

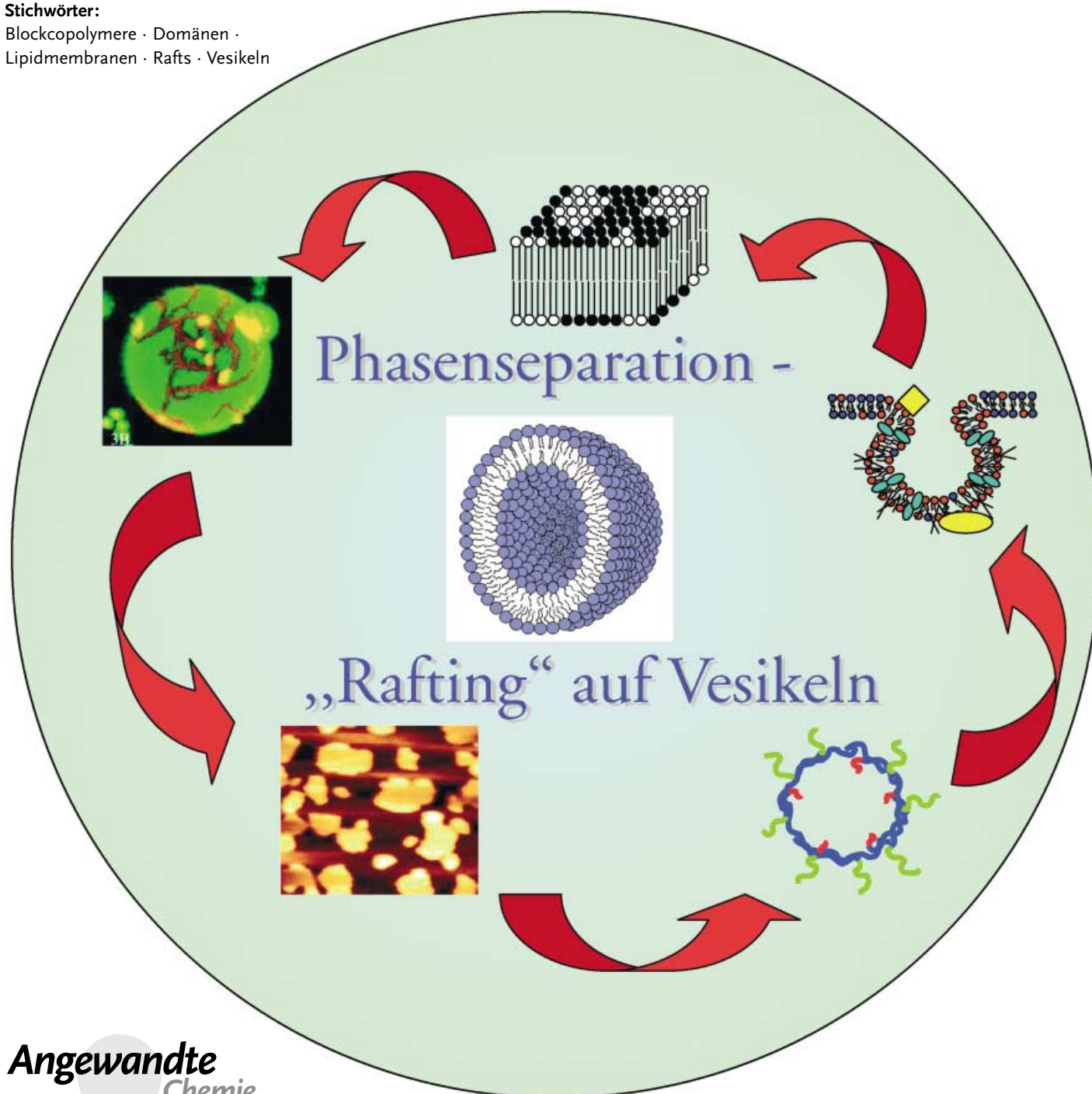
Lipidmembranen

Domänen und Rafts in Lipidmembranen

Wolfgang H. Binder,* Veronique Barragan und Fredric M. Menger

Stichwörter:

Blockcopolymere · Domänen ·
Lipidmembranen · Rafts · Vesikeln



„It takes a membrane to make sense out of disorder in biology. You have to be able to catch energy and hold it, storing precisely the needed amount and releasing it in measured shares.“ *Die herausragende Rolle von Domänen und „Rafts“ für das von Lewis Thomas in The Lives of Cells so treffend beschriebene Verhalten von Lipidmembranen ist Gegenstand dieses Aufsatzes. Erläutert wird der experimentelle Nachweis, der Aufbau und die Bildung von Domänen sowie die Eigenschaften von Rafts – einer speziellen Form von Domäne – und ihr möglicher Einfluss auf menschliche Krankheiten. Lipide, Polymere und Proteine können zu solchen Mikro- und Nanostrukturierungen innerhalb einer Membran beitragen, wodurch ein neuer Typ struktureller Ordnung in Doppelschichtmembranen entsteht. Ein Verständnis für diese unterschiedlichen Arten von Ordnungen innerhalb selbstorganisierter Systeme zu vermitteln, ist vorrangiges Ziel dieses Aufsatzes.*

Aus dem Inhalt

1. Einführung	5981
2. Experimentelle Grundlage der Domänen- und Raft-Forschung	5982
3. Phasenseparation und Domänenbildung in Lipiddoppelschicht-Modellen	5985
4. Rafts	5993
5. Polymerinduzierte Phasenseparation	5996
6. Biologische Auswirkung der Phasenseparation	6001
7. Ausblick	6004

1. Einführung

Lipide sind wesentlich komplexer aufgebaut als andere biologische Bausteine wie Polynucleotide, Proteine und Polysaccharide, die als kovalente Kettenmoleküle keine schnellen Sequenzänderungen eingehen können. Lipide ordnen sich durch nichtkovalente Bindungen „von selbst“ an und können sich innerhalb der so gebildeten Membranen auf unterschiedliche Arten frei verschieben. Um sich die Bewegungsmöglichkeiten der Lipide zu veranschaulichen (Abbildung 1),

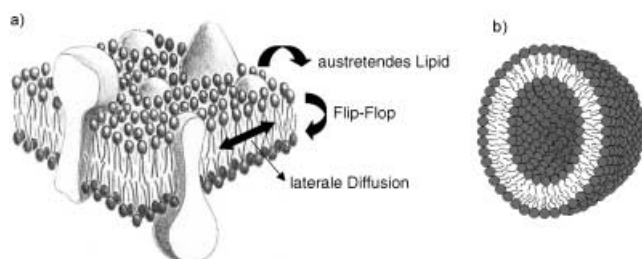


Abbildung 1. a) Lipiddoppelschichtmembran; b) Aufbauprinzip einer Vesikel.

muss man sich eine Biomembran als Doppelschicht vorstellen, wobei sich die polaren Gruppen an der Membranoberfläche befinden und die hydrophoben Ketten in das Membraninnere gerichtet sind. Je nach Lipid- und Membranaufbau kann sich ein Lipidmolekül zwischen den beiden Membranschichten durch laterale Diffusion verschieben, durch einen Flip-Flop-Prozess von einer Schicht zur nächsten springen oder sich vollständig von der Membran abtrennen. Wie im Folgenden gezeigt wird, sind die Eigenschaften solcher Membranen größtenteils von dieser hohen Bewegungsfreiheit der Lipidbausteine bestimmt.

Wenn eine Membran mindestens zwei Lipide enthält (was meistens der Fall ist), so besteht die Möglichkeit, dass sich eine der Lipid-Komponenten als Domäne organisiert. Spezielle Domänen („Rafts“), die unter anderem mit Cholesterin und Sphingolipiden angereichert sind, wurden in jüngster Zeit mit Signalübertragung und „membrane trafficking“ in Verbindung gebracht.^[1] Domänen und Rafts sind Gegenstand dieses Aufsatzes, wobei der thematische Schwerpunkt auf chemischen Aspekten liegt.

Als nächstes gilt es, den Begriff der Vesikel (des Liposoms) näher zu definieren. Vesikeln sind geschlossene Hohlkugeln mit einer Doppelschichtmembran als Außenhülle (Abbildung 1). Es gibt eine Reihe von Methoden zum Aufbau von Vesikeln,^[2] für unsere Zwecke genügt es jedoch zu wissen, dass Lipide eine natürliche Affinität zur Bildung von Vesikeln haben. Die Einwirkung starker Scherkräfte auf die Lipide, wie sie z. B. durch Ultraschall oder Filtration durch poröse Membranen induziert werden, kann diesen Prozess erleichtern. Durch die Wahl der geeigneten Lipide oder Lipidmischungen lassen sich die Eigenschaften der Membran

[*] Prof. Dr. W. H. Binder
Institut für Angewandte Synthesechemie
Abteilung Makromolekulare Chemie
Technische Universität Wien
Getreidemarkt 9/163/MC, 1060 Wien (Österreich)
Fax: (+43) 1-58801-16299
E-mail: wbinder@mail.zserv.tuwien.ac.at

Dr. V. Barragan
University of Montpellier, ENSCM
Laboratoire de Chimie Biomoléculaire
8, rue de l'Ecole Normale
34296 Montpellier cedex 05 (Frankreich)

Prof. Dr. F. M. Menger
Chemistry Department
Emory University
1515 Pierce Drive, 30322 Atlanta, GA (USA)

hinsichtlich Temperaturstabilität, Steifheit, elektrischer Ladung, Oberflächenbeschaffenheit und Vesikelgröße leicht einstellen. So sind unter anderem folgende Vesikeltypen in der Literatur beschrieben (unilamellar deutet hierbei auf lediglich eine Doppelmembran-Hülle hin): kleine unilamellare Vesikeln (SUVs) mit einem Durchmesser von 30 bis 100 nm, große unilamellare Vesikeln (LUVs) mit einem Durchmesser von 100 bis 200 nm und Riesenvesikeln (GVs), deren Größe von 1 bis 100 μm reicht (im Lichtmikroskop sichtbar). Als einfache und wirklichkeitsgetreue Nachahmungen von Biomembranen sind Vesikeln ein wichtiges Instrument in der modernen Domänen- und Raft-Forschung.

Wie bereits erwähnt, sind Biomembranen gewöhnlich aus Lipidmischungen aufgebaut. Die Hauptbestandteile sind Phospholipide, Glycerolipide, Sphingolipide und Cholesterin neben einer Vielzahl von Nebenkomponten wie Lysolipiden, Glycolipiden und Cerebrosiden. Zusammen mit membrangebundenen Proteinen, die bis zu 70 % der Membranoberfläche belegen, entsteht so ein äußerst komplexes System. Jeder Zelltyp und sogar jeder einzelne Membrantyp innerhalb einer Zelle hat eine charakteristische Lipidzusammensetzung (d. h., die prozentualen Mengenverhältnisse der einzelnen Lipide unterscheiden sich).^[3] Auch während des Zellwachstums unterliegt die Zusammensetzung der Lipide gewissen Schwankungen^[4] und kann sogar von der Ernährungsweise abhängen.^[5] Verglichen damit nimmt sich die Kombination von vier Nucleotiden oder zwanzig Aminosäuren geradezu trivial aus, zumal ihr kovalenter Verknüpfungsmodus zu mehr oder minder stabilen und innerhalb der Zelle einheitlichen Sequenzen führt.

Früher wurde angenommen, dass die intermolekularen Kräfte zwischen Lipidmolekülen relativ gering sind und eine statistische Verteilung der Lipide innerhalb einer Membran resultiert. Wie bereits erwähnt, folgt jedoch aus neueren Untersuchungen, dass sich Lipide zu Domänen und Rafts zusammenlagern, die die Membraneigenschaften maßgeblich beeinflussen. Abbildung 2 verdeutlicht zwei Arten der Entmischung einer Doppelschichtmembran aus zwei unterschiedlichen Lipiden: a) Lipide können sich innerhalb einer Schicht durch laterales Clustering anordnen, wobei Domänen und Rafts gebildet werden. b) Die beiden Lipidtypen können sich selektiv zu entgegengesetzten Membranschichten anordnen (vertikale Phasentrennung). Beide Prozesse treten sowohl in natürlichen (Zellen) als auch synthetischen Systemen (Vesikeln) auf.

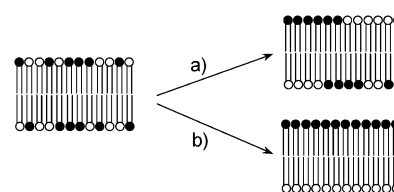


Abbildung 2. Gemischte Lipiddoppelschicht mit zwei Haupttypen der Phasenseparation zweier doppelkettiger Lipide: a) laterale Phasenseparation, b) vertikale Phasenseparation.

Wenn mehr als zwei Lipide am Aufbau einer Membran beteiligt sind, wird der Mechanismus der Domänen- und Raftbildung wegen der vielfältigen Wechselwirkungen wesentlich komplizierter. Jede Domänen- und Raftbildung ist ein Phasensegregationsprozess, der durch Änderung äußerer Parameter wie der Temperatur, der ionischen Ladung oder des Kompressionsdrucks einer Monoschichtmembran ausgelöst wird. Auch der Einbau von Makromolekülen in eine Doppelschicht kann eine Umlagerung der Lipide in Domänen und Rafts bewirken.

2. Experimentelle Grundlage der Domänen- und Raft-Forschung

In diesem Abschnitt werden wir die experimentellen Ansätze zur Identifizierung und Charakterisierung der Domänenbildung vorstellen. Wir beginnen mit vier älteren Arbeiten, die auch nach mehr als zwei Jahrzehnten noch äußerst aufschlussreich sind und den Gesamtkontext verdeutlichen sollen. Im Anschluss daran werden neuere Experimente zu Domänen und Rafts präsentiert.

Jacobson und Papahadjopoulos^[6] beschrieben 1975 die Erzeugung einer Lipiddomäne (damals als „molekulare Segregation“ oder „Phasenseparation“ bezeichnet) durch Versetzen einer gemischten Lipidmembran mit Ca^{2+} -Ionen. Zur Erläuterung dieses Experiments soll zunächst der so genannte „Gel-Flüssigkristall-Phasenübergang“ (hier künftig als Fest-fluid-Phasenübergang bezeichnet) erklärt werden. Hierbei geht die Doppelschicht in einem hoch kooperativen Prozess von einem geordneten in einen ungeordneten Zustand über, sobald eine Phasenübergangstemperatur T_m überschritten ist. Bei diesem schmelzähnlichen Vorgang dehnt sich die Doppelschicht lateral aus und wird dünner,

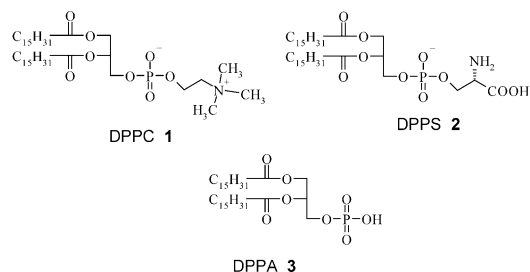


Wolfgang Binder promovierte 1995 mit einer Arbeit zur Kohlenhydratsynthese an der Universität Wien unter Betreuung von Prof. W. Schmid. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. F. M. Menger (Arbeiten zur kombinatorischen Polymerchemie) verbrachte er ein weiteres Postdoc-Jahr bei Prof. J. Mulzer an der Universität Wien (Arbeiten zur organischen Synthese). Seit 1997 ist er Assistenzprofessor an der Technischen Universität Wien. Seine Forschungsarbeiten umfassen nanostrukturierte Polymere, Membranen und Polymernetzwerke.



Veronique Barragan promovierte an der Universität Montpellier. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. F. M. Menger kehrte sie nach Montpellier an die Chemie-Fakultät zurück (Laboratoire de Chimie Biomoléculaire von Prof. Montero). Ihre Forschungsarbeiten umfassen biomedizinische Aspekte der Kohlenhydrat-, Liposomen- und Membranchemie.

da die unterhalb von T_m vorliegende *all-trans*-Konformation der linearen Ketten durch Rotation von Lipidmolekülen in diverse *gauche*-Konformationen übergeht. Eine gängige Technik zur Bestimmung von T_m ist die Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC). Bei dieser Methode wird eine Membransuspension langsam in einem Kalorimeter aufgeheizt und die Temperatur abgelesen, bei der ein endothermer Peak auftritt.



Das Lipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (**1**, DPPC) hat eine scharf ausgeprägte Übergangstemperatur von 42°C. Eine Mischung aus 34% DPPC und 66% Rinderhirn-Phosphatidylserin (PS, DP-freies **2**) zeigt im DSC-Spektrum dagegen ein breites Signal zwischen 5 und 28°C, das sich in Gegenwart von 10 mM Ca^{2+} in zwei Signale bei 29 und 42°C aufspaltet. Dieses Ergebnis bedeutet, dass durch Phasenseparation „reine“ DPPC-Domänen gebildet wurden (angezeigt durch das T_m -Signal bei 42°C); Ursache ist die Komplexbildung der PS-Carboxylatgruppen mit den Ca^{2+} -Ionen.

Hartmann und Galla beschrieben 1978^[7] die Polylysin-induzierte molekulare Organisation eines Lipids in einer Doppelschichtmembran. Um nachzuweisen, dass die Assoziation von Membranen mit Peptiden die Zusammenlagerung anionischer Lipidmoleküle zu Domänen auslöst, wurden Methoden wie Spinmarkierung, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie eingesetzt. Die Fluoreszenzexperimente sollen hier näher vorgestellt werden.



Pyren 4

Pyren (**4**) bildet 1:1-Komplexe (Excimere) bestehend aus je einem Monomer im Grundzustand und im ersten angeregten Singulett-Zustand. Die Fluoreszenz der Monomere und die Emission des Excimers sind spektral klar voneinander getrennt. Beim Übergang von einem fluiden in einen festen Membranzustand (z.B. durch Absenken der Temperatur

unter T_m) reichert sich Pyren in den fluiden Membranabschnitten an, die eine zeitlang mit der festen Membran koexistieren. Anschaulich beschrieben „quetscht“ die feste Membran Pyren aus, das sich in der flüssigen Phase konzentriert. Dabei ist ein erhöhtes Excimer-Monomer-Fluoreszenzverhältnis zu beobachten.

Aus dem anionischen Lipid Dipalmitoylphosphatidsäure (**3**, DPPA; $T_m = 50^\circ\text{C}$) und 3 Mol-% Pyren (**4**) kann eine Vesikelmembran hergestellt werden. In einem Experiment wird die Probe dann bei 60°C (hier liegt das Lipid flüssig vor) mit Polylysin, einem Polykation, versetzt. Die Polylysinmoleküle binden durch elektrostatische Wechselwirkungen an die anionischen Vesikeln, sodass sich das anionische Lipid an den Bindungsstellen zu einem festen Aggregat ordnet (Abbildung 3). Nachgewiesen wurde diese Domänenbildung durch das erhöhte Verhältnis zwischen Excimer- und Monomer-Emission nach der Polylysin-Zugabe, das belegt, dass sich Pyren im flüssigen Lipid, d.h. außerhalb der Polylysin-induzierten festen Phase, angereichert hat.

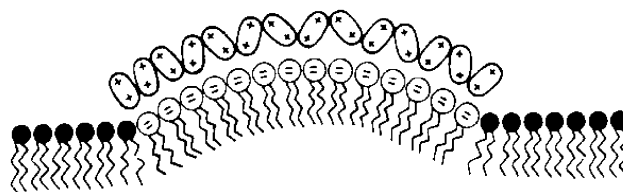
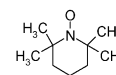


Abbildung 3. Domänenbildung durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen Polylysin und einem anionischen Phospholipid. Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [7].

Shimshick und McConnell untersuchten in den frühen 70er Jahren^[8] die laterale Phasentrennung in Phospholipidmembranen mit EPR-Spektroskopie. Die Methode beruhte auf der Verteilung von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-Oxid (**5**, TEMPO) zwischen dem Innenraum einer fluiden Membran und dem Umgebungswasser. Wenn die Temperatur unter T_m gesenkt wird, wechselt die Doppelschichtmembran ihren Aggregatzustand von fluid nach fest, und TEMPO wird in die wässrige Phase abgeschieden. Da die Probe in der fluiden Membran und in Wasser unterschiedliche EPR-Eigenschaften hat, können die Konzentrationen in beiden Umgebungen eindeutig bestimmt werden. Wenn die Membran z.B. 50% TEMPO in das Umgebungswasser freisetzt, so kann geschlossen werden, dass sich 50% der Membran zu festen Domänen geordnet hat. Unstetigkeiten in Phasendiagrammen (d.h. Auftragungen von Phasenzuständen bei unterschiedlichen Temperaturen und Lipidverhältnissen) werden als Beweis für spontane Domänenbildung angesehen.



TEMPO 5

Bei einer binären Mischung zweier Phosphatidylcholins, deren gesättigte Kettenenden sich um lediglich zwei C-Atome in ihrer Länge unterscheiden, kann eine ideale Mischung beobachtet werden. Demnach bildet eine Mischung aus DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholin; zwei C_{14} -Ketten) und DPPC (zwei C_{16} -Ketten) eine einzige homogene feste Phase. Bei 30°C und einem Anteil von 0–25 Mol-%



Fredric M. Menger ist Professor für Chemie an der Emory University. Wenn er über seinen nachhaltigsten Beitrag zur Wissenschaft nachdenkt, gerät ihm umgehend die Zusammenarbeit mit ehemaligen Schülern wie Wolfgang und Veronique in den Sinn, die nun, mittlerweile selbst Professoren, die Kette der Forschungsarbeiten fortführen.

DPPC liegt die Doppelschichtmembran laut EPR-Messungen in fluidem Zustand vor, bei 25–60 Mol-% DPPC werden fluide und feste Phasen nebeneinander nachgewiesen, und bei einem DPPC-Gehalt über 60 Mol-% wird eine feste, einheitliche Membran als ideale Mischung beobachtet. Wenn sich die Kettenlänge zweier Phospholipide um mehr als zwei C-Atome unterscheidet oder wenn die Lipide unterschiedliche Kopfgruppen tragen (z. B. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin), können heterogene Festphasen entstehen. Unter der Voraussetzung, dass sich das Gleichgewicht hinreichend langsam innerhalb der festen Phase einstellt, kann es zu einer Wanderung der Lipide in der Doppelschichtmembran unter Bildung von Monolipidclustern kommen. Dieser einfache Typ der Domänenbildung ist bei fluiden Membranen zwar bekannt, wird dort aber selten beobachtet.

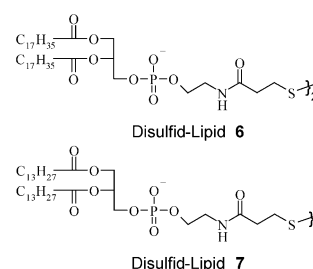
Wilkinson and Nagle^[9] setzten 1979 eine dilatometrische Methode ein, um Nichtmischbarkeiten (Domänen) in binären Mischungen von DMPC (zwei C₁₄-Ketten) und D-C₂₀PC (zwei C₂₀-Ketten) nachzuweisen. Sie stellten multilamellare Vesikeln her, indem sie die beiden Lipide in Chloroform lösten, das Lösungsmittel entfernten und den entstandenen Film mit Wasser versetzten. Alternativ dazu wurde das Lipidgemisch in Wasser suspendiert, oberhalb von *T_m* mit Ultraschall verteilt, vom Wasser befreit und anschließend erneut in Wasser suspendiert. Dilatometrische Messungen zeigten bei Lösungen von 10–15 mg mL⁻¹ einen abrupten Anstieg des spezifischen Volumens, sobald die Temperatur über *T_m* stieg.

DMPC und D-C₂₀PC haben *T_m*-Werte von etwa 24 bzw. 63 °C. Das Phasendiagramm (basierend auf dilatometrischen Daten) zeigt einen konstanten Fest-fluid-Übergang bei 24 °C für Vesikeln mit einem Gehalt von 1–90 Mol-% D-C₂₀PC in DMPC. Dies belegt, dass D-C₂₀PC aus der DMPC-Phase segregiert und die „normale“ Übergangstemperatur des reinen DMPC (*T_m* = 24 °C) nicht beeinflusst.

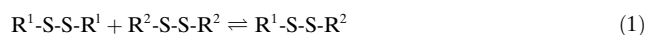
NAP-22, ein Protein aus Rattenhirn, wurde mit hydrophoben Myristoyl-Ketten derivatisiert. In-vitro-Experimenten zufolge bindet es ausschließlich an Cholesterin-haltige Vesikeln. In einer kürzlich publizierten Arbeit untersuchten Epanand et al.^[10] die Frage, ob NAP-22 aufgrund seiner Cholesterin-spezifischen Bindungseigenschaften die Bildung von Cholesterin-angereicherten Domänen in Biomembranen induzieren kann. Methode der Wahl war unter anderem die In-situ-Kraftmikroskopie (In-situ-AFM). In den Experimenten wurde zunächst ein Film, bestehend aus Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) und 40 Mol-% Cholesterin, hydratisiert. Durch Ultraschallbehandlung wurden kleine Vesikeln erzeugt (1 mg mL⁻¹) und anschließend in eine AFM-Flüssigzelle, die zuvor mit einem Stück frisch gespaltenem Glimmer versehen wurde, injiziert. Dabei wurde die spontane Bildung von Doppelschichten auf dem Glimmerträger beobachtet. Nach anschließendem Spülen der Zelle mit Pufferlösung wurde ein Referenzbild einer proteinfreien Probe aufgenommen, die Zelle mit NAP-22-Lösung versetzt und erneut vermessen. Die Oberflächenbeschaffenheit der trägerfixierten Doppelschicht änderte sich bei der NAP-22-Zugabe deutlich: Während die proteinfreie Membran eine glatte Oberfläche aufwies, wurde in Gegenwart von NAP-22 eine

etwa 1 nm dicke „Proteindecke“ beobachtet. Da der Durchmesser eines NAP-22-Moleküls etwa 3.7 nm beträgt, weist dieses Ergebnis auf eine teilweise Einbettung des Proteins in die Lipiddoppelschicht hin. Genauer AFM-Untersuchungen zufolge enthielt die Proteindecke proteinreiche Regionen, die räumlich isoliert und in ihrer Höhe abgesetzt waren. Aufgrund von Circular dichroismus-Spektren und DSC-Experimenten wird vermutet, dass die NAP-22-induzierten Domänen tatsächlich eine erhöhte Konzentration an Cholesterin aufweisen.

Ein wohl einzigartiger experimenteller Ansatz ist der von Regen et al.^[11] beschriebene Thiolat-Disulfid-Austausch. Untersucht wurden Lipiddimere, die durch eine S-S-Gruppe verknüpft sind. Wenn zwei unterschiedliche Lipid-Homodimere (R¹-S-S-R¹ (6) und R²-S-S-R² (7)) in gleichen Anteilen



gemischt werden, stellt sich in Gegenwart eines Katalysators das Gleichgewicht (1) ein. Sofern die Bildung der Homodimere nicht bevorzugt ist, wird idealerweise ein statistisches Verhältnis zwischen Hetero- und Homodimeren von 2:1:1 erwartet.

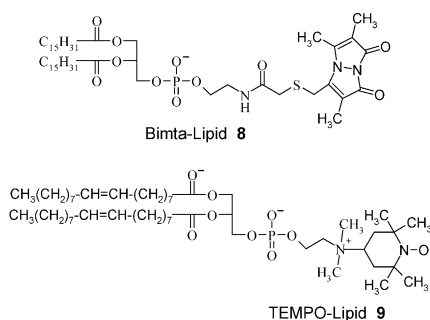


Die beiden Phospholipid-Homodimere 7 und 6 (eines mit C₁₄-, das andere mit C₁₈-Ketten) wurden gemischt und im Inneren einer unilamellaren Riesenvesikel äquilibriert. Gemäß HPLC-Analyse betrug der Anteil an Heterodimer innerhalb der Vesikel 1.55, was einer nichtstatistischen Verteilung der Lipiddimere bei einer bevorzugten Bildung der Homodimere entspricht. Dieser Effekt wurde als „nearest neighbor recognition“ bezeichnet, allerdings könnte auch eine intramolekulare Präferenz von R¹ für R¹ und/oder R² für R² eine Rolle spielen. (Interessanterweise wurde die statistische 2:1:1-Verteilung erhalten, wenn die beiden Homodimere in der Doppelschicht mit 50 Mol-% DPPC gemischt wurden.) Eine unmittelbare Erklärung für den Faktor 1.55, etwa anhand von Domänenengröße und -zusammensetzung, ergibt sich jedoch nicht.

Im Folgenden beschreiben wir Experimente mit Zellmembranen, die direkten Aufschluss über Lipidzusammensetzungen in Membrandomänen geben. Membrankomponenten tierischer Zellen werden gewöhnlich durch nichtionische Detergentien bei niedrigen Temperaturen gut gelöst, allerdings wurde entdeckt, dass ein Teil der Zellmembranlipide von Säugern unlöslich ist. Wie mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nachgewiesen wurde, sind

diese unlöslichen Bestandteile mit Cholesterin angereichert.^[12] Diese „Lipid-Rafts“ liegen innerhalb der Membrandoppelschicht als flüssig-geordnete (l_o) Domänen in Nachbarschaft zu flüssig-ungeordneten (l_d) Domänen vor (l_o - und l_d -Domänen sind beide fluid, aber von unterschiedlichem Typus). Die einzelnen Membrankomponenten der l_o - und der l_d -Domänen wurden nach Behandlung der unlöslichen bzw. löslichen Bestandteile mit Detergentien chemisch analysiert.

Silvius et al.^[13] untersuchten die Lipidverteilung innerhalb der Rafts mithilfe von Fluoreszenz-Quenching. Dieses Experiment umfasst, vereinfacht geschildert, Membrandoppelschichten mit unterschiedlichen Komponenten (die unter (a) und (b) genannten kommen in den meisten biologischen Rafts vor): a) eine Sphingolipid-Phospholipid-Mischung, b) zusätzlich 33 Mol-% Cholesterin, c) zusätzlich geringe Mengen eines fluoreszierenden Phospholipids (z.B. **8**),



d) zusätzlich ein spinmarkiertes Phosphatidylcholin (z.B. **9**) als Fluoreszenzquencher. Die Quenchkurven der fluoreszierenden Sonden wurden bei steigendem Anteil (0–100%) an spinmarkiertem Phosphatidylcholin (bezüglich der Mischung aus unmarkiertem Sphingolipid und Phospholipid) aufgenommen.

Es wurden zwei Typen von Quenchkurven beobachtet: Der eine Kurvenverlauf war in Einklang damit, dass die Lipidkomponenten über den gesamten Bereich der Zusammensetzung der Doppelschicht eine einzige Phase bilden, ein zweiter Verlauf ließ auf eine l_o - l_d -Phasentrennung schließen. Die Analysen belegen unter anderem, dass sich ein fluoreszierendes Phospholipid, das zwei gesättigte C_{20} -Ketten enthält, bereitwillig in einer l_o -Domäne verteilt, während Lipide mit zwei C_{14} -Ketten nur bedingt in die Rafts eindringen können. Lipide mit zwei *cis*-Doppelbindungen zeigen schließlich keinerlei Tendenz mehr zur Verteilung in l_o -Phasen.

In einem abschließenden Beispiel für die experimentellen Methoden in der Domänen- und Raft-Forschung soll die Spreitung eines Lipidfilms mit der Dicke einer Moleküllage auf einer Wasseroberfläche unter Verwendung einer Langmuir-Filmwaage vorgestellt werden (Abbildung 4).^[14a] In dieser Versuchsanordnung liegt die Monoschicht als eine rechteckige Fläche vor, die auf einer Seite von einer beweglichen Barriere, auf der anderen Seite von einem Schwimmer, der mit einem Torsionsdraht verbunden ist, begrenzt wird. Wenn die bewegliche Barriere den Film staucht (d.h. seine

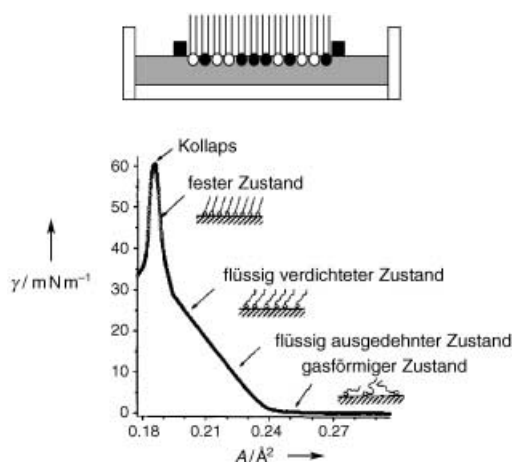


Abbildung 4. Das Verhalten eines Lipids auf einer Langmuir-Filmwaage in den einzelnen Stadien seiner Phasenzustände. Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [14a].

Fläche verkleinert), erhöht sich der Oberflächendruck, der direkt durch die Schwimmervorrichtung gemessen werden kann. Durch die Verkleinerung der Fläche kann es zu einer Neuausrichtung der Moleküle aus ihrer horizontalen in eine platzsparende vertikale Position kommen. Auf diese Weise lässt sich die Orientierung von Molekülen nicht nur beeinflussen, sondern auch bestimmen, indem man die Fläche pro Molekül im Lipidfilm mit der Moleküldimension vergleicht.

Was hat dies mit Doppelschichten zu tun? In einem komprimierten Lipidfilm befinden sich die Kopfgruppen in der Wasserphase, während die lipophilen Ketten mehr oder minder herausragen. Eine halbe Doppelschicht kann ähnlich betrachtet werden, weshalb die durch Langmuir-Experimente erhaltenen Informationen über die Packung einer Lipidmonoschicht durchaus auf Doppelschichtsysteme übertragbar sein sollten. Ein Experiment durch Janshoff et al.^[14b] soll dies verdeutlichen: Es wurde eine Monoschicht aus DPPC und DPPS (4:1) hergestellt, die 1 Mol-% eines fluoreszierenden Phosphatidylcholins enthielt. Nach Auftragen dieses Films auf eine reine Wasseroberfläche konnte man im Fluoreszenzmikroskop kreisförmige schwarze Domänen (ähnlich einem Leopardmuster) erkennen, die etwa 19% der Filmoberfläche in Anspruch nahmen. Bei Erhöhung des Drucks auf den Film auf 4 mN m^{-1} wuchsen die schwarzen Flecke kontinuierlich an. Diese Bereiche wurden als DPPS-angereicherte Domänen interpretiert, die das fluoreszierende Phosphatidylcholin verdrängt hatten. Filme an einer Luft-Wasser-Grenzfläche haben einen entscheidenden Vorteil gegenüber vesikulären Systemen: Phasenänderungen können leicht durch äußeren Druck induziert werden.

3. Phasenseparation und Domänenbildung in Lipiddoppelschicht-Modellen

Laterale (d.h. innerhalb einer Schicht) und vertikale Phasentrennungen (d.h. zwischen Schichten) in einer Doppelschicht können entweder spontan oder durch externe

Stimulation, gekoppelt oder separat auftreten. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, gibt es eine Vielzahl externer Stimuli, die eine Phasenseparation innerhalb einer Doppelschicht auslösen und so die Membranstruktur beeinflussen

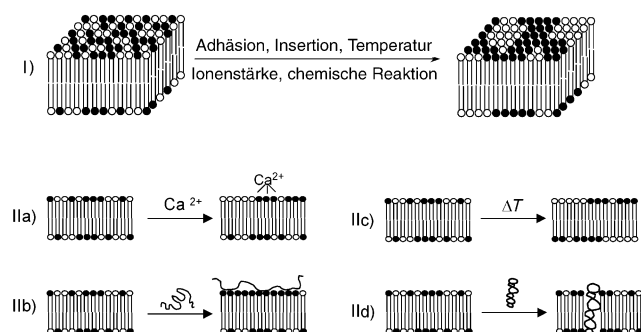


Abbildung 5. Phasentrennung in Lipidmembranen: I) Laterale Phasentrennung zweier Lipide; II) externe Effekte führen zu unterschiedlichen Arten der Phasentrennung: a) laterale Phasentrennung in der äußeren Schicht durch Komplexbildung, b) vertikale Phasentrennung durch Adsorption eines Polymers, c) laterale Phasentrennung in beiden Schichten durch Temperaturänderung, d) laterale Phasentrennung um ein in die Membran eingebautes Molekül.

können. Prinzipiell können hierbei zwei Typen von Wechselwirkung beteiligt sein: Kräfte zwischen den Kopfgruppen und Kräfte zwischen den Lipidketten. So kann eine Änderung des pH-Wertes der Lösung die Ladung und die Hydratisierung der Kopfgruppen verändern, sodass z.B. die Anziehungskräfte zwischen den Kopfgruppen schwächer werden, was eine Phasentrennung zur Folge haben kann. Wie bereits geschildert, können Ca^{2+} -Ionen durch Metallkomplexierung Clusterbildung auslösen, und die Adsorption von ionischen

Polymeren kann unter anderem die Packungsdichte eines Lipids, das elektrostatisch an das Polymer bindet, erhöhen.

Kräfte, die vorrangig auf den hydrophoben Innenraum einer Membran wirken, können auf ähnliche Weise eine Phasentrennung bewirken. So kann z.B. eine Änderung der Temperatur eine Phasentrennung zweier Lipide mit unterschiedlichem Schmelzpunkt (T_m) induzieren, oder ein in die Membran eingebettetes Molekül kann eine erhöhte Affinität zu einem bestimmten Lipid aufweisen, wodurch sich dieses nichtstatistisch um das Molekül anordnet. Generell kann die Größe von Domänen von einigen wenigen Molekülen bis hin zu beträchtlichen Lipidsträngen variieren. Ab welchem Punkt man eine Domänenbildung als echte Phasentrennung bezeichnet, bleibt der Definition überlassen.

3.1. Lipidkomponenten

Die Strukturen der Hauptkomponenten von lebenden und künstlichen Zellmembranen sind in Abbildung 6 dargestellt.^[15] Prinzipiell gibt es drei Hauptklassen von Lipiden: a) Diacylglycerol-Lipide, b) Sphingosin-analoge Lipide und c) Sterinlipide (Cholesterin). Sowohl die Dimensionen der Kopfgruppen und Ketten als auch die Ladungswechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen spielen eine entscheidende Rolle für das Ordnungsverhalten der Lipide innerhalb einer Doppelschichtmembran.

Auch Blockcopolymeren können dünne Membranen bilden,^[16] allerdings wird dieser Prozess durch andere Kräfte gesteuert. Während sich Lipiddoppelschichten hauptsächlich aufgrund hydrophober Wechselwirkung zwischen den Alkylketten ordnen, wirken bei Blockcopolymeren sowohl Solvens-Polymer- als auch Polymer-Polymer-Wechselwirkungen als treibende Kräfte. Bei Polymermembranen treten somit zusätzliche ordnende Wechselwirkungen auf – auch in nicht-wässrigen Medien. Vor allem die Nichtmischbarkeit von

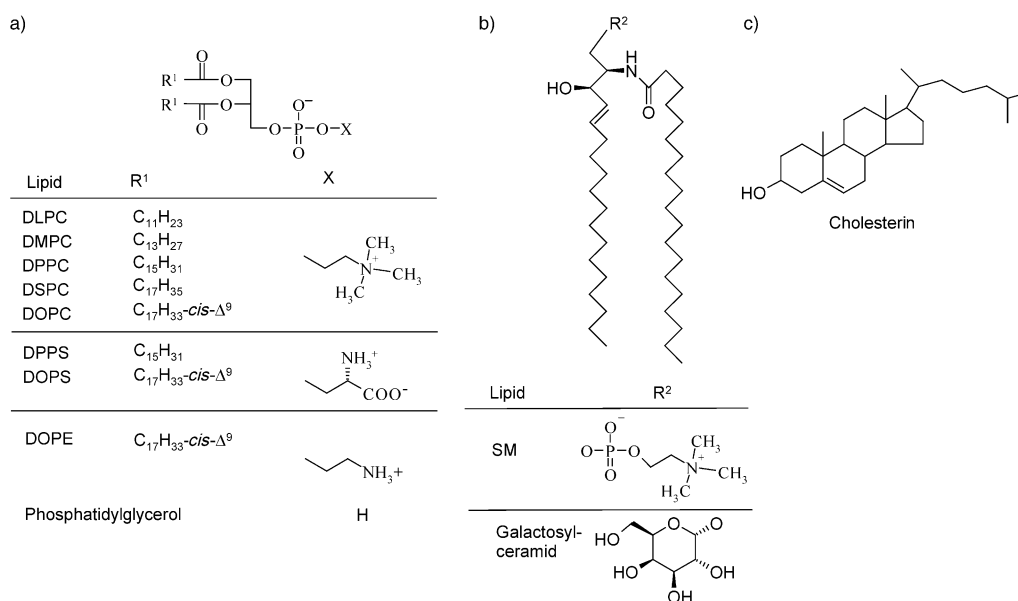


Abbildung 6. Strukturen von Membranlipiden: a) Diacylglycerolipide, b) Sphingolipide, c) Sterinlipide (Cholesterin).

sondern wird durch schwache Anziehungskräfte in der flüssigen Phase induziert. Eine solche Mischungslücke kann auch in der festen Phase unterhalb der Schmelztemperatur von Lipid A auftreten, wodurch innerhalb der kristallinen Phase zwei unterschiedlich gepackte Bereiche von hexagonalen Lipidgittern entstehen. Zusammengefasst kann eine Domänenbildung durch Nichtmischbarkeit von Fest/flüssig-, Flüssig/flüssig- oder Fest/fest-Zuständen ausgelöst werden.

3.2. Binäre Mischungen aus strukturell ähnlichen Verbindungen

Signifikante Phasenseparationseffekte lassen sich auch bei Systemen beobachten, die sich nur geringfügig in ihrer Lipidstruktur unterscheiden. Ein klassisches Beispiel betrifft Phosphatidylcholine mit unterschiedlichen Kettenlängen. Das nichtideale Verhalten dieser Lipide ist ausschließlich auf die Fehlordnung der Alkylketten zurückzuführen, da die Kopfgruppen jeweils identisch sind. Knoll et al.^[19] und Silvius et al.^[20] erstellten Phasendiagramme durch systematisches Variieren der Kettenlänge und damit verbunden einer Erhöhung der Fehlordnung zwischen zwei Lipiden. Laterale Phasenseparation wurde beobachtet, wenn sich die Ketten um vier oder mehr CH_2 -Gruppen unterscheiden. Abbildung 8a zeigt das Phasendiagramm für DLPC (C_{12})/DPPC

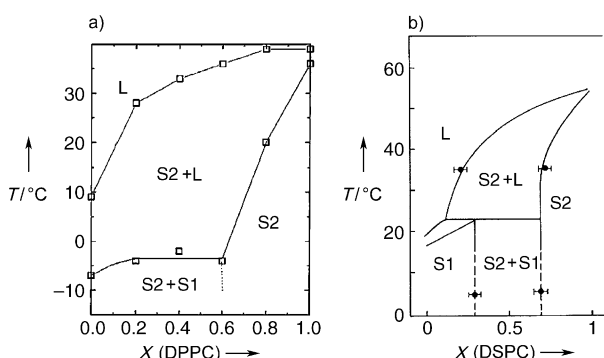


Abbildung 8. Phasendiagramme von DMPC/DPPC (a) und DLPC/DSPC (b). Beide Lipidmischungen unterscheiden sich in ihren hydrophoben Ketten um vier $(\text{CH}_2)_4$ -Einheiten und zeigen eine Koexistenz zwischen flüssiger (L) und fester Phase (S). Mit Genehmigung von Elsevier Science^[19] und der American Chemical Society.^[20a]

(C_{16}), aus dem eine eindeutige Fest/fest-Phasentrennung im Bereich von 60 bis 100 Mol-% DPPC ersichtlich ist, während zwischen 0 und 60 Mol-% DPPC beide Lipide in separierten festen Phasen nebeneinander vorliegen. Im flüssigen Zustand liegt dagegen über den gesamten Mischungsbereich eine homogene Mischung beider Lipide vor (innerhalb der Übergangstemperaturen T_{mA} und T_{mB}).

Ein ähnliches Diagramm wird nach Abbildung 8b für die um jeweils zwei CH_2 -Einheiten längeren Homologen DMPC (C_{14})/DSPC (C_{18}) erhalten. Die Koexistenzbereiche der flüssigen und festen Phasen stellen Domänen dar, die, wie bereits geschildert, durch verschiedene Methoden nachweisbar sind. Die Größe dieser Domänen kann von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern reichen, was

bedeutet, dass sich 100 bis mehrere 100 000 Lipide innerhalb solcher Domänen befinden können. Die Größe von Domänen und ihr Verhalten wird in Abschnitt 4 näher behandelt.

Ein weiterer Typ von Lipid-Mischung, bestehend aus einem symmetrischen Doppelketten-Lipid wie DSPC und einem Lipid gleicher Kopfgruppe und zwei unterschiedlich langen Acylketten (C_{18} - C_{10} -PC), wurde durch Mason^[21] untersucht. Das Mischungsverhalten dieser beiden Lipide wird in Abbildung 9 veranschaulicht.^[21] Die kürzere der Lipidketten

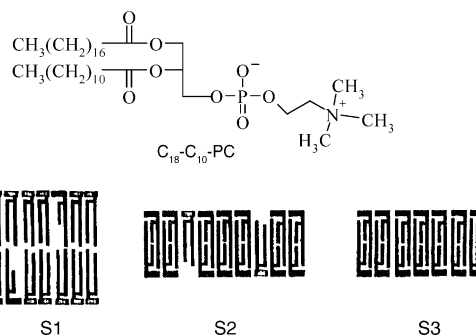


Abbildung 9. Mischbarkeit von DSPC mit einem stark unsymmetrischen Lipid (C_{18} - C_{10} -PC). Die Art der Verzahnung der unsymmetrischen Lipidketten kennzeichnet die unterschiedlichen Festphasentypen S1, S2 und S3. Mit Genehmigung der American Chemical Society aus Lit. [21].

stört aufgrund der acht fehlenden Methylengruppen das Membrangefüge, was drei Arten von Entmischungen in der festen Phase hervorrufen kann (S1, S2 und S3). Bei der festen Phase S1 – mit sehr geringen Anteilen an unsymmetrischer Lipidkomponente – bildet sich eine „normale“ Doppelschichtmembran ohne Strukturkompensierung des Defekts. Bei Konzentrationen über 50 Mol-% C_{18} - C_{10} -PC liegen zwei feste Phasen getrennt vor: eine Phase S2, in der die Lipidmembran teilweise verzahnt ist, wodurch kleine Zwischenräume für das symmetrische DSPC entstehen, und eine Phase S3, die ausschließlich verzahntes C_{18} - C_{10} -PC enthält. Die Phasentrennung im festen Zustand geht somit auf schwache Kräfte zwischen den C_{18} -Ketten des unsymmetrischen Lipids zurück, die die bevorzugte Aggregation identischer Einheiten bewirken.

Veränderungen am Lipid-Rückgrat (z. B. an der Glycerol-Einheit) können zu nichtidealen Effekten führen, auch wenn die Kopfgruppen und die Acylkettenlängen identisch sind. Die Mischung des Esters DPPC mit dem Ether 1,2-Dihexadecylphosphatidylcholin (DHPC) zeigt zwei unterschiedliche Strukturtypen im festen Zustand an. DHPC bildet eine verzahnte Phase,^[22] wobei durch Selbstorganisation eine Monoschicht und nicht die erwartete Doppelmembran entsteht.

3.3. Binäre Mischungen strukturell unterschiedlicher Lipide

Am häufigsten wird Domänenbildung beobachtet, wenn sich die beteiligten Lipide grundlegend durch ihren Aufbau und/oder ihre Eigenschaften unterscheiden. Solche Unter-

schiede betreffen a) die Kopfgruppe bei gleichem Lipid-Grundkörper, b) die Übergangstemperaturen der Lipide und c) Mischungen von Lipiden mit Cholesterin.

3.3.1. Mischungen geladener und/oder neutraler Lipide

Eine Vielzahl von Phasenstudien zur Mischbarkeit von Lipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen bei gleicher Kettenlänge wurde von Silvius^[23] und auch anderen Autoren vorgenommen und systematisch analysiert. In der aufgestellten Reihung werden unterschiedliche Lipidpaare (geladen/neutral oder neutral/neutral) miteinander verglichen (PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin, PA = Phosphatidsäure, PC = Phosphatidylcholin). Generell ist die Mischbarkeit der (PE,PS)- und (PE,PA)-Lipidpaare etwa gleich gut, während (PC,PS) und (PC,PA) schlechter und (PE,PC) am schlechtesten mischbar sind. Die meisten dieser Systeme weisen eine Fest/fest-Mischungslücke bei vollständiger Mischbarkeit im flüssigen Zustand auf. Aufgrund der großen Unterschiede in den Übergangstemperaturen werden breite Koexistenzbereiche der flüssigen und festen Phasen der einzelnen Lipide beobachtet. Offenbar reichen chemische Unterschiede der Lipid-Kopfgruppen nicht aus, um starke Phasenseparationseffekte in flüssiger Phase zu induzieren.

3.3.2. Lipide mit stark unterschiedlichen Phasenübergangstemperaturen

Sowohl Sphingolipide als auch Phospholipide weisen große strukturelle Unterschiede bezüglich ihrer Kopfgruppen und der hydrophoben Ketten auf, wodurch eine laterale Phasenseparation stark begünstigt wird. Zwei Arten von Untersuchungsmethoden wurden hierbei angewendet: a) konventionelle thermische (DSC) und Fluoreszenzmethoden, b) Fluoreszenzmikroskopie von gemischten Monoschichten aus Sphingomyelin, DMPC und geringen Mengen eines fluoreszierenden Lipids. Holopainen et al.^[24] untersuchten das Phasenverhalten von Lipidfilmen mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie nach einer Methode von Ringsdorf et al.^[25]

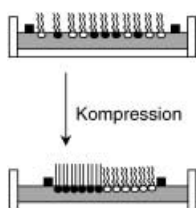


Abbildung 10. Aufbringen einer Lipidmischung in Form eines Langmuir-Films. Unter äußerem Druck kommt es zu einer Phasentrennung in eine feste, geordnete und in eine flüssige Phase. Der Prozess kann mithilfe eines fluoreszierenden Lipids, das sich in einer der beiden Phasen anreichert, direkt verfolgt werden.

Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 10 dargestellt: Ein binäres Lipidgemisch, das zusätzlich etwa 1 Mol-% eines fluoreszierenden Lipids enthält, das sich bevorzugt in einer der beiden Lipidphasen anreichert, wird als Film auf einer Langmuir-Filmwaage aufgebracht und komprimiert. Dadurch kommt es zu einer Phasentrennung, die im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass unterschiedliche Phasenzustände durchlaufen werden, ohne die Temperatur erhöhen zu müssen. Der Lipidfilm wird durch die stufenweise Erhöhung des Kompressionsdruckes vom flüssig-ausgedehnten über den flüssig-verdichteten in den festen Zustand überführt. Der flüssig-verdichtete und der feste Phasenzustand entsprechen den flüssigen bzw. festen Zuständen innerhalb einer Doppelschichtmembran.

Sphingolipide und Phospholipide zeigen Phasenseparation sowohl im festen Zustand als auch über weite Bereiche zwischen den beiden Übergangstemperaturen der Lipide.^[26] Die starken Unterschiede werden durch die Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen innerhalb des Ceramid-Rückgrats hervorgerufen.^[27] Abbildung 11a zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von C24:1-Galactosylceramid mit DMPC in einer Monoschicht.

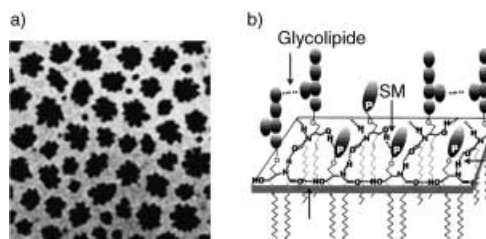


Abbildung 11. a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Monoschicht aus DMPC/C24:1-Ceramid (30:70) mit 1 Mol-% eines fluoreszierenden Lipids. b) Schematische Darstellung der Vernetzung zwischen DMPC und C24:1-Ceramid (Pfeile markieren vernetzende Wasserstoffbrücken). Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [26, 27].

reszenzaufnahme von C24:1-Galactosylceramid mit DMPC in einer Monoschicht. Bei passenden Kettenlängen – so wie bei DMPC und C24:1-Ceramid der Fall – wird eine Phasentrennung sowohl im flüssigen wie auch im festen Zustand beobachtet. Diese Phasentrennung kann durch Fluoreszenzmikroskopie^[24] sichtbar gemacht werden. Dabei erscheinen die C24:1-Ceramid-reichen Domänen aufgrund des angereicherten Fluoreszenzmarkers als dunkle Flecke in der hellen, flüssigen DMPC-reichen Matrix. Zurückzuführen ist diese Art der Domänenbildung auf ein Netz von Wasserstoffbrücken, das die Ceramid-Einheiten miteinander verknüpft.^[28]

3.3.3. Cholesterin-Phospholipid-Mischungen

Cholesterin erhöht die Steifheit der Membran und bewirkt eine erhöhte laterale Beweglichkeit. Diese Wirkungsweise lässt sich anhand eines Phasendiagramms darstellen (Abbildung 12).^[29] Bei niedrigen Cholesteringehalten entsteht eine neue Phase (I_o), die mit der I_d -Phase bis zu einem Anteil von 30 Mol-% Cholesterin im Gleichgewicht steht. Bei Erhöhung des Cholesteringehaltes auf über 30 Mol-% bleibt lediglich die I_o -Phase beständig, weshalb auch der thermische Phasenübergang des Phospholipids (DPPC) verschwindet. In einer Mischung mit einem Gehalt von mehr als 30 Mol-% Cholesterin zeigt DPPC somit keinen Unterschied zwischen seinem flüssigen und seinem festen Zustand. Dies erklärt auch die Funktion des Cholesterins (Verhinderung von Phasenübergängen) in biologischen Membranen, in denen es oft in Anteilen von bis zu 35 % vorkommt.

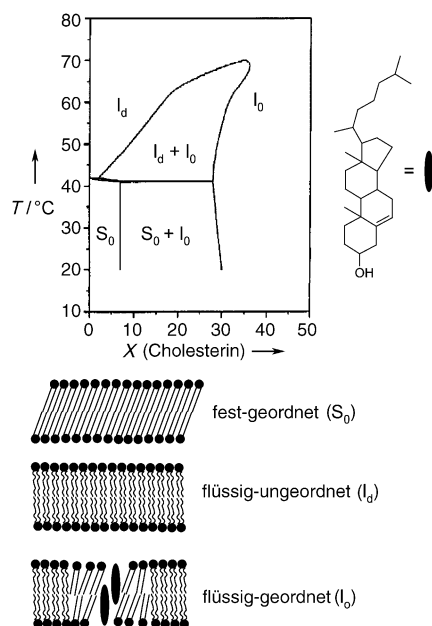


Abbildung 12. Einfluss des Cholesteringehalts auf eine Lipiddoppelschichtmembran. Mit steigendem Gehalt an Cholesterin wird zunächst die I_d -Phase oberhalb der Schmelztemperatur der DPPC-Ketten stabilisiert. Bei über 30 Mol-% Cholesterin verschwindet der Phasenübergang, und es wird ausschließlich die I_o -Phase beobachtet. Mit Genehmigung der National Academy of Sciences aus Lit. [29].

Die Zugabe von Cholesterin zu DPPC führt auch zu einer starken Verdichtung der Membran (Verringerung der Membranfläche von 61 Å auf 47 Å),^[30] was die Erhöhung der MembranstEIFigkeit erklärt. Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und gesättigten, langen Acylketten sind gegenüber solchen mit ungesättigten Ketten bevorzugt. Die Wechselwirkung mit Cholesterin führt außerdem zu einem gehäuften Auftreten von *trans*-Konformationen innerhalb gesättigter Ketten. Die laterale Beweglichkeit wird aufgrund der kleineren Abmessungen des Cholesterins (gegenüber DPPC) gesteigert. Grund ist die erhöhte Beweglichkeit der Membrankomponenten innerhalb der Lipiddoppelschicht.

3.3.4. Cholesterin-Sphingolipid-Mischungen

Mit Sphingolipiden wechselwirkt Cholesterin auf ähnliche Weise wie mit Phospholipiden.^[30] In Tabelle 1 wird die prozentuale Abnahme der Kopfgruppenfläche von Sphingomyelin- und Phosphatidylcholin-Monoschichten bei Zugabe von äquimolaren Mengen an Cholesterin verglichen.

Die relative Abnahme in einer Monoschicht ist am größten, wenn sich das Lipid in einem möglichst ausgedehnten Zustand befindet (d.h. bei niedrigem Kompressionsdruck). Je stärker die Lipidschicht komprimiert wird, desto weniger kann Cholesterin zum Verdichten der Membran beitragen. Somit bestimmt der anfängliche Phasenzustand des Lipids den Grad der Wechselwirkung mit Cholesterin. Vergleicht man den Austritt von Cholesterin aus Membranen, die unterschiedliche Sphingomyeline enthalten, so beobachtet

Tabelle 1: Prozentuale Abnahme der Kopfgruppenfläche von Sphingomyelin(SM)- und Phosphatidylcholin-Monoschichten durch Zugabe äquimolarer Mengen an Cholesterin bei definierten Kompressionsdrücken.

Lipid	Kompression [mN m^{-1}] und Flächenreduktion [%]		
	5 mN m^{-1}	20 mN m^{-1}	30 mN m^{-1}
N-18-D1-SM	35 %	28 %	25 %
SM (Ei)	39 %	28 %	17 %
SM (Rind)	39 %	26 %	16 %
POPC ^[a]	34 %	26 %	23 %
DPPC	41 %	12 %	11 %
MPPC ^[a]	43 %	29 %	11 %

POPC = Palmitoylolelphosphatidylcholin, MPPC = Myristoylpalmitoylphosphatidylcholin.

man mit zunehmender Länge der *N*-Acylketten eine stärkere Wechselwirkung.^[31]

3.4. Dreikomponentenmischungen

Membranen aus drei und mehr Lipiden simulieren biologische Membranen wesentlich besser als binäre Mischungen. Gewöhnlich enthalten eukaryotische Biomembranen etwa 50 Mol-% Sphingo- und Phospholipide und bis zu 40 Mol-% Cholesterin. Untersuchungen an Mischungen aus zwei Phosphatidylcholinen mit stark unterschiedlichen Übergangstemperaturen (DLPC/DPPC, 12-BrDPPC/DPPC, DOPC/SLPC)^[20] weisen darauf hin, dass in Gegenwart von Cholesterin eine höhere Tendenz zur Phasentrennung vorliegt. Die Cholesterin-freien binären Lipidgemische gehen eine Phasentrennung bei Temperaturen zwischen den jeweiligen Übergangstemperaturen ein. Geringe Mengen an Cholesterin fördern die Phasentrennung durch Wechselwirkungen mit den längeren DPPC-Ketten, während sehr hohe Konzentrationen an Cholesterin die Phasentrennung beeinträchtigen.^[20a]

Dieser Effekt, der in Phosphatidylcholin-Cholesterin-Mischungen wesentlich stärker ausgeprägt ist, lässt sich mit Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen.^[32] Dazu wurden Experimente mit trägerfixierten Doppelschichtmembranen und Riesenvesikeln („giant vesicles“) durchgeführt, wobei ein fluoreszierendes Lipid selektiv in die feste Phase der DLPC-DPPC-Cholesterin-Mischungen eingebaut wurde (Abbildung 13).^[33] Wie bereits erwähnt, lässt sich die Bildung von Domänen, die 10 μm oder größer sind, mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisieren. Dazu wurden zwei unterschiedliche fluoreszierende Lipide eingesetzt, nämlich 1,1'-Dieicosanyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat (DiI-C20), das bevorzugt in die feste (geordnete) Phase eindringt, und 2-(4,4-Difluor-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (Bodipy-PC), das bevorzugt in der flüssigen Phase verbleibt. In Abbildung 13 sind die festen, geordneten Bereiche rot und die flüssigen, ungeordneten grün gekennzeichnet.

Darüber hinaus hängt die Phasenseparation in hohem Maße vom Sterintyp ab (Abbildung 14).^[34] Die stärkste phasentrennende Wirkung hat Ergosterin, gefolgt von 7-

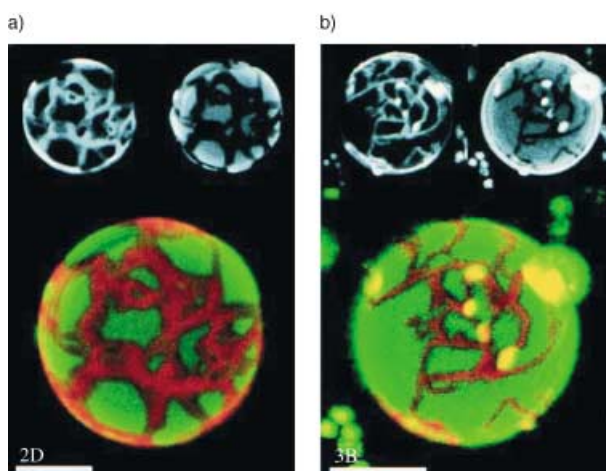


Abbildung 13. Fluoreszenzaufnahmen von Riesenvesikeln mit Phasentrennung bei 25 °C. a) DLPC/DPPC = 40:60. Die roten Bereiche kennzeichnen feste, geordnete Domänen (an DPPC angereichert), die grünen Bereiche flüssige Domänen (an DLPC angereichert). b) DLPC/DPPC = 50:50 mit 5 Mol-% Cholesterin. Skalierung = 10 µm. Mit Genehmigung der National Academy of Sciences aus Lit. [33].

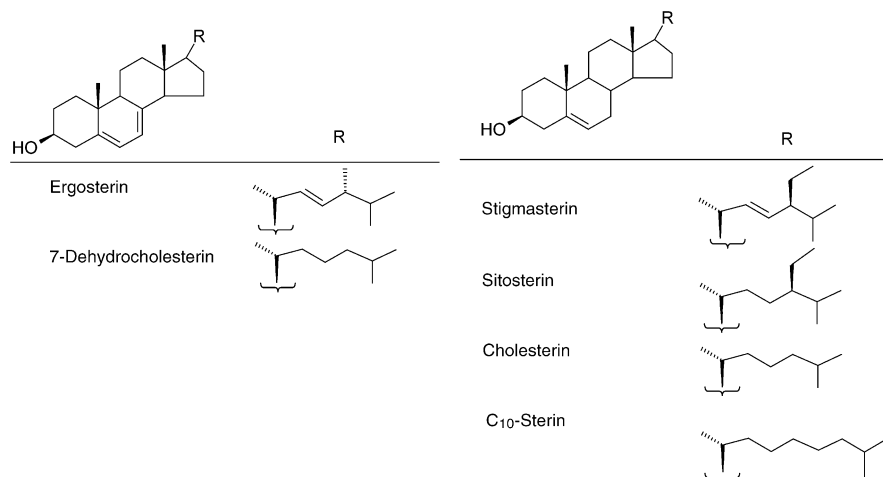


Abbildung 14. Strukturen von Sterinen, die Domänenbildung in SM-DOPC-Sterin-Membranen bewirken.

Dehydrocholesterin, Stigmasterin, Sitosterin, Cholesterin und C₁₀-Sterin. Demnach spielt die Zahl an Doppelbindungen im B-Ring und in der Seitenkette der Sterineinheit eine wesentliche Rolle für die Domänenbildung, allerdings sind die Ursachen hierfür bislang nicht vollkommen verstanden.

3.5. Induzierte Phasenseparation durch niedermolekulare Verbindungen

3.5.1. Einfluss von Ca²⁺ auf Phasenseparationen

Einer der am häufigsten untersuchten Phasentrennungsprozesse beruht auf der Wirkung von zweiwertigen Ionen auf gemischte Phosphatidylserin-Doppelschichten.^[35] Abbildung 15 verdeutlicht den drastischen Einfluss, den Ca²⁺-Ionen auf das Phasenverhalten von DEPC-DEPS-Mischun-

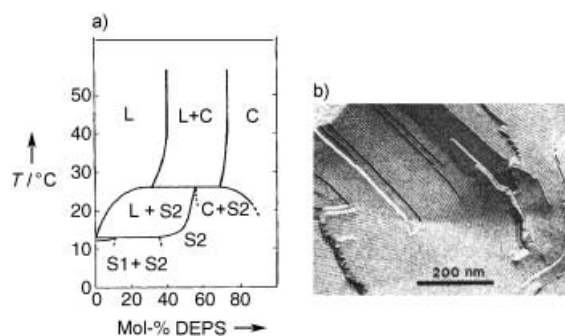


Abbildung 15. Wirkung von Ca²⁺-Ionen auf eine DEPC-DEPS-Lipidmischung (DE = Dielaidoyl). a) DEPC-DEPS-Lipiddoppelschicht, versetzt mit 30 mM Ca²⁺. Sowohl in der flüssigen als auch in der festen Phase wird ein starker Entmischungseffekt beobachtet (L flüssig-kristalline Phase, C neue Cochleatphase, S1 PC-reiche Phase, S2 PS-reiche Phase). b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Lipiddoppelschichtmembran in Mischung mit der neuen Cochleatphase/hexagonalen Phase (DOPE/DOPS 1:1, versetzt mit Ca²⁺). Mit Genehmigung der American Chemical Society aus Lit. [35b,c].

gen ausüben. Beide Lipide sind im flüssigen Zustand vollständig mischbar (Abbildung 15 a).^[35b] Bei Zugabe von 30 mM Ca²⁺ beobachtet man einen starken Entmischungseffekt, der sowohl in der flüssigen als auch in der festen Phase auftritt. Wichtigster Befund ist jedoch die Bildung einer gänzlich neuen Phase – erkennbar an einem geänderten Erscheinungsbild der Vesikeloberflächen – im Konzentrationsbereich von 40–80 Mol-% Ca²⁺ („flüssig-cochleate Phase C“). Diese Beobachtung ist in Einklang mit der gefrierbruchelektronenmikroskopischen Untersuchung einer DOPE-DOPS-Mischung, die die Details der Phasenseparation veranschaulicht (Abbildung 15 b).^[35c] Hierbei wird in einer 1:1-Mischung der beiden Lipide in Gegenwart von Ca²⁺-

Ionen sowohl die hexagonale DOPE-Phase als auch die cochleate DOPS-Phase sichtbar gemacht. Diese Art von Phasentrennung ist auch mit der vesikulären Fusion in biologischen Membranen verknüpft, wobei man annimmt, dass Phasenübergänge im flüssigen Zustand die Membranfusion bewirken.

3.5.2. Cyclodextrine, Amphotericin B

Hydrophobe Moleküle tendieren dazu, unter Bildung stabiler Lipid-Komplexe in Lipidmembranen einzudringen. Eine hoch geordnete Lipiddoppelschicht wird dabei gewöhnlich aufgebrochen und die Membran bei höheren Konzentrationen der hydrophoben Verbindung zerstört. Solche Moleküle, die darüber hinaus Clusterbildung auslösen können, sind meist relativ groß bei Molekulargewichten von

über 500 gmol^{-1} . Die Fähigkeit, in biologische Membranen einzudringen, ist ein wesentliches Merkmal vieler pharmakologisch aktiver Substanzen. Eines der bekanntesten Beispiele ist das Antifungizid Amphotericin B,^[36] das die Membrandurchlässigkeit erhöht, indem es durch zwei entgegengesetzt ausgerichtete Amphotericin-B-Moleküle transmembrane Ionenkanäle aufbaut (Abbildung 16a).

Aus Modelluntersuchungen geht hervor, dass es aufgrund der günstigen Wechselwirkung zwischen Amphotericin B und Cholesterin oder Phospholipiden zu einer Clusterbildung der Lipide um Amphotericin B kommt. Minones et al.^[37] zeigten, dass Amphotericin B mit den umgebenden Lipiden nur dann mischbar ist, wenn sich die entsprechende Monoschicht im ausgedehnten Zustand (vergleichbar mit der flüssigen Phase in Doppelschichten) befindet. In einer verdichteten Monoschicht hingegen (vergleichbar mit einer festen Doppelschicht) segregieren Amphotericin-B-Moleküle von den Lipiden und bilden eine eigene Domäne. Mit anderen Worten wird beim Phasenübergang die zunächst bevorzugte Wechselwirkung zwischen Lipid und Amphotericin B zugunsten einer Wechselwirkung zwischen Amphotericin-B-Molekülen „geopfert“.

Der Segregationseffekt von cholesteryliertem Cyclodextrin ist ein weiteres Beispiel für induzierte Clusterbildung in Lipidmembranen. Eine Cholesterin-Einheit wurde über einen Succinimidyl-Spacer an β -Cyclodextrin gebunden und in eine DMPC-Doppelschichtmembran eingebaut (Abbildung 17).^[38] Hierbei bildeten sich zwei Phasen, von denen die eine fast ausschließlich reines DMPC und die andere eine hohe Konzentration an cholesteryliertem Cyclodextrin enthält. Ohne den Succinimidyl-Spacer bleibt der phasenseparierende Effekt aus.

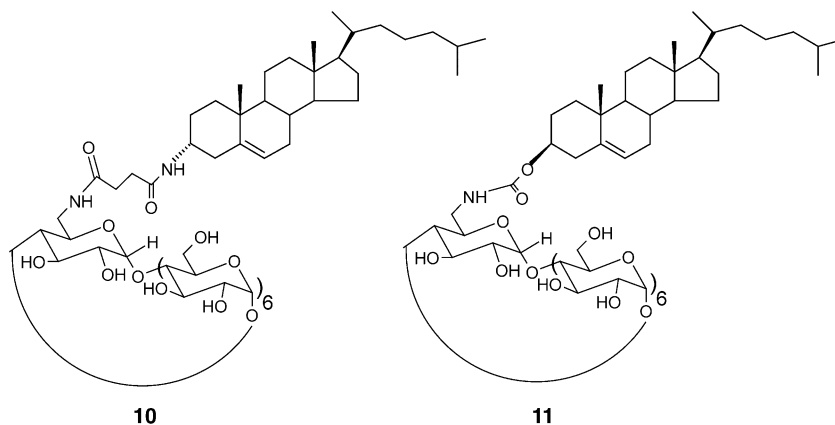


Abbildung 17. β -Cyclodextrin-Derivate mit (10) und ohne (11) Succinimidyl-Spacer.

Es zeigte sich, dass die Zahl der Lipidmoleküle, die an das cholesterylierte Cyclodextrin koordinieren, von der Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Phospholipid-Kopfgruppen und dem hydrophilen Teil des Cyclodextrins bestimmt wird. Die Cholesteryl-Einheit wirkt offenbar als Anker zur Fixierung des Cyclodextrins in der hydrophoben Membran.

3.5.3. Acylierte und prenylierte Peptide und Enzyme

Die Aggregation und Domänenbildung von Peptiden an der Oberfläche einer Lipiddoppelschichtmembran ist von herausragender biologischer Bedeutung. Durch Kombination von Untersuchungstechniken aus der Molekularbiologie und Membrantechnologie konnten detaillierte Hydrophilie/Hydrophobie-Profile von Peptiden erstellt werden.

Eine Lipid-Peptid-Wechselwirkung – Voraussetzung für die Clusterbildung von Peptiden in bereits phasenseparierten Membranen – konnte kürzlich mithilfe von Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie nachgewiesen werden.^[39,40] Das Experiment ist vergleichsweise einfach (Abbildung 18).^[41]

Zwei Peptide (A und B) mit einer definierten Aminosäuresequenz werden mit unreaktiven fluoreszierenden Molekülen (z.B. Pyren, Tryptophan oder nichtdimerisierenden Peptiden wie cyanfarbenen und gelben Varianten von grün fluoreszierenden Peptiden) markiert. Diese modifizierten Lipide zeigen als Mischung in einer homogenen, domänenfreien Membran keinerlei Fluoreszenzenergietransfer (FRET, fluorescent radiation energy transfer). Erst nach einer Clusterbildung wäre ein FRET durch die räumliche Nähe zweier Peptide möglich. Aus diesem Grund wurden Vesikeln aus Lipidmischungen hergestellt, die zur Domänenbildung neigen und die Zusammensetzung von Zelloberflächen wiedergeben. Vesikeln aus PC-SM-Cholesterin-Mischungen segregieren hierbei in eine flüssig-geordnete (l_o) und in eine flüssig-ungeordnete

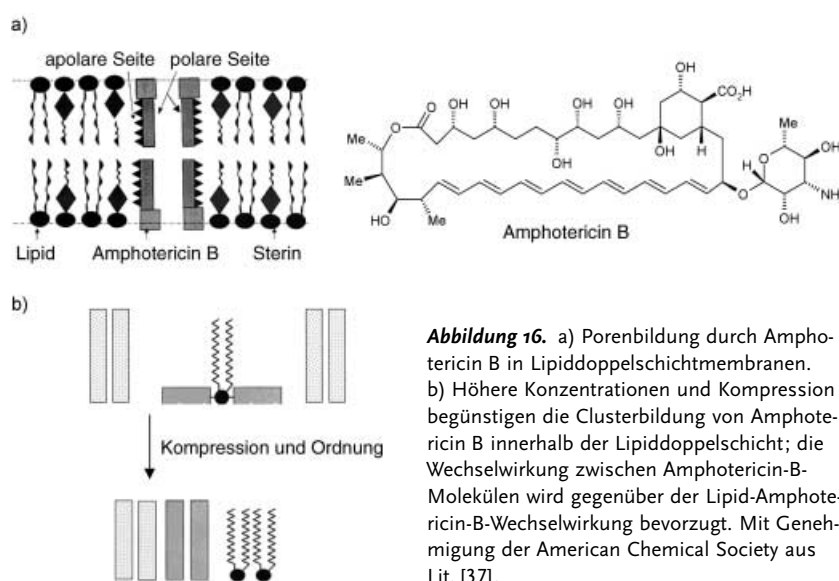


Abbildung 16. a) Porenbildung durch Amphotericin B in Lipiddoppelschichtmembranen. b) Höhere Konzentrationen und Kompression begünstigen die Clusterbildung von Amphotericin B innerhalb der Lipiddoppelschicht; die Wechselwirkung zwischen Amphotericin-B-Molekülen wird gegenüber der Lipid-Amphotericin-B-Wechselwirkung bevorzugt. Mit Genehmigung der American Chemical Society aus Lit. [37].

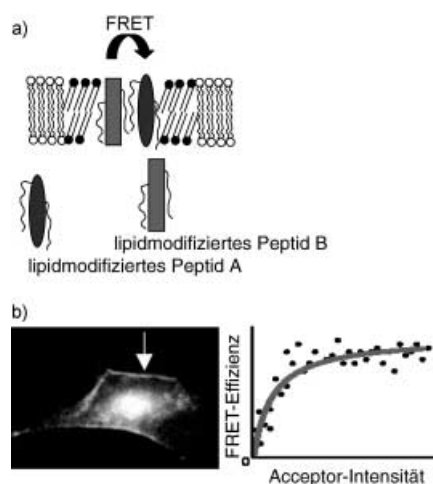


Abbildung 18. Durch Fluoreszenzenergietransfer (FRET) sichtbar gemachte Clusterbildung von lipidmodifizierten Peptiden in Membranen. a) Lipidmodifizierte Peptide A und B (myristoyliert oder palmitoyliert) und deren Clusterbildung in der flüssig-geordneten Phase (l_o) einer Membran. b) Fluoreszenz-Abbildung und FRET-Analyse des Bereichs, in dem es zu einer Clusterbildung durch das lipidmodifizierte Peptid kommt. Mit Genehmigung der AAAS aus Lit. [41a].

Phase (l_d). Dieses System wurde herangezogen, um die Anreicherung von Peptiden mit unpolaren Ketten in der l_o -Phase zu untersuchen. Es zeigt sich, dass langkettige Fettsäuren (Myristoyl-, Palmitoylderivate) die Phasenseparation fördern, während in Gegenwart von Geranylgeraniol-Ketten keine Clusterbildung beobachtet wurde.

Die Wirkung von Enzymen kann durch phasenseparierte Domänen erheblich verstärkt werden. Ringsdorf et al.^[42] zeigten, dass die Aktivität von Phospholipase-A2 in hohem Ausmaß vom Phasenzustand der Membranoberfläche abhängt. Es wurden Monoschichten aus DPPC untersucht, die sowohl feste als auch flüssige Domänen enthielten. Durch Einbau eines Fluoreszenzmarkers wurden die fest-geordneten Domänen fluoreszenzmikroskopisch als dunkle Flecke sichtbar gemacht (Abbildung 19). Nach Zugabe von Phospholipase-A2 (einem DPPC-spaltenden Enzym) wurde eine Verformung der runden Flecke beobachtet, was darauf hinweist, dass der Abbau von DPPC bevorzugt an den Fest-flüssig-Phasengrenzflächen stattfindet. Demnach reichert sich das Enzym vorzugsweise an den Fest-flüssig-Phasengrenzen an und katalysiert dort die Hydrolyse der Phospholipide.

4. Rafts

4.1. Definition

Wer sich das erste Mal mit Lipidaggregaten beschäftigt, wird auf drei Begriffe stoßen (Abbildung 20): Caveolen, Domänen, Rafts. Caveolen^[43] sind kleine Einstülpungen (Größenordnung 50 nm) in einer natürlichen Membran. Sie sind mit dem Protein Caveolin sowie mit Cholesterin und Sphingolipiden angereichert und können im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Domänen^[44] sind laterale

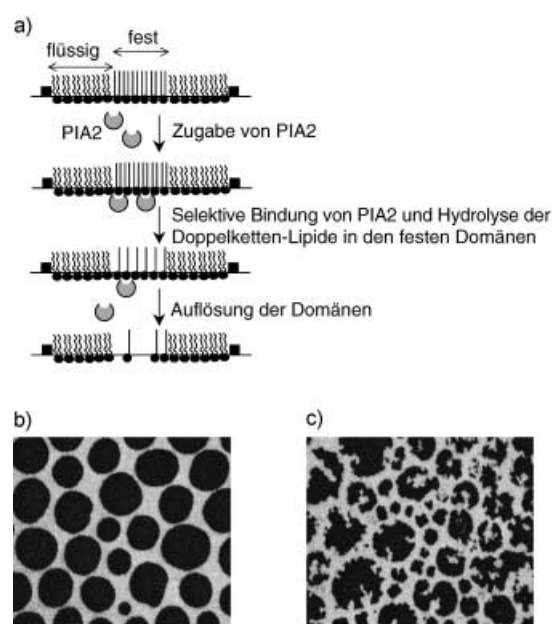


Abbildung 19. Selektive Wirkung von Enzymen (Phospholipase PLA2) in den fest-geordneten Domänen einer DPPC-Monoschicht. a) Schema der selektiven enzymatischen Spaltung des Lipids in der fest-geordneten Phase. b) Vor Zugabe von PLA2 liegen runde Domänen vor. c) Zerstörung der Domänen durch selektive Hydrolyse und nachfolgende Auflösung. Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [42].

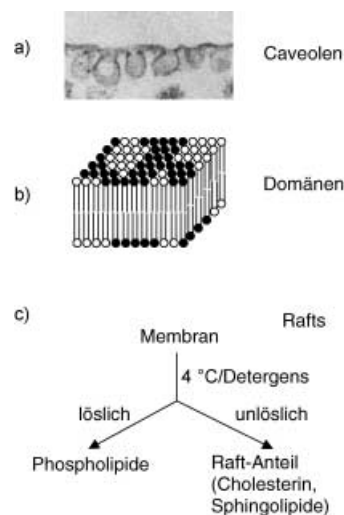


Abbildung 20. a) Caveolen (TEM-Aufnahme); b) Domänen (Schema); c) Extraktionsprotokoll für die Isolierung der Raft-Anteile im Lipid.

Aggregate in Lipidmembranen, die entweder aus einzelnen Lipiden (im Flüssig-fest-Gleichgewicht) oder aus Lipidmischungen bestehen (siehe Abschnitt 3). Die Definition der Domäne ist weit weniger spezifisch als die der Caveole und wird für jede Art von Aggregat innerhalb einer Lipiddoppelschicht oder Lipidmonoschicht herangezogen. Die Größenordnung von Domänen reicht von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern.

Der Raft-Begriff^[45] leitet sich historisch von Membran-Anteilen ab, die nach einem früher üblichen Verfahren durch

Extraktion isoliert wurden. Man hatte festgestellt, dass natürliche Membranen, die mit Detergentien kalt extrahiert wurden (4°C), eine Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Lipidfraktion zurückließen (so genannte detergentenresistente Membranen, DRMs). Dies führte zur Annahme, dass die Aggregate in Membranen lebender Zellen hauptsächlich aus nichtkovalent gebundenen Clustern von Cholesterin und Sphingolipiden in Gegenwart anderer Phospholipide bestehen. Es existiert eine günstige Wechselwirkung zwischen Sphingomyelin und Cholesterin aufgrund der Wasserstoffbrücken zwischen Sphingolipid-NH- und Cholesterin-OH-Gruppen sowie der lipophilen Wechselwirkung zwischen den langkettigen Sphingolipiden und Cholesterin. Demnach gilt der Raft-Begriff sowohl für biologische Membranen als auch für künstliche Membranmimetika.

4.2. Eigenschaften und Charakterisierung von Rafts

Generell haben Rafts, Domänen und Caveolen drei Eigenschaften gemein: a) reduzierte laterale Beweglichkeit, b) eine vom Rest der Membran abweichende chemische Zusammensetzung und c) Schwankungen in der Schichtdicke der Membran. Verschiedene analytische Techniken wurden zum Nachweis dieser drei Membraneigenschaften eingesetzt. Hierunter fallen Kraftmikroskopie (AFM) und Röntgendiffraktometrie (XRD) zur Beobachtung der Schichtdickenänderungen, SPT (single particle tracking) und Fluoreszenz-anisotropie zur Bestimmung der Lateralbeweglichkeit sowie Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und Flugzeit-Sekundärionenspektroskopie (TOF-SIMS) zur Analyse der chemischen Zusammensetzung. Eine wichtige Entwicklung war die Visualisierung von Membranbereichen durch Fluoreszenzmikroskopie durch Anreicherung von fluoreszierenden Markern in einem Lipidverband (Beispiele dazu wurden bereits mehrfach zitiert).

Die Erklärung für das Auftreten von Rafts innerhalb einer Lipidmembran setzt bei der Cholesterin-induzierten Bildung einer flüssig-geordneten (l_o) und einer flüssig-ungeordneten Phase (l_d) an. Wie schon in Abschnitt 3 erläutert, ist die l_o -Phase gegenüber der l_d -Phase verdichtet. Bei Zugabe von Sphingolipiden reichert sich Sphingomyelin bei Cholesteringehalten bis zu 35 Mol-% innerhalb der geordneten Phase an, was die Domänenbildung begünstigt. Bei sehr hohen Konzentrationen an Cholesterin (über 50 Mol-%) existiert jedoch nur noch die l_o -Phase, wodurch die Domänen- und Raftbildung gehindert wird. Eine Reihe von Autoren hat diesen Prozess in Membranen aus Phospholipid-Cholesterin-Sphingolipid-Mischungen ausführlich beschrieben.^[24,25,32,33]

Dietrich et al.^[46] und Korlach et al.^[33] untersuchten unilamellare Riesenvesikeln (GUVs) mit konfokaler Lasermikroskopie, indem sie ein fluoreszenzmarkiertes Sensorlipid (Laurdan) selektiv in die Lipiddoppelschicht aus DOPC/Cholesterin/Sphingomyelin (1:1:1) mit 1 Mol-% Gangliosid einbauten (Abbildung 21). Die Strahlungsemission dieses Lipids hängt vom Hydratisierungszustand des umgebenden Mediums ab, wodurch es zu einer Rotverschiebung von 50 nm innerhalb der l_o -Phase (gegenüber der l_d -Phase) kommt. Damit lassen sich durch Anwendung von Zweiphotonen-

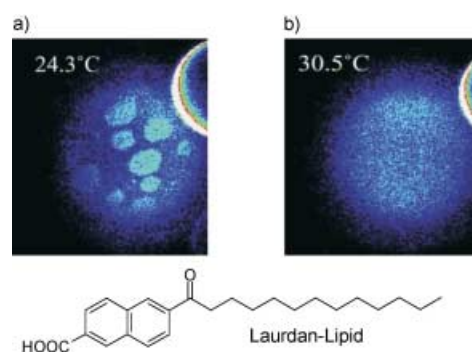


Abbildung 21. Domänenbildung in unilamellaren Riesenvesikeln (GUVs) aus DOPC/Cholesterin/SM (1:1:1). a) Abbildung von Rafts in GUVs bei 24.3°C; b) Zerstörung der Rafts durch Erhöhen der Temperatur auf 30.5°C. Mit Genehmigung der Biophysical Society aus Lit. [46].

Absorptionsprozessen und einem Wellenlängenfilter Laurdan-Lipide bezüglich ihres Aufenthaltsortes (l_o oder l_d) unterscheiden. Da GUVs eine kugelförmige Struktur aufweisen, kann man durch selektive Detektion von Photonen die gesamte Oberfläche einer Vesikel abbilden (mit mikroskopischen Verfahren lässt sich dagegen nur die Querschnittsfläche einer GUV darstellen). Es wurden dunkle Flecke von etwa 10 µm Größe auf den Vesikeloberflächen nachgewiesen, was auf eine Phasenseparation und die Bildung von Rafts hinweist. Sobald die Temperatur über die Phasenübergangstemperatur angehoben wurde, verschwanden diese Bereiche, womit die Existenz phasenseparierter Einheiten bewiesen war. Aus einer zeitaufgelösten Aufnahme von Fluoreszenzabbildungen ging außerdem hervor, dass sich die Rafts langsam in der flüssigen Phase bewegen.

Zur Untersuchung der Schichtdickenänderung von phasenseparierten Membranen (gewöhnlich zwischen 0,5 und 1 nm) werden meist AFM-Methoden eingesetzt.^[47] Zur Anwendung dieser Methode sind trägerfixierte Monoschicht- oder Doppelschichtmembranen notwendig, die durch Transfer eines Langmuir-Blodgett-Films auf eine ebene hydrophobe Oberfläche (z.B. Glimmer oder silanisiertes Glas) hergestellt werden können. Entscheidend für dieses Experiment ist die Wahl der geeigneten Monoschicht-Kompression, da diese den Zustand in biologischen Membranen imitieren soll. Der bewegliche Ausleger (cantilever) der AFM-Spitze tastet dann die unterschiedlichen Höhenprofile der Lipidbereiche ab. Da phasenseparierende Lipide meist unterschiedliche Kettenlängen aufweisen, kann aufgrund der beobachteten Höhendifferenzen indirekt auf eine Phasentrennung und die Bildung von Domänen geschlossen werden (Abbildung 22).

Milhiet et al.^[48] untersuchten den Einfluss von steigenden Cholesteringehalten auf die Domänenbildung innerhalb einer POPC-SM-Monoschicht (Abbildung 22a). In der Cholesterin-freien Monoschicht erkennt man voluminöse Bereiche (ca. 10⁴ nm²), die mit steigendem SM-Gehalt größer werden. Es liegen flüssige und feste Domänen nebeneinander vor. Durch Zugabe von Cholesterin wird die Verteilung und Größe der Domänen beträchtlich verändert. Beginnend bei einem Cholesteringehalt von etwa 20 Mol-% sinkt die Höhe

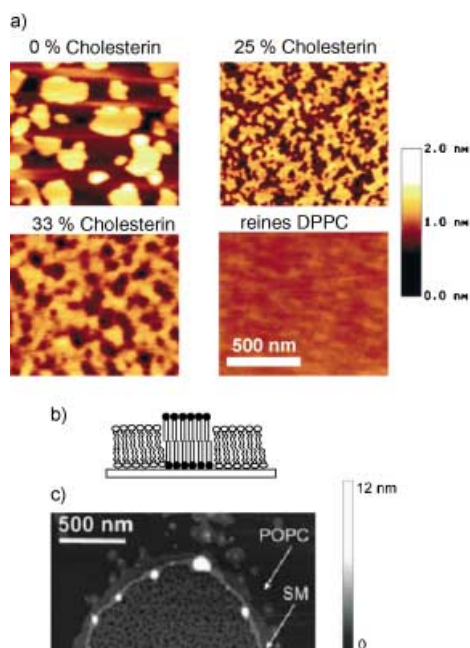


Abbildung 22. Detektion von Rafts durch AFM. a) Effekt von Cholesterin auf die Raft-Bildung; b) Prinzip der Detektion von Rafts durch Visualisierung von Höhendifferenzen mit AFM; c) Anreicherung von Gangliosid GM1 (0,2 Mol-%) an der Grenzfläche einer POPC-SM-Monoschicht (80:20). Mit Genehmigung der Biophysical Society aus Lit. [48].

der Domänen allmählich und erreicht bei einem Gehalt von etwa 55 Mol-% ein Minimum.

Zwei weitere Effekte konnten mit AFM-Spektroskopie nachgewiesen werden: die selektive Extraktion bestimmter Membrankomponenten (ähnlich wie bei DRMs), wodurch die selektive Extraktion spezieller Raft-Strukturen bewiesen wurde,^[49] und die Bildung von Gangliosid(GM1)-Clustern in der l_o -Phase.^[50,51] Die GM1-Cluster erscheinen als helle Flecke innerhalb und an der Phasengrenze der phasenseparierten Domänen (Abbildung 22c), was darauf schließen lässt, dass sich GM1 in der l_o -Phase oder an der l_o - l_d -Phasengrenze anreichert.

Die Membrandicke multilamellarer Vesikeln (MLVs) kann mit Weitwinkelröntgenstreuung (WAXRD) gemessen werden.^[52] Bei diesem Vesikeltyp sind die Doppelschichten zwiebelartig angeordnet, wodurch der Abstand zwischen den einzelnen Schichten und ihre Dicke bestimmt werden kann. So wurde z.B. herausgefunden, dass Sphingomyelin-DOPC-Membranen eine 0,9–1,1 nm höhere Schichtdicke haben als DOPC-Cholesterin- oder reine DOPC-Doppelschichtmembranen. Dies zeigt, dass die chemische Zusammensetzung einer Membran ihre Schichtdicke beeinflussen kann.

Eine Reihe von Methoden wurde eingesetzt, um die laterale Beweglichkeit von Rafts und ihre Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung nachzuweisen. Bei der SPT-Methode^[53] wird ein mit einem Goldpartikel (Größe 40 nm) markiertes Lipid in eine Raft-haltige Lipidmischung eingebaut. Durch konfokale Lasermikroskopie^[54] wurde die Domänenstruktur innerhalb der Lipidmonoschicht bestimmt und anschließend die Bahn des Gold-markierten Lipids

verfolgt (Abbildung 23). Dies ermöglicht die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten (D) innerhalb der einzelnen phasenseparierten Zustände (der dunklen und hellen Bereiche) der Monoschicht. Es zeigte sich, dass die Beweglichkeit (und somit D) des Lipidtracers in der l_d -Phase mehr als doppelt so groß ist wie in der l_o -Phase.

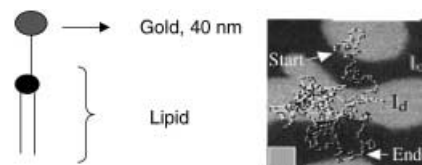


Abbildung 23. Mit SPT kann die Diffusion eines Gold-markierten Lipids in den l_d - (hell) und den l_o -Bereichen (dunkel) einer Raft-haltigen Lipidmonoschicht (DOPC/Cholesterin/SM 1:1:1) verfolgt werden. Die Partikelbahn des Gold-markierten Lipids gibt Aufschluss über den Diffusionskoeffizienten in der l_d - ($1,1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) und der l_o -Phase ($0,38 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [46].

In einer weiteren Studie zur Zusammensetzung von Rafts in Abhängigkeit von den umgebenden Membranlipiden wurde TOF-SIMS^[55] von DPPC-DOPC-Monoschichten in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass in Gegenwart von Ca^{2+} DOPS-angereicherte Cluster mit einer Domänengröße von 3–10 μm gebildet werden.

4.3. Größe von Rafts

Ein viel diskutiertes Thema ist die absolute Größe von Rafts.^[56] In Tabelle 2 sind Literaturwerte und die jeweilige Messmethode zusammengefasst. Mit AFM und SPT wurden Werte im Bereich von einigen 10 bis 100 nm erhalten, während mikroskopische Verfahren, WAXRD und TOF-SIMS Werte von wenigen Mikrometern ergaben. Die Molekülzahl in solchen Rafts variiert zwischen einigen 100 und mehreren 100 000. Hierzu müssen drei Punkte beachtet werden:

1. Rafts sind dynamische Systeme, was bedeutet, dass die einzelnen Komponenten in einem Gleichgewicht zwischen ihrer freien und geordneten Form vorliegen. Mit Fluoreszenzmikroskopie und SPT wurde nachgewiesen, dass sich die Grenzflächen von Rafts bezüglich ihrer umgebenden Lipide im Bereich einiger Sekunden bewegen, sodass es schwierig ist, bei Raumtemperatur eine genaue Größenmessung vorzunehmen.
2. Die Art der Detektion legt den Größenbereich der messbaren Strukturen fest. Somit ist es nicht überraschend, dass Rafts, die kleiner als 1 μm sind, durch Fluoreszenzmikroskopie nicht detektierbar sind, während mit AFM-Methoden Strukturen in der Größenordnung von 10 nm noch gemessen werden können.
3. Da die Raftbildung letztlich auf Phasenseparationsprozesse zurückgeht, spielen sowohl die Art der Membranherstellung als auch der physikalische Zustand, in dem

Tabelle 2: Größe und chemische Zusammensetzung von Rafts in biomimetischen Membranen.

Methode	Detektionsprinzip	Membrantyp	Zusammensetzung	Größe	Lit.
AFM	Höhendifferenz	Monoschicht	POPC/SM/Cholesterin	15–200 nm	[48]
AFM	Höhendifferenz	Monoschicht	POPC/SM/Cholesterin/GM1	30–90 nm	[47b, 48]
AFM	Höhendifferenz	Monoschicht	DPPC/Cholesterin/GM1	100 nm	[50]
AFM	Höhendifferenz	Monoschicht	DOPC/DPPC/GM1	ca. 1 μm	[51]
AFM	Höhendifferenz	Monoschicht	DOPC/SM/Cholesterin	ca. 0.5 μm	[49]
SPT	Beweglichkeit	Maus-Fibroblasten	–	ca. 200 nm	[53a]
SPT	Beweglichkeit	BHK-Zellen	–	30 nm	[53b]
SPT	Beweglichkeit	Monoschicht	POPC/SM/Cholesterin	–	[46]
TOF-SIMS	chem. Zusammensetzung	Monoschicht	DPPC/DPPS	3–10 μm	[55]
WAXRD	Membrandicke	MLV	–	9–11 Å Dicke	[52b]
Mikroskopie	Fluoreszenz	Monoschicht	POPC/SM/Cholesterin/GM1	ca. 1 μm	[46]
Mikroskopie	Fluoreszenz	Monoschicht	DOPC/SM/Cholesterin	ca. 0.5 μm	[54b]
Mikroskopie	Fluoreszenz	Monoschicht	DOPE/DPPC/Cholesterin	einige μm	[54c]
Mikroskopie	Zweiphotonen-Absorption	GUV	POPC/SM/Cholesterin	ca. 10 μm	[46]
Mikroskopie	Zweiphotonen-Absorption	GUV	DLPC/DAPC	< 30 μm	[54a]

sich die Monoschicht oder die Doppelschicht befindet, eine wesentliche Rolle. Die meisten Experimente wurden mit trägerfixierten Langmuir-Blodgett-Monoschichten durchgeführt, die sich von „losen“ Doppelschichtmembranen in GUVs unterscheiden können. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Phasenwachstum zeitabhängig ist,^[57] was darauf hindeutet, dass Domänen nicht immer Gleichgewichtsstrukturen darstellen. So nimmt laut AFM-Messungen die Domänengröße innerhalb einer DPOC-DPPC-Membran mit der Zeit signifikant zu (Abbildung 24). Hierbei kann die anfängliche Domänengröße von 80 nm–1.1 μm auf mehr als 5 μm anwachsen.

5. Polymerinduzierte Phasenseparation

Die bisherigen Abschnitte befassten sich mit der spontanen lateralen Phasentrennung innerhalb einer gemischten Lipiddoppelschichtmembran unter Einwirkung von Temperatur, ionischen Effekten und kleinen Membranzukünnen. Im Folgenden behandeln wir nun Phasenseparierungsprozesse durch große Moleküle (Polymere), die die Clusterbildung innerhalb einer Lipidmembran auslösen können. Diese Prozesse sind nicht auf Lipiddoppelschichtmembranen beschränkt, sondern können auch bei Makromolekülmembranen auftreten (Abbildung 25).

Der Vesikel-Begriff kann auf alle geschlossenen Hohlkugelstrukturen mit Durchmessern von 100–500 nm ausgedehnt werden. Die Außenhülle dieser Vesikeln kann unterschiedlich aufgebaut sein: a) aus polymerisierten Lipiden oder aus Polymeren, die in eine Lipiddoppelschichtmembran eingebaut sind,^[58] b) aus niedermolekularen Blockcopolymeren oder c) aus hochmolekularen Blockcopolymeren.^[16] Die treibende Kraft der Domänenbildung ist die Phasenseparation zwischen den Polymerketten und/oder den Lösungsmittelmolekülen, ein Effekt, der bei Polymeren stärker ausgeprägt ist als bei niedermolekularen

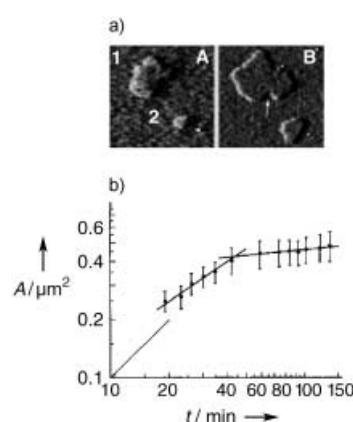


Abbildung 24. Domänenwachstum (Domänen 1 und 2), visualisiert durch AFM. a) Die Größe der Domänen einer DPOC-DPPC-Monoschicht (3:1) nimmt mit der Zeit zu (A: nach 19 min, B: nach 59 min); b) Querschnittsfläche als Funktion der Zeit; der Kurvenverlauf wird durch ein Potenzgesetz wiedergegeben. Mit Genehmigung der American Chemical Society aus Lit. [57].

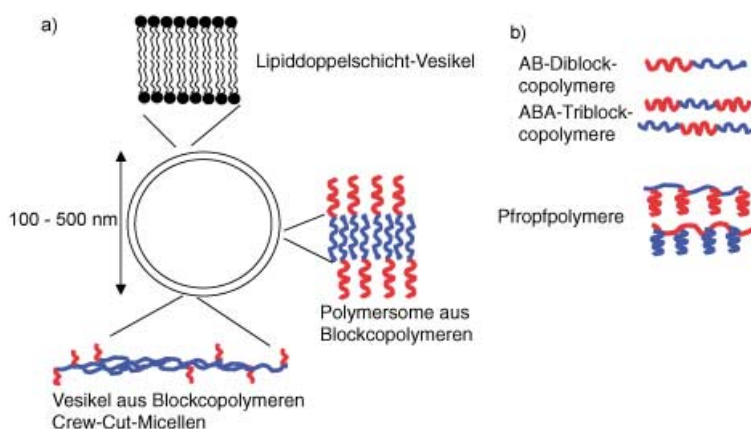


Abbildung 25. a) Die Außenhülle von Vesikeln kann aus Lipiddoppelschichtmembranen, Diblockcopolymeren („Polymersomen“) oder vernetzten Diblockcopolymeren („Crew-Cut-Vesikeln“) aufgebaut sein. b) Unterschiedliche Arten von Blockcopolymeren (rot: hydrophiler Block, blau: hydrophober Block).

Verbindungen.^[59] Speziell amphiphile Polymere (d.h. Polymere aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Block) zeigen eine relativ hohe selektive Löslichkeit in Wasser^[60] und können deshalb zu einer Vielzahl von hoch geordneten Strukturen wie Micellen, Vesikeln, Gelen und lyotropen Phasen aggregieren.^[61] Der Organisationstyp hängt vor allem vom Verhältnis der hydrophilen und hydrophoben Gruppen, dem Molekulargewicht und dem Lösungsmittel ab.

Das Aggregationsverhalten von amphiphilen Blockcopolymeren wurde in einem neueren Übersichtsartikel ausführlich beschrieben^[62] und soll hier nicht näher erörtert werden. Dennoch sei kurz darauf hingewiesen, dass die Bildung von Vesikeln und das Phänomen der Polymer- und Blockcopolymer-induzierten Phasentrennung lediglich spezielle Fälle dieses sehr komplexen Phasenverhaltens sind. Unter Einwirkung von Polymeren kommt es entweder zu einer lateralen (innerhalb der Membran) oder einer vertikalen Phasentrennung (zwischen der inneren und der äußeren Schicht). Die folgenden Abschnitte erläutern den Effekt von Polymeren und Polymerisationsprozessen innerhalb der Membran auf die Domänenbildung.

5.1. Einfluss von Polymeren auf Lipiddoppelschichtmembranen

Ein amphiphiles oder ein geladenes Polymer kann auf drei Arten die Domänenbildung in einer Lipiddoppelschicht bewirken (Abbildung 26):

1. Durch den Einbau eines Pfropfpolymeres mit hydrophoben Pfropfgruppen kommt es zur Clusterbildung um die hydrophoben Ankergruppen, wodurch laterale Domänen gebildet werden.
2. Geladene Polymere bewirken in Mischung mit geladenen und neutralen Lipiden eine vertikale Phasentrennung, wobei sich die geladenen Lipide durch einen Flip-Flop-

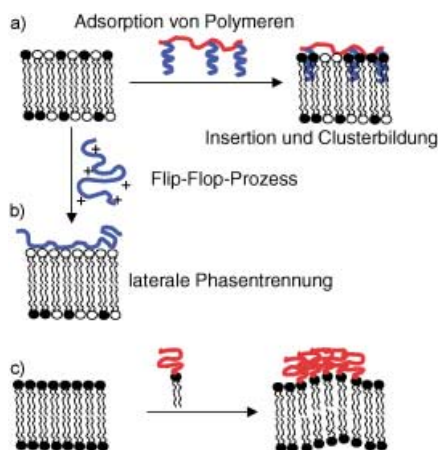


Abbildung 26. Durch Polymere hervorgerufene Phasentrennungen in Lipiddoppelschichtmembranen. a) Clusterbildung der Lipide um die hydrophoben Seitenketten eines Pfropfpolymeres; b) laterale Phasentrennung nach Adsorption eines geladenen Polymeres (blau) an der Oberfläche einer Doppelschicht; c) Clusterbildung eines Lipidpolymers und dadurch ausgelöste Membrankrümmung.

Prozess mit entgegengesetzter Ladung zum Polymer anordnen.

3. Der Einbau von Lipid-Polymer-Konjugaten in die Doppelschichtmembran bewirkt eine Clusterbildung des Lipidpolymers durch erzwungene Erhöhung der Membrankrümmung.

5.1.1. Einbau von Pfropfpolymeren

Eine Vielzahl von Polymeren kann an der Oberfläche einer Lipid-Vesikel adsorbiert werden. Am besten geeignet sind amphiphile Block- und Pfropfcopolymere mit hydrophilem Gerüst und hydrophoben Seitenketten. Die hydrophoben Polymerketten können in die Membran eindringen, wodurch die hydrophilen Polymerketten an der Membranoberfläche fixiert werden.

Ladaviere et al.^[63] wiesen den induzierenden Effekt von hydrophilen/hydrophoben Pfropfpolymeren auf die Domänenbildung innerhalb einer Lipiddoppelschicht nach. So zeigten GUVs aus Polyacrylsäure-Pfropfcopolymeren mit über 75 Mol-% hydrophilem Anteil (d.h. Anteil an freier Acrylsäure) sowohl fluoreszierende (helle) wie auch nicht-fluoreszierende (dunkle) Domänen (Abbildung 27). Es

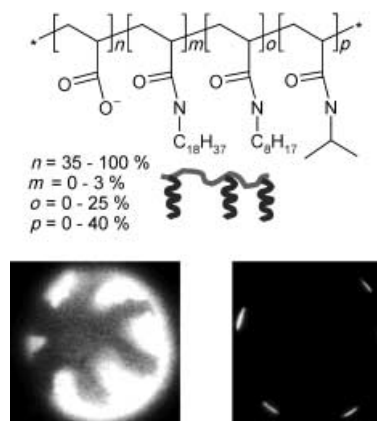


Abbildung 27. Fluoreszenzaufnahmen von GUVs, die die Phasentrennung durch Insertion eines Pfropfpolymeren veranschaulichen. Mit Genehmigung der American Chemical Society aus Lit. [63].

wurde gezeigt, dass diese Polymere die Lipiddoppelschichtmembran nicht durchdringen und zwei Arten von Phasentrennung hervorrufen: a) vertikale Phasentrennung durch äußerliche Adsorption an die Doppelschichtmembran nach Insertion der hydrophoben Pfropfkette des Polymeren und b) laterale Entmischung durch Clusterbildung der hydrophoben Ketten innerhalb der Lipiddoppelschichtmembran.

5.1.2. Elektrostatische Adsorption von Polymeren an Vesikeloberflächen

Die elektrostatische Wechselwirkung von Polymeren mit Vesikeln wurde mit Laser-Mikroelektrophorese untersucht.^[64] Dazu wurde eine ionische Vesikel einem elektrischen Feld ausgesetzt und ihre Bewegung mit einem Laserstrahl verfolgt. Bei Zugabe eines entgegengesetzt geladenen

Polymers kam die elektrophoretische Bewegung des Komplexes zum Stillstand, was bedeutet, dass die Ladungen an der Vesikeloberfläche durch das Polymer abgesättigt waren. Auf diese Weise lässt sich untersuchen, ob das Polymer entweder nur die außen gelegenen ionischen Lipide erkennt (wodurch nur die Hälfte der vesikulären Ionen neutralisiert würde) oder aber den gesamten Lipidanteil der Vesikel (wobei die innen gelegenen Lipide durch einen Flip-Flop-Prozess an die Oberfläche wandern müssten).

Es zeigte sich, dass ein anionisches Tensid (Natriumdocylsulfat, SDS) durch die elektrostatische Wechselwirkung mit einem kationischen Polymer (PEVP, Abbildung 28) von der Innenschicht einer fluiden Doppelschichtmembran an die äußere Schicht gezogen werden kann, wodurch erreicht

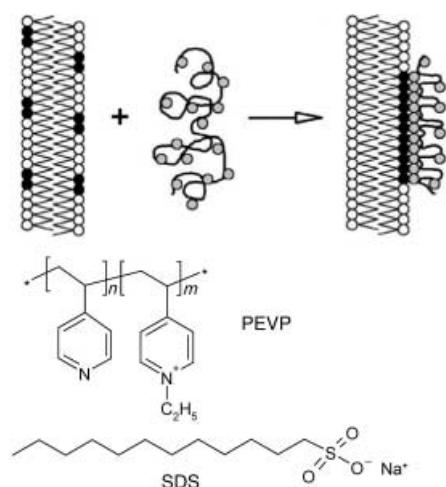


Abbildung 28. Flip-Flop-Prozess eines anionischen Tensids (SDS), ausgelöst durch Adsorption eines kationischen Polymers (PEVP). PEVP = Poly(*N*-ethylvinylpyridin-co-vinylpyridin). Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [64b].

wurde, dass das Verhältnis der PEVP-Gesamtladung gleich der von SDS war. Bei festen Doppelschichtmembranen hingegen wird kein solcher Flip-Flop-Prozess in Gegenwart von SDS beobachtet, wodurch das PEVP/SDS-Ladungsverhältnis auf 0.5 absinkt (d. h., nur die an der äußeren Schicht befindlichen Lipide werden neutralisiert). Da die Polymerkonzentration viel zu gering ist, um die gesamte Vesikeloberfläche abdecken zu können, nimmt man an, dass das Polymer mit der Gesamtmenge oder der Hälfte des Tensids (je nach Membranzustand) Domänen bildet und es dort zur Neutralisation der Ladungen kommt.

5.1.3. Krümmungsinduzierte Clusterbildung

Lipid-Polymer-Konjugate bilden eine spezielle Klasse von membranaktiven Polymeren, bei denen ein hydrophiles Polymer kovalent an die Kopfgruppe eines doppelkettigen Lipids gebunden ist. Wenn die Länge der hydrophoben Ketten des Lipids acht CH_2 -Einheiten übersteigt, kann das Konjugat durch hydrophobe Wechselwirkungen in eine Lipidmembran

eindringen, wodurch ein Teil der Membranoberfläche von einer hydrophilen Polymerhülle bedeckt wird. Dabei kann sich die physikalische und/oder biologische Stabilität von Liposomen erhöhen (ähnlich wie beim Prinzip der sterischen Stabilisierung von Kolloiden).^[65] Zum Einsatz kommen in erster Linie Poly(ethylenglycole), Poly(acrylsäuren), Poly(aminosäuren), Poly(oxazoline) und Oligosaccharide. Abgesehen von den stabilisierenden Effekten können Lipid-Polymer-Konjugate auch die Bildung von Domänen begünstigen und Gestaltänderungen in einer Membran bewirken.

Die induzierte Domänenbildung durch Lipid-Polymer-Konjugate konnte anhand von Experimenten mit einer Doppelschichtmembran mit eingebautem Poly(ethylenglycol)-Lipid nachgewiesen werden (Abbildung 29). Slack

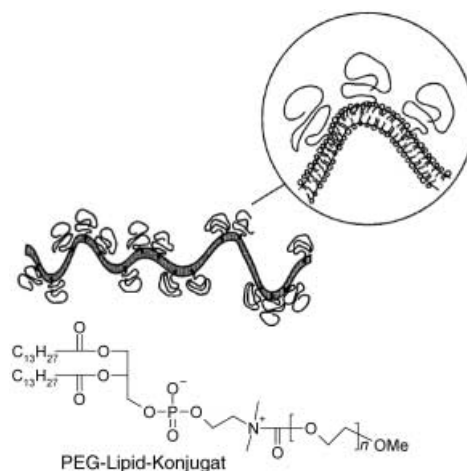


Abbildung 29. Anreicherung von PEG-Lipid-Konjugaten in gekrümmten Bereichen einer Lipiddoppelschichtmembran; PEG = Poly(ethylenglycol). Mit Genehmigung des American Institute of Physics aus Lit. [66].

et al.^[66] untersuchten hierbei multilamellare Membranen mit und ohne Lipid-Polymer-Konjugate. Aus den Studien ging hervor, dass die Lipid-Polymer-Konjugate vorzugsweise in stärker gekrümmten Bereichen der Membran angereichert werden, da die hydrophilen Polymere mit ihren voluminösen Kopfgruppen mehr Platz beanspruchen als konventionelle Lipide mit ihren kleineren Kopfgruppen.

In einer Weiterentwicklung dieses Konzepts wurde ein Pffropfpolymer mit thermosensitiven Eigenschaften erzeugt. Simon et al.^[67] verwendeten ein Copolymer aus Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) und einem geringen Anteil an hydrophoben Pffropfketten (0.5 Mol-%) (Abbildung 30a), die als Ankergruppen in der Lipiddoppelschicht dienen. Zusätzlich wurde eine fluoreszierende Komponente zugesetzt, um die laterale Diffusion beobachten und quantifizieren zu können. PNIPAM ist ein thermoresponsives Polymer, das beim Erhitzen über die kritische Temperatur von 42 °C seine Struktur durch Kontraktion ändert, sodass auch die Membrankrümmung stark zunimmt (Abbildung 30b). Somit kommt es zur Bildung neuer Vesikeln als Antwort auf einen Temperatursprung (Abbildung 30c).^[68]

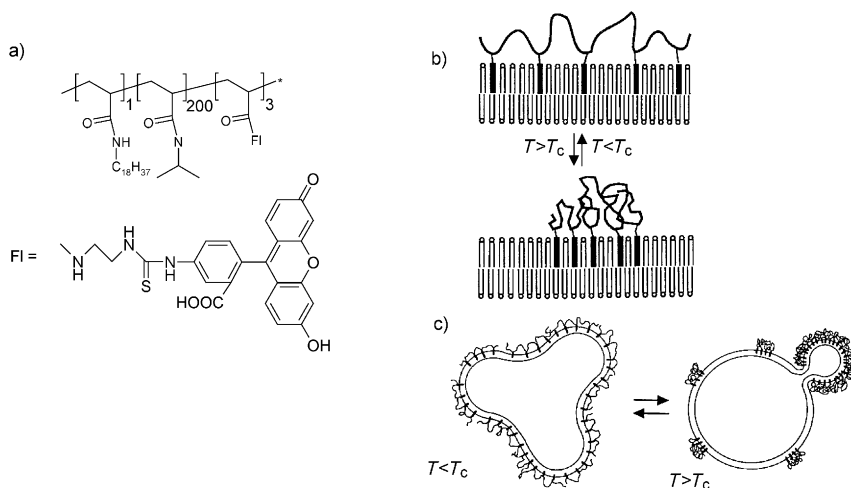


Abbildung 30. Anreicherung von PNIPAM-Lipid-Konjugaten in gekrümmten Bereichen einer Lipiddoppelschichtmembran. a) Struktur des Blockcopolymers; b) temperaturinduzierte Kontraktion ($T > T_c$) des in die Membran eingebauten Polymers; c) Effekt der temperaturinduzierten Kontraktion auf die Vesikelform: Die Krümmung wird erhöht und führt schließlich zur Bildung neuer Vesikeln an der Oberfläche. Mit Genehmigung von Elsevier Science aus Lit. [67].

5.2. Polymerisation innerhalb einer Lipiddoppelschichtmembran

In einer Lipiddoppelschichtmembran sind zwei Arten von Polymerisationsreaktionen möglich: a) Polymerisation von reaktiven Monomeren innerhalb der hydrophoben Membranhülle, b) Polymerisation von Lipiden mit polymerisierbaren Gruppen. Punkt (b) wurde ausführlich in der Literatur beschrieben^[58a] und soll hier lediglich mit Bezug auf vertikale Phasenseparationsprozesse erwähnt werden. Beide Polymerisationstypen können sowohl laterale als auch vertikale Phasentrennungen in einer Lipiddoppelschichtmembran induzieren.

5.2.1. Laterale Phasenseparation von wachsenden Polymeren innerhalb der Lipiddoppelschicht

Eine Vielzahl kleiner hydrophober Moleküle kann in den hydrophoben Teil einer Lipiddoppelschichtmembran eingebaut werden, darunter Styrol, Divinylbenzol und Alkylacrylate. Durch thermische oder photochemische Polymerisation von Monomeren lassen sich zwei Arten von Strukturen erhalten (Abbildung 31): a) Entweder kommt es aufgrund schneller Diffusion der Monomere zur Phasenseparation während der Polymerisation, was eine „Klumpenbildung“ des Polymers zur Folge hat,^[69] oder b) das Monomer polymerisiert homogen innerhalb der hydrophoben Membranhülle.^[70]

German et al.^[71] untersuchten die Phasenseparation von Monomeren innerhalb einer Lipiddoppelschicht nach Reaktionsschema (a) (unter Bildung von „Fallschirm-Strukturen“).^[72] Styrol oder Alkylmethacrylate wurden durch Mischen mit einer vorgefertigten Vesikelsuspension homogen zwischen den einzelnen Membranschichten (DODAB) verteilt (Abbildung 31). Anschließend wurde eine radikalische Polymerisation ausgelöst, wobei es schon kurz nach der

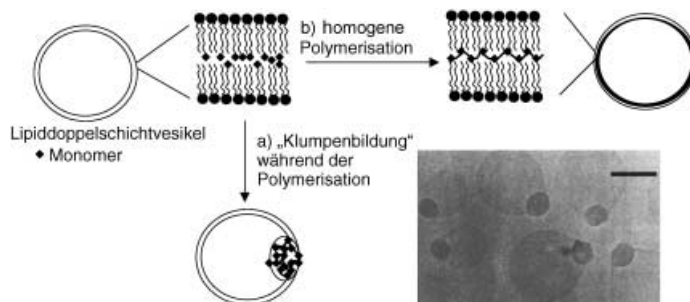


Abbildung 31. Polymerisation von Monomeren (Styrol, Methylmethacrylat) innerhalb einer Doppelschichtmembran aus Didodecylammoniumbromid (DODAB). Das TEM-Bild verdeutlicht die „Klumpenbildung“ aufgrund der schnellen Diffusion des Monomers innerhalb der Doppelschicht.^[72]

5.2.2. Polymerisation in vertikal phasenseparierten Doppelschichten

Ravoo et al.^[74] verwendeten eine Kombination aus vertikaler Phasenseparation und anschließender Polymerisation zum Aufbau von stabilen Vesikeln mit unterschiedlichen inneren und äußeren Schichtstrukturen. Dazu wurde ein β -Nitrostyrol-Derivat an die hydrophile Kopfgruppe eines Diacylglycerophospholipids gekuppelt, und aus dem Konjugat wurden bei neutralem pH-Wert Vesikeln aufgebaut (Abbildung 32).

Die β -Nitrostyrol-Einheiten an den Außenseiten der Vesikeln wurden durch Zugabe einer alkalischen Lösung unter Bildung von Benzaldehyd-Derivaten hydrolysiert, während die Innenseite der Membran durch die gehinderte Diffusion der Hydroxidionen (neutraler pH-Wert) in ihrem Aufbau unverändert blieb. Die an der Membrannenschicht verbliebenen β -Nitrostyrol-Gruppen wurden anschließend photochemisch polymerisiert, wodurch der vertikal phasen-

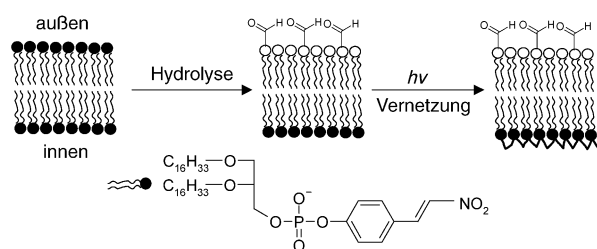


Abbildung 32. Selektive Vernetzung eines Lipids an der inneren Membranschicht einer Vesikel. Die Hydrolyse führt zur Desaktivierung der β -Nitrostyrol-Einheiten an der äußeren Membranschicht. Die verbleibenden β -Nitrostyrol-Einheiten an der Innenseite werden photochemisch vernetzt.

separierte Zustand stabilisiert wurde – ansonsten hätte ein Flip-Flop-Prozess zu einer Vermischung der beiden Membranstrukturen geführt.

5.3. Vesikelbildung durch Phasenseparation von Blockcopolymeren

Im Unterschied zur Vesikelbildung durch kleine Lipidmoleküle (mit Molekulargewichten um etwa 1000 g mol^{-1}) können Blockcopolymeren (mit Molekulargewichten von 1000 bis zu einigen 10000 g mol^{-1}) Vesikeln durch Phasentrennungsprozesse bilden. Entscheidender Punkt ist die Nichtmischbarkeit eines der Polymerblöcke mit Wasser sowie auch die Nichtmischbarkeit der beiden Blöcke untereinander. Man kennt zwei Arten von Membranaufbau, die letztlich zu zwei unterschiedlichen Strukturtypen führen.

Blockcopolymeren mit mittleren Molekulargewichten von einigen 1000 g mol^{-1} und $20\text{--}40 \text{ Mol-\%}$ an hydrophilem Block können direkt in Wasser gelöst werden und bilden dort durch Phasentrennung der nichtmischbaren Polymerblöcke „Polymerosome“ (Abbildung 33a).^[16,75] Die Membrandicke kann über die Größe des hydrophilen Blocks zwischen 8 und 20 nm eingestellt werden. Damit sind Membranen mit maßgeschnei-

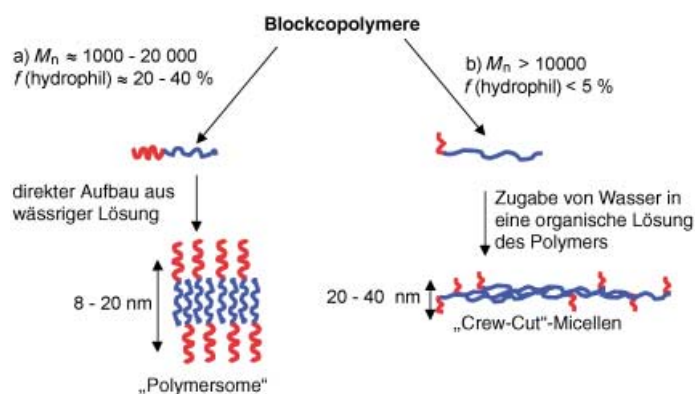


Abbildung 33. Aufbau von Vesikeln durch amphiphile Blockcopolymeren in wässrigen Lösungen. a) Bildung von „Polymerosomen“ durch direkte Aggregation von kurzkettigen Blockcopolymeren mit einem hydrophilen Anteil zwischen 20 und 40 Mol-\% ; b) Aggregation von hydrophoben, langkettigen Blockcopolymeren durch Ausfällung unter Bildung von „Crew-Cut“-Micellen.

derten chemischen und mechanischen Eigenschaften wie einer definierten Permeabilität, Steifheit und Elastizität zugänglich. Die amphiphilen Blockcopolymeren fungieren als „lipidartige“ Moleküle, die sich aufgrund hydrophober Effekte und der Nichtmischbarkeit der Polymerblöcke anordnen. Die hydrophoben Ketten sind bei niedrigen Molekulargewichten maximal gestreckt und bei höheren Molekulargewichten „verschlungen“. Der Aggregationsprozess wurde ausführlich beschrieben^[76] und soll hier nicht weiter behandelt werden.

Blockcopolymeren mit höheren Molekulargewichten ($M > 10000 \text{ g mol}^{-1}$) und einem hydrophilen Anteil von weniger als 20 Mol-\% sind aufgrund verlangsamter kinetischer Prozesse (bedingt durch die langen hydrophoben Ketten) nicht mehr in der Lage, eigenständig Vesikeln zu bilden. Das Polymer wird daher in einem mit Wasser mischbaren Solvens gelöst, in dem beide Blöcke gut löslich sind (Abbildung 33b).^[77] Durch langsame Zugabe von Wasser bilden sich Vesikeln mit einer Membrandicke von etwa 20 bis 40 nm . Da die Membran aus stark verflochtenen Polymerketten aufgebaut ist, spiegelt die Schichtdicke nicht zwangsläufig die Länge der hydrophoben Blöcke wider.

Eisenberg und Luo^[78] untersuchten die Vesikelbildung mit einer Reihe von Blockcopolymeren, darunter PS-*b*-PA, PS-*b*-PEO und PS-PVP. Entscheidend war, dass die hydrophoben Blöcke dieser Polymere (Polymerisationsgrad $200\text{--}380$) wesentlich länger waren als die hydrophilen Blöcke (Polymerisationsgrad $20\text{--}80$). Die damit erzeugten Vesikeln enthalten einen hydrophoben Kern aus PS und eine hydrophile Hülle aus PEO, PA oder PVP. Maßgebend für die Vesikeldimensionen ist eine feine Balance zwischen der Streckung der PS-Blöcke, der abstoßenden Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Blöcken und der Kern-Hülle-Wechselwirkung.

Das Wechselspiel dieser energetischen Beiträge wurde genutzt, um Polymerketten in einer Mischung aus Blockcopolymeren entweder an die Innen- oder die Außenseite der Vesikel zu dirigieren (Abbildung 34). Dazu wurde eine Mischung aus zwei Blockcopolymeren mit gleich langen PS-Ketten ($m = 300$) und unterschiedlich langen hydrophilen Blöcken (Polyacrylsäure (PA, $n = 11$) oder Poly(4-vinylpyridin) (P-4VP, $n = 33$)) präpariert. Zusätzlich wurde ein Pyren-Marker zwischen den PS- und den PA-Block eingebaut, um die Position der Polyacrylsäureketten innerhalb der Vesikel bestimmen zu können. Nach Mischen der beiden Polymere und Vesikelbildung wurden Ti^+ -Ionen als Fluoreszenzlöcher zugesetzt, wobei die Pyren-Fluoreszenz jedoch nicht gelöscht wurde. Dies bedeutet, dass sowohl die Pyrenmoleküle als auch die PA-Ketten in das Vesikelinnere zeigen, während die P-4VP-Blöcke an der Vesikeloberfläche lokalisiert sind. Dieses Ergebnis lässt sich durch rein geometrische Überlegungen erklären: Die längeren P-4VP-Ketten benötigen mehr Platz als die PA-Ketten, weshalb sie bevorzugt an der Außenhülle der Vesikel angeordnet werden, während die kürzeren PA-Ketten im stärker gekrümmten Vesikelinnenraum lokalisiert sind.

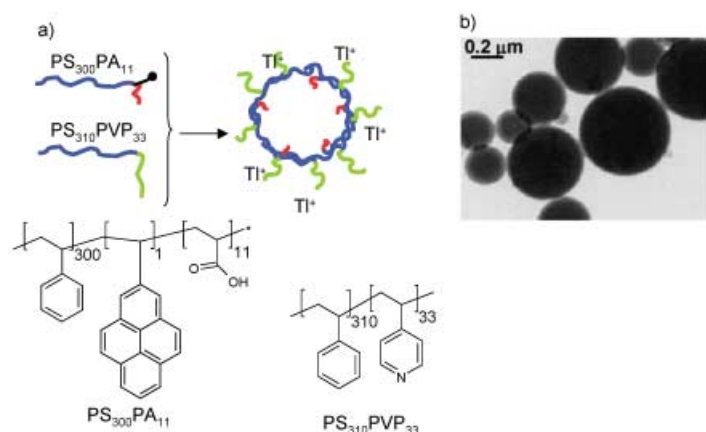


Abbildung 34. Selektive Phasenseparation eines Blockcopolymers an der Innen- und Außenseite von „Crew-Cut“-Micellen. a) Eine Mischung aus PS₃₀₀PA₁₁- und PS₃₁₀PVP₃₃-Blockcopolymeren bildet gemischte „Crew-Cut“-Micellen. Die längeren PVP-Ketten (grün) zeigen nach außen, die kürzeren PAA-Ketten (rot) nach innen. Der Pyrenteil zeigt ebenfalls in das Vesikelinnere und bleibt daher für die TI⁺-Ionen, die als Fluoreszenzlöcher wirken, unerreichbar. b) TEM-Bild so gebildeter Vesikel.^[78]

6. Biologische Auswirkung der Phasenseparation

Die primäre Funktion von Membranlipiden besteht im Aufbau einer Grenzschicht, die die Integrität von Zellen und Organellen aufrechterhalten soll. Die außerordentliche Vielfalt von Lipiden, die am Membranaufbau in lebenden Zellen beteiligt sind, legt jedoch die Vermutung nahe, dass diese neben ihrer Rolle als physikalische Barriere zusätzliche Funktionen in biologischen Prozessen ausüben.^[79,80] Um die Funktion biologischer Membranen zu verstehen, wurden Cholesterin-Phospholipid- und Protein-Lipid-Mischungen in künstlichen Membranen untersucht. Wie schon erwähnt, kann eine Membran abhängig von Temperatur und Lipidzusammensetzung in unterschiedlichen Zuständen vorliegen: einem Gel-artigen (L_β) und einem flüssig-kristallinen Zustand (L_α). Zusätzlich konnte in Modellmembranen aus Cholesterin und Phospholipiden ein flüssig-geordneter Zustand (L_o) nachgewiesen werden, der sowohl Eigenschaften einer L_β- als auch einer L_α-Phase aufweist. Ob solche Domänen auch in vivo existieren, war lange Jahre umstritten.

Erste Hinweise, dass Rafts auch in Membranen lebender Zellen vorhanden sind, wurden aus Untersuchungen an Fibroblasten erhalten. Es wurden Membranfraktionen identifiziert, die zum einen reich an Glycosphingolipiden sind, zum anderen aber keine Löslichkeit in kalten nichtionischen Tensiden wie Triton X-100 zeigen.^[81] In zahlreichen Folgestudien wurde die Bedeutung von Rafts in biologischen Prozessen untermauert. Es wurden Proteine gefunden, die innerhalb solcher Domänen assoziieren, was eine große Bedeutung für biologische Prozesse wie Signaltransduktion, Sortierung von Proteinen und Lipiden, Zelladhäsion sowie für eine Reihe von Krankheiten haben dürfte.

6.1. Caveolen, Caveoline und Cholesterin

Eine spezielle Klasse von Lipid-Domänen sind die Caveolen, eine Untergruppe der Rafts, die reich an Cholesterin, Glycosphingolipiden, Sphingomyelin und Lipid-verankerten Membranproteinen sind (siehe Abschnitt 4.1).^[43,82,83] Caveolen wurden erstmals in den 50er Jahren^[84,85] mithilfe der Elektronenmikroskopie als kleine Einstülpungen mit dynamischer Struktur und Durchmessern von 50 nm oder größer charakterisiert.^[86,87] Infolge ihrer Flexibilität können Caveolen jedoch auch geschlossene Formen annehmen und z. B. als flache oder röhrenförmige Domänen innerhalb der Membran vorliegen (Abbildung 35).^[73,88,89]

Caveolen kommen in vielen Zellarten vor und sind von dem Cholesterin-bindenden 22 kDa-Protein Caveolin-1 umhüllt.^[86] Caveolin-1 enthält eine zentrale, 33 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne, die mit der Membran wechselwirkt, während die Amino- und Säureendgruppen des Proteins in das Cytoplasma reichen. Es gehört einer Familie von etwa 21–25 kDa schweren Membranproteinen an, die Homo- und Heterooligomere bilden können und an einer Vielzahl

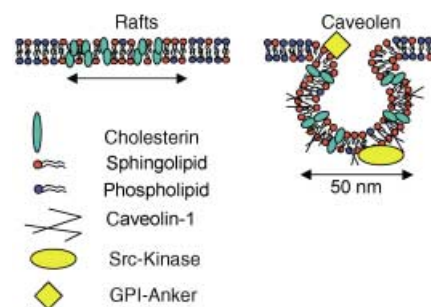


Abbildung 35. Schematische Struktur von Caveolen und assoziierten Proteinen (Caveolin 1, GPI-Anker, Src-Kinasen).

von Zellfunktionen beteiligt sind.^[86,90–92] Caveolin-1 kommt in einer ganzen Reihe von Zellen vor (Endothelzellen, Adipozyten, Fibroblasten usw.) und lagert sich immer an Cholesterin-reiche Domänen innerhalb der jeweiligen Zellmembran an.

Caveolin kann nur in Gegenwart von Cholesterin Oligomere bilden und an biologische Membranen anlagern.^[93–97] Man nimmt an, dass Caveolin-1 entscheidend für die Bildung der charakteristischen eingestülpften Caveolenstruktur ist,^[43,98] weshalb es auch als „Marker“ für Caveolen dient. Die Einstülpung entsteht durch den Hairpin-Loop des hydrophoben Proteinkerns im Membraninneren und der Anbindung des Proteins an Cholesterin und die Glycosphingolipide.^[87,93,99,100] In manchen Organellen befinden sich auch Domänen, die zwar einen ähnlichen molekularen Aufbau wie Caveolen haben, jedoch kein Caveolin-1 enthalten. Solche Bereiche werden als „nichtcaveolische Rafts“ oder schlicht „Rafts“ bezeichnet.^[1,87]

Bei zu niedrigem Cholesteringehalt zerfällt die Hülle und die Zahl an Caveolen nimmt ab.^[101] Da die Abnahme an Cholesterin direkt die Funktion der Rafts beeinträchtigt, lässt sich die Beziehung zwischen Caveolen und Cholesterin am einfachsten unter funktionellen Aspekten betrachten.^[101]

6.2. Caveolen und Cholesterin: Funktion bei der Signaltransduktion in Zellen

Caveolin-1 wurde in Caveolen von Plasmamembranen und in intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Reticulum (ER) oder dem Trans-Golgi-Netzwerk nachgewiesen.^[92,94,103] Das endoplasmatische Reticulum ist ein großes, durch röhren- und sackförmige Strukturen aufgebautes Zellkompartiment bestehend aus einem rauen ER und einem glatten ER. Das raue ER dient zur Proteinsynthese, wobei die Proteine zumeist über Transportvesikeln zum Golgi-Apparat weitergeleitet werden können. Der Golgi-Apparat ist, ähnlich wie das ER, ein von Membranen umschlossenes Netzwerk, in dem die Proteinreifung und -sortierung stattfindet.

Cholesterin wird im ER synthetisiert (so wie alle anderen Lipide Raft-ähnlicher Domänen), anschließend zur Plasmamembran befördert und dort zwischen Rafts und anderen Domänen verteilt. Zell-Lipide müssen nicht wie die meisten Transmembranproteine durch Vesikeln befördert werden, sondern werden durch Trägerproteine durch das Cytoplasma transportiert. Exogenes Cholesterin (und Sterine im Allgemeinen) kann durch Endocytose in die Zelle eingebracht werden, wobei Caveolin-1 als Träger benötigt wird. Caveolin-1 bindet Cholesterin an der Zelloberfläche und befördert es durch die Zelle und die Plasmamembran und weiter zu den intrazellulären Kompartimenten.^[88]

Zusammengefasst besteht eine sehr enge Verknüpfung zwischen Cholesterin, dem Protein Caveolin und den Caveolen, wobei die Caveolenbildung durch den Gehalt an Caveolin-1 in der Zelle gesteuert wird.^[104] Da Caveolin-1 direkt am Cholesterintransport innerhalb der Zelle beteiligt ist, bestimmt es den Cholesteringehalt und die Eingliederung von Cholesterin in Membrandomänen. Demnach ist die Lipid-Protein-Wechselwirkung für eine Vielzahl von signalübertragenden Bahnen von großer Bedeutung, da Cholesterin die Anwesenheit von Signalübertragungsproteinen innerhalb der Zelldomänen zulässt. Viele biologische Prozesse werden gehemmt, wenn der Cholesteringehalt derart sinkt, dass solche Proteine nicht mehr in ausreichendem Maße in die Zelle transportiert werden.

6.3. Protein-Targeting in Membrandomänen

Lipiddomänen können bestimmte Klassen von Proteinen, die an der In-vivo-Funktion von Rafts beteiligt sind, selektiv ein- oder ausschließen.^[99] Prinzipiell wird ein Lipid durch seine lipophile Gruppe in einer Membran verankert. Proteine können mit Palmitin-, Myristin- (z.B. Src-Kinasen) oder Prenylketten (z.B. kleinen GTP-Ketten) acyliert werden

sowie an Cholesterin oder glycosyliertes Phosphatidylinositol (GPI) kovalent gebunden sein (Abbildung 35).

Caveolin ist nicht das einzige Protein mit Lipid-Anker, das an Aufbau und Funktion von Caveolen beteiligt ist. Acylierte Proteine, GPI-verankerte Proteine, die über eine Carboxy-Endgruppe an Membranen angebunden werden können, und einige prenylierte Proteine sind Bausteine, die ebenso in Caveolen zu finden sind.^[105] Diese aus dem ER stammenden Proteine (Caveolin, GPI-modifizierte Proteine usw.) werden nach ihrer Synthese in den Lipidkern (Glycosphingolipid/Sphingomyelin/Cholesterin) der Golgi-Komplex-Domänen transportiert und bilden dort Caveolen.

Ob die genannten Protein Rafts bilden, hängt primär von der Art ihrer gesättigten Ankergruppen ab (meist Myristin-Palmitin-Ketten oder Palmitindoppelketten).^[105] Da Rafts eine hohe Konzentration an acylierten Proteinen aufweisen, geht man heute davon aus, dass die Acylierung der signalgebende Schritt in der Bildung von Mikrodomänen innerhalb einer Membran ist. Einige hydrophobe Modifikationen des Protein-Ankers scheinen ebenso notwendig zu sein, da oft hohe Konzentrationen an Acylketten notwendig sind, um spezielle Proteine (z.B. *Influenza Hemagglutinin*^[106]) in die Membrandomänen einzuführen. Der relativ geringe Gehalt an prenylierten Lipiden kann mit der sterischen Hinderung der Prenyl-Ankergruppen erklärt werden. Diese sind zwar in hohem Maße hydrophob, können aber aufgrund ihrer sperrigen Struktur nicht in die hoch geordneten Domänen eindringen. Der Mechanismus der Proteinassoziation an die Membran-Rafts bedarf jedoch noch genauerer Untersuchung.

Obwohl bekannt ist, dass Rafts sowohl in Plasmamembranen als auch in vakuolären Systemen lebender Zellen vorhanden sind, ist ihre molekulare Zusammensetzung bislang nicht aufgeklärt. Trotz der zahlreichen Informationen rund um diese Thematik ist der Aufbau von Proteinen, die in solche Rafts inserieren können, noch immer wenig erforscht. Zumindest ist bekannt, dass normale Zellprozesse wie auch Krankheitsverläufe eng an die Präsenz von Raft-Komponenten geknüpft sind.

6.4. Signaltransduktion und endocytische Funktionen von Membrandomänen in Zellen

Die meisten hydrophilen Signalsubstanzen (z.B. hydrophile Hormone), die eine Membrandoppelschicht nicht durchqueren können, wirken durch Anbindung an spezielle Rezeptoren an der äußeren Zelloberfläche. Membranproteine, die solche Rezeptorfunktionen aufweisen, werden in drei Klassen unterteilt: 1) Klasse-I-Rezeptoren, die Enzymaktivität aufweisen (meist für Tyrosin-Kinase), 2) Klasse-II-Rezeptoren, die Ionenkanäle bilden, und 3) Klasse-III-Rezeptoren, bei denen es sich um Transmembranproteine handelt, die ihr Signal über G-Proteine weiterleiten. Nach dem Andocken der hydrophilen Signalsubstanz bewirkt eine Modifikation in der Rezeptorstruktur ein Signal im Membraninneren. Dieser Prozess wird als Signaltransduktion bezeichnet.

Caveolen und Rafts sind mit Rezeptoren angereichert, die in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen, z. B. mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Src-Thyrosin-Kinasen oder endotheler N2O-Synthase (eNOS).^[87] Diese morphologisch einzigartigen Bereiche („signaling platforms“) wirken als signalgebende Zentren. Ein Beispiel für diese Funktion von Caveolen ist die Wirkung des Choleratoxins. Die Signaltransduktion dieses Toxins erfordert die Gegenwart von Caveolen, um die Toxin-Rezeptor-Komplexe durch ein vesikuläres Transportsystem in das Zellinnere zu befördern. Das Beispiel verdeutlicht die enge Beziehung zwischen Signaltransduktion und Endocytose in Membrandomänen.^[107]

Der Begriff Cytose steht für den aktiven Zelltransport, entweder zur Aufnahme (Endocytose) oder zur Abscheidung von Makromolekülen (Exocytose). Als Transcytose bezeichnet man das Einführen eines Moleküls durch eine Plasmamembran mit anschließendem Transport zur gegenüberliegenden Membran. Beide Prozesse erfordern die Bildung von Vesikeln in der Membran, die jedoch von der Plasmamembran und von den Membranen der Zellorganellen abgeschnürt sind. Solche endocytischen Vesikeln sind in der Regel von speziellen Proteinen umgeben (meist Clathrin), anscheinend gibt es aber auch Caveolen, die Endocytose und Transcytose^[108] in Abwesenheit von Clathrin-Vesikeln ermöglichen.^[109]

Die Rolle, die bestimmte Lipide bei der Clusterbildung zu Rafts zur Regelung der Endocytose einnehmen, ist für Sterine bekannt, nicht aber für Sphingolipide. Es wurde gezeigt, dass Cholesterin die endocytischen Prozesse einer Zelle entscheidend beeinflussen kann, da bei der Abnahme des Cholesteringehalts der Transport von Molekülen durch Caveolen unterbunden wird.^[108]

Falls Caveolen am Transport von speziellen Molekülen beteiligt sind, sollten sie in der Lage sein, sich von der Membran abzukapseln. Ein solcher Mechanismus wurde postuliert, demzufolge nach der Einstülpung der Membran die Vesikel abgespalten werden muss, um als Transportmedium wirken zu können. Demnach könnten Proteine mit Caveolen assoziieren, um die Bildung von eigenständigen Vesikeln zu ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass bei endothelen Zellen und Hepatocyten diese Abspaltung durch GTPase-Dynamin ermöglicht wird.^[87,109,110]

Der Transport durch Caveolen scheint allerdings nicht auf Makromoleküle beschränkt zu sein. So zeigten Anderson et al., dass auch kleine Moleküle wie Folsäure durch Caveolen in die Zelle gelangen. Den Mechanismus der nicht-endocytischen Aufnahme von Molekülen und gelösten Substanzen bezeichnet man als Potocytose.^[111]

6.5. Rafts und menschliche Krankheiten

Membrandomänen, die Caveolen und Caveolin enthalten, stehen in enger Verbindung mit dem Verlauf von Krankheiten wie Krebs, Atherosklerose, neurodegenerativen Krankheiten und AIDS. Im Folgenden geben wir einen Überblick über diese Zusammenhänge.

6.5.1. Übertragbare spongiforme Enzephalopathien

Prione gehören zu einer Proteinklasse von etwa 35 kDa, die degenerative neurologische Beschwerden (übertragbare spongiforme Enzephalopathien, TSEs) hervorrufen können. Ein PrP-Gen ist eine normale Komponente des Wirt-Genoms, wobei eine Form des Wirt-PrP einen GPI-Anker enthält, mit dem es an Rafts an der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran binden kann.

Der Mechanismus der Übertragung und Pathogenese umfasst die Umwandlung des Wirt-Prion-Proteins PrP in seine „Scrapie-Isoform“ PrP^{Sc}. Diese Umwandlung wird durch verschiedene Faktoren gehemmt, z. B. durch einen sinkenden Gehalt an zelleigenem Cholesterin. Hierbei wird die Bildung von Raft-assoziierten Proteinen gemindert, wodurch auch die Umwandlung von Prion-Proteinen zu PrP^{Sc} verhindert wird. Darüber hinaus verhindert der Ersatz des GPI-Ankers durch ein 62-Aminosäure-Protein (das für den Transport in „coated pits“ codiert) den Transport in PrP-Raft-Domänen. Diese Experimente deuten darauf hin, dass die Umwandlung von PrP zu PrP^{Sc} in Caveolen stattfinden muss.^[112,113]

6.5.2. Krebs

In vielen Arten onkogener Zellen ist die Zahl an Caveolen aufgrund der Abnahme (bis hin zum Verlust) von Caveolin-1 stark vermindert.^[114] Caveolin-1 kommt in den meisten normalen Zellen vor und ist hier entscheidend an der Signalübertragung und der Differenzierung von Zellen^[115] beteiligt. Es wurde außerdem nachgewiesen, dass Caveolin-1 als Suppressor menschlicher Tumore fungiert, da sein Gen in einem Bereich des Genoms gefunden wurde, der bei Krebs oft gelöscht wird. Dies lässt darauf schließen, dass dieser Bereich für die Unterdrückung von Tumoren^[116] eine Rolle spielt, was auch die Verringerung von Caveolin-1 bei der Umwandlung und Wucherung vieler Krebszellarten erklärt.^[117] Sobald Caveolin-1 nicht mehr in ausreichender Menge vorhanden ist, verringert sich die Zahl an Caveolen, wodurch das Zellwachstum unkontrolliert stattfindet,^[114] da eine Vielzahl von zellwachstumsregulierenden Proteinen mit Caveolin-1 wechselwirkt oder in Caveolen lokalisiert ist.^[118]

Multiwirkstoffresistente Krebsarten weisen hingegen einen extrem hohen Gehalt an Caveolin-1 und eine große Zahl an Caveolen auf.^[119,120] Dies könnte durch den Cholesterin-abführenden Effekt^[121] von Caveolin und Caveolen (d. h. den Transport von Cholesterin zur Plasmamembran) erklärt werden, da Cholesterin als integrales Element im Wirkstofftransport und im Wirkstoffausschluss aus intrazellulären Membranen postuliert wird. Folge davon ist letztlich die Entwicklung einer Multiwirkstoffresistenz.

Bis dato veröffentlichte Studien führen zu dem Schluss, dass sich der Gehalt an Caveolin-1 bei Differenzierungen, onkogenen Umwandlungen und Multiwirkstoffresistenzen ändert, was den komplexen Einfluss von Membrandomänen bei Krebs verdeutlicht.

6.5.3. Virologie

Es wurde gezeigt, dass Rafts bei einer Vielzahl von Virusinfektionen, unter anderem bei HIV, eine entscheidende Rolle spielen.^[122] Es gibt klare Hinweise, dass HIV-1 durch Lipid-Rafts^[123,124] in das Membraninnere eindringen kann und dies generell ein Schlüsselvorgang bei Infektion mit Hüllenviren ist. Die Wechselwirkung zwischen dem Virus und der Zelloberfläche setzt die Anlagerung eines Virus-Proteins an einem speziellen Zellrezeptor voraus, wodurch es schließlich zur Fusion und zum Eintrag des Virus in die Zelle kommt. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Art von Wechselwirkung an geordneten Domänen der Zelle stattfindet oder nicht.

Wie schon erwähnt, können bestimmte Transmembranmoleküle in Rafts angereichert oder aus Rafts ausgeschlossen sein. Zum Beispiel kommt das 200-kDa-Protein CD45 in Zellmembranen häufig vor, nicht jedoch in Rafts. Interessanterweise wird CD45 auch von HIV-1 ausgeschlossen, während andere Membranproteine in der HIV-1-Membran angereichert werden.^[125] Dies lässt darauf schließen, dass HIV mit Rafts und nicht mit der umgebenden Zellmembran assoziiert.

Es wurde herausgefunden, dass sich die Membranzusammensetzung vieler Viren von der ihrer Wirtszellen unterscheidet.^[126–130] So ist z. B. die Lipiddoppelschicht von HIV-1 reich an Cholesterin und Sphingolipiden^[123] – wie dies auch bei Rafts der Fall ist. Demnach ist es nicht überraschend, dass bei Verringerung des Cholesteringehalts innerhalb der Wirtszelle die Lipid-Rafts zerstört werden, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der HIV-Produktion kommt.^[131] Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass Viren spezielle Domänen der Wirtszellen verwenden, um den Infektionsprozess einzuleiten.

Am Ebola-Virus konnte demonstriert werden, dass der Virenangriff und der Eintritt in die Zelle über Rafts erfolgt.^[132] Hierzu wurden mit Fluoreszenzmikroskopie Bereiche des Ebola-Virus sichtbar gemacht, die reich an Lipid-Rafts waren (Abbildung 36). Die Resultate eröffnen neue Perspektiven im Kampf gegen die Ausbreitung von Viren durch neue antivirale Methoden.

7. Ausblick

In diesem Aufsatz haben wir einen Überblick über einen neuen Typ von Ordnung innerhalb von Membranen präsentiert. Ausgangspunkt waren konventionelle Lipiddoppel-



Abbildung 36. Clusterbildung innerhalb der Membran des Ebola-Virus, visualisiert im Lichtmikroskop durch Zusatz von Fluoreszenzmarkern. Grün: Raft-Marker, gelb: Gangliosid GM1, rot: virales Glycoprotein. Die Überlagerung der Farben belegt die Assoziation der Virenpartikel mit den Rafts. Mit Genehmigung von Rockefeller University Press aus Lit. [132].

schicht-Modellmembranen, deren Erforschung viele Wissenschaftler über die letzten Jahrzehnte beschäftigt hat. Historisch gesehen begann alles mit einem „einfachen“ Doppelschichtmodell, das aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeleitet war, gefolgt von der Entwicklung der ersten künstlichen Vesikeln durch Kunitake et al.^[133] Damit war die Grundlage für Studien mit neuen physikochemischen Methoden geschaffen, die den Einfluss von Lipidmolekülen auf die Struktur und die Dynamik von Lipiddoppelschichtmembranen (zunächst meist nur eine Lipidkomponente) aufzeigten.

Das komplexe Verhalten von Lipidmischungen in Membranen und die domänenbildende Wechselwirkung von Membranen mit großen Molekülen (Polymeren und Proteinen) war lange Zeit nur postuliert worden. Erst im letzten Jahrzehnt gelang der definitive Nachweis für die Existenz solcher Domänen und die biologisch herausragende Rolle von Rafts in Membranen lebender Zellen. Heute ist bekannt, dass sowohl die hydrophoben Lipidketten als auch die hydrophilen Kopfgruppen zusammen mit verschiedenen Membranproteinen eine entscheidende Rolle in der Clusterbildung von Membranen spielen. Solche Cluster-Effekte können auch mit nichtlipidischen Molekülen (synthetischen Polymeren) erhalten werden.

Anatole France schrieb: „Versuche nicht deine Eitelkeit zu befriedigen, indem du eine Vielzahl von Dingen lehrst ... löse einfach einen Funken aus. Ist reichlich Zunder vorhanden, wird es Feuer fangen“. Autoren von Übersichtartikeln wie diesem sehen sich stets dem Problem ausgesetzt, einerseits jenem weisen Rat Folge zu leisten, andererseits den Leser mit ausreichend „Brennstoff“ zu versorgen, um ein möglichst helles Feuer zu entfachen. Auch wenn Aufsätze oft veröffentlicht werden, wenn der Rahm bereits abgeschöpft ist, so lässt sich dies auf die Domänen- und Raft-Forschung nicht ummünzen. Trotz all der Informationen, die bis dato gesammelt wurden, haben wir erst begonnen, die Chemie und Biologie von Rafts zu begreifen. Zu weiteren Fortschritten in der Biologie wird auch die Chemie ihren Beitrag leisten müssen: bei der Aufklärung von Membranstrukturen, dynamischen Prozessen und Membranfunktionen, bei denen Domänen und Rafts eine Schlüsselrolle spielen. Es zeichnet sich ab, dass ein besseres Verständnis solcher Prozesse neue Perspektiven für die Bekämpfung von viralen Infektionen, Lipidstoffwechselerkrankungen, Krebs und anderen hartnäckigen Krankheiten liefern wird.

W.B. dankt dem österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF 14844 CHE und FWF 13294 CHE) sowie der österreichischen Nationalbank (OenB 7702) für finanzielle Unterstützung. Die Autoren danken Christian Kluger für die ausgezeichnete Übersetzung des Manuskripts. Spezieller Dank gebührt Prof. H. Gruber für das Korrekturlesen des Manuskripts. F.M.M. dankt den National Institutes of Health (NIH).

Eingegangen am 18. Februar 2003 [A586]

- [1] R. G. W. Anderson, K. Jacobson, *Science* **2002**, 296, 1821 – 1825.
- [2] R. R. C. New, *Liposomes, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1990**.

- [3] G. van Meer, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 29–33.
- [4] K. Simons, J. Gruenberg, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 459–462.
- [5] K. Simons, E. Ikonen, *Science* **2000**, *290*, 1721–1726.
- [6] K. Jacobson, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **1975**, *14*, 152–161.
- [7] W. Hartmann, H.-J. Galla, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *509*, 474–490.
- [8] E. J. Shimshick, H. M. McConnell, *Biochemistry* **1973**, *12*, 2351–2360.
- [9] D. A. Wilkinson, J. F. Nagle, *Biochemistry* **1979**, *18*, 4244–4249.
- [10] R. M. Epand, S. Maekawa, C. M. Yip, R. F. Epand, *Biochemistry* **2001**, *40*, 10514–10521.
- [11] M. Uragami, N. Tokutake, X. Yan, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5124–5125.
- [12] L. J. Pike, X. Han, K.-N. Chung, R. W. Gross, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2075–2088.
- [13] T.-Y. Wang, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 919–933.
- [14] a) P. Dynarowicz-Latka, A. Dhanabalan, O. N. Oliveira, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *91*, 221–293; b) M. Ross, C. Steinem, H.-J. Galla, A. Janshoff, *Langmuir* **2001**, *17*, 2437–2445.
- [15] a) M. D. Houslay, K. K. Stanley, *Dynamics of Biological Membranes*, Wiley, New York, **1982**, S. 1–92; b) W.-G. Wu, L.-M. Chi, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4683–4685.
- [16] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, *297*, 967–973.
- [17] a) X.-M. Li, J. M. Smaby, M. M. Momen, H. L. Brockman, R. E. Brown, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1921–1931; b) J. M. Holopainen, J. Y. A. Lehtonen, P. K. J. Kinnunen, *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *88*, 1–13.
- [18] a) D. E. Wolf, *Curr. Top. Membr.* **1994**, *40*, 143–165; b) R. Welt, M. Glaser, *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *73*, 121–137.
- [19] W. Knoll, G. Schmidt, H. Rötzer, T. Henkel, W. Pfeiffer, E. Sackmann, S. Mittler-Neher, J. Spinke, *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 363–374.
- [20] a) J. R. Silvius, D. del Giudice, M. Lafleur, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15198–15208; b) S. N. Ahmed, D. A. Brown, E. London, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10944–10953.
- [21] J. T. Mason, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4421–4429.
- [22] J. T. Kim, J. Mattai, G. G. Shipley, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6599–6603.
- [23] J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *857*, 217–228.
- [24] J. M. Holopainen, H. L. Brockman, R. E. Brown, P. K. J. Kinnunen, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 765–775.
- [25] D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 365–379.
- [26] M. Gardam, J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *980*, 319–325.
- [27] M. Masserini, D. Ravasi, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1532*, 149–161.
- [28] R. E. Brown, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1–9.
- [29] H. B. Sankaram, T. E. Thompson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8686–8690.
- [30] J. H. Smaby, H. L. Brockman, R. E. Brown, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9135–9142.
- [31] B. Ramstedt, J. P. Slotte, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 908–915.
- [32] Y.-H. Hao, J.-W. Chen, *J. Membr. Biol.* **2001**, *183*, 85–92.
- [33] J. Korch, P. Schuille, W. W. Webb, G. W. Feigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8461–8466.
- [34] X. Xu, R. Bittman, G. Duportail, D. Heissler, C. Vilcheze, E. London, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33540–33546.
- [35] a) W. Knoll, G. Schmidt, H. Rötzer, T. Henkel, W. Pfeiffer, E. Sackmann, S. Mittler-Neher, J. Spinke, *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 363–374; b) J. R. Silvius, J. Gagne, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3241–3247; c) C. P. S. Tilcock, M. B. Bally, S. B. Farren, P. R. Culis, S. M. Gruner, *Biochemistry* **1984**, *23*, 2696–2703.
- [36] J. Bolard, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *864*, 257–304.
- [37] J. Miñones, Jr., J. Miñones, O. Conde, J. M. Rodriguez Patino, P. Dynarowicz-Latka, *Langmuir* **2002**, *18*, 2817–2827.
- [38] M. Roux, R. Auzely-Velty, F. Djedaini-Pilard, B. Perly, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 813–822.
- [39] S. Morein, J. A. Kilian, M. M. Sperotto, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1405–1417.
- [40] a) T.-Y. Wang, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13031–13040; b) J. B. McCabe, L. G. Berthiaume, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3601–3617.
- [41] a) D. A. Zacharias, J. D. Violin, A. C. Newton, R. Y. Tsien, *Science* **2002**, *296*, 913–916; b) D. Shigematsu, M. Matsutani, T. Furuya, T. Kiyota, S. Lee, G. Sugihara, S. Yamashita, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 271–280.
- [42] D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 365–379.
- [43] J. Marx, *Science* **2001**, *294*, 1862–1865.
- [44] M. Edidin, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 492–496.
- [45] a) D. A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221–17224; b) G. van Meer, *Science* **2002**, *296*, 855–857.
- [46] C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1417–1428.
- [47] a) P. E. Milhiet, M.-C. Giocondi, C. Le Grimallec, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 875–878; b) A. S. Muresan, H. Diamant, K. Y. C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6951–6952; c) C. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, L. J. Johnston, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2526–2535; d) C. Le Grimallec, M.-C. Giocondi, R. Pujol, E. Lesniewska, *Single Mol.* **2000**, *1*, 105–107; e) S. Kumar, J. H. Hoh, *Traffic* **2001**, *2*, 746–756; f) E. Sparr, K. Ekelund, J. Engblom, S. Engström, H. Wennerström, *Langmuir* **1999**, *15*, 6950–6955.
- [48] a) P. E. Milhiet, C. Domec, M.-C. Giocondi, N. V. Mau, F. Heitz, C. Le Grimallec, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 547–555; b) M.-C. Giocondi, L. Pacheco, P. E. Milhiet, C. Le Grimallec, *Ultramicroscopy* **2001**, *86*, 151–157; c) P. E. Milhiet, V. Vie, M.-C. Giocondi, C. Le Grimallec, *Single Mol.* **2001**, *2*, 109–112.
- [49] H. A. Rinia, M. M. E. Snel, J. P. J. M. van der Eerden, B. de Kruijff, *FEBS Lett.* **2001**, *501*, 92–96.
- [50] a) M. Menke, S. Künneke, A. Janshoff, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 317–322; b) C. Yuan, L. J. Johnston, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2768–2781.
- [51] V. Vie, N. Van Mau, E. Lesniewska, J. P. Goudonnet, F. Heitz, C. Le Grimallec, *Langmuir* **1998**, *14*, 4574–4583.
- [52] a) J. Majewski, T. L. Kuhl, G. S. Smith, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2707–2715; b) M. Gandhavadi, D. Allende, A. Vidal, S. A. Simon, T. J. McIntosh, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1469–1482.
- [53] a) C. Dietrich, B. Yang, T. Fujawara, A. Kusumi, K. Jacobson, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 274–284; b) A. Pralle, P. Keller, E.-L. Florin, K. Simons, J. K. H. Hörber, *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 997–1007.
- [54] a) L. A. Bagatolli, E. Gratton, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 434–447; b) C. Dietrich, Z. N. Volovyk, M. Levi, N. L. Thompson, K. Jacobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10642–10647; c) A. V. Samsonov, I. Mihalyov, F. S. Cohen, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1486–1500.
- [55] M. Ross, C. Steinem, H.-J. Galla, A. Janshoff, *Langmuir* **2001**, *17*, 2437–2445.
- [56] R. G. W. Anderson, K. Jacobson, *Science* **2002**, *296*, 1821–1825.
- [57] M.-C. Giocondi, V. Vie, E. Lesniewska, P.-E. Milhiet, M. Zinke-Allmang, C. Le Grimallec, *Langmuir* **2001**, *17*, 1653–1659.
- [58] a) B. A. Armitage, D. E. Bennett, H. G. Lamparski, D. F. O'Brien, *Adv. Polym. Sci.* **1996**, *126*, 54–84; b) C. G. Clark, K. L. Wooley, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 122–129; c) H. Ringsdorf, B. Schlär, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117–162; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113–158.
- [59] S. Förster, M. Zisenis, E. Wenz, M. Antonietti, *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 9956–9970.

- [60] Z. Tuzar, P. Kratochvil, *Surf. Colloid Sci.* **1993**, 15.
- [61] P. Alexandridis, R. J. Spontak, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, 4, 130–139.
- [62] S. Förster, T. Plantenberg, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 712–739; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 688–714.
- [63] C. Ladaviere, C. Tribet, S. Cribier, *Langmuir* **2002**, 18, 7320–7326.
- [64] a) A. A. Yaroslavov, O. Yu. Udalykh, N. S. Melik-Nubarov, V. A. Kabanov, Yu. A. Ermakov, V. Azov, F. M. Menger, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 4835–4843; b) V. A. Kabanov, A. A. Yaroslavov, *J. Controlled Release* **2002**, 78, 267–271.
- [65] a) D. D. Lasic, D. Needham, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2601–2628; b) H. E. Warriner, S. L. Keller, S. H. J. Idziak, N. L. Slack, P. Davidson, J. A. Zsadzinski, C. R. Safinya, *Biophys. J.* **1998**, 75, 272–293.
- [66] N. L. Slack, P. Davidson, M. A. Chibbaro, C. Jeppesen, P. Eiselt, H. E. Warriner, H.-W. Schmidt, P. Pincus, C. R. Safinya, *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 6252–6257.
- [67] J. Simon, M. Kühner, H. Ringsdorf, E. Sackmann, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, 76, 241–258.
- [68] a) I. Tsafirir, S. Sagi, T. Arzi, M.-A. Guedeau-Boudeville, V. Frette, D. Kandel, J. Stavans, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 86, 1138–1141; b) J. Stavans, *Phys. A* **2002**, 306, 368–375.
- [69] D. H. W. Hubert, M. Jung, A. L. German, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 1291–1294.
- [70] a) W. Meier, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, 4, 6–14; b) J. Hotz, W. Meier, *Langmuir* **1998**, 14, 1031–1036; c) J. D. Morga, C. A. Johnson, E. W. Kahler, *Langmuir* **1997**, 13, 6447–6451.
- [71] M. Jung, B. H. Robinson, D. C. Steytler, A. L. German, R. K. Heenan, *Langmuir* **2002**, 18, 2873–2879.
- [72] a) M. Jung, D. H. W. Hubert, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, J. Meuldijk, A. M. van Herk, H. Fischer, A. L. German, *Langmuir* **1997**, 13, 6877–6880.
- [73] M. P. Krafft, L. Schieldknecht, P. Marie, F. Giuleri, M. Schmutz, N. Poulain, E. Nakache, *Langmuir* **2001**, 17, 2872–2877.
- [74] B. J. Ravoo, W. D. Weringa, J. B. F. N. Engberts, *Langmuir* **1996**, 12, 5773–5780.
- [75] a) B. M. Discher, Y.-Y. Won, D. S. Ege, J. C.-M. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, D. Hammer, *Science* **1999**, 284, 1143–1146; b) C. Nardin, T. Hirt, J. Leukel, W. Meier, *Langmuir* **2000**, 16, 1035–1041; c) B. M. Discher, H. Bermudez, D. A. Hammer, D. E. Discher, Y.-Y. Won, F. S. Bates, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2848–2854.
- [76] a) B. M. Discher, D. A. Hammer, F. S. Bates, D. E. Discher, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, 5, 125–131; b) D. A. Hammer, D. E. Discher, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2001**, 31, 387–404.
- [77] a) A. Eisenberg, H. Shen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3448–3450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3310–3312; b) K. Yu, C. Bartels, A. Eisenberg, *Macromolecules* **1998**, 31, 9399–9402; c) L. Luo, A. Eisenberg, *Langmuir* **2001**, 17, 6804–6811.
- [78] A. Eisenberg, L. Luo, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1043–1046; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1001–1004.
- [79] S. Mukherjee, F. R. Maxfield, *Traffic* **2000**, 1, 203–211.
- [80] E. London, D. A. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1508, 182–195.
- [81] W. G. Carter, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 6953–6960.
- [82] D. A. Brown, E. London, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, 14, 111–136.
- [83] R. G. Parton, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, 8, 542–548.
- [84] G. E. Palade, *J. Appl. Phys.* **1953**, 24, 1424.
- [85] E. Yamada, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1955**, 1, 445–458.
- [86] K. G. Rothberg, J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, R. G. Anderson, *Cell* **1992**, 68, 673–682.
- [87] E. J. Smart, G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto, M. P. Lisanti, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 7289–7304.
- [88] R. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 199–225.
- [89] S. Matveev, X. Li, W. Everson, E. J. Smart, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 49, 237–250.
- [90] J. A. Engelman, X. Zhang, F. Galbiati, D. Volonté, F. Sotgia, R. G. Pestell, C. Minetti, P. E. Scherer, T. Okamoto, M. P. Lisanti, *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, 63, 1578–1587.
- [91] M. Way, R. G. Parton, *FEBS Lett.* **1996**, 378, 108–112.
- [92] T. V. Kurzchalia, P. Dupree, R. G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, K. Simons, *J. Cell Biol.* **1992**, 118, 1003–1014.
- [93] M. Murata, J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 10339–10343.
- [94] S. Monier, R. G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske, T. V. Kurzchalia, *Mol. Biol. Cell* **1995**, 6, 911–927.
- [95] M. Sargiacomo, P. E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K. S. Song, M. C. Sanders, M. P. Lisanti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9407–9411.
- [96] S. Monier, D. J. Dietzen, W. R. Hastings, D. M. Lublin, T. V. Kurzchalia, *FEBS Lett.* **1996**, 388, 143–149.
- [97] S. Li, K. S. Song, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 568–573.
- [98] S. Li, K. S. Song, S. S. Koh, A. Kikuchi, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 28647–28654.
- [99] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569–572.
- [100] A. M. Fra, M. Masserini, P. Palestini, S. Sonnino, K. Simons, *FEBS Lett.* **1995**, 375, 11–14.
- [101] W. J. Chang, K. G. Rothberg, R. G. W. Anderson, *J. Cell Biol.* **1992**, 118, 63–69.
- [102] K. G. Rothberg, Y.-S. Ying, B. A. Kamen, R. G. W. Anderson, *J. Cell Biol.* **1990**, 111, 2931–2938.
- [103] E. Smart, Y.-S. Ying, P. Conrad, R. G. W. Anderson, *J. Cell Biol.* **1994**, 127, 1185–1198.
- [104] A. M. Fra, E. Williamson, K. Simons, R. G. Parton, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 30745–30748.
- [105] K. A. Melkonian, A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, D. A. Brown, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 3910–3917.
- [106] P. Scheiffele, M. G. Roth, K. Simons, *EMBO J.* **1997**, 16, 5501–5508.
- [107] A. A. Wolf, M. G. Jobling, S. Wimer-Mackin, M. Ferguson-Maltzman, J. L. Madara, R. K. Holmes, W. I. Lencer, *J. Cell Biol.* **1998**, 141, 917–927.
- [108] H. A. Anderson, Y. Chen, L. C. Norkin, *Mol. Biol. Cell* **1996**, 11, 1825–1834.
- [109] J. E. Schnitzer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 49, 265–280.
- [110] J. R. Henley, E. W. Krueger, B. J. Oswald, M. A. McNiven, *J. Cell Biol.* **1998**, 141, 85–99.
- [111] R. G. W. Anderson, B. A. Kamen, K. G. Rothberg, S. W. Lacey, *Science* **1992**, 255, 410–411.
- [112] K. Kaneko, M. Vey, M. Scott, S. Pilkuhn, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2333–2338.
- [113] A. Taraboulos, M. Scott, A. Semenov, D. Avraham, L. Laszlo, S. B. Prusiner, *J. Cell Biol.* **1995**, 129, 121–132.
- [114] A. J. Koleske, D. Baltimore, M. P. Lisanti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 1381–1385.
- [115] D. Volonte, F. Gabialti, M. P. Lisanti, *FEBS Lett.* **1999**, 445, 431–439.
- [116] R. Sager, S. Sheng, A. Anisowicz, G. Sotiropoulou, Z. Zou, G. Stenmann, K. Swisshelm, Z. Chen, M. J. Hendrix, P. Pemberton, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1994**, 59, 537–546.
- [117] L. Campbell, M. Gumbleton, K. Ritchie, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 49, 325–372.
- [118] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5419–5422.

- [119] Y. Lavie, G. Fiucci, M. Liscovitch, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32380–32383.
- [120] C.-P. H. Yang, F. Galbiati, D. Volonte, S. B. Horwitz, M. P. Lisanti, *FEBS Lett.* **1998**, 439, 368–372.
- [121] C. J. Fielding, P. E. Fielding, *J. Lipid Res.* **1997**, 38, 1503–1521.
- [122] Neuere Übersicht: J. Raulin, *Prog. Lipid Res.* **2002**, 41, 27–65.
- [123] R. C. Aloia, H. Tian, F. C. Jensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5181–5185.
- [124] D. H. Nguyen, J. E. K. Hildreth, *J. Virol.* **2000**, 74, 3264–3272.
- [125] R. J. Orentas, J. E. K. Hildreth, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1993**, 9, 1157–1165.
- [126] J. J. McSharry, R. R. Wagner, *J. Virol.* **1971**, 7, 59–70.
- [127] O. Renkonen, L. Kaarainen, K. Simons, C. G. Gahmberg, *Virology* **1971**, 46, 318–326.
- [128] J. P. Quigley, D. B. Rifkin, E. Reich, *Virology* **1972**, 50, 550–557.
- [129] J. E. Pessin, M. Glaser, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 9044–9050.
- [130] B. N. Slosberg, R. C. Montelaro, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 689, 393–402.
- [131] A. Ono, E. O. Freed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 13925–13930.
- [132] S. Bavari, C. N. Bosio, E. Wiegand, G. Ruthel, W. Gordon, B. Amy, T. W. Geisbert, M. Hevey, C. Schmaljohn, A. Schmaljohn, J. M. Aman, *J. Exp. Med.* **2002**, 195, 593–692.
- [133] a) T. Kunitake, *J. Macromol. Sci. Chem.* **1979**, 13, 587–595; b) Y. Okahata, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5231–5232; c) T. Kunitake, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 692–710; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 709–726.