membran. Die Berechnung wurde mit Gl. (A.14) durchgeführt.

### ***Vesikelelongierung durch Membranelektroporation***

Die Erzeugung von Elektroporen in einer Membran führt zu einer Zunahme der Membranoberfläche gemäß  $\Delta S_p = N_p \cdot \pi \cdot \bar{r}_p^2$ , wobei  $N_p$  die Anzahl der Poren pro Vesikel und  $\bar{r}_p$  der mittlere Porenradius ist. Unter Berücksichtigung der Gl. (1.21) ergibt der Beitrag  $\Delta S_p$  zur Gesamt-Oberflächenzunahme  $\Delta S = \Delta S_{ss} + \Delta S_p$  im Vergleich zur Vesikelelongierung bei  $\Delta S_p = 0$  formal kleinere Werte für  $\kappa$  und  $K$ . Von Vorteil bei der Auswertung ist, dass  $\Delta S_p$  relativ zur  $\Delta S_{ss}$  kinetisch verzögert abläuft (Abb. 16a,b).

Zusätzlich führt die mit Membrandehnung und –glättung einhergehende Elongierung zu einer Zunahme der Membrankrümmung in den Polkappen des Vesikels. Das verstärkt die Membranelektroporation (Correa and Schelly, 1998). Da normalerweise die Zeitkonstante  $\tau_p$  der Elektroporation bei  $\Delta\phi^N = -0,3$  V im Bereich einiger Mikrosekunden liegt (Kakorin et al., 1996a), läßt sich die zweite, langsame Phase der Gesamtrelexation von  $\Delta S$  dem elektroporativ bedingten Oberflächenzuwachs  $\Delta S_p$  zuordnen (Abb. 16c). Aufgrund des ausreichend großen Unterschieds in den Werten der Zeitkonstanten  $\Delta S_{ss}$  und  $\Delta S_p$ , ist die separate Bestimmung der Amplituden und Relaxationsraten von  $\Delta S_{ss}$  und  $\Delta S_p$  möglich (Abb. 16).

### ***Verstärkender Einfluß der Membrankrümmung auf die elektroporative Zunahme der Membranoberfläche***

Der dramatische Effekt der geometrischen Membrankrümmung  $H = 1 / a$  auf die elektroporativ bedingte Zunahme  $f_p = \Delta S_p / S_0$  der Membranoberfläche unter der Bedingung  $\Delta\phi^N = -0,3$  V = konst., kann mit dem Konzept der Flächen-Differenz-Elastizitäts- (ADE) Gibbs-Energie erklärt werden (Seifert and Lipowsky, 1995). Dieses Konzept wurde bereits erfolgreich angewendet, um den Effekt von an Vesikelmembranen adsorbiertem, humanem, Annexin V auf die Membranelektroporation von Lipidvesikeln zu quantifizieren (Tönsing et al., 1997). Die Krümmung der Vesikelmembran führt zu unterschiedlichen Packungsdichten der Lipidmoleküle in der äußeren und inneren Monoschicht der Membran. Der laterale Druckgradient entlang der Vesikelmembrannormalen verringert sich durch die Bildung von (konischen) Elektroporen. Die molare ADE-Gibbssche Reaktionsenergie wird wie folgt formuliert (Tönsing et al., 1997):

$$\Delta_r G_{ADE} \approx - \frac{64\pi^2 \cdot \alpha \cdot \kappa \cdot \bar{r}_p^{-2} \cdot \xi \cdot N_A}{d} \cdot a^{-1}, \quad (1.24)$$

wobei  $N_A$  die Avogadrokonstante,  $\bar{r}_p$  der mittlere Porenradius,  $\bar{r}_p = (r_{out} + r_{in})/2$  und  $r_{out}$  und  $r_{in}$  die Porenradien in der äußeren und inneren Monoschicht der Lipiddoppelschicht sind.  $\alpha$  ist ein Materialparameter;  $1 \leq \alpha \leq 6$  (Wiese et al., 1992) (Seifert and Lipowsky, 1995) und

$\xi = (r_{\text{out}} - r_{\text{in}})/(r_{\text{out}} + r_{\text{in}})$ . Für  $\bar{r}_p = 0,35$  nm [Kakorin et al. 1996] enthält der äußere Porenrand 7, der innere 5 Lipidmoleküle, womit  $\xi = 0,352$ .

Erfahrungsgemäß ist das Ausmaß der Membranelektroporation  $f_p \approx 10^{-2}$ , so dass die Gleichgewichtskonstante  $K = f_p/(1-f_p)$  des ratenlimitierenden Schritts  $C \rightleftharpoons (P)$  durch  $K \approx f_p$  gegeben ist, wobei C den geschlossenen und (P) den porierten Membranzustand bezeichnet (Neumann et al., 2000). Daher gilt:

$$f_p \approx K = K_0 \cdot e^{-\Delta_r G_{\text{ADE}}/RT} = K_0 \cdot e^{B_H \cdot a^{-1}}, \quad (1.25)$$

wobei  $R = k_B \cdot N_A$ , die Gaskonstante und  $K_0 = K(a^{-1} = 0)$  den verbleibenden thermodynamischen, mechanischen und elektrischen Beitrag zur Porenbildung beschreibt. Dies sind im einzelnen Porenrand-, chemische und elektrische Polarisierungsterme für  $\Delta\varphi^N = -0,3$  V. Der Parameter  $B_H$  ist gegeben durch:

$$B_H = -\frac{\Delta_r G_{\text{ADE}}}{RT \cdot a^{-1}} = \frac{64\pi^2 \cdot \alpha \cdot \kappa \cdot \bar{r}_p^2 \cdot \xi}{d \cdot k_B \cdot T}, \quad (1.26)$$

In vorliegenden Fall hängt  $f_p$  ausschließlich von  $H$  ab. Die Analyse der Daten in Abb. 19a liefert unter Berücksichtigung der Gl. (1.25)  $K_0 = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$  und  $B_H = 81 \pm 5$  nm<sup>-1</sup>, der zu  $\kappa = 2,95 \cdot 10^{-20}$  J und  $\alpha = 2,0$  korrespondiert (siehe Gl. (1.26)). Der Wert von  $K_0 = 1,2 \cdot 10^{-3}$  bedeutet, dass die Poren bei  $\Delta\varphi^N = -0,3$  V und  $a^{-1} = 0$  (planare Membran) lediglich 0,12 % der Membranfläche ausmachen. Der Wert von  $B_H = 81$  nm<sup>-1</sup> bedeutet, dass die Bildung einer konischen Pore mit einem Durchmesser  $\bar{r}_p = 0,35$  nm in einem Vesikel mit dem Radius  $a = 25$  nm zur Dissipation der Gibbschen Energie von  $\Delta_r G_{\text{ADE}} = B_H \cdot a^{-1} = 3,2$  RT führt. Beim größeren Vesikelradius von  $a = 170$  nm ist die Energiefreisetzung kleiner:  $\Delta_r G_{\text{ADE}} = B_H \cdot a^{-1} = 0,5$  RT. Hier ist zu beachten, dass  $\Delta S_p$  in Abb. 19a, im Unterschied zu  $\Delta S_{\text{ss}}$ , formal im gesamten Radienbereich  $25 \leq a/\text{nm} \leq 170$  mit dem konstanten Parameter  $\kappa = 2,95 \cdot 10^{-20}$  J beschrieben werden kann. Im allgemeinen kann  $\kappa$  mit zunehmendem Radius  $a$  auf Kosten einer Abnahme von  $\alpha$  und  $\bar{r}_p$  ansteigen, während das Produkt  $\kappa \cdot \alpha \cdot \bar{r}_p^2$  in Gl. (1.26) konstant bleibt. Daher stellt der konstante Wert von  $\kappa = 2,95 \cdot 10^{-20}$  J, der zur Erklärung der Daten für  $f_p$  in Abb. 19a dient, keinen Widerspruch zur Abhängigkeit von  $\kappa$  vom Radius  $a$  dar (Abb. 17b), die für die Dehnung und Glättung der Ondulationen ermittelt wurde (Abb. 17a).

Die Analyse der Relaxationsraten  $\tau_p^{-1} = \tau_{\text{II}}^{-1}$  für die zweite Relaxationsphase (Abb. 16c) mit einem Arrhenius Ansatz,  $\tau_p^{-1} = \tau_0^{-1} \cdot \exp[b_H \cdot a^{-1}]$  (Abb. 19b), liefert den Parameter  $\tau_0^{-1} = 0,037 \pm 0,003$  μs<sup>-1</sup> und  $b_H = 84 \pm 5$  nm<sup>-1</sup>. Daher muß hier  $b_H \approx B_H$  gelten. Somit ist die Aktivierungsenthalpie  $E_a = b_H \cdot a^{-1} \cdot R \cdot T$  der durch die Membrankrümmung angetriebenen Elektroporation numerisch vergleichbar mit  $\Delta_r G_{\text{ADE}}$  (Gl. (1.24)).

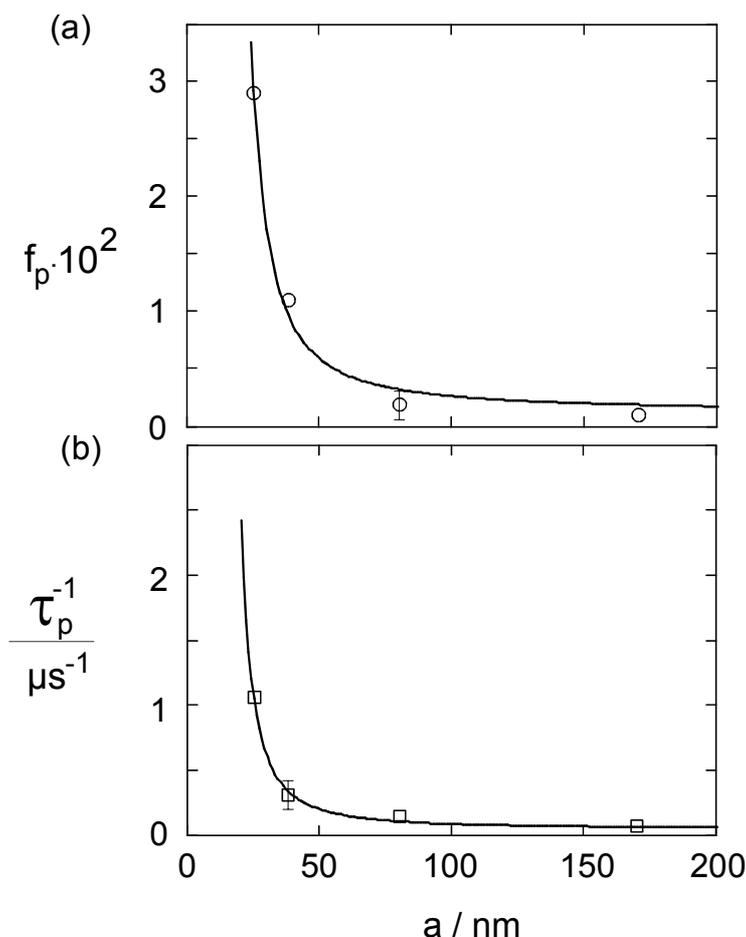


Abb. 19 Radiusabhängigkeit (a) des Oberflächenbruchteils  $f_p = \Delta S_p / S_0$  der Membranelektroporen und (b) der Relaxationsrate  $\tau_p^{-1} = \tau_{II}^{-1}$  der Elektroporation bei konstantem  $\Delta\phi_{\text{konst}} = -1,5 \cdot a \cdot E = -0,3$  V. (○), Amplituden und (□), Raten der Relaxationen aus Abb. 16c. Die durchgezogenen Kurven (a) zeigen angepasste Daten für  $f_p = K_0 \cdot e^{B_H \cdot a^{-1}}$  bei  $K_0 = 1,2 \cdot 10^{-3}$  und  $B_H = 81 \text{ nm}^{-1}$  und (b) für  $\tau_p^{-1} = \tau_0^{-1} \cdot \exp[b_H \cdot a^{-1}]$  und den Parametern  $\tau_0^{-1} = 0,037 \mu\text{s}^{-1}$  und  $b_H = 84 \text{ nm}^{-1}$ .

Die detaillierte kinetische Analyse der Turbiditätsrelaxationen der kleinen unilamellaren Lipidvesikeln (LUV) zeigt, dass die erste, schnelle Phase der elektromechanischen Vesikeldeformation hauptsächlich aus der Zunahme der Membranoberfläche  $\Delta S_{ss}$  durch Membrandehnung und Glättung der thermischen Ondulationen resultiert. Die zweite, langsamere Phase zeigt die Oberflächenzunahme  $\Delta S_p$  durch Bildung von Elektroporen in der Membran an (Abb. 16). Die Zunahme der Membrankrümmung führt zu einem Anstieg des Bruchteils der elektroporierten Membranfläche  $f_p$  und der zugehörigen Relaxationsraten. Aufgrund der Differenz in der relativen Lipidpackungsdichte zwischen der äußeren und inneren Membranmonoschichten verringert sich die Flächendifferenzenergie der Membran bei der Bildung von Elektroporen. Die geometrische Krümmung der Membran erhöht also das Ausmaß und die Rate der Membranelektroporation analog dem Effekt der chemisch

bedingten Spontankrümmung  $c_0$  auf die Membranelektroporation (Neumann and Kakorin, 1999).

Der neue analytische Ausdruck (Gl. (1.21)) für die Gleichgewichtsdeformation eines Vesikels verallgemeinert die von (Helfrich, 1974) formulierten Gleichungen für den Fall der Membrandehnung und des Ausgleichs der Membranondulationen. Dieser neue kinetische Ansatz trägt dazu bei, die elektroporativ bedingte Zunahme der Membranoberfläche separat von dem Anteil zu bestimmen, der durch die Membrandehnung und die Glättung der Ondulationen bei Vesikeln und, möglicherweise, biologischen Zellen auftritt. Eine Anregung für die Praxis kann daher lauten: um effektiv zu elektroporieren, sollte die Membran eine starke Krümmung aufweisen.

## 5 Optische Membransonden als Indikatoren für die elektroporative Vesikeldeformation

### 5.1 Der Absorptionsdichroismus sondenmarkierter Vesikel

Hydrophobe, lineare Sondenmoleküle, wie Zeaxanthin, PATMAN, DPH, TMA-DPH oder  $\beta$ -DPH pPC, orientieren sich mit ihrem optischen Übergangsdipolmoment vorzugsweise entlang der Kohlenwasserstoffketten, also in Richtung der Membranflächennormalen einer Lipidmembran (Lentz, 1989), (Pebay-Peyroula et al., 1994), (van der Heide et al., 1996) (s. Anhang 7.7.1).

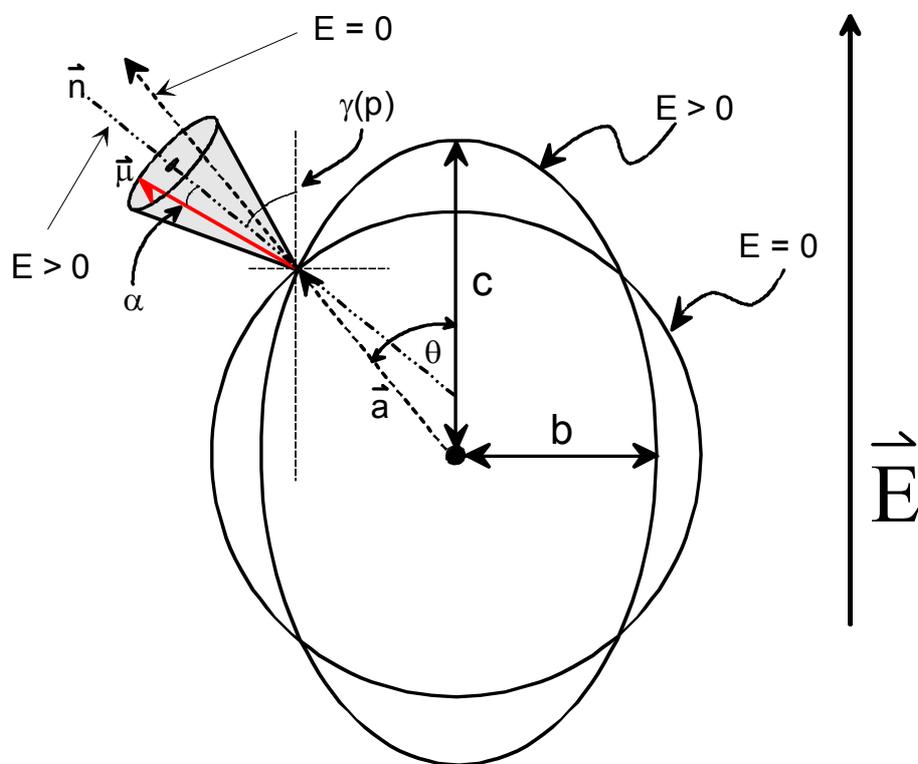


Abb. 20 Globale Rotationsverschiebung des optischen Übergangsmoments  $\vec{\mu}$  eines membrangebundenen Chromophors, hervorgerufen durch die Vesikeldeformation im elektrischen Feld  $E$ .  $\vec{\mu}$  ist auf der Oberfläche des Konus verteilt, dessen Hauptachsenvektor  $\vec{n}$  ist;  $\alpha$  ist der mittlere Halbwinkel des Konus in Bezug zu  $\vec{n}$ . Die Elongierung eines Vesikels dreht  $\vec{n}$  aus der Richtung des Feldvektors  $\vec{E}$  heraus. Das führt zu einem negativen Absorptionsdichroismus ( $\Delta A$ ). Das im Feld deformierte Vesikel mit dem ursprünglichen Radius  $a$  wird durch das Halbachsenverhältnis  $p = c / b$  beschrieben.  $\gamma(p)$  ist durch  $\arctan(p^2 \cdot \tan(\theta))$  gegeben (s. Gl. (1.27)) und beschreibt die Drehung des Normalenvektors  $\vec{n}$  bzw.  $\vec{\mu}$  in Bezug auf den Feldvektor  $\vec{E}$ .

Einige Sondenmoleküle richten ihren Chromophor auch nahezu orthogonal zur Membrannormalen aus. Dies zeigen Messungen zur Fluoreszenzanisotropie für die membranaufgelagerte Sonde DiIC<sub>16</sub>(3) (Axelrod, 1979). Der Winkel zwischen dem optischen Emissionsübergangsdipolmoment von DiIC<sub>16</sub>(3) und der Flächennormalen roter Blutzellen ist  $78 \pm 8^\circ$ . Der in dieser Arbeit für VET<sub>400</sub>-Lipidmembranen für die Feldstärke  $E = 2 \text{ MV m}^{-1}$  bestimmte mittlere Winkel liegt bei  $\approx 80^\circ$  ( $t_E = 10 \mu\text{s}$ ), in guter Übereinstimmung mit  $78 \pm 8^\circ$ .

Die sondenmarkierte Vesikelmembran wird bei der Elongierung in Feldrichtung als Ganzes bewegt. Bei dieser globalen Reorientierung der Membransonden dreht der Chromophor, je nach Ausrichtung, aus der Richtung des elektrischen Feldvektors heraus oder hinein. Daher resultiert z.B. für  $\beta$ -DPH pPC ein negativer (Neumann and Kakorin, 1996), oder, im Fall des Farbstoffs DiIC<sub>16</sub>(3), ein positiver Absorptionsdichroismus, da der Chromophor in letzterem Fall durch den Mitführungseffekt der Vesikelmembran in Feldrichtung gedreht wird (s. Abb. 3).

Da die Sonden die beschriebene Drehbewegung kollektiv durchführen, findet man je nach Sondentypus große Werte für die Amplitude des Absorptionsdichroismus im Bereich  $0,1 \leq \Delta A^- / A_0 \leq 0,4$  für Feldstärken von  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  (s. Abb. 9). Hingegen führt die lokale Rotation individueller Sondenmoleküle, wie sie z.B. bei einem Übergang im Randbereich einer hydrophoben zu einer hydrophilen Pore auftritt (Kakorin et al., 1996b), (Neumann et al., 1989), nur zu wesentlich kleineren Änderungen für den Absorptionsdichroismus, da maximal 0,2 % der Membranoberfläche eines Vesikels elektroporiert werden (Tönsing et al., 1997). Daher zeigt der Absorptionsdichroismus nicht direkt die feldinduzierte Porenbildung (MEP) in einer Membran an, sondern hauptsächlich die globale Reorientierung der Sonden, die durch die Formänderung des Vesikels unter dem Einfluss des elektrischen Maxwell-Stress auftritt (Neumann et al., 1998).

Wenn das optische Übergangsmoment einer Sonde nicht parallel zur Membrannormalen, sondern auf einem Konus mit dem mittleren Öffnungswinkel  $\alpha$  verteilt ist, so verringert sich die Amplitude des Absorptionsdichroismus im Vergleich zur parallelen Ausrichtung, da die Projektion von  $\vec{\mu}$  auf den Feldvektor  $\vec{E}$  kleiner wird. In Abb. 8 wird deutlich, dass die Sonden einen unterschiedlichen Absorptionsdichroismus haben. Legt man bei gleicher Deformation  $p$  die Gl. (1.27) zugrunde, dann bedeutet dies, dass sich der Wert des mittleren Konuswinkel  $\alpha$  für die einzelnen Sondentypen unterscheidet. Es ist zudem bekannt, dass sich der Extinktionskoeffizient eines membrangebundenen Chromophors unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ändert. Das wird mit dem iono-elektrochromen Effekt, oder auch durch die Reorganisation der lokalen Lösungsumgebung des Farbstoffs erklärt [Neumann and Kakorin 1996]. Quantitativ zeigt sich dieser Effekt im chemischen Anteil  $\Delta A^+$  der

Relaxationen. Der Anteil  $|\Delta A^+|$  ist im Vergleich zu  $|\Delta A^-|$  allerdings sehr klein (s. Abb. 7), so dass die Differenz  $(\Delta A_{CH}^{\parallel} - \Delta A_{CH}^{\perp})$  in Gl. (1.9) vernachlässigt werden kann (Kakorin and Neumann, 1996). Daher ist der reduzierte Absorptionsdichroismus  $\Delta A / A_0$  durch folgendes Integral gegeben :

$$\frac{\Delta A^-}{A_0} = \frac{\Delta A}{A_0} = -\frac{3}{4} \left\{ \frac{3 \cdot \cos^2 \alpha - 1}{2} \right\} \cdot \int_0^{\pi} \{1 - 3 \cdot \cos^2 [\arctan(p^2 \cdot \tan \theta)]\} \cdot \sin \theta \, d\theta, \quad (1.27)$$

wobei  $A_0$  der Wert der Absorption beim Feld  $E = 0$  und der Winkel  $\alpha$  den mittleren Konuswinkel zwischen der Flächennormalen  $\bar{n}$  und dem optischen Übergangsmoment  $\bar{\mu}$  der Sonde darstellt (s. Abb. 20). Hierbei wird angenommen, dass das optische Übergangsmoment der Sonde zufällig verteilt auf der Oberfläche des gedachten Konus liegt. Der mittlere Konuswinkel  $\alpha$  ist hierbei ähnlich aufzufassen, wie der Konuswinkel  $\theta_{\max}$  für die stationäre Orientierung im "Wobbling-in-cone"-Modell der Fluoreszenzemission stäbchenförmiger Moleküle, deren Emissionsübergangsmoment parallel zu Moleküllängsachse liegt (Kinosita, Jr. et al., 1977). Der zweite Legendre-Polynomterm  $\{(3 \cdot \cos^2 \alpha - 1)/2\}$  in Gl. (1.27) hat bei der Fluoreszenzanisotropie den Charakter eines Ordnungsparameters (Engel and Prendergast, 1981) und wird hier analog benutzt. Der mittlere Sonden-Konuswinkel läßt sich demnach als der aus dem Ordnungsparameter  $\{(3 \cdot \cos^2 \alpha - 1)/2\}$  bestimmte Orientierungswinkel der Hauptachse des optischen Übergangsmoments  $\bar{\mu}$  in Bezug auf die Membrannormale  $\bar{n}$  auffassen. Gl. (1.27) zeigt, dass  $|\Delta A^-|$  für eine Sonde mit einer präferentiellen Ausrichtung parallel zur Membrannormalen mit zunehmendem Winkel  $0 \leq \alpha / \text{deg} < 54,7$  immer kleiner wird. Für  $\alpha = 0$  liegen alle optischen Übergangsmomente orthogonal zur Flächennormalen der Membran,  $|\Delta A^-|$  nimmt den maximalen Wert an. Bei dem *magischen* Winkel von  $\alpha = 54,7^\circ$  verschwindet der Term  $\{(3 \cdot \cos^2 \alpha - 1)/2\}$ , der reduzierte Absorptionsdichroismus wird  $\Delta A / A_0 = 0$ . Das bedeutet, dass alle Richtungen des optischen Übergangsmoments  $\bar{\mu}$  gleich gewichtet sind. Für Sonden mit Winkeln im Bereich von  $54,7 \leq \alpha / \text{deg} \leq 90$  dreht sich das Vorzeichen von  $\Delta A / A_0$  um.

Nach Gl. (1.27) bedeutet ein negativer Absorptionsdichroismus, dass die Deformation  $p$  eines Vesikels in Feldrichtung erfolgt (Elongation zum prolaten Ellipsoiden), während ein positives Vorzeichen für  $\Delta A / A_0$  eine Stauchung zum oblaten Ellipsoiden anzeigt. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass die Sonde eine im wesentlichen parallele Ausrichtung zur Membrannormalen besitzt. Für eine überwiegend orthogonale Orientierung zur Membrannormalen erwartet man bei den beschriebenen Prozessen eine Vertauschung der Vorzeichen.

Zur Berechnung des Achsenverhältnisses  $p = c / b$  oder dem Sonden-Konuswinkel  $\alpha$  kann die folgende Lösung des Integrals aus Gl. (1.27) benutzt werden:

$$\frac{\Delta A}{A_0}(p, \alpha) = \frac{3}{4} \cdot (3 \cdot \cos^2 \alpha - 1) \cdot \frac{3p^2 \operatorname{arcsinh}(\sqrt{p^4 - 1}) - (p^4 + 2)\sqrt{p^4 - 1}}{(p^4 - 1)\sqrt{p^4 - 1}}, \quad (1.28)$$

Um zusätzlich zu berücksichtigen, dass die optischen Übergangsmomente der Sonden im *Volumen* des Konus mit dem Halbwinkel  $\alpha_{\max}$  zufällig verteilt vorliegen, wird substituiert:

$$\left\{ \frac{3 \cdot \cos^2 \alpha - 1}{2} \right\} = \frac{\int_0^{\alpha_{\max}} \frac{3 \cdot \cos^2 \alpha - 1}{2} \cdot \sin \alpha d\alpha}{\int_0^{\alpha_{\max}} \sin \alpha d\alpha} \quad (1.29)$$

Hierbei gilt  $\alpha_{\max} > \alpha$ .

In dieser Arbeit wird für die Auswertungen der Term  $\{(3 \cdot \cos^2 \alpha - 1)/2\}$  benutzt.

Bei einer alternativen Beschreibung der Orientierung eines Chromophors in der Membran (Straume and Litman, 1987b) wird der mittlere Konuswinkel  $\alpha$  durch die äquivalenten Bruchteile der optischen Übergangsmomente der Sondenmoleküle, die relativ zur Membrannormalen  $\bar{n}$  parallel ( $f_{\parallel}$ ) und orthogonal ( $f_{\perp}$ ) liegen, ersetzt. Die beiden Fraktionen genügen dem Massenerhalt mit:  $f_{\parallel} + f_{\perp} = 1$ . Danach folgt:

$$\left\{ \frac{3 \cdot \cos^2 \alpha - 1}{2} \right\} = f_{\parallel} - \frac{f_{\perp}}{2} = \frac{3 \cdot f_{\parallel} - 1}{2} \quad (1.30)$$

Nomenklatur des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha$ :

$\alpha$	Der mittlere Sonden-Konuswinkel in einer ondulierenden Lipidmembran.
$\alpha_0$	Der mittlere Sonden-Konuswinkel in einer <i>nicht</i> ondulierenden Lipidmembran.
$\alpha_E$	Der mittlere Sonden-Konuswinkel einer Lipidmembran in Gegenwart eines elektrischen Feldes.

## 5.2 Einfluss der Krümmung eines Ellipsoids auf den Sonden-Konuswinkel $\alpha$

Die Rate der Vesikelelongation ist durch die Oberflächenzunahme der Elektroporenbildung limitiert. Als Quelle für die Vesikelelongierung stammt die größte Flächenzunahme wegen  $\Delta\phi(E) = -1,5 \cdot E \cdot a \cdot f(\lambda_m) \cdot \cos(\theta)$  aus den Polkappen der Vesikel ( $\theta = 0$ ).

Die Krümmungsanisotropie wirkt auf den mittleren Konuswinkel einer Sonde in der Membran eines ellipsoiden Vesikels in charakteristischer Weise. In den Polkappen des Vesikels nimmt der mittlere Konuswinkel  $\alpha$  zu, da die Sonde hier eine geringere Einschränkung ihres Rotationsfreiheitsgrades erfährt als in einer nicht deformierten Membran. Neben der rein elektromechanisch, durch Dehnung und Glättung der Ondulationen erzeugten Membranzusatzoberfläche, ist der Flächenanteil der Elektroporenbildung zu berücksichtigen. Die Bildung von wassergefüllten, konischen HO-Poren führt aber vor allem in den Polkappen des Ellipsoids zur Verringerung des Lipidichtegradienten. Bei großen Transmembranspannungen verringert sich damit die Krümmung in diesen Bereichen, der Membransonde steht ein kleineres freies Membranvolumen zu Verfügung.

### 5.2.1 Die Winkelabhängigkeit der Gesamtkrümmung $H_t$ eines Ellipsoiden

Zur Berechnung der Krümmung eines Ellipsoids (Prolat) ist sowohl der meridiane,  $R_m$ , als auch der parallele Radiusvektor,  $R_p$ , zu berücksichtigen (s. Abb. 21). Der meridiane Radiusvektor,  $R_m$ , eines Ellipsenperimeters ist gegeben durch:

$$R_m = \frac{\hat{a} \cdot \left(1 - \left(\frac{e \cdot x}{\hat{a}}\right)^2\right)^{\frac{3}{2}}}{\sqrt{1-e^2}} = \frac{\hat{a} \cdot (1 - (e \cdot \cos \theta)^2)^{\frac{3}{2}}}{\sqrt{1-e^2}} \quad (1.31)$$

und der parallele Radiusvektor,  $R_p$ , ist

$$R_p = \hat{a} \cdot \sqrt{1-e^2} \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{e \cdot x}{\hat{a}}\right)^2} = \hat{a} \cdot \sqrt{1-e^2} \cdot \sqrt{1 - (e \cdot \cos \theta)^2}, \quad (1.32)$$

wobei  $\hat{a} = a \cdot \sqrt[3]{(1-e^2)^{-1/2}} = \sqrt[3]{p}$  und  $a \ll \hat{a}$  der Radius der ursprünglichen Kugel des durch eine Deformation resultierenden Ellipsoiden ist.  $e$  bezeichnet die Exzentrizität, die mit der Deformation  $p$  über  $\sqrt{1-e^2} = p^{-1}$  zusammenhängt und  $x = \hat{a} \cdot \cos \theta$ .

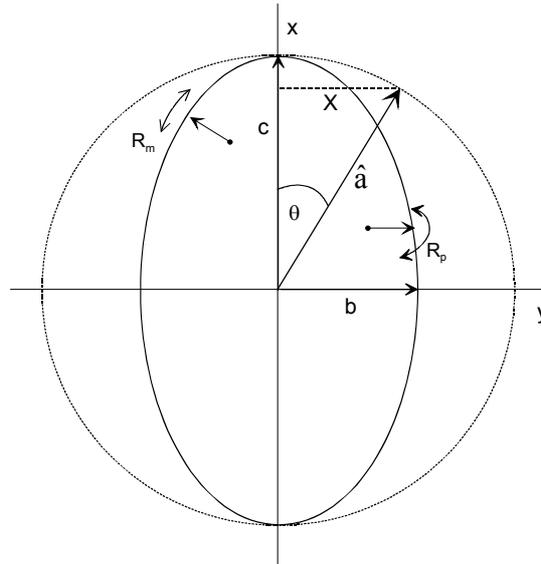


Abb. 21: Die Deformation einer Kugel zu einem Ellipsoiden unter der Bedingung konstanten Volumens ( $V = \text{const.}$ ) und Berücksichtigung einer Oberflächenvergrößerung. Die Gesamtkrümmung  $H_t$  einer Ellipse beim Polarwinkel  $\theta$  ist durch die Summe der inversen Radien  $R_m$  und  $R_p$  an dieser Stelle gegeben.  $c$  ist die lange,  $b$  die kurze Halbachse der Ellipse.  $\hat{a} = c$  ist der Ortsvektor eines Punktes auf dem Kreisumfang beim Winkel  $\theta$ .  $X$  ist die Distanz des durch den Ortsvektor  $\hat{a}$  beschriebenen Kreispunktes von der Hauptachse  $c$ .  $R_m$  und  $R_p$  sind der meridiane und parallele Radius die zu dem Ortspunkt  $H_t(\theta)$  gehören. Beachte, dass  $\hat{a} > a$  ist !

Die geometrische Krümmung einer Kugel ist an jeder Stelle der zweidimensionalen Oberfläche gleich und immer durch  $H = 2 / a$  gegeben. Für den hier betrachteten Fall eines prolates Ellipsoiden ist die Summe der reziproken Radien,  $R_m$  und  $R_p$ , beim Winkel  $\theta$ , gleich der *Gesamtkrümmung*  $H_t$  an dieser Stelle:

$$H_t(\theta) = \frac{1}{R_m(\theta)} + \frac{1}{R_p(\theta)}, \quad (1.33)$$

Entlang eines Ellipsenperimeters ändert sich die Gesamtkrümmung  $H_t$ , im Unterschied zur Kugel, stetig in Abhängigkeit vom Winkel  $\theta$ .

Für die Grenzfälle  $\theta = 0^\circ$  und  $\theta = 90^\circ$  erhält man für  $R_m$  und  $R_p$ :

$$\theta = 0^\circ: \quad R_m = \frac{\hat{a} \cdot (1 - (e \cdot \cos \theta)^2)^{\frac{3}{2}}}{(1 - e^2)^{\frac{1}{2}}} = \hat{a} \cdot (1 - e^2) \quad (1.34)$$

$$R_p = \hat{a} \cdot (1 - e^2)^{\frac{1}{2}} \cdot (1 - e^2)^{\frac{1}{2}}; \quad R_m = R_p$$

$$R_m = \frac{\hat{a}}{\sqrt{1-e^2}} \quad (1.35)$$

$\theta = 90^\circ$ :

$$R_p = \hat{a} \cdot \sqrt{1-e^2}$$

### 5.2.2 Die Differenz der Oberflächendichte in der Schale eines sphärischen Ellipsoiden

Für die durch den Abstand  $d$  getrennte innere und äußere Oberfläche ( $S_{in}$ ,  $S_{out}$ ) einer Kugelschale, beträgt die Differenz der Krümmung  $\Delta H = H_{out} - H_{in}$ . Besetzt man nun die neutralen Oberflächen der inneren und äußeren Monoschicht,  $S_-$  und  $S_+$ , der Kugelschale sukzessiv so dicht wie möglich mit Lipidmolekülen, so resultiert analog dem Krümmungsunterschied auch eine Differenz in der relativen Lipidpackungsdichte zwischen den Schichten. Die Flächendifferenz beträgt  $\Delta S_0 = (n_{out} - n_{in})/\rho_0$  und die relative Flächenänderung  $\Delta S_0/S_0 = (n_{out} - n_{in})/n_0$ , wobei  $n_0$  die Anzahl der Lipidmoleküle und  $\rho_0$  die neutrale Oberflächendichte auf  $S_0$  ist. Der Zusammenhang zwischen der Krümmung  $H$  und der Oberflächendichte  $\rho$  der Lipidmoleküle in den neutralen Flächen der Monoschichten läßt sich ausdrücken durch:

$$\rho_{\pm} = \rho_0 \cdot \left( 1 \pm \frac{1}{2} \cdot d \cdot H \right), \quad (1.36)$$

wobei  $d$  die Schalendicke und  $\rho_-$  und  $\rho_+$  die neutralen Oberflächendichten der inneren und äußeren Monoschicht  $S_-$  und  $S_+$  sind (s. Abb. 22).

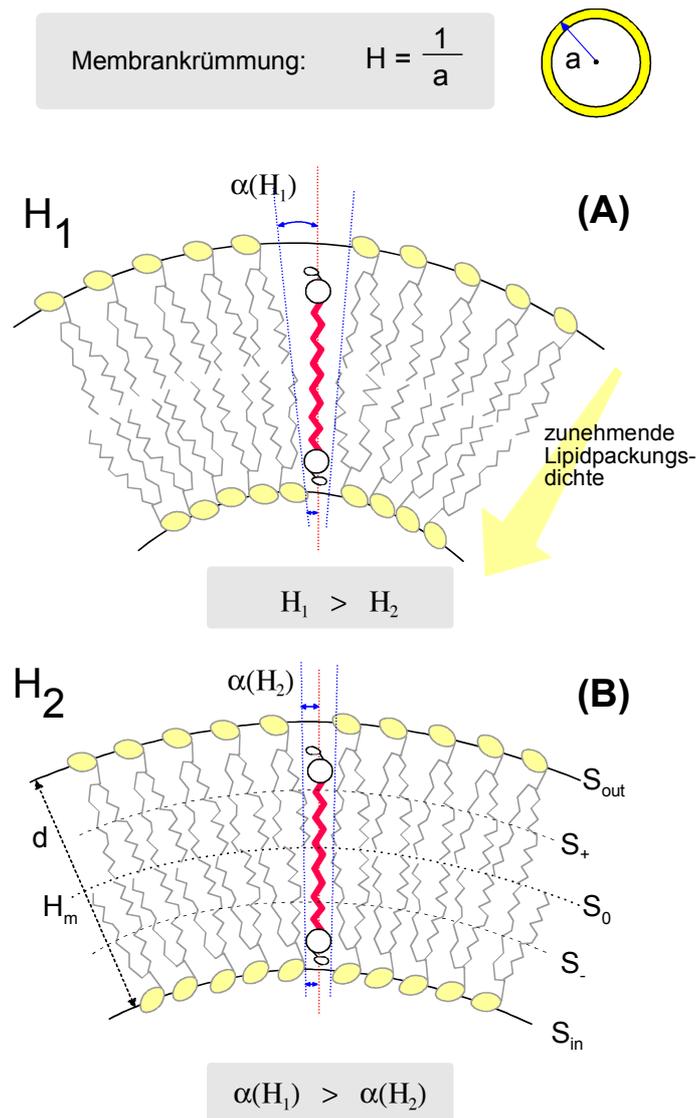


Abb. 22: Schematische Darstellung zum Einfluss der Krümmung einer Lipidmembran auf die relative Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0$  und die Auswirkung auf den Konuswinkel  $\alpha$  des transmembranen Zeaxanthin. Da  $a_1 < a_2$  und  $H = 1/a$  ist, folgt  $H_1 > H_2$ . Unter dieser Bedingung ist  $\alpha(H_1) > \alpha(H_2)$ . (A) Bezogen auf die neutrale Fläche  $S_0$  führt eine größere Membrankrümmung in der äußeren Monoschicht zu einer weniger dichten, innen aber zu einer erhöhten Lipidpackungsdichte. Die Anzahl der Lipidmoleküle auf den Flächen ist  $S_{out} = S_{in}$ . (B) Je kleiner die Membrankrümmung  $H$ , desto geringer ist die Asymmetrie der Lipidpackungsdichte der inneren und äußeren Schicht. Die Membransonde spiegelt diese geometrischen Verhältnisse durch einen kleineren Konuswinkel  $\alpha$  wider;  $d$ , Membrandicke;  $S_0$ ,  $S_{out}$ ,  $S_{in}$  neutrale, äußere, innere Oberfläche der Vesikelmembran;  $S_-$ ,  $S_+$  neutrale Oberfläche der inneren und äußeren Lipidmonoschicht.  $H_m$  Krümmung der neutralen Oberfläche  $S_0$ .

Dann folgt für die Differenz von  $\rho_-$  und  $\rho_+$ :

$$\Delta\rho = \rho_- - \rho_+ = \rho_0 \cdot \left( 1 + \frac{1}{2} \cdot d \cdot H - \left( 1 - \frac{1}{2} \cdot d \cdot H \right) \right) = \rho_0 \cdot d \cdot H \quad (1.37)$$

Die relative Änderung der Oberflächendichte (Lipidpackungsdichte),  $\Delta\rho/\rho_0$ , als Funktion der Krümmung einer kugelförmigen Sphäre ist dann bei gegebener Schalendicke  $d$ :

$$\frac{\Delta\rho}{\rho_0} = d \cdot H \quad (1.38)$$

Mit Gl. (1.33) und (1.38) folgt für  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  eines prolaten Ellipsoiden:

$$\frac{\Delta\rho}{\rho_0}(\theta) = d \cdot H_t(\theta) \quad (1.39)$$

Mittels Gl. (1.39) läßt sich somit die Änderung der relativen Lipidpackungsdichte für alle Flächennormalen eines Ellipsenperimeters bestimmen.  $H_t(\theta)$  ist in diesem Fall gleich  $2 \cdot H$ .

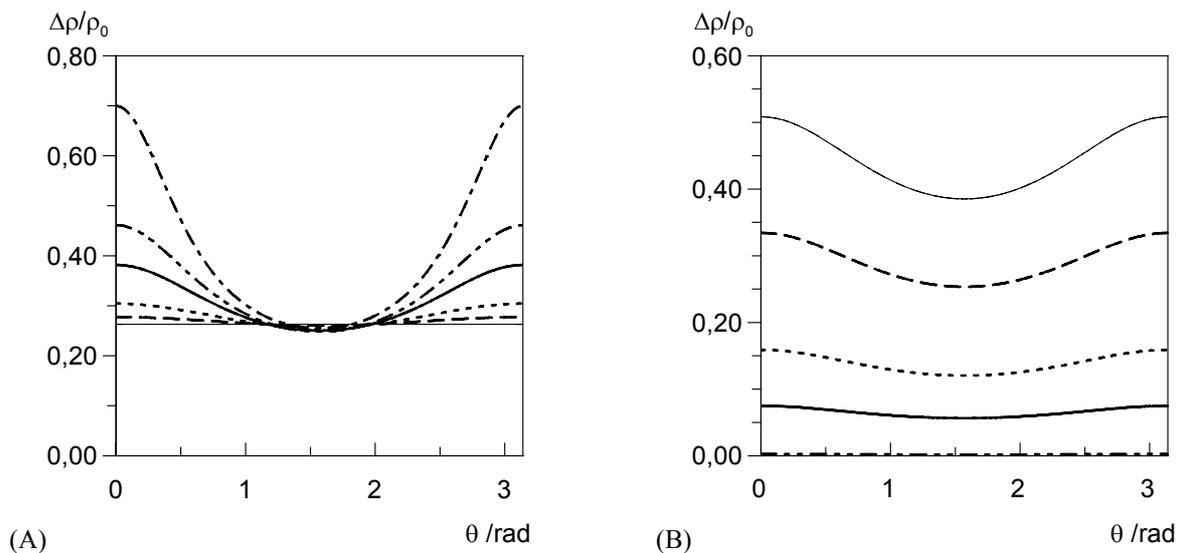


Abb. 23: Die nach Gl. (1.39) berechnete Änderung der relativen Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0$  entlang eines Perimeters eines zum Ellipsoid deformierten Vesikels als Funktion des Polarwinkels  $\theta$ , für unterschiedliche Deformationen  $p$ . (A)  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  für VET<sub>100</sub> (initial:  $a/\text{nm} = 38$ ) für die Deformationen  $p = 1; 1,033; 1,091; 1,25; 1,4; 1,8$  (von unten nach oben) (B)  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  für Vesikel mit den Initialradien  $a = 25, 38, 80, 170, 5000$  nm (von oben nach unten) bei der konstanten Deformation  $p = 1,155$ , Schalendicke  $d = 5$  nm.

### 5.3 Datenanalyse und Diskussion

Mit Hilfe von Gl. (1.28) lassen sich nun aus den Absorptionsänderungen  $\Delta A^- / A_0 = \Delta A / A_0$  und dem aus den Turbiditätsänderungen  $\Delta T^- / T_0$  und  $\Delta T^+ / T_0$  erhaltenen Achsenverhältnis  $p = c / b$  die zeitabhängigen Änderungen des Sonden-Konuswinkels im Ein- und Ausfeld berechnen (s. Abb. 24).

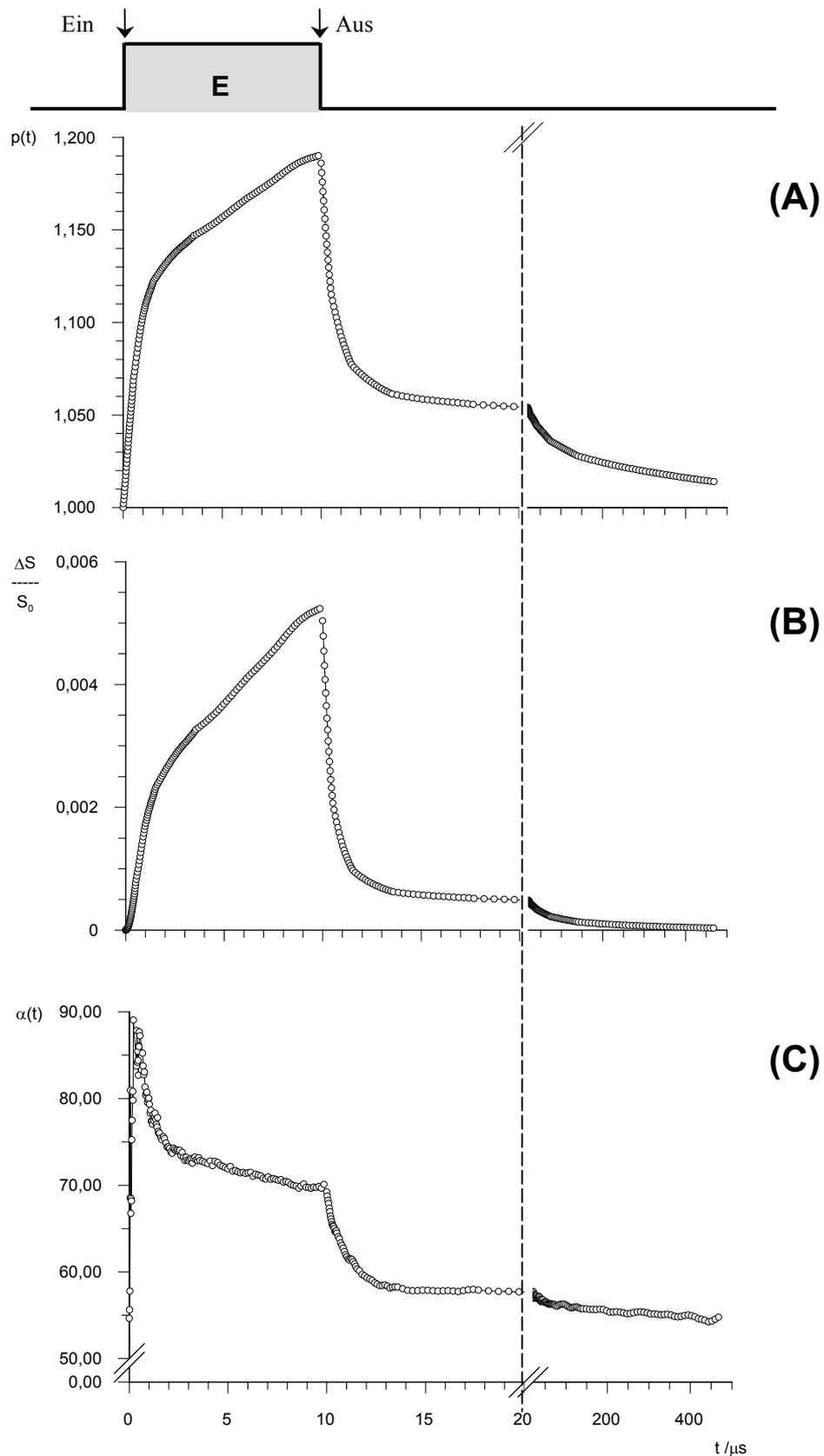


Abb. 24 Die Ein- und Ausfeldrelaxation des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  der membranaufgelagerten Sonde DiIC<sub>16</sub>(3) (C), die dazu gehörige berechnete Vesikel-Deformation  $p$  (A) und die Oberflächenänderung  $\Delta S/S_0$  (B).  $\alpha(t)$  wird mit Gl. (1.28),  $\Delta S/S_0$  mit Gl. (A.5) berechnet.  $p(t)$  wird aus  $\Delta T/T_0$  und  $\Delta T^+/T_0$  mittels des FORTRAN-Progs. COA98 berechnet. Exp. Bed. wie in Abb. 7.

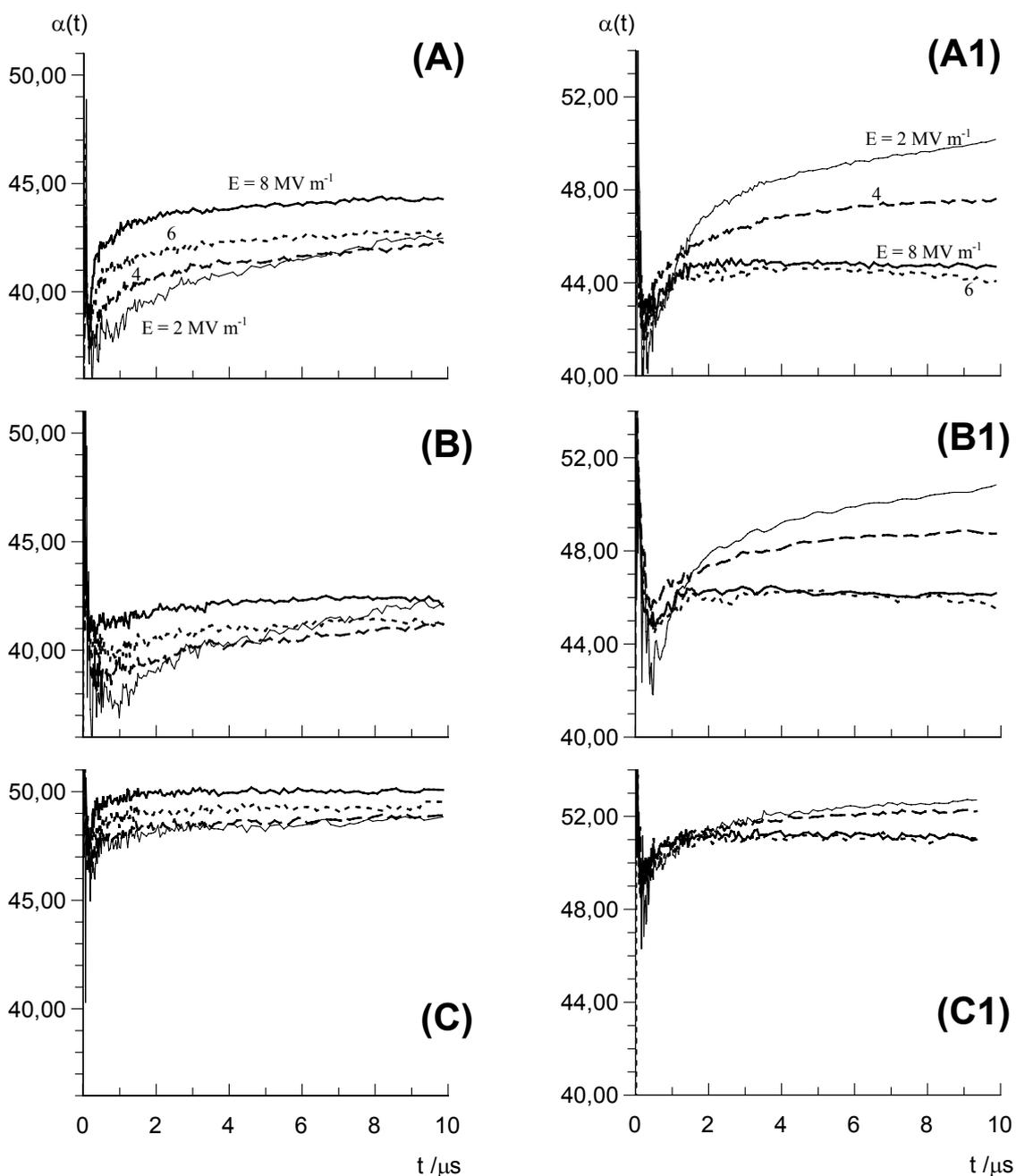


Abb. 25 Die mit Gl. (1.28) berechnete Einfeldrelaxation des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  der Membransonden  $\beta$ -DPH pPC (A, A1), Zeaxanthin (B, B1) und DPH (C, C1) als Funktion der Zeit  $t$  für die Feldstärken  $E = 2, 4, 6, 8 \text{ MV m}^{-1}$ . Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \text{ }\mu\text{s}$  wird appliziert. Vesikelradien: (A-C)  $a = 38 \text{ nm}$  (VET100); (A1-C1)  $a = 25 \text{ nm}$  (VET50) Exp. Bed. wie in Abb. 7.

### 5.3.1 Der relative Oberflächendichtegradient $\Delta\rho(\theta)/\rho_0$ und der mittlere Sonden-Konuswinkel $\alpha$

Die Abhängigkeit des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  von der Membrankrümmung  $H$  ist in erster Näherung durch

$$\alpha_0(H) = c + b \cdot H, \quad (1.40)$$

gegeben, wobei  $c$  als Achsenabschnitt den Winkel  $\alpha_0$  in einer planaren, nicht ondulierten Membran bezeichnet und die Geradensteigung  $b$  die Änderung des Winkels  $\alpha_0$  mit der Krümmung  $H$  berücksichtigt.

Für den Verlauf der Elektrodeformation einer Sphäre zu einem Ellipsoiden gilt für  $H_t$  die in Gl. (1.33) beschriebene Abhängigkeit vom Winkel  $\theta$ . Es wird nun angenommen, dass die Änderung der Krümmung  $H_t(\theta)$  sich in der Änderung des mittleren Sondenwinkels  $\langle \alpha \rangle$  widerspiegelt. Somit läßt sich für das Funktional des mittleren Winkels  $\langle \alpha \rangle$  und der Deformation  $p$  formulieren:

$$\langle \alpha \rangle = \text{fkt}(p) \quad (1.41)$$

Bezieht man nun die Deformation  $p$  mit in Gl. (1.33) ein, so folgt:

$$H_t(p, \theta) = \frac{1}{R_m(p, \theta)} + \frac{1}{R_p(p, \theta)}, \quad (1.42)$$

Die Gl. (1.38) stellt den Zusammenhang der relativen Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0$  mit dem Produkt aus der Krümmung  $H(\theta)$  und der Schalendicke  $d$  (Membrandicke) her. Eine elektrisch induzierte Änderung der Umgebungsparameter - hier durch die Biegung, Dehnung, Kompression und Elektroporation der Membran bedingt - führt offenbar zu einer Änderung der charakteristischen Eigenschaften eines Sondenmoleküls.

Meßtechnisch ist aber nicht  $\alpha(\theta, p)$ , sondern nur der über alle Winkel  $\theta$  gemittelte Sonden-Konuswinkel  $\alpha_E$  zugänglich nach:

$$\langle \alpha \rangle = \frac{1}{2} \int_0^\pi \alpha_0(H_t) \cdot \sin \theta d\theta, \quad (1.43)$$

wobei  $\alpha_0$  durch Gl. (1.40) gegeben ist. Falls  $H$  unabhängig von  $\theta$  ist ( $p = 1$ ), gilt für eine nicht ondulierte Membran  $\langle \alpha \rangle = \alpha_0$ .

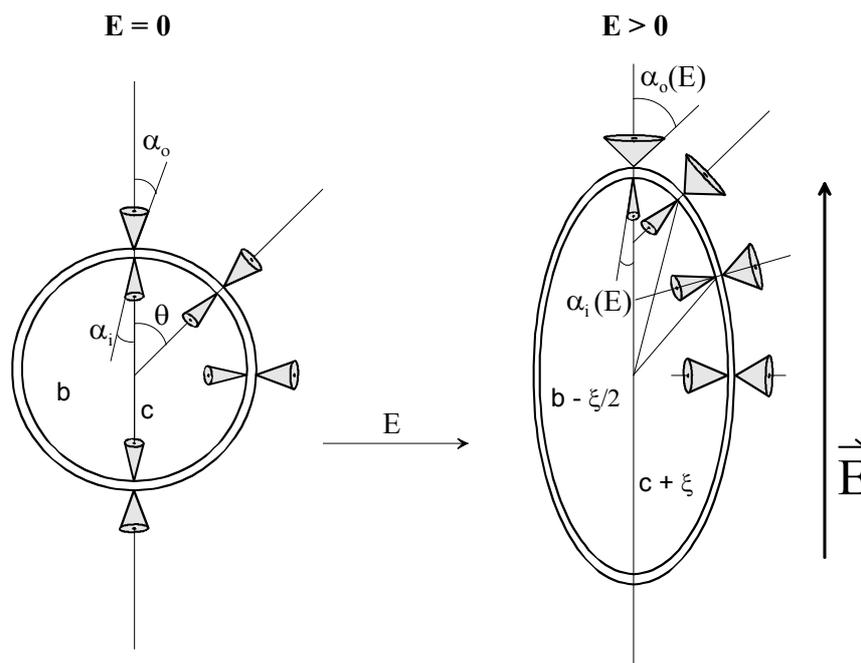


Abb. 26: Die Wirkung des elektrischen Feldes auf den Sonden-Konuswinkel  $\alpha$ , hier angedeutet durch die Konen, auf ein Vesikel. Für  $E = 0$  nimmt  $\alpha$  in einem kugelförmigen, nicht ondulierenden (z.B. einem osmotisch gespannten) Vesikel, für alle Winkel  $\theta$  den gleichen Wert  $\alpha_0$  an. Aufgrund des mit der Krümmung  $H$  ansteigenden Lipiddichtegradienten  $\Delta\rho/\rho_0$ , unterscheidet sich  $\alpha$  für die innere und äußere Lipidmonoschicht umso mehr, je kleiner der Radius  $a$  des Vesikel ist. Im elektrischen Feld ( $E > 0$ ) findet man im zum Ellipsoiden deformierten Vesikel aufgrund der in Gl. (1.39) und (1.40) beschriebenen Abhängigkeit unterschiedlich große Werte für  $\alpha$ ; je größer  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  desto größer wird  $\alpha$  und *vice versa*.  $c, b$  Halbachsen;  $\xi$  Elongation/Kontraktion;  $\theta$  Polarwinkel des Radiusvektors zur Hauptachse (Feldvektor);  $\alpha_i, \alpha_o$  Sonden-Konuswinkel der inneren und äußeren Lipidmonoschicht;  $\vec{E}$  elektrischer Feldvektor.

Um die zeitliche Entwicklung von  $\langle \alpha(t) \rangle$  bei Anwesenheit eines elektrischen Feldes mit einzubeziehen, ist für die Krümmung  $H$  auch die Abhängigkeit von  $\theta$  und  $p(t)$  zu berücksichtigen:

$$\langle \alpha(t) \rangle = \frac{1}{2} \int_0^\pi \alpha_0(H_t(\theta, p(t))) \cdot \sin \theta d\theta \quad (1.44)$$

Setzt man nun für  $\alpha_0$  die Beziehung aus Gl. (1.40) ein, so folgt:

$$\langle \alpha(t) \rangle = \frac{1}{2} \int_0^\pi (c + b \cdot H_t(\theta, p(t))) \cdot \sin \theta d\theta \quad (1.45)$$

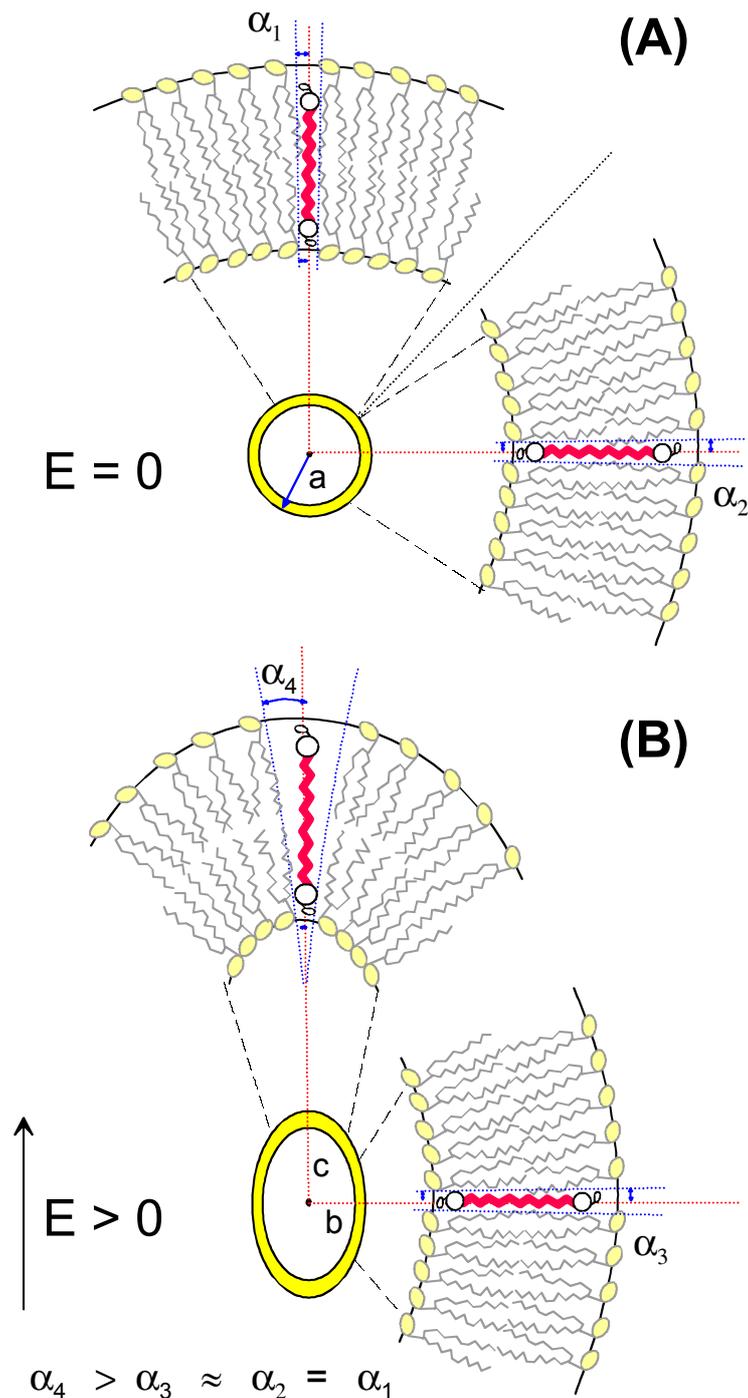


Abb. 27: Die Wirkung der lokalen Membrankrümmung  $H_l(\theta)$  einer Ellipsenschale auf den Zeaxanthin-Konuswinkel  $\alpha_E$ . (A) In einem kugelförmigen, nicht ondulierenden, Vesikel für die elektrische Feldstärke  $E = 0$  ist die Krümmung  $H$  an jeder Stelle der Kugeloberfläche  $2/a$ . Daher ist  $\alpha_1$  in der Polkappe ( $\theta = 0$ ) gleich  $\alpha_2$  am Äquator des Vesikels ( $\theta = \pi/2$ ), oder  $\alpha(\theta) = \text{const.}$  und ebenso  $\Delta\rho/\rho_0(\theta) = \text{const.}$  (B) In einem zum Ellipsoid deformierten Vesikel für  $E > 0$  sind sowohl  $H$ ,  $\Delta\rho/\rho_0$  und daher auch  $\alpha$  eine Funktion des Winkels  $\theta$ . Somit:  $H(\theta=0) < H(\theta=\pi/2)$ ;  $H(\theta) \propto \Delta\rho/\rho_0(\theta) \propto \alpha(\theta)$  und  $\alpha_4(\theta=0) > \alpha_3(\theta=\pi/2) \approx \alpha_2(\theta=0) = \alpha_1(\theta=\pi/2)$ .  $c$ ,  $b$  Halbachsen;  $\theta$ , Polwinkel des Oberflächenvektors in Bezug zur Hauptachse (Feldvektor);  $\vec{E}$ , elektrischer Feldvektor.

Gl. (1.45) beschreibt die zeitliche Änderung des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\langle \alpha(t) \rangle$  während der fortschreitenden Elektrodeformation eines kugelförmigen Vesikels zu einem Ellipsoiden. Da  $H(\theta)$  gemäß Gl. (1.38) proportional zu  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  ist, kann die Änderung des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha$  als direkter Einfluss der Lipidpackungsdichte auf die Beweglichkeit des Sondenmoleküls gedeutet werden. Je geringer die Lipidpackungsdichte, desto größer wird das der Sonde für ihre rotatorische Bewegung zur Verfügung stehende Volumen in der Membran und umso größer wird der mittlere Sonden-Konuswinkel  $\alpha_E$  sein.

### 5.3.2 Datenbasis

#### *Die lineare Abhängigkeit $\alpha(H)$ bei konstantem Transmembranpotential*

Nach Abb. 28 zeigen die Endwerte ( $t_E = 9,86 \mu\text{s}$ ) der  $\alpha$ -Einfeld-Relaxationen an, dass der Sonden-Konuswinkel  $\alpha_E$  linear von der Vesikelkrümmung  $H$  abhängt. Während der mittlere Sonden-Konuswinkel  $\alpha_E$  sich für DiI<sub>C16</sub>(3) und Zeaxanthin für Krümmungen von  $0,0059 \leq H/\text{nm}^{-1} \leq 0,04$  um  $\Delta\alpha \approx 15^\circ/\text{deg}$  ändert, findet man für DPH in den gleichen Grenzen nur eine absolute Änderung von  $\Delta\alpha \approx 3^\circ/\text{deg}$ . Die in Abb. 28 gezeigte Abhängigkeit  $\alpha_E(H)$  enthält nur noch den Einfluss der Membrankrümmung  $H$  auf den Winkel  $\alpha_E$ , da die Vesikelgrößen und externen Feldstärken  $E$  so gewählt wurden, dass die nominale Transmembranspannung in den Polkappen der Vesikel  $\Delta\varphi = -1,5 \cdot E \cdot a = -0,3 \text{ V} = \text{const.}$  ist. Der von der MEP stammende Beitrag zur Winkeländerung ist für alle Vesikelgrößen (Krümmungen) konstant.

Eine Deformation des Ausmasses  $p$  führt nach Gl. (1.42) zu einer deutlichen Vergrößerung der Krümmung in den Polkappen eines Vesikel und damit auch zu einer Änderung der relativen Packungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0$  der Lipide in diesem Bereich (s. Gl. (1.39) und Abb. 23A+B). Für  $\theta = 0$  und  $\theta = \pi$  ändert sich  $\Delta\rho/\rho_0$  eines Vesikels mit einem initialen Radius von  $a = 38 \text{ nm}$  (VET<sub>100</sub>) für Deformationen von  $1 \leq p \leq 1,4$  im Bereich von  $0,26 \leq \Delta\rho/\rho_0 \leq 0,46$  ( $p = 1,4$  entspricht  $e = 0,7$ ) (s. Abb. 23A). Während  $\Delta\rho/\rho_0$  in den Polkappenbereichen des Vesikels für Deformationen von  $p > 1,05$  deutlich ansteigt, findet man im äquatorialen Bereich für  $\theta = \pi/2$  eine Verringerung von  $\Delta\rho/\rho_0 = 0,26$  ( $p = 1$ ) auf  $0,25$  ( $p = 1,4$ ). Die Effekte sind wegen  $\Delta\rho/\rho_0 \propto H_t = 1/R_m + 1/R_p$  umgekehrt proportional zur Summe der Radiusvektoren eines Ellipsoids.

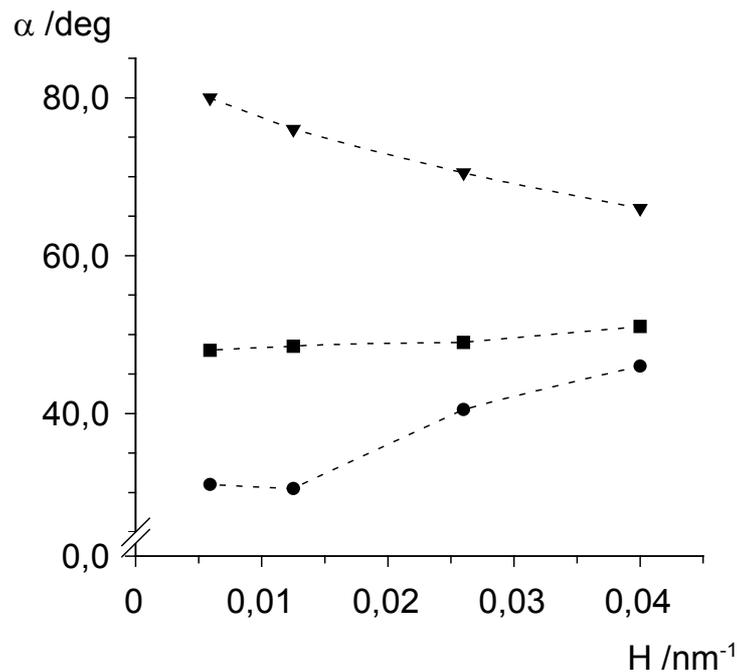


Abb. 28: Die Endwerte der Einfeld-Relaxation des mittleren Konuswinkels  $\alpha_E$  (/deg) der Membransonden DiIC<sub>16</sub>(3) ( $\blacktriangledown$ ), DPH ( $\blacksquare$ ) und Zeaxanthin ( $\bullet$ ) als Funktion der Vesikelmembrankrümmung  $H / \text{nm}^{-1}$  bei  $t_E = 9.86 \mu\text{s}$  und einer konstanten Transmembranspannung von  $\Delta\varphi_{\text{const}} = -0,3 \text{ V}$ . Initiale Krümmung (Vesikelradien):  $H / \text{nm}^{-1}$  ( $a / \text{nm}$ ) = 0,04 (25), 0,026 (38), 0,0125 (80), 0,0059 (170). Exp. Bed.:  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  (20 °C),  $\text{pH} = 6,5$ . Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  wird appliziert.  $[\text{DiIC}_{16}(3)] = 2.5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{DPH}] = 3.33 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Zeaxanthin}] = 5 \mu\text{M}$ .

Für eine gegebene Deformation  $p(t_E = 10\mu\text{s}) = 1,4$  findet man einen größeren Wert für  $\Delta\rho/\rho_0(\theta = 0)$ , je kleiner der initiale Radius  $a$  des Vesikels ist (vgl. Abb. 23B). Wenn Gl. (1.41) gilt und die Sonde mit dem Wert ihres Sonden-Konuswinkels für  $\alpha(\theta, p)$  den Gradienten der lokalen Packungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0(\theta)$  in der Membran proportional widerspiegelt, erwartet man bei kleinen Vesikeln unter den oben genannten Bedingungen eine deutlich größere, absolute Änderung für die langsame, ansteigende Mode von  $\alpha$ , als bei Vesikeln mit großen Radien (s. Abb. 29).

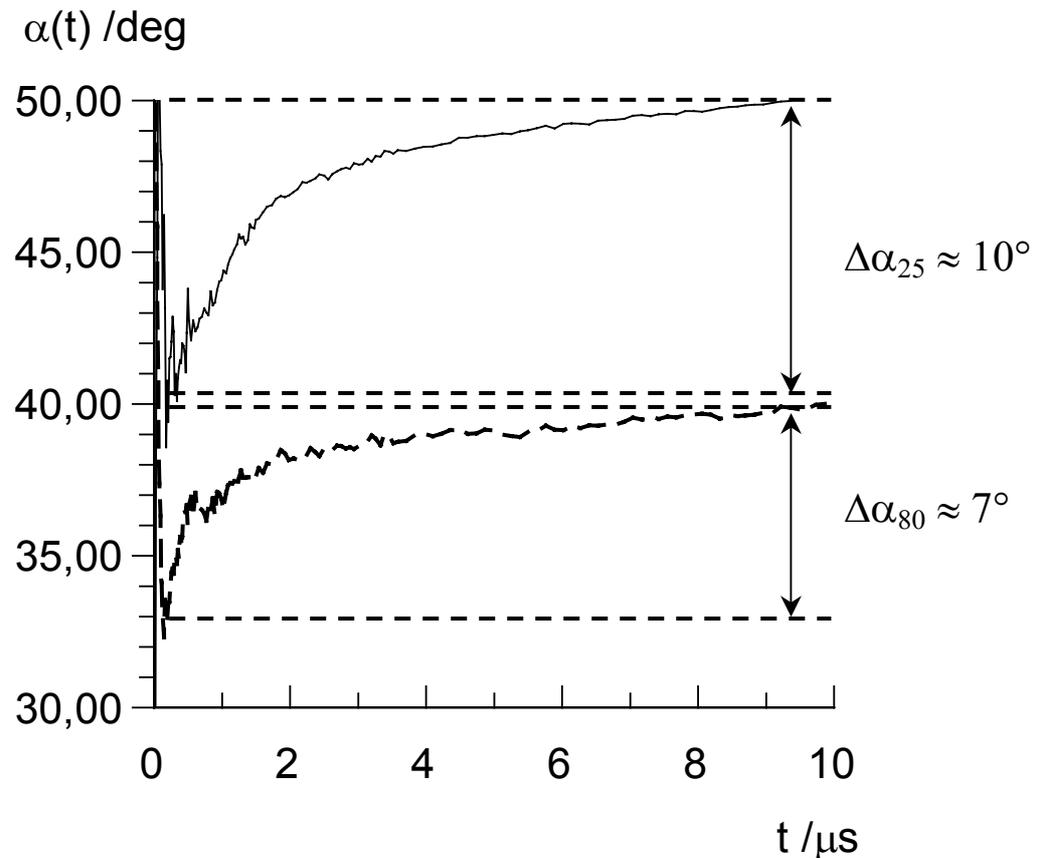
**"Anomalie" der  $\alpha$ -Relaxation bei Vesikeln mit großer Krümmung**

Abb. 29 Die Einfeld-Relaxation des mittleren Konuswinkels  $\alpha_E$  (/deg) der Membransonde  $\beta$ -DPH pPC als Funktion der Zeit für die beiden unterschiedlichen Vesikelgrößen  $a/\text{nm} = 25$  (durchgezogene Linie) und  $80$  (unterbrochene Linie) für die Feldstärken  $E/\text{MV m}^{-1} = 2/7$  und das gleiche Achsenverhältnis  $p(t_E=10\mu\text{s}) \approx 1,4$  am Ende des Feldpulses  
 Exp. Bed.:  $[\text{Av}20]_T = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Ein Rechteckfeldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  wird appliziert.  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5 \mu\text{M}$ .

Beim Vergleich der  $\alpha$ -Relaxationen von  $\text{VET}_{50}$  und  $\text{VET}_{200}$  (vgl. Abb. 29) beobachtet man für  $\text{VET}_{50}$  eine "Winkel-Anomalie", bei der trotz einer geringen externen Feldstärke  $E = 2 \text{ MV m}^{-1}$  eine unerwartet große Änderung für  $\alpha_E$  gefunden wird. Die Änderung für  $\alpha_E$  ist im Ausmaß mit der bei  $\text{VET}_{200}$  bei Feldstärken von  $E = 7 \text{ MV m}^{-1}$  vergleichbar. Bei gleichem Achsenverhältnis  $p(t_E=10\mu\text{s}) \approx 1,4$  am Ende des Feldpulses ist für den Vesikelradius  $a = 25 \text{ nm}$  ( $\text{VET}_{50}$ ) und eine Feldstärke von  $E = 2 \text{ MV m}^{-1}$   $\Delta\phi_{\text{mem}}(\text{VET}_{50}) = 1,5 \cdot E \cdot a \cdot \cos(\theta = 0 = \pi) = -0,075 \text{ V}$  und für  $a = 80 \text{ nm}$  ( $\text{VET}_{200}$ ) bei  $E = 7 \text{ MV m}^{-1}$  ist  $\Delta\phi_{\text{mem}}(\text{VET}_{200}) = -0,84 \text{ V}$  (vgl. Abb. 29). Damit ist die nominale Transmembranpotentialdifferenz für  $\text{VET}_{200}$  rund 11mal größer, die Änderung für  $\alpha_E$  zwischen dem Minimum und Maximum der  $\alpha$ -Relaxation beträgt aber nur  $\Delta\alpha(\text{VET}_{200}) \approx 7^\circ$ , während für  $\text{VET}_{50}$

$\Delta\alpha(\text{VET}_{50}) \approx 10^\circ$  ist. Für  $\Delta\phi_{\text{mem}}(\text{VET}_{50}) = -0,075 \text{ V}$  kann die Membran als vollständig nichtleitend betrachtet werden ( $\lambda_m \approx 0$ ). Außerdem ist das Ausmaß der Elektroporation und damit der Bruchteil  $f_p$  der Elektroporen am Gesamtoberflächenzuwachs  $\Delta S/S_0 = \Delta S_{\text{ss}}/S_0 + \Delta S_p/S_0$  vernachlässigbar klein (s. Abschnitt 4.2.2) (Kakorin et al., 1996a), (Tönsing, 1997). Dann ist  $\Delta S/S_0 \approx \Delta S_{\text{ss}}/S_0$ , d.h. nahezu die gesamte für die Deformation notwendige Zusatzoberfläche stammt aus dem Flächenreservoir der Dehnung und Ondulationsglättung. Da die Porenanzahl sehr klein und der mittlere Porenradius  $\bar{r}_p \approx 0,35 \text{ nm}$  von der Feldstärke unabhängig ist (Tönsing, 1997) und das Produkt  $\bar{r}_p^2 \cdot \alpha_{\text{mat}} \cdot \kappa$  in Gl. (1.26) konstant bleiben muß, sollte die Biegesteifigkeit  $\kappa < 2,95 \cdot 10^{-20} \text{ J}$  und daher  $\alpha_{\text{mat}} > 2,0$  sein, um bei  $H \geq 0,04$  und  $p(t_E=10\mu\text{s}) \approx 1,4$  eine ausreichende Biegung der Membran von  $\text{VET}_{50}$  zu ermöglichen (Abb. 29).

Für  $\Delta\phi_{\text{mem}}(\text{VET}_{200}) = -0,84 \text{ V}$  erwartet man hingegen eine Membranleitfähigkeit von  $\lambda_m \gg 0$  und damit sollte  $f_p \approx 0,2 \%$  sein. Der Großteil des Flächenzuwachses stammt bei der externen Feldstärke  $E = 7 \text{ MV m}^{-1}$  für  $\text{VET}_{200}$  aus der Dehnung und Ondulationsglättung, da der verstärkende Einfluss der Krümmung auf die Membranelektroporation hier nur noch eine geringe Wirkung zeigt ( $H = 0,0125$ ) (s. Abb. 19a und Gl. (1.26)). In Abb. 23B wird deutlich, dass der Unterschied in der Krümmung für ein deformiertes Vesikel mit  $a = 25 \text{ nm}$  für ein gegebenes Achsenverhältnis  $p$  (hier:  $p = 1,155$ ) im Vergleich zur ursprünglichen Kugelform wesentlich größer ist ( $\Delta(\Delta\rho/\rho_0) \approx 33 \%$ ), als für ein Vesikel mit einem Radius von  $a = 80 \text{ nm}$  ( $\Delta(\Delta\rho/\rho_0) \approx 23 \%$ ). Erwartungsgemäß nimmt die Differenz für  $\alpha_E$  zwischen dem Minimum und Maximum am Ende des Feldpulses der  $\alpha$ -Relaxation für  $\text{VET}_{50}$  für externe Feldstärken  $2 \leq E/\text{MV m}^{-1} \leq 8$  ab (s. Abb. 25A1), während man für Vesikel mit den Radien  $a = 38, 80, 170 \text{ nm}$  eine Zunahme der Differenz mit der Feldstärke beobachtet (s. Abb. 25A).

Gemäß Abb. 19a und Gl. (1.24) - (1.26) wird die Bildung von konischen Elektroporen in der Membran bei großen Krümmungen durch die Energiefreisetzung von  $\Delta_r G_{\text{ADE}} = 3,2 \text{ RT}$  pro Mol Elektropore stark begünstigt. Dies ist für  $\text{VET}_{50}$  für die Feldstärken  $5 \leq E/\text{MV m}^{-1} \leq 8$  der Fall (Abb. 25A1 + B1). Der große Gradient der Lipidpackungsdichte in deformierten  $\text{VET}_{50}$  kann aber durch die konischen Elektroporen verringert werden, wobei  $\Delta\rho/\rho_0$  sich gemäß des ADE-Modells ebenfalls verringert. Da gemäß Gl. (1.40) und (1.45)  $\Delta\rho/\rho_0$  proportional zu  $\alpha$  ist, erwartet man für  $\text{VET}_{50}$  eine Verringerung des Amplitudenwertes für  $\alpha(t_E)$  mit steigender Feldstärke. In der Konsequenz steht der Sonde dann aber ein vergleichsweise geringeres Membranvolumen zur Verfügung; die Beweglichkeit, also der mittlere Sonden-Konuswinkel, verringert sich. Die beschriebene Abhängigkeit wird so gefunden und ist in Abb. 25A1-C1 für die Sonden  $\beta$ -DPH pPC, Zeaxanthin und DPH dargestellt.

### ***Die Relaxation des mittleren Sonden-Konuswinkels $\alpha$***

Die Einfeld-Relaxation des mittleren Sondenkonuswinkels  $\alpha_E(t)$  ist in ihrer Kinetik im Bereich  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  praktisch für alle Membransonden gleich. Man findet zwei Moden (s. Abb. 24C): (i) Nach dem Einschalten des elektrischen Feldes zum Zeitpunkt  $t_E = 0$  verringert sich  $\alpha_E$  ausgehend von  $\alpha_0 = \alpha_E(t_E = 0 \mu\text{s})$  (für DiIC<sub>16</sub>(3): Zunahme) zunächst innerhalb der ersten 150 ns, also im Bereich der Polarisationszeit der Vesikelmembran, um bis zu 60% des ursprünglichen Wertes von  $\alpha_0$  (s. Abb. 30). Damit macht diese Phase den Hauptanteil der Änderung in der  $\alpha$ -Relaxation aus.

Von Interesse ist, dass diese sehr schnelle Phase in der  $\alpha$ -Ausfeld-Relaxation nicht gefunden wird (s. Abb. 24C). Der Anfangswert von  $\alpha_E(t_E = 0 \mu\text{s})$  ist im Mittel für *alle Sonden* und *Vesikelgrößen*  $\alpha_E(t_E = 0 \mu\text{s}) \approx 55^\circ$ .

Der schnellen negativen Einfeld-Phase folgt eine (ii) langsamere Zunahme (DiIC<sub>16</sub>(3): Abnahme) für  $\alpha_E$ , die für  $8 \geq E / \text{MV m}^{-1} \geq 2$  bereits nach  $t_E \approx 1 - 4 \mu\text{s}$  ca. 90% des stationären Endwertes von  $\alpha_E$  bei  $t_E = 10 \mu\text{s}$  erreicht hat. Für diesen Teil der Relaxation von  $\alpha_E$ , lassen sich zwei charakteristische Zeitkonstanten für den Feldstärkebereich  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  extrahieren: eine langsamere, im Bereich  $3 < \tau_{\text{slow}} / \mu\text{s} < 5$  und eine schnellere Phase  $0,3 < \tau_{\text{fast}} / \mu\text{s} < 1$ .

Die Sonde DiIC<sub>16</sub>(3) zeigt statt einer Verringerung eine Zunahme für  $\alpha_E$  mit gleicher Kinetik und gleichem prozentualen Zuwachs im Vergleich zu allen anderen Sonden. Das Verhalten von DiIC<sub>16</sub>(3) läßt sich über die relativ zu den anderen Sonden orthogonale Ausrichtung des Chromophors zur Membrannormalen deuten. Der Winkeländerung für DiIC<sub>16</sub>(3) liegen also letztlich die gleichen Gesetzmäßigkeiten wie bei den anderen Sonden zugrunde.

Höhere Feldstärken beschleunigen - wie erwartet - sowohl den schnellen, ersten Prozess (i), der  $\alpha_E$  verringert, als auch den langsameren, zweiten (ii), so dass der stationäre Werte von  $\alpha_E(t = 10 \mu\text{s})$  früher erreicht wird. Der Endwert der Einfeld-Relaxation  $\alpha_E(t = 10 \mu\text{s})$  ist mit Ausnahme von VET<sub>50</sub> nicht von der Feldstärke E abhängig (s. Abbildungen  $\alpha_E(E)$  im Anhang 7.10.3).

Im Ausfeld (s. Abb. 24A+B) erreicht  $\alpha_{\text{off}}$  bereits nach rund 50  $\mu\text{s}$  ca. 90 % des stationären Endwertes bei  $t_{\text{off}} = 500 \mu\text{s}$  (s. Abb. 24C). Das Fehlen der schnellsten Einfeld-Relaxationsphase zeigt an, dass das Vesikel unmittelbar nach der Abschaltung des Feldes noch deformiert bleibt und die Lipidmembran nicht onduliert, weil die laterale Spannung noch zu groß ist. Sowohl das Achsenverhältnis p, als auch die relative Oberflächenänderung  $\Delta S/S_0$  gelangen erst für Zeiten über  $t_{\text{off}} = 20 \mu\text{s}$  in die Nähe ihres stationären Wertes bei  $t_{\text{off}} = 400 \mu\text{s}$ .

Das Ausfeldsignal eignet sich für kleine Feldstärken zur Abschätzung von  $\alpha_0$  weitaus besser, da schon nach ca. 50  $\mu\text{s}$  rund 95 % des Endwertes für  $\alpha_{\text{off}}$  erreicht werden. Der Winkel  $\alpha_{\text{off}}$  ist bei Vesikeln mit  $a = 38 \text{ nm}$  (VET<sub>100</sub>) unabhängig vom Sondentypus und beträgt ca. 55 ( $\approx 54,7$ ) °. Diesen Wert findet man auch, wenn man die in Abb. 28 aufgetragenen  $\alpha$ -Winkel der Sonden Zeaxanthin, DPH und DiIC<sub>16</sub>(3) linear auf eine unendliche Krümmung extrapoliert. Alle Geraden schneiden sich bei dem Winkel  $\alpha \approx 55$  ( $\approx 54,7$ ) °. Das entspricht einer Krümmung  $H = 0,064$  bzw. einem Gradienten in der lokalen, relativen Lipidpackungsdichte von  $\Delta\rho/\rho_0 = 0,3$ . Anscheinend führt dieser durch die Vesikeldeformation erzeugte Unterschied in der relativen Lipidpackungsdichte dazu, dass die Sondenmoleküle keine Vorzugsrichtung mehr präferieren.

### 5.3.3 Datenanalyse

#### *Deutung der Ursache für die schnelle Änderung von $\alpha_E(t)$*

Als Ursache für die schnelle Änderung (s. Abb. 30) (i) von  $\alpha_E$  kommen zwei Prozesse in Betracht: (a) der schnelle Ausgleich der Membranondulationen, oder (b) die durch das elektrische Feld bewirkte direkte oder indirekte (über die Lipidmoleküle induzierte) Ausrichtung der Sondenmoleküle in Richtung der Flächennormalen.

Zu (a): Die Relaxationszeit der Vesikeldeformation für den Ausgleich der thermischen Ondulationen kann mittels Gl. (1.46) abgeschätzt werden (Neumann et al., 1998):

$$\tau \approx -\frac{5}{16} \frac{\eta a^3}{\kappa} \ln \left( 1 - \frac{64}{3} \frac{(p-1)\kappa}{\epsilon_0 \epsilon_w E^2 a^3} \right) \quad (1.46)$$

Für  $\eta = 10,02 \cdot 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ nm}$  und einen typischen Wert von  $\kappa = 2,5 \cdot 10^{-20} \text{ J}$  bei einer Deformation von  $p = 1,1$  erhält man  $0,8 \geq \tau_{\text{und}} / \mu\text{s} \geq 0,009$  für  $1 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$ . Obwohl die Zeitkonstante für die Membrandehnung ebenfalls sehr klein ist ( $\tau_{\text{str}} = 2,5 \cdot 10^{-10} \text{ s}$ , (Komura, 1996)), kann dieser Prozess die schnelle Abnahme von  $\alpha_E$  nicht erklären, weil die Glättung der thermischen Ondulation und die Dehnung der Membran konsekutive Prozesse sind. Die Dehnung läuft also erst nach dem Abschluss der Glättung thermischer Ondulationen ab.

Zur Veranschaulichung des Mechanismus, für eine sehr schnelle Verringerung von  $\alpha_E$ , soll ein Gedankenexperiment helfen: Gegeben sei eine einseitig an einer starren Wand befestigte, in der Fläche frei ondulierende Membran. Die durch die Ondulationen lokal auftretenden Krümmunterschiede ändern beständig den Gradienten der relativen Lipidpackungsdichte an jedem Ort der Membranoberfläche. Man erhält daher wegen Gl. (1.40) eine breite, ortsabhängige Verteilung für  $\Delta\rho/\rho_0$ , ebenso wie für den Sonden-Konuswinkel gemäß

$\alpha(\Delta\rho/\rho_0)$ . Läßt man nun an dem der starren Wand gegenüberliegenden freien Ende der Membran eine Kraft  $F_{\text{pull}}$  angreifen, die die Membran strafft und gerade so groß ist, dass die Ondulationen geglättet werden, resultiert hieraus sofort eine wesentlich engere Verteilung für den Sonden-Konuswinkel  $\alpha$ . Der Grund hierfür ist, dass die Krümmung  $H$  an jedem Ort der planaren Membran nun ortsunabhängig  $H = 0$  ( $a \rightarrow \infty$ ) ist, d.h. auch  $\Delta\rho/\rho_0$  nimmt lateral an jeder  $x,y$ -Koordinate den gleichen Wert an. Das Maximum dieser schmalen  $\alpha$ -Verteilung liegt bei einem kleineren Winkel, als dies bei der ondulierenden Membran der Fall ist. Da die Zusatzoberfläche aus der Ondulationsglättung maximal  $\Delta S/S_0 \approx 5\%$  sein kann, kann dieses Modell allein, nicht die große Winkeländerung für  $\alpha_E$  von rund  $\approx 60\%$  ( $\approx 20^\circ$ ) der schnellen Phase erklären.

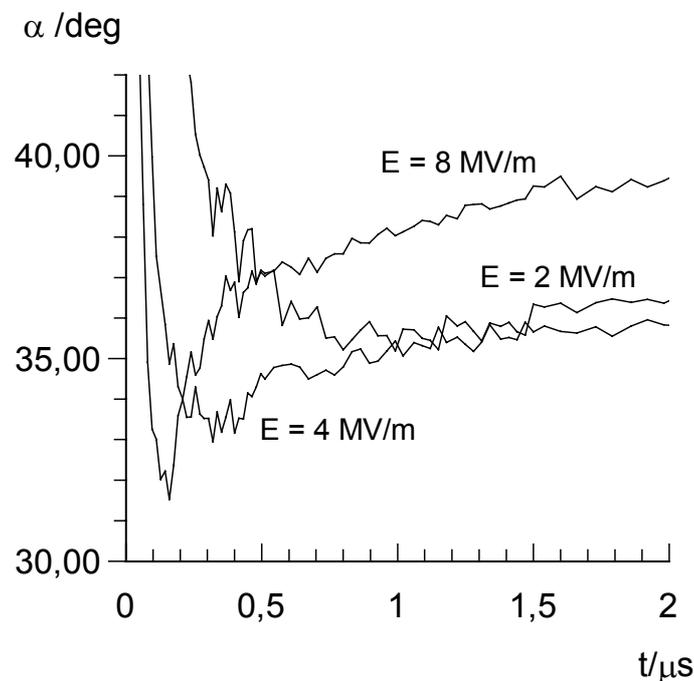


Abb. 30: Die ersten  $2 \mu\text{s}$  der schnellen Phase der Einfeld-Relaxation des mittleren Konuswinkels  $\alpha_E$ , berechnet aus dem Achsenverhältnis  $p$  und dem Absorptionsdichroismus  $\Delta A/A_0$  mittels Gl. (1.28), als Funktion der Zeit  $t$  in Rechteckfeldpulsen ( $t_E = 10 \mu\text{s}$ ) bei  $E = 2; 4$  und  $8 \text{ MV m}^{-1}$ . Exp. Bed.:  $a = 80 \text{ nm}$ ;  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ;  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ;  $T = 293 \text{ K}$  ( $20^\circ\text{C}$ );  $\text{pH} = 6,5$ ;  $[\beta\text{-DPH pPC}] = 5 \mu\text{M}$ .

Die von Helfrich und Klösgen (1992) vorgeschlagene Überstruktur stellt eine weitere Alternative zur Deutung der schnellen Änderung von  $\alpha$  dar. Die Überstruktur ist eine *versteckte* Membranoberfläche (Membranflächenreservoir), die bei mechanischer Beanspruchung einer Lipidmembran, z.B. bei Dehnung, sichtbar werden kann. Der durch die Überstruktur gespeicherte Flächenanteil ( $A_{\text{real}}/A_{\text{proj}} \approx 1,5$ ) ist deutlich größer als der durch Ondulationen verfügbare Anteil  $A_{\text{real}}/A_{\text{proj}} \approx 1,05$ . Hierbei ist  $A_{\text{real}}$  die ohne äussere

Einwirkung verfügbare reale Oberfläche und  $A_{\text{proj}}$  die Projektionsfläche, um die die Membran im Mittel onduliert. Bereits sehr kleine laterale Spannungen können den Ausgleich der versteckten Oberfläche herbeiführen, im Einklang mit der Beobachtung, dass selbst kleine Feldstärken die schnelle erste Phase für die Winkeländerung herbeiführen (s. Abb. 30). Die zum Ondulationsausgleich oder zum "Glattziehen" der Überstruktur notwendigen Energien liegen in der Größenordnung weniger  $kT$ , so dass auch kleine elektrische Felder den Prozess starten können (Jud, 1998). Sowohl für den Ondulationsausgleich als auch für das "Glattziehen" der Überstruktur gilt, dass der mittlere Sondenkonus-Winkel  $\alpha$  indirekt durch einen kooperativen Mitführungseffekt der Sonde durch die Lipidmatrix (gemäß dem oben beschriebenen Gedankenexperiment) verringert wird. Die mittels Gl. (A.5) aus dem Achsenverhältnis  $p$  berechneten Daten zur Oberflächenänderung zeigen, dass  $\Delta S/S_0$  maximal 6 % ( $VET_{100}$ ) ist. Dies ist rund 8mal weniger als für die Überstruktur erwartet wird ( $\Delta S/S_0 = 50\%$ ). Falls also eine Überstruktur für Avanti 20-Vesikel existiert, würde sie nur einen vergleichsweise geringen Oberflächzuwachs liefern.

Zu (b): Das elektrische Feld kann selbst auf die Sondenmoleküle wirken. Die Dipole der Lipidkopfgruppen und damit auch die Reorientierung der Chromophore in der hydrophoben Lipidmatrix diskutiert können im membraninternen elektrischen Feld, das im Bereich Bereich der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten sehr hohe Werte erreicht, ausgerichtet werden. Das Verhältnis des induzierten Transmembranfeldes  $E_m$  zum extern applizierten Feld  $E$  ist gegeben durch:

$$f(a) = \frac{|E_m|}{|E_{\text{ext}}|} = 1,5 \cdot \frac{a}{d} \quad , \quad (1.47)$$

wobei man  $f(a) = a/d$  der Feldverstärkungsfaktor ist. Das applizierte elektrische Feld  $E$  wird durch die ionische Grenzflächenpolarisation verstärkt (Neumann et al., 1989). Für  $VET_{100}$  ( $a = 38 \text{ nm}$ ,  $d = 5 \text{ nm}$ ) und externe Feldstärken von  $2 \leq E_{\text{ex}} / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  erreicht man Werte im Bereich  $22,8 \leq E_m / \text{MV m}^{-1} \leq 91,2$ . Diese extrem hohen membraninternen Feldstärken können zur Teilausrichtung der Dipole der Lipidkopfgruppen in Feldrichtung führen. Das verstärkt besonders im Bereich der Polkappen der Vesikel den Eintritt von Wasser und Ionen in die Oberflächen der Lipiddoppelschicht. Die Kopfgruppeneinstellung sollte z.B. für  $\beta$ -DPH pPC, TMA-DPH, PATMAN und Zeaxanthin zur direkten oder auch indirekten Ausrichtung (DPH) dieser stäbchenförmigen Sonden in Richtung der Membranflächennormalen führen, wobei  $\alpha_E$  kleiner wird.

Fraglich an dem Mechanismus der direkten Feldwirkung auf die Kopfgruppeneinstellung ist, warum die Sonde DiIC<sub>16</sub>(3) an der Grenzfläche Lipidmembran / Wasser die gleiche Kinetik zeigt, wie die übrigen Sonden innerhalb des hydrophoben Bereichs der Lipidmatrix. Zum

einen ist nicht klar, warum diese Sonde bei der Drehung von Lipidkopfgruppen den Winkel zur Membranflächennormalen vergrößert und nicht verringert. Da sie im Mittel orthogonal zu dieser Achse liegt, erwartet man eine Verringerung bei der Orientierung der Kopfgruppen von  $\alpha_E$ . Andererseits ist das elektrische Feld im wässrigen Medium direkt an der Grenzfläche kleiner, als im Membraninneren, da hier  $\epsilon_{\text{Lip}} \approx 2$  ist, während  $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} \approx 80$ , was einer Feldschwächung um den Faktor  $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} - \epsilon_{\text{Lip}} \approx 78$  entspricht. Dieser Unterschied in der wirksamen elektrischen Feldstärke sollte sich in der Kinetik der schnellen Phase von DiIC<sub>16</sub>(3) auswirken. Dies wird jedoch nicht beobachtet. Die Kinetik ist identisch mit der aller anderen Sonden. Auch das Modell der direkten Ausrichtung der Sonden kann die enorme Änderung für  $\alpha_E$  von rund 50% nur unzureichend erklären. Da die Ausrichtung der Kopfgruppen auch eine Drehung der Kohlenwasserstoffreste zur Folge hat, müsste bei alleiniger Wirkung dieses Effekts auch eine Verdünnung der Membran um bis zu 30 % erfolgen. Die relativen Dicken- und Oberflächenänderungen sind mit der Änderung des Winkels  $\alpha_E$  bei konstantem Membranvolumen über:

$$\frac{\Delta d}{d_0} = \frac{\Delta S}{S_0} = 1 - \frac{\cos(\alpha_E)}{\cos(\alpha)} \quad , \quad (1.48)$$

verknüpft, wobei  $d_0$ ,  $S_0$  und  $\alpha$  die Werte für die Dicke und Oberfläche der Membran und den mittleren Sonden-Konuswinkel  $\alpha$  ohne Feld sind. Eine Änderung von  $\alpha$  bedeutet in diesem Modell, dass Membrandicke und –oberfläche sich ebenfalls ändern.

Die initiale Änderung von  $\alpha_E$  in der schnellen Phase beträgt nahezu 60 % bezogen auf den Anfangswert von  $\alpha(t_E = 0\mu\text{s}) \approx 55^\circ$ , der aus der Ausfeldrelaxation von VET<sub>100</sub> abgeschätzt wird. Für VET<sub>200</sub> erreicht  $\alpha_E$  im Anfangsbereich der Relaxation für  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$  einen Wert von  $\alpha_E \approx 32^\circ$ , womit  $\Delta\alpha = \approx 23^\circ$  ist (s. Abb. 30). Dies würde wegen  $\Delta d_{\text{tot}}/d_0 = \Delta S_{\text{tot}}/S_0$  zu rund 58% Änderung in der Oberfläche führen, was rund 52% über dem gemessenen Wert liegt. Dieser große Gesamtoberflächenzuwachs würde zu einer extremen Vesikelelongation und zum Zerreißen der Membran führen. Bisher wurde für VET<sub>200</sub> in Sucrose eine Membran-Ausdünnung von  $\Delta d_{\text{tot}}/d_0 = 0,025$  (2,5%) beobachtet (Griese, 2001). In dieser Arbeit werden für VET<sub>100</sub> in wässriger  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$  maximal  $\Delta d_{\text{tot}}/d_0 = 6 \%$  gefunden. Daher kann das Ausmaß der schnellen Phase auch nicht allein mit der direkten Ausrichtung der Sonden durch das elektrische Feld erklärt werden. Wahrscheinlicher ist ein Zusammenspiel aus der Glättung der Ondulation, dem Flächenzuwachs aus der Überstruktur und der direkten, feldbedingten Ausrichtung der Sonden, wobei alle Prozesse ihren individuellen Beitrag zur Winkeländerung liefern.

### ***Deutung der Ursache für die langsame Änderung von $\alpha_E(t)$***

Das undulierende Vesikel wird nach dem Einschalten des elektrischen Feldes zunächst sehr schnell aufgeladen. Der Aufbau des Transmembranpotentials ist für Vesikelradien bis  $a = 200 \text{ nm}$ , Feldstärken von  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  und Fremdsalzkonzentrationen von  $[\text{NaCl}]_{\text{in=out}} = 0,2 \text{ mM}$  in weniger als 200 ns abgeschlossen (Schwan, 1957).

Konvolutiert mit der Aufladung beginnt der Prozess des Ausgleichs der Ondulationen, gefolgt von der Dehnung der Membran. Der langsamste Prozess, der ratenlimitierend für die Zunahme der Vesikeloberfläche ist, ist die Membranelektroporation (Neumann et al., 1998). Die Bildung konischer Elektroporen verringert die relative Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0$ .

An die sehr schnelle negative Phase (für  $\text{DiIC}_{16}(3)$ : positives Vorzeichen) der Änderung für  $\alpha_E$  schliesst sich ein langsame Winkeländerung mit positivem Vorzeichen (für  $\text{DiIC}_{16}(3)$ : negatives Vorzeichen) an. Wie in Abb. 16a+b gezeigt, teilt sich der Gesamtoberflächenzuwachs von  $\Delta S/S_0$  auf zwei Prozesse auf: Als Oberflächenquelle ist die Glättung der Ondulationen und die Dehnung der Membran  $\Delta S_{ss}/S_0$  der schnellere Prozess, verzögert gefolgt von der langsameren Bildung der Elektroporen, angezeigt durch  $\Delta S_p/S_0$ . Eine analoge Darstellung dieses Zusammenhangs, aber korreliert mit der Änderung  $p(t)$  sowie  $\alpha_E(t)$ , findet man auch in Abb. 24A-C. In Abb. 24B erkennt man eine leicht sigmoide Anlaufphase für  $\Delta S/S_0$ , dann folgt ein steile, gefolgt von einem langsameren Zunahme  $\Delta S/S_0$ . Beide Signalkomponenten werden direkt in der Relaxation von  $\alpha_E(t)$  reflektiert (Abb. 24C). Zunächst erfährt das ursprünglich kugelförmige Vesikel durch die Kompression der Membran eine Oberflächenzunahme und damit eine Deformation in Feldrichtung. Die charakteristischen Zeiten für  $\Delta S_{ss}/S_0$  sind sehr klein ( $\tau < 1 \mu\text{s}$ ) und in der Größe vergleichbar mit denen der hier für die Änderung von  $\alpha_E(t)$  zugeordneten Phase. Die Abb. 25A zeigt, dass die Phase von  $\alpha_E(t)$  mit positivem Vorzeichen mit zunehmender Feldstärke im Bereich von  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  immer schneller ansteigt, der Endwert für  $\alpha_E(t=10\mu\text{s})$  sich aber nur geringfügig ändert. Im Rahmen des in Abschnitt 5.2 entworfenen Modells läßt sich dies so deuten, dass es sich bei der Änderung von  $\alpha_E(t)$  im Feldstärkebereich von  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 4$  im wesentlichen um den Beitrag handelt, der durch die Zunahme der Membrankrümmung  $H_t(\theta)$  bei der Deformation des Vesikels zum Ellipsoiden auftritt. Die Transmembranspannung ist in diesem Bereich lediglich  $0,11 \leq \Delta\phi / V \leq 0,23$  und damit für ein großes Ausmaß an Elektroporenbildung zu klein. Da im Ellipsoid die Krümmung  $H$  und  $\Delta\rho/\rho_0$  von  $\theta$  abhängen, sollte die wesentliche Änderung von  $\alpha$  in den Polkappenbereichen des deformierten Vesikels stattfinden, wo  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$  maximal ist. Mit zunehmender Feldstärke steigt auch die Transmembranspannung weiter an, der Oberflächenbruchteil  $f_p$  durch konische Elektroporen nimmt zu. Dies führt gemäß dem ADE-Modell vor allem in den Polkappen zur Verringerung von  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$ . Der Gradient der relativen Lipidpackungsdichte nimmt auch bei höheren

Feldstärken nicht weiter zu und geht durch die Neubildung von konischen Poren in eine Sättigung. Aus diesem Grund weisen die Endwerte von  $\alpha_E(t=10\mu\text{s})$  für alle Feldstärken eine nahezu gleichen Wert auf. Die rotatorische Beweglichkeit der Sonde erfährt eine zunehmende Einschränkung.

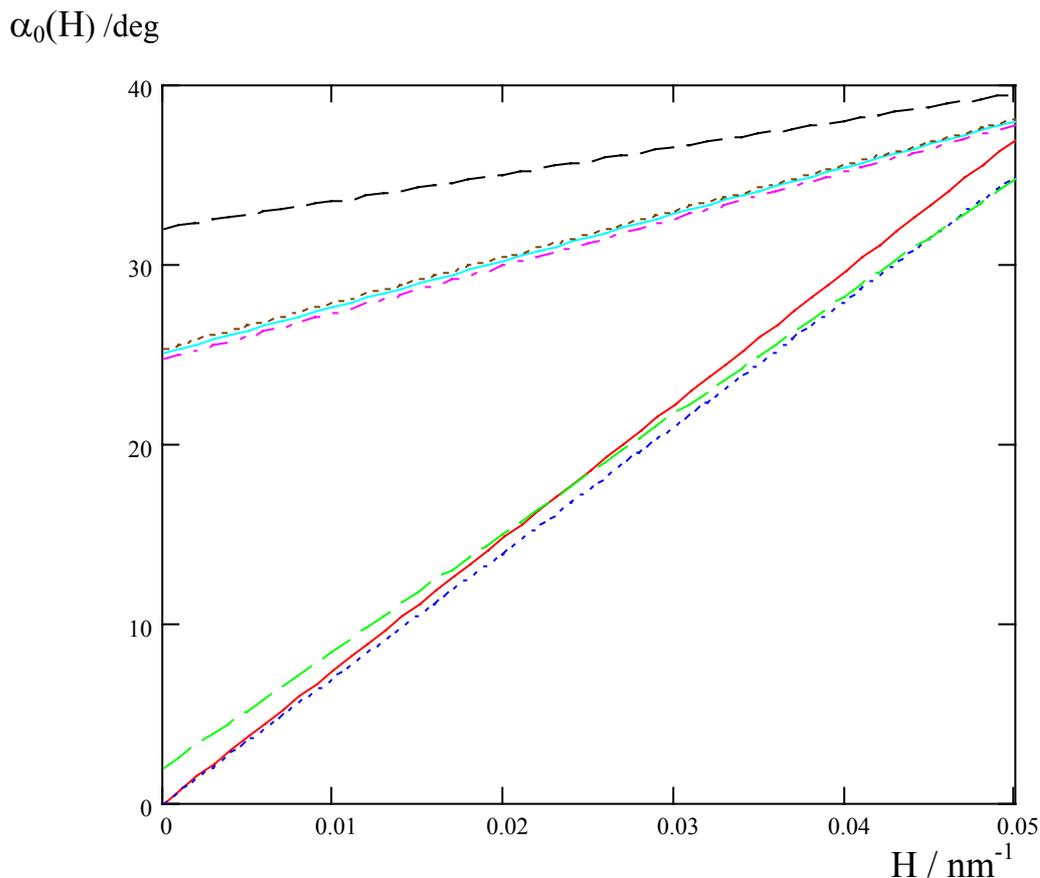


Abb. 31: Die für die Membransonde Zeaxanthin aus der Anpassung von  $\alpha_E(t)$  mit Gl. (1.45) erhaltene lineare Abhängigkeit des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_0 = c + bH$  von der Membrankrümmung  $H$  für die Feldstärken  $E / \text{MV m}^{-1} = 2 - 8$  (rot, grün, blau, magenta, cyan, braun, schwarz). Exp. Bed.: Vesikelradius  $a = 38 \text{ nm}$ ;  $[\text{Av20}]_T = 1,0 \text{ mM}$ ;  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ;  $T = 293 \text{ K}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ );  $\text{pH} = 6,5$ ;  $[\text{Zeaxanthin}] = 5 \mu\text{M}$ .

Bei geringen Feldstärken findet also hauptsächlich eine rein mechanische Verformung der Vesikelmembran statt. Die Sonde erhält durch die Änderung der Lipidpackungsdichte mehr Spielraum, der Sonden-Konuswinkel  $\alpha_E$  nimmt daher zu. Bei größeren Feldern wird die mechanische Verformung der Membran durch die Elektroporenbildung ergänzt. Das von den konischen Poren zusätzlich in der Membran beanspruchte Volumen steht den Sonden nicht

mehr zur Verfügung. Da aufgrund der Zunahme des Feldes weiter deformiert wird, nimmt  $\alpha_E(t)$  aber nicht ab, sondern geht im zeitlichen Verlauf in die Sättigung (s. Abb. 25A;  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$ ). Interessant ist, dass offenbar schon geringe Feldstärken von  $E = 2 \text{ MV m}^{-1}$  die gleiche Winkeländerung, wie große Feldstärken herbeiführen, dies aber mit einer langsameren Kinetik. Der Grund hierfür ist die extrem geringe Biegesteifigkeit der Lipidmembranen.

Wie bereits diskutiert, erkennt man für  $\text{VET}_{50}$  ( $a = 25 \text{ nm}$ ) (Abb. 25A1), dass das Ausmaß der Änderung von  $\alpha_E(E = 2 \text{ MV m}^{-1})$  bezogen auf das Minimum und Maximum der betrachteten Phase um den Faktor zwei größer ist als für  $\alpha_E(E = 8 \text{ MV m}^{-1})$ .  $\text{VET}_{50}$  weisen initial bereits aufgrund einer großen Krümmung  $H$  einen großen Gradienten in der Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$  auf (Abb. 23B). Bei kleinen Feldstärken  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 3$  liegt wegen  $a = 25 \text{ nm}$  nur eine sehr geringe Transmembranspannung von  $0,075 \leq \Delta\varphi / V \leq 0,11$  an. Diese Werte sind für ein großes Ausmaß an Elektroporenbildung wesentlich zu klein. Wegen der starken Krümmung von  $\text{VET}_{50}$  ist auch  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi) = 0,2$  ( $p = 1$ ) groß. Das wird bereits durch die initial wesentlich größeren Werte für  $\alpha_E$  deutlich. Denn für  $\text{VET}_{50}$  verschieben sich alle  $\alpha$ -Relaxationen leicht zu größeren Winkeln (vgl. Abb. 25A-C/A1-C1). Diese rotatorische Freiheit der Sonde nimmt bei großem  $\Delta\rho/\rho_0$  zu. Folglich führt die bei  $E = 2, 3 \text{ MV m}^{-1}$  feldgetriebene, mechanische Deformation der Vesikelmembran zur Vergrößerung von  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$ . Wegen der sehr geringen Transmembranspannung  $\Delta\varphi < 0,11 \text{ V}$  ergibt das einen nur kleinen Anteil an Elektroporen. Daher findet man für die kleinste Feldstärke die größte Änderung für den Winkel  $\alpha_E(t)$ . Die Sonde kann das bei der Zunahme von  $\Delta\rho/\rho_0$  neu hinzukommende freie Membranvolumen vollständig nutzen. Nimmt die Feldstärke zu, nimmt auch  $\Delta\varphi$  zu und es entstehen ab ca.  $E = 5 \text{ MV m}^{-1}$  ausreichend viele wassergefüllte Elektroporen, die den Gradienten der Lipidpackungsdichte  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$  verkleinern. Trotz zunehmender Feldstärke findet man nun eine Verringerung im Ausmaß von  $\alpha_E(t)$ , wobei aber die Kinetik erwartungsgemäß schneller wird.  $\alpha_E(t)$  erreicht für  $5 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  innerhalb von  $2 \mu\text{s}$  den Endwert von  $\alpha_E(t=10\mu\text{s})$ , während der Endwert von  $\alpha_E$  für  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 3$  nicht innerhalb von  $t_E=10\mu\text{s}$  erreicht wird (vgl. Abb. 25A1-B1 und Abb. 24C).

Bei einer ausreichend großen Transmembranspannung ( $\Delta\varphi > 0,19 \text{ V}$ ) wird die Bildung von Elektroporen aufgrund der großen Membrankrümmung stark favorisiert. Dies kann aus dem Oberflächenzuwachs mit dem Modell der ADE ermittelt werden, zum anderen liefert die Zeitabhängigkeit des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E(t)$  mit dem Modell der  $\theta$ -Winkelabhängigkeit von  $\Delta\rho/\rho_0$  äquivalente Informationen. In Abb. 28 ist der Einfluss der Krümmung auf den Endwert mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E(t=10\mu\text{s})$  gezeigt. Der Anteil der Elektroporation ist für alle Vesikelradien  $a$  (Krümmungen) konstant, da die Daten für die konstante Transmembranspannung von  $\Delta\varphi_{\text{const}} = -0,3 \text{ V}$  aufgetragen wurden. Die Zunahme

von  $\alpha_E(t=10\mu s)$  mit der Initialkrümmung der Vesikel kann nun konsistent mit dem alleinigen Einfluss der Zunahme des Lipiddichtegradienten  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$  erklärt werden. Nimmt  $\Delta\rho/\rho_0(\theta=0=\pi)$  zu, besetzen die Lipid- und auch die Sondenmoleküle das in der äußeren Monoschicht hinzugekommene, freie Membranvolumen. Die Zunahme in der Rotationsfreiheit der Sonden ist durch eine Vergrößerung von  $\alpha_E(t=10\mu s)$  sichtbar.

Die strukturellen Unterschiede und die verschiedenen Bindungsorte der membrangebundenen Sonden bedingen Unterschiede in den  $\alpha_E$ -Relaxationen. Wie bereits erwähnt, versteift das transmembrane Zeaxanthin die Lipidvesikelmembran, wahrscheinlich aufgrund der lokalen Kopplung beider Lipidmonoschichten (s. Abb. 25B), so dass die bei der Deformation notwendige Verschiebbarkeit der Monoschichten gegeneinander verringert wird. Abb. 25B verdeutlicht, dass zwar bei kleinen Feldstärken  $2 \leq E / MV m^{-1} \leq 3$  eine  $\alpha_E$ -Relaxation mit geringem Ausmaß existiert, diese aber mit zunehmender Feldstärke ihre Amplitude verringert. Diese Beobachtung lässt sich mit einer Verringerung der Deformation mit steigender Feldstärke deuten, wobei viskoelastische Effekte eine Rolle spielen. Offenbar gilt dies jedoch nur für Vesikelradien  $a > 25$  nm, da der Effekt für VET<sub>50</sub> nicht zu erkennen ist. Dies hängt eventuell mit der initial schon wesentlich geringeren Lipidpackungsdichte in VET<sub>50</sub> zusammen, die von vornherein eine höhere Beweglichkeit der Sonden zulässt. Die  $\alpha_E$ -Relaxation in (s. Abb. 25B1) zeigt, dass die für VET<sub>100</sub> sichtbaren Einschränkungen hier nicht gelten.

Als anderes Extrem ist die Sonde DPH aufzufassen (Abb. 25C/C1). Im Vergleich mit allen anderen Sonden zeigt sie für alle Vesikelgrößen die geringste Änderung in der zweiten, positiven Phase der  $\alpha_E$ -Relaxation. Es fällt ausserdem auf, dass die Relaxationen von  $\alpha_E$  durchgängig höhere Endwerte zeigen als die anderen Sonden (s. Abschnitt 7.10.3), konsistent mit einer geringeren Sonden-Ausrichtung. Da DPH die gleiche Lipidpackungsdichte wahrnimmt wie die anderen Sondenmoleküle, aber deutlich kleinere Amplituden in der  $\alpha_E$ -Relaxation hat, müssen die strukturellen Unterschiede der Sondenmoleküle und ihre Bindungsorte in und an der Membran als Ursache für die Beobachtung diskutiert werden. DPH ist im hydrophoben Bereich der Membran gelöst und erhält daher lediglich durch die Ausrichtung der Kohlenwasserstoffreste der Lipidmoleküle eine gewisse Vorzugsrichtung. Verschiedene Studien zur Orientierung von DPH in Lipidmembranen deuten auch darauf hin, dass zwei Population von DPH-Molekülen mit unterschiedlicher Ausrichtung der Molekülhauptachse in der Lipidmembran existieren; eine Form mit orthogonaler, die andere mit paralleler Orientierung zur Membrannormalen (van der Heide et al., 1996), (Lentz, 1993). Da jede Population vermutlich individuell auf die Änderung von Lipidpackungsdichten reagieren kann, mitteln sich die bei den anderen Sonden zu beobachtenden Effekte im Fall von DPH heraus.

### ***Einfluss der membrangebundenen Sondenkonzentration***

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 diskutiert, ist eines der Ziele die Klassifikation der Sonden und andererseits die Identifikation der Sondentypen, die sich für den weiteren Einsatz in der Feldsprung-Relaxationspektrometrie eignen.

Die Analyse der Ergebnisse zur Abhängigkeit der Endwerte der Minusmode der Absorption und der Turbidität,  $\Delta A^-/A_0$  und  $\Delta T^-/T_0$ , aus Abschnitt 3.2.2 (Abb. 12A-D) zeigen, dass sich die Sonden im Hinblick auf die *Beeinflussung der Membran* in drei Gruppen einteilen lassen: (I) DiIC<sub>16</sub>(3); (II) PATMAN und Zeaxanthin; (III)  $\beta$ -DPH pPC, DPH und TMA-DPH werden nicht diskutiert.

zu (I): In Abb. 2B und Abb. 12A wird deutlich, dass DiIC<sub>16</sub>(3) offenbar im untersuchten Konzentrationsbereich  $1,25 \leq [\text{DiIC}_{16}(3)] / \text{mol L}^{-1} \leq 20$  keinen Einfluß auf die optischen, wie auch auf die mechanischen und elektrischen Eigenschaften der Lipidmembran haben. Die Kinetik der Turbiditätsänderung ist im Rahmen der Messgenauigkeit für alle Farbstoffkonzentrationen mit der eines unmarkierten Vesikels vergleichbar. Die Störung der Membranstruktur durch DiIC<sub>16</sub>(3) bleibt demnach im Vergleich zu den anderen Farbstoffen extrem gering. Die Ursache hierfür ist, dass der Chromophor lediglich membranaufgelagert ist und die Bindung letztlich, in einer hydrophoben Wechselwirkung, über C<sub>16</sub>-Ketten hergestellt wird.

zu (II): Der Betrag der Endwerte von  $\Delta A^-/A_0$  in Abb. 12B+D nimmt mit [Zeaxanthin] und [PATMAN] zu, während sich  $\Delta T^-/T_0$  im gleichen Konzentrationsbereich verringert. Wie bereits diskutiert, sind PATMAN und Zeaxanthin beide membranintegrale Sonden. PATMAN ist, ähnlich wie auch TMA-DPH oder Dodecylsulfat, aufgrund seiner molekularen Struktur ein detergenz-ähnliches Molekül. Daher ist eine konzentrationsabhängige Änderung der Membraneigenschaften zu erwarten. Für Zeaxanthin tritt offenbar schon bei sehr geringen Konzentrationen die membranversteifende Wirkung auf (Abb. 12B) ([Zeaxanthin] = 1,25  $\mu\text{M}$ ). Oberhalb dieser Konzentration nimmt der Endwert von  $\Delta A^-/A_0$  nur noch wenig zu,  $\Delta T^-/T_0$  zeigt aber eine deutliche Verringerung. Da  $\Delta T^-/T_0$  proportional zu  $p$  ist, nimmt die Deformation des Vesikels mit steigender [Zeaxanthin] ab, das gleiche Verhalten findet man für PATMAN. Da der Betrag von  $\Delta A^-/A_0$  zunimmt, der von  $\Delta T^-/T_0$  aber geringer wird, kann dieses Verhalten nur durch die Membranversteifung bei gleichzeitiger Orientierung der Sondenchromophore ( $|\alpha|$  wird geringer) in Richtung der Membranflächennormalen erklärt werden.

zu (III) Für das Lipidgemisch POPC/PS findet (Tönsing, 1997) in Abhängigkeit von [ $\beta$ -DPH pPC] eine Zunahme für  $\Delta A^-/A_0$  von  $\beta$ -DPH pPC. Für  $\Delta T^-/T_0$  wurde keine Abhängigkeit von [ $\beta$ -DPH pPC] gefunden.

In dieser Arbeit wird für den gleichen Konzentrationsbereich für das Lipid Av20 eine Verringerung von  $\Delta A/A_0$  und  $\Delta T/T_0$  gemessen (Abb. 12C). Mit zunehmender Konzentration versteift  $\beta$ -DPH pPC die Av20-Membran. Die Abnahme von  $\Delta T/T_0$ , zeigt indirekt das verringerte Ausmaß der Deformation an. Die gleichzeitige Verringerung von  $\Delta A/A_0$  bei Zunahme von  $\Delta T/T_0$  bedeutet, dass der Ordnungsgrad der Membran mit der Zunahme von  $[\beta\text{-DPH pPC}]$  abnimmt. Dies führt dazu, dass der DPH-Chromophor seinen mittleren Winkel  $\alpha$  in Bezug zur Membranflächennormalen vergrößert. Trotzdem sich die Biegesteifigkeit der Membran erhöht, kann sich  $\Delta A/A_0$  hierbei verringern.

Zusammenfassend, DiIC<sub>16</sub>(3) ist ideal als inertes Sondenmolekül für den Einsatz in elektro-optischen Feldsprungmessungen geeignet. DiIC<sub>16</sub>(3) beeinflusst die Eigenschaften der Membran nicht, weist einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten auf und absorbiert im langwelligen Spektralbereich. Durch seine exponierte Bindungsposition ist es potentiell in der Lage, die Bindung von Makromolekülen an die Membran direkt über Positions- oder Mobilitätsänderungen des Chromophors anzuzeigen. Diese Eigenschaft sollte sich auch in der Kinetik des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E(t)$  für DiIC<sub>16</sub>(3) widerspiegeln.

Zeaxanthin ist auch als Sondenmolekül für Membrankrümmungen geeignet. Aufgrund des membranversteifenden Effekts erfüllt Zeaxanthin allerdings nicht die Inert-Anforderungen an eine Sonde. PATMAN zeigt Unterschiede in der Membrankrümmung nicht so deutlich an, weil die Sonde nur eine Monoschicht durchspannt.

$\beta$ -DPH pPC versteift die Av20-Membran im gleichen Ausmaß wie Zeaxanthin und PATMAN, zeigt dies aber nicht direkt über die Absorptionsänderung an.  $\beta$ -DPH pPC eignet sich sehr gut als Sonde für elektro-optische Untersuchungen von Lipidvesikeln, da der Chromophor empfindlich auf die Änderung von Lipidpackungsdichten und Lösungsumgebungen durch Positionsänderung oder spektrale Verschiebung der Absorptionsbanden reagieren kann. Von Nachteil für PATMAN, TMA-DPH, DPH wie auch  $\beta$ -DPH pPC ist, dass die Absorptionsbanden bei kurzen Wellenlängen ( $\lambda = 365$  nm) liegen. Hier besteht die Gefahr, bei längerer Belichtungsdauer die Sonden und/oder die Proben photolytisch zu zerstören.

Kurz, durch Kombination geeigneter Sondenmoleküle ist es möglich, selektiv Informationen über die unterschiedlichen Eigenschaften der Bereiche einer Lipidmembran im elektro-optischen Feldsprungexperiment zu erhalten.

## 6 Literatur

- Axelrod, D. 1979. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.* 26:557-574.
- Brinkmann, U. Die Wirkung von Cholesterol und Dodecylsulfat auf die elektroporative Deformation und Solubilisierung von Doppelschicht-Vesikeln. 1998. Thesis/Dissertation, Universität Bielefeld.
- Chernomordik, I.V., S.I.Sukharev, S.V.Popov, V.Pastuchenko, A.Sokirko, I.G.Abidor, and Y.A.Chizmadzhev. 1987. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim. Biophys. Acta* 902:360-373.
- Cherry, R.J. and D.Chapman. 1969. Optical Properties of Black Lecithin Films. *J. Mol. Biol.* 40:19-32.
- Chong, C.S. and K.Colbow. 1976. Light Scattering and Turbidity Measurements on Lipid Vesicles. *BBA* 436:260-282.
- Correa, N.M. and Z.A.Schelly. 1998. Dynamics of Electroporation of synthetic liposomes studied using a pore-mediated reaction,  $Ag^+ + Br^- = AgBr$ . *J. Phys. Chem. B* 102:9319-9322.
- Cranney, M., R.B.Cundall, G.R.Jones, J.T.Richards, and E.W.Thomas. 1983. Fluorescence lifetime and quenching studies on some interesting diphenylhexatriene membrane probes. *BBA* 735:418-425.
- Engel, L.W. and F.G.Prendergast. 1981. Values for and significance of order parameters and "Cone Angles" of fluorophore rotation in lipid bilayers. *B* 20:7338-7345.
- Evans, E. 1974. Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys. J.* 14:923-931.
- Farafonov, V.G., N.V.Voshchinnikov, and V.V.Somsikov. 1996. Light-Scattering by a Core-Mantle Spheroidal Particle. *Applied Optics* 35:5412-5426.
- Fluhler, E., V.G.Burnham, and L.M.Loew. 1985. Spectra, Membrane Binding, and Potentiometric Responses of New Charge Shift Probes. *B* 24:5749-5755.

- Foster, K.R. and A.E. Sowers. 1995. Dielectrophoretic forces and potentials induced on pairs of cells in electric field. *Biophys. J.* 69:777-784.
- Gabrielska, J. and W.I. Gruszecki. 1996. Zeaxanthin (dihydroxy- $\beta$ -carotene) but not  $\beta$ -carotene rigidifies lipid membranes: a H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *BBA* 1285:167-174.
- Glaser, R., S.L. Leikin, I.V. Chernomordik, V. Pastuchenko, and A. Sokirko. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta* 940:275-287.
- Goetz, R., G. Compper, and R. Lipowsky. 1999. Mobility and elasticity of self-assembled membranes. *Phys. Rev. Lett.* 82:221-224.
- Griese, T. Elektrooptische und Konduktometrische Relaxationsspektrometrie: Deformation und Elektroporation von salzgefüllten Lipid-Vesikeln in äußeren elektrischen Feldern. 2001. Thesis/Dissertation, Universität Bielefeld.
- Helfrich, W. 1974. Deformation of lipid bilayer spheres by electric fields. *Z. Naturforsch.* 29:182-183.
- Helfrich, W. and B. Klösgen. 1992. Some complexities of simple lipid membranes. *Surfaces and Membranes* 211-220.
- Helfrich, W. and R.-M. Servuss. 1984. Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Nuovo Cimento* 3 D:137-151.
- Jud, A. Monte-Carlo-Simulation einer Überstruktur auf Lipidmembranen. 1998. Thesis/Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Kaiser, R.D. and E. London. 1998. Location of Diphenylhexatriene (DPH) and its Derivates within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth. *B* 37:8180-8190.
- Kakorin, S. and E. Neumann. 1996. Chemical electrooptics and linear dichroism of polyelectrolytes and colloids. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 100:721-722.

- Kakorin,S. and E.Neumann. 1998. Kinetics of Electroporative Deformation of Lipid Vesicles and Biological Cells in an Electric Field. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 102:1-6.
- Kakorin,S., E.Redeker, and E.Neumann. 1998. Electroporative deformation of salt filled lipid vesicle. *Eur. Biophys. J.* 27:43-53.
- Kakorin,S., S.P.Stoylov, and E.Neumann. 1996a. Electro-optics of membrane electroporation in diphenylhexatriene-doped lipid bilayer vesicles. *Biophysical Chemistry* 58:109-116.
- Kinosita,K., Jr., S.Kawato, and A.Ikegami. 1977. A theory of fluorescence polarization decay in membranes. *Biophys. J.* 20:289-305.
- Klösgen,B. and W.Helfrich. 1993. Special features of phosphatidylcholine vesicles as seen in cryo-transmission electron microscopy. *Eur. Biophys. J.* 22:329-340.
- Komura,S. 1996. Shape fluctuations of vesicles. *In Vesicles.* M.Rosoff, editor. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong. 197-236.
- Kummrow,M. and W.Helfrich. 1991. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A* 44:8356-8360.
- Lakowicz,J.R. 1983. Effects of Solvents on Fluorescence Emission Spectra. *In Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Plenum Press, New York. 187-215.
- Lakowicz,J.R., D.R.Bevan, and B.P.Maliwal. 1983. Synthesis an Characterization of a Fluorescence Probe for Phase Transition an Dynamic Properties of Membranes. *B* 22:5714-5722.
- Lazrak,T., A.Milon, G.Wolff, A.-M.Albrecht, M.Miehe, G.Ourisson, and Y.Nakatani. 1987. Comparison of the effects of inserted C40- and C50- terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *BBA* 903:132-141.
- Lentz,B.R. 1989. Membrane "fluidity" as detected by diphenylhexatriene probes. *Chemistry and Physics of Lipids* 50:171-190.
- Lentz,B.R. 1993. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 64:99-116.
- Loew,L.M. 1988. Probing the Lateral Organization and Dynamics of Membranes. *In Spectroscopic Membrane Probes.* Wolf DE, 193-220.

- Loew, L.M. and L.L.Simpson. 1981. Charge-shift probes of membrane potential. A probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophys. J.* 34:353-365.
- Lopez Cascales, J.J., M.L.Huertas, and J.Garcia de la Torre. 1997. Molecular dynamics simulation of a dye molecule in the interior of a bilayer: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophysical Chemistry* 69:1-8.
- MacDonald, R.C., R.I.MacDonald, B.P.M.Menco, K.Takeshita, N.K.Subbarao, and L.Hu. 1991. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061:297-303.
- Mayer, L.D., M.J.Hope, and P.R.Cullis. 1986. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* 858:161-168.
- Milon, A., T.Lazrak, A.-M.Albrecht, G.Wolff, G.Weill, G.Ourisson, and Y.Nakatani. 1986. Osmotic swelling of unilamellar vesicles by the stopped-flow light scattering method. Influence of vesicle size, solute, temperature, cholesterol and three  $\alpha,\omega$ -dihydroxycarotenoids. *BBA* 859:1-9.
- Muller, J.M., E.E.van Faassen, and G.van Ginkel. 1994. The interpretation of the time-resolved fluorescence anisotropy of diphenylhexatriene-phosphatidylcholine using the compound motion model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201:709-715.
- Neumann, E. 1992. Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 28:247-267.
- Neumann, E. and S.Kakorin. 1996. Electrooptics of membrane electroporation and vesicle shape deformation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1:790-799.
- Neumann, E. and S.Kakorin. 1999. Electroporation of curved lipid membranes in ionic strength gradients. *Biophysical Chemistry* 85:249-271.
- Neumann, E., S.Kakorin, and K.Tönsing. 1998. Membrane electroporation and electromechanical deformation of vesicles and cells. *Faraday Discussion* 111:111-125.
- Neumann, E., S.Kakorin, and K.Tönsing. 2001. Principles of Membrane Electroporation and Transport of Macromolecules. *Methods in Molecular Medicine* 37:1-35.

- Neumann,E., P.M.Siemens, and K.Toensing. 2000. Electroporative fast pore-flickering of the annexin V - lipid surface complex, a novel gating concept for ion transport. *Biophys. Chem.* 86:203-220.
- Neumann,E., A.E.Sowers, and C.A.Jordan. 1989. Electroporation and Electrofusion in Cell Biology. Plenum Press, New York.
- Neumann,E., E.Werner, A.Sprafke, and K.Krüger. 1991. Electroporation phenomena. Electro-optics of plasmid DNA and of lipid bilayer vesicles. *Colloid and Molecular Electro-Optics* 197-206.
- Olson,F., C.A.Hunt, F.C.Szoka, W.J.Vail, and D.Papahadjopoulos. 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 557:9-23.
- Parente,R.A. and B.R.Lentz. 1985. Advantages and limitations of 1-palmitoyl-2-[[2-[4-(6-phenyl-trans-1,3,5-hexatrienyl)phenyl]ethyl]carbonyl]-3-sn-phosphatidylcholine as a fluorescent membrane probe. *Biochemistry* 24:
- Pebay-Peyroula,E., E.J.Dufourc, and A.G.Szabo. 1994. Location of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by neutron diffraction. *Biophysical Chemistry* 53:45-56.
- Revzin,A. and E.Neumann. 1974. Conformation changes in rRNA induced by electric impulses. *Biophys. Chem.* 2:144-150.
- Sackmann,E. 1994. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters* 346:3-16.
- Schwan,H.P. 1957. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *In* Advances in biological and medical physics. Academic Press, New York. 147-209.
- Seifert,U. and R.Lipowsky. 1995. Morphology of vesicles. *In* Structure and dynamics of membranes. R.Lipowsky and E.Sackmann, editors. Elsevier, Amsterdam. 403-63.
- Seufert,W.D. 1970. Model membranes: Spherical Shells Bounded by One Biomolecular Layer of Phospholipids. *Biophysiks* 7:60-73.

- Shinitzky, M. and Y. Barenholz. 1974. Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. *J. Biological Chemistry* 249:2652-2657.
- Shinitzky, M. and Y. Barenholz. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *BBA* 515:367-394.
- Stoylov, S. and E. Neumann. 1992. The electric dichroism of suspensions of non-absorbing particles. *Bulgarian chemical communications* 25:445-450.
- Straume, M. and B. J. Litman. 1987a. Equilibrium and dynamic structure of large, unilamellar, unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles. Higher order analysis of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and 1[4-(Trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene anisotropy decay. *B* 26:5113-5120.
- Straume, M. and B. J. Litman. 1987b. Influence of cholesterol on equilibrium and dynamic bilayer structure of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay. *B* 26:5121-5126.
- Swairjo, M. A., B. A. Seaton, and M. F. Roberts. 1994. Effect of vesicle composition and curvature on the dissociation of phosphadic acid in small unilamellar vesicles – a P-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 1191:354-361.
- Tönsing, K. Mechanismus der elektrischen Porenbildung in einfachen Lipid-Doppelschichten und Zellmembranen. 1997. Thesis/Dissertation, University of Bielefeld.
- Tönsing, K., S. Kakorin, E. Neumann, S. Liemann, and R. Huber. 1997. Annexin V and vesicle membrane electroporation. *Eur. Biophys. J.* 26:307-318.
- Uphoff, R. Reorientierungsbewegungen starrer und flexibler Moleküle in einfachen Flüssigkeiten untersucht mit depolarisierter Lichtstreuung und Fluoreszenz-Anisotropie. 1987. Thesis/Dissertation, University of Bielefeld.
- van der Heide, U. A., G. van Ginkel, and Y. K. Levine. 1996. DPH is localised in two distinct populations in lipid vesicles. *Chemical Physics Letters* 253:118-122.

van Langen, H., G. van Ginkel, D. Shaw, and Y. K. Levine. 1989. The fidelity of response by 1-[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene in time-resolved fluorescence anisotropy measurements on lipid vesicles. *Eur. Biophys. J.* 17:37-48.

Wabel, Chr. Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions. 1998. Thesis/Dissertation, University of Erlangen-Nürnberg.

Wiese, W., W. Harbich, and W. Helfrich. 1992. Budding of lipid bilayer vesicles and flat membranes. *J. Phys. Condens. Matter* 4:1647-1657.

Winterhalter, M. and W. Helfrich. 1988. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *Journal of Colloid and Interface Science* 122:583-586.

## 7 Anhang

### 7.1 Elongierung eines Vesikels im elektrischen Feld

In Übereinstimmung mit Winterhalter und Helfrich (1988) läßt sich die Elongation eines kugelförmigen Vesikels zu einem Ellipsoiden mit einem Verschiebungsparameter  $\zeta$  darstellen. Dabei ist  $\zeta$  die Zunahme des Radius  $a$  in Richtung des elektrischen Feldvektors  $\vec{E}$  und  $\zeta / 2$  ist die dazu korrespondierende Abnahme des Radius  $a$ , der senkrecht zum Feldvektor  $\vec{E}$  steht. Dementsprechend sind  $c = a + \zeta$  und  $b = a - \zeta / 2$  die lange und die kurze Haupt-Halbachse des Ellipsoids. Für ein elektrisches Gleichspannungsfeld  $E$  und kleine Vesikeldeformationen  $\zeta \ll a$  ist die durch den Maxwell-Stress erzeugte Oberflächenenergiedichte für die Verschiebung von Membranelementen gegeben durch (Winterhalter and Helfrich, 1988):

$$\Delta g_{\text{feld}}(\zeta) = g_{\text{feld}}(\zeta) - g_{\text{feld}}(0) = -(3/20) \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_w \cdot E^2 \cdot \zeta, \quad (\text{A.1})$$

wobei  $\epsilon_0 = (8,854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 / \text{Jm})$  die Vakuumpermittivität und  $\epsilon_w = 80$  die Dielektrizitätszahl des Wassers ist.

Die Vesikel-Elongation zum Ellipsoid erhöht die Membranbiegeenergiedichte um (Winterhalter and Helfrich, 1988):

$$\Delta g_{\text{bend}}(\zeta) = g_{\text{bend}}(\zeta) - g_{\text{bend}}(0) = (12/5) \cdot k_c \cdot \zeta^2 / a^4 \quad (\text{A.2})$$

Geht man über die von Winterhalter und Helfrich (1988) aufgestellte Theorie hinaus, und erlaubt Membrandehnungen und den Ausgleich von thermischen Ondulationen während der Vesikeldeformation, ist hierfür eine Zunahme in der Energiedichte,  $\Delta g_{\text{ss}}(\sigma, \zeta) = \Delta(\sigma(\zeta) \cdot S(\zeta))$ , der Membran zu berücksichtigen:

$$\Delta g_{\text{ss}}(\sigma, \zeta) = \Delta\sigma(\zeta) + \frac{\sigma_0 \cdot \Delta S(\zeta)}{S_0}, \quad (\text{A.3})$$

wobei  $\Delta\sigma = \sigma(\zeta) - \sigma_0$  und  $\Delta S(\zeta) = S(\zeta) - S_0$  ist.

Die Oberfläche eines elongierten Sphäroiden ist gegeben durch:

$$S(\zeta) = 2\pi \cdot c^2 \cdot \left[ p(\zeta)^{-2} + \frac{\arcsin(\sqrt{1-p(\zeta)^{-2}})}{p(\zeta) \cdot \sqrt{1-p(\zeta)^{-2}}} \right], \quad (\text{A.4})$$

wobei das Achsenverhältniss  $p$  des Sphäroiden durch  $p = c / b$  gegeben ist.

Bei kurzen elektrischen Feldpulsen ( $t_E \leq 10 \mu\text{s}$ ) und einem geringen Ausmaß der Elektroporation findet man keinen Volumenstrom von intravesikulärem Medium über die porierte Membran nach aussen. Somit kann das Vesikelvolumen als konstant angesehen werden ( $\Delta V \approx 0$ ). Die

Einschränkung auf die Volumenkonstanz führt zu der Beziehung:  $V = (4\pi/3) \cdot a^3 = (4\pi/3) \cdot c^3 / p^2$ . Die Substitution von  $c = p^{2/3} \cdot a$  in Gl. (A.4) ergibt den relativen Flächenzuwachs der Membran, um ein Vesikel unter der Bedingung der Volumenkonstanz zu elongieren:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{p^{-2/3}}{2} + \frac{p^{1/3} \cdot \arcsin(\sqrt{1-p^{-2}})}{2 \cdot \sqrt{1-p^{-2}}} - 1 \quad (\text{A.5})$$

Den Vesikeldeformations-Parameter  $\zeta$  bestimmt man durch die Minimierung der totalen Energiedichte-Änderung  $\Delta g(\zeta)$ :

$$\Delta g(\zeta) = \Delta g_{\text{field}}(\zeta) + \Delta g_{\text{bend}}(\zeta) + \Delta(\sigma(\zeta) \cdot S(\zeta)) / S_0 \quad (\text{A.6})$$

Für die meisten Fälle von praktischem Interesse läßt sich die Zunahme der lateralen Spannung  $\Delta\sigma(\zeta)$  mittels der Gl. (1.16) im Text und Gl. (A.5) bestimmen. Der zum Minimum von  $\Delta g(\zeta)$  korrespondierende Gleichgewichtswert  $\zeta_0$  kann numerisch, z.B. mit Mathematica 4, oder anderen geeigneten Programmen, bestimmt werden. Wenn  $\Delta\sigma(\zeta)$  durch die Näherungsgleichung (1.19) gegeben ist, kann die Berechnung von  $\zeta_0$  analytisch über das Setzen von  $d(\Delta g(\zeta))/d\zeta = 0$  erfolgen. Die Differentiation der Gln. (A.1), (A.2) und (A.3) liefert:

$$d(\Delta g_{\text{field}}(\zeta))/d\zeta = -(3/20) \cdot \varepsilon_o \cdot \varepsilon_w \cdot E^2 \quad (\text{A.7})$$

$$d(\Delta g_{\text{bend}}(\zeta))/d\zeta = (24/5) \cdot \kappa \cdot \zeta / a^4 \quad (\text{A.8})$$

$$d(\Delta g_{\text{ss}}(\zeta))/d\zeta = \sigma_o \cdot \left[ \frac{K}{1+K/(L \cdot \sigma_o)} + 1 \right] \cdot \left( \frac{d(\Delta S(\zeta))}{S_0} \right) / d\zeta \quad (\text{A.9})$$

Unter ausschliesslicher Berücksichtigung der ersten Potenz von  $\zeta/a^2$  im Ausdruck  $(d(\Delta S)/d\zeta)/S_0$ , gelangt man zu folgender Näherung:

$$d(\Delta g_{\text{ss}}(\zeta))/d\zeta \approx \sigma_o \cdot \frac{8 \cdot \pi \cdot k_c \cdot (\lambda + \sigma_o) + k_B \cdot T \cdot \lambda}{8 \cdot \pi \cdot k_c \cdot \sigma_o + k_B \cdot T \cdot \lambda} \cdot \frac{3 \cdot \zeta}{4 a^2} \quad (\text{A.10})$$

Die Substitution der Gleichungen (A.7), (A.8) und (A.9) in Gl. (A.6) ergibt, zusammen mit der Lösung von  $d(\Delta g(\zeta))/d\zeta = 0$ , den Gleichgewichtswert für die Membranverschiebung:

$$\zeta_0 \approx \frac{\varepsilon_o \cdot \varepsilon_w \cdot E^2 \cdot a^4}{32 \cdot \kappa + 5 \cdot \sigma_o \cdot a^2 \cdot \frac{8 \cdot \pi \cdot \kappa \cdot (K + \sigma_o) + k_B \cdot T \cdot K}{8 \cdot \pi \cdot \kappa \cdot \sigma_o + k_B \cdot T \cdot K}} \quad (\text{A.11})$$

Hier ist anzumerken, dass Gl. (A.11) für  $\sigma_o = 0$ , verschwindende spontane Membrankrümmung und Membranleitfähigkeit, mit der Gl. (21) aus der Publikation von (Winterhalter and Helfrich, 1988) übereinstimmt.

Die Umstellung von  $p = c/b = (a + \zeta)/(a - \zeta/2)$  und eine Reihenentwicklung bis zum  $(p - 1)^2$ -Term ergibt

$$\zeta = a \cdot \frac{p-1}{p/2+1} \approx (2/3) \cdot a \cdot (p-1). \quad (\text{A.12})$$

Die Substitution von Gl. (A.12) in Gl. (A.11) ergibt nach Umstellung die Gl. (1.21) im Text.

### **Charakteristische Zeit der Vesikeldeformation**

Im Rahmen eines Stokes-Formalismus für die verallgemeinerte Kraft  $F = 6\pi \cdot \eta \cdot a \cdot v$ , läßt sich die charakteristische Zeit der Vesikeldeformation abschätzen. Hierbei ist  $\eta$  die Viskosität des Mediums  $\eta = 8.9 \cdot 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Wasser) und  $v = d\zeta/dt$  die Geschwindigkeit der Membranverschiebung. Die geringe, unter der Vesikel-Elongation auftretende Verschiebung der Membran, kann durch die Verschiebung des Mittelpunkts einer Sphäre mit dem Radius  $a$  unter dem Einfluss der sich ändernden, verallgemeinerten Kraft  $F$  modelliert werden:

$$F(\zeta) = -S_0 \cdot d(\Delta g(\zeta))/d\zeta \quad (\text{A.13})$$

Sofern  $F(\zeta)$  bis auf Null absinkt, während  $\zeta$  seinen Gleichgewichtswert  $\zeta_0$  erreicht, ist eine Näherung für die charakteristische Zeit  $\tau$  der Vesikel-Elongation durch das Stokesesche Gesetz in der integralen Form gegeben:

$$\tau = 6\pi \cdot \eta \cdot a \cdot \int_0^{\zeta_e} [F(\zeta)]^{-1} d\zeta, \quad (\text{A.14})$$

wobei die obere Integrationsgrenze  $\zeta_e = \zeta_0 \cdot (1 - e^{-1})$  der Bruchteil  $1/e$  der vollständigen Gleichgewichtsverschiebung  $\zeta_0$  ist ( $e \approx 2,72$ ).

Mit den Gleichungen (A.6) - (A.10) ergibt die Integration der Gl. (A.14) die Gl. (1.23) im Text.

## **7.2 Bestimmung des Brechungsindex von Lipidvesikelmembranen**

Um die aus der Lichtstreuung an Vesikelsuspensionen mittels des Fortran-Programms von (Farafonov et al., 1996) erhaltenen Deformationen  $p = c/b$  zu berechnen, ist die Kenntnis der Brechungsindizes der Lipidmembran  $n_{Av20}$  und des internen und externen (wässrige  $[\text{NaCl}]_{\text{in=out}} = 0,2 \text{ mM}$ ) Vesikelmediums  $n_{\text{med}}$  für die Messwellenlänge  $\lambda = 365 \text{ nm}$  die Voraussetzung. Hier wird

$n_{\text{med}} = 1,3467$  ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )) verwendet.

Der Brechungsindex wird aus der Wellenlängenabhängigkeit für destilliertes Wasser bei  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Landolt und Börnstein, Hellwege, 1999) mittels einer Cauchy Anpassung erhalten, da sich die Literaturwerte auf die Na-D-Linie  $\lambda = 589$  nm beziehen. Hier wird  $n_{\text{AV}20} = 1,481$  ( $\lambda = 365$  nm,  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )) für den Brechungsindex der Lipidmembran verwendet.

Da die Tabellenwerke der Brechungsindizes von Lipidmembranen lediglich Daten für die Na-D-Linie enthalten, werden zunächst Brechungsindexinkremente für Avanti 20-Suspensionen unterschiedlicher Lipidmassenanteile nach der Methode von (Chong and Colbow, 1976) mit einem Abbe-Refraktometer ermittelt. Durch lineare Extrapolation der erhaltenen Messwerte auf 100% Lipid-Massenanteil  $n_{\text{AV}20} = 1,466$  ( $\lambda = 589$  nm,  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )) und anschließende Cauchy Anpassung, erhält man schliesslich einen Brechungsindex für die Avanti 20-Lipidmembran.

Der Wert  $n_{\text{AV}20} = 1,481$  ( $\lambda = 365$  nm,  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )) ist in guter Übereinstimmung mit dem von für Asolectin gefundenen Wert von  $n_{\text{AV}20} = 1,46$  ( $\lambda = 546$  nm,  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )) (Seufert, 1970). Asolectin ist, wie Avanti 20, ebenfalls ein Lipidextrakt aus Sojabohnen. Wabel (1998) gibt für Sojaöl einen Wert von  $n_{\text{AV}20} = 1,47$  ( $\lambda = 589$  nm) an.

Der für Vesikel aus Lecithin (Chong and Colbow, 1976) und für planare Lipidmembranen von (Cherry and Chapman, 1969) ermittelte Wert ist  $n_{\text{PC}} = 1,486$  (1,507) ( $\lambda = 589$  (366) nm,  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )) bzw.  $n_{\text{PC}} = 1,486$  ( $\lambda = 632$  nm,  $T = 293$  K ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )).

Aus  $n_{\text{AV}20}$  und  $n_{\text{med}}$  berechnet sich dann der relative Brechungsindex  $m$  zu:

$$m = n_{\text{AV}20} / n_{\text{med}} = 1,481 / 1,347 = 1,0995$$

### 7.3 Berechnung der Vesikeldeformation $p$ aus den Turbiditätsdaten

Die Ermittlung des Achsenverhältnisses  $p$  aus den Turbiditätsdaten beruht auf der Berechnung des Lichtstreuungsquerschnitts  $C_{\text{sca}}$  bzw. des effektiven Faktors  $Q_{\text{sca}} / \text{m}^{-2}$  (s. Gl. (A.15)) der Partikel mittels eines Fortran-Programms.

Die Autoren haben allgemein das Problem der Lichtstreuung von ummantelten Partikeln gelöst und sind in der Lage, auch die Lichtstreuung inhomogener, nicht-sphärischer Partikel mit Hilfe von Variablentrennung in einem spheroidalen Koordinatensystem zu berechnen (Farafonov et al., 1996).

$$Q_{\text{sca}} = \frac{C_{\text{sca}}}{\pi \cdot a^2} \quad (\text{A.15})$$

Dabei ist die totale Energie des in alle Richtungen streuenden Partikels durch die Integration von  $I(\theta, \varphi)/I_0$  über eine Kugeloberfläche gegeben [Kerker, 1996]:

$$C_{\text{sca}} = \frac{1}{I_0} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} I(\theta, \varphi) \cdot r^2 \sin \theta d\theta d\varphi. \quad (\text{A.16})$$

Die Richtung der gestreuten Lichtwelle ist definiert über die Polarkoordinaten ( $r$ ,  $\theta$  und  $\varphi$ ).

Mit Hilfe des Programms werden für unterschiedliche Brechungsindizes der Membran,  $n_{\text{AV20}}$ , und des Außenmediums,  $n_{\text{out=in}} = \text{konst.}$ , die Lichtstreuungsquerschnitte  $C^{\parallel}$  und  $C^{\perp}$  in Abhängigkeit vom Achsenverhältnis  $p$  errechnet und damit anschliessend die Zeitabhängigkeit der (theoretischen) Turbiditätsmoden  $\Delta T^-/T_0$  und  $\Delta T_{\text{CH}}/T_0$  bestimmt:

$$\frac{\Delta T^-}{T_0} = \frac{C^{\parallel} - C^{\perp}}{C_0} \quad (\text{A.17})$$

$$\frac{\Delta T_{\text{CH}}}{T_0} = \frac{C^{\parallel} + 2 \cdot C^{\perp}}{3C_0} - 1 \quad (\text{A.18})$$

Das von Griese (2001) speziell angepasste Programm von Farafonov et al. (1996) berücksichtigt die elektroporative Deformation der Vesikel und den Eintritt von Wasser in die Membran durch die Iteration über das Achsenverhältnis  $p = c / b$  (prolater Rotationsellipsoid) und den relativen Brechungsindex  $m$ .

## 7.4 Physikalische Eigenschaften der Vesikelsuspensionen

Die zur Messung eingesetzte Lipidtotalkonzentration beträgt, falls nicht anders angegeben,  $[\text{Lip}]_{\text{tot}} = 1,0 \text{ mM}$  der Lipide Avanti 20. Dies entspricht einer Vesikelanzahldichte von  $\approx 10^{14} - 10^{15} \text{ L}^{-1}$  für Vesikelradien im Bereich von  $a / \text{nm} = 25 - 200$ . Unter diesen Bedingungen beträgt der mittlere Abstand zwischen den Oberflächen einzelner Vesikel in allen Fällen mehr als  $h_0 \approx 0,5 \mu\text{m}$ , d.h. mehr als das Doppelte des Vesikeldurchmessers. Damit liegen die Bedingungen einer verdünnten Suspension vor. Es existieren ohne elektrisches Feld praktisch keine Vesikel-Vesikel-Kontakte.

### 7.4.1 Minimale Annäherungszeit für den Vesikel-Vesikel-Kontakt im Feld

Die minimale, charakteristische Annäherungszeit,  $\tau_{\text{app}}$ , zweier feldinduzierter Dipole, die zur hydrodynamischen Vesikel-Vesikel-Wechselwirkung führt, liegt für elektrische Feldstärken  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$  in der Größenordnung von  $\tau_{\text{app}} \approx 600 \mu\text{s}$  (Foster and Sowers, 1995). Bei elektrischen Feldpulsen mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  und Feldstärken von  $2 \leq E / \text{MV m}^{-1} \leq 8$  sind Vesikel-Vesikel-Kontakte auch während des Feldpulses zu vernachlässigen. Kontrollen der optischen Dichte von Vesikelsuspension vor und direkt nach einem Feldpuls mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$  (VET<sub>100</sub>;  $[\text{Lip}]_{\text{tot}} = 1,0 \text{ mM}$ ;  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ) und der maximal applizierten Feldstärke von  $E = 8 \text{ MV m}^{-1}$  zeigen keine Unterschiede in den OD-Spektren. Daher können

feldinduzierte, nach der Feldeinwirkung weiterhin bestehende Vesikelaggregation und/oder -fusionen unter den gegebenen Bedingungen ausgeschlossen werden (Daten nicht dargestellt). Bis zu fünf repetitive Feldpulse (mit Pulspausen von  $t = 30$  sec) auf dieselbe Vesikelsuspension zeigen keine Veränderung der gemessenen Relaxationen.

#### 7.4.2 Einfluss der Lipidkonzentration auf die elektro-(optischen) Signale

Um die Möglichkeit der Bildung von Vesikelaggregaten ausschließen zu können, die nicht langlebig sondern nur in der Einfeldphase stabil sind, wurden verschieden konzentrierte Lipidvesikelsuspensionen licht- und elektro-optisch untersucht.

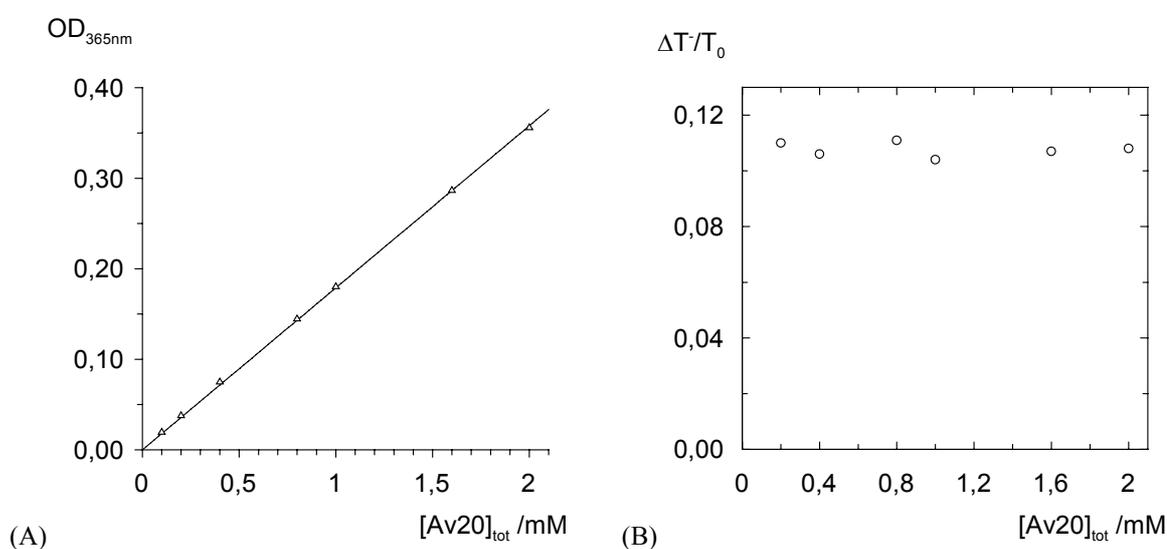


Abb. 32: (A) Die optische Dichte,  $OD_{365nm}$ , unmarkierter, unilamellarer Vesikel (SUV) des Lipids Avanti 20 bei der Meßwellenlänge  $\lambda = 365$  nm, als Funktion der Lipidtotalkonzentration  $[Av20]_T$ . (B) Die Endwerte der Einfeld-Relaxation der Minus-Mode der Turbidität,  $\Delta T/T_0$ , bei  $t_E = 9,86$   $\mu s$  als Funktion der Lipidtotalkonzentration  $[Av20]_T$ . Es wurde ein Feldpuls der Feldstärke  $E = 5$   $MV m^{-1}$  mit einer Dauer von  $t_E = 10$   $\mu s$  appliziert. Vesikelradius:  $a = 38$  nm, Vesikeldichte  $\rho_{VET} = 7,4 \cdot 10^{14} L^{-1}$ ,  $[Av20]_T = 1,0$  mM,  $[NaCl] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K (20°C),  $pH = 6,5$ .

Die Abb. 32A zeigt, dass die  $OD_{365nm}$  linear abhängig von  $[AV20]_T$  ist, womit Vesikel-Vesikel-Kontakte ohne Feldeinwirkung ( $E = 0$ ) auszuschließen sind. In Abb. 32B sind die Endwerte der Einfeld-Relaxation der Minus-Mode der Turbidität,  $\Delta T/T_0$ , gezeigt. Da  $\Delta T/T_0$  im Rahmen der Messgenauigkeit unabhängig von  $[Av20]_T$  zu sein scheint, ist somit eine feldinduzierte, transiente Vesikelaggregation zu vernachlässigen.

## 7.5 Bestimmung des Absorptionsanteils, $A_D$

Der Absorptionsanteil der Sonden,  $A_\lambda(D)$ , an der Gesamt-OD,  $OD_\lambda(V,D)$ , wird durch Differenzbildung der optischen Dichte der unmarkierten,  $OD_\lambda(V)$ , und der markierten Vesikelsuspensionen bei den jeweiligen Meßwellenlängen  $\lambda / \text{nm} = 365, 436, 545$  bestimmt. Allgemein gilt bei Additivität:  $A_D = OD(V, D) - OD(V)$ . In Abb. 33 wird am Beispiel der OD einer  $\beta$ -DPH pPC-markierten und unmarkierten Vesikelsuspension die Differenzbildung gezeigt.

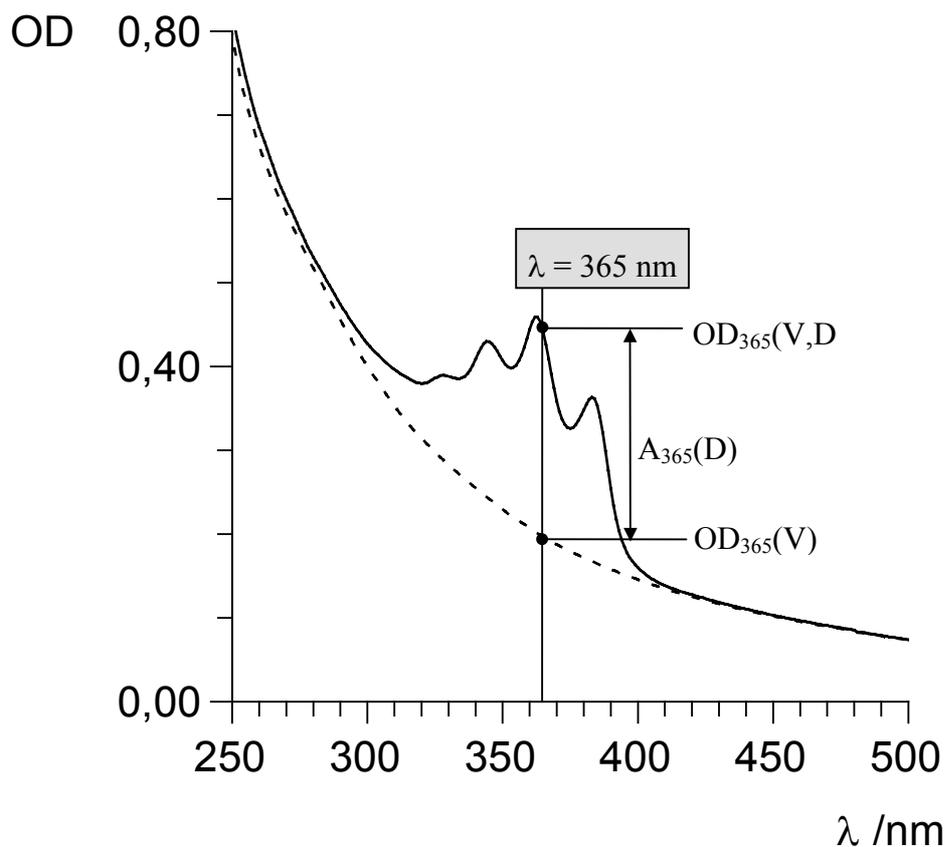
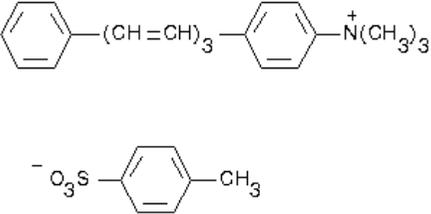
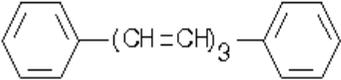


Abb. 33 Optische Dichte von wässrigen Suspensionen unmarkierter, unilamellarer Vesikel (LUV) des Lipids Avanti 20, (- - -), und der gleichen, aber farbstoffmarkierten Suspension (—), als Funktion der Wellenlänge  $\lambda / \text{nm}$ . Die Absorption von  $\beta$ -DPH pPC,  $A_{365\text{nm}}(D)$ , bei der Meßwellenlänge  $\lambda = 365 \text{ nm}$  ergibt sich aus der Differenz der  $OD_{365\text{nm}}(V, D)$  der markierten und der  $OD_{365\text{nm}}(V)$  der unmarkierten Vesikelsuspension. Vesikelradius:  $a = 38 \text{ nm}$ , Vesikeldichte  $\rho_{\text{VET}} = 7,4 \cdot 10^{14} \text{ L}^{-1}$ ,  $[\text{Av20}]_{\text{tot}} = 1,0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Farbstoff:  $[\beta\text{-DPHp PC}] = 5,0 \mu\text{M}$ ;  $OD_{365\text{nm}}(V) = 0,197$ ;  $OD_{365\text{nm}}(V, D) = 0,441$ ;  $A_{365\text{nm}}(D) = 0,244$ ;  $\epsilon_{365\text{nm}}(\beta\text{-DPHp PC}) = 48860 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 7.6 Strukturelle und optische Parameter der Membranfarbstoffe

[Av20]<sub>tot</sub> = 1,0 mM; [NaCl] = 0,2 mM

Nr.	IUPAC-Name:	Kürzel:	$\epsilon_{\lambda}(\text{Av20}) / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$M_r$	Struktur:
1.	2-(3-(diphenylhexatrienyl)-propanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	$\beta$ -DPHpPC	$4,4 \cdot 10^4$ ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) $\text{OD}_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$	782,01	
2.	6-hexadecanoyl-2-(((2-(trimethylammonium)ethyl)methyl)-amino)naphthalinchlorid	PATMAN	$1,15 \cdot 10^4$ ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) $\text{OD}_{\text{max}} = 353 \text{ nm}$	517,24	
3.	(3R,3'R)- $\beta$ , $\beta$ -carotin-3,3'-diol	Zeaxanthin	$3,1 \cdot 10^4$ $\lambda = 436 \text{ nm}$ $\text{OD}_{\text{max}} = 462 \text{ nm}$	568,88	
4.	1,1'-dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat	DiIC <sub>16</sub> (3)	$1,2 \cdot 10^5$ ( $\lambda = 545 \text{ nm}$ ) $\text{OD}_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$	877,77	

Nr.	IUPAC-Name:	Kürzel:	$\epsilon_{\lambda}(\text{Av20}) / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$M_r$	Struktur:
5.	1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien p-toluolsulfonat	TMA-DPH	$4,3 \cdot 10^4$ ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) $\text{OD}_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$	461,62	
6.	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien	DPH	$4,0 \cdot 10^4$ ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) $\text{OD}_{\text{max}} = 356 \text{ nm}$	232,32	

## 7.7 Einbauorte und physikalisch-chemische Eigenschaften der Lipidsonden

Parameter	DiI <sub>C16</sub> (3)	PATMAN	DPH	TMA-DPH	Zeaxanthin	β-DPH-pPC
Photostabilität <sup>[1]</sup>	stabil	stabil	sehr labil	labil	labil	sehr labil
Bindungsart (Befestigung)	Grenzfläche Membran/Lösung	Grenzfläche Membran/Lösung	hydrophober KW-Bereich	Grenzfläche Membran/Lösung	Beide Membran- grenzflächen, ( <i>transmembran</i> )	Grenzfläche Membran/Lösung
Lokalisierung <sup>[2]</sup> der chromophoren Gruppe	Lipidkopfgruppen (aufgelagert)	Lipidglycerol- gerüst	hydrophober KW-Bereich	Lipidglycerol- gerüst, hydrophober KW-Bereich	hydrophober KW-Bereich	hydrophober KW-Bereich
Chromophor- Orientierung <sup>[3]</sup>	senkrecht	parallel	parallel / senkrecht	parallel	parallel	parallel
Sondentyp	lipid-artig	detergenz-artig	lipophil	detergenz-artig	dipolares Amphiphil	sonden- markiertes Lipid
Ladungszahl	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	zwitterionisch
$c_{\text{mem}}^{\text{crit}} / \mu\text{M}$ <sup>[4]</sup>	20 (1 : 50)	10 (1 : 100)	5 (1 : 200)	n.b.	10 (1 : 100)	10 (1 : 100)

[1]: Intensive Bestrahlung für t = 5 min beim Absorptionsmaximum des membrangebundenen Farbstoffs ( $[\text{Sonde}]_{\text{tot}} \leq 10 \mu\text{M}$ ).

Lichtquelle: 150 W Xenon-Lampe

[2]: Aus Fluoreszenzmessungen.

[3]: Gemittelte Orientierung der Hauptachse des optischen Übergangsmoments relativ zur Membranflächennormalen.

[4]: Bezogen auf  $[\text{Av20}]_{\text{tot}} = 1,0 \text{ mM.}$ ; molares Verhältnis: Sonde : Lipid = 1 : n

### 7.7.1 Einbauorte der Farbstoffe in Lipidmembranen

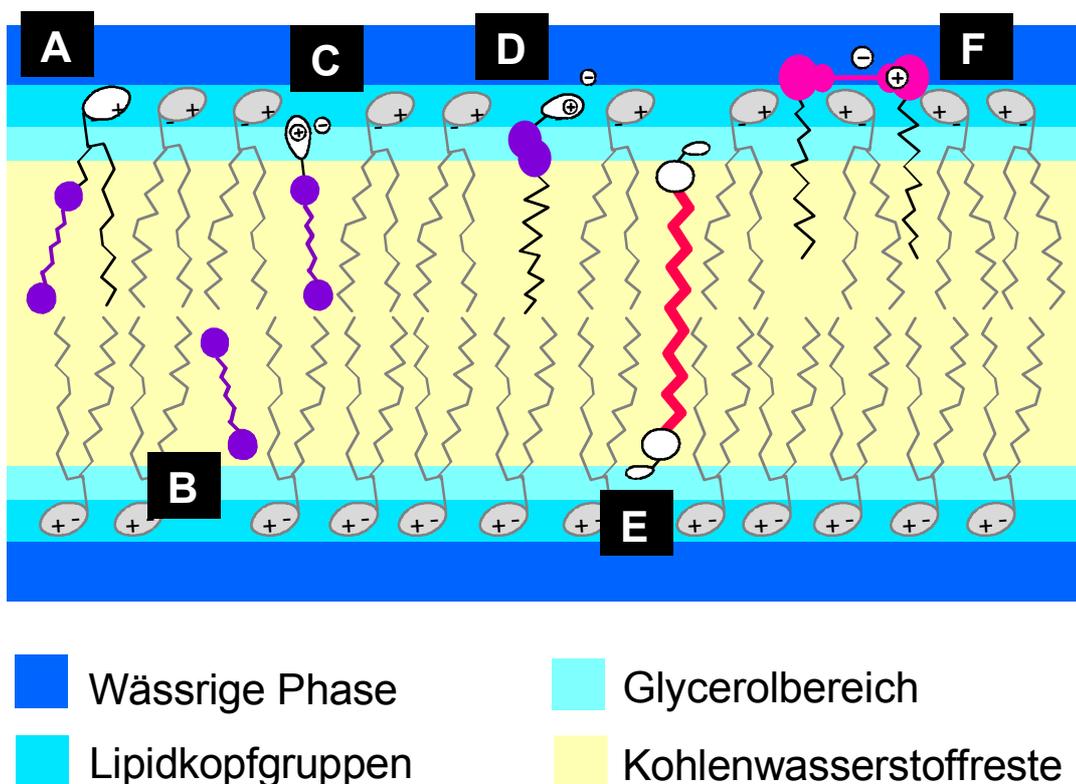


Abb. 34 Schema für die Bindungsorte der Farbstoffe in einer Lipidmembran. (A)  $\beta$ -DPH pPC, (B) DPH, (C) TMA-DPH, (D) PATMAN, (E) Zeaxanthin, (F) DiIC<sub>16</sub>(3).

Die in Abb. 34 gezeigten, bevorzugten Ausrichtungen des optischen Übergangsmoments der Sonden in Bezug zur Membranflächennormalen basieren auf Vorzeichen und Amplitudenwerten der Minusmoden der Absorption ( $\Delta A^-/A_0$ ). Die für die Sonden gewählten Bindungsorte beruhen zum Teil auf eigenen Messdaten der statischen Fluoreszenz (TMA-DPH, PATMAN, DiIC<sub>16</sub>(3)) der Farbstoffe in unterschiedlichen protischen und aprotischen Lösungsmitteln mit Dielektrizitätskonstanten im Bereich von  $\epsilon = 2 - 80$  (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzdaten im Rahmen einer Lippert-Auswertung (Lakowicz, 1983) im Vergleich zu den für Lipidmembranen bekannten optischen Daten liefern Aussagen über die direkte Sondenumgebung. Die Dielektrizitätskonstanten sowie der Brechungsindex im isotropen Lösungsmittel und in der Membran erlauben die Bestimmung des Sondenbindungsortes in einer Lipidmembran.

### 7.7.2 Moleküllängen der Membransonden

Die Ermittlung der Moleküllängen erfolgte mit den folgenden Programmen von ACD Labs:

- ACD/3D

- ACD/ChemSketch 3.5

Wenn möglich wurden die Strukturen mit den oben genannten Programmen vor der Ermittlung der Längen optimiert. Gemessen wird jeweils an den Wasserstoffatomen der terminalen Gerüstatome (C, N) in Richtung der Molekülhauptachse an einer gestreckten Struktur (maximale Länge).

Da die Optimierung nicht die Lösungsumgebung der Sonden in der Lipidmembran berücksichtigt, kann sich die hier zugrunde gelegte, gestreckte Struktur von der tatsächlichen Konformation in der Membran erheblich unterscheiden. Da aber zumindest im hydrophoben Bereich der Membran für alle Sonden gleiche Bedingungen vorliegen, ist auch ein Vergleich der gestreckten Form sinnvoll.

Tab. 2: Durch Optimierung mit ACD/3D ermittelte Moleküllängen der Membransonden

Membransonde (Kürzel)	L(H   H) /nm
DPH	1,6
TMA-DPH	1,8
DiIC <sub>16</sub> (3)	2,4
β-DPH pPC	2,9
PATMAN	3,0
Zeaxanthin	3,3

### 7.7.3 Übersicht und Einzelcharakterisierung der Farbstoffe

Aufgrund *struktureller* Aspekte bietet sich wiederum eine Einteilung der Farbstoffe in drei Gruppen an:

- Zeaxanthin, DiIC<sub>16</sub>(3).
- β-DPH pPC
- TMA-DPH, DPH, PATMAN

Außer dem Carbocyaninfarbstoff, DiIC<sub>16</sub>(3), der nach dem Membraneinbau an der Membran/Wasser-Grenzfläche mit seiner chromophoren Gruppe im Mittel orthogonal zur Membrannormalen steht, orientieren sich alle anderen Farbstoffe praktisch kollinear zur Membrannormalen und verbergen ihren Chromophor innerhalb des hydrophoben Bereichs.

Die Gruppe (a) wird allein von β-DPH pPC besetzt. Es weist als einziges Sondenmolekül eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den Molekülen der Lipidmembran auf. In der Gruppe (b) finden sich

stäbchenförmige Farbstoffe, von denen zwei (DPH, TMA-DPH) auf der Chromophorstruktur des lipophilen Moleküls Diphenyl -1,3,5- hexatrien (DPH) basieren. Daher stimmen diese Sonden in vielen physikalischen Eigenschaften, wie z.B. der Lage der Absorptionsmaxima, dem molaren Absorptionskoeffizienten und der Lage des optischen Übergangsmoments der Absorption weitgehend überein (Pebay-Peyroula et al., 1994; Engel and Prendergast, 1981; Straume and Litman, 1987a) (s. Abschnitt 7.6). Der Farbstoff PATMAN, der als chromophore Gruppe ein aromatisches Ringsystem (Naphtylrest) aufweist, lokalisiert seinen Chromophor als einzige Sonde dieser Gruppe im Bereich der Kopf- bzw. Glycerolgruppen der Lipidmembran (Lakowicz et al., 1983).

Die Gruppe (c) nimmt eine Sonderstellung ein, da der natürliche, transmembrane Farbstoff Zeaxanthin bei kleinen Konzentrationen zum einen als Sonden-Chromophor agiert. Zum anderen verändert er bei größeren Konzentrationen  $[\text{Zeaxanthin}]_{\text{tot}} \geq 10 \mu\text{M}$  (s. Abb. 2A) die optischen und mechanischen Eigenschaften der Membran und wirkt dann als „Doppelcholesterol“ und somit membranversteifend (Gabrielska and Gruszecki, 1996), (Milon et al., 1986; Lazrak et al., 1987) (s. Abb. 12B). Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden. Der Carbocyaninfarbstoff, DiIC<sub>16</sub>(3), hingegen orientiert sich im Unterschied zu den anderen Sonden mit der chromophoren Struktur an der Grenzfläche Lipidmembran/Lösungsmittel (Axelrod, 1979) im Mittel senkrecht zur Membrannormalen. Die Bindung an die Membran erfolgt über zwei an den Ringsystemen befestigte C<sub>16</sub>-Ketten, die in den hydrophoben Bereich der Kohlenwasserstoffketten der Lipidmembran eintauchen, sowie über die chromophore Gruppe, die durch ihrer positive Ladung eine attraktive Wechselwirkung mit negativ geladenenen Kopfgruppen von Lipidmolekülen eingehen kann (Loew, 1988), (Fluhler et al., 1985), (Loew and Simpson, 1981).

Mit dem kolinear zur Moleküllängsachse orientierten optischen Übergangsmoment des Sondenmoleküls werden Rotationsbewegungen der Sonde, relativ zu einer äußeren Referenzrichtung, durch Messungen mit linear polarisiertem Licht zugänglich. Je nach Modell und Auswertungsmethode extrahiert man aus den linear-dichroitischen Absorptionsänderungen einer sondenmarkierten Probe entweder Kollektivbewegungen der Sonden bei Vesikelglobalverformung, oder man erhält Informationen über intrinsische Umgebungsänderungen.

### ***Einzelcharakterisierung der Farbstoffe***

**DPH** –  $\beta$ -DPH pPC, TMA-DPH:

All-trans-1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), ein lineares  $\alpha,\omega$ -Diphenyltrien mit C<sub>2h</sub>-Symmetrie, repräsentiert eine der effektivsten Membransonden zur Untersuchung der dynamischen Vorgänge in Lipidmembranen (Abb. 34B).

Lineare Polyene konstituieren sich aus einer Kette von konjugierten C-C-Doppelbindungen, die ein nicht unterbrochenes, planares  $\pi$ -System bilden. Die durch die Konjugation erreichte energetische Absenkung der Molekülorbitale spiegelt sich in den hohen Intensitäten und der Lage des Wellenlängenbereichs der Übergänge wider. DPH besitzt eine stäbchenförmige Gestalt. Der aus Anisotropie- und Lichtstreuungsmessungen ermittelte Bereich für das hydrodynamische Molekülvolumen beträgt  $V_{\text{DPH}} = 0,150 - 0,230 \text{ nm}^3$ , je nach Wichtung des Beitrags der einzelnen Rotationsachsen (Uphoff, 1987). Für die beobachtete Fluoreszenz ist nur die vollkommen gestreckte all-trans-Konfiguration des Moleküls verantwortlich (Shinitzky and Barenholz, 1978).

DPH besitzt im angeregten Zustand ein Dipolmoment und eine höhere Polarisierbarkeit als im Grundzustand. Die in diesem Zustand erhöhte dielektrische Reibung zwischen DPH und dem Lösungsmittel verlangsamt die Reorientierung. Neben Stoßprozessen ist die Lebenszeit des angeregten Zustandes im wesentlichen durch reversible cis-trans-Photoisomerisierungen gegeben, welche in Konkurrenz zur Fluoreszenz treten. Das Ausmaß der Photoisomerisierungen zeigt eine starke Abhängigkeit von der Viskosität des Mediums. In einer hochviskosen Umgebung, in der die Möglichkeit zur cis-trans-Isomerisierung weitgehend unterdrückt wird, mißt man eine hohe Fluoreszenzintensität (Shinitzky and Barenholz, 1978).

Bei kontinuierlicher Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von  $\lambda = 320 - 370 \text{ nm}$  nimmt die Fluoreszenzemission von DPH mit der Zeit (exponentiell) ab. Nach 15 - 30 s unter Lichtausschluß erreicht das System wieder seine ursprüngliche Fluoreszenzintensität. Begrenzt man den Bestrahlungszeitraum auf maximal 10 s, wird die reversible Photoisomerisierung unterdrückt.

Der Extinktionskoeffizient von DPH in sauerstofffreier Lösung beträgt  $\epsilon_{\text{DPH}} \approx 80000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (n-Hexan,  $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ ) und zeigt nur eine geringe Temperaturabhängigkeit (Shinitzky and Barenholz, 1974). Nahezu über den gesamten Wellenlängenbereich, in dem DPH absorbiert, werden intensive  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergänge angeregt. Das Absorptionsspektrum in n-Hexan zeigt drei Maxima bei  $\lambda = 335, 350$  und  $370 \text{ nm}$ , die dem Polyensystem zugeordnet werden können. Der Übergang bei  $\lambda \approx 350 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{max}}(\text{DPH})$ ) ist der intensivste. Die breite Absorption bei  $\lambda \approx 225 \text{ nm}$  stammt von den Phenylsystemen. Die genaue Lage des Maximums in Lipidmembranen hängt von der Länge der Acylkohlenwasserstoffkette, ihrem Sättigungsgrad, der Temperatur, dem Sauerstoffgehalt und der Ionenstärke des Suspensionsmediums ab.

Ein auffälliges Merkmal im Absorptions- und im Fluoreszenzanregungsspektrum von DPH und anderen linearen Polyenen ist eine solvensabhängige, bathochrome Verschiebung (Solvatochromie).

$\beta$ -DPH pPC ist ein mit dem anisotropen Chromphor 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) gekoppeltes Lipid (s. Abb. 34A und Abschn. 7.7). Dabei wird der in 2-Stellung des Glycerolgerüsts eines Phosphatidylcholinmoleküls stehende Palmitinsäurerest durch einen

3-Diphenylhexatrien-propansäurerest ersetzt. In Lipidmembranen besitzt  $\beta$ -DPH pPC eine charakteristische Absorptionsbandenstruktur bei  $290 \leq \lambda / \text{nm} \leq 420$  und einen molaren Absorptionskoeffizienten von  $\epsilon_{365} \approx 45000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Zahlreiche fluoreszenzspektroskopische Daten zeigen, daß der Chromophor des  $\beta$ -DPH pPC im hydrophoben Bereich der Kohlenwasserstoffketten einer Monoschicht der Lipidmembran lokalisiert ist, und das optische Übergangsmoment überwiegend parallel zur Membrannormalen ausgerichtet ist (Parente and Lentz, 1985), (Muller et al., 1994). Aufgrund seiner großen strukturellen Ähnlichkeit zu den natürlich vorkommenden Lipiden eignet sich  $\beta$ -DPH pPC hervorragend zur optischen Untersuchung von Bio- und künstlichen Lipidmembranen. Bei molaren Konzentrationsverhältnissen Sonde : Lipid von 1 : 400 verändert der Farbstoff die Membraneigenschaften praktisch nicht (s. Abschnitt 3.2.2, Abb. 12).

TMA-DPH besteht aus dem ungeladenen Chromophorrest DPH und der in para-Stellung zum konjugierten System lokalisierten positiv geladenen Trimethylammoniumgruppe. Der geladene Substituent verankert die Sonde im Lipidkopfgruppenbereich der Membran. Im Gegensatz zu DPH ist TMA-DPH daher nahe der Membranoberfläche lokalisiert ist (Abb. 34C). TMA-DPH zeigt die gleichen spektralen Charakteristika, wie der analoge neutrale Farbstoff DPH. Der intensivste Übergang des Absorptionsspektrums liegt bei  $\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm}$ . Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum hat intensivste Maximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ .

#### PATMAN:

Der Farbstoff PATMAN hat einen detergenzartigen Aufbau. Der Chromophor ist die Aminonaphtalengruppe. Die positiv geladene Trimethylammoniumgruppe und der Palmitoylrest ( $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}$ -) lokalisieren und orientieren den chromophoren Rest in der Nähe der Wasser-/Membrangrenzfläche. Der Palmitoylrest bindet im hydrophoben Bereich der Membran (Abb. 34D). Die hohe Lösungsmittelsensibilität von PATMAN beruht auf einer Ladungstrennung im angeregten Zustand, mit der negativen Ladung an der Carboxy- und der positiven Ladung an der Aminogruppe. Der Farbstoffes PATMAN hat sein Absorptionsmaximum in Methanol bei  $\lambda_{\text{max}} = 357 \text{ nm}$  und sein Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$ .

#### Zeaxanthin:

Zeaxanthin [(3R,3R')- $\beta$ , $\beta$ -Carotin-3,3'-diol] ist ein in der Natur vorkommendes Farbpigment (z.B. im Mais, dem Zeaxanthin seine Gelbfärbung verleiht), das in dieser Arbeit als dichroitische Sonden benutzt wird. Sie zählt strukturell zur Klasse der Carotenoide und spielt eine wichtige Rolle in lebenden Zellen, u.a. als Photopigment und Elektronenleiter, sowie als mechanischer Stabilisator von Membranen (wie Cholesterol).

Zeaxanthin ist wie  $\beta$ -Carotin ein lineares, stäbchenförmiges  $C_{40}$ -Carotenoid, das ein konjugiertes C-C-Doppelbindungssystem enthält, das sichtbares Licht im Wellenlängenbereich von  $\lambda \approx 400 - 550$  nm absorbiert. Die durch die Konjugation erreichte energetische Absenkung der Molekülorbitale spiegelt sich im hohen molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon \approx 40000$  L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> in Av20-Lipidmembranen) und der Lage des Wellenbereichs der Übergänge wider.

Zeaxanthin bindet in Av20-Lipidmembranen transmembran mit den terminalen Hydroxyfunktionen an den transversalen Membran-/Lösungsmittel-Grenzflächen. Es wird in der Literatur auch als „Doppelcholesterol“ bezeichnet, da es bei Konzentrationen  $[\text{Zeaxanthin}]_{\text{crit}} \approx 0.005$  mM, wie Cholesterol, die Biegesteifigkeit von DMPC-Lipidmembranen erhöht und die Permeabilität für Wasser erniedrigt (Milon et al., 1986), (Gabrielska and Gruszecki, 1996). Für Cholesterol findet man für Av20-Lipidmembranen allerdings Sättigungskonzentrationen, die bei  $[\text{Cholesterol}]_{\text{crit}} \approx 0.5$  mM liegen, also rund 100mal höher als bei Zeaxanthin sind (Brinkmann, 1998)

Um eine gute Inkorporation der Sonde in Lipidmembranen zu erreichen, sollte die Länge des hydrophoben Sondenteils der Dicke des hydrophoben Bereichs der Lipidmembran (Bilayer) gut angepasst sein. Der Abstand der beiden H-Atome der Hydroxygruppen von Zeaxanthin beträgt rund  $d = 3,3$  nm und ist somit nur wenig kürzer als die Dicke der hydrophoben Kohlenwasserstoffschicht von Av20-Lipidmembran ( $d_{\text{KW}} \approx 4$  nm) (s. Abschnitt 7.7.2, Tab 2).

$\beta$ -Carotin stellt im hydrophoben Membranbereich den gleichen sterischen Anspruch wie Zeaxanthin, wechselwirkt aber aufgrund der fehlenden hydrophilen Gruppen an den Grenzflächen nicht mit polaren Molekülen. Hierdurch wird die Membranstruktur gestört. Es resultiert eine Entropieabnahme, die ein  $\beta$ -Carotin-markiertes Vesikel im Vergleich zu einem Zeaxanthin-markierten Vesikel destabilisiert.

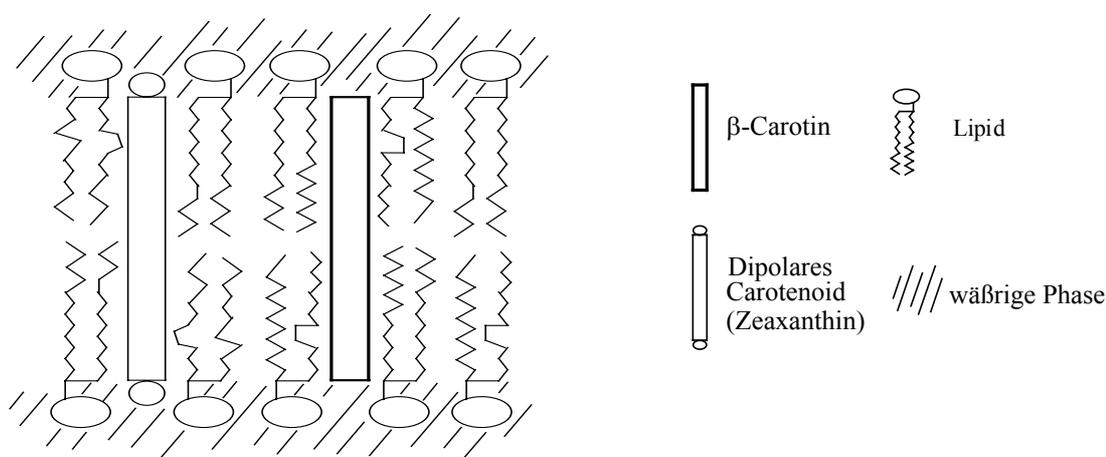


Abb. 35 Schematische Darstellung einer Lipidmembran im flüssigkristallinen Zustand mit den eingebetteten Sondenmolekülen Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin. Die bei  $\beta$ -Carotin fehlende "Kopfgruppe" führt zu vermehrtem Wassereintritt und damit zur Destabilisierung der Av20-Membran.

DiIC<sub>16</sub>(3):

Der Indocarbocyanin-Farbstoff DiIC<sub>16</sub>(3) besteht aus einer positiv geladenen Indocarbocyaningruppe, die zwei Kohlenwasserstoffketten (C<sub>16</sub>) an den Iminstickstoffen trägt. Diese Farbstoffklasse zeichnet sich besonders durch einen großen, molaren Extinktionskoeffizienten aus. ( $\epsilon_{\text{Av20}}(\lambda = 545 \text{ nm}) \approx 110000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in Av20-Lipidmembranen aus. Die chromophore Gruppe des DiIC<sub>16</sub>(3) besitzt wegen der positiven Ladung wenig lipophilen Charakter. Trotzdem bindet der Farbstoff bedingt durch seine beiden langen C<sub>16</sub>-Kohlenwasserstoffketten an Lipidmembranen. Die Indocarbocyaningruppe richtet sich dabei nahezu parallel zur Membranoberfläche aus. Die beiden Alkylketten ragen im Mittel senkrecht in das hydrophobe Innere der Membran hinein (Abb. 34D), wobei die KW-Ketten nur eine Lipidmonoschicht durchdringen. Die Auswertung von Fluoreszenzspektren zeigt, dass die absorbierende Gruppe an der Grenzfläche Membran-Wasser in hydrophiler Umgebung auf die Lipidkopfguppen aufgelagert und nicht membranintegral lokalisiert ist. Die Absorptions- und Emissionsspektren besitzen je zwei Maxima und überlappen sich stark. Das Absorptionsmaximum in Methanol liegt bei  $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$  und das Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 565 \text{ nm}$ . Die Indocarbocyanine gehören mit zu den ersten potentiometrisch genutzten Fluoreszenzsonden. Der kationische Farbstoff akkumuliert sich hierbei an einer hyperpolarisierten Membran und wird dabei in die Membran transloziert. In der Membran ändert sich durch Farbstoffaggregation das Fluoreszenzspektrum und die Absorption. Daher gehört diese Farbstoffklasse zu den sogenannten "slow response"-Sonden, die die Änderungen von Potentialdifferenzen an Membranen im Milli- und Sekundenbereich anzeigen. In dieser Arbeit wurde das DiIC<sub>16</sub>(3) in einem neuen Kontext als schnelle "fast response"-Sonde in Feldsprungrelaxationsmessungen eingesetzt. Hierbei steht nicht die langsame Translokation in die Membran, sondern die feldinduzierte, polarisationsoptisch erfassbare, schnelle Positionsänderungen ( $t_{\text{rot}} < 20 \text{ ns}$ ) des anisotropen Chromophors im Blickpunkt.

## 7.7.4 Optische Dichte (OD)-Spektren

### *Einfluss des Vesikelradius und der Lipidtotalkonzentration*

Die Turbidität der Vesikelsuspensionen hängt von der Konzentration und dem Durchmesser der Partikel ab. Die OD für eine gegebene Vesikelgröße ist linear von der Lipidtotalkonzentration abhängig (s. Abb. 36B). Die OD ist bei gegebener Lipidtotalkonzentration, wie erwartet, nicht-linear abhängig vom Vesikeldurchmesser (Daten nicht dargestellt). Gleichzeitig zeigt der lineare Verlauf von  $OD_{365\text{nm}}$  mit steigender  $[Av20]_T$ , dass in Abwesenheit eines externen elektrischen Feldes ( $E = 0$ ) keine Vesikel-Vesikel-Kontakte oder Fusionen bei größeren Partikeldichten auftreten.

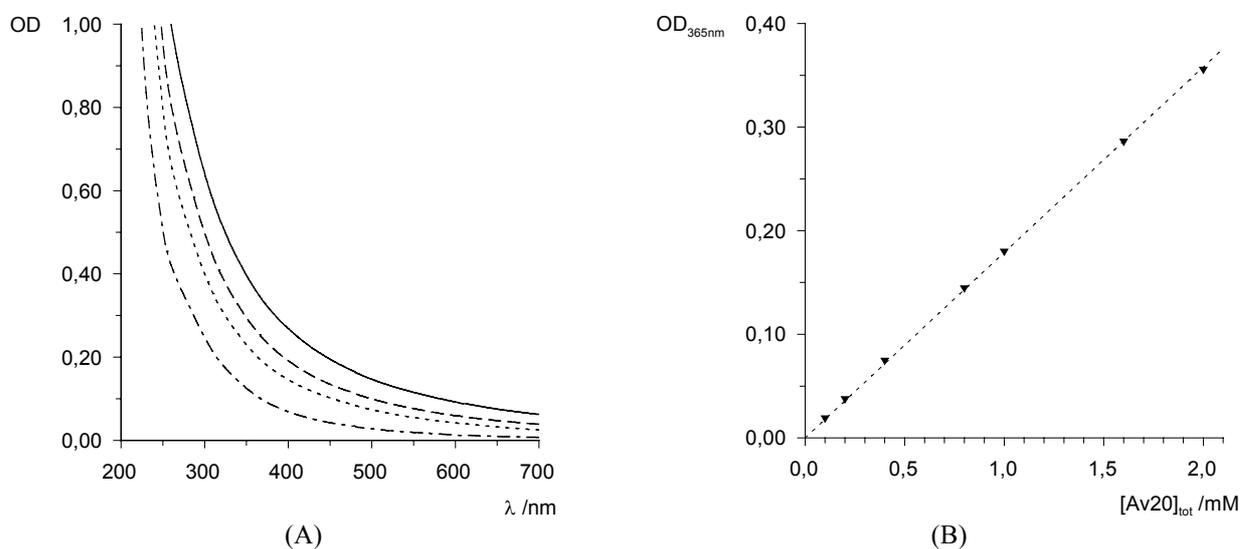


Abb. 36: (A) Die optische Dichte, OD, unmarkierter Vesikelsuspensionen von Avanti 20 (Av20) Vesikeln mit unterschiedlichem  $a_{\text{VET}}$  Durchmesser als Funktion der Wellenlänge  $\lambda$  / nm.

$a_{\text{VET}}$  / nm = 25 (---), 38 (- - -), 80 (— —), 170 (——).

(B) Die  $OD_{365\text{nm}}$  einer unmarkierten Vesikelsuspension von  $a_{\text{VET}} = 38$  nm gemessen bei  $\lambda$  / nm = 365 steigt linear mit der Lipidtotalkonzentration  $[Av20]_{\text{tot}}$  an.

$[Av20]_{\text{tot}} = 1,0$  mM,  $[NaCl] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K (20 °C),  $pH = 6,5$ .

### Farbstoffmarkierte- und unmarkierte Vesikel

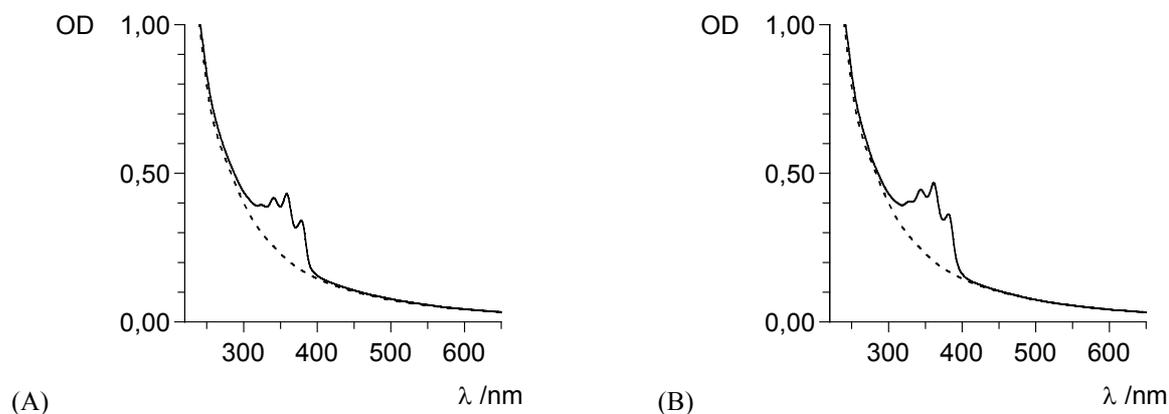


Abb.: 37 OD-Spektren wässriger Suspensionen unmarkierter, unilamellarer Vesikel (LUV) aus dem Lipid Av20, (- - -), und der gleichen, aber farbstoffmarkierten Suspension (—), als Funktion der Wellenlänge  $\lambda$  /nm. Vesikelradius:  $a = 38$  nm, Vesikeldichte  $\rho_{\text{VET}} = 7,4 \cdot 10^{14} \text{ L}^{-1}$ ,  $[\text{Av20}]_{\text{T}} = 1,0$  mM,  $[\text{NaCl}] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ .

Farbstoffe: (A)  $[\text{DPH}] = 3,33 \mu\text{M}$ ; (B)  $[\text{TMA-DPH}] = 5,0 \mu\text{M}$ .

### Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration

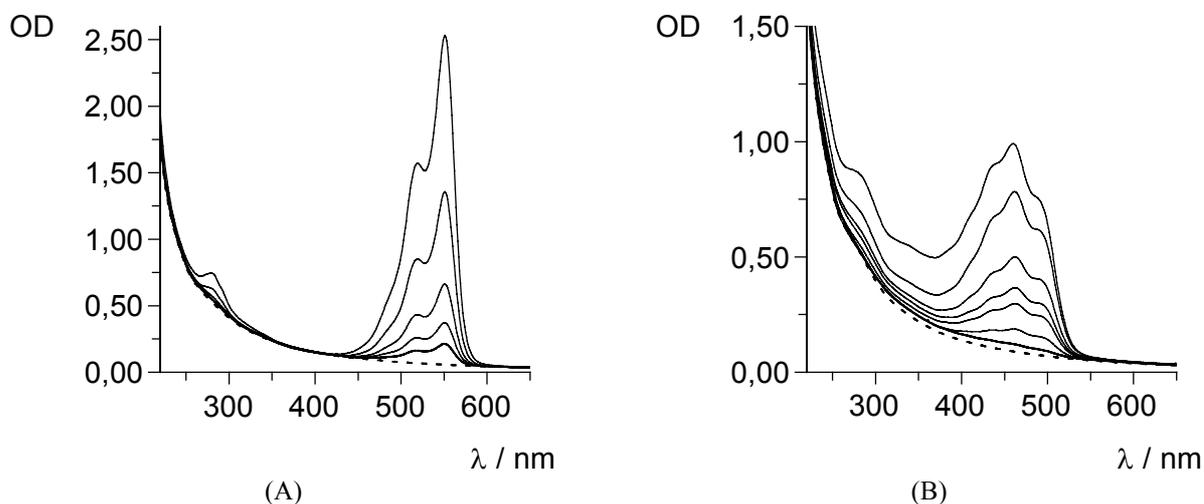


Abb. 38: OD-Spektren wässriger Suspensionen unmarkierter, unilamellarer Vesikel (LUV) aus dem Lipid Av20, (- - -), und der gleichen, aber farbstoffmarkierten Suspension (—), als Funktion der Wellenlänge  $\lambda$  /nm bei unterschiedlicher membrangebundener Farbstoffkonzentration. Vesikelradius:  $a = 38$  nm, Vesikeldichte  $\rho_{\text{VET}} = 7,4 \cdot 10^{14} \text{ L}^{-1}$ ,  $[\text{Av20}]_{\text{tot}} = 1,0$  mM,  $[\text{NaCl}] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Farbstoffe: (A)  $[\text{DiC}_{16}(3)] = 1,25, 2,5, 5, 10, 20 \mu\text{M}$ ; (B)  $[\text{Zeaxanthin}] = 1,25, 2,5, 5, 6,66, 10, 20 \mu\text{M}$ .

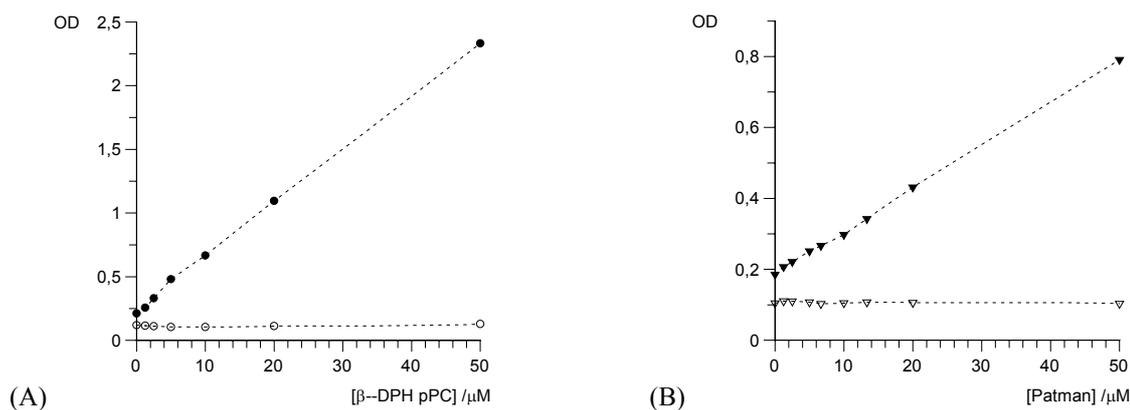


Abb. 39: Die optische Dichte,  $OD_{\lambda\text{-in}}$ , (gefüllte Symbole) *innerhalb* der Absorptionsbanden von farbstoffmarkierten Suspensionen unilamellarer Av20-Vesikel als Funktion der Totalkonzentration der Farbstoffe  $\beta$ -DPH pPC (A) und PATMAN (B) und die optische Dichte,  $OD_{\lambda\text{-ex}}$ , (ungefüllte Symbole) *außerhalb* der Absorptionsbanden der Farbstoffe. Vesikelradius:  $a = 38 \text{ nm}$ . Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 1

(A)  $\beta$ -DPH pPC:  $OD_{\lambda=365\text{nm}}(\text{in}, \bullet)$ ;  $OD_{\lambda=436\text{nm}}(\text{out}, \circ)$ ;  $\epsilon_{365} = 45580 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

(B) PATMAN:  $OD_{\lambda=365\text{nm}}(\text{in}, \blacktriangledown)$ ;  $OD_{\lambda=436\text{nm}}(\text{out}, \triangledown)$ ;  $\epsilon_{365} = 11240 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Die  $OD_{\lambda\text{-in}}$  (Abb. 39A) zeigt für  $\beta$ -DPH pPC einen linearen Verlauf im gesamten Bereich der untersuchten Sondentotalkonzentration ( $[\text{Sonde}]_{\text{tot}} = 0 - 50 \text{ } \mu\text{M}$ ), so daß  $[\beta\text{-DPH pPC}]_{\text{crit}} > 50 \text{ } \mu\text{M}$  (A) sein muß; den gleichen Zusammenhang findet man auch für PATMAN (B). Innerhalb des untersuchten Bereichs der Sondenkonzentration ist die optische Dichte der Vesikel,  $OD_{\lambda\text{-ex}}$ , konstant und damit unabhängig von der Membransondenkonzentration.

### 7.7.5 Bestimmung der Bindungsorte von DiIC16(3), PATMAN und TMA-DPH durch Fluoreszenz

Die Absorptions- und Emissionseigenschaften fluoreszierender Moleküle werden von der Art der Lösungsumgebung, besonders aber von der Polarität des Lösungsmittels beeinflusst. In erster Näherung ist die Energiedifferenz ( $\text{cm}^{-1}$ ) zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand eines Fluorophors eine Eigenschaft des Brechungsindex ( $n$ ) und der Dielektrizitätszahl ( $\epsilon$ ) des Lösungsmittels. Dieser Zusammenhang wird durch die Lippert-Gl. (A.19) (Lakowicz, 1983) beschrieben:

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_E = \Delta\tilde{\nu} \approx \frac{2}{hc} \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu^* - \mu)^2}{a^3} + \text{const} \quad (\text{A.19})$$

Hierbei ist  $\tilde{\nu}_A$  die Wellenzahl pro cm der Absorption,  $\tilde{\nu}_E$  die Wellenzahl pro cm der Emission und  $\Delta\tilde{\nu}$  die Stokes-Verschiebung,  $h$  die Plancksche Konstante,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit,  $\epsilon$  die Dielektrizitätszahl des Lösungsmittels,  $n$  der Brechungsindex des Lösungsmittels,  $\mu$  das Dipolmoment des Farbstoffes im Grundzustand und  $\mu^*$  das Dipolmoment im angeregten Zustand und  $a$  der Radius des Farbstoffmoleküls.

Die aus den Fluoreszenzspektren (nicht gezeigt) ermittelten Wellenlängen und Wellenzahlen der Absorptions- und Emissionsmaxima finden sich in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Die aus diesen Daten für die Stokes-Verschiebung  $\Delta\tilde{\nu}$  und den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  berechneten Werte werden ebenfalls in diesen Tabellen aufgelistet.

Zur Auswertung werden die Brechungsindices  $n$ , die dekadischen Logarithmen der Dielektrizitätszahlen  $\lg \epsilon$  und die Solvenspolarisationsparameter  $\Delta F$  (Orientierungspolarisierbarkeit), mit denen die Lösungsmittel charakterisiert werden, gegen die Stokes-Verschiebung der Farbstoffe in diesen Lösungsumgebungen aufgetragen. Weiterhin werden die Wellenzahlen pro cm der Extinktions- und Emissionsmaxima gegen die Solvenspolarisationsparameter  $\Delta F$  aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Dabei ist:

$$\Delta F = \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon - 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \quad (\text{A.20})$$

Man erhält als Ergebnis:

Farbstoff	Solvenspolarisationsparameter $\Delta F$	Dielektrizitätszahl $\epsilon$	Brechungsindex $n$
DiIC <sub>16</sub>	0.47	1000	1.20
PATMAN	0.17	8.4	1.56
TMA-DPH	0.03	2.0	1.49

## Vergleich der Spektren

### DiIC<sub>16</sub>(3)

Die Stokes-Verschiebung von  $\Delta\tilde{\nu} = 638 \text{ cm}^{-1}$  in der Membran liegt sehr hoch. Man errechnet daraus einen Wert von  $\Delta F \approx 0,47$ . Auch für den Brechungsindex und die Dielektrizitätszahl würde man so extreme Werte erhalten:  $n \approx 1,2$  und  $\varepsilon \approx 1000$ . Der Stokes Shift in der Membran liegt aber nur wenig unter dem für Wasser ermittelten Wert von  $\Delta\tilde{\nu} = 645 \text{ cm}^{-1}$ . Dies deutet an, dass der Bindungsort des Chromophors sich nahe der Wasser/Vesikelmembran-Grenzfläche befindet.

### PATMAN

Aus der für PATMAN in Vesikelmembranen bestimmten Stokes-Verschiebung von  $\Delta\tilde{\nu} = 6100 \text{ cm}^{-1}$  errechnet man einen Solvenspolarisationsparameter von  $\Delta F \approx 0,17$ , eine Dielektrizitätszahl von  $\varepsilon \approx 8,4$  und einen Brechungsindex von  $n \approx 1,56$ . Der absorbierende Farbstoffrest liegt demnach in dem Teil der Membran, der zwischen den hydrophoben KW-Ketten und den polaren Kopfgruppen lokalisiert ist. Für diesen Bereich werden Dielektrizitätszahlen zwischen 20 - 30 (polare Kopfgruppen) bis zu 2 (hydrophobe Kohlenwasserstoffe) angegeben.

### TMA-DPH

Die für die Vesikelmembran bestimmte Stokes-Verschiebung ist  $\Delta\tilde{\nu} = 4576 \text{ cm}^{-1}$ . Für die Membranregion des Diphenylhexatrienrestes wird ein Solvenspolarisationsparameter von  $\Delta F \approx 0,03$ , eine Dielektrizitätszahl von  $\varepsilon \approx 2,0$  und ein Brechungsindex von  $n \approx 1,49$  ermittelt. Diese Werte werden allgemein für die hydrophoben Bereiche der Kohlenwasserstoffreste der Vesikelmembran angenommen.

DiIC<sub>16</sub>(3)

Nr.	$\lambda_A$	$\lambda_E$	$\tilde{\nu}_A$ cm <sup>-1</sup>	$\tilde{\nu}_E$ cm <sup>-1</sup>	$\Delta\tilde{\nu}$ cm <sup>-1</sup>	$\epsilon$ L/M cm
1	552	566	18115,942	17667,845	448,098	48416,7
2	560	581	17857,143	17211,704	645,439	
3		567		17636,684		
4	551	567	18148,820	17636,684	512,136	104833,3
5	552	568	18115,942	17605,634	510,308	119266,7
6	547	563	18281,536	17761,989	519,546	122666,7
7	548	564	18248,175	17730,496	517,679	125750,0
8	550	564	18181,818	17730,496	451,322	130416,7
9	548	566		17667,845		117366,7
10	552	565	18115,942	17699,115	416,827	123316,7
11	551	567	18148,820	17636,684	512,136	110366,7
12	555	566	18018,018	17667,845	350,173	124183,3
13	552	568	18115,942	17605,634	510,308	122666,7
14	553	569	18083,183	17574,692	508,490	133850,0
15	554	569	18050,542	17574,692	475,849	120233,3
16	552	567	18115,942	17636,684	479,258	168750,0
17	554	569	18050,542	17574,692	475,849	70883,3
18	556	569	17985,612	17574,692	410,919	136050,0
19	562	575	17793,594	17391,304	402,290	140433,3
20	557	570	17953,321	17543,860	409,462	130366,7
21	559	571	17889,088	17513,135	375,953	46366,7
24	562	573	17793,594	17452,007	341,587	126550,0
25	552	568	18115,942	17605,634	510,308	113866,7
26	556	569		17574,692		142833,3
27	549	564	18214,936	17730,496	484,440	120933,3
28	549	583	18214,936	17152,659	1062,278	4916,7
29	550	584	18181,818	17123,288	1058,531	9666,7

## PATMAN

Nr.	$\lambda_A$	$\lambda_E$	$\tilde{\nu}_A$ $\text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}_E$ $\text{cm}^{-1}$	$\Delta\tilde{\nu}$ $\text{cm}^{-1}$	$\varepsilon$ L/M cm
1	354	478	28248,588	20920,502	7328,085	16705,0
2	372	488	26881,720	20491,803	6389,917	3211,7
3	367	490	27247,956	20408,163	6839,793	13888,3
4	358	488	27932,961	20491,803	7441,158	14746,7
5	349	443	28653,295	22573,363	6079,932	16121,7
6	343	440	29154,519	22727,273	6427,246	16490,0
7	347	475	28818,444	21052,632	7765,812	14943,3
8	347	467	28818,444	21413,276	7405,168	
9	370	430	27027,027	23255,814	3771,213	
10	348	460	28735,632	21739,130	6996,502	15245,0
11	350	452	28571,429	22123,894	6447,535	14573,3
12	356	457	28089,888	21881,838	6208,050	15608,3
13	349	458	28653,295	21834,061	6819,234	14160,0
14	347	455	28818,444	21978,022	6840,422	15065,0
15	349	456	28653,295	21929,825	6723,471	15796,7
16	332	424	30120,482	23584,906	6535,576	13125,0
17	348	456	28735,632	21929,825	6805,808	9498,3
18	342	427	29239,766	23419,204	5820,562	10785,0
19		456		21929,825		
20	338	414	29585,799	24154,589	5431,209	5206,7
21		448		22321,429		
24	361	444	27700,831	22522,523	5178,309	3420,0
25	356	432	28089,888	23148,148	4941,739	5515,0
26	347	438	28818,444	22831,050	5987,394	2528,3
27	354	484	28248,588	20661,157	7587,431	13345,0
28	354	490	28248,588	20408,163	7840,424	8025,0
29	343	479	29154,519	20876,827	8277,692	4621,7

## TMA-DPH

Nr.	$\lambda_A$	$\lambda_E$	$\tilde{\nu}_A$ $\text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}_E$ $\text{cm}^{-1}$	$\Delta\tilde{\nu}$ $\text{cm}^{-1}$	$\epsilon$ L/M cm
1	360	441	27777,778	22675,737	5102,041	61800,00
2	340	433		23094,688		18573,33
3	361	448		22321,429		49200,00
4	359	435	27855,153	22988,506	4866,647	56926,67
5	360	404	27777,778	24752,475	3025,303	50473,33
6	354	438	28248,588	22831,050	5417,537	52426,67
7	352	435	28409,091	22988,506	5420,585	44566,67
8	355	436	28169,014	22935,780	5233,234	38780,00
9	355	433		23094,688		
10	357	433	28011,204	23094,688	4916,516	48126,67
11	357	433	28011,204	23094,688	4916,516	43706,67
12	361	436	27700,831	22935,780	4765,051	54926,67
13	358	434	27932,961	23041,475	4891,486	42133,33
14	358	434	27932,961	23041,475	4891,486	41933,33
15	359	432	27855,153	23148,148	4707,005	37013,33
16	363	436	27548,209	22935,780	4612,430	22786,67
17	358	432	27932,961	23148,148	4784,813	35800,00
18	361	435	27700,831	22988,506	4712,325	25160,00
19	360	463	27777,778	21598,272	6179,506	
20	359	432	27855,153	23148,148	4707,005	42800,00
21	360	426	27777,778	23474,178	4303,599	
24	360	437	27777,778	22883,295	4894,483	
25	353	426	28328,612	23474,178	4854,433	64366,67
26	360	428		23364,486		
27	353	431	28328,612	23201,856	5126,756	50333,33
28	354	439	28248,588	22779,043	5469,544	35786,67
29	343	433	29154,519	23094,688	6059,831	20480,00

## Charakteristika der verwendeten Lösungsmittel

Nr.	Lösungsmittel	$\epsilon$ (DK)	$\lg \epsilon$	$\eta$ /cP	n	$\Delta F$	Cutoff /nm
1.	Formamid	109	2,037	3.343	1.44	0,28457	260
2.	Wasser	78.4	1,894	0.89	1.333	0,31989	200
3.	Glycerol	42	1,623	934	1.47	0,26421	290
4.	Ethylenglykol	37.7	1,576	16.79	1.43	0,27507	210
5.	Dimethylformamid	37.0	1,568	0.796	1.43	0,27471	280
6.	Acetonitril	37.4	1,573	0.345	1.344	0,30540	225
7.	Methanol	32.7	1,515	0.547	1.328	0,30874	230
8.	Ethanol	24.5	1,389	1.678	1.36	0,28920	200
9.	Aceton	20.7	1,316	0.316	1.359	0,28420	335
10.	n-Propanol	20.3	1,307	1.947	1.386	0,27373	250
11.	Isopropanol	18.3	1,262	2.038	1.377	0,27311	220
12.	Cyclopentanol	18.0	1,255	9.6	1.452	0,24700	320
13.	n-Butanol	17.5	1,243	2.607	1.399	0,26356	230
14.	n-Hexanol	13.3	1,124	4.592	1.418	0,24437	230
15.	n-Octanol	9.9	0,996	7.215	1.429	0,22292	250
16.	Dichlormethan	8.9	0,949	0.422	1.424	0,21692	240
17.	n-Dekanol	8.1	0,908	11.8	1.437	0,20519	240
18.	Chloroform	4.7	0,672	0.542	1.446	0,14524	260
19.	Toluol	2.4	0,380	0.59	1.497	0,01500	300
20.	Dioxan	2.2	0,342	1.44 <sub>15°</sub>	1.422	0,01960	230
21.	n-Hexan	1.9	0,279	0.31	1.375	0,00123	200
24.	CCl <sub>4</sub>	2.2	0,342	0.97	1.46	0,00722	270
25.	Tetrahydrofuran	7.5	0,875	0.55	1.407	0,20871	300
26.	Diethylether	4.3	0,633	0.24	1.352	0,16593	250
27.	MeOH:H <sub>2</sub> O = 7:3	-					230
28.	MeOH:H <sub>2</sub> O = 3:7	-					230
29.	MeOH:H <sub>2</sub> O = 1:9	-					230

## 7.8 Physikalische Parameter der Vesikel

	Avanti 20 – VET <sub>50nm</sub>	VET <sub>100nm</sub>	VET <sub>200nm</sub>	VET <sub>400nm</sub>
Vesikeldurchmesser $\varnothing_{\text{Ves}}$	50 ± 15 nm	76 ± 20 nm	160 ± 45 nm	320 ± 94 nm
Membrandicke d	5 nm	5 nm	5 nm	5 nm
Aussenradius a	25 · 10 <sup>-9</sup> m	38 · 10 <sup>-9</sup> m	80 · 10 <sup>-9</sup> m	170 · 10 <sup>-9</sup> m
Vesikeloberfläche <sup>[1]</sup> (äußere Schale)	7,84 · 10 <sup>-15</sup> m <sup>2</sup>	1,82 · 10 <sup>-14</sup> m <sup>2</sup>	8,04 · 10 <sup>-14</sup> m <sup>2</sup>	3,63 · 10 <sup>-13</sup> m <sup>2</sup>
Vesikeloberfläche <sup>[1]</sup> (innere Schale)	5,03 · 10 <sup>-14</sup> m <sup>2</sup>	1,29 · 10 <sup>-14</sup> m <sup>2</sup>	7,07 · 10 <sup>-14</sup> m <sup>2</sup>	3,42 · 10 <sup>-13</sup> m <sup>2</sup>
O <sub>Lipidkopfgruppe</sub> <sup>[2]</sup>	0,7 nm <sup>2</sup> = 7 · 10 <sup>-15</sup> cm <sup>2</sup>	0,7 nm <sup>2</sup> = 7 · 10 <sup>-15</sup> cm <sup>2</sup>	0,7 nm <sup>2</sup> = 7 · 10 <sup>-15</sup> cm <sup>2</sup>	0,7 nm <sup>2</sup> = 7 · 10 <sup>-15</sup> cm <sup>2</sup>
Anzahl der Lipide pro Vesikel	1,84 · 10 <sup>4</sup> Lipide / Vesikel	4,55 · 10 <sup>4</sup> Lipide / Vesikel	2,16 · 10 <sup>5</sup> Lipide / Vesikel	1,0 · 10 <sup>6</sup> Lipide / Vesikel
[Lipid]	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM
Anzahl der Lipide pro Liter	6,05 · 10 <sup>20</sup> Lipide L <sup>-1</sup>			
Anzahl der Vesikel pro Liter	3,3 · 10 <sup>16</sup> Vesikel L <sup>-1</sup>	1,33 · 10 <sup>16</sup> Vesikel L <sup>-1</sup>	2,8 · 10 <sup>15</sup> Vesikel L <sup>-1</sup>	6,05 · 10 <sup>14</sup> Vesikel L <sup>-1</sup>
⟨Freie Weglänge⟩ der Vesikel <sup>[2]</sup>	3,86 μm	4,14 μm	4,44 μm	4,55 μm
mittlerer Abstand zwischen den Vesikeln <sup>[4]</sup>	0,311 μm	0,422 μm	0,709 μm	1,18 μm
Turbidität T <sub>0</sub> (λ = 365 nm)	0,1027	0,1968	0,2560	0,3485
Turbidität T <sub>0</sub> (λ = 436 nm)	0,0519	0,1033	0,1516	0,2178
Turbidität T <sub>0</sub> (λ = 545 nm)	0,0214	0,0514	0,0706	0,1098

$$[1] O_{\text{vesikel}} = 4\pi a^2$$

$$[2] \lambda = 1/(\text{Teilchendichte} \cdot \pi \cdot (2a)^2)$$

$$[3] 1/\sqrt[3]{n \text{ Ves} / \text{m}^3}$$

## 7.9 Optische Dichte farbstoffmarkierter Vesikelsuspensionen

Experimentelle Bedingungen:

$[Av20]_T = 1.0 \text{ mM}$ ,  $[NaCl] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $T = 293 \text{ K}$  (20 °C),  $pH = 6,5$ .

$OD_0 = A + T$

<b>OD<sub>0</sub></b>	365 (λ /nm)				436	545
	βDPH pPC	DPH	TMA-DPH	PATMAN	Zeaxanthin	DiIC <sub>16</sub> (3)
VET <sub>50</sub>	0,3307	0,2687	0,3706	0,2519	0,1925	0,3416
VET <sub>100</sub>	0,4411	0,3592	0,4366	0,3264	0,2791	0,3600
VET <sub>200</sub>	0,4815	0,4357	0,4786	0,3522	0,3306	0,3809
VET <sub>400</sub>	0,5731	0,4357	0,5725	0,4638	0,3645	0,4138

## 7.10 Elektro-optische Relaxationssignale für Avanti 20-Vesikel

### 7.10.1 Turbidität

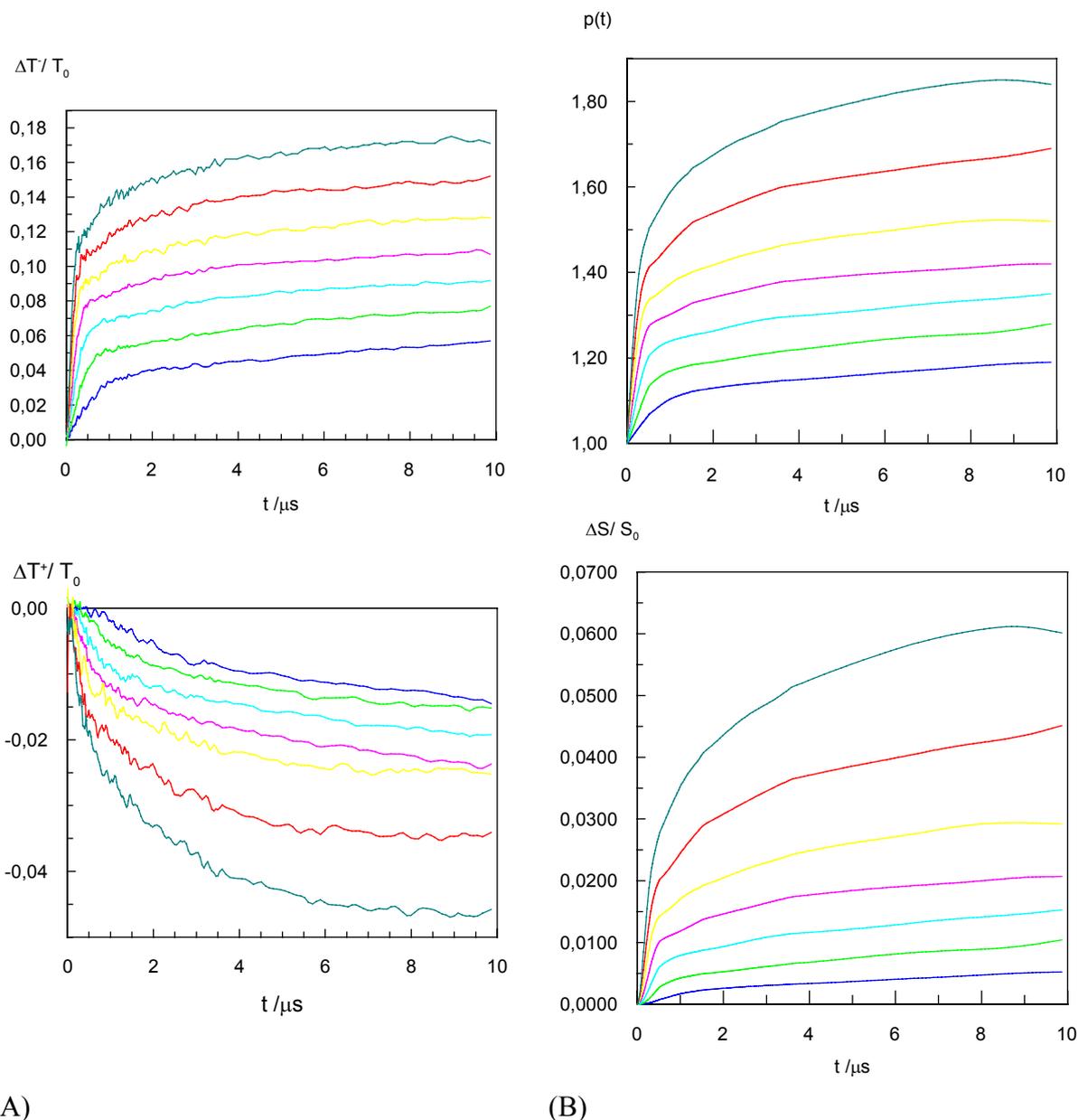


Abb. 40 Die Einfeld-Relaxationen der Minus- und Plusmode der Turbidität,  $\Delta T/T_0$  und  $\Delta T^+/T_0$ , bei der Wellenlänge  $\lambda = 365$  nm und das hieraus mittels dem FortanCode COA98 berechnete Achsenverhältnis  $p$  (B), sowie die mit Gl. (A.5) bestimmte Gesamtoberflächenänderung  $\Delta S/S_0$  als Funktion der Zeit in einem Rechteckfeldpuls im Feldstärkebereich  $E = (2 \text{ (blau)} - 8 \text{ (dunkelgrün)}) \text{ MV m}^{-1}$  mit einer Dauer von  $t_E = 10 \mu\text{s}$ . Vesikelradius:  $a = 38$  nm.;  $[\text{Av}20]_T = 1.0$  mM,  $[\text{NaCl}] = 0,2$  mM,  $T = 293$  K (20 °C),  $\text{pH} = 6,5$ .

## 7.10.2 Absorption

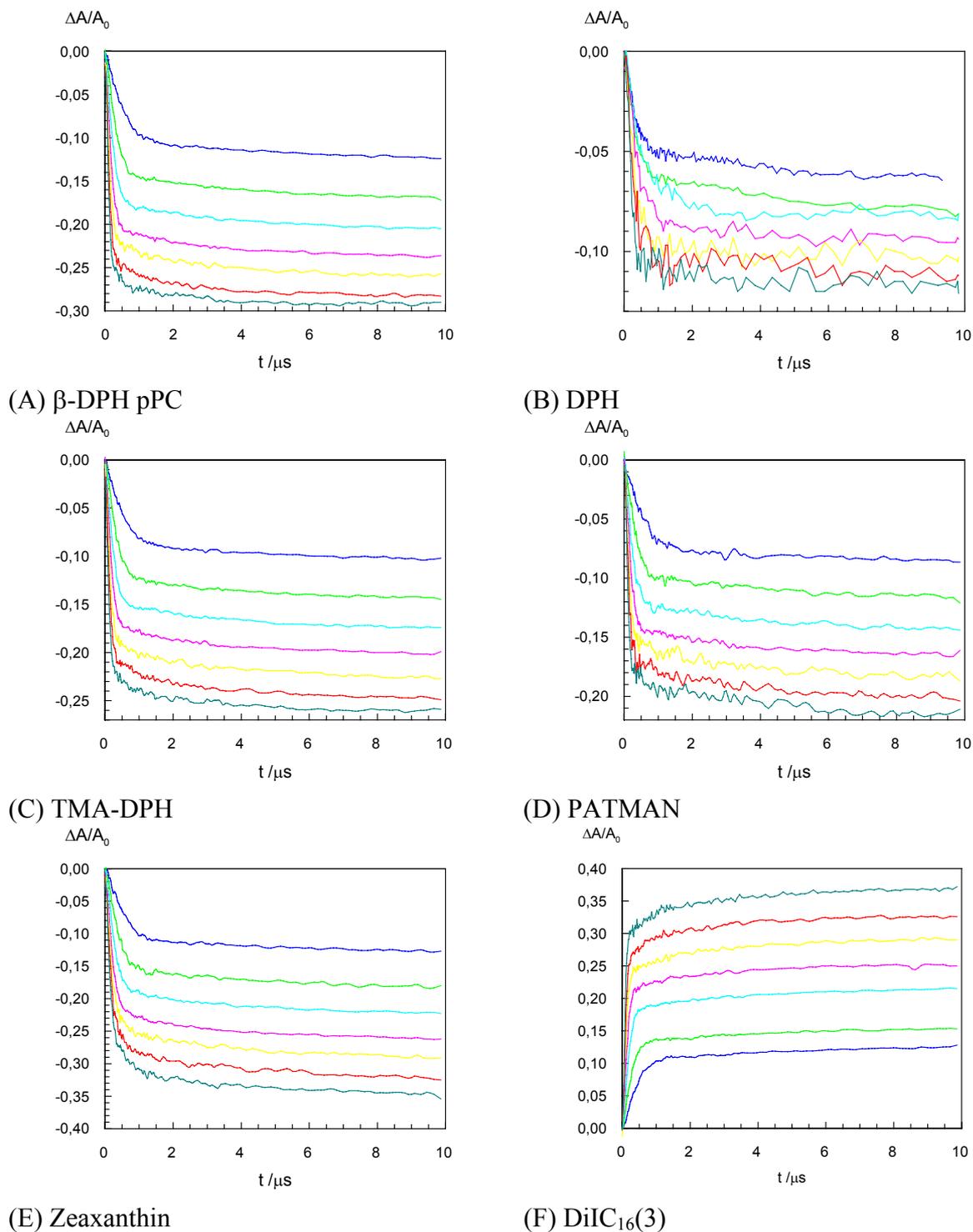
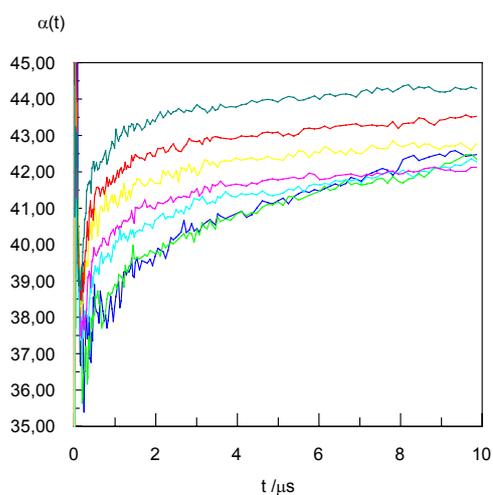
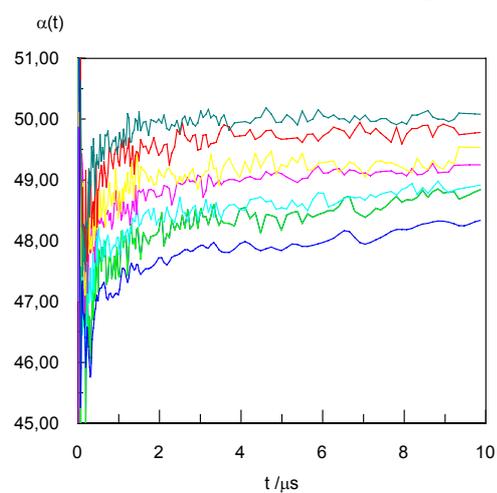
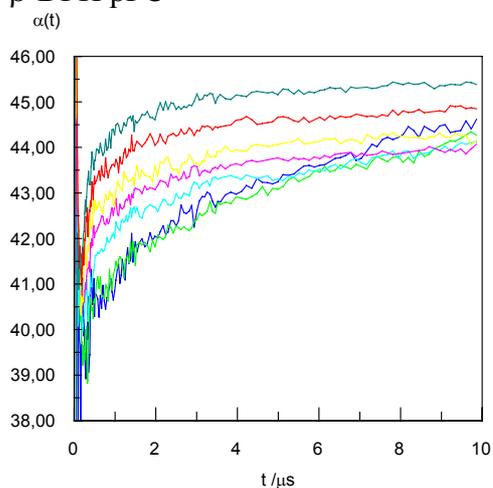


Abb. 41 Die Einfeld-Relaxationen der Minusmode der Absorption,  $\Delta A^-/A_0 = \Delta A/A_0$ , (für  $\Delta A^+/A_0 \approx 0$ ) der membrangebundenen Farbstoffe  $\beta$ -DPH pPC ( $\lambda = 365$  nm), DPH ( $\lambda = 365$  nm), TMA-DPH ( $\lambda = 365$  nm), PATMAN ( $\lambda = 365$  nm), Zeaxanthin ( $\lambda = 436$  nm) und DiIC<sub>16</sub>(3) ( $\lambda = 545$  nm) in VET<sub>100</sub> als Funktion der Zeit für die Feldstärken  $E = 2$  ((blau) – 8 (dunkelgrün)) MV m<sup>-1</sup> in einem Rechteckfeldpuls der Dauer von  $t_E = 10$   $\mu$ s. Exp. Bed. wie in Abb. 7.

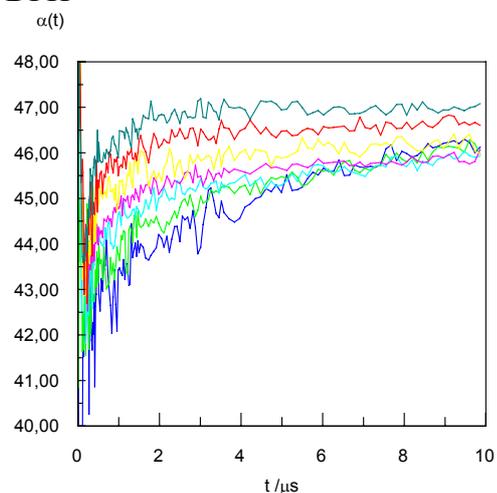
### 7.10.3 Relaxationen und Endwerte des mittleren Konuswinkels $\alpha_E$

(A)  $\beta$ -DPH pPC

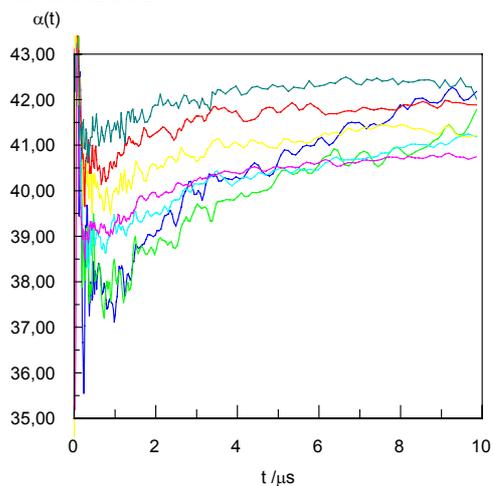
(B) DPH



(C) TMA-DPH



(D) PATMAN



(E) Zeaxanthin

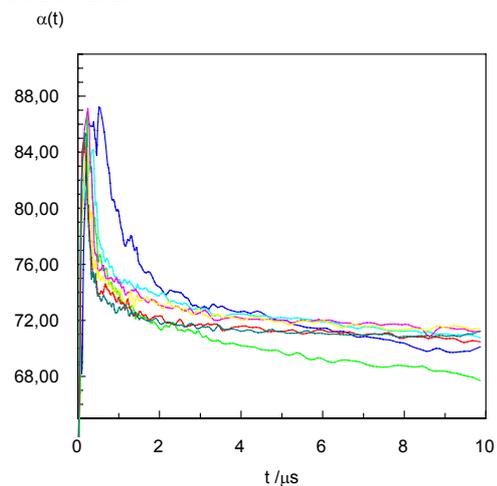
(F) DiIC<sub>16</sub>(3)

Abb. 42 Die mit Gl. (1.28) berechnete Einfeldrelaxation des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  der membran-gebundenen Farbstoffe  $\beta$ -DPH pPC (A), DPH (B), TMA-DPH (C), PATMAN (D), Zeaxanthin (E) und DiIC<sub>16</sub>(3) (E) in VET<sub>100</sub> als Funktion der Zeit für die Feldstärken  $E = 2$  ((blau) – 8 (dunkelgrün)) MV m<sup>-1</sup>. Exp. Bed. wie in Abb. 41.

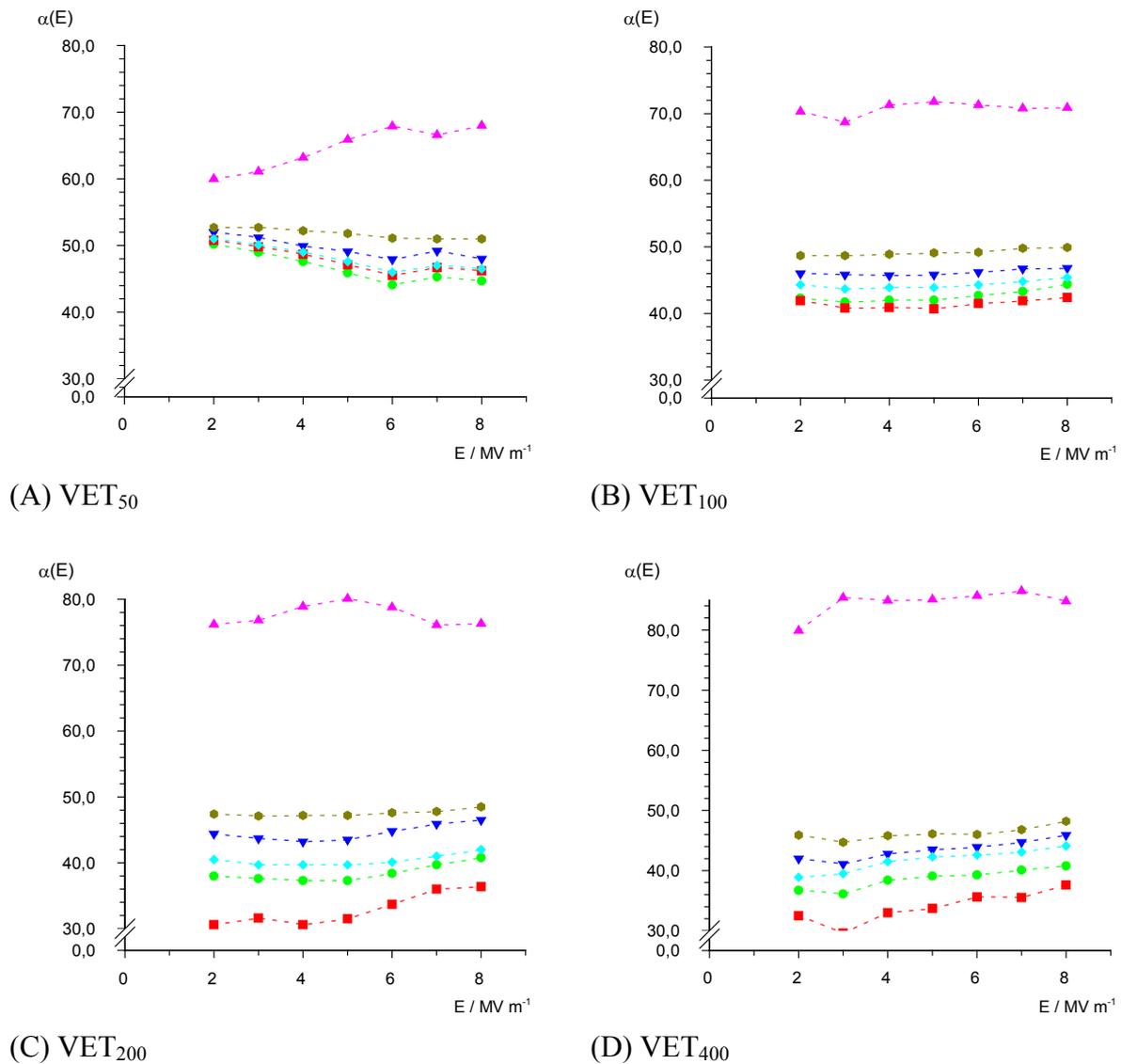


Abb. 43 Die Endwerte der Einfeld-Relaxation des mittleren Sonden-Konuswinkels  $\alpha_E$  der membran-gebundenen Farbstoffe  $\beta$ -DPH pPC (●), DPH (●), TMA-DPH (◆), PATMAN (▼), Zeaxanthin (■) und DiIC<sub>16</sub>(3) (▲) in VET<sub>50</sub> (A), VET<sub>100</sub> (B), VET<sub>200</sub> (C) und VET<sub>400</sub> (D) für die Feldstärken  $E = (2 - 8) \text{ MV m}^{-1}$ . Exp. Bed. wie in Abb. 41.

## 8 Danksagung

Diese Dissertationsarbeit wurde in der Zeit von 1995 bis 12.1999 und abschließend vom 01.05.2001 bis 02.2002 an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld am Lehrstuhl für Physikalische und Biophysikalische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. E. Neumann angefertigt.

Herrn *Prof. E. Neumann* danke ich für die Themenstellung und die ständige Diskussionsbereitschaft. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen und den Erfahrungsaustausch mit bekannten Wissenschaftlern im In- und Ausland bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Herrn *Dr. S. Kakorin* für viele wertvolle Anregungen, die gute Zusammenarbeit und wichtige Beiträge zur Theorie und Modellbildung, sowie intensive Diskussionen zur Auswertung und Interpretation experimenteller Daten.

Herrn *Dr. T. Griese*, meinem Laborkollegen, danke ich herzlichst für die sehr gute Zusammenarbeit und Kollegialität, die die tägliche Arbeit und wissenschaftliche Diskussionen positiv beeinflusst haben. Ich spreche ihm ausserdem meinen besonderen Dank für die Überlassung seines effektiven Feldsprungprogrammes und zahlreicher Routinen zur Datenauswertung aus. Durch seine Zusammenarbeit mit Herrn *Priv. Doz. Dr. U. Pliquett*, dem ich für seine wichtige technische Unterstützung ebenfalls sehr dankbar bin, gelang eine deutliche Verbesserung sowohl in der Qualität, als auch der Quantität der Leistung der Feldsprungapparatur.

Frau *Dr. K. Tönsing* danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit, ihre verlässliche Unterstützung und die interessanten Anregungen und Diskussionen zum Thema der Membranelektroporation.

Herrn *Prof. W. Knoche* danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn *Dr. C. R. Rabl* danke ich für die stete Gesprächsbereitschaft und sein großes Interesse an der Verbesserung der Feldsprunganlage.

Frau *A. Gieselmann*, Frau *I. Ehring* und Herrn *U. Güth* spreche ich meinen herzlichen Dank für die exzellente technische Assistenz und den Beistand bei der Erarbeitung neuer Präparationsmethoden aus. Dank schulde ich auch meinen fleissigen Blockpraktikanten Herrn *Dr. M. Reiher*, Frau *Dipl. Chem. R. Plessow* und Frau *Dipl. Chem. B. Engel* für ihre konstruktive Mitarbeit und zielstrebiges Arbeiten.

Nicht zuletzt danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Neumann für die sehr gute Zusammenarbeit und die allzeit angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn *Dr. K. Kratz* und *Dr. Th. Schröder* spreche ich meinen Dank für die zuverlässige und zeitunabhängige Durchführung zahlreicher dynamischer Lichtstremessungen aus.

Anschließend gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung der Projekte Ne227/9-1-4 an E.N..

Der Fa. Hoffmann LaRoche, Abt. f. Vitamin- u. Ernährungsforschung, danke ich für die freundliche Überlassung des Farbstoffs Zeaxanthin.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Name:** Thomas Liese

**Anschrift:** Breslauer Str. 8b  
33758 Schloß Holte  
Tel. +49-5207-920872  
Email: [tliese@gmx.de](mailto:tliese@gmx.de) / thomas.liese@uni-bielefeld.de

**Geburtsdatum/-ort:** 11.11.1961 in Gelsenkirchen

**Familienstand:** Verheiratet, 1 Kind

**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

### Bildungsweg

#### Schulbildung

1968 - 1970 Grundschole Mährfeldstrasse, Gelsenkirchen

1970 - 1972 Eichendorff-Grundschole, Bielefeld

1972 - 1981 Hans Ehrenberg-Gymnasium, Bielefeld

Juni 1981 Allgemeine Hochschulreife

#### Wehrdienst

Jan. 1982 - März 1983 Grundwehrdienst in Albersdorf (Schleswig-Holstein)

#### Hochschulstudium

Okt. 1983 **Beginn des Studiengangs Diplom Chemie** an der Universität Bielefeld

Mai 1987 **Vordiplom** im Studiengang Diplom Chemie

Mai 1994 **Beginn der Diplomarbeit** in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Neumann. Titel der Arbeit: „Der Einbau von Diphenylhexatrien in Lipidvesikelmembranen“ im Fachbereich Physikalische Chemie an der Universität Bielefeld

Jan. 1995 **Abschluß des Diplomstudiengangs Chemie**, Note: gut

Jan. 1995 **Beginn der Dissertation** in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Neumann: „Die Wirkung der Membrankrümmung auf die elektroporative Deformation sondenmarkierter Lipidvesikel“ im Fachbereich Physikalische und Biophysikalische Chemie an der Universität Bielefeld

April 2002 **Abschluß der Dissertationsarbeit**, Note: sehr gut

### **Berufstätigkeit im Studienrahmen**

- Projektierung, Installation und Administration des lokalen Windows NT 4.0 Netzwerks in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Neumann (Phys. Chemie III) an der Universität Bielefeld
- Mitarbeiter-Schulungen zu Applikationen und Betriebssystemen (MS-DOS, Win3.1-95, WinNT)
- Programmentwicklungen unter MS Visual Basic 5.0 und Datenbankdesign unter MS Access 7.0
- Aufbau und Administration des WWW-Servers der Phys. Chemie III
- Zusammenarbeit mit dem Hochschulrechenzentrum
- Hard- und Software-Fehlerbehebung (Netz & Host)
- Studentenbetreuung im Studiengang Diplom Chemie (Grund-/Fortgeschrittenenpraktikum) in Praktika und Übungen
- Mitarbeit beim Aufbau des Praktikums  
Biophysikalische Chemie und Studentenbetreuung

### **Berufliche Erfahrung**

ab Jul. 2000 **SerCon GmbH, IT-Beratungsunternehmen:**  
ASP-Consultant im Bereich *e-business enabling*,  
Microsoft-Services

Jan. - Jun. 2000 **bil consult GmbH, IT-Beratungsunternehmen:**  
Unternehmensberater Oracle RDB,  
Datenbankprogrammierung und SW-Dokumentation

Apr. - Aug. 1993 **Greiffenhagen GmbH, Wirtschaftsprüfungsunternehmen:** Durchführung von EDV-Schulungen zu

- seit März 1991
- vorhandener PC-Hard- und Software, Bielefeld
- **VHS Bielefeld:** Tätigkeit als selbstständiger EDV-Trainer in der Erwachsenenbildung.
  - **EDV-Beratertätigkeit** für klein- und mittelständische Unternehmen, sowie private Endkunden; Einrichtung u. Wartung von EDV-Systemen (Netzwerke)
- Okt. 1989 - Sep. 1990
- SWR EDV Hard- und Software:** Beratungs- und Programmierstätigkeit, u.a. Projektierung und Entwicklung einer Datenbank für Versicherungsnehmer unter MODULA II, Schloss Holte.
- Apr. 1988 - Sep. 1989
- Geschäftsführer der „rH-Programmsysteme GbR“**, Firmenziel: Realisierung einer ereignisorientierten Benutzeroberfläche als Grundlage zur Entwicklung eines Warenwirtschaftssystems für den Reifenhandel, Bielefeld.
- Mai - Aug. 1986
- Fa. Kurt Fischer, Kfz-Werkstatt:** Entwicklung eines integrierten Tankstellenverwaltungssystems unter Locomotive Basic mit ISAM, Bielefeld.

### **Sonstige Tätigkeiten**

- Juli 1998 - Mai 1999
- Stipendiat des Microsoft-Förderprogramms „MCP-CAMPUS 1998“

### **Sonstige Kenntnisse**

- Fremdsprachen: Englisch: fließend in Wort und Schrift
- Führerschein: Klasse I + III




---

Thomas Liese