

Nachweis der kationeninduzierten Membranfusion an Liposomen

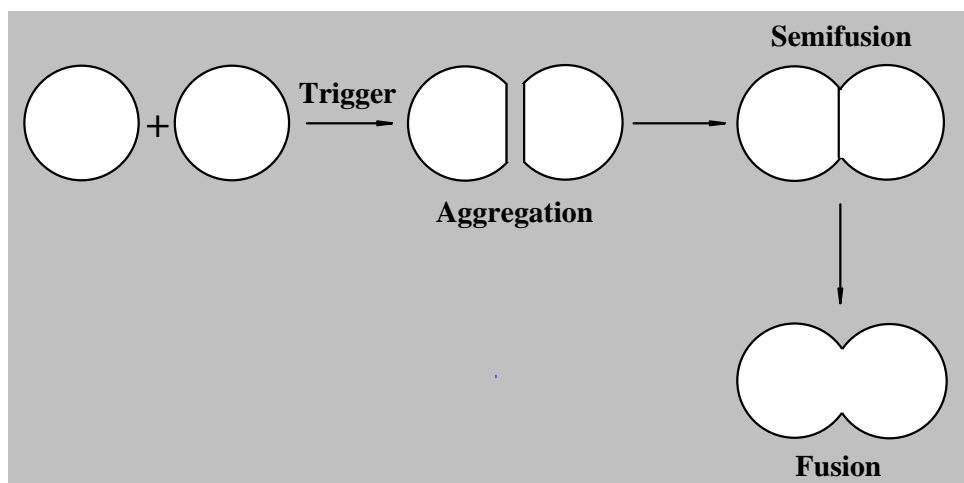
Matthias Müller, Dr. Olaf Zschörnig, Prof. Dr. K. Arnold, ,

Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Liebigstraße 27, 04103 Leipzig,
Tel.: (0341) 97 15 720, Fax: (0341) 97 15 709
e-mail: muem@medizin.uni-leipzig.de

1 Einleitung

Membranfusionen sind Bestandteil solch wichtiger zellbiologischer Prozesse wie der Exozytose, der Endozytose, dem intrazellulären Vesikeltransport, der Befruchtung und der Virus- und Bakterieninfektion von Zellen. Ihr molekularer Mechanismus ist jedoch bis heute noch nicht vollständig verstanden. Biophysikalische Forschungen zur Membranfusion werden durch die Komplexität der beteiligten biologischen Systeme erschwert. Hier kann die Verwendung von Modellen wie Phospholipidvesikeln (Liposomen) zu Fortschritten führen. Darüberhinaus sind natürliche Fusionsvorgänge so mannigfaltig, daß zu ihrer Erklärung unterschiedliche Theorien nötig zu sein scheinen. In den letzten Jahrzehnten konnte aber gerade durch Untersuchungen an Liposomen die Hypothese gestärkt werden, daß bestimmte allgemeine physikalische Mechanismen bei allen Membranfusionen auftreten.

1.1 Fusion von Liposomen



Trigger

Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} , ...), kalziumbindende Proteine, Virusproteine, Peptide, Polymere (PEG, ...)

1.2 Fusionsreaktion

A	Aggregation	unspezifische Wechselwirkungen (van-der-Waals-Anziehung, reduzierte elektrostatische Anziehung)
B	direkter molekularer Kontakt der Oberflächen	reduzierte hydrostatische Abstoßung
C	lokale Störung der Lipiddoppelschicht	u.a. hydrophobe Wechselwirkungen
D	Mischung der Liposomen	<ul style="list-style-type: none">Mischung der Lipide der äußeren Doppelschicht evtl. ohne echte Fusion (Semifusion)Vermischung der Liposomeninhalte (vollständige „echte“ Fusion)

2 Methoden

Liposomenpräparationen: Für die Herstellung sowohl von small unilamellar vesicles (SUV; $d < 100$ nm; Ultraschalltechnik [BRANSON Sonifier]) als auch von large unilamellar vesicles (LUV; $d = 100, 200$ oder 400 nm, Extrudertechnik [LIPEX Biomembranes Extruder]) unterschiedlicher Zusammensetzung aus einer Vielzahl natürlicher und synthetischer Phospholipide sind Voraussetzungen vorhanden.

Fluoreszenzspektroskopie: Die wichtigste Methode zur Messung der Fusion beruht auf der Inkorporation von Fluoreszenzsonden in die Liposomenbilayer oder in deren wässrigen Inhalt und der Beobachtung der Änderung der Verteilung dieser Sonden bei der Fusion. Es kommen verschiedene Assays zum Einsatz, durch die die einzelnen Teilschritte einer Membranfusion (Aggregation, Lipidmischung, Leakage, Vermischung der inneren Inhalte) meßbar sind. Weitere wichtige der Fluoreszenzspektroskopie zugängliche Parameter sind: Membranfluidität, Hydrophilizität der beteiligten Oberflächen (meßbar mit polaritätsempfindlichen Sonden) und Adsorption von geladenen bzw. ungeladenen Molekülen, die als Trigger der Fusion in Frage kommen (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Messungen z.B. von Protein-Tryptophan auf Pyren-markierte Lipide bzw. Fluoreszenzlöschung durch Spinlabel). Es ist ein PERKIN-ELMER-Fluorimeter LS 50B mit temperierbarem Vierfachküvettenhalter und Magnetrührereinrichtung vorhanden.

Charakterisierung der an der Fusion beteiligten Membranoberflächen: Das Oberflächenpotential von Phospholipidvesikeln wird aus der elektrophoretischen Beweglichkeit (EPM) berechnet. Die EPM kann durch Zellektrophorese unter Benutzung der Photonenkorrelationsspektroskopie [ZETASIZER 4, Malvern Instruments] gemessen werden. Wir untersuchen insbesondere ihre Änderung als Folge von Bindung / Adsorption.

Partikelgrößenmessungen mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie [ZETASIZER] liefern Aussagen über eine Vergrößerung der Phospholipidvesikel im Zuge einer Aggregation und Fusion.

2.1 Partikelgrößenbestimmung mit der Photonenkorrelationspektroskopie

Die Verwendung von Lichtstreuverfahren zur Bestimmung von Teilchengrößen bietet sich deshalb an, weil die Intensität des gestreuten Lichtes direkt vom Teilchenradius der streuenden Teilchen R abhängt. Die konventionelle Lichtstreuung an kolloidalen Systemen wurde theoretisch bereits von Rayleigh behandelt. Tyndall, Einstein und Mie lieferten weitere Beiträge. Erste Experimente begannen um 1940.

Beim klassischen Lichtstreuexperiment wird die Intensität des von Partikeln gestreuten Lichtes erfaßt. Für Teilchen, die viel kleiner als die Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes sind ($R < \lambda/10$), kann man Rayleighstreuung annehmen, und es gilt:

$$I = I_0 16\pi^4 R^6 \frac{n^2 - 1}{(n^2 + 2)^2} \frac{1}{r^2 \lambda^4}$$

λ Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes, I_0 eingestrahltete Intensität, n Verhältnis der Brechungsindizes von Medium n_0 und streuender Substanz n_1 , R Radius der streuenden Partikel, r Abstand des Detektors

Mit der sogenannten Rayleighzahl R_θ folgt:

$$R_q = 16\pi^4 R^6 \frac{n^2 - 1}{(n^2 + 2)^2} \frac{1}{r^2 \lambda^4}$$

$$\frac{I}{I_0} = \frac{R_q}{r^2}$$

Für größere Teilchen entsteht eine Winkelabhängigkeit der Streulichtintensität durch Interferenzen des von verschiedenen Orten des Teilchens gestreuten Lichts. Mit dem Wellenzahlvektor K , der den Winkel θ zwischen einfallendem und gestreutem Strahl enthält, läßt sich für die Streuintensität eine Reihenentwicklung angeben.

$$K = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

$$I = I_0 P(\theta)$$

$$P(\theta) = 1 - \frac{1}{3}(R_G K)^2 + \dots$$

R_G heißt Gyrationradius und hängt mit der Größe und der Geometrie der streuenden Teilchen zusammen. Für Kugeln gilt zum Beispiel:

$$R_G = \frac{3}{5} R^2$$

Der Gyrationradius kann aus Messungen für verschiedene Winkel gewonnen werden.

Allerdings unterliegen Messungen zur Partikelgrößenbestimmung mit der Lichtstreuung einigen Einschränkungen, die sie sehr aufwendig machen oder ihren Anwendungsbereich beschränken: Zwang zur exakten Kalibrierung oder Kenntnis von Kennzahlen der Probe (Brechungsindex, Konzentration, Partikeldichte); Notwendigkeit der Messung über viele Winkel für größere Streuer.

Die **Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)**¹ wurde in den siebziger Jahren entwickelt. Bei der PCS mißt man auch Schwankungen der Streulichtintensität, die durch die Bewegung der streuenden Teilchen verursacht werden. Als Meßgröße erhält man den Diffusionskoeffizienten und daraus abgeleitet die Größe der Partikel.

Die streuenden Teilchen unterliegen z.B. der Brownschen Bewegung. Das mittlere Verschiebungsquadrat in einer bestimmten Beobachtungszeit wird durch die Einstein-Smoluchowski-Gleichung beschrieben:

$$\langle x^2 \rangle = 6Dt$$

Die Diffusion wird durch die Einsteingleichung in Kombination mit dem Stokesschen Gesetz bestimmt. D ist die Diffusionskonstante, η ist die Viskosität des Mediums und R_h ist der hydrodynamische Radius der streuenden Teilchen:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Die Fluktuationen der Teilchenposition aufgrund der zufälligen Brownschen Bewegung führen zu Fluktuationen im Intensitätsspektrum des Streulichtes. Eine Lageveränderung x des streuenden Teilchens während der Meßzeit führt zu den gleichen Intensitätsveränderungen, wie sie im statischen Falle durch die Interferenz des Streulichtes von Teilchen entstehen würden, die den Abstand x voneinander haben.

Die Messungen wurden an einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments) durchgeführt. Der Strahl eines 5-mW-Helium-Neon-Lasers durchdringt die Probenzelle. Unter einem Winkel von 90° wird die Streustrahlung von einem Photomultiplier detektiert (Einzelphotonenzählung). Innerhalb einer gewissen Meßzeit wird eine Momentaufnahme der Intensitätsverteilung erstellt und in den Kanälen eines Korrelators abgelegt. Die rechnergestützte Auswertung dieser Signale erfolgt über die Berechnung der Autokorrelationsfunktion der Intensität der Streustrahlung.

$$G_2(t, t + \tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle$$

Diese Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung ($I \sim E^2$) liefert eine Aussage über die Korrelation eines Intensitätszustandes zum Zeitpunkt $(t+\tau)$ mit dem Zustand zum Zeitpunkt t . Die Zeit τ wird in Zeitintervalle τ^* (typischerweise 10...50 μ s) zerlegt, während der die den Photomultiplier erreichenden Photonen gezählt werden. Ihre Zahl wird gespeichert. Im Korrelator werden insgesamt 64 dieser Signale in einem Schieberegister abgelegt (64-Kanal-Korrelator), wobei zunächst für jedes neu ankommende Signal das jeweils älteste aus dem Register entfernt wird. Anschließend erfolgt eine Multiplikation des neuen Signals mit allen im Schieberegister befindlichen Signalen. Zum Abschluß werden die Produkte aufsummiert, so daß sich die Autokorrelationsfunktion aufbaut.

¹Für die Methode sind eine Reihe von weiteren Bezeichnungen im Gebrauch: dynamische Lichtstreuung, Intensitätskorrelationspektroskopie, quasi-elastische Lichtstreuung (QELS).

Da die Ursachen der Fluktuationen des Intensitätssignals statistischer Natur sind, ergibt sich eine exponentiell abklingende Autokorrelationsfunktion. Zur Auswertung wird die Autokorrelationsfunktion normiert

$$g_2(t, t + \tau) = \frac{G_2(t, t + \tau)}{\langle I^2 \rangle}$$

und in die normierte Autokorrelationsfunktion erster Ordnung (Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes) umgerechnet.

$$g_2(t, t + \tau) = 1 + |g_1(t, t + \tau)|^2$$

$$g_1(t, t + \tau) = \exp\left(-\frac{\tau}{t_c}\right)$$

Aus dem Anstieg dieser Autokorrelationsfunktion in logarithmischer Auftragung folgt die charakteristische Zeit t_c der Fluktuationen. Sie liefert die Zeit, in der ein Teilchen aufgrund der Brownschen Bewegung im Mittel die Strecke $1/K$ zurückgelegt hat (mittleres Verschiebungsqadrat: $1/K^2$). Der Wellenzahlvektor K ist ja gerade die Strecke, die zwischen zwei Streuern liegen muß, um eine Änderung der Streuintensität beobachten zu können.

Diese Zeit wird durch die Diffusionskonstante bestimmt, die die charakteristische Zeit normiert.

$$t_c = \frac{1}{DK^2}$$

Der aus D bestimmte hydrodynamische Radius stimmt für monodisperse Proben im allgemeinen gut mit dem mittleren Radius der Teilchen der Suspension überein. Für polydisperse Proben mit einer gewissen Größenverteilung wird die Autokorrelationsfunktion durch eine Summe über verschiedene e -Funktionen beschrieben. Der Abklingkonstanten t_c entspricht dann eine Verteilungsfunktion.

2.2 Zellelektrophorese

Als Zellelektrophorese wird die Bewegung suspendierter, elektrisch geladener Teilchen (z.B. feste und kolloidale Teilchen, Zellen, Tropfen, Vesikel) unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes bezeichnet. Entsprechend der Ladung der Partikel erfahren sie im elektrischen Feld eine Kraft und bewegen sich in ihm mit einer Geschwindigkeit v . Das Verhältnis von Geschwindigkeit und elektrischer Feldstärke bezeichnet man als **elektrophoretische Beweglichkeit**.

$$b = \frac{v}{E} = \frac{s}{t \cdot E}$$

Aus der elektrophoretischen Beweglichkeit lassen sich Rückschlüsse auf die Ladung der Partikel ziehen. Für den einfachsten Fall einer Punktladung ist die Beweglichkeit der Ladung direkt proportional.

Für Liposomen in Elektrolyten sind die Verhältnisse etwas komplexer. An der Liposomenoberfläche sind die Festladungen der Phospholipide angeordnet. In der Umgebung befinden sich Gegenionen, deren Konzentration mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche bis zur Bulkkonzentration absinkt. Die Konzentration der Koionen ist an der Oberfläche verringert und wächst mit zunehmender

Entfernung bis zur Bulkkonzentration an. Die geladene Oberfläche mit Gegen- und Koionenwolke läßt sich als diffuse elektrische Doppelschicht beschreiben.

Bei der Bewegung im elektrischen Feld kommt es zur Trennung zwischen den mitgeführten Ionen in der Adsorptionsschicht und den nicht mitgeführten Ionen in der Diffusionsschicht. Man definiert nun das elektrische Potential Ψ in der Trennebene zwischen diesen beiden Bereichen (Scherebene) als **ζ -Potential**. Für Liposomen sind 2 \AA eine gute Näherung für den Abstand zwischen Membran und Scherebene. Für alle hier behandelten liposomalen Systeme wird die Meßgröße elektrophoretische Beweglichkeit b mit dem ζ -Potential durch die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung verknüpft.

$$\zeta = \frac{\eta}{\epsilon_0 \epsilon_r} b$$

Hierin sind η die Viskosität des Mediums, in dem die Bewegung stattfindet, und ϵ_0 und ϵ_r die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und des Mediums.

Das elektrostatische Potential Ψ in einer Entfernung x von der Membranoberfläche wird durch die Gouy-Chapman-Gleichung beschrieben, wenn Ψ_0 das Potential an der Oberfläche, T die Temperatur und e die Elementarladung sind.

$$\Psi(x) = \frac{2kT}{e} \ln \frac{\left(1 + \frac{\exp\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) + 1} \right) \exp(-\kappa x)}{\left(1 - \frac{\exp\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) + 1} \right) \exp(-\kappa x)}$$

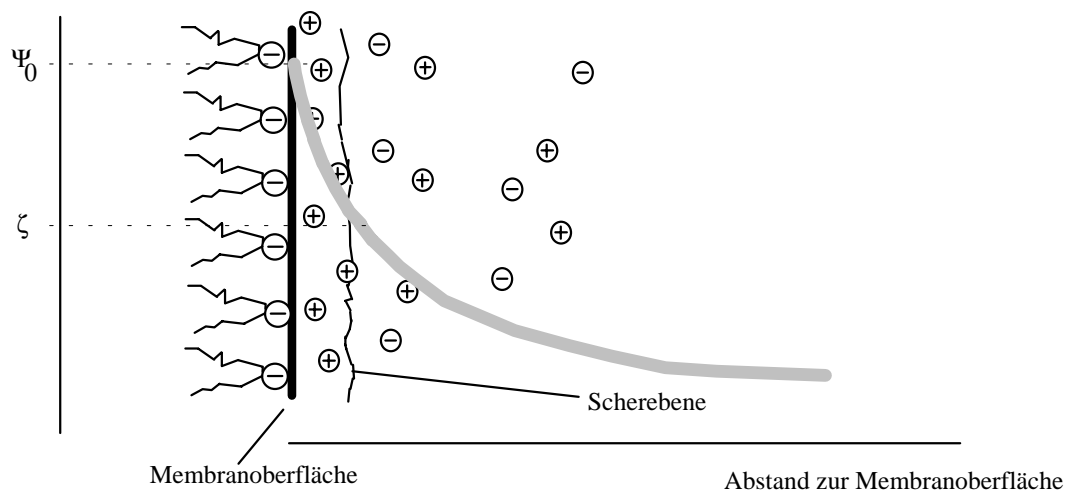
Der hier auftretende Debye-Hückel-Koeffizient κ beschreibt die Abschirmung der Oberflächenladung durch die Ionen des Elektrolyten. Der Wert $1/\kappa$ ist ein gutes Maß für die Dicke der elektrischen Doppelschicht. Neben den bereits eingeführten Größen und der Avogadrozahl N_A hängt der Debye-Hückel-Koeffizient natürlich von der Konzentration des Elektrolyten C ab.

$$\kappa = \sqrt{\frac{2CN_A e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r kT}}$$

Das elektrische Potential und die Ladungsdichte sind durch die Gouy-Gleichung verbunden.

$$\sigma = \sqrt{\frac{C}{8N_A \epsilon_0 \epsilon_r kT}} \sinh\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right)$$

Damit liefert die Bestimmung des Zetapotentials die Möglichkeit, Aussagen über die Oberflächenladung von Liposomen zu treffen, die z.B. durch die Bindung von Kationen verändert werden kann.



Diffuse elektrische Doppelschicht und Zetapotential

Alle angegebenen Gleichungen gelten natürlich nur soweit, wie die ihnen zugrunde liegenden Annahmen richtig bleiben. Auf die Grenzen der einzelnen Modelle, soll hier nicht weiter eingegangen werden. Die Verhältnisse, wie sie bei den benutzten Liposomensystemen gegeben sind, lassen die Benutzung obiger Gleichungen zu. Auf Ausnahmen wird hinzuweisen sein.

Für die Messung des Zetapotentials findet hier der Zetasizer 4 (Malvern Instruments) Verwendung. Hier wird die Geschwindigkeit der Partikel in einem durch die Kreuzungsstelle zweier Laserstrahlen gegebenen Volumen mit Methoden der Photonenkorrelationspektroskopie bestimmt.

Der Laser ist ein 5-mW-Helium-Neon-Laser. Durch die Kreuzung zweier Laserstrahlen wird ein Interferenzmuster erzeugt, daß durch die periodische Abfolge von Hell- und Dunkelzonen gekennzeichnet ist. In diesem Hell-Dunkel-Muster bewegen sich die zu vermessenden Partikel durch das angelegte elektrische Feld E getrieben. Sie streuen das Laserlicht jeweils beim Durchtritt durch die hellen Bereiche des Interferenzmusters.

Entsprechend der Geschwindigkeit der Partikel wird also ein periodisches Streuverhalten erzeugt, daß in der PCS eine periodisch modulierte Autokorrelationsfunktion liefert. Es ergibt sich eine e -Funktion (aus statistischen Anteilen der Bewegung), der eine Sinusfunktion aufmoduliert ist. Aus der Autokorrelationsfunktion erhält man durch eine Fourier-Transformation die Frequenzverteilung. Die Frequenzverbreiterung, die von der Brownschen bewegung herrührt, wird durch eine Messung ohne elektrisches Feld ermittelt, und nach der eigentlichen Elektrophorese abgezogen. Die Frequenzverbreiterung Δf aus der elektrophoretischen Bewegung liefert die elektrophoretische Beweglichkeit b .

$$\Delta f \sim bE$$

Diese wird dann mit obigen Beziehungen in das Zetapotential umgerechnet.

Die temperaturabhängigen Materialkonstanten der Medien müssen vorgegeben werden. Für die Auswertung wird der errechnete gewichtete Mittelwert des Zetapotentials und seine Standardabweichung verwendet. Alle Messungen finden in einer der stationären Ebenen der Meßkapillare (Lage bei 14,6% des Kapillarradius ausgehend von der Kapillarwand) statt, wo der elektroosmotische Effekt ausgeglichen ist.

2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine empfindliche spektroskopische Methode. Sie hat vielfältige Anwendung bei Studien an Modellmembranen gefunden.

Im folgenden wird auf die physikalischen Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie eingegangen.

2.3.1 Physikalische Grundlagen

Grundlage der Fluoreszenzspektroskopie ist die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie.

Trifft elektromagnetische Strahlung auf Materie, so kann Energie an die Bausteine der Materie, die Moleküle, abgegeben werden. **Absorbiert** ein Molekül elektromagnetische Strahlung mit einer Frequenz im ultravioletten oder sichtbaren Bereich, führt das zur Anregung von Übergängen zwischen den Elektronenenergieniveaus des Moleküls. Die einfallende Strahlung hebt ein Elektron aus einem energetisch niedrigeren in ein energetisch höheres Orbital, was zu einem angeregten, energiereicheren Zustand des Moleküls führt.

Die elektronischen Übergänge lassen sich nach den beteiligten Molekülorbitalen klassifizieren. Im Grundzustand werden bindende σ -, π - und n -Orbitale unterschieden. Besetzte bindende σ -Orbitale bilden die Einfachbindungen und die besetzten bindenden π -Orbitale die Mehrfachbindungen eines Moleküls. Bei Heteroatomen wie N oder O kommen nichtbindende n -Orbitale vor, die von einsamen Elektronenpaaren besetzt werden (Galla, 1988).

Von diesen Orbitalen des Grundzustandes, in dem sich nach der Boltzmann-Statistik praktisch alle Moleküle befinden, kann ein Elektron nach Absorption elektromagnetischer Strahlung in die leeren antibindenden Orbitale des angeregten Zustandes wechseln. Dort gibt es zwei Typen von Orbitalen, die σ^* - und die π^* -Orbitale. Für die Fluoreszenzspektroskopie an Biomolekülen sind die mit hoher Wahrscheinlichkeit auftretenden $\pi \rightarrow \pi^*$ und die energetisch am niedrigsten liegenden $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge wichtig.

Eine weitere gebräuchliche Klassifizierung von Absorptionsübergängen geht von der Spinanordnung aus.

Im Grundzustand eines Moleküls mit gerader Elektronenzahl sind die bindenden Orbitale in der Regel paarweise mit Elektronen besetzt, deren Spins nach dem Pauliprinzip antiparallel ausgerichtet sind. Daraus ergibt sich ein Gesamtspin $S = 0$. Die Multiplizität $M = (2S+1)$ dieses Zustandes ist eins. Deshalb wird diese Spinanordnung als Singulettzustand S_0 bezeichnet. Mit einigen Ausnahmen (z.B. Sauerstoff) ist der Grundzustand ein Singulettzustand.

Im angeregten Zustand des Moleküls können die Elektronenspins parallel oder antiparallel orientiert sein. Entsprechend werden angeregte Singulettzustände (wegen $S = 0$ und $M = 1$) und angeregte Triplettzustände (wegen $S = 1$ und $M = 3$) unterschieden. Angeregte Singulett- und Triplettzustände besitzen als Folge unterschiedlicher Elektronenwechselwirkung verschiedene Energien, wobei die Energie des Triplettzustandes im allgemeinen niedriger ist als die des entsprechenden Singulettzustandes.

Der Übergang vom Singulettgrundzustand S_0 zum ersten angeregten Singulettzustand S_1 gehört zu den erlaubten Übergängen. Ein Übergang vom Singulettgrundzustand S_0 zum angeregten Triplettzustand T_1 wird nicht beobachtet, auch wenn die Resonanzbedingung erfüllt ist. Die hierfür notwendige Spinumkehr würde die aus dem Drehimpulssatz abgeleitete Auswahlregel verletzen, daß sich der Gesamtspin und damit die Multiplizität bei einem Übergang nicht ändern darf.

Eine weitere Unterteilung ist durch die Aufspaltung der Energieniveaus in Schwingungsniveaus gegeben, welche den verschiedenen möglichen Molekülschwingungszuständen (symmetrische und asymmetrische Valenz- und Deformationsschwingungen) entsprechen. Durch Rotationsniveaus ergibt sich eine weitere Unterteilung. Die Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur fast ausschließlich im niedrigsten Schwingungsniveau $v = 0$ des elektronischen Grundzustandes S_0 . Die Absorption eines Photons geeigneter Energie erfolgt daher vorwiegend aus diesem Zustand heraus. Das Molekül wird dabei in den ersten angeregten Singulettzustand (S_1) oder in höhere angeregte Singulettzustände (S_2 , S_3 , ...) überführt. Der Absorptionsprozeß läuft innerhalb von 10^{-15} s ab (Galla, 1988).

Im Anschluß an die Absorption finden verschiedene **Desaktivierungsprozesse** statt, durch welche die Abgabe der durch die Absorption aufgenommenen Energie erfolgt. Diese Energieabgabe bei der Rückkehr des Moleküls in seinen energetischen Grundzustand kann entweder unter Aussendung von Strahlung oder strahlungslos verlaufen.

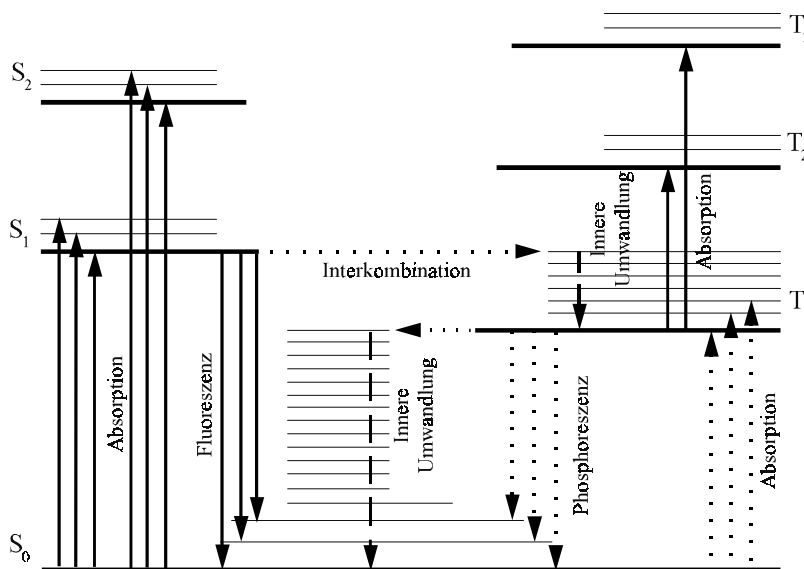
Die **strahlungslose Verteilung der Energie** auf innere Schwingungsmoden des angeregten Moleküls durch thermischen Ausgleich mit der Umgebung oder auf Schwingungsmoden benachbarter Moleküle durch Stöße bezeichnet man als innere Umwandlung. Dieser Austausch, durch den ein Molekül wieder das thermische Gleichgewicht mit der Umgebung erreicht, überführt das Molekül in das nullte Schwingungsniveau des entsprechenden angeregten Elektronenniveaus.

Dieser Mechanismus der thermischen Relaxation ist auch für die strahlungslose Desaktivierung vom S_2 - oder S_3 -Zustand in den S_1 -Zustand verantwortlich. Nach erfolgter Anregung wird die Elektronenenergie zunächst in Kernschwingungsenergie überführt. Das Molekül befindet sich somit im Schwingungszustand gleicher Gesamtenergie des Singulettzustandes S_1 . Anschließend fällt das Molekül durch Temperatúrausgleich mit der Umgebung in den entsprechenden Schwingungsgrundzustand. Für diese strahlungslose Schwingungsrelaxation ist eine charakteristische Zeit von 10^{-12} s erforderlich, sie erfolgt damit deutlich schneller als Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Eine vollständige strahlungslose Desaktivierung über diesen Prozeß ist allerdings nicht möglich, da die Energiedifferenz zwischen den Singulett-niveaus S_1 und S_0 sehr viel größer ist als zwischen höheren benachbarten und angeregten Singulett-niveaus. Die strahlungslose Umwandlung in das Singulett-niveau kann nur über die gleichzeitige Anregung einer Vielzahl von Schwingungsquanten erfolgen. Der strahlungslose Desaktivierungsprozeß verläuft dadurch langsamer und ermöglicht damit ein effektives Konkurrieren der Fluoreszenzemission aus diesem Zustand.

Den quantenmechanisch verbotenen Spinaustauschprozeß, durch den ein Singulettzustand in einen Triplettzustand (oder umgekehrt) ohne Emission von Strahlung überführt wird, bezeichnet man als Interkombinationsübergang. Dieser hat wegen der Spin-Bahn-Kopplung eine gewisse Wahrscheinlichkeit (Haken und Wolf, 1994).

Vorgänge, die mit der **Emission elektromagnetischer Strahlung** verbunden sind, werden als Lumineszenz bezeichnet und im allgemeinen in Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterteilt.



Typisches Termschema eines Moleküls mit Singulett- und Triplettssystem (Haken und Wolf, 1994). Die Übergänge zwischen den beiden Systemen sind gepunktet dargestellt und mehr oder weniger stark verboten. Die strahlungslose Abgabe der Energie ist gestrichelt dargestellt.

Als Phosphoreszenz wird der Strahlungsübergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des Triplettzustandes T_1 in ein Schwingungsniveau des Singulettgrundzustandes S_0 bezeichnet. Die charakteristische Übergangszeit reicht von 10^{-4} s bis zu 1 s. Die lange Abklingdauer ist eine Folge des Verbotes von Spin-Umklappvorgängen bei optischen Übergängen.

Fluoreszenz tritt beim Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Singulettzustandes S_1 in ein Schwingungsniveau des Singulettgrundzustandes S_0 auf. Hierbei beträgt die Übergangszeit 10^{-8} s bis 10^{-7} s.

Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden meist bei aromatischen oder heterozyklischen Molekülen beobachtet, insbesondere Moleküle mit zwei oder mehreren kondensierten Ringen haben für diese Vorgänge eine große Bedeutung. Solche Moleküle werden auch als Fluorophore bezeichnet. Die Anregungszustände niedrigster Energie dieser Moleküle sind die des π -Elektronensystems. Die Absorption eines Photons führt zum Übergang eines Elektrons aus einem bindenden π -Orbital in ein antibindendes π^* -Orbital höherer Energie (Cevc, 1993).

Die hier interessierende Fluoreszenz hat folgende Eigenschaften:

- Jedes Fluorophor besitzt zwei charakteristische Spektren, das Emissionsspektrum und das Absorptionsspektrum.
- Das Emissionsspektrum des Fluorophors ist unabhängig von der Anregungswellenlänge, da Fluoreszenz stets vom niedrigsten Schwingungsenergieniveau des Singulettzustandes S_1 aus erfolgt.
- Das Fluoreszenzspektrum ist aufgrund der kleineren Quantenenergien gegenüber dem Absorptionsspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben (Stokes-Regel).
- Bei vergleichbaren Schwingungsstrukturen von S_0 und S_1 verhalten sich Absorptions- und Emissionsspektrum spiegelbildlich zueinander.

Der Anteil der Fluoreszenz an den verschiedenen Prozessen der Desaktivierung des angeregten Moleküls wird durch die Quantenausbeute Φ der Fluoreszenz angegeben, welche folgendermaßen definiert ist:

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl der emittierten Photonen}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}} \leq 1.$$

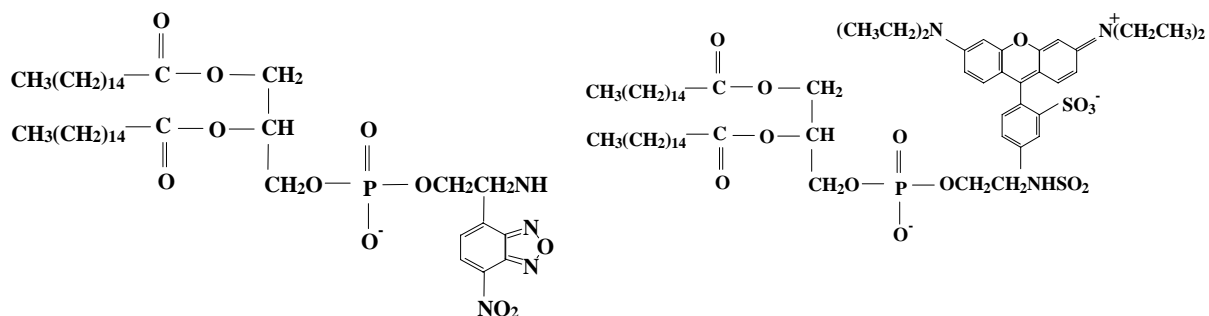
Demzufolge ist eine höhere Quantenausbeute mit einer größeren Fluoreszenzintensität verbunden. Gibt es keine Konkurrenzprozesse, ist die Quantenausbeute eins. Häufig werden solche Werte bei den Fluoreszenzfarbstoffen gemessen. Durch alle strahlungslosen Konkurrenzprozesse wird die Quantenausbeute verkleinert (Galla, 1988).

3 Experimentelles

3.1 Fluoreszenzassay für die Lipidmischung bei der Membranfusion

Die Untersuchung der Membranfusion mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie beruht darauf, Fluoreszenzsonden bei der Präparation der Liposomen entweder in die Modellmembranen einzubauen oder in das Innere der Vesikel einzuschließen. Die Vermischung der Membranlipide, wie sie im Zuge einer Membranfusion oder bei einer starken Aggregation von Liposomen auftritt, wird mit Hilfe des NBD/Rh-Mischungsassays² nachgewiesen.

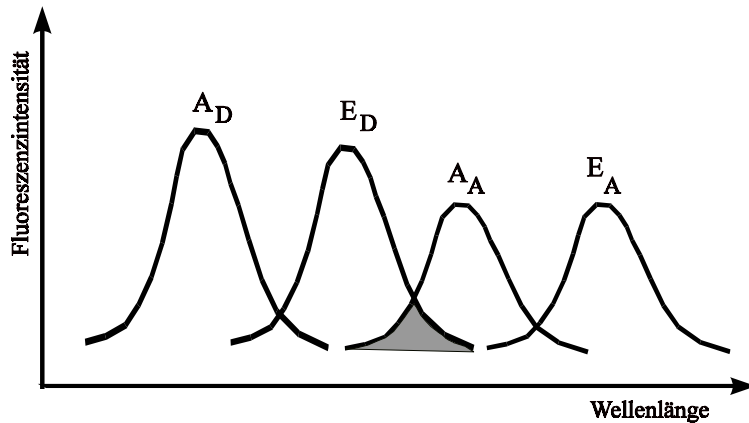
Name	Fluorophor gebunden an	Molekulargewicht	Hersteller
NBD-PE	NBD an PE-Kopfgruppe	880 g/mol	Molecular Probes
Rh-PE	Rhodamin an PE-Kopfgruppe	1259 g/mol	Molecular Probes



Struktur von Rh-PE und Struktur von NBD-PE

Das Donatormolekül NBD stellt einen Fluorophor dar, der durch elektromagnetische Strahlung in einen angeregten Zustand versetzt wird. Das Absorptionsmaximum des Moleküls liegt bei 470 nm. Das Emissionsmaximum von NBD liegt bei 520 nm. Rhodamin hat bei 520 nm sein Absorptionsmaximum. Die Anregungsenergie des Donatormoleküls kann also auf das Akzeptormolekül Rhodamin übertragen werden, das dadurch seinerseits angeregt wird und durch Fluoreszenzemission zur Abregung kommt. Das Emissionsmaximum von Rhodamin liegt bei 588 nm.

² Düzgünes, N. und Bentz, J. (1988) Fluorescence assays for membrane fusion. In: Loew, L.M., (Hg.) *Spectroscopic membrane probes*, S. 117-159. Boca Raton: CRC Press.



Absorptions- und Emissionspektrum eines Donator-Akzeptor-Paares, A bezeichnet das Absorptionsspektrum, E das Emissionsspektrum. Die Indizes bezeichnen Donator (D) und Akzeptor (A)

Die verwendeten Fluorophore NBD und Rhodamin sind an die Kopfgruppe eines Phosphatidylethanolamin-Moleküls gebunden. Dadurch werden sie in die Liposomenmembran eingebaut, wenn man sie in organischen Lösungsmitteln den Chloroformlösungen von Lipiden beimischt, die zur Liposomenpräparation verwendet werden.

Für den Assay wird eine Liposomenpopulation, die je 1 mol% NBD-PE und 1 mol% Rh-PE in den Membranen enthielt, mit einer unmarkierten Liposomenpopulation im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Lipidkonzentration im Meßansatz beträgt dann ca. $100 \mu\text{M}^3$. In den Proben werden durch Titration unter Rühren und Thermostatierung sukzessive verschiedene Kationenkonzentrationen eingestellt. 180 s nach Zugabe der Salzlösung wird das Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

Tritt eine Vermischung von Membranlipiden im Zuge einer Fusion auf, so werden die Fluorophore durch laterale Diffusion über die nun größere Oberfläche verdünnt. Der Abstand zwischen Donatoren und Akzeptoren wird vergrößert, und die Transfereffizienz sinkt. Die Akzeptorfluoreszenz nimmt ab, und die Donatoreigenfluoreszenz nimmt zu.

Die Berechnung der Mischungsausbeute geschah nach folgender Gleichung:

$$M = \frac{\frac{I_{520}}{I_{588}^{\text{Triton}}} - \frac{I_{520}^0}{I_{588}^0}}{\frac{I_{520}}{I_{588}^{\text{Triton}}} - \frac{I_{520}^0}{I_{588}^0}} \cdot 100\%$$

In die Berechnung gehen sowohl Donator- (I_{520}) als auch Akzeptorfluoreszenzintensität (I_{588}) ein. Dabei sind die Intensitäten in Abwesenheit von fusionsgenen Substanzen mit „0“ indiziert, die mit „Triton“ indizierten Werte sind die Fluoreszenzintensitäten nach der Lysierung mit 1 vol% Triton X-100. Der vom System hierdurch eingenommene Zustand ist durch eine sehr starke Verdünnung der Sonden gekennzeichnet und wird als 100%-Wert der Lipidmischung angenommen.

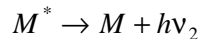
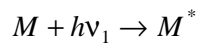
³Die Proben enthalten in 2 ml Pufferlösung 40 μl der zu untersuchenden Liposomensuspension (20 μl markiert und 20 μl unmarkiert)

3.1.1 Fluoreszenzassay für Vesikelleakage und Vermischung innerer Inhalte bei der Membranfusion - Anwendung der Fluoreszenzlöschung -

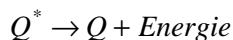
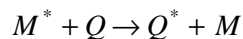
Als **Fluoreszenzlöschung** (engl.: **Quenching**) bezeichnet man einen Vorgang, bei dem es *nicht* zur Aussendung von Strahlung durch angeregte Fluorophore kommt, sondern die Anregungsenergie der Moleküle auf andere Moleküle übertragen wird, die als Löscher bezeichnet werden.

Die Quantenausbeute der Fluoreszenz einer Substanz wird dabei durch in der Umgebung vorhandene Löschermoleküle herabgesetzt, indem zwar der Absorptionsprozeß des Fluorophors nicht beeinflusst wird, jedoch die Energie des Anregungszustandes strahlungslos auf die Löschermoleküle überführt wird. Man unterscheidet dabei zwei Arten von Fluoreszenzlöschung: Die **dynamische Fluoreszenzlöschung** beruht auf der Energieübertragung durch Kollisionsprozesse, die **statische Fluoreszenzlöschung** auf dem Übertrag durch Komplexbildung.

Der **Grundmechanismus der Löschung** der Fluoreszenz eines Moleküls M durch einen Löscher Q ist der folgende: Absorption und Emission des Fluorophors werden beschrieben durch:



Die Quantenausbeute der Fluoreszenz wird nun aber noch dadurch beeinflusst, daß das angeregte Molekül M^* Energie an den Quencher Q abgibt, der strahlungslos relaxiert:

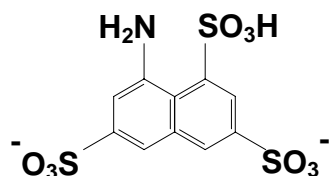


Die Verwendung der dynamischen Löschung für Leakage- und Fusionsassay beruht auf der **Konzentrationsabhängigkeit** dieses Vorganges. Bei einer konstanten Konzentration des Fluorophors ist die Übertragungsrate k_Q für die Fluoreszenzlöschung proportional zur Konzentration der Löschermoleküle.

$$k_Q = K \cdot c_Q$$

Die Konstante K heißt Löschkonstante.

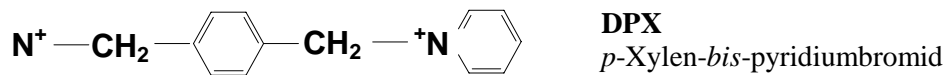
Zum Nachweis von Membranstabilitäten oder Porenbildung während der Fusion und zur Verfolgung der Vermischung der inneren Vesikelinhalte können z.B. Assays verwendet werden, die auf der dynamischen Löschung der Fluoreszenz des Moleküls ANTS durch das Löschermolekül DPX beruhen.



ANTS

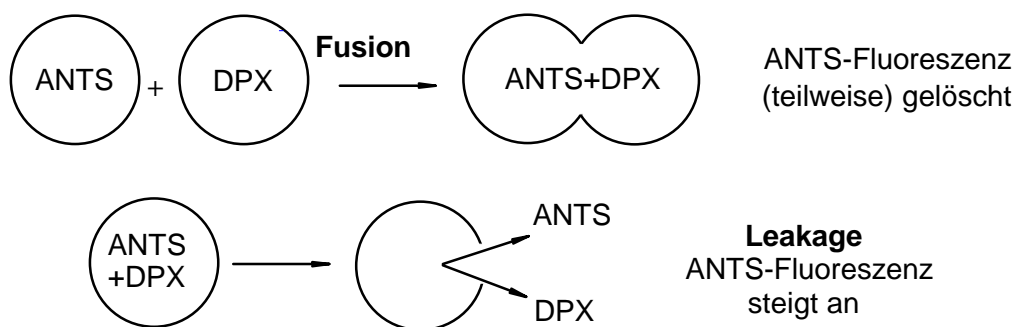
8-Aminonaphtalen-1,3,6-trisulfonsäure

(engl.: 8-aminonaphtalen-1,3,6-trisulfonic acid)



Struktur von ANTS bzw. DPX

Präparative Details: Die wasserlöslichen Moleküle ANTS und DPX werden gemeinsam in Liposomen eingeschlossen. Dazu werden die Vesikel in einer Pufferlösung präpariert, die neben 20 mM Natriumchlorid 12,5 mM ANTS und 45mM DPX enthalten. Der nicht in die Vesikel eingeschlossene Puffer wird mittels der Größenausschlußchromatographie auf einer Gelsäule Sephadex G-50 abgetrennt. Unter den so im Vesikel herrschenden Konzentrationsverhältnissen wird die ANTS-Fluoreszenz durch DPX gelöscht . Beim Austritt innerer Inhalte in den Außenraum kommt es zur Verdünnung der Löschermoleküle, und die Quenchingeffizienz sinkt. Damit steigt das Fluoreszenzsignal des Fluorophors ANTS an (Abb. 2).



Prinzip der ANTS-DPX-Assays

Präpariert man verschiedene Liposomenpopulationen, von denen die eine nur DPX (90 mM), die andere nur ANTS (25 mM ANTS und 40 mM NaCl) enthält, so hat man ein System zum Nachweis der vollständigen Fusion von Liposomen in der Hand. Kommt es zur Vermischung der inneren Liposomeninhalte bei Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Lipidmembran, so liegt im Inneren der fusionierten Vesikel DPX in der Umgebung des ANTS in löschender Konzentration vor, und das ANTS-Fluoreszenzsignal nimmt ab (Abb. 2). Die ANTS-Fluoreszenz wird bei 360 nm angeregt, die Fluoreszenzemission wird bei 540 nm detektiert oder zur Erhöhung der Signalintensität über alle Wellenlängen größer als 540 nm integriert.

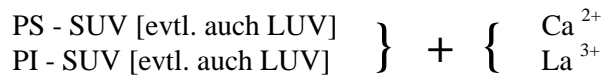
Die Fluoreszenzintensität I_0 , die an intakten Vesikeln, die sowohl ANTS als auch DPX enthielten, gemessen wird, ist als 0%-Wert für den Ausfluß innerer Inhalte L und als 100%-Wert für die Vermischung innerer Inhalte F zu setzen. Der 100%-Wert für das Vesikelleakage ergibt sich nach Zugabe von 1 vol% Triton X-100 (I_{Triton}). Die Auswertung der Signale kann unter Korrektur um das Streusignal, das mit unmarkierten Vesikeln unter sonst gleichen Bedingungen gemessen wurde, erfolgen.

$$\text{Leakage } L = \frac{I - I_{\text{Streu}} - I_0}{I_{\text{Triton}} - I_{\text{Streu}} - I_0} \cdot 100\%$$

$$\text{Fusion } F = \frac{I - I_0}{I_0} \cdot 100\%$$

4 Experimentieranleitung

1. Systeme



2. Vesikelpräparation

unmarkierte Vesikel

- 2 mg Phospholipid (PL, Chloroformlösung) mit (gespülter!) Hamiltonspritze in 50 ml-Rundkolben füllen
- Rotationsverdampfer: Org. Lösungsmittel entfernen (Laborslang: „abtrotieren“ oder „abdampfen“)
- in 2 ml Puffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.4) aufnehmen → Lipidkonzentration in der Suspension: 1 mg/ml
- 10 min vortexen
- 30 min bei 35 °C ($T > T_{\text{Ü}}$) schütteln
- (wenn SUV und LUV zu präparieren: Ansatz teilen)
- in Kryo-Röhrchen füllen
- **Präparation von SUV:** Ultraschallbehandlung (Branson Tip Sonifier: Temperaturbad, Spitze säubern, Leistungsversorgung und Temperaturkontrolle), 10 min - mittlere Leistung - 50% duty time
- **Präparation von LUV (100 nm Durchmesser):** Lipix Biomembranes Extruder: Extruder säubern, 2 Polycarbonatmembranen einlegen, Stickstoffdruck < 50 mbar, mit Puffer spülen, Suspension 10 Gefrier-Tau-Zyklen mit flüßigem Stickstoff, 5 Extrusionszyklen

markierte Vesikel für NBD-Rh-Lipidmischungsassay

- gleiche Stoffmenge wie unmarkierte Vesikel präparieren (d.h. Berechnung der einzusetzenden Stoffmengen nach folgendem Ansatz nötig: 98 mol% PL + 1 mol% NBD-PE + 1 mol% Rh-PE !)
- berechnete Mengen PL-, NBD-PE- und Rh-PE-Chloroformlösung mit entsprechenden Hamilton-Sprizen in 50 ml-Rundkolben einfüllen
- weitere Schritte wie bei unmarkierten Vesikeln

3. Fusionsmessung

- beide Systeme jeweils unter dem Einfluß von Ca^{2+} und La^{3+} (d.h. vier Messungen)
- Fluoreszenzspektrometer LS 50-B (Perkin-Elmer), Temperierung 37°C
- Einmal-Küvetten (Polystyren)

für jedes der vier zu messenden Systeme:

- **in der Küvette mischen:** 1 Teil unmarkierte + 1 Teil markierte Vesikel (20 μ l + 20 μ l + 2500 μ l Puffer \rightarrow molare Lipidkonzentration berechnen!)
- **Fluoreszenzspektrum aufnehmen:** experimentelle Bedingungen (Anregungswellenlänge und Emissionswellenlängenbereich) entspr. dem im Skript erläuterten Prinzip des Assays, Spalte auf optimale Intensität (ca. 300 - 500 a.u.) justieren
- **Ca²⁺- bzw. La³⁺-Titration:** Zugabemengen mit vorhandenem ausgefeilten Basicprogramm errechnen (logarithmische Stufung, Wertebereich Ca²⁺: 0 ... 100 mM (0, 0.1, 0.3, 0.6, 1, 3 usw.), Wertebereich La³⁺: 0 ... 1 mM (0, 0.001, 0.003, 0.006, 0.01 usw.)), Zugabe \rightarrow vortex \rightarrow Spektrum \rightarrow nächste Zugabe
- **nach Titration:** Lysierung der Vesikel durch Zugabe von 0.2 vol% Triton-X100-Lösung (beachte: vorhandene Satmmlösung ist 20%ig!) \rightarrow Spektrum

4. Auswertung

- aus jedem Spektrum ablesen: $I(520 \text{ nm})$ und $I(588 \text{ nm})$
- Berechnung von $q = \frac{I(520 \text{ nm})}{I(588 \text{ nm})}$ für Ausgangsspektrum (q_0), Tritonspektrum (q_{Triton}) und jede Ionenkonzentration (q_c)
- Fusionsausbeute $F = \frac{q_c - q_0}{q_{\text{Triton}} - q_0} \cdot 100\%$
- grafische Darstellung: $F = F(c_{\text{Ion}})$ für alle vier Systeme (log. x-Achsen-Skalierung)

5. Protokoll-Vorschlag

- **Zielstellung**
- **Methode**
- **System**
- **Präparation**
- **Messung**
 - Wertetabelle
 - Beobachtungen
 - Spektren-Ausdruck
 - Ergebnis-Grafik
- **Diskussion**

5 Literatur

zu Phospholipiden und Liposomen:

Cevc, G. (Hg.) (1993) *Phospholipids Handbook*, New York: Marcel Dekker, Inc..

zur Membranfusion:

Arnold, K. (1995) Cation-induced vesicle fusion modulated by polymers and proteins. In: Lipowsky, R. und Sackmann, E., (Hg.) *The Structure and Dynamics of Membranes Vol. 1 of Handbook of Biological Physics*, S. 865-916. Amsterdam: Elsevier.

zur Fluoreszenzspektroskopie:

Galla, H.J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Stuttgart und New York: Georg Thieme Verlag.

Haken, H. und Wolf, H.-C. (1994) *Molekülphysik und Quantenchemie*, 2. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer Verlag.

Perkampus, H.-H. (1993) *Lexikon Spektroskopie*, Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH Verlagsgesellschaft mbH.