

Untersuchungen über die Größe, Struktur und Dynamik von Gallensäure/Lecithin-Mischmicellen

Size, Structure, and Dynamics of Bile Salt/Lecithin Mixed Micelles

Ch. Gähwiler, C. von Planta, D. Schmidt und H. Steffen
Zentrale Forschungseinheiten F. Hoffman-La Roche A.G. Basel

(Z. Naturforsch. **32 c**, 748—755 [1977]; eingegangen am 8. Juni 1977)

Herrn Professor Dr. Walter Boguth zum 60. Geburtstag gewidmet

Laser Light Scattering, Spin Labels, Fluorescent Labels, Lecithin/Glycocholic Acid Mixed Micelles

The structure and size of lecithin/sodium glycocholate mixed micelles was investigated by quasi-elastic laser light scattering and spin label techniques.

The investigations are in accordance with a bilayer model for these micelles. The order parameter and the phase transition enthalpy of the micellar bilayer were determined.

The lateral and rotational diffusion constants of label molecules are compared with the corresponding diffusion constants in liposomes.

Einleitung

Lecithin/Wasser-Gemische bilden bei hohem Wassergehalt Vesikeln von einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten, während Gallensäuren in Wasser durch Aneinanderlagern apolarer Molekülstellen Micellen bilden (Small¹).

Im Phasendiagramm des Systems Wasser/Lecithin/Gallensäure gibt es einen Bereich, in dem Gallensäure-Lecithin-Mischmicellen vorliegen, welche eine optisch isotrope und klar durchsichtige Phase bilden. Diese Mischmicellen spielen in der Biologie

eine wichtige Rolle bei der Solubilisierung und Resorption von fettlöslichen Substanzen (Benzonana²).

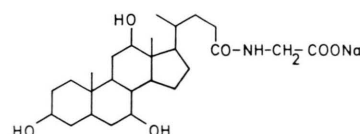
Für die Struktur der Mischmicellen wurde ein Modell vorgeschlagen (Small¹), nach dem die Micelle aus einem Stück Lecithin-Doppelschicht besteht, dessen hydrophobe Seitenwand durch die hydrophoben Stellen der Gallensäuremoleküle abgedeckt ist (s. Abb. 1). Die hydrophilen Stellen der Gallensäuremoleküle sind nach außen in die wässrige Phase gerichtet.

Wir haben untersucht, ob diese Vorstellung in Übereinstimmung ist mit den Ergebnissen von Streulicht- und Spinlabel ESR-Messungen. Außerdem wurde die Beweglichkeit von Lipidmolekülen in dieser Phase mit Hilfe von Spin- und Fluoreszenzlabels bestimmt.

Materialien und Methodik

Als Materialien wurden Na-Glycocholat (NaGC, I) von Calbiochem und Eilecithin (hergestellt nach der Methode von Singleton³) verwendet.

I



Die Herstellung der micellaren Phase erfolgte nach folgender Methode:

Stammlösungen der Gallensäure und des Lecithins in Methanol wurden in entsprechenden Mengen gemischt. Durch Verdunsten des Lösungsmittels mit Hilfe eines N₂-Stromes wurde aus dem Gemisch an der Wand eines Reagenzglases ein dünner Film

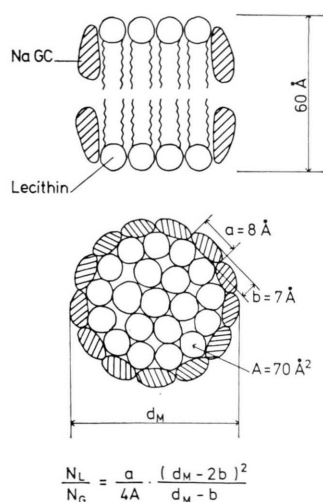


Abb. 1. Modell einer Lecithin-Gallensäure-Mischmicelle nach Small¹. Die Gleichung gibt das Molverhältnis N_L/N_G Lecithin/NaGC als Funktion des Zylinderdurchmessers d_M und die Molekülparameter a , b , A .

Sonderdruckanforderungen an Dr. C. von Planta, c/o F. Hoffman-La Roche & Co., CH-4002 Basel.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

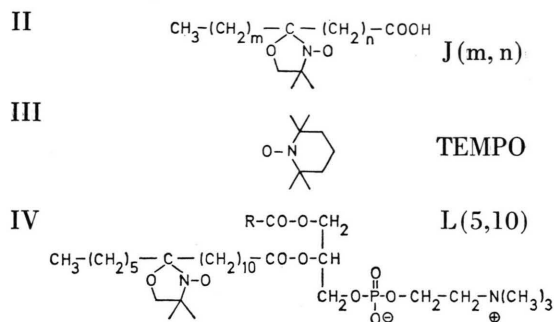
This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

erzeugt. Dieser Film wurde dann in Pufferlösung (normalerweise 150 mM NaCl und 10 mM Na₂HPO₄, pH 8,5) aufgelöst.

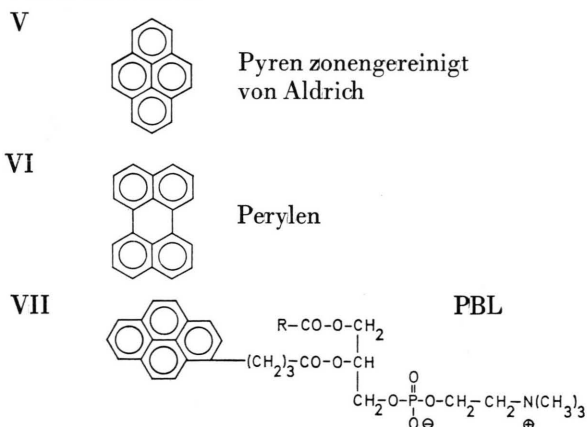
Die für Vergleichszwecke verwendeten Liposomen wurden nach der Methode von Bangham⁴ hergestellt.

Folgende Spinlabel (Gaffney⁵) wurden für die ESR-Messungen verwendet:



RCO ≡ Acylrest von Eilecithin

Für die Fluoreszenzmessungen wurden folgende Label verwendet:



Die Label L(5,10) und PBL wurden aus Ei-Lyso-Lecithin mit den entsprechenden Fettsäuren synthetisiert (Boss⁶).

Zur Dotierung der Micellen mit Labeln wurden die entsprechenden Lipid- und NaGC-Methanol-Stammlösungen mit der Methanol-Stammlösung des Labels vermischt und daraus der Film hergestellt.

Zur Messung der quasielastischen Lichtstreuung (Benedek⁷) wurde ein 96-Kanal Photonenkorrelator (Chen⁸), ein He-Ne Laser (Spectra Physics 125A) als Lichtquelle und ein ITT F-130 Photomultiplier als Detektor verwendet. Zur Entfernung von Staubpartikeln wurden die Probenröhrchen vor der Messung 30 Minuten lang zentrifugiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit einem angekoppelten HP-9810 Tischrechner.

Die Spinlabeluntersuchungen erfolgten mit einem Varian X-Band E9 Spektrometer, die Fluoreszenzmessungen mit einem Perkin Elmer MPF-2A Fluoreszenzspektrophotometer mit Polarisationszusatz. Die Fluoreszenz-Meßproben wurden mit 99,999% Stickstoff, der zusätzlich durch Oxisorb (Messer, Griesheim, Düsseldorf) gereinigt wurde, begast. Die Fluoreszenzabklingzeitmessungen wurden mit einer gepulsten N₂-Entladung bei 2,8 atü und 9000 V durchgeführt. Die Photomultipliersignale wurden mit einem Sampling Oszillograph Tektronix 564B/3S1/3T77A abgetastet und in einem HP Time Averaging Computer 5480/5486B/5488A gemittelt.

Die thermoanalytischen Messungen wurden mit einem Mettler TA 2000 Thermoanalysensystem durchgeführt.

3. Experimentelle Ergebnisse

3.1. Größe und Struktur der Mischmicellen

a) Größenmessung mittels quasielastischer Lichtstreuung

Infolge der Brownschen Bewegung der Micellen fluktuiert die Intensität des gestreuten Laserlichts. Die Autokorrelationsfunktion dieser zeitlichen Schwankungen, welche mit dem Photonenkorrelator gemessen wird, hat einen exponentiellen Verlauf mit einer Abklingzeitkonstante $\tau_e = 1/2 D_z K^2$, wobei D_z die Diffusionskonstante der Micellen ist und K die Amplitude des Streuvektors. Mit Hilfe der Stokes-Einsteinschen Beziehung

$$D_z = k T / 3 \pi \eta d_H$$

läßt sich der hydrodynamische Durchmesser d_H der Teilchen berechnen (k = Boltzmann-Konstante, T = absolute Temperatur, η = Viskosität). Im Falle von sphärischen Teilchen⁹ übersteigt d_H den Teilchendurchmesser um die doppelte Dicke der Solvationsschicht (ca. 5 – 10 Å). Sind die Teilchen nicht alle gleich groß, so ist die Autokorrelationsfunktion eine Überlagerung von verschiedenen Exponentialfunktionen. Mit der Kumulantenmethode (Koppel¹⁰) läßt sich in diesem Fall eine mittlere Abklingzeitkonstante $\bar{\tau}_e$ und die Varianz V der Verteilung bestimmen. $\bar{\tau}_e$ entspricht dem z-Mittelwert D_z der Diffusionskonstanten und V ist ein Maß für die Polydispersität der Teilchen (Pusey¹¹). Wir haben die Auswertung der gemessenen Autokorrelationsfunktionen stets nach diesem Verfahren durchgeführt.

Abb. 2 zeigt die mittlere Größe von Lecithin-NaGC-Mischmicellen, welche an 4 verschiedenen Reihen von micellaren Lösungen gemessen wurde.

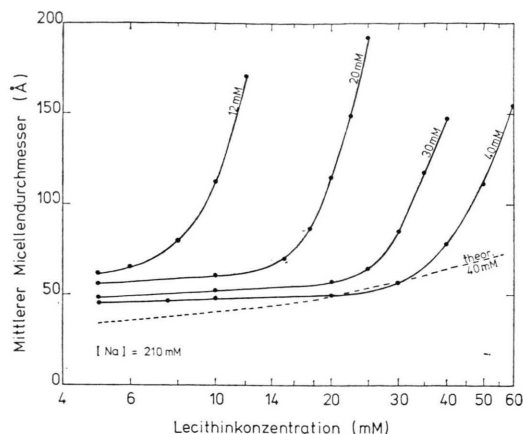


Abb. 2. Mittlerer Micellendurchmesser von Lecithin/NaGC-Mischmicellen als Funktion der Lecithinkonzentration für vier verschiedene NaGC-Konzentrationen (12, 20, 30 resp. 40 mM). Die gesamte Na-Ionen-Konzentration beträgt bei allen Proben 210 mM (pH 8,5).

Die NaGC-Konzentration wurde jeweils innerhalb einer Reihe konstant gehalten (12, 20, 30 oder 40 mM) und die Menge Eilecithin variiert. Alle Lösungen waren vollkommen klar. Die Na-Ionenkonzentration war für alle Proben die gleiche, 210 mM. Die micellare Größe hängt auch von der Ionenstärke der wässrigen Phase ab, wie in Abb. 3 für drei verschiedene Zusammensetzungen (Lecithin/NaGC = 40 mM/40 mM, resp. 40/20 und 23/20) als Funktion der NaCl-Konzentration gezeigt wird.

Erwartungsgemäß nimmt die Größe der Mischmicellen mit der Menge an solubilisiertem Lecithin zu. Diese Größenzunahme ist bis zu einem Lecithin/NaGC-Verhältnis von ca. 0,7 gering. In diesem Be-

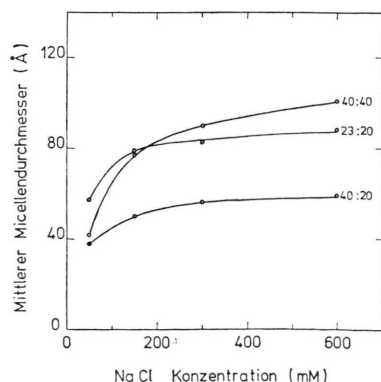


Abb. 3. Mittlerer Micellendurchmesser von drei verschiedenen Lecithin/NaGC-Mischmicellen (23 mM : 20 mM; 40 mM : 20 mM und 40 mM : 40 mM) als Funktion von der NaCl-Konzentration (zusätzlich 10 mM Phosphatpuffer pH 8,5).

reich stimmen die experimentellen und die anhand des Mischmicellenmodells (Abb. 1) für die gleiche NaGC-Konzentration nach dem Modell von Small¹ theoretisch berechneten Größen¹² gut überein (gestrichelte Kurve auf Abb. 2 für [NaGC] = 40 mM). Es wurde angenommen, daß die NaGC-Konzentration in der intermicellaren Phase vernachlässigbar ist. In Wirklichkeit nimmt die Konzentration der freien Gallensäure mit sinkendem Lecithingehalt stark zu, sie kann bis zur Hälfte der gesamten Gallensäurekonzentration ausmachen (Shankland¹³). Folglich ist das Lecithin/NaGC-Verhältnis in den Mischmicellen bei kleinem Lecithingehalt wesentlich größer als das gesamte Verhältnis, was die größere Steigung der theoretischen gegenüber der experimentellen Kurve erklären würde. In diesem Bereich nimmt die gestreute Lichtintensität linear mit der Lecithin-Konzentration zu, was vor allem auf die proportionale Zunahme der Anzahl Mischmicellen und nicht auf deren Vergrößerung zurückzuführen ist¹⁴. Man kann daraus schließen, daß das Lecithin/NaGC-Verhältnis in den Mischmicellen einen kritischen Wert $\sim 0,5 - 0,6$ (einer Aggregationszahl von 35 – 40 Molekülen pro Micelle entsprechend) nicht unterschreitet.

Wenn das Lecithin/NaGC-Verhältnis größer als 0,7 wird, nimmt die Größe der Mischmicellen stark zu. Sie erreicht einen maximalen Wert von ca. 200 Å, wenn fast doppelt so viel Lecithin wie NaGC vorhanden ist. Lösungen mit noch höherem Lecithin/NaGC-Wert sind trüb, was auf das Vorhandensein einer unsolubilisierten Lecithinphase hindeutet. Diese Phase läßt sich durch Zentrifugation (6000 $\times g$) absedimentieren. Im klaren Überstand sind gesättigte Mischmicellen vorhanden, deren Größe praktisch unabhängig von der überschüssigen Lecithinmenge ist. Ein maximales Lecithin/NaGC-Molverhältnis von zwei ist aus dem Phasendiagramm des ternären Systems, Lecithin-Natriumcholat-Wasser, bekannt (Small *et al.*¹⁵).

Im Bereich hoher Lecithin/NaGC-Verhältnisse ist die Größenzunahme der Mischmicellen nicht mehr auf eine Vergrößerung des Lecithinkerns der Mischmicellen allein zurückzuführen (Abb. 1), sondern auf eine Aggregation von einzelnen Micellen zu größeren Sekundärmicellen. Diese Sekundärmicellen sind, wie die einfachen Mischmicellen, im thermodynamischen Gleichgewicht, d. h. ihre Größe hängt nicht von der Herstellungsart der Micellenlösungen ab.

Es zeigt sich, daß die Sekundärmicellen stark polydispers sind. Die Varianz, die aus der Abweichung der Autokorrelationsfunktion von der Exponentialform berechnet wird und für kleine Lecithin/NaGC-Verhältnisse innerhalb der Meßgenauigkeit null ist, erreicht bei einer 40 mM : 40 mM Lecithin/NaGC-Lösung den Wert $0,15 \pm 0,05$ ¹⁶. Wie aus einer Simulationsrechnung der Autokorrelationsfunktion hervorgeht, kann ein solch hoher Wert im Falle einer Lösung polydisperser, sphärischer Micellen mit Gauss-verteilten Molgewichten nicht erreicht werden. Folglich kann die Struktur der Sekundärmicellen nicht globulär sein; vermutlich ist sie länglich, weil dann die Diffusionskonstante am stärksten vom Molgewicht bzw. der Aggregationszahl der Micellen abhängt.

b) Spinlabel-Untersuchung

Abb. 4 gibt die ESR-Spektren von Mischmicellen verschiedener Zusammensetzungen wieder, die mit dem Spinlabel J(13,2) (II) dotiert sind. Die Spek-

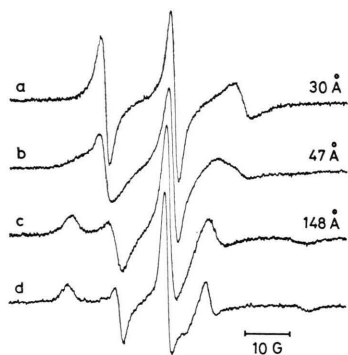


Abb. 4. EPR-Spektrum des Labels J (13,2) (10^{-4} M) in: a) Micellen (40 mM NaGC) mit Durchmesser 30 Å; b) Mischmicellen (40 mM NaGC/10 mM Eilecithin) mit Durchmesser 47 Å; c) Mischmicellen (40 mM NaGC/60 mM Eilecithin) Durchmesser 148 Å; d) Liposom aus Eilecithin (60 mM).

tren hängen wegen der Anisotropie des g -Faktors und der Hyperfeinkopplungskonstanten in komplizierter Weise von der Rotations-Bewegung des Labels in der Micelle und derjenigen der Micelle selbst ab (Hubbell¹⁷). Auf die ESR-Spektren des Labels hat die Rotations-Bewegung der Micellen sicher keinen Einfluß mehr, wenn die Rotationskorrelationszeit $\geq 10^{-7}$ s ist, d. h. bei Micellendurchmessern von mehr als 100 Å. Kurve 4 a) zeigt das Spektrum des Labels in NaGC-Micellen ohne Lecithin. Dieses Spektrum läßt auf eine rasche isotrope Bewegung des Labels schließen. Auswertung der

Linienbreite nach der Methode von Sinensky¹⁸ ergibt eine Rotationskorrelationszeit, aus der man, unter der Annahme eines fest in den Micellen verankerten Labels, einen hydrodynamischen Micell-Durchmesser bestimmen kann. Dieser beträgt etwa 25 Å. Dieser Wert stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit dem mittels Lichtstreuung gemessenen überein. Mit zunehmender Lecithinkonzentration nimmt die Linienbreite zu, d. h. die Micellen rotieren langsamer. In der Kurve 4 c) stellt man eine Aufspaltung der beiden äußeren Linien fest. Diese läßt sich mit einer raschen anisotropen Bewegung des Labels in einem Doppelschichtgebiet der Micelle erklären. Zum Vergleich ist deshalb in 4 d) auch noch das Spektrum des Labels J(13,2) in Lecithin-Liposomen dargestellt. Bei ähnlicher Aufspaltung weisen die Linien im Micellspektrum 4 c) deutlich größere Linienbreiten auf als die Linien des Liposomenspektrums. Man muß deshalb in der Doppelschichtregion der Micelle eine im Vergleich zur Doppelschicht eines Liposoms verlangsamte anisotrope Rotation um eine Achse senkrecht zur Doppelschichtebene annehmen.

Ähnlich wie bei Liposomen aus Eilecithin kann man auch bei den Mischmicellen aus NaGC und Eilecithin nach der Methode von Hubbell¹⁷ einen Ordnungsgrad $S = (T_{||} - T_{\perp}) / (T_{zz} - T_{xx})$ bestimmen.

$2T_{||}$ und $2T_{\perp}$ entsprechen hierbei dem Abstand der beiden äußersten bzw. innersten Extremwerte im Spektrum von J(m,n), während $T_{zz} = 30,8$ G und $T_{xx} = 5,8$ G die Komponenten des Hyperfeinkopplungstensors sind (Seelig¹⁹).

Mit den Labels J(13,2) und J(11,4), die den polaren Teil der Doppelschicht charakterisieren, findet man in den Mischmicellen (40 mM NaGC und 60 mM Eilecithin) einen gegenüber Liposomen etwas verringerten Ordnungsgrad (Seelig¹⁹). Mit dem Label J(9,6) ist dagegen praktisch kein Unterschied im Ordnungsgrad mehr feststellbar zwischen Mischmicellen und Liposomen (siehe Abb. 5). Die Abnahme des Ordnungsgrades mit zunehmender Temperatur und zunehmendem n ist für die verschiedenen Label J(m,n) ähnlich wie bei Liposomen aus Eilecithin.

Falls in den Mischmicellen Lecithin-Doppelschichten vorliegen, so sollten diese ähnlich wie in Liposomen bei einer bestimmten Temperatur T_c eine Phasenumwandlung von der kristallinen in die flüssigkristalline Phase zeigen.

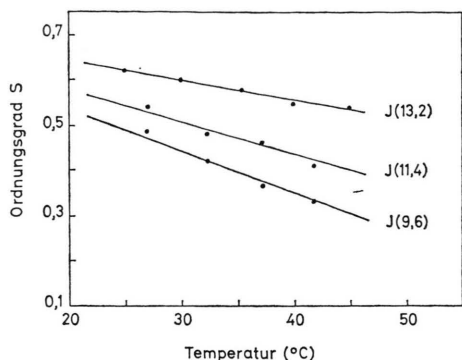


Abb. 5. Ordnungsgrad S in Mischmicellen (40 mM NaGC/60 mM Eilecithin) in Abhängigkeit von der Temperatur, Konzentration an Label $J(m, n)$ war 10^{-4} M.

In wässrigen Lecithindispersionen kann man die Phasenumwandlung mit Hilfe eines von Shimshick und McConnell²⁰ entwickelten Verfahrens bestimmen. Dabei mißt man die Verteilung des Spinlabels TEMPO(II) zwischen der Lipid- und der Wasserphase über den Löslichkeitsparameter $f = ([\text{TEMPO}] \text{ im Lipid}) / ([\text{TEMPO}] \text{ in Lipid und Wasser})$. Auf diese Art findet man in Dimyristoyllecithin (DML) Dispersionen $T_c = 23^\circ\text{C}$, in Dipalmitoyllecithin (DPL) Dispersionen $T_c = 41^\circ\text{C}$ und in Distearoyllecithin (DSL) Dispersionen $T_c = 54^\circ\text{C}$.

Mit dem gleichen Verfahren wurde auch die Phasenumwandlung in Mischmicellen (250 mM NaGC und 200 mM DML bzw. DPL bzw. DSL) bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Mischmicellen noch mittels Differenzthermoanalyse auf Phasenumwandlungen hin untersucht.

Mit beiden Verfahren findet man übereinstimmend, daß die Mischmicellen von NaGC mit den verschiedenen Lecithinen (DML; DPL; DSL) eine Phasenumwandlung aufweisen, wobei für T_c die gleiche Reihenfolge gefunden wird wie in den wässrigen Lecithindispersionen [$T_c(\text{DML}) < T_c(\text{DPL}) < T_c(\text{DSL})$]. Im Vergleich zu den reinen Lecithindispersionen ist die Phasenumwandlung jedoch stark verbreitert und nach tieferen Temperaturen verschoben (siehe Abb. 6).

Dieses veränderte Verhalten der Mischmicell-Bilayer läßt sich damit erklären, daß in ihnen nur kleine Bilayerbereiche mit verhältnismäßig wenig Lecithinmolekülen vorliegen, die außerdem noch stark durch die Gallensäuremoleküle des Micellrandes gestört werden.

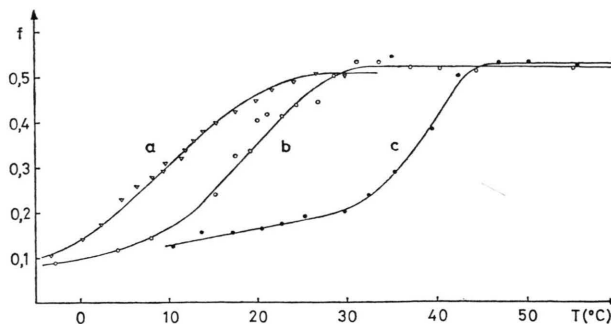


Abb. 6. Temperaturabhängigkeit des f -Parameters von Mischmicellen (250 mM NaGC/200 mM Lecithin). a) Dimyristoyllecithin; b) Dipalmitoyllecithin; c) Distearoyllecithin.

Die quantitative Auswertung der thermoanalytischen Messungen ergibt für die Phasenumwandlung in wässrigen DPL-Dispersionen eine Umwandelungsenthalpie von $\Delta H = 8,6 \text{ kcal/mol}$ bei 41°C (Phillips²¹). Bei den Mischmicellen (250 mM NaGC/200 mM DPL) findet man die Phasenumwandlungen im Bereich von 12 bis 31°C mit einer Umwandelungsenthalpie von $\Delta H \approx 5 \pm 1,5 \text{ kcal/mol}$.

3.2. Molekülbeweglichkeit im Lipidbereich der Mischmicellen

Mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisations- und Excimerfluoreszenz-Messungen wurde die Rotationsdiffusion und die laterale Diffusion von im Lipidbereich der Micellen gelösten Labelmolekülen untersucht und mit denjenigen in Liposomen verglichen. Außerdem wurde die laterale Diffusion von Lecithin-ähnlichen Spin- und Fluoreszenzlabels im Lipidbereich der Micellen und Liposomen bestimmt.

a) Vergleich der Rotationsbeweglichkeit von Perylen im Lipidbereich von Micellen und Liposomen

Zur Untersuchung der Rotationsbeweglichkeit wurde Perylen (VI) in Micellen und in Liposomen gelöst. Nach Perrin kann die Fluoreszenzpolarisation p mit der Rotationskorrelationszeit ϱ des Labels in Beziehung gesetzt werden:

$$\frac{1/p - 1/3}{1/p_0 - 1/3} = 1 + \frac{\tau}{\varrho}, \quad \text{wobei} \quad \varrho = \frac{V \eta^{\text{rot}}}{kT}$$

Dabei ist:

- p , Polarisationswert der Probe;
- p_0 , Polarisationswert bei unendlicher Viskosität;
- τ , Fluoreszenzabklingzeit;
- ϱ , Rotationskorrelationszeit;

V , molekulares Volumen des Labels;
 η^{rot} , Viskosität;
 k , Boltzmann-Konstante;
 T , Temperatur.

Diese Formel gilt streng nur für kugelförmige Moleküle und wurde als Näherung benutzt.

In der folgenden Tabelle sind die Meßgrößen p und τ der mit Perylen dotierten Systeme angegeben:

System	[Lecithin]	[NaGC]	[Perylen]	$\lambda_{\text{Anr.}}$	$\lambda_{\text{Emiss.}}$	p	τ
Micellen	1,3 mM	6,17 mM	1,3 μM	440 nm	470 nm	0,057	8,7 ns
Liposomen	1,3 mM	—	1,3 μM	440 nm	470 nm	0,058	5,5 ns

Die p -Werte sind gleich. Man erhält deshalb mit Hilfe der oben angegebenen Gleichung:

$$\frac{\eta_{\text{Lip}}^{\text{rot}}}{\eta_{\text{Mic}}^{\text{rot}}} = \frac{\tau_{\text{Lip}}}{\tau_{\text{Mic}}} = 0,63 \text{ bei } 20^\circ \text{C.} \quad (1)$$

In den Micellen ist die Viskosität größer und die Rotationsbeweglichkeit kleiner als in den Liposomen.

b) Diffusionsmessung von Fluoreszenz- und Spin-Labeln in Micellen und Liposomen

Die relative laterale Diffusion von gelösten fluoreszierenden Labelmolekülen kann nach einer von Galla und Sackmann²² beschriebenen Methode über die Excimerenbildung bestimmt werden. Unter der Annahme, daß die zur Excimerbildung notwendigen Stöße von Labelmolekülen im Grundzustand mit solchen im angeregten Zustand durch Diffusion zustande kommen, läßt sich für das Verhältnis der Diffusionskonstanten folgende Gleichung herleiten²²:

$$\frac{D_{\text{Mic}}}{D_{\text{Lip}}} = \frac{(I_{\text{Exc}}/I_{\text{Mon}})_{\text{Mic}} \tau_{\text{Lip}}^* (c/F)_{\text{Lip}}}{(I_{\text{Exc}}/I_{\text{Mon}})_{\text{Lip}} \tau_{\text{Mic}}^* (c/F)_{\text{Mic}}}$$

Dabei sind I_{Exc} und I_{Mon} die relativen Intensitäten der Excimer- und Monomer-Fluoreszenzbanden, τ^* die Excimer-Fluoreszenzabklingzeit, c das molare Verhältnis von Label zu Lipid und F der Flächenbedarf eines Lecithinmoleküls. Im Falle von Pyren (V) wurde die Fluoreszenzintensität bei 373 nm resp. 480 nm für I_{Mon} resp. I_{Exc} verwendet. Abb. 7 zeigt das überlagerte Monomer- und Excimerspektrum von Pyren in Liposomen. Um zu prüfen, ob in den Liposomen und Micellen die Excimerbildung tatsächlich diffusionslimitiert ist, wurde gezeigt, daß $I_{\text{Exc}}/I_{\text{Mon}}$ eine lineare Funktion der Labelkonzentration c ist (Abb. 7).

Die Bestimmung der Excimerenabklingzeiten²³ ergab (Abb. 8):

$$\tau_{\text{Lip}}^* = 85 \text{ ns} \quad \tau_{\text{Mic}}^* = 106 \text{ ns}.$$

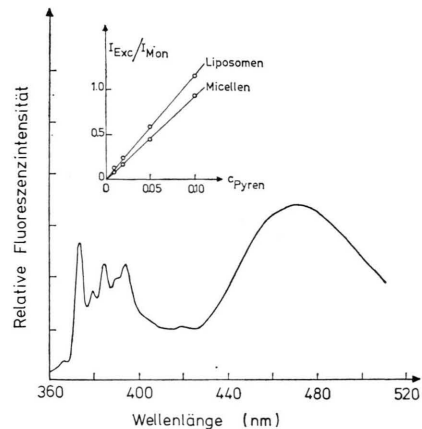


Abb. 7. Fluoreszenzspektrum von 10 mol% Pyren in multilamellaren Liposomen aus Eilecithin (1,3 mM) für eine Anregungswellenlänge von 330 nm. Das Monomerenspektrum liegt im Bereich 370–420 nm und das Excimerenspektrum im Bereich 420–520 nm vor. Das Verhältnis der Excimer- zu Monomerfluoreszenz $I(480 \text{ nm})/I(373 \text{ nm})$ ist in der Nebenfigur als Funktion der molaren Zusammensetzung Pyren/Lecithin für Liposomen (1,3 mM Lecithin) und Mischmicellen (6,17 mM NaGC/1,3 mM Lecithin) aufgetragen.

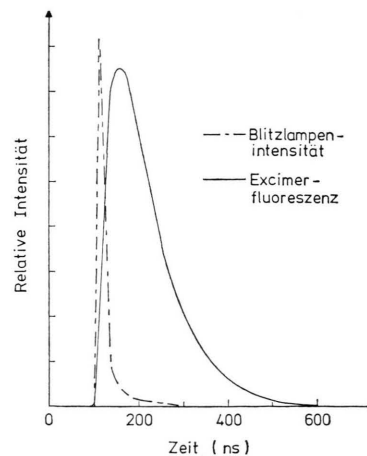


Abb. 8. Zeitabhängigkeit der Excimerfluoreszenz von Pyren in Eilecithin Liposomen (Molverhältnis 0,1) nach Anregung durch einen N_2 -Entladungsblitz. Interferenzfilter für die Anregung 341,3 nm (Schott, Mainz), Kantenfilter für die Excimerfluoreszenz KV 450 (Schott, Mainz).

Für Pyrenkonzentrationen c von 0 bis 0,1 erhält man:

$$\frac{D_{\text{Mic}}/F_{\text{Mic}}}{D_{\text{Lip}}/F_{\text{Lip}}} = \frac{\eta_{\text{Lip}}^{\text{diff}} \cdot F_{\text{Lip}}}{\eta_{\text{Mic}}^{\text{diff}} \cdot F_{\text{Mic}}} = 0,66 \text{ bei } 20^\circ\text{C}, \quad (2)$$

dabei wurde $D \sim 1/\eta^{\text{diff}}$ angenommen, wobei η^{diff} die Viskosität ist, die der lateralen Diffusion entspricht. Wir können diesen Wert mit dem Viskositätsverhältnis vergleichen, das wir mittels Perylen erhalten haben. Da wahrscheinlich sowohl für die Diffusion von Pyren als auch für die Rotation von Perylen Kinkenbewegungen in den Lipiddoppelschichten verantwortlich sind, kann man annehmen, daß $\eta_{\text{Pyren}}^{\text{diff}} \sim \eta_{\text{Perylen}}^{\text{rot}}$ ist. Man darf deshalb wegen der Übereinstimmung der Werte (1) und (2) innerhalb der Fehlergrenzen auf ähnlichen Flächenbedarf der Lecithinmoleküle in den Doppelschichten der Micellen und der Liposomen schließen, d. h. $F_{\text{Lip}} \sim F_{\text{Mic}}$.

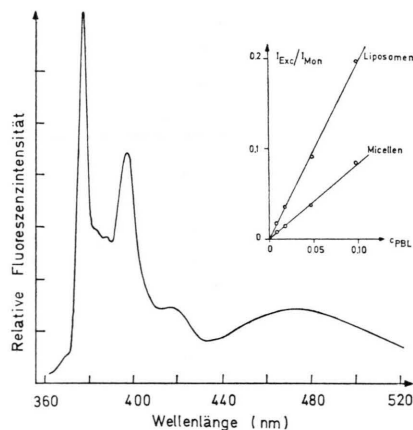


Abb. 9. Fluoreszenzspektrum von 10 mol% Pyrenbutter-säurelecithin PBL in multilamellaren Liposomen aus Eilecithin (1,3 mm) für eine Anregungswellenlänge von 330 nm. Das Monomerenspektrum liegt im Bereich 370–430 nm und das Excimerenspektrum im Bereich 430–520 nm vor. Das Verhältnis der Excimer- zu Monomerfluoreszenz $I(480 \text{ nm})/I(377 \text{ nm})$ ist in der Nebenfigur als Funktion der molaren Zusammensetzung PBL/Lecithin für Liposomen (1,3 mm) und Mischmicellen (6,17 mm NaGC/1,3 mm Lecithin) aufgetragen.

Zur Messung der Diffusionskonstanten von phospholipidähnlichen Molekülen wurde die oben beschriebene Methode der Excimerbildung auf den Label PBL(VII) angewendet. Abb. 9 zeigt das Monomer- und Excimerspektrum. Auch hier wurde nachgewiesen, daß die Excimerbildung diffusionslimitiert ist (Abb. 9). Mit den Abklingzeiten für PBL von

$$\tau_{\text{Lip}} = 104 \text{ ns} \quad \tau_{\text{Mic}} = 137 \text{ ns}$$

$$D_{\text{Mic}}/D_{\text{Lip}} = 0,32 \text{ bei } 20^\circ\text{C}.$$

Als unabhängige Methode zur Bestimmung der Diffusion phospholipidähnlicher Substanzen wurde das Verfahren von Sackmann²⁴ mit dem Spinlabel L(5,10)(IV) benutzt. Auch dieses Verfahren beruht darauf, daß die Zahl der Zusammenstöße zwischen Lipidmolekülen durch den Diffusionskoeffizienten D gegeben ist.

Die Stoßhäufigkeit unter den Spinlabelmolekülen in der Membran ist meßbar über die Spinaustauschwechselwirkung, die zu einer charakteristischen Verbreiterung der ESR-Linien führt. Aus dieser kann man auf die Austauschfrequenz W_{ex} rückschließen, die über folgende Gleichung mit dem Diffusionskoeffizienten D zusammenhängt:

$$W_{\text{ex}} = \frac{4}{3} D \frac{d}{F \lambda} \frac{c}{1+c}.$$

Hierbei ist:

$c = [\text{Label}]/[\text{Lipid}]$;

d = kritischer Abstand für Spinaustausch ($\approx 20 \text{ \AA}$);

λ = Länge eines Diffusions-Sprungs ($\approx 8 \text{ \AA}$);

F = Fläche pro Lipidmolekül.

Die Vergleichsmessung mit Liposomen ergab:

$$D_{\text{Mic}}/D_{\text{Lip}} = 0,36 \text{ bei } 20^\circ\text{C}.$$

(Im Liposom ist unter Annahme von $F = 70 \text{ \AA}^2$ $D = 5,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.)

Die mittels Spin- und Fluoreszenzlabeln gemessenen Verhältnisse der lateralen Diffusionskoeffizienten von Lipidmolekülen in Micellen und Liposomen stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein. Dabei wurde der Flächenbedarf pro Lipidmoleküle in den Micellen und Liposomen als gleich angenommen.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Messung eines Ordnungsgrades S und einer (allerdings stark verbreiterten) Phasenumwandlung sind starke Hinweise für eine Anordnung der Lecithinmoleküle in Doppelschichten innerhalb der Mischmicellen von Lecithin und NaGC. Dafür sprechen auch die vergleichbaren Werte der Diffusionskonstanten der Lipidmoleküle in den Mischmicellen und in Liposomen, ebenso die vergleichbaren Werte der Rotationsviskositäten von Perylen in Misch-

micellen und Liposomen. Die Packungsdichte der Lipidmoleküle ist folglich in den Mischmicellen- und Liposomen-Doppelschichten sehr ähnlich.

Daß die Werte der Diffusionskonstanten der Lecithinmoleküle in den Micellen kleiner sind als in Liposomen, muß vermutlich auf den Rand der Doppelschicht zurückgeführt werden, der die Bewegungsfähigkeit der Lecithinmoleküle einschränkt. Die größere Viskosität im Lipidbereich der Micellen verglichen mit derjenigen im Liposom muß wiederum durch den Randeffect erklärt werden, der die Kinkbeweglichkeit behindert.

Die Phasenumwandlung des Lecithins in Micellen erfolgt über einen wesentlich breiteren Temperaturbereich, und die Wärmetönung ist kleiner als in

Liposomen. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß wesentlich weniger Lecithinmoleküle pro Micelle vorhanden sind (ca. 30 Lecithinmoleküle pro Micelle bei einem Lecithin/NaGC-Molverhältnis von 0.9 in der Micelle) als pro Liposom, welche sich aber trotzdem noch kooperativ verhalten.

Die Größenbestimmung mittels quasielastischer Lichtstreuung deutet darauf hin, daß das Modell von Small für Molverhältnisse von Lecithin/NaGC kleiner als 0,7 wahrscheinlich zutrifft, und daß in diesem Gebiet die Micellen monodispers sind. Bei größeren Molverhältnissen von Lecithin/NaGC findet wahrscheinlich Aggregation zu länglichen Micellen statt, deren Strukturbestimmung noch weiterer Abklärung bedarf. In diesem Gebiet sind die Micellösungen stark polydispers.

- ¹ D. M. Small, *The Bile Acids*, Vol. 1, S. 249–355 (P. P. Nair, ed.), Plenum Press, New York and London 1971.
- ² G. Benzonana, *Biological Horizons in Surface Science* (L. M. Prince and D. F. Searce, eds.), Academic Press, New York 1973.
- ³ W. S. Singleton, M. S. Gray, M. L. Brown u. J. L. White, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **42**, 53 [1965].
- ⁴ A. D. Bangham, M. M. Standish u. J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **13**, 238 [1965].
- ⁵ B. J. Gaffney, „Spin Labeling“, *Theory and Applications*, (L. J. Berliner, ed.), Academic Press, New York 1976.
- ⁶ W. F. Boss, C. J. Kelley u. R. Landsberger, *Anal. Biochem.* **64**, 289 [1975].
- ⁷ G. B. Benedek, *Polarization, Matter and Radiation*, *Livre de Jubile en l'honneur de Professeur A. Kastler*, pp. 49–84, Presses universitaires de France, Paris 1969.
- ⁸ S. H. Chen, W. B. Veldkamp u. C. C. Lai, *Rev. Sci. Instrum.* **46**, 1356–1367 [1975].
- ⁹ Für asphärische Teilchen ist d um einen Formfaktor f größer als der Durchmesser einer volumengleichen Kugel. Zum Beispiel für ein längliches Rotationsellipsoid mit Achsenverhältnis 10 : 1 ist $f = 1,54$.
- ¹⁰ D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.* **57**, 4814–4820 [1972].
- ¹¹ P. N. Pusey, *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy* (H. Z. Cummins and E. R. Pike, ed.), 387–428, Plenum Press, New York, London 1974.
- ¹² Als theoretische Micellengröße wurde der Durchmesser der volumengleichen Kugel als Funktion des Lecithin/NaGC-Verhältnisses berechnet (Formfaktor $f \sim 1$).
- ¹³ W. Shankland, *Chem. Phys. Lipids* **4**, 109–130 [1970].
- ¹⁴ Das Streuvermögen von reinen NaGC-Lösungen ist um mindestens einen Faktor 10 schwächer als dasjenige der Mischmicellen, es ist deshalb vernachlässigbar.
- ¹⁵ D. M. Small, M. C. Bourges u. D. G. Dervichian, *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 563–580 [1966].
- ¹⁶ Zum Vergleich beträgt die an einer 70 mm micellaren Natriumlaurylsulfatlösung gemessene Varianz 0,35 (N. A. Mazer, G. B. Benedek u. M. C. Carey, *J. Phys. Chem.* **80**, 1075–1085 [1976]).
- ¹⁷ W. L. Hubbell u. H. M. McConnell, *J. Amer. Chem. Soc.* **93**, 314 [1971].
- ¹⁸ M. Sinensky, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **71**, 522 [1974].
- ¹⁹ J. Seelig u. W. Hasselbach, *Eur. J. Biochem.* **21**, 17 [1971].
- ²⁰ E. J. Shimshick u. H. M. McConnell, *Biochemistry* **12**, 2351 [1973].
- ²¹ M. C. Phillips, R. M. Williams u. D. Chapman, *Chem. Phys. Lipids* **3**, 234 [1969].
- ²² H. J. Galla u. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 103 [1974].
- ²³ Die Excimerfluoreszenzabklingzeit wurde bei langen Zeiten mit hohen Labelkonzentrationen bestimmt, so daß die Monomerfluoreszenz in diesem Gebiet abgeklungen ist (keine Neubildung von Excimeren durch noch vorhandene Label im angeregten Zustand).
- ²⁴ E. Sackmann, H. Träuble, H. J. Galla u. P. Overath, *Biochemistry* **12**, 5360 [1973].