

Die cytomimetische organische Chemie – ein erster Bericht

Fredric M. Menger* und Kurt D. Gabrielson

Dieser Aufsatz beschreibt, wie ein einfaches System, die Riesenvesikel, durch chemische und physikalische Reize zu einer Vielzahl cytomimetischer Umwandlungen wie Verschmelzung, Teilung, Endocytose, Knospung (budding), Aggregation, „Gebären“ (birthing) und „Fressen“ angeregt werden kann. Setzt man beispielsweise eine Riesenvesikel, in deren Innerem sich eine kleine Vesikel befindet, Octylglucosid aus, so kann die kleinere Vesikel die äußere Membran durchstoßen und in das umgebende Medium austreten (Ge-

bären, birthing). Die dabei entstehende Verletzung an der Membran der Wirt-vesikel verheilt sofort. Der Zusatz von Cholansäure löst hingegen die Futtersuche und den Freßvorgang aus, bei dem die Vesikel schnell wächst, indem sie sich die kleineren Nachbarvesikeln einverleibt. Ist die Nahrung verbraucht, zerstört sich die Riesenvesikel selbst (ein Beispiel für den natürlichen Prozeß aus Geburt, Wachstum und Tod). Diese lebensähnlichen morphologischen Veränderungen konnten mit käuflichen Chemikalien erzielt werden, d.h. diese

Prozesse sind der Organischen Chemie, und nicht etwa der Biologie oder Biochemie zuzuordnen. Dieser Aufsatz beinhaltet auch experimentelle Einzelheiten, beispielsweise über die Herstellung und Beobachtung von Vesikeln, in der Hoffnung, interessierten Lesern den Einstieg in dieses noch nicht entwickelte Arbeitsgebiet zu erleichtern.

Stichworte: Cytomimetische organische Chemie · Mikroskopie · Supramolekulare Chemie · Vesikeln

1. Einleitung

Die alten Griechen glaubten, daß die Umwandlung eines ungeordneten Universums (Chaos) in ein geordnetes (Kosmos) das Werk ihrer Götter sei. Heute scheinen die Ordnungsprinzipien, besonders die von komplexen biologischen Systemen wie Zellen, noch fast genauso rätselhaft wie vor Jahrhunderten zu sein. Auf mysteriöse Weise organisieren sich Moleküle zu komplizierten Verbänden, die das Phänomen „Leben“ hervorbringen. Obwohl lebende Systeme sehr wahrscheinlich den Grundgesetzen der Chemie unterworfen sind, geht ihr biologisches Verhalten von ihrer kollektiven und holistischen Natur aus. Die Biologie ist in Wirklichkeit organisierte Organische Chemie. Somit muß man sich fragen, ob die Eigenschaften organisierter organischer Moleküle aus den bekannten Eigenschaften der Einzelmoleküle vorhersagbar sind. Oder mit anderen Worten: Ist das Verhalten organischer Systeme eine einfache Extrapolation der Chemie von Einzelmolekülen? Wir konnten diese Fragen bereits mit „nein“ beantworten^[1]. Um mehr über organisierte Verbände und letztendlich über die Biologie zu erfahren, muß man sich von der Organischen Chemie der Einzelmoleküle lossagen und sich – trotz der zweifellos auftretenden Schwierigkeiten und Unsicherheiten – der Chemie der Molekülverbände zuwenden.

Betrachten wir die Rolle der π -Mesonen in der Chemie. Da π -Mesonen Bestandteil aller Atomkerne und somit auch Bestandteil des Kohlenstoffs sind, gehören sie notwendigerweise auch zur Organischen Chemie. (Eine Decarboxylierung ist beispielsweise mit dem Verlust von π -Mesonen verbunden.) Warum kümmern sich Chemiker dann überhaupt nicht um diese Elementarteilchen? Diese Frage läßt sich durchaus beantworten: Chemiker arbeiten auf einem Komplexitäts- und Ordnungsniveau, auf dem die Teilchenphysik bedeutungslos ist. Drei Zitate unterstützen diese allgemeine Feststellung. W. H. Thorpe: „The behavior of large and complex aggregates of elementary particles is not to be understood as a simple extrapolation of the properties of a few particles. Rather, at each level of complexity entirely new properties appear.“ P. W. Anderson: „At each level of organization, types of behavior open up which are entirely new and basically unpredictable from a... detailed analysis of the entities which make up the... higher level systems.“ Und A. R. Peacocke: „Higher levels of complexity are distinguished by some genuinely new features and activities, and these require distinctive theories, language, and concepts to describe them.“ Es ist die diesen Zitaten innewohnende Philosophie, die uns zu den Arbeiten motiviert hat, die wir auf den folgenden Seiten beschreiben wollen.

Vesikeln, auch Liposome genannt, sind kugelförmige Gebilde, die aus einer geschlossenen Lipidhülle, die einen mit Wasser gefüllten Innenraum umgibt, aufgebaut sind (Abb. 1). Unter bestimmten Bedingungen selbstorganisieren sich Lipide zu Rie-

[*] Prof. F. M. Menger, K. D. Gabrielson
Department of Chemistry, Emory University
Atlanta, GA 30322 (USA)
Telefax: Int. + 404/727-6586

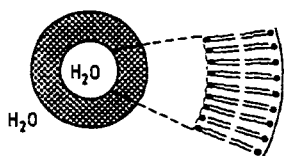


Abb. 1. Schematische Darstellung einer aus einer einzigen Lipiddoppelschicht aufgebauten, unilamellaren Vesikel.

senvesikeln, die die Größe lebender Zellen haben^[2]. Wie wir später im einzelnen noch zeigen werden, können bei Riesenvesikeln viele zellähnliche Prozesse wie Aggregation, Knospung, Verschmelzung und Teilung beobachtet werden^[3]. Dieses Verhalten bezeichnen wir als cytomimetische

Chemie^[4]. Wir haben zwar einige Bedenken, diesen neuen Begriff einzuführen, doch erscheint uns die Bezeichnung cytomimetisch für die eindrucksvollen, unter dem Lichtmikroskop sichtbaren, morphologischen Veränderungen durchaus treffend. Und, um es mit den Worten von J. S. Mill zu umschreiben: „Hardly any thoughts ever make their way among mankind, even in the minds of their inventors, until aptly selected words nail them down and hold them fast.“

Wir sind natürlich nicht die ersten, die die cytomimetische Chemie fasziniert. Schon vor mehr als sechzig Jahren haben Crile et al.^[5] eine brillante Arbeit veröffentlicht, in der sie die Vorgänge beschrieben, die beim Vereinigen der etherlöslichen Fraktion von Hirngewebe, d. h. die Lipide, mit der wasserlöslichen Fraktion, d. h. den Proteinen und Nucleinsäuren, zu beobachten sind^[6]. Innerhalb weniger Minuten bildeten sich im Wasser auffällige Strukturen, die sie als sich selbst aufbauende Zellen (autosynthetic cells) bezeichneten. Jedes dieser Gebilde enthielt eine im Mikroskop sichtbare zentrale Organelle, ähnlich einem Zellkern. Die Strukturen wuchsen langsam, vermehrten sich durch Knospung (budding) oder direkte Teilung und bewegten sich gelegentlich wie eine Amöbe. Sie hatten sogar einen hohen Sauerstoffverbrauch. Obwohl diese Entdeckungen von anderen bestätigt wurden^[7, 8], blieben sie so gut wie nicht beachtet. Wir sind zur Zeit dabei, diese Arbeit wieder aufleben zu lassen (wir konnten dem Wunsch einfach nicht widerstehen!), doch hier diskutieren wir ausschließlich sehr viel einfachere Systeme, die aus Substanzen aufgebaut sind, die nicht direkt biologischen Ursprungs sind.

Wir möchten betonen, daß in diesem Aufsatz einführende Untersuchungen beschrieben werden. Wir haben mit unseren Arbeiten vor genau zwei Jahren in einem kleinen Büroraum begonnen, den wir umbauten, um ein Mikroskop aufstellen zu

können. Wir wollten die Reaktion von Riesenvesikeln bei der Einwirkung von Chemikalien, Hitze, Berührung oder anderen Reizen beobachten. Von dieser ersten Forschungsphase erhofften wir uns, Informationen sammeln zu können, jedoch keine unmittelbaren, aufklärenden Erkenntnisse. J. F. Wilford hat diese Situation treffend beschrieben: „Science proceeds first by open exploration, the time of initial discoveries. Then follows reconnaissance, gathering evidence on a broad front, pursuing leads to the far corners of the problem, and generating preliminary hypotheses. Finally, if warranted by the results of the exploration and reconnaissance, there comes the time for detailed studies and the testing of more informed hypotheses.“ Wir befinden uns in jeder Beziehung in der „ungehinderten Entdeckungsphase“ (open exploration phase). Nichtsdestotrotz sind die bisherigen Ergebnisse so verblüffend, daß ihre Veröffentlichung – in der Hoffnung, auch andere für dieses Unterfangen zu begeistern – gerechtfertigt erscheint.

Da dieser Aufsatz einen großen Kreis von Nichtfachleuten ansprechen soll, haben wir versucht, einen wissenschaftlich nüchternen Schreibstil zu vermeiden. Diese Forderung war einfach zu erfüllen, denn gemäß den Worten von A. Lavoisier gilt: „When we begin the study of any science, we are in a situation, respecting that science, similar to that of children.“ Tatsächlich haben wir auch unzählige Male mit kindlichem Staunen die Dynamik unserer Riesenvesikeln verfolgt.

2. Kurzer Überblick über die Geschichte der Riesenvesikeln

A. Einstein sagte: „A hundred times every day, I remind myself that my inner and outer life are based on the labors of other men, living and dead, and that I must exert myself to give in the same measure as I have received.“ Auch wir haben anderen viel zu verdanken, die schon vor uns Riesenvesikeln und verwandte Systeme untersucht haben. 1911 schrieb Otto Lehmann ein Buch mit dem Titel „Die flüssigen Kristalle“ und veröffentlichte darin Mikrophotographien von langen Tubuli, die sich an den Rändern hydratisierter Phospholipidfilme entwickelten^[2]. Er beobachtete auch Vesikelstrukturen, die er als „künstliche Zellen“ bezeichnete. Wie wir sehen werden, waren

Fredric M. Menger ist im nördlichen gemäßigten Klima geboren, aufgewachsen und ausgebildet worden. Seiner im Text erkennbaren Vorliebe für Zitate folgend, bedient er sich der Worte des Alt-Rockstars Frank Zappa: „I write because I am personally amused at what I do.“ Da ihm bewußt ist, daß sein Professoren-Schreibtisch ein gefährlicher Standort ist, um über die Welt nachzudenken und zu urteilen, reist er häufig in entlegene Gegenden, oftmals in Begleitung seiner Blues-Harmonika.

Kurt D. Gabrielson hat die meisten der in diesem Aufsatz beschriebenen Versuche durchgeführt. Er legte seinen B.-S.-Abschluß am Rhode Island College ab und hat vor kurzem an der Emory University promoviert. Er arbeitet jetzt für die Georgia Pacific Corporation.



F. M. Menger



K. D. Gabrielson

die Tubuli von Lehmann für unsere eigenen, achtzig Jahre später durchgeführten Forschungsarbeiten von Bedeutung. D. Hammarskjöld stellte einst die Frage: „Why this desire in all of us that, after we have disappeared, the thoughts of the living shall now and again dwell upon our name?“ Für Otto Lehmann ist dieser Wunsch nach Unsterblichkeit – zumindest in unserer Arbeitsgruppe – in Erfüllung gegangen.

Vor allem aus praktischen Gründen blieb das System von Lehmann lange Zeit unbeachtet, bis es Mitte der sechziger Jahre von Alec Bangham wieder zum Leben erweckt wurde. (Es gibt fürwahr eine Veröffentlichung, in der Vesikeln als „Bangosome“ bezeichnet werden.) Bangham hat als einer der ersten klar erkannt, was uns heute als Selbstverständlichkeit erscheint, und zwar, daß in Vesikeln ein Innenraum durch eine semipermeable Barriere, die Lipiddoppelschicht^[9], vom umgebenden Medium abgetrennt ist. Substanzen im Inneren der Vesikeln sind damit – zumindest zeitweilig – vom umgebenden Medium geschützt. Diese Tatsache und die Fähigkeit, Vesikeln an spezifische, biologisch wichtige Stellen zu lenken, hat ein beachtliches kommerzielles Interesse hervorgerufen. Da künftige Anwendungsmöglichkeiten von Vesikeln in Pharmakologie, Medizin, Kosmetik, Diagnostik usw. bereits anderswo beschrieben sind^[10], fügen wir dem an dieser Stelle nur wenig hinzu. Wir wollen uns mit der Feststellung begnügen, daß Lipide äußerst interessante und nützliche Verbindungen sind, und zwar nicht wegen ihrer Molekülstruktur, sondern wegen ihrer aggregierten Form. Organisierte Lipidverbände sind in der Natur allgegenwärtig, so daß E. Chargaff mutmaßte: „Our souls may reside in fat.“

Die meisten Untersuchungen über Vesikeln sind mit sogenannten kleinen unilamellaren Vesikeln (small unilamellar vesicles, SUVs) oder großen unilamellaren Vesikeln (large unilamellar vesicles, LUVs) durchgeführt worden^[11]. Beides sind submikroskopische Strukturen mit Durchmessern von 30–50 nm bzw. 100–200 nm. SUVs werden typischerweise wie folgt hergestellt^[12]: Lecithin oder irgendein anderes Phospholipid (20 mg in 200 µL CHCl₃) wird in ein kleines Glasfläschchen (Volumen: 4 dram) gegeben und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft. Der zurückbleibende Lipidfilm wird anschließend bei vermindertem Druck getrocknet, mit 2.0 mL Pufferlösung versetzt und bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids (70 °C ist für die meisten Lipide ausreichend) für 15 min einem Ultraschallbad oder einer Ultraschallsonde ausgesetzt. Die Größenverteilung der so hergestellten SUVs kann durch dynamische Lichtstreuung ermittelt werden. LUVs werden für gewöhnlich durch schnelles Einspritzen einer Alkohollösung des Lipids in eine Pufferlösung erhalten^[13]. Bei einem anderen Herstellungsverfahren wird eine Etherlösung des Lipids langsam in eine warme wäßrige Lösung injiziert, wobei der Ether verdampft und sich das Lipid zu großen Vesikeln zusammenlagert^[14].

Drei Nachteile der SUV- und LUV-Systeme sollten erwähnt werden: a) Im allgemeinen haben SUVs und LUVs breite Größenverteilungen. Dies kann zu einem Problem werden, wenn Vesikeln unterschiedlicher Größe nicht dieselben Eigenschaften aufweisen (Permeabilität, Spektren usw.). b) SUVs und LUVs mit einem kleinen Durchmesser haben eine viel stärker gekrümmte Oberfläche als die bedeutend flacheren Zellmembranen. Die Krümmung stört die Lipidanordnung und beeinflusst auf diese Weise das Membranverhalten. c) Da SUVs und

LUVs unter dem Lichtmikroskop nicht sichtbar sind, sind viele Informationen schwierig zu erhalten. So ist es beispielsweise nicht einfach, zwischen einer Verschmelzung und einer Aggregation von SUVs zu unterscheiden. Eine Wellung der Membrandoppelschichten kann fast nicht nachgewiesen werden. Außerdem sind SUV- und LUV-Systeme für die Untersuchung von Verletzungs- und Heilungsprozessen innerhalb der Membran ungeeignet. Aus all diesen Gründen haben wir uns der Untersuchung von sogenannten Riesenvesikeln zugewendet, die unter dem Lichtmikroskop direkt sichtbar sind.

Zu einem Zeitpunkt, als wir tief in die Erforschung von SUVs und LUVs verstrickt waren^[15], beschworen wir die berühmten drei Fragen Kants herauf: Was kann ich erfahren? Was sollte ich tun? Was darf ich erhoffen? Hinsichtlich der ersten Frage hatten wir das Gefühl, daß wichtige Prozesse (beispielsweise die bereits erwähnte Verletzung und Heilung von Membranen) mit Hilfe von SUV/LUV-Systemen nicht eindeutig aufgeklärt werden können. Wir hielten es daher für ratsam, zur Erforschung von Riesenvesikeln überzugehen, womit die zweite Frage beantwortet ist. Und welche Hoffnungen knüpfen sich an diesen Entschluß? Die Beantwortung dieser Frage steht natürlich im Mittelpunkt dieses Aufsatzes.

Bevor wir fortfahren, ist es sinnvoll, einen wichtigen Parameter, die Vesikelgröße, näher zu betrachten. In Tabelle 1 sind die

Tabelle 1. Durchmesser verschiedener chemischer und biologischer Partikel.

	Å	nm	µm	mm
Micelle	50	5		
SUV	300–500	30–50		
LUV	1000–2000	100–200	0.1–0.2	
Tollwut-Virus	1300	130	0.13	
Typhus-Bacillus	7000	700	0.70	
rotes Blutkörperchen	7 × 10 ⁴	7 × 10 ³	7	0.007
Amöbe	10 × 10 ⁵	10 × 10 ⁴	100	0.10
Riesenvesikel	0.5–20 × 10 ⁵	0.5–20 × 10 ⁴	5–200	0.01–0.20

Durchmesser von Vesikelarten und biologischen Objekten in mehreren Einheiten wiedergegeben. Riesenvesikeln haben ähnliche oder sogar größere Ausmaße als Zellen und sind daher im Mikroskop sichtbar. Obwohl die Herstellung von Riesenvesikeln normalerweise polydispers verläuft, d. h. es entstehen Vesikeln unterschiedlicher Größe, spielt dies – anders als bei SUV/LUV-Systemen – keine besondere Rolle, da wir bei unseren Experimenten stets nur eine einzelne Vesikel für die Untersuchung auswählen, und die Größe dieser Vesikel ist stets bekannt.

Da dieser Aufsatz in Teilen eine Art einführendes Lehrbuch über Riesenvesikeln sein soll, möchten wir die bekannten Herstellungsverfahren für Riesenvesikeln zusammenfassen.

2.1. Trocknungs-Rehydratisierungs-Verfahren^[16]

1–3 mg Phospholipid werden in einem 5 mL-Rundkolben in 1 mL CHCl₃/MeOH (10:1) gelöst. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgedampft, wobei der Kolben so horizontal wie möglich ausgerichtet wird, um eine möglichst große Filmfläche zu erhalten. Danach gibt man vorsichtig 5 mL entio-

nisiertes Wasser zu oder eine wäßrige Lösung, die weniger als 1 mM Salz enthält, daß der Lipidfilm nicht zerstört wird, und setzt den Kolben für eine Stunde in ein warmes Wasserbad (70 °C). In diesem Zeitraum löst sich der hydratisierte Film von den Wänden des Kolbens (Abb. 2). Erhitzt man weiter (4 Stun-

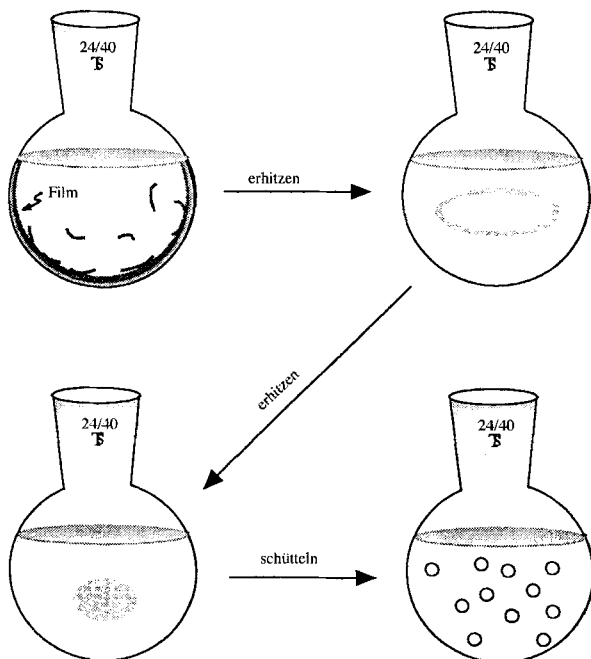


Abb. 2. Herstellung von Riesenvesikeln nach dem Trocknungs-Rehydratisierungs-Verfahren. Phospholipide werden häufig bei 70 °C hydratisiert, für Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB) sind 50 °C ausreichend.

den bis 2 Tage), bildet das Lipid eine einzige Kugel von etwa 1 cm Durchmesser, die an ein im Wasser schwebendes durchsichtiges Meerestier erinnert. Der Kolben wird aus dem Wasserbad genommen und – solange er noch warm ist – für wenige Sekunden (nicht länger!) geschüttelt. Dies bewirkt, daß die Kugel zu einer polydispersen Ansammlung von Riesenvesikeln zerfällt, die in einer nahezu klaren Lösung suspendiert sind. Die Größenverteilung der Vesikeln ist abhängig von der Inkubationszeit sowie von der Dauer und Heftigkeit des Schüttelns. Modifizierungen dieses Herstellungsverfahrens sind in der Literatur beschrieben^[17].

2.2. Dialyse-Verfahren^[18]

Bei diesem Verfahren wird eine Lösung von 200 mg 1-*O*-Methylglucosid und 10 mg Lipid in 400 µL Methanol für zwei Tage gegen eine Pufferlösung mit pH = 7.4 dialysiert. Es bilden sich Riesenvesikeln unter Bedingungen, bei denen die Komponente im Innenraum fortwährend hyperosmotisch ist. Die Durchmesser der Riesenvesikeln liegen zwischen 10 und 100 µm. Es wird behauptet, daß die Riesenvesikeln überwiegend unilamellar, d. h. aus einer einzigen Doppelschicht aufgebaut, und nicht multilamellar, d. h. aus mehreren Doppelschichten in zwiebelartiger Anordnung aufgebaut sind. Auch Natriumtrichloracetat kann verwendet werden, um einen osmotischen Gradienten an der

Doppelschicht zu erhalten^[19]. Das Dialyse-Verfahren hat gegenüber dem Trocknungs-Rehydratisierungs-Verfahren den Vorteil, daß es bei hohen Salzkonzentrationen eingesetzt werden kann. Dennoch besteht immer die Gefahr einer Kontaminierung durch den „indifferenten gelösten Stoff“.

2.3. Gefrier-Tau-Verfahren^[20]

Riesenvesikeln können aus SUV-Systemen, die mit Hilfe von Ultraschall in Wasser erzeugt wurden, hergestellt werden, wenn man letztere mehrfach in flüssigem Stickstoff einfriert und anschließend wieder auftaut. Dieses Verfahren ist besonders für proteinhaltige Lipidsysteme zu empfehlen, da beim Trocknungs-Rehydratisierungs-Verfahren und bei der Dialyse die Proteine denaturieren könnten.

2.4. Feststoffhydratisierungs-Verfahren

Aus unserer Sicht ist es besonders wichtig, die Bildung multilamellarer, zwiebelartig aufgebauter Vesikeln wegen ihrer Komplexität möglichst gering zu halten. So ist beispielsweise eine Vesikelverschmelzung nur schwer zu interpretieren, wenn mehrere Lipidschichten unterschiedlicher Krümmung an diesem Vorgang beteiligt sind. In unserem Laboratorium führten alle drei oben beschriebenen Methoden, insbesondere das Dialyse- und das Gefrier-Tau-Verfahren, sowohl mit Phospholipiden als auch mit synthetischen Tensiden zu erheblichen Mengen an multilamellaren Vesikeln. Wir haben ein viertes Verfahren entwickelt, das mit einem synthetischen Lipid, Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB), in mehr als 90% der Fälle zu unilamellaren Vesikeln führt^[4].

Bei diesem Verfahren werden 0.1–0.2 mg DDAB in eine auf einen Objektträger geklebte Gummischeibe (14 mm Innendurchmesser) gegeben. Danach überdeckt man das Pulver mit 450 µL Wasser, so daß es hydratisieren kann. (Die Mengen an DDAB und Wasser sind wichtig; zuviel DDAB führt zu multilamellaren Vesikeln, während bei zu wenig DDAB nur wenige Vesikeln im Mikroskop zu erkennen sind. Wie man in Abbildung 3 an der Bildung Wurm-ähnlicher Tubuli (Myelin-Formen) an der Oberfläche der Feststoffpartikel sehen kann, beginnt die Hydratisie-

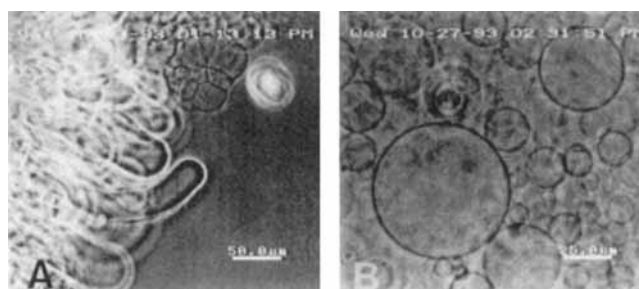
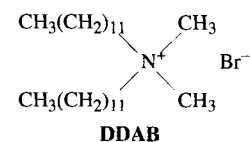


Abb. 3. Mit Hilfe von Phasentransfer-Mikroskopie beobachtete Hydratisierung von DDAB-Pulver. A: Anfängliche Bildung von Tubuli. B: Nachfolgende Bildung von unilamellaren Riesenvesikeln (GUVs).

rung sofort. Nach etwa fünf Minuten beobachtet man viele Trauben-artige Cluster, von denen einige in 5–10 µm große Vesikeln übergehen. Die restlichen Cluster entwickeln sich – über einen kaum verstandenen, zwei Stunden dauernden Verschmelzungsprozeß – zu unilamellaren Riesenvesikeln. Diese können durch Phasenkontrast-Mikroskopie problemlos von den trübe-ren, multilamellaren Vesikeln unterschieden werden. Unilamel-lare Riesenvesikeln werden von nun an als GUVs (giant unila-mellar vesicles) bezeichnet.

Die zuvor beschriebene Arbeitsvorschrift führt mit DDAB zu guten Ergebnissen, während sie für Phospholipide weniger ge-eignet ist. Nach unserer Erfahrung müssen die Reaktionsbedin-gungen bei der Herstellung von GUVs für jedes Lipid und jede Temperatur individuell erarbeitet werden. Da wir mit DDAB (selbst in Gegenwart von Zusatzstoffen wie Cholesterin) ausge-zeichnete Präparationen erhalten haben und da diese eine Viel-zahl zellähnlicher morphologischer Veränderungen zeigen, ha-ben wir für unsere ersten Untersuchungen ausschließlich DDAB verwendet. Es gibt jedoch keinen prinzipiellen Grund, warum unser Herstellungsverfahren nicht auf andere, natürliche oder synthetische, Lipide übertragbar sein sollte.

Die nach dem Feststoffhydratisierungs-Verfahren aus DDAB hergestellten, unilamellaren Riesenvesikeln sind für zwei bis drei Tage stabil und neigen danach zur Aggregation. Man beachte, daß GUVs trotz ihrer spontanen Bildung nicht einem globalen Energieminimum entsprechen^[21]. Das Energieminimum wird tatsächlich von ebenen Doppelschichten eingenommen; um eine Krümmung dieser Schichten zu erreichen, muß Energie zuge-führt werden. Konvektionsströme und Vibrationen (die man normalerweise überhaupt nicht bemerkt) reichen aus, um die leichte Krümmung der GUVs herbeizuführen. Stark gekrümmte GUV-Systeme werden – wie bereits erwähnt – durch Einwir-kung von Ultraschall erzeugt. Da GUVs, Tubuli und viele ande-re Strukturvarianten relativ flach sind und somit eine ähnliche Energie aufweisen, ist eine Vielzahl ineinander überführbarer Erscheinungsformen möglich.

Bevor wir fortfahren, kann der Leser zurecht die Beantwor-tung einiger grundlegender Fragen erwarten; die bedeutendste ist wohl folgende: Woher wissen wir überhaupt, daß unsere GUVs tatsächlich unilamellar sind (d. h. von nur einer einzigen Lipiddoppelschicht umhüllt sind)? Dies ist alles andere als eine triviale Frage, wie schon die Tatsache beweist, daß wir am An-fang unserer Forschung multilamellare Vesikeln für unilamella-re gehalten haben. Diese Verwechslung hatte drei Ursachen: a) In der Literatur über Riesenvesikeln werden – häufig ohne aus-reichende Beweise – unilamellare Strukturen postuliert. Zu Be-ginn haben wir genauso gehandelt. b) Wie wir bereits erwähnt haben, sind unilamellare Vesikeln sehr viel begehrtenwerter als multilamellare. Wir hätten uns daher an das folgende Zitat von H. J. Van Till erinnern sollen: „The purpose of empirical re-search is to discover what the physical world is really like, not to verify its conformity to our preferences.“ c) Überdies waren wir als Chemiker Anfänger beim Benutzen des Lichtmikro-skops. Erst nachdem wir genügend Erfahrungen im Umgang mit dem Lichtmikroskop gesammelt hatten, konnten wir zwis-chen uni- und multilamellaren Vesikeln unterscheiden.

Es stellte sich heraus, daß Vesikeln im gewöhnlichen Hellfeld-Lichtmikroskop nicht sichtbar sind, da die Brechungsindices der Vesikeln und des wäßrigen Mediums einander zu ähnlich

sind. Wir haben uns daher der Phasenkontrast-Mikroskopie zugewandt, die in solchen Fällen besonders geeignet ist. Bei der Phasenkontrast-Mikroskopie wird ein ausgehölter Lichtkegel (hollow cone of light) durch die Probe geschickt. Auf diese Wei-se tritt auch dann eine Veränderung der Helligkeit an Grenzli-nien auf, wenn der Unterschied der Brechungsindices nur gering ist. Eine Phasenkontrast-Beleuchtung läßt sich auf einfache Weise erhalten, indem man einen preiswerten „Metallring“ in den Kondensor des Mikroskops einschiebt. Weitere Einzelhei-ten zur Phasenkontrast-Optik finden sich in der Lit.^[22].

Abbildung 4 zeigt Phasenkontrast-Mikrophotographien von DDAB-Riesenvesikeln mit einem Durchmesser von 90 µm bei 400facher Vergrößerung. Obwohl die Vesikeln kugelförmig sind, erscheinen sie eben, da die Schärfentiefe des Mikroskops (1.5 µm bei einer 40fach vergrößernden Objektivlinse) viel klei-ner ist als der Vesikeldurchmesser. Mit der Phasenkontrast-Mikroskopie kann man also nur einen dünnen Lipidring am Vesikeläquator anstatt der gesamten Vesikel sehen. Versuche, Bereiche oberhalb oder unterhalb des Äquators scharfzustellen, ergeben nur verschwommene Bilder. In Abbildung 4A ist eine typische multilamellare Vesikel dargestellt. Man kann sie an-hand einer Trübung und einer vom Medium abweichenden Textur ohne Schwierigkeiten als solche identifizieren. Die Vesi-keln in Abbildung 4B und 4C sind ebenfalls multilamellar. Da

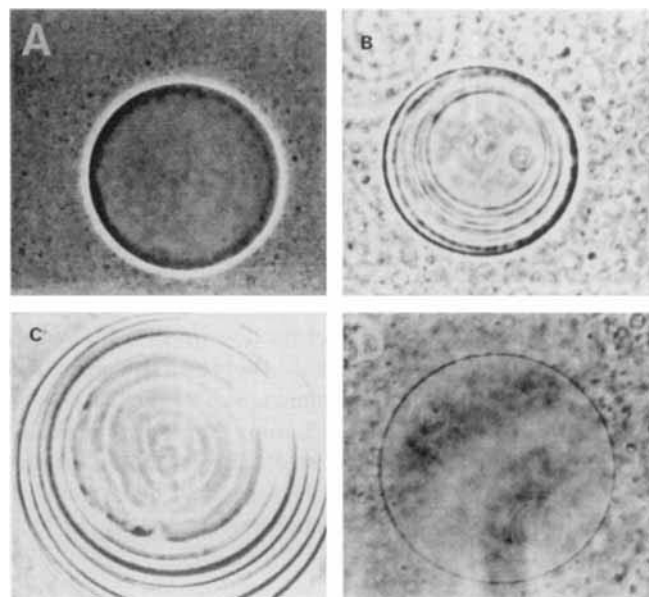


Abb. 4. Phasenkontrast-Mikrophotographien einer multilamellaren (A), einer oli-golamellaren (B und C) und einer unilamellaren Riesenvesikel (D).

sie jedoch weniger dicht gepackt sind, können die Schichten hier aufgelöst werden. Abbildung 4D zeigt schließlich eine unilamel-lare Riesenvesikel des von uns in der Membranforschung bevor-zugten Typs.

Eine Lipiddoppelschicht, deren Dicke nur 40 Å beträgt, kann natürlich nicht unter einem Lichtmikroskop sichtbar sein. Der dunkle Ring in Abbildung 4D ist somit ein optischer Effekt und entspricht keinesfalls der wirklichen Membrandicke. Ebenso-we-nig kann mit dem Lichtmikroskop zwischen einer aus einer ein-zelnen Doppelschicht (wahre GUVs) und einer aus wenigen

Doppelschichten aufgebauten Membran unterschieden werden. Obwohl eine derartige Unterscheidung aus der Sicht unserer Experimente kaum eine Rolle spielt, glauben wir aus den folgenden Gründen, daß tatsächlich wahre unilamellare Vesikeln entstehen: a) Werden GUVs chemisch oder physikalisch zerstört, so verschwindet der Ring vollständig (Abb. 4D), ohne daß ein sichtbarer innerer Ring zurückbleibt. (Bei multilamellaren Vesikeln sieht man dagegen häufig, daß die einzelnen Schichten nach und nach abgeschält werden.) b) In der Literatur veröffentlichte kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von Vesikeln lassen – ähnlich wie Abbildung 4D – eine einzelne Doppelschicht vermuten^[23]. c) Sogenannte Doppelschicht-Lipidmembranen (bilayer lipid membranes, BLMs), in denen ein Film von 60–100 Å Dicke ein 1 mm großes Loch in einer Teflonplatte überspannen kann^[24], gelten als Beweis dafür, daß ein oder zwei Doppelschichten die Fähigkeit haben, eine einheitliche, unversehrte Struktur über makroskopische Entfernungen aufrechtzuerhalten.

3. Literatur

Als uns der Gedanke kam, Riesenvesikeln zu untersuchen, wußten wir nur sehr wenig über deren Herstellung und Beobachtung sowie über Manipulationsmöglichkeiten. T. S. Elliot meinte: „Between the idea and reality stands the shadow.“ Frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben uns geholfen, Licht ins Dunkel zu bringen. Unter den wenigen Veröffentlichungen über Riesenvesikeln sind einige, die für unsere Arbeiten von besonderer Bedeutung waren, und diese wollen wir nun kurz beschreiben.

Experimente an Riesenvesikeln, die (über die Dehydratisierungs-Rehydratisierungs-Methode) aus Hirnlipiden, Ei-Lecithin und synthetischen Phospholipiden hergestellt wurden, sind von Mueller et al.^[25] recht früh veröffentlicht worden. Diese Arbeiten lieferten einige interessante Erkenntnisse: a) Vesikeln können in destilliertem Wasser und in Lösungen von Nicht-elektrolyten erzeugt werden, aber nicht in salzhaltigen Lösungen, in denen die Lipide ausfallen. b) Nach einer Wachstumsperiode von mehreren Tagen sind die Vesikeln über einige Wochen stabil. c) Vesikeln können durch Zentrifugieren in speziellen Röhrchen nach ihrer Größe separiert werden. Die Riesenvesikeln überstehen offenbar eine Beschleunigung von 40000 g über 30 min (unsere DDAB-Vesikeln sind hingegen zu labil, um eine derartige Mißhandlung auszuhalten). d) In destilliertem Wasser hergestellte Vesikeln scheinen unter osmotischem Druck (unbekannten Ursprungs) zu stehen. Bricht man sie physikalisch auf, so wird der Inhalt des Vesikelinnenraums schnell ausgestoßen. e) Die von Mueller et al. veröffentlichten Mikrophotographien wurden durch Dunkelfeld-Mikroskopie erhalten. Bei dieser Technik (die – ähnlich wie die Phasenkontrast-Mikroskopie – ein spezielles Zubehör im Kondensor erfordert) wird eine Vesikel als ein Lichtring auf einem dunklen Hintergrund abgebildet (Abb. 5). Nach unserer Erfahrung wird ein solcher Lichtring hauptsächlich bei multilamellaren Vesikeln beobachtet. Man sollte sich daher davor hüten, von einer einzelnen Hülle in der Dunkelfeld-mikroskopischen Aufnahme auf eine unilamellare Struktur der Vesikel zu schließen.

Zimmermann et al.^[26] haben unter dem Lichtmikroskop eine durch ein elektrisches Feld ausgelöste Verschmelzung von Riesenvesikeln, die aus einem 1:1-Gemisch eines kationischen Lipids und Cholesterin gebildet wurden, beobachtet. Das Anlegen eines elektrischen Wechselfelds (200 V cm^{-1} , 100 kHz) führte dazu, daß die Vesikeln zunächst in direkten

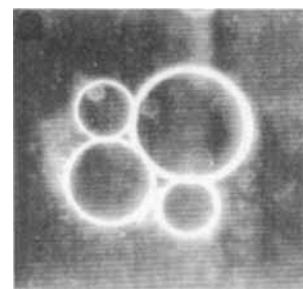


Abb. 5. Dunkelfeld-Mikrophotographie von multilamellaren Riesenvesikeln.

Kontakt miteinander traten (Abb. 6). Die Verschmelzung, die sich innerhalb einer Sekunde vollzog, wurde ausgelöst, indem man das AC-Feld abstellte und die Probe für 20–50 µs einem Spannungsstoß von $3\text{--}9 \text{ kV cm}^{-1}$ aussetzte. Man vermutet, daß durch das elektrisch induzierte Aufbrechen der Membran eine Vielzahl nebeneinanderliegender Poren in der Kontaktzone erzeugt werden (Abb. 6). Bei der Reorganisation des Lipids ver-

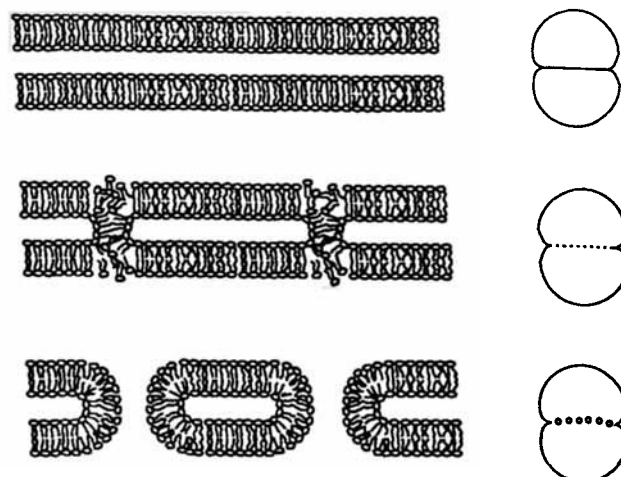
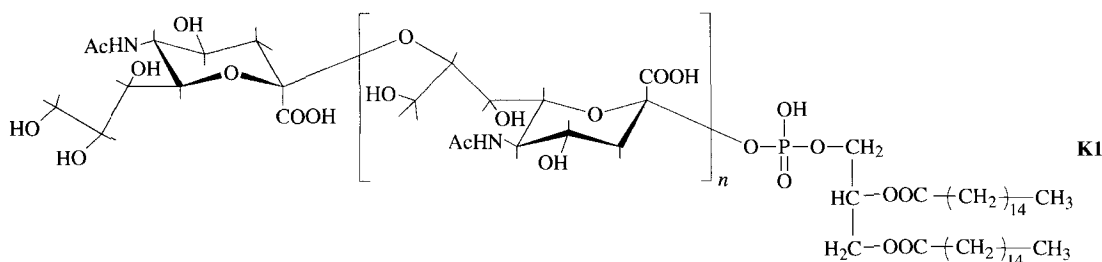


Abb. 6. Schematische Darstellung einer durch ein elektrisches Feld ausgelösten Vesikelverschmelzung; aus Lit. [26].

binden sich dann die beiden Riesenvesikeln. Gleichzeitig bilden sich mit dem Mikroskop nicht erkennbare GUVs, die in der neuen Vesikel eingeschlossen sind.

Die Arbeitsgruppe von H. Ringsdorf^[27] hat ein aus *E. coli* isoliertes Polysaccharid K1 in ein Riesenvesikel-Präparat injiziert. Man fand heraus, daß sich K1 in die Vesikeldoppelschicht einbaut, vermutlich über Lipidbausteine von K1. Die Bindung von K1 an die Vesikel wurde nachgewiesen, indem man dem Präparat einen Fluoreszenz-markierten anti-K1-Antikörper setzte. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop waren Riesenvesikeln mit stark fluoreszierender Peripherie zu erkennen, ein eindeutiger Beweis für die Anreicherung des Antikörpers an der äußeren Membranoberfläche. Gab man K1 nicht zu, so war die Antikörper-Fluoreszenz gleichmäßig über das wäßrige Medium verteilt.

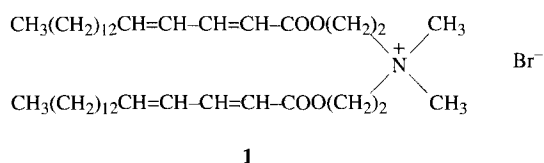
Es sollte noch erwähnt werden, daß dieses Experiment nur eines von einigen wunderbaren Arbeiten ist, die in Lit.^[27] beschrieben sind. Die 1988 erschienene Übersicht, in der auch die



Endocytose, Lochbildung, Vesikeldomänen und Polymerisationsprozesse besprochen werden, ist eine Pflichtlektüre für jeden, der in das Forschungsgebiet der Riesenvesikeln einsteigen will. Wir sind von ihr in vieler Hinsicht inspiriert worden.

Einige der Veröffentlichungen von E. Sackmann auf dem Membrangebiet befassen sich mit Riesenvesikeln. Vier Experimente sollen hier besprochen werden:

Experiment 1^[28]: Es wurden Riesenvesikeln aus dem quartären Ammoniumlipid **1**, das eine Phasenübergangstemperatur



von 42 °C aufweist, hergestellt. (Die Phasenübergangstemperatur ist die Temperatur, bei der ein Lipid vom hochgeordneten Gelzustand in den weniger geordneten flüssigkristallinen Zustand übergeht.) Die normalerweise kugelförmigen Vesikeln nahmen bei 42 °C eine scheibenartige Gestalt an (Abb. 7). Bei

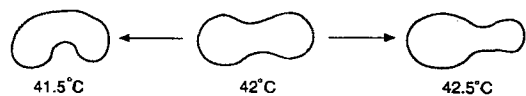
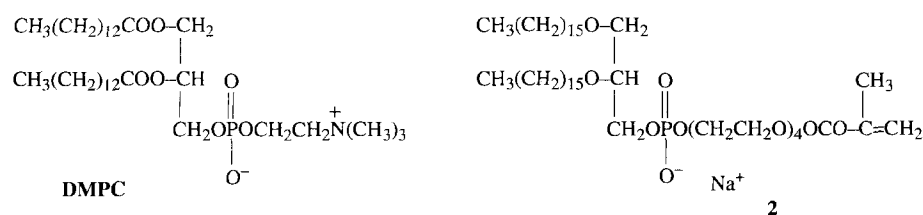


Abb. 7. Änderung der Gestalt einer aus synthetischem Lipid aufgebauten Riesenvesikel bei Anhebung oder Absenkung der Temperatur um $0,5^{\circ}\text{C}$ über bzw. unter die Phasenübergangstemperatur von 42°C [28].

einer Erhöhung der Temperatur auf 42.5 °C veränderte sich die Vesikelform zu einem Kegel (Bowlingpin), während sie bei 41.5 °C sichelartig eingestülpt wurde. Eine so starke Abhängigkeit der Morphologie von der Temperatur konnten wir bei unseren Versuchen mit den nahe verwandten DDAB-Vesikeln nicht feststellen. Die Membranomorphologie hängt offensichtlich in bisher noch nicht verstandener Weise von der Lipidstruktur ab.

Experiment 2^[29]: Löst man bei Riesenvesikeln, die aus einem 4:1-Gemisch von Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und polymerisierbarem Phospholipid **2** entstehen, die Polymerisa-



tion durch UV-Bestrahlung aus, so konnte das Einstülpen der Vesikeln beobachtet werden (photochemisch induzierte Endocytose, Abb. 8). Die Erklärung für dieses Phänomen stützt sich auf zwei Annahmen: a) Das polymerisierbare Lipid ist in der äußeren Hälfte der Membrandoppelschicht in etwas höherer Konzentration vorhanden als in der inneren (die äußere Schicht bietet den sperrigen Kopfgruppen etwas mehr Platz. b) Durch die Polymerisation verringert sich der Platzbedarf pro Molekül. Treffen beide Faktoren zu, so schrumpft die äußere Hälfte der

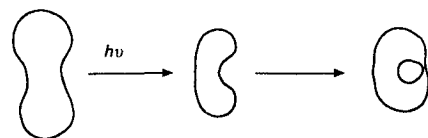


Abb. 8. Photochemisch induzierte Endocytose einer Riesenvesikel, die aus einem 4:1-Gemisch von Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und einem polymerisierbaren Phospholipid aufgebaut ist [29].

Doppelschicht bei der Polymerisation stärker als die innere, und die Doppelschicht wird sich insgesamt nach innen einstülpen. Svetina und Zeks^[30] waren die ersten, die in einem wegweisenden Aufsatz die Behauptung aufstellten, daß sich die Krümmung der Doppelschicht dadurch verändert, daß sich die beiden Hälften der Lipiddoppelschicht unabhängig voneinander zusammenziehen oder ausdehnen. Wir werden später noch Gelegenheit haben, uns dieses Konzept ins Gedächtnis zu rufen.

Experiment 3^[29]: Es zeigte sich, daß eine aus reinem DMPC aufgebaute Vesikel von der Kugelform über einen eingestülpten Zustand in eine Zwei-Vesikel-Struktur übergeht, wenn man leicht an das auf der Probe liegende Deckglas klopft (Abb. 9).

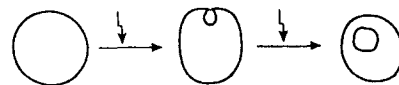


Abb. 9. Auswirkung von leichtem Klopfen auf das Deckglas auf einer DMPC-Risensvesikel-Präparation [29].

Es wurde zutreffend festgestellt, daß dieses Experiment die Metastabilität von Vesikelmorphologien belegt. Eine andere wichtige Frage wurde dagegen nicht gestellt: Tritt diese, in diesem Fall durch mechanische Reizung ausgelöste, Veränderung der Erscheinungsform regelmäßig oder nur ab und zu auf? Wir sprechen diesen Punkt an, weil wir die Erfahrung gemacht haben, daß viele seltsame morphologische Ereignisse nur gelegentlich zu

Na⁺

2

$$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{OCO}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{C}}}=\text{CH}_2$$

beobachten sind. Die Veröffentlichung von Bildern dieser Strukturen, ohne eine Aussage über ihre „Wahrscheinlichkeit“ zu machen, ist daher irreführend.

Die Untersuchung von physikalisch induzierten Umwandlungen von Vesikeln ist noch aus einem anderen Grund lehrreich. Die in Experiment 3 beschriebenen Vesikelpräparationen sind als dünne Filme zwischen einem Objektträger und einem Deckglas beobachtet worden. Wir haben eine solche Handhabung der Proben aus zwei Gründen vermieden: a) Zum einen ist es empfehlenswert, die Wechselwirkungen zwischen Vesikeln und Glas möglichst gering zu halten, und zwar besonders solche, bei denen die Vesikeln zwischen zwei Glasplatten gequetscht werden (man erinnere sich daran, daß Vesikeln Durchmesser von 0.2 mm und mehr aufweisen; siehe Tabelle 1). b) Zum anderen möchten wir unsere Vesikeln in ähnlicher Weise manipulieren (d.h. sie hin- und herzubewegen, in sie hineinzustechen usw.), wie Cytologen lebende Zellen handhaben. Diese Absicht schließt die Verwendung von Deckgläsern aus. Da nicht abgedeckte, dünne Filme schnell verdampfen, haben wir stets dicke, wäßrige Proben in einer ringförmigen Begrenzung (Einzelheiten siehe unten) verwendet. Ein verfeinerter Versuchsaufbau, mit dem dieselben Ziele erreicht werden, ist an anderer Stelle beschrieben^[31].

Experiment 4^[31]: Die Veränderungen der Erscheinungsform von DMPC-GUVs in entionisiertem Wasser sind als Funktion der Temperatur untersucht worden (Abb. 10). Die in Abbil-

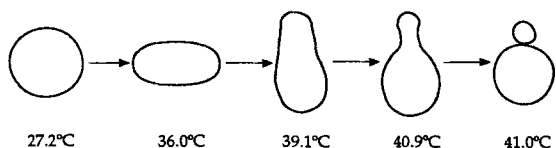


Abb. 10. Änderung der Gestalt einer DMPC-GUV in entionisiertem Wasser als Funktion der Temperatur [31].

dung 10 dargestellten Morphologien traten bei 35 von 98 Vesikeln auf, wenn vor dem Erhitzen ein nicht näher definierter, seitlicher Druck auf die Vesikeln ausgeübt wurde. Die Form der GUVs wandelte sich von kugelförmig (27.2 °C) über ellipsoid (36.0 °C) bis zu verschiedenen birnenförmigen Gebilden (37.5–40.9 °C). All diese Erscheinungsformen waren stabil und reversibel herstellbar. Ein weiterer Temperaturanstieg um 0.1 °C auf 41 °C destabilisierte die Birnenform und bewirkte die Bildung einer Art Vesikel mit Knospe, die als Anfangsstadium auf dem Weg zu einer getrennten Tochterzelle interpretiert werden kann. Es wurden sogar noch ausgefallenerere Umwandlungen beobachtet, auf die wir hier jedoch nicht im einzelnen eingehen möchten. All diese morphologischen Umwandlungen können qualitativ mit dem Svetina-Zeks-Modell erklärt werden^[30], das besagt, daß die beiden Hälften der Lipiddoppelschicht ein leicht unterschiedliches thermisches Ausdehnungsvermögen aufweisen.

Wann immer man Vesikelmorphologien untersucht, sollte man dies mit einem gewissen Maß an Vorsicht tun. Man darf nie außer acht lassen, daß beispielsweise die Phasenkontrast-Mikroskopie nur ein dünnes Band im Bereich des Vesikeläquators sichtbar macht. Demzufolge ist es leicht möglich, daß man eine Umwandlung von der Kugel- in die Birnenform mit einer 90°-Drehung einer birnenförmigen Vesikel verwechselt (Abb. 11).

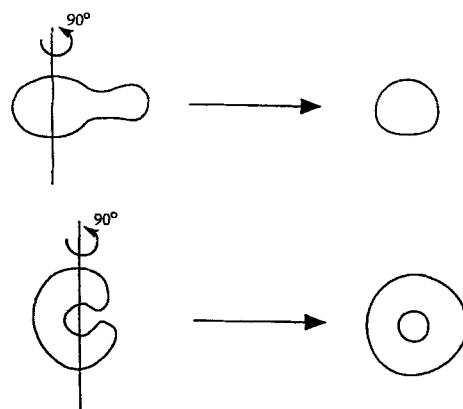


Abb. 11. Veränderungen, die im Phasenkontrast-Mikroskop für Veränderungen der Gestalt gehalten werden können, in Wirklichkeit jedoch auf Rotationen beruhen.

In ähnlicher Weise könnte eine 90°-Drehung als Übergang einer eingestülpten Vesikel zu einer Form, bei der sich eine Vesikel im Innern einer anderen befindet, mißverstanden werden (Abb. 11). Derartige Doppeldeutigkeiten lassen sich ausschließen, wenn man die Reversibilität der Umwandlung nachweist. Es ist unwahrscheinlich, daß sich 90°-Drehungen an den Gegebenheiten ihrer Umgebung orientieren, wenn letztere zwischen zwei Zuständen hin- und herpendeln.

Die einfallsreichen Untersuchungen von Evans und Needham^[17, 32] an Riesenvesikeln bilden einen schönen Abschluß für diesen historischen Überblick, der keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Evans und Needham haben eine GUV von 20 µm Durchmesser mit einem Saugdruck von weniger als 0.03 atm an eine 5 µm-Mikropipette angesaugt, wodurch die Vesikel teilweise in die Pipette hineingezogen (Abb. 12) und gleichzeitig die Membranfläche vergrößert wurde (wie indirekt aus der Projektionslänge innerhalb der Pipette abgelesen werden kann). Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: a) Der Saugdruck wurde bei konstanter Temperatur erhöht. b) Die Temperatur wurde bei vorgegebenem Saugdruck erhöht. Diese Versuche lieferten zwei thermoelastische Koeffizienten, und zwar das Kompressibilitätsmodul K und den thermischen Ausdehnungskoeffizienten α . Einige ausgewählte, unten aufgeführte Ergebnisse zeigen das Leistungsvermögen dieser Methode.

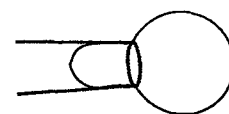


Abb. 12. Einsaugen einer 20 µm großen GUV in eine 5 µm-Pipette bei einem Saugdruck von 0.03 atm oder kleiner [32].

Kühlt man eine GUV bei konstantem Druck von einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur auf eine unterhalb der Phasenübergangstemperatur ab, so zieht sich die Membran sprunghaft um etwa 20% zusammen. Darüber hinaus erhöht sich das Kompressibilitätsmodul drastisch. So steigt beispielsweise der K -Wert für DMPC (Phasenübergangstemperatur 24 °C) von 150 dyn cm⁻¹ bei 29 °C auf 855 dyn cm⁻¹ bei 8 °C. Gibt man zu DMPC bei 29 °C äquimolare Mengen an Cholesterin, erhöht sich der K -Wert von 150 auf 685 dyn cm⁻¹, obwohl die Membran in einem flüssigkristallinen Zustand verbleibt. Cholesterin bildet offenbar einen festen Komplex mit DMPC, wodurch sich die Doppelschichtkompressibilität im Vergleich zu der einer Doppelschicht aus reinem DMPC ober-

halb der Phasenübergangstemperatur stark verringert. Evans und Needham konnten in der Mikropipette bei kleiner Zugspannung auch das Vorhandensein einer „geriffelten Membranphase“ mit einer ungewöhnlich kurzen Projektionslänge nachweisen. Die geriffelte Phase weist Wellenstruktur auf, bei der die Lipidketten senkrecht zur Gesamtfläche der Membran angeordnet sind.

Aus den bisher angeführten Literaturstellen geht hervor, daß die meisten Veröffentlichungen zur Vesikelforschung in biochemischen und biophysikalischen Publikationsorganen erschienen sind. Chemiker, vor allem Organiker wie wir selbst, haben den Riesenvesikeln vergleichsweise wenig Beachtung geschenkt. Bei dem Versuch, auch die chemische Fachwelt auf dieses Thema aufmerksam zu machen, sehen wir uns einem schwerwiegenden Kommunikationsproblem gegenüber, das zum Teil darauf beruht, daß die Erforschung von Riesenvesikeln eine Mischung der Verfahren der Chemie und Biologie erfordert. Während die Chemie durch die einfachen und definierbaren Reaktionsbedingungen (Zusammensetzung, Konzentration usw.) vertreten ist, steuert die Biologie die besondere Art der Datenerfassung (Photographie) bei. Infolgedessen müssen Chemiker – wenigstens im Moment – auf die von ihnen so geliebten Graphen, Tabellen, Gleichungen und Spektren verzichten. Nichtsdestotrotz haben wir die Bitte, daß sich die Chemiker den Ausspruch: „Das ist keine Chemie!“ verkneifen. Denn was sonst als Chemie sollte es sein, wenn sich eine Riesenvesikel, die sich aus einer in einer Chemikalienhandlung gekauften Verbindung bildet, unter Einwirkung eines synthetischen Tensids in zwei Hälften teilt? Letztendlich werden wir in den folgenden Abschnitten immer weiter ins Detail gehen und unsere „chemischen Systeme“^[1] auf einer eher molekularen Ebene betrachten. Aber bevor wir dorthin gelangen, müssen wir zunächst die grundlegenden Verhaltensmuster unserer Membranmodelle beobachten und aufzeichnen können. Gelegentlich werden zwar einige Erklärungen auf molekularer Ebene erfolgen, doch wird der Leser diese wahrscheinlich für ziemlich primitiv halten. Man sollte jedoch nie außer acht lassen, daß wir uns noch in einem sehr frühen Stadium des Verstehens befinden und daß nach derzeitigem Stand viele Probleme der Vesikelchemie mit einem Zitat von J. Wiesner treffend beschrieben werden können: „Just too complicated for rational, logical solutions. They admit of insights, not solutions.“

4. Das Lichtmikroskop

„The ladder of natural systems consists of elementary particles, atoms, molecules, macromolecules, cell parts, cells, organs, organisms, populations and ecosystems“ (R. Wesson). Bisher wurden Elementarteilchen hauptsächlich von Physikern, Moleküle von Chemikern, Makromoleküle von Biochemikern und Zellen von Cytologen untersucht. Diese Arbeitsteilung geht zunehmend verloren. Ist ein bestimmtes wissenschaftliches Niveau in einem Forschungsgebiet erreicht, ist es unvermeidbar, daß sich die Abenteuerlustigsten auf das nächsthöhere Komplexitätsniveau wagen. Diejenigen, die sich so verhalten, haben ein ähnliches Temperament wie Thomas Lincoln, der seinem Sohn Abraham einmal den Rat gab, sich immer dann ein neues Heim zu suchen, wenn er den Rauch aus dem Schornstein des Nachbarn sehen kann. Die Chemie ist ein gutes Beispiel für diesen

unaufhaltsamen Drang zu höheren Komplexitätsniveaus. So hört man bei chemischen Tagungen mehr und mehr über DNA, Antikörper oder Rezeptorbindungsstellen. Unser Aufsatz soll Chemiker zu einem Sprung über zwei Stufen, nämlich dem Sprung von Molekülen zu Zellkomponenten ermutigen. Ein derartiger Zuspruch ist eigentlich kaum mehr notwendig, da Chemiker bereits die ihnen vertrauten Methoden NMR- und ESR-Spektroskopie, Kinetik usw. auf Membransysteme angewendet haben. Ungewöhnlich ist hingegen der Vorschlag, daß Chemiker sich mit dem altgedienten Handwerkszeug der Cytologen, dem Lichtmikroskop, anfreunden sollen.

Leser, die nur ein beiläufiges Interesse an der cytomimetischen Chemie haben, werden den Wunsch haben, dieses Kapitel über die Lichtmikroskopie zu überschlagen und sich gleich den nachfolgenden Abschnitten 5 mit den Ergebnissen der Experimente zuzuwenden. Diejenigen aber, die mit dem Gedanken spielen, in die cytomimetische Chemie einzusteigen, sollten die folgenden, kurzen Hinweise zur Lichtmikroskopie lesen. Die Lichtmikroskopie ist in jüngster Zeit durch andere Techniken aufgerüstet worden, aber „it is not widely known outside the biological community that a renaissance and a revolution in light microscopy are now underway“^[33].

Unser Laboratorium ist mit zwei Geräten ausgestattet: einem Leitz-Laborlux-S-Standardlichtmikroskop und einem Nikon-Diaphot-TMD-Umkehrlichtmikroskop. Bei letzterem Gerätetyp ist das Linsensystem unterhalb des Objekttisches angebracht, und die Beleuchtung erfolgt von oben. Dieser Aufbau ermöglicht eine einfachere Mikromanipulation der Vesikeln und führt zu geringeren Interferenzproblemen, wenn bei tiefen Temperaturen Wasser auf dem Abdeckgläschen kondensiert.

Beide Mikroskope sind mit zehnfach vergrößernden Okularlinsen ausgestattet. Vier Merkmale sollten die Objektivlinsen aufweisen: a) Es sind Linsen, die speziell für die Phasenkontrast-Mikroskopie angefertigt und vertrieben werden. b) Es sind Flachfeld- oder PLANO-Linsen, die die Bildfeldwölbung verringern, so daß sowohl die Bildmitte als auch die Randbereiche scharf erscheinen. c) Sie sind achromatisch, d. h. sie sind in Hinblick auf den Öffnungsfehler um eine Wellenlänge (gelb-grün) korrigiert. Deshalb wird immer ein Grünfilter in den Strahlengang der beleuchtenden Lichtquelle geschoben. d) Wegen der Dicke der Vesikelpollen müssen die Linsen eine große Arbeitslänge aufweisen. Diese vier Eigenschaften, die bei den Produktinformationen der Linsen angegeben sind, sind hingegen nicht für die Hochqualitäts-Hellfeldmikroskopie, die Polarisations- oder die Fluoreszenzmikroskopie zu empfehlen.

Die Mikroskopkondensoren, die das Licht auf die Probe fokussieren, sind universell verwendbar, d. h. sie sind für viele Arten der Lichtmikroskopie einsetzbar. Da ihre Irisblende (veränderliche Lochblende) bei der Phasenkontrast-Mikroskopie immer weit geöffnet ist, werden sie zu Anfang einmal zentriert und scharfgestellt, danach jedoch nicht mehr verändert.

Jede Objektivlinse wird bei ihrer Herstellung mit einer numerischen Apertur (NA) versehen. Die NA-Werte unserer Linsen liegen zwischen 0.25 und 0.55. Zwei wichtige Parameter, die Auflösungsgrenze und die Schärfentiefe, hängen mit dem NA-Wert zusammen. Die Auflösungsgrenze ist als kürzester Abstand zwischen zwei gerade noch unterscheidbaren Punkten definiert. Nach der Rayleigh-Gleichung^[34] gilt: je größer der NA-Wert, desto kleiner (besser) die Auflösungsgrenze. Man be-

achte, daß Objekte, die kleiner als die Auflösungsgrenze sind, zwar gesehen werden, jedoch nicht in allen Einzelheiten. Die Auflösungsgrenze der von uns verwendeten Objektiven beträgt zwischen 0.52 und 0.87 μm .

Unter Schärfentiefe versteht man den Abstand zwischen der nächsten und der entferntesten Bildebene, die gerade noch scharf erscheint. Schärfentiefe kann beispielsweise eine Rolle spielen, wenn man den Austritt einer kleinen Vesikel aus dem Innenraum einer größeren Vesikel beobachten will. Nimmt die Schärfentiefe ab, dann wird es zunehmend unwahrscheinlich, daß sich die kleine und die große Vesikel in derselben Bildebene befinden und somit gleichzeitig scharf erscheinen. Ein großer NA-Wert verbessert zwar die Auflösungsgrenze, verringert jedoch die Schärfentiefe und erschwert dadurch das Scharfstellen. So beträgt beispielsweise die Schärfentiefe für $\text{NA} = 0.25$ 8.5 μm und für $\text{NA} = 0.55$ 1.5 μm . Der Umgang mit dem Lichtmikroskop lehrt uns, Kompromisse einzugehen!

Das Lichtmikroskop kann mit einer Vielzahl von Zusatzgeräten ausgestattet werden (Abb. 13). Besonders erwähnt werden

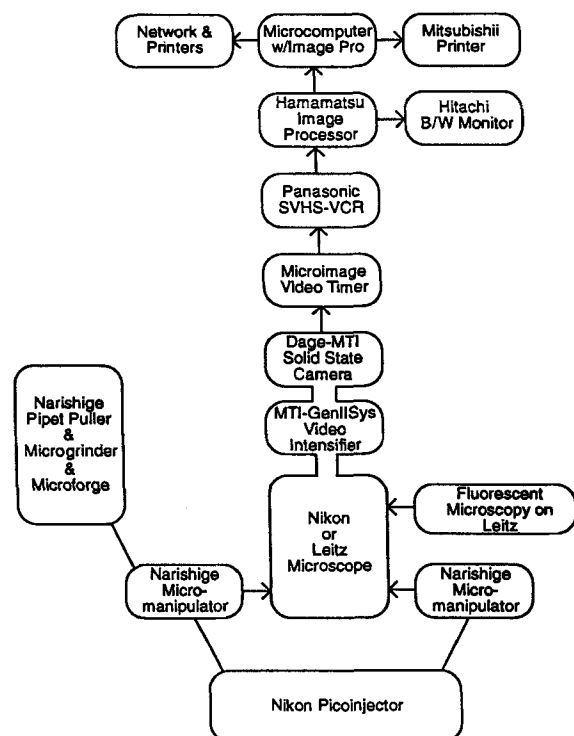


Abb. 13. Blockdiagramm eines mit Videogeräten und anderen Zusatzgeräten ausgestatteten Mikroskops. Viele GUV-Experimente können jedoch auch mit einem einfachen, für die Phasenkontrast-Mikroskopie ausgestatteten Mikroskop und einer Polaroid-Kamera durchgeführt werden. VCR = Videorecorder; B/W Monitor = Schwarz-Weiß-Bildschirm; Pipet Puller = Pipettenziehgerät; Microgrinder = Mikroschleifgerät; Microforge = Mikroschmiede.

sollte eine Festkörperkamera (solid state camera), die in eine speziell für diesen Zweck angefertigte Öffnung des Mikroskops eingeschoben wird. Das Signal der Kamera wird an einen Argus-10-Prozessor für die Bilddatenverarbeitung weitergegeben, der die Bilder digital verbessert, um stärkere Kontraste zu erzielen. Darüber hinaus kann er „zoomen“, so daß aus einer 400fachen Vergrößerung eine 800–1600fache wird. Im Blockschema zu Abbildung 13 sind auch ein Videorekorder zur Auf-

nahme von Echtzeit-Videos, ein Monitor zur Betrachtung von Bildern auf einem Bildschirm und ein Drucker zur Anfertigung von Standbildern aufgeführt. Man sollte nicht vor der scheinbaren Komplexität von Abbildung 13 zurückschrecken. Alle Einzelteile sind kommerziell zu erwerben, schnell am Mikroskop anzubringen und einfach zu handhaben^[35]. Einfaches Scharfstellen und Ausrichten des Objektstischs sind die Hauptfertigkeiten, die man benötigt, um „nichtidentifizierte schwimmende Objekte“^[36] aufzuspüren.

Einer der Hauptvorteile von GUVs im Vergleich zu ihren submikroskopischen Verwandten ist die Möglichkeit, sie wie Zellen zu mikromanipulieren. Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Pipettenziehgeräts lassen sich Mikropipetten mit sehr kleinen Durchmessern bis zu 1000 Å herstellen. Hierzu wird eine vertikale Glaskapillare, die am unteren Ende mit hängenden Gewichten beschwert ist, am oberen Ende durch eine elektrische Spule gefädelt. Schaltet man den Strom ein, so schmilzt der Teil der Kapillare, der sich innerhalb der heißen Spule befindet, die Gewichte ziehen nach unten, und die Kapillare wird zu einer Mikropipette mit kleinem Durchmesser ausgezogen. Die Pipette kann noch mit einem Mikroschleifrad oder durch sogenanntes Mikroschmieden weiter bearbeitet werden. Mit der Mikroschmiede kann man das Pipettenende glattpolieren oder in jede gewünschte Form bringen.

Mikropipetten wurden von uns überwiegend dazu benutzt, Vesikeln festzuhalten oder in sie hineinzustechen. Haltepipetten haben große glatte Enden, mit denen – saugt man eine GUV etwas an – diese festgehalten wird. Injektionspipetten weisen dagegen sehr viel kleinere Durchmesser als die Vesikeln auf und werden zu einer scharfen Spitze geschliffen. Sowohl das Einsaugen durch eine leere Pipette als auch das Herausdrücken aus einer gefüllten erfolgt mit einem Picoinjektor, der mit einem Stickstoff-Tank verbunden ist. Ein Picoinjektor kann Flüssigkeitsmengen zu- oder abführen, die um Größenordnungen kleiner sind als das Nanoliter-Volumen einer typischen GUV.

Die Mikropipetten können mit einem Mikromanipulator an die gewünschte Stelle des mikroskopischen Bildausschnitts gebracht werden. Diese Vorrichtung, die am Objektstisch des Mikroskops befestigt wird, verfügt über einen Joystick, mit dem man die befestigte Pipette vorsichtig und um geringe Distanzen verschieben kann. Alle hier beschriebenen Mikromanipulationstechniken sind in der Cytologie alltägliche Hilfsmittel.

Die Herstellung der Proben haben wir bereits im Zusammenhang mit der DDAB-Hydratisierungsmethode erwähnt (siehe Abschnitt 2.4). Die Hydratisierung fand in einem auf einen Objektträger geklebten Gummiring von 14 mm Innendurchmesser statt. Die eingesetzte Probenmenge (0.45 mL) wurde so bemessen, daß der Gummiring vollständig gefüllt war und möglichst wenig Luft zwischen der Probe und dem auf dem Gummiring liegenden Deckglas verblieb. Das Deckglas sollte das Verdampfen sowie Oberflächenvibrationen der Probe verhindern. Werden Mikromanipulationen durchgeführt, so kann selbstverständlich kein Deckglas verwendet werden. Bei Temperatur-gesteuerten Experimenten wurde ein selbstgebauter, thermostatisierter Objektstisch verwendet.

Hiermit wollen wir die Hintergrundinformationen zum Thema cytomimetische Chemie abschließen. Jeder Leser wird nach seinem Geschmack und seinen Bedürfnissen entscheiden, ob wir zuviel oder zuwenig Einzelheiten eingebracht haben. Wie auch

immer, der Zeitpunkt ist gekommen, um die konkreten Mikro-photographien in Augenschein zu nehmen und aus erster Hand die komplizierten Zusammenhänge des Membranverhaltens zu betrachten. Die meisten der im folgenden Abschnitt gezeigten Mikrophotographien sind hier erstmals veröffentlicht.

5. Experimentelles

Wir haben die Ergebnisse unserer Experimente im folgenden nach den cytomimetischen Prozessen (Aggregation, Verschmelzung, Teilung usw.) geordnet. Jeder dieser Prozesse wird durch eine Reihe von Standphotos illustriert, die aus Videoaufzeichnungen ausgewählt wurden, die mit Hilfe eines Mikroskops aufgenommen wurden. Zugegebenermaßen ist das Betrachten der Standphotos ähnlich einem Mickey-Mouse-Film, den man Bild für Bild anschaut. Glücklicherweise läßt sich das Verhalten von Vesikeln jedoch recht anschaulich durch Standaufnahmen beschreiben, wenn diese einen ausreichend großen Zeitraum überspannen. Das soll natürlich nicht heißen, daß dem unvermeidlichen Übergang von der dynamischen zur semistatischen Darstellungsweise nichts zum Opfer fällt. Kein Standbild kann beispielsweise vermitteln, welches Vergnügen es bereitet, eine Vesikelverschmelzung oder -teilung in Echtzeit zu verfolgen. Und keine Standaufnahme wird das Gefühl vermitteln, etwas Wunderbares zu erleben, das einmal einem unserer Besucher den Ausruf entlockte: „How do you make those cells do that?“ Wir klärten unseren Gast später darüber auf, daß wir diese „Zellen“ aus einer Verbindung hergestellt hatten, die wir bei Eastman Chemicals gekauft hatten, und ihr Verhalten durch einfache physikalische und chemische Reize ausgelöst wurde.

5.1. Hydratisierung

Wir haben bereits weiter oben beschrieben, wie durch Hydratisierung von Lipidfilmen Riesenvesikeln entstehen können (siehe Abb. 2). In unserem Laboratorium führte diese Methode hauptsächlich zu multilamellaren Vesikeln (dies war einer der Gründe, weshalb wir die in Abbildung 3 dargestellte Feststoffhydratisierung entwickelt haben). Es stellte sich heraus, daß die nach der Trocknungs-Rehydratisierungs-Methode hergestellten, multilamellaren Riesenvesikeln ebenfalls dazu neigen, unilamellare Vesikeln zu bilden, wenn man sie für mehrere Tage stehen läßt und hydratisiert. Diesen Hydratisierungsvorgang haben wir mikroskopisch verfolgt (Abb. 14). Man sieht, daß es an den äußeren Hüllen der multilamellaren Vesikeln zunächst zu einer Art Blasenbildung kommt. Diese Bläschen entwickeln sich danach weiter zu Tubuli, die strahlenförmig von der Vesikeloberfläche ausgehend wachsen. Schließlich lösen sich die Tubuli ab und werden zu unilamellaren Vesikeln. Auf diese Weise wird die multilamellare Vesikel nach und nach schichtweise unter Bildung einer GU abgetragen. Die offensichtliche Instabilität multilamellarer Vesikeln im Vergleich zu ihren unilamellaren Gegenstücken beruht wohl zum Teil auf elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen den konzentrischen, zwiebelartig angeordneten DDAB-Schichten.

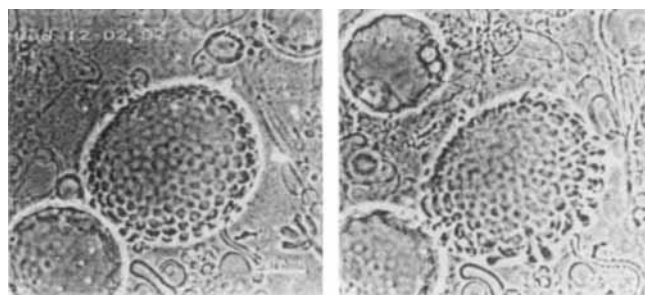
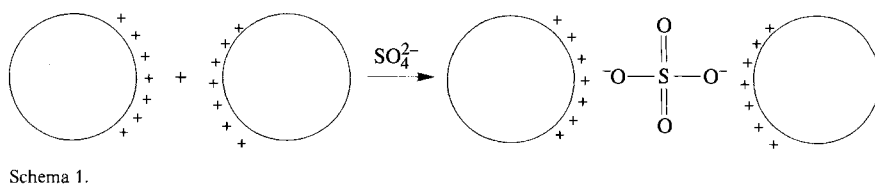


Abb. 14. Phasenkontrast-Mikrophotographien der Hydratisierung einer multilamellaren Riesenvesikel unter Bildung von kleinen unilamellaren Vesikeln. Links: nach 2.5 h, rechts: nach 4.5 h. Der Maßbalken unten rechts in den Bildern entspricht 100 μm .

5.2. Aggregation

A. Einstein hat einmal geschrieben: „The only apparatus necessary for observing Brownian motion is the microscope, and it need not even be a particularly good one.“ In ähnlicher Weise ist ein einfaches Mikroskop auch alles, was man zum Verfolgen einer Vesikelaggregation benötigt. Man versetzt eine Probe, in der die Riesenvesikeln weit voneinander entfernt sind, einfach mit kleinen Mengen an Na_2SO_4 (1.0 mM), und im Verlauf weniger Minuten lagern sich die Vesikeln zu Gruppen zusammen (Abb. 15). Man beachte, daß dieses Experiment, das wir in einem frühen Stadium unserer Forschung durchgeführt haben, mit Dunkelfeld-Mikroskopie und nicht mit der von uns mittlerweile bevorzugten Phasenkontrast-Mikroskopie verfolgt wurde.

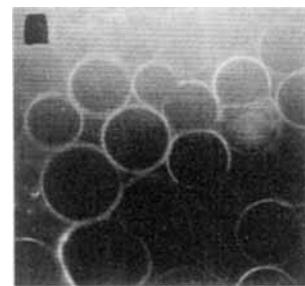


Abb. 15. Dunkelfeld-Mikrophotographie der Sulfat-induzierten Aggregation von Riesenvesikeln. Vor der Zugabe von Sulfat befanden sich nur drei Vesikeln im Mikroskopgesichtsfeld.

Der Aggregationsprozeß kann als elektrostatische Neutralisation der weitreichenden Abstoßungskräfte zwischen den Doppelschichten der Vesikeln verstanden werden^[37]. Offenbar ist das dianionische Sulfat ein weit effektiverer „Klebstoff“ als das Bromid-Gegenion von DDAB (Schema 1).

Die Sulfat-induzierte Verschmelzung konnten wir an GUVs nicht beobachten, obwohl ein solcher Prozeß für Vesikeln mit einem kleinen Durchmesser von nur 80 nm beschrieben ist^[38]. Die Oberflächen der kleineren Vesikeln sind stärker gekrümmt, und sie können deshalb stärker zur Verschmelzung neigen als GUVs. Diese Beobachtung erinnert an die sogenannte „Ostwald-Reifung“, bei der große kolloidale Tröpfchen auf Kosten kleinerer wachsen^[39]. Ein interfacialer Druck im Innern der kleinen Tröpfchen ist die Triebkraft für die Vereinigung. Die Tatsache, daß mit Sulfat behandelte GUVs nicht verschmelzen,

läßt vermuten, daß Sulfat nicht in der Lage ist, die Vesikeln genügend nahe zueinander zu bringen, um die Abstoßungskräfte der Hydrathülle zu überwinden, was eine Voraussetzung für die Verschmelzung ist. Die Abstoßung der Hydrathüllen zeigt, daß die Kopfgruppen zunächst dehydratisiert werden müssen, bevor eine Phaseninstabilität in der Membran auftreten kann^[40].

5.3. Verschmelzung

Wenn der Verschmelzung von Membranen keine Grenzen gesetzt wären, dann würden Menschen, wie schleimige Wackelpuddings, aus Massen an vielkernigem Protoplasma bestehen. Und wenn es keine Mechanismen gäbe, durch die Verschmelzungen ausgelöst werden, dann wären viele biologische Ereignisse (Infektion, Befruchtung, Vereinigung etc.) nicht möglich. Es ist daher kein Wunder, daß in Abhandlungen über das Verhalten von Membranen die Verschmelzung ein immer wiederkehrendes Thema ist. Leider können wir die überaus vielfältigen Veröffentlichungen zur Membranverschmelzung aus Platzgründen nur durch einen Literaturverweis würdigen^[41]. Die folgenden knappen Ausführungen zum Thema Membranfusion beschränken sich auf die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, einführenden Versuche.

5.3.1. Physikalische Einwirkungen

Mit Hilfe von Haltepipetten und leichtem Ansaugen kann man zwei Riesenvesikeln in unmittelbaren Kontakt zueinander bringen (Abb. 16). Es fällt auf, daß die linke Vesikel im linken

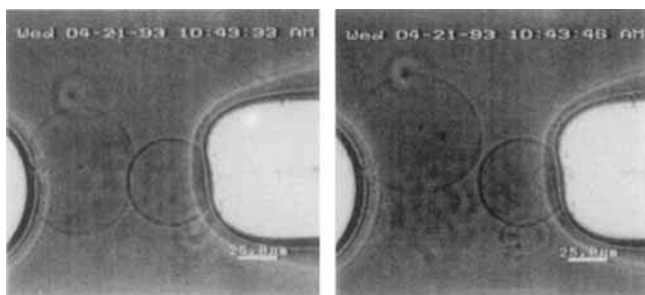


Abb. 16. Erfolgreicher Versuch einer physikalisch induzierten Verschmelzung von zwei DDAB-Riesenvesikeln. Die Vesikeln wurden mit Hilfe von Haltepipetten unter leichtem Saugdruck gehandhabt. Im linken Photo sind die Vesikeln gerade auseinander gedrückt worden, wobei sich die linke Vesikel etwas verformte.

Photo durch den Druck der Nachbarvesikel verzerrt wird. Trennt man die beiden Vesikeln, so wird die linke Vesikel – wie man im rechten Photo erkennen kann – in eine leicht ovale Form gezogen. Anschließend nimmt die Vesikel sofort wieder von selbst die kugelförmige Gestalt an. Trotz der offensichtlichen, unmittelbaren Nachbarschaft der Vesikeln findet über eine Zeitspanne von bis zu einer Stunde keine Verschmelzung statt. Eine Vesikelverschmelzung kann zwar – wie wir im folgenden sehen werden – durch chemische, aber nicht durch physikalische Einwirkungen ausgelöst werden.

5.3.2. Acetat-induzierte Verschmelzung

Wir beobachteten eine bemerkenswerte Folge von Ereignissen, wenn eine Probe von multilamellaren Vesikeln (0.45 mL von 9×10^{-4} M DDAB; Trocknungs-Rehydratisierungs-Verfahren) ohne Rühren mit kleinen Portionen an NaOAc (100 μ L, 0.25 M) versetzt wurde. Zunächst begannen sich die Vesikeln aufzulösen, und nach etwa 20 Minuten waren sie zu einer strukturlosen Masse entartet, die in submikroskopisches Material zerfiel, woraus schließlich ein absolut klares Gesichtsfeld resultiert. (Ein derartiges Verschwinden der Vesikeln war vorauszusehen, denn Didodecyltrimethylammoniumacetat ist eine gut wasserlösliche Verbindung, die keine Riesenvesikeln bildet.) Etwas Unerwartetes ereignete sich jedoch, wenn die Proben bei der DDAB-Phasenübergangstemperatur von 17 °C oder bei tieferen Temperaturen aufbewahrt wurden. Es bildeten sich erneut kleine Kügelchen, die das Gesichtsfeld übersäten. Der Ausdruck „Kügelchen“ wird verwendet, weil die Strukturen zu trübe aussahen, als daß sie als multilamellare Vesikeln identifiziert werden konnten. Auch wenn wir ihre genaue Morphologie nicht kennen, die DDAB-Kügelchen verschmolzen jedenfalls sehr schnell. In Abbildung 17 ist eine Bildfolge gezeigt, in der zwei Kügelchen, die über mehrere Minuten Seite an Seite gelegen hatten, plötzlich innerhalb weniger Sekunden verschmolzen. Diese Verschmelzung konnte in mehreren Experimenten reproduziert werden.

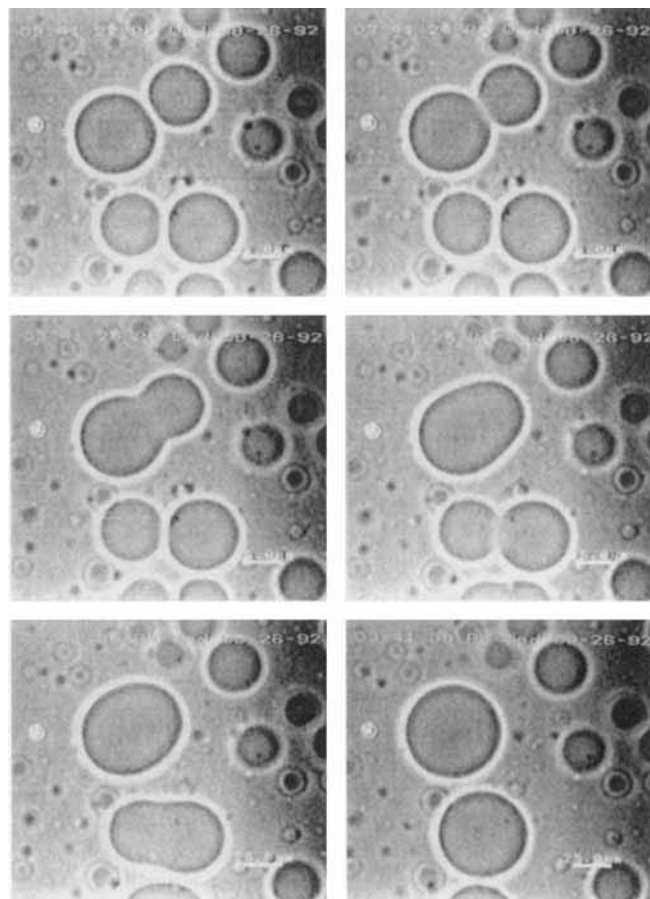
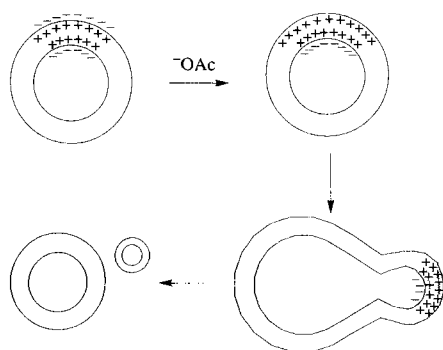


Abb. 17. Phasenkontrast-Mikrophotographien einer innerhalb weniger Sekunden ablaufenden Acetat-induzierten Vesikelverschmelzung. Der Maßbalken entspricht 5.0 μ m.

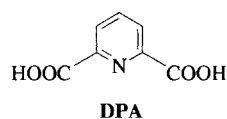
Der Zerfall der Vesikeln kann nicht allein dem osmotischen Druck zugeschrieben werden, da der Effekt von der Art des zugesetzten Salzes abhängt (mit Acetat, Fluorid und Hydroxid tritt er auf, mit Chlorid hingegen nicht). Unsere Beobachtungen lassen sich jedoch mit den folgenden zwei Annahmen befriedigend erklären: a) Stark hydratisierte Anionen wie Acetat binden relativ locker an kationische Oberflächen^[42]. b) Nach dem Svetina-Zeks-Modell^[30] können die beiden Hälften der Lipiddoppelschicht unabhängig voneinander agieren. Setzt man den DDAB-Vesikeln von außen einen Überschuß an Acetat zu, so wird das Gegenion Bromid gegen Acetat ausgetauscht, und es entsteht eine äußere Lipidschicht, die von ihren Gegenionen stärker getrennt ist. Bedingt durch die daraus resultierende Abstoßung zwischen den Kopfgruppen, dehnt sich die äußere Lipidschicht relativ zur inneren aus. Man sollte erwarten, daß eine derartige Asymmetrie die Krümmung der Membran erhöht^[43] und auf diese Weise die Ausscheidung kleiner Vesikeln und das mögliche Verschwinden mikroskopisch sichtbarer Strukturen vorangetrieben wird (Schema 2).



Schema 2.

5.3.3. DPA-induzierte Verschmelzung

Engberts et al.^[44] haben berichtet, daß das Dianion der Dipicolinsäure (DPA) DDAB-Vesikel von 3000 Å Durchmesser dazu veranlaßt, zu Vesikeln von 2–3 µm Durchmesser zu verschmelzen. Die Wirkung von DPA erinnert an den altbekannten, die Verschmelzung fördernden Einfluß, den Ca^{2+} -Ionen auf negativ geladene Vesikeln ausüben^[45]. Aufgrund der Affinität von Ca^{2+} -Ionen gegen-



über anionischen Lipiden bewirken diese die Bildung von Vesikel- Ca^{2+} -Vesikel-Verbänden. Die daraus resultierende Dehydratisierung der Oberfläche und die unmittelbare Nachbarschaft der Vesikeln lösen eine Verschmelzung aus.

Ein durch Feststoffhydratisierung hergestelltes Vesikelpräparat wurde mit DPA (25 µL einer 5 mM Lösung, mit NaOH auf pH 7 eingestellt) versetzt. Neben den GUVs waren auch „Kügelchen“ unbekannter Morphologie vorhanden, die durch DPA ausgelöst schnell verschmolzen (Abb. 18). Die GUVs verwandelten sich statt dessen von starren Kugeln in weiche, unregelmäßige Gebilde (Abb. 19). Die nur eine Carboxygruppe aufweisende Picolinsäure zeigte hingegen keine solche Wirkung.

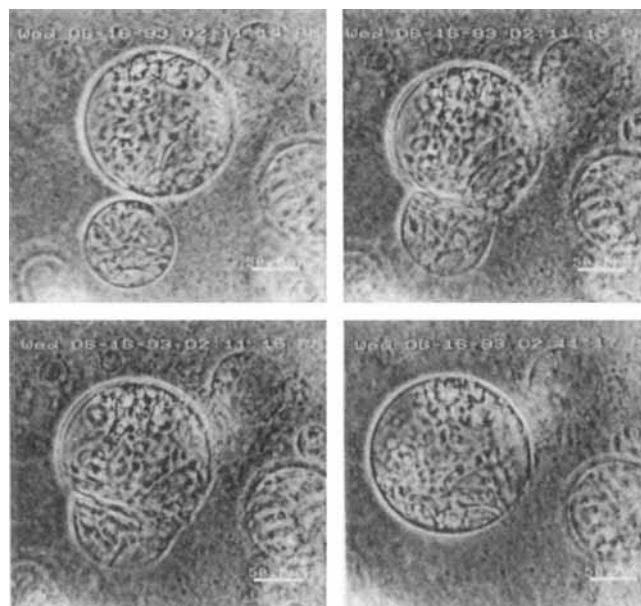


Abb. 18. Phasenkontrast-Mikrophotographien einer DPA-induzierten Verschmelzung von DDAB-Vesikeln unbekannter Struktur. Der Maßbalken entspricht 50.0 µm. Der Vorgang lief in weniger als vier Sekunden ab.

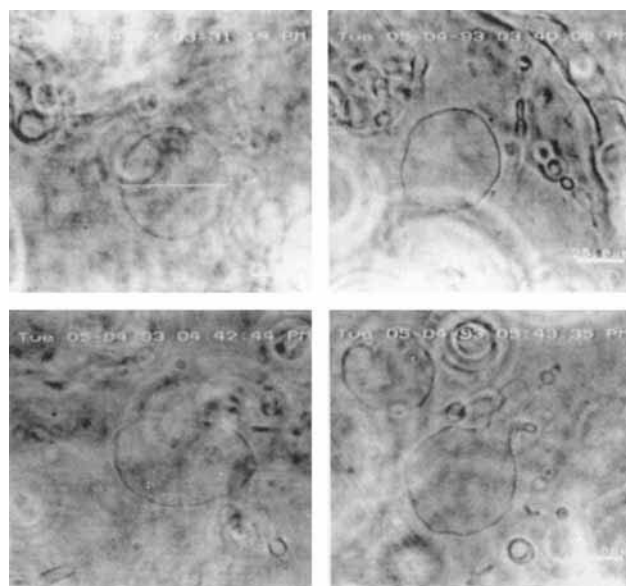
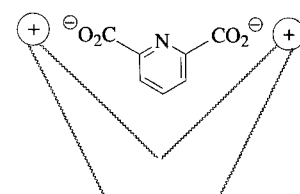


Abb. 19. Wirkung von DPA auf DDAB-GUVs. Zeitlicher Ablauf: Bild oben links nach oben rechts: 10 min; Bild oben rechts nach unten links: 1 h; Bild unten links nach unten rechts: 1 h.

Wir können auf molekularer Ebene nur Vermutungen über den Verlust an Starrheit in den GUV-Membranen anstellen. Eine Möglichkeit wäre, daß sich DPA in den Bereich der Kopfgruppen einbaut und die Lipidmoleküle auseinanderdrückt (Schema 3). Da auf diese Weise die Lipidpackung verlorengeht, kann man sich als Folge das Verformen der normalen Kugelgestalt vorstellen. Eine zweite Erklärung hängt mit der von uns häufig beobachteten Tatsache zusammen, daß



Schema 3.

GUVs offenbar unter einem osmotischen Druck stehen, d. h. ein innerer Druck bläht die Vesikeln auf. Der Ursprung dieses Drucks bei völliger Abwesenheit von Salzen ist bisher noch nicht verstanden. Jedenfalls könnte DPA die Vesikeln für Wasser und kleine Moleküle durchlässig machen, und somit einen Druckausgleich und ein Zusammenfallen der Vesikeln bewirken.

5.4. Endocytose

Bei vielen Experimenten mit DPA haben wir beliebige GUVs bei einem Prozeß beobachtet, der der Endocytose bei Zellen auffallend ähnelt (Abb. 20). Eine Riesenvesikel begann eine

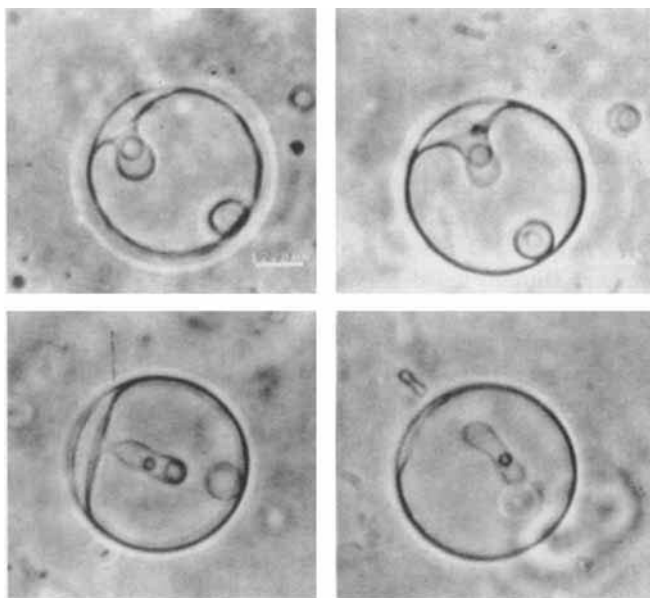


Abb. 20. DPA-induzierte Endocytose einer unilamellaren Riesenvesikel über einen Beobachtungszeitraum von 30 min. Dieser Vorgang wurde wiederholt beobachtet, tritt jedoch nur hin und wieder auf.

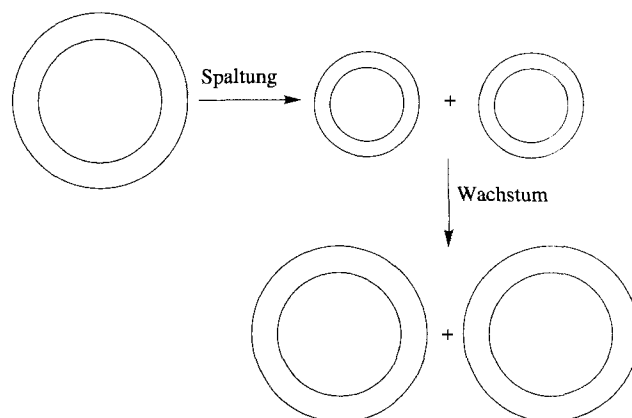
kleinere Vesikel zu verschlingen, und nach 30 Minuten war die kleinere Vesikel vollständig verspeist. Ohne Zweifel unterstützt DPA die Endocytose, indem es die Flexibilität der Membran erhöht. Es ist noch immer ein Rätsel, welche Art von Endocytose-stimulierenden Substanzen beispielsweise eine Amöbe produziert, wenn sie einen eßbaren Happen in ihrer Nähe aufgespürt hat. Ungeklärt ist auch, wie es einem Virus gelingt, eine Gastzelle zu überreden, ihn einzulassen.

Es sollte beim Lesen deutlich geworden sein, daß sich ein Modellsystem entwickeln läßt. Wir können wunderbare morphologische Veränderungen in einer einfachen Membran nicht-biologischen Ursprungs verfolgen. Wir können den Lesern allerdings nicht – oder höchstens auf Anfängerniveau – die molekularen Grundlagen dieser morphologischen Veränderungen erklären. Es sollte niemals eine Entschuldigung für das Fehlen von Details geben, wenn sich ein neues Gebiet der Wissenschaft auftut und die Forschung gerade erst „an der Oberfläche kratzt“. Die Entdeckerfreude in der Wissenschaft beruht nicht allein auf einer scharfen Analyse, sondern auch auf der Formulierung eines Problems, und letzteres ist laut A. Einstein „often

more important than the solution“. Neue Entdeckungen, die unbeantwortete Fragen und ungelöste Probleme aufwerfen, sowie neuartige Möglichkeiten erhoffen und nie zuvor durchgeführte Experimente Realität werden lassen, davon handelt dieser Aufsatz. Im wesentlichen sind wir dem Rat von R. Hoffmann gefolgt: „Row a boat into that tall mysterious grass just because you have heard a strange bird call there.“ Auf unseren Fall übertragen steht das „geheimnisvolle Schilf, in das wir unser Boot gerudert haben“ für das Reich der Mikroskopie und der „fremdartige Vogel, der uns gelockt hat“ für die Riesenvesikeln mit ihren erstaunlichen Verwandlungsmöglichkeiten.

5.5. Teilung

Die Vesikelteilung war für uns von besonderem Interesse, da die Abfolge Teilung, Wachstum und erneute Teilung gleichbedeutend ist mit dem Prinzip der Selbstreproduktion, einem langfristigen Ziel unserer Arbeiten (Schema 4). Wie wir in den fol-



Schema 4.

genden Abschnitten zeigen werden, konnten wir tatsächlich eine Vesikelteilung herbeiführen, jedoch nicht die für einen selbstreplizierenden Prozeß ideale Art der Teilung, bei der eine Vesikel in zwei Vesikeln gleicher Größe gespalten wird.

5.5.1. Mechanische Reizung

Abbildung 21 zeigt den Versuch, mit einer spitzen Mikropipette in eine Vesikel, die mit einer Haltepipette unter leichtem Saugdruck festgehalten wird, hineinzustechen. Es handelt sich hierbei um ein frühes Experiment, und wir wußten zu diesem Zeitpunkt noch nicht, daß die untersuchte Riesenvesikel multilamellar war. Jedenfalls machten wir die Erfahrung, daß es sehr schwierig ist, mit der Injektionspipette (die über einen am Objektisch befestigten Mikromanipulator gelenkt wurde) die Vesikel zu durchstoßen. Schließlich gelang es uns, durch die Stiche die Bildung einer neuen kleineren Vesikel auszulösen. Wir vermuten, daß die äußerste Doppelschicht der multilamellaren Vesikel durch die Pipette physikalisch beschädigt wurde. Die Lipidmoleküle in der verletzten Doppelschicht hatten damit die Möglichkeit, sich zu einer unabhängigen unilamellaren Vesikel ohne Doppelschicht-Doppelschicht-Abstoßung umzuorganisieren.

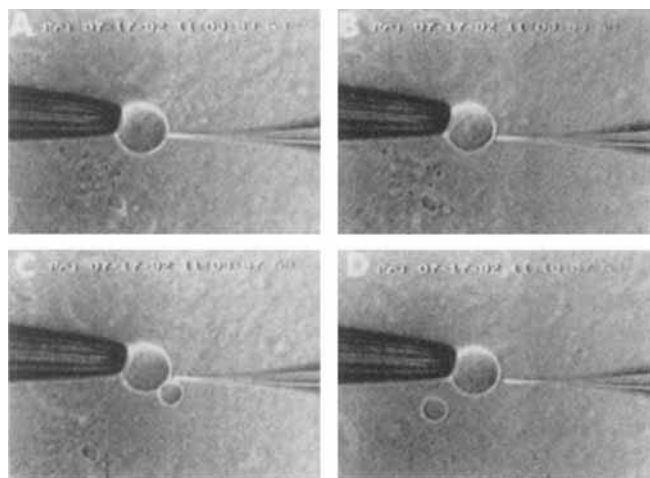


Abb. 21. Thigmatrope Teilung, bei der durch Berührung eine multilamellare Vesikel zur Bildung und Freisetzung kleinerer Vesikeln angeregt wird. Die Muttervesikel wird durch eine Haltepipette festgehalten, während eine durch einen Mikromanipulator gesteuerte spitze Pipette in die Vesikeloberfläche sticht.

Gelegentlich findet man eine oligolamellare Vesikel unter dem Mikroskop, in der die konzentrischen Doppelschichten soweit voneinander entfernt sind, daß man sie getrennt voneinander erkennen kann. In Abbildung 22 ist gezeigt, wie Schicht für Schicht einer oligolamellaren Vesikel durch Reizung mit einer spitzen Pipette zerstört wird. Die Vesikel wird in dem Maße kleiner und kleiner, in dem die Schichten abgeschält werden.

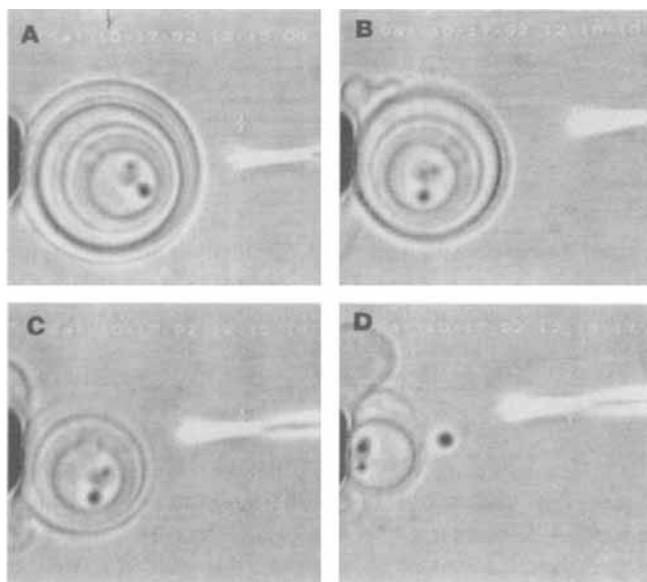


Abb. 22. Sticht man die einzelnen Schichten einer oligolamellaren Vesikel mit einer spitzen Pipette an, so wird diese immer kleiner.

5.5.2. Verdünnung

Stellt man multilamellare Riesenvesikeln durch Hydratisierung eines Lipidfilms (eine Methode, die – wie bereits erwähnt – durch unser Feststoffhydratisierungs-Verfahren verdrängt worden ist) her, so bleiben diese Vesikeln für mindestens einen Tag unverändert, es sei denn, man verdünnt die Probe mit Wasser auf das vier- bis zwanzigfache ihres Volumens. Die Verdünnung bewirkt, daß 5–30 µm große GUVs aus den multilamel-

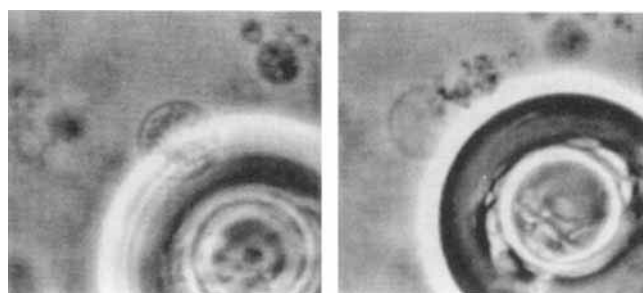


Abb. 23. Durch Verdünnung angeregter Ausstoß kleiner unilamellarer Vesikeln aus einer multilamellaren Vesikel. Man beachte, wie das innere Volumen der unilamellaren Vesikeln durch eine am Berührungspunkt der beiden Vesikel entstandene Öffnung ausgestoßen wird. Die beiden Photos sind im Abstand von drei Sekunden aufgenommen. Nach weniger als fünf Sekunden haben sich die Tochtervesikeln von der Muttervesikel entfernt, und die Wunde ist wieder verheilt.

laren Vesikeln ausgestoßen werden, bis letztere vollständig verschwunden sind (Abb. 23). Wenn sich die kleinen GUVs von der multilamellaren Vesikel ablösen, wird das Volumen ihrer Innenräume schnell durch die Öffnung ausgestoßen, die sich an der Membranstelle bildet, an der die GUV und die multilamellare Vesikel kurzzeitig miteinander verbunden waren. (Diese Öffnung verheilt anschließend sofort wieder, so daß eine intakte GUV entsteht.) Dieses Ausstoßen des Inhalts der GUV ist ein weiterer Hinweis auf den Innendruck, der für GUV-Systeme charakteristisch zu sein scheint^[46].

Warum wird durch die Verdünnung mit Wasser eine Teilung herbeigeführt? Der osmotische Druck scheint für die Beantwortung dieser Frage keine Rolle zu spielen, da die in entionisiertem Wasser hergestellten Vesikelpräparationen auch mit entionisiertem Wasser verdünnt wurden. Statt dessen sieht es so aus, als ob ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Vesikel-Vesikel- und Doppelschicht-Doppelschicht-Abstoßung besteht. Durch die Verdünnung der Probe verringert sich die Vesikel-Vesikel-Abstoßung, während die Doppelschicht-Doppelschicht-Abstoßung innerhalb der multilamellaren Vesikel unverändert bleibt. Folglich ist die Bildung von GUVs thermodynamisch begünstigt. Kleine Energieunterschiede zwischen den verschiedenen morphologischen Erscheinungsformen sind also der Schlüssel zum Verständnis des Verhaltens von Riesenvesikeln.

5.6. Gebären (birthing)^[41]

Wir haben uns für die Wechselwirkungen von GUVs mit Tensiden interessiert, da Tenside häufig eingesetzt werden, um die Bestandteile von Biomembranen löslich zu machen^[47]. M. N. Jones^[48] hat vorgeschlagen, daß Tenside über hydrophobe Kräfte an Phospholipidmembranen binden. Ist ein Sättigungsniveau erreicht, so stoßen die Doppelschichten gemischte Micellen aus Lipid und Tensid aus. Ueno und Akechi^[49], die Vesikeln von 200 nm Durchmesser durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie untersucht haben, beobachteten, daß Octylglucosid die Vesikeln in Himbeer-ähnliche Cluster, bestehend aus 20–30 nm große Kügelchen, überführt. Diese kleinen Partikel entfernen sich nach und nach von der Clusteroberfläche und gehen als gemischte Micellen in Wasser in Lösung. Uns ist kein Beispiel bekannt, bei dem der Abbau von Vesikeln durch Tenside mit Hilfe eines Lichtmikroskops verfolgt wurde.

Wir versetzten eine Standard-GUV-Präparation (20–21 °C) mit 25 μL einer 5 mM Octylglucosid-Lösung, was einer Tensidkonzentration unterhalb der kritischen Micellenkonzentration von 25 mM entspricht. Im Verlauf der ersten Stunde wurden nur wenige Vesikeln abgebaut. Weit aufregender war die Entdeckung eines einer Geburt ähnelnden Prozesses (birthing process), der an einer GUV, die in ihrem Inneren eine kleinere Vesikel enthielt, beobachtet wurde. Unter dem Einfluß von Octylglucosid konnte die eingeschlossene Vesikel die Doppelschicht der Muttervesikel durchdringen (Abb. 24). In der Muttervesikel

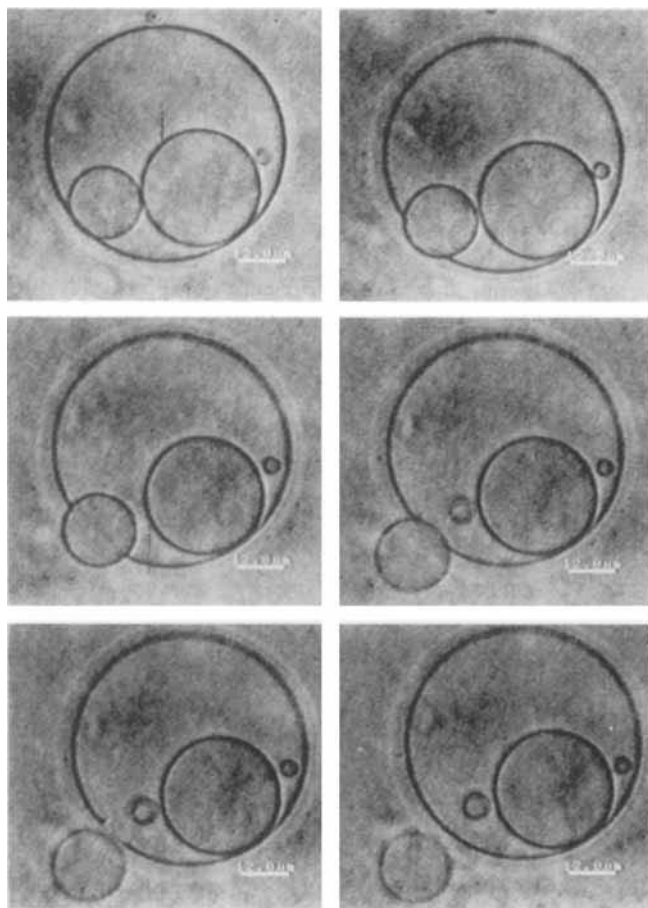


Abb. 24. Eine durch Octylglucosid ausgelöste „Geburt“ einer Vesikel, verfolgt durch Phasenkontrast-Mikroskopie (der Maßbalken entspricht 12,0 μm). Man beachte, wie die Öffnung in der Muttervesikel unten links augenblicklich wieder verheilt. Der gesamte Prozeß läuft innerhalb von zwölf Sekunden ab.

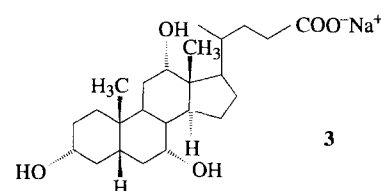
entstand eine Öffnung, die augenblicklich wieder verheilte (untere Photos). Diese Folge von Ereignissen konnte bei jedem Präparat wiederholte Male beobachtet werden. Das Lichtmikroskop hat offenbar die Fähigkeit, dynamische Vorgänge einzufangen, die sich mit dem viel häufiger verwendeten Elektronenmikroskop schwer nachweisen lassen. Darüber hinaus werden Artefakte, die durch Trocknen, Metallüberzüge etc. entstehen und bei der Elektronenmikroskopie ein Problem sind, vermieden.

Kombiniert man die mit dem Lichtmikroskop und dem Elektronenmikroskop^[49] erzielten Ergebnisse, liegt die Vermutung nahe, daß Octylglucosid den Zusammenhalt unter den organisierten DDAB-Molekülen schwächt, möglicherweise durch Bildung schwach assoziierter kugelförmiger Partikel. Die Membranuntereinheiten können sich zeitweilig voneinander trennen

und auf diese Weise einen schmalen Durchgang für die eingeschlossene Vesikel öffnen. Ein Beweis für dieses Modell konnte durch Experimente bei höheren Octylglucosidkonzentrationen (10–25 mM), bei denen die GUVs schnell abgebaut werden, erbracht werden. Hier konnte man beobachten, daß Partikel von 1–1 μm Größe die Vesikeloberfläche übersäten (ohne Abbildung). Diese Partikel, bei denen es sich nach Hellfeld-mikroskopischen Aufnahmen entweder um Feststoffe oder multilamellare Lipide handelt, lösten sich ab, während sich gleichzeitig der Durchmesser der GUVs mit einer von der Octylglucosidkonzentration abhängigen Geschwindigkeit verkleinerte.

5.7. „Fressen“^[4]

Die starke Wirkung von Octylglucosid auf Riesenvesikeln veranlaßte uns, auch ein natürlich vorkommendes Tensid, das Natriumsalz



der Cholsäure **3**, zu untersuchen. Das Cholat **3** gehört zur Steroidfamilie der Gallensäuren, die fettartige Substanzen im Darm löslich machen. Setzt man das Cholat (50 μL einer 5 mM Lösung) GUV-Präparationen zu, löste dies das schnelle Verschmelzen der Vesikeln aus. Wie Abbildung 25 rechts oben

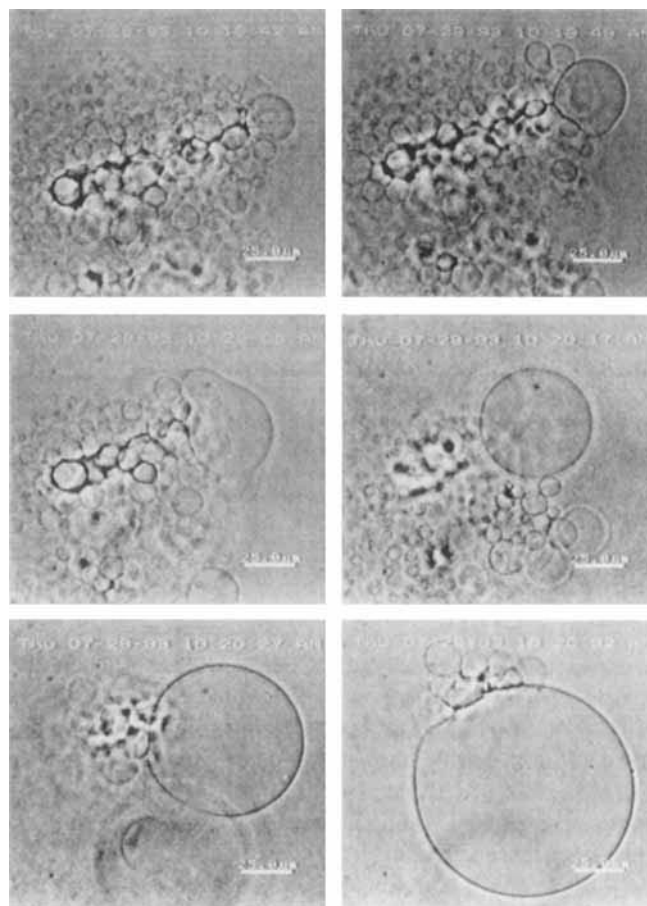


Abb. 25. Durch Natriumcholat ausgelöster Fressvorgang einer unilamellaren DDAB-Vesikel. Die Vesikel in der oberen rechten Ecke wächst beim Verzehren ihrer kleineren Nachbarvesikel. Der gesamte Prozeß dauert weniger als eine Minute.

zeigt, verschlingt eine GUV die kleineren Vesikeln eines benachbarten Trauben-ähnlichen Clusters. Der Durchmesser der fressenden Vesikel wächst mit jeder verschlungenen kleinen Vesikel. Sind in der Nachbarschaft der fressenden Vesikel keine kleinen Vesikeln mehr vorhanden, findet ein unerwartetes und zuvor noch nie beschriebenes Ereignis statt: Die große Vesikel zerfällt, wobei sie nach und nach Lipidmoleküle ausstößt (Abb. 26).

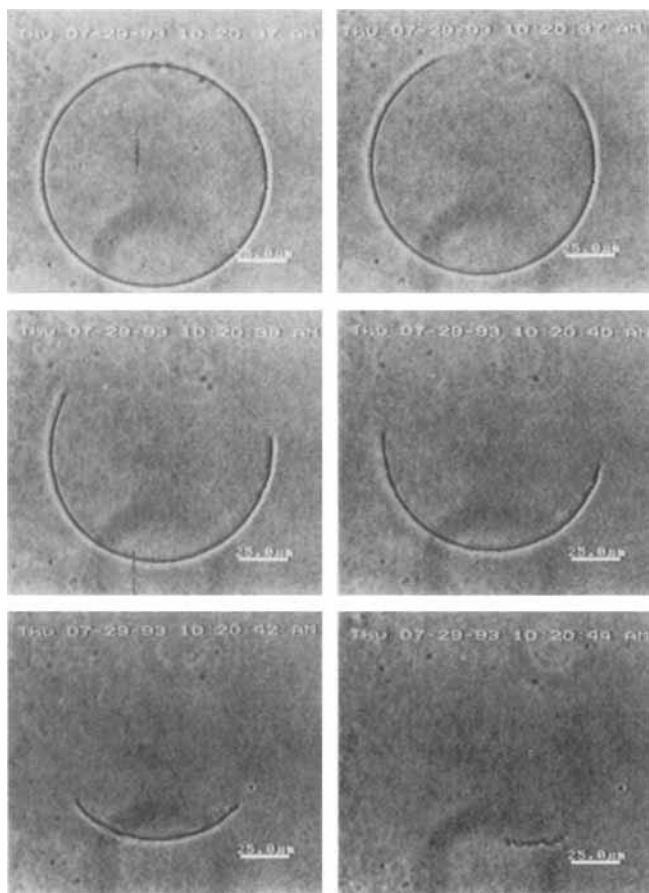


Abb. 26. Zerfall der unilamellaren Riesenvesikel sofort nach Beendigung des in Abb. 25 gezeigten Freißvorgangs. Die vollständige Auflösung der Membran ist nach sechs Sekunden abgeschlossen.

Dieser Vorgang vollzieht sich in nur wenigen Sekunden. Es sieht so aus, als ob eine defekte Stelle in der GUV zu einer Kante mit freiliegenden Lipidmolekülen führt. Ausgehend von diesem Defekt werden dann kontinuierlich Lipidmoleküle durch Cholan-säure in Lösung gebracht, bis schließlich die Vesikeldoppel-schicht verschwunden ist. Es fällt auf, daß die ursprüngliche Kugelform über den gesamten Prozeß bestehen bleibt. Die bei der Auflösung der Membran entstehenden Produkte sind sub-mikroskopisch und könnten – wie andere Arbeitsgruppen po-stuliert haben^[48, 49] – gemischte Micellen sein. Bei höherer Kon-zentration fallen gelegentlich Kristalle von DDAB-Cholat aus der Lösung aus. Ein anderes Steroid, das Cholesterin, hat kei-nen derartigen Einfluß auf die GUVs. Der Einbau von 30% Cholesterin in die DDAB-Doppelschicht stabilisiert vielmehr die Vesikeln.

5.8. Injektion

Die Injektion in Riesenvesikeln war von Anfang an ein vor-rangiges Ziel unserer Untersuchungen. Wenn es gelänge, eine Pipette in eine Vesikel einzuführen (eine Methode, die Cytolo-gen an lebenden Zellen routinemäßig anwenden), dann ließe sich daraus eine Vielzahl von Experimenten ableiten. Man könnte beispielsweise biologische Makromoleküle, wie Enzyme und DNA, innerhalb des begrenzten Volumens einer Riesenvesi-kel untersuchen. Oder unterschiedliche Mengen an Wasser könnten in eine Vesikel eingespritzt werden, um die Elastizität der Doppelschicht gegen einen Innendruck zu testen. Oder man könnte eine störende gelöste Substanz in die Vesikel einbringen und deren unterschiedliche Wirkungen auf die innere und äußere Hälfte der Doppelschicht untersuchen.

Das Injizieren war keine einfach zu lösende Aufgabe. Bei multilamellaren Vesikeln führten die Versuche, in die Vesikeln hineinzustechen, zum Abschälen der Doppelschichten (siehe Abb. 21 und 22), während die meisten unilamellaren Vesikeln bei dem Versuch, sie mit der Mikropipette zu durchdringen, zerplatzten. Schließlich waren wir dennoch erfolgreich. GUVs, deren Durchmesser 200 µm oder mehr betrug und 5% Choleste-rin enthielten, waren elastisch und zerplatzten nicht. Ein gutes Beispiel ist in Abbildung 27 wiedergegeben. Wir glauben, daß

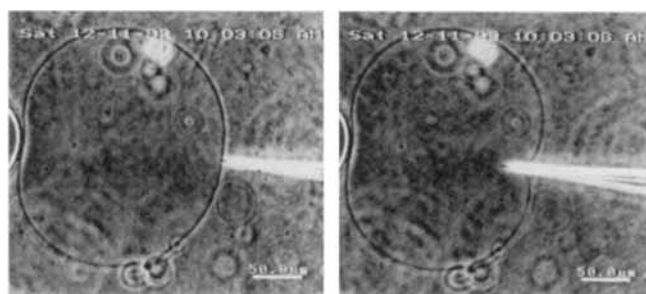


Abb. 27. Einführung einer Mikropipette in eine unilamellare Riesenvesikel beste-hend aus DDAB und Cholesterin (95:5). Der Maßbalken entspricht 50 µm.

die Pipette tatsächlich die Doppelschicht durchstoßen hat, da sich die Vesikel während des Experiments verformt und sowohl die Spitze der Pipette als auch die Vesikel gleichzeitig scharf zu erkennen sind. Einen weiteren Beweis für die Einführung der Pipette in das Vesikelinnere zeigt Abbildung 28: Ein hell erschei-nender Partikel innerhalb der Vesikel konnte mit einem leichten Sog durch die Pipette entfernt werden. Man beachte auch die leichte Verformbarkeit der Vesikel sowie deren Fähigkeit, die durch die Pipette verursachte Verletzung wieder zu heilen.

5.9. Schlußbemerkungen

Wir wollen diesen Aufsatz mit einem Zitat aus den „Personal Reminiscences“ von Albert Szent-Gyorgi beschließen: „In my hunt for the secret of life, I started research in histology. Unsatis-fied by the information that cellular morphology could give me about life, I turned to physiology. Finding physiology too complex, I took up pharmacology. Still finding the situation too complicated, I turned to bacteriology. But bacteria were even

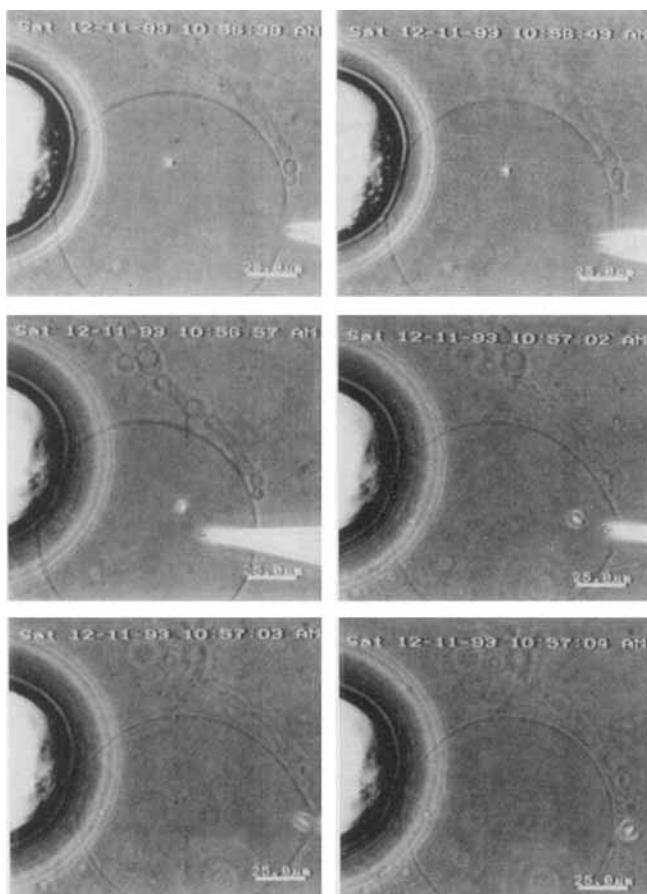


Abb. 28. Heraussaugen eines Partikels (heller Fleck) aus dem Inneren einer unilamellaren Riesenvesikel (DDAB und Cholesterin, 95:5) über eine eingeführte Mikropipette unter leichtem Saugdruck.

too complex, so I descended to the molecular level, studying chemistry and physical chemistry. After twenty years' work, I was led to conclude that to understand life we have to descend to the electronic level, and to the world of wave mechanics. But electrons are just electrons, and have no life at all. Evidently on the way I lost life; it had run out between my fingers."

Dieses Zitat möchte ich nicht mißverstanden wissen: Wir wollen Chemiker in der biologisch orientierten Forschung keineswegs dazu auffordern, ihr Arbeitsgebiet aufzugeben, sondern sie im Gegenteil dazu ermutigen, ihre Bemühungen noch zu verstärken. Allerdings sollte man nie außer acht lassen, daß lebende Zellen eine Komplexität bezüglich ihrer Organisation aufweisen, die bei Systemen im Reaktionsgefäß vollkommen fehlt. Aus diesem Grund sollte man sich in Zukunft von der Chemie der Einzelmoleküle freimachen und statt dessen sich vermehrt der Chemie von Molekülverbänden zuwenden. Da sich eine Gruppe aus organisierten Molekülen anders verhält als ein Einzelmolekül, besteht die Notwendigkeit, die Unterschiede herauszuarbeiten. Dies ist die Philosophie, die die Arbeit in unserer Gruppe während der vergangenen zwei Jahrzehnte geprägt hat, und diese Philosophie spiegelt sich in der Bezeichnung „cytomimetische organische Chemie“ wider.

Der Romancier Tim O'Brien schrieb: „The thing about a story is that you dream it as you tell it, hoping that others might dream along with you, and in this way memory and imagination

and language combine to make spirits in the head.“ Vielleicht ist dies auch das Beste, auf das Wissenschaftler hoffen dürfen, nämlich andere zu inspirieren^[50, 51].

Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert. Dieser Aufsatz ist denjenigen außergewöhnlichen Studenten gewidmet – und bis zu einem gewissen Grad auch für sie geschrieben –, deren Tagesablauf von der Jagd nach dem wissenschaftlichen Fortschritt kontrolliert und bestimmt wird und die sich daran messen.

Eingegangen am 15. Juli 1994 [A 74]

Übersetzt von Dr. Sabine Töteberg-Kaulen. Boffzen

- [1] F. M. Menger, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1086.
- [2] D. D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam, **1993**, S. 94, 118, 122, 189.
- [3] F. M. Menger, N. Balachander, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5862.
- [4] F. M. Menger, K. Gabrielson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1567.
- [5] G. Crile, M. Telkes, A. Rowland, *Protoplasma* **1932**, 15, 337.
- [6] Wir danken Dr. Adolph E. Smith, daß er uns auf die Arbeit von Crile hingewiesen hat.
- [7] R. Beutner, *Physical Chemistry of Living Tissues and Life Processes*, Williams and Wilkins, Baltimore, **1933**.
- [8] A. E. Smith, D. H. Kenyon, *Perspect. Biol. Med.* **1972**, 529.
- [9] A. D. Bangham, M. W. Hill, N. G. A. Miller, *Meth. Memb. Biol.* **1973**, 1, 1.
- [10] *Liposomes as Drug Carriers* (Hrsg.: G. Gregoriadis), Wiley, Winchester, **1988**; *Liposomes* (Hrsg.: M. J. Ostro), Dekker, New York, **1987**; G. Storm, H. P. Wilms, D. J. A. Crommelin, *Biotherapy* **1991**, 3, 25; G. L. Scherphof, T. Damen, H. J. H. Spanjer, F. H. Roerdink, *Lipids* **1987**, 22, 891; S. Wright, L. Huang, *Adv. Drug. Del. Rev.* **1989**, 3, 343.
- [11] R. R. C. New, *Liposomes, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1990**.
- [12] F. M. Menger, J.-J. Lee, P. Aikens, S. Davis, *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, 129, 185.
- [13] J. M. H. Kremer, M. W. J. Esker, C. Pathmanathan, P. H. Wiersema, *Biochemistry* **1977**, 16, 3932.
- [14] D. W. Deamer, A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 443, 629; M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, 90, 1905.
- [15] F. M. Menger, D. S. Davis, R. A. Persichetti, J.-J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2451.
- [16] J. P. Reeves, R. M. Dowben, *J. Cell. Physiol.* **1969**, 73, 49; H. H. Hub, U. Zimmerman, H. Ringsdorf, *FEBS Lett.* **1982**, 140, 254.
- [17] D. Needham, E. Evans, *Biochemistry* **1988**, 27, 8261.
- [18] N. Oker, J. F. Scheerer, R. C. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 692, 384.
- [19] N. Oker, R. C. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 734, 54.
- [20] K. Higashi, S. Suzuki, H. Fujii, Y. Kirino, *J. Biochem.* **1987**, 101, 433.
- [21] D. D. Lasic, *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, 140, 302.
- [22] J. H. Richardson, *Handbook for the Light Microscope. A User's Guide*, Noyes, Park Ridge, NJ, **1991**.
- [23] A. Walter, P. K. Vinson, A. Kaplun, Y. Talmon, *Biophys. J.* **1991**, 60, 1315.
- [24] H. T. Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM). Theory and Practice*, Dekker, New York, **1974**; X. K. Zhao, P. J. Herve, J. H. Fendler, *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 908.
- [25] P. Mueller, T. F. Chien, B. Rudy, *Biophys. J.* **1983**, 44, 375. Ein weiteres Beispiel für Dunkelfeld-Mikroskopie: H. Hotani, *J. Mol. Biol.* **1984**, 178, 113.
- [26] R. Büschl, H. Ringsdorf, W. Zimmermann, *FEBS Lett.* **1982**, 150, 38.
- [27] H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 117; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 113.
- [28] E. Sackmann, H.-P. Duwe, K. Zeman, A. Zilker in *Structure and Dynamics of Nucleic Acids, Proteins, and Membranes* (Hrsg.: E. Clementis, S. Chin), Plenum, New York, **1986**, S. 251.
- [29] E. Sackmann, H.-P. Duwe, H. Engelhardt, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, 81, 281.
- [30] S. Svetina, B. Zeks, *Biomed. Biochem. Acta* **1983**, 42, 86.
- [31] J. Käs, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1991**, 60, 825.
- [32] E. Evans, D. Needham, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, 81, 267.
- [33] D. L. Taylor, M. Nederlof, F. Lanni, A. S. Waggoner, *Am. Sci.* **1992**, 80, 322.
- [34] A. J. Lacey, *Light Microscopy in Biology. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1989**, S. 18.
- [35] Ein vollständig ausgestattetes Labor für Lichtmikroskopie einschließlich Mikromanipulationszubehör kostet weniger als \$ 100 000. Ein Mikroskop mit Polaroid-Kamera, eine für viele GUV-Versuche ausreichende Ausstattung, kann bereits für einen Bruchteil dieses Betrags erworben werden.
- [36] Wir danken Professor J. B. F. N. Engberts für diese Bezeichnung.
- [37] D. Hoekstra, *Biochemistry* **1982**, 21, 2833.

- [38] D. Yogeve, B. C. R. Guillaume, J. H. Fendler, *Langmuir* **1991**, 7, 623.
 [39] J. H. Clint, *Surfactant Aggregation*, Chapman and Hall, New York, **1992**, S. 271.
 [40] A. C. Cowley, N. L. Fuller, R. P. Rand, V. A. Parsegian, *Biochemistry* **1978**, 17, 3163.
 [41] *Molecular Mechanisms of Membrane Fusion* (Hrsg.: S. Ohki, D. Doyle, T. D. Flanagan, S. W. Hui, E. Mayhew), Plenum, New York, **1988**.
 [42] E. W. Anacker, A. L. Underwood, *J. Phys. Chem.* **1981**, 85, 2463; D. F. Evans, *Langmuir* **1988**, 4, 3.
 [43] D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1981**, 77, 601. Wir verweisen auch auf eine wichtige Arbeit, in der die Wirkung von Anionen auf Vesikeln durch Video-verstärkte Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie untersucht worden ist: J. E. Brady, D. F. Evans, B. Kachar, B. W. Ninham, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4279.
 [44] L. A. M. Rupert, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3920.
 [45] D. Papahadjopoulos, *Cell. Surf. Rev.* **1978**, 5, 765.
 [46] P. Mueller, T. F. Chien, B. Rudy, *Biophys. J.* **1983**, 44, 375.
 [47] J. Ruiz, F. M. Goni, A. Alonso, *Biochem. Biophys. Acta* **1988**, 937, 127.
 [48] M. N. Jones, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 127.
 [49] M. Ueno, Y. Akechi, *Chem. Lett.* **1991**, 1801.
 [50] Zwei kurze Abhandlungen über die Eigenschaften von Vesikeln, ein Aufsatz und ein Editorial, sind sehr zu empfehlen: R. Lipowsky, *Nature* **1991**, 349, 475; J. Maddox, *ibid.* **1993**, 363, 205.
 [51] Weitere Beispiele für Wachstum, Verschmelzung, Undulation, Ausscheidung, Verwundung und Heilung werden in Kürze publiziert (F. M. Menger, S. J. Lee, *Langmuir*, im Druck).

Veranstaltungshinweis BAM-Workshop

"Chemometrische Methoden der analytischen Qualitätssicherung"

vom 30.11.1995 bis 01.12.1995 in Berlin-Adlershof

Der von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Referat "Qualitätssicherung und Methodik der chemischen Analytik" veranstaltete Workshop umfaßt folgende Themenschwerpunkte:

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Validierung • Anwendung statistischer Tests • Nachweisgrenzen • Varianzanalytische Verfahren | <ul style="list-style-type: none"> • Ergebnisunsicherheit • Kalibrierung • Ausgleichsverfahren • Ringversuchsauswertung |
|---|---|

Vortragende: Prof. Doerffel (Leipzig), Prof. Ehrlich (Dresden), Dipl.-Math. Fritz (BAM), Prof. Gnauck (BTU Cottbus), Dr. Hässelbarth (BAM), Prof. Henrion (HU Berlin)

Detailliertes Programm, Veranstaltungshinweise und Anmeldung: Dr. Hässelbarth, BAM, Referat I.01, Rudower Chaussee 5, 12489 Berlin,

Tel. (030) 63925861, Fax. (030) 63925787

Teilnehmergebühr: 150 DM

Anmeldeschluß: **30.10.1995**