

Zuordnung spricht, ist die Verbreiterung der Basis des Signals bei  $\delta = 185$ . Diese Verbreiterung wird auf die B-C-Kopplung zurückgeführt.

Raman-Messungen an Einkristallen und an pulverförmigen Proben von  $\text{Ca}_5\text{Cl}_3(\text{C}_2)(\text{CBC})$  ergaben reproduzierbare Signale bei 1885 und  $1495 \text{ cm}^{-1}$ , wobei das erste Signal der symmetrischen C-C-Streckschwingung zuzuordnen ist (Tabelle 2).

### Experimentelles

Alle Arbeiten wurden unter striktem Ausschluß von Sauerstoff und Luftfeuchtigkeit unter Argon in einer Handschuhbox (M. Braun, Garching) durchgeführt.

Bei dem Versuch, „ $\text{Ca}_4\text{Cl}_3\text{BC}_2$ “ herzustellen, entstanden wenige dünne, orangebraune, transparente und rechteckige Plättchen der Titelverbindung. Gezielt kann  $\text{Ca}_5\text{Cl}_3(\text{C}_2)(\text{CBC})$  durch Umsetzung von Ca,  $\text{CaCl}_2$ , B und Graphit in dem der Formel entsprechenden Mengenverhältnis erhalten werden.

Zur Synthese der reinen Verbindung wurden 7 mmol (280.6 mg) Ca (ABCR, 99.99 %), 2 mmol (21.7 mg) B (ABCR, 99.7 %), 8 mmol (96.1 mg) Graphit (Merck, reinst, 4 h bei 670 K im Vakuum ausgeheizt) und 3 mmol (333 mg)  $\text{CaCl}_2$  (Strem, 99.99 %), 4 h im HCl-Gasstrom bei 670 K getrocknet) umgesetzt. Die Reaktanten wurden in einer quarzglasummantelten Tantalampulle mit einer Aufheizgeschwindigkeit von  $10 \text{ K h}^{-1}$  auf 1170 K erhitzt und mindestens 4 d bei dieser Temperatur belassen. Man kühlte mit  $10 \text{ K h}^{-1}$  auf Raumtemperatur ab (die Produkte waren röntgenographisch rein,  $^{13}\text{C}$ -MAS-NMR- und Raman-spektroskopisch konnten  $\text{Ca}_5\text{Cl}_3\text{C}_3$ -Verunreinigungen nachgewiesen werden). Ein nach dieser Methode erhaltenener Einkristall wurde unter einem Mikroskop in der Handschuhbox ausgewählt und in ein Markröhrchen eingeschmolzen.

Zur Herstellung des für die  $^{13}\text{C}$ -MAS-NMR-Spektroskopie benötigten  $\text{Ca}_5\text{Cl}_3(\text{C}_2)(\text{CBC})$  wurde die gleiche Synthesevorschrift verwendet, aber etwa 10 % des eingesetzten Graphits wurden durch  $^{13}\text{C}$  (99 %, amorph, Chemotrade) ersetzt.

Eingegangen am 14. Mai 1998 [Z11856]

**Stichwörter:** Bor • Calcium • Carbide • Festkörperchemie

- [1] a) W. Borchers, L. Stockem, *Z. Elektrochem.* **1902**, 8, 757–758; b) L. Wöhler, G. Rodewald, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1909**, 61, 54–90.
- [2] P. Ehrlich, B. Alt, L. Gentsch, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1956**, 283, 58–73.
- [3] H.-J. Meyer, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1991**, 593, 185–192.
- [4] H.-J. Meyer, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1991**, 594, 113–118.
- [5] a) O. Reckeweg, H.-J. Meyer, *Z. Naturforsch. B* **1997**, 52, 340–344; b) F. E. Rohrer, R. Nesper, *J. Solid State Chem.* **1998**, 135, 194–200.
- [6] H. Womelsdorf, H.-J. Meyer, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1994**, 620, 262–265.
- [7] Kristallstrukturanalyse von  $\text{Ca}_5\text{Cl}_3(\text{C}_2)(\text{CBC})$ : orangebraunes, transparentes Plättchen,  $0.18 \times 0.15 \times 0.04 \text{ mm}^3$ , Raumgruppe *Cmcm* (Nr. 63),  $a = 389.24(7)$ ,  $b = 1389.1(7)$ ,  $c = 1859.1(13) \text{ pm}$ ,  $V = 1005.2(9) \times 10^6 \text{ pm}^3$ ; Ca(1): 0, 0.1573(1),  $\frac{1}{4}$ ; Ca(2): 0, 0.3643(1), 0.5618(1); Ca(3): 0, 0.9446(1), 0.3586(1); Cl(1): 0, 0.8062(1),  $\frac{1}{4}$ ; Cl(2): 0, 0.2836(1), 0.4153(1); B: 0, 0.5355(5),  $\frac{1}{4}$ ; C(1): 0, 0.4501(4), 0.6735(3); C(2): –0.0629(36), 0.9635(4), 0.5106(4); Meßtemperatur:  $T = 293(2) \text{ K}$ ,  $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 71.073 \text{ pm}$ ), Enraf-Nonius-CAD4-Diffraktometer, Graphitmonochromator,  $\omega$ -Scan,  $6.26^\circ < 2\theta < 53.84^\circ$ , LP-Korrektur, keine weitere Absorptionskorrektur, Strukturlösung mit Direkten Methoden (SHELXS-86<sup>[19]</sup>) Strukturverfeinerung nach dem Volle-Matrix-kleinste-Quadrat-Verfahren mit SHELXL-97 gegen  $|F^2|$ ,<sup>[20]</sup> 46 freie Parameter, alle Atome anisotrop verfeinert,  $R1 = 0.041/0.065$ ;  $wR2 = 0.090/0.096$ ;  $\text{GOF} = 1.089/1.089$  (504 unabhängige Reflexe mit  $I > 4\sigma(I)$ /alle 642 unabhängigen Reflexen; max./min. Restelektronendichte  $0.52/ -0.97 \text{ e}^{-} \text{pm}^{-3}$ ). Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen

(Fax: (+49) 7247-808-666; E-mail: crysdata@fiz-karlsruhe.de), unter der Hinterlegungsnummer CSD-406847 angefordert werden.

- [8] M. Wörle, H.-J. Muhr, H. Meyer zu Altenhildesche, R. Nesper, *J. Alloys Comp.* **1997**, 260, 80–87.
- [9] M. Atoji, *J. Chem. Phys.* **1961**, 35, 1950–1960.
- [10] R. Hoffmann, H.-J. Meyer, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1992**, 607, 57–71.
- [11] „CACAO“: C. Mealli, D. Proserpio, *J. Chem. Ed.* **1990**, 67, 399–402.
- [12] A. Simon, H. Mattausch, R. Eger, R. E. Kremer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1210–1211; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1188–1189.
- [13] J.-F. Halet, J.-Y. Saillard, J. Bauer, *J. Less-Comm. Met.* **1990**, 158, 239–250.
- [14] H. Mattausch, A. Simon, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1764–1766; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1633–1635.
- [15] H. Hillebrecht, F. D. Meyer, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2655–2657; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2499–2500.
- [16] H. Mattausch, A. Simon, C. Felser, R. Dronskowski, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1805–1807; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1685–1687.
- [17] T. M. Duncan, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 2663–2668.
- [18] B. Wrackmeyer, K. Horchler, A. Sebald, L. H. Merwein, C. Ross II, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 821–823; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 807–809.
- [19] G. M. Sheldrick, SHELXS-86, Göttingen, **1990**; G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, 46, 467–473.
- [20] G. M. Sheldrick, SHELX-97, Göttingen, **1997**.

### Digitonin als chemischer Auslöser für die selektive Umwandlung von Riesenvesikeln\*\*

Fredric M. Menger\* und Jason S. Keiper

*In memoriam Craig West*

Die beachtenswerten und besonderen Eigenschaften von Lipiddmembranen haben das Interesse von vielen biologisch orientierten Chemikern geweckt. Mit fortlaufend genauerer Beschreibung des Verhaltens von Membranen entstehen ständig neue Herausforderungen. Dazu zählt die Abschätzung der Wechselwirkungen, die zwischen Doppelschichten und natürlichen oder synthetischen Verbindungen bestehen. Dafür sind Riesenvesikel<sup>[1–4]</sup> als kugelförmige Ansammlungen von Lipiddoppelschichten mit Durchmessern von 5–200  $\mu\text{m}$  ideale Studienobjekte, da sie die Möglichkeit bieten, Membranen zu isolieren, zu manipulieren und unter dem Lichtmikroskop direkt zu beobachten.<sup>[5]</sup> Hier beschreiben wir die Wirkungen von Digitonin auf Riesenvesikel. Digitonin (Abb. 1) ist ein Naturstoff aus der Familie der Saponine und wird aus dem Europäischen Fingerhut (*Digitalis purpurea*) isoliert. Das Steroid-Pentasaccharid ist dafür bekannt, in Erythrozyten und anderen cholesterinhaltigen Zellen Lyse hervorzurufen. Wie wir hier darlegen werden, wirkt Digitonin als selektiver chemischer „Auslöser“ auf die Membranschichtung.<sup>[6]</sup>

[\*] Prof. Dr. F. M. Menger, J. S. Keiper  
Department of Chemistry, Emory University  
Atlanta, GA 30322 (USA)  
Fax: (+1) 404-727-6586

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (USA) unterstützt.

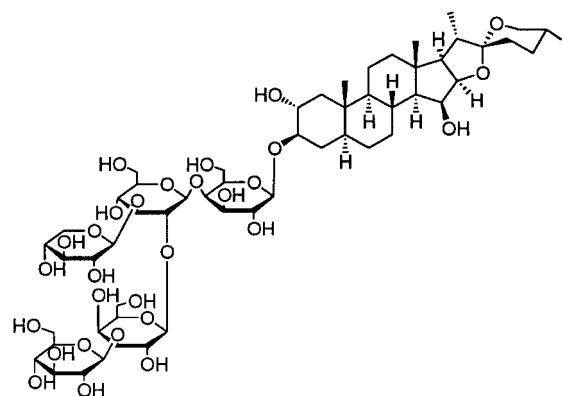


Abb. 1. Struktur des Steroid-Saponins Digitonin aus *Digitalis purpurea*.

Saponine wie Digitonin werden als Schäummittel, Waschmittel, Süßstoffe und Zusatzstoffe vielfältig eingesetzt,<sup>[7, 8]</sup> doch vermutlich am faszinierendsten ist ihre Fähigkeit, in Lipidmembranen einzudringen und 1:1-Komplexe mit Cholesterin zu bilden.<sup>[9–11]</sup> Diese nicht genau bekannte Komplexierung wird für die lytische Aktivität bei cholesterinhaltigen Zellen verantwortlich gemacht. Es wurden bereits Lösungen kleiner Vesikel (ca. 100 nm Durchmesser) verwendet, um die Saponin-induzierte Zerstörung zu untersuchen.<sup>[12–20]</sup> Wir nutzten den Vorteil, daß Riesenvesikel unter dem Lichtmikroskop sichtbar sind, um die Wirkung von Digitonin auf cholesterinhaltige Phospholipid-Membranen zu untersuchen.

Riesenvesikel aus Phosphatidylcholin (z. B. 1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (SOPC) oder 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC)) wiesen in Abwesenheit membrangebundener Steroide keine sichtbaren morphologischen Veränderungen auf, selbst nach über 100 Digitonin-Injektionen (je  $2.7 \pm 0.5$  pL mit  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Dagegen ergab der Einschluß eines Steroids wie Cholesterin oder Ergosterin eine reproduzierbare Digitonin-induzierte Zersetzung der Vesikel. So zerstörte eine einzige externe Mikroinjektion von Digitonin (2.7 pL mit  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) im Abstand von 5  $\mu\text{m}$  zu einem Riesenvesikel aus SOPC/50% Cholesterin die Struktur in 1.5 s völlig. Es blieb nur eine Masse aus Niederschlägen und amorphem Lipidmaterial zurück.

Bei noch geringeren Konzentrationen von injiziertem Digitonin oder einem geringeren Prozentsatz von membrangebundenem Cholesterin konnten dazwischenliegende Morphologien beobachtet werden. Zum Beispiel entstanden durch Hinzufügen von Digitoninlösung (2.7 pL mit  $1.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu einem POPC/33%-Cholesterin-Riesenvesikel übergangsweise becherförmige („nanocup“-) Strukturen (Abb. 2).<sup>[21]</sup> Ein stabiler Komplex am Rand des Risses scheint den Wiederverschluß der Kugel zu verhindern. Tatsächlich zerfiel das Vesikel innerhalb von 30 s durch die weitere Ausdehnung der kreisförmigen Öffnung völlig. Interessanterweise behielt der intakte Teil des Vesikels während des gesamten Vorgangs seine kugelförmige Wölbung.

In etwa 25 % der Versuche wurden Fasern von 3–10  $\mu\text{m}$  Länge am Rande der Vesikel beobachtet (Abb. 3). Auch in submikroskopischen Vesikeln wurden elektronenmikroskopisch Fasern entdeckt,<sup>[17–19]</sup> von denen angenommen wird, daß sie nur aus Saponin-Steroid-Komplexen bestehen. Damit

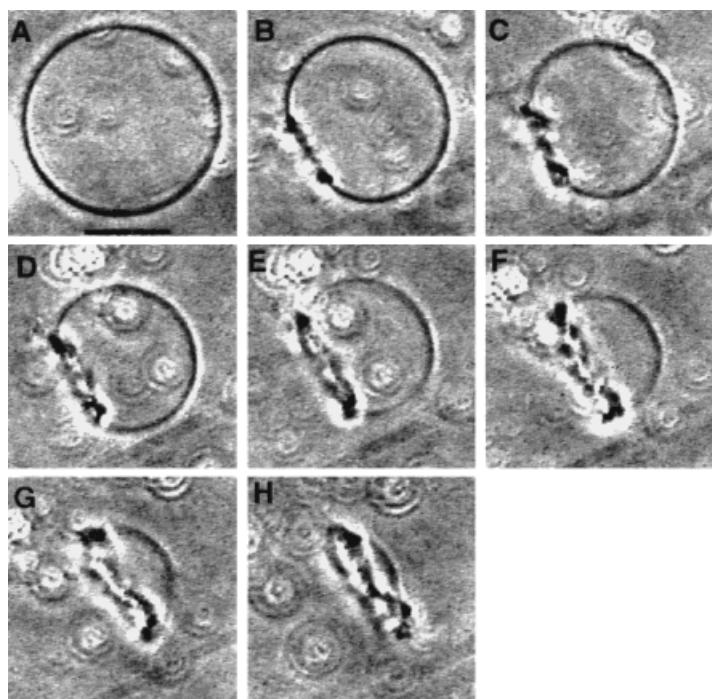


Abb. 2. Zerreissen und graduelle Zersetzung eines 67  $\mu\text{m}$  großen Vesikels aus POPC/33 Mol-% Cholesterin nach einmaliger Injektion einer Digitoninlösung (2.7 pL;  $1.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Als Übergang sind „nanocup“-Morphologien (Mikrophotographien D–F) sichtbar. Balken: 25  $\mu\text{m}$ ; Zeit: 30 s.

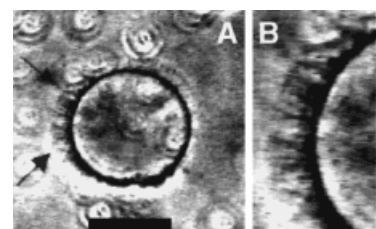


Abb. 3. A) Nach vier Injektionen Digitonin (je 2.7 pL mit  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) über einen Zeitraum von 16 s erstrecken sich faserige Röhren von der Oberfläche eines zerrissenen Vesikels aus SOPC/10 Mol-% Cholesterin. Die Röhren zogen sich 10 s nach der anfänglichen Bildung auf die Oberfläche der Struktur zurück. B) Vergrößerte Ansicht der faserigen Strukturen. Balken: 25  $\mu\text{m}$ .

überschneiden sich kleine und große Vesikel bezüglich ihres Verhaltens trotz stark unterschiedlicher Krümmung. Im Fall der Riesenvesikel existieren die Fasern jedoch nur vorübergehend: Nach weniger als 10 s werden sie auf die Vesikeloberfläche zurückgezogen. Die Visualisierung solcher dynamischer Prozesse ist ein großer Vorteil der Lichtmikroskopie gegenüber der Elektronenmikroskopie.

Abbildung 4 gibt das molekulare Verhältnis von Digitonin zu Cholesterin an, das zur Zerstörung von SOPC/Cholesterin-Riesenvesikeln nötig ist. Die Datenpunkte beruhen auf der minimal benötigten Menge an injiziertem Digitonin, um in einem isolierten Riesenvesikel einen Riß hervorzurufen. Zwei Schlußfolgerungen lassen sich aus den Ergebnissen ableiten: a) Sowohl mit 10 % Cholesterin (oberer Graph) als auch mit 50 % Cholesterin (unterer Graph) ist die Vesikelgröße kein entscheidender Faktor innerhalb des Bereichs von 30–70  $\mu\text{m}$  Durchmesser; b) das Digitonin/Cholesterin-Verhältnis sinkt von ca. 3 (bei 10 % Cholesterin) auf ca. 0.15 (bei

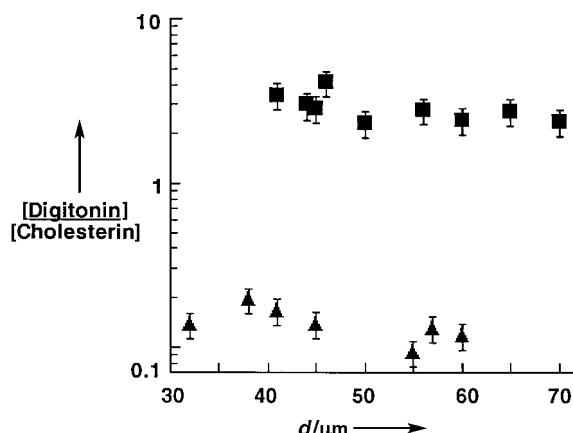


Abb. 4. Das molekulare Verhältnis von Digitonin zu Cholesterin für die Mikroinjektions-Experimente mit SOPC/Cholesterin-Vesikel, ausgehend von der minimal benötigten Menge an injizierter Digitoninlösung, um Riesenvesikel einer bestimmten Größe und Zusammensetzung zu zerreißen. (v) SOPC/10 Mol-% Cholesterin; (o) SOPC/50 Mol-% Cholesterin. Die Fehlerbalken betragen  $\pm 19\%$ , bezogen auf die Standardabweichung des Injektionsvolumens. Die Zahl der Cholesterinmoleküle pro Vesikel wurden bei  $15^\circ\text{C}$  über das Fläche/Molekül-Verhältnis nach der Methode von Needham und Nunn<sup>[22]</sup> bestimmt.

50% Cholesterin) ab; Cholesterin führt also eindeutig zur erhöhten Empfindlichkeit der SOPC-Doppelschichten gegenüber Digitonin und der dadurch ausgelösten Zerstörung. Normalerweise nimmt man von Cholesterin an, daß es die Widerstandsfähigkeit von Membranen gegenüber streßbedingtem Zerreißen erhöht.<sup>[1, 23]</sup> Die Bildung eines unlöslichen Digitonin/Cholesterin-Komplexes innerhalb der Membran<sup>[13, 19, 20]</sup> muß daher jeglichen stabilisierenden Effekt von Cholesterin aufheben.

Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen waren wir in der Lage, das Zerreißen von Riesenvesikeln in einer Gruppe von zwei oder mehreren gezielt auszulösen. Die Selektivität beruhte dabei auf dem Cholesterinanteil der Vesikel. Abbildung 5 A zeigt zwei gegensätzlich geladene Vesikel, die elektrostatisch bedingt „zusammengeschchnappt“ sind, wie bereits beschrieben.<sup>[6]</sup> Das obere, kationische Vesikel enthielt POPC, Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB) und Cholesterin im molaren Verhältnis von 78/2/20. Das untere, anionische Vesikel enthielt POPC sowie 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-phosphoglycerin (POPG) im molaren Verhältnis von 98/2 und war somit frei von Cholesterin. Die entsprechenden Vesikel mit nur 2% kationischen und anionischen Lipidbestandteilen hafteten mehr als 2 h unverändert aneinander. Wurde aber das System einer einzigen Injektion von Digitonin ( $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ausgesetzt, dann brachen die kationischen Vesikel, die 20 Mol-% Cholesterin enthielten, auf (Abb. 5 B) und kollabierten auf das stabile anionische Vesikel (Abb. 5 C, D). Eine teilweise Zersetzung auf dem anionischen Vesikel konnte durch eine Bildprofilanalyse bestätigt werden (Abb. 5 E, F), bei der eine bedeckte Membran in Region 2 entdeckt wurde. Dieses selektive Phänomen ließ sich leicht reproduzieren. Wurde Cholesterin dem anionischen Vesikel zugesetzt, dann zerriß dieses und kollabierte auf sein Nachbarvesikel.

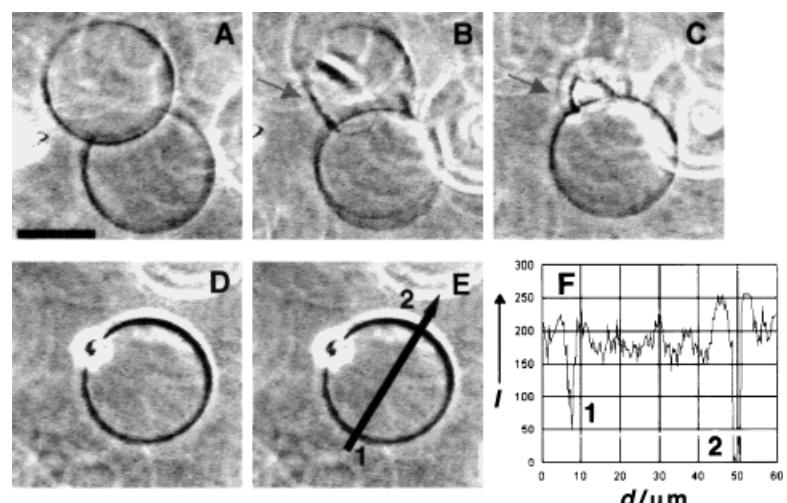


Abb. 5. A)  $34 \mu\text{m}$  große cholesterinhaltige Vesikel (POPC/DDAB/Cholesterin, 78/2/20 Mol-%) wurden selektiv zerriissen, während sie an einem  $40 \mu\text{m}$  großen, cholesterinfreien Vesikel (POPC/POPG, 98/2 Mol-%) hafteten. Die Mikrophotographien A–C zeigen den fortschreitenden Zerfall des Vesikels nach einer einmaligen Injektion von Digitoninlösung ( $2.7 \text{ pL}$  mit  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $t \sim 2 \text{ s}$ ). Die Mikrophotographie D zeigt das intakt gebliebene Vesikel, dessen teilweise Bedeckung durch ein Intensitätsprofil bestätigt wird (E, F). Der helle Punkt auf dem Vesikel bestand aus einem Niederschlag oder einem abnormalen Lipidcluster. Balken:  $25 \mu\text{m}$ .

Der Beschichtungsprozeß wurde auch mit der Epi-Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Abbildung 6 A zeigt zwei aneinander haftende Vesikel, das obere mit jeweils 12 Mol-% Cholesterin und 4-(4-(Dihexadecylamino)styryl)-N-methylpyridiniumiodid (DiA; einem membranlöslichen Fluoreszenzfarbstoff). Da das untere Vesikel keinen dieser Bestandteile enthielt, fluoreszierte nur das obere Vesikel mit dem Farbstoff (Abb. 6 B). Bei Zugabe von Digitonin zerplatzte das obere Vesikel und kollabierte auf das untere, was eine aufgrund der Fluoreszenz beobachtbare teilweise Bedeckung auslöste (Abb. 6 C).

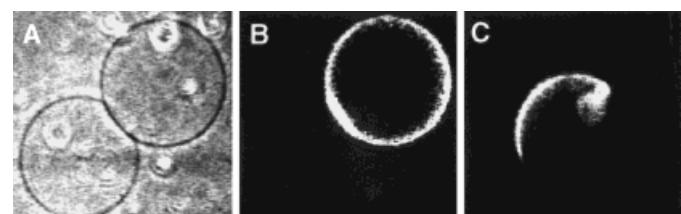


Abb. 6. Ein durch A) Phasenkontrast und B) Epi-Fluoreszenz sichtbares  $70 \mu\text{m}$  großes cholesterinhaltiges, fluoreszenzmarkiertes Vesikel (POPC/DDAB/DiA/Cholesterin, 85/2.5/0.5/12 Mol-%, obere rechte Ecke) hängt an einem  $67 \mu\text{m}$  großen POPC/POPG-Vesikel (98/2 Mol-%). C) Epi-Fluoreszenz-Ansicht eines statischen Vesikels mit einer Lipidschicht des fluoreszenzmarkierten Vesikels, nachdem es durch die Zugabe von Digitonin kollabiert ist ( $2.7 \text{ pL}$ ;  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Balken:  $25 \mu\text{m}$ .

Diese Arbeit eröffnet neue Möglichkeiten für eine selektive Freisetzung: Ein kontrollierbarer Prozentsatz einer ungleichartigen Population von Riesenvesikeln kann jetzt chemisch dazu gebracht werden, ihren Inhalt freizugeben, während der Rest der Population intakt bleibt.<sup>[24]</sup>

## Experimentelles

Digitonin (Boehringer Mannheim) wurde nach der Methode von Kun et al. gereinigt (45%).<sup>[25]</sup> Elementaranalyse: ber. für C<sub>50</sub>H<sub>92</sub>O<sub>29</sub>: C 54.71, H 7.54%; gef. C 54.24, H 7.69%. Partikelgröße (Coulter N4 Plus) von Dispersionen von gereinigtem Digitonin in gefiltertem Wasser (Milli-Q) enthielten Strukturen von 3–8 nm Größe bei Konzentrationen von 0.5–2.5 mg mL<sup>-1</sup>, was auf das Vorhandensein von micellen- oder prämicellenartigen Aggregaten hindeutet. DiA wurde von Molecular Probes (USA) bezogen. Die Vesikel wurden nach der von Angelova et al.<sup>[26]</sup> entwickelten „Electroformation“-Methode hergestellt. Die folgende Vorgehensweise war repräsentativ und wurde je nach Zusammensetzung leicht variiert: Ein Tropfen (1 µL) der Lösung des Lipids oder der Lipidmischung (0.25–1.0 mg mL<sup>-1</sup> in Diethylether/Methanol, 9/1) wurde auf zwei parallelen Pt-Drähten (0.5 mm Durchmesser) des Apparates aufgebracht. Nachdem der Film mit einem Stickstoffstrom 45 min getrocknet worden war, wurde der Apparat an einen Wechselstrom angeschlossen, der von einem Funktionsgenerator (33120A) erzeugt wurde, der an ein Oszilloskop (54600B, beide von Hewlett-Packard) gekoppelt war (anfängliches  $\nu$  = 10 Hz;  $V$  = 0.1 V), und die Kammer wurde mit  $\approx$  1.5 mL gefiltertem Wasser gefüllt. Die Spannung (Oszilloskopanzeige) wurde bis auf 3 V erhöht, während die Frequenz stufenweise bis auf 0.5 Hz innerhalb von 2–5 h gesenkt wurde. Kugelförmige Riesenvesikel (vermutlich einschichtig oder aus nur wenigen Doppelschichten bestehend)<sup>[27]</sup> mit Durchmessern von 10–100 µm wurden nach dem Abschalten des Stroms erhalten. Die Vesikelherstellungen nach der „Electroformation“-Methode sowie die nachfolgenden Experimente wurden bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

Haltepipetten und Injektionspipetten wurden aus G-1-Kapillarröhren von Narishige mit einem horizontalen P-97-Pipettenzieher von Sutter hergestellt. Die Haltepipetten wurden weiter mit einem MF-9-Mikroamboß von Narishige poliert. Die Handhabung der Vesikel erfolgte mit einem Mikromanipulationsgetriebe von Narishige, das an einen PLT-188-Picoinjektor von Nikon angeschlossen war. Die Vesikel wurden mit den Haltepipetten gegriffen und in der Nähe des Kammerbodens losgelassen, um a) den Einfluß von zufälligen Luftströmen, die das Wasser durchströmen, zu verringern und b) den Vesikel-Draht-Lipidhaltestrang zu zerreißen.<sup>[27]</sup> Der Haltestrang, der bei durch die „Electroformation“-Methode hergestellten Vesikeln zu finden war, ermöglicht den Austritt von Wasser, was bedeutet, daß angebundene Vesikel keine vollständig geschlossenen Kugeln sind. Das Fehlen eines Haltestrangs bei den nach unserer Methode hergestellten Vesikeln wurde zum einen über Epi-Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen durch die Tatsache bestätigt, daß diese Vesikel nicht erneut an den Draht banden, wenn sie losgelassen wurden (wie es angebundene Vesikel tun). Mikroinjektionen von Digitoninlösungen wurden mit einem Druck von 0.21 bar, in einer Zeit von 50 ms und einem Ausgleichsdruck (um die Kapillaraktion zu erleichtern) von 0.042–0.055 bar durchgeführt. Das Injektionsvolumen, das über die durch optische Mikroskopie gemessene Leerung der Pipette abgeschätzt wurde,<sup>[28]</sup> betrug durchschnittlich  $2.7 \pm 0.5$  pL. Externe Mikroinjektionen wurden 5–10 µm von der Vesikeloberfläche entfernt vorgenommen.

Zur Probenuntersuchung wurde eine Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt mit einem Diaphot-TMD-Mikroskop von Nikon zusammen mit einer MTI-CCD-72-Festphasenkamera von Dage, einem AG-1960-SVHS-Videorecorder von Panasonic, einem Argus-10-Bildprozessor von Hamamatsu und einem Schwarzweißmonitor von Sony. Dieses System wurde an eine Micron-Millenia-166-PC-Workstation mit einer Image-Pro-Plus-Bildverarbeitungs-Software angeschlossen, von der Abbildungen mit einem Tektronix-Phaser-440-Farbdrucker gedruckt wurden. Die Epi-Fluoreszenzmikroskopie wurde mit derselben Ausstattung durchgeführt, mit Ausnahme der CCD-Kamera, die durch eine MTI-VE-1000SIT-Schwachlicht-Kamera von Dage ersetzt wurde sowie der verwendeten Filterkombination von entweder Nikon V-2A ( $\lambda_{\text{Anregung}} = 380$ –425 nm;  $\lambda_{\text{Filter}} = 450$  nm) oder B-2A ( $\lambda_{\text{Anregung}} = 450$ –490 nm;  $\lambda_{\text{Filter}} = 520$  nm).

- [1] E. Evans, D. Needham, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 4219.
- [2] D. Needham in *Permeability and Stability of Lipid Bilayers* (Hrsg.: E. DiSalvo, S. Simon), CRC Press, Boca Raton, FL, **1995**, S. 49–76.
- [3] H.-G. Döbereiner, E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, M. Wortis, *Phys. Rev. E* **1997**, *55*, 4458.
- [4] F. M. Menger, K. D. Gabrielson, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2260; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2091.
- [5] F. M. Menger, J. S. Keiper, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 888.
- [6] F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2602; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2489.
- [7] K. Hostettmann, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, **1995**.
- [8] D. C. Van Setten, G. van de Werken in *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine* (Hrsg.: G. R. Waller, K. Yamasaki) Plenum Press, New York, **1996**, S. 185–193.
- [9] A. M. Glauert, J. T. Dingle, J. A. Lucy, *Nature* **1962**, *196*, 953.
- [10] S. Takagi, H. Otsuka, T. Akiyama, U. Sankawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 3485.
- [11] P. Muhr, W. Likussar, M. Schubert-Zsilavecz, *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 137.
- [12] R. Segal, I. Milo-Goldzweig, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *512*, 223.
- [13] T. Akiyama, S. Takagi, U. Sankawa, S. Inari, H. Saitō, *Biochemistry* **1980**, *19*, 1904.
- [14] M. Nishikawa, S. Nojima, T. Akiyama, U. Sankawa, K. Inoue, *J. Biochem.* **1984**, *96*, 1231.
- [15] M. Hu, K. Konoki, K. Tachibana, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1299*, 252.
- [16] E. A. J. Keukens, T. de Vrije, H. de Boer, C. H. J. P. Fabrie, R. A. Demel, W. M. F. Jongen, B. de Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1110*, 127.
- [17] R. G. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *774*, 151.
- [18] P. M. Elias, J. Goerke, D. S. Friend, *J. Cell. Biol.* **1978**, *78*, 577.
- [19] E. A. J. Keukens, T. de Vrije, C. van den Boom, P. de Waard, H. H. Plasman, F. Thiel, V. Chupin, W. M. F. Jongen, B. de Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1240*, 216.
- [20] E. A. J. Keukens, T. de Vrije, L. A. M. Jansen, H. de Boer, M. Janssen, A. I. P. M. de Kroon, W. M. F. Jongen, B. de Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1279*, 243.
- [21] F. M. Menger, S. J. Lee, *Langmuir* **1995**, *11*, 3685.
- [22] D. Needham, R. S. Nunn, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 997.
- [23] E. Evans, D. Needham, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 267.
- [24] Über Fortschritte in dieser Richtung mit submikroskopischen Vesikeln wurde berichtet in: Y. Nagawa, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7237.
- [25] E. Kun, E. Kirsten, W. N. Piper, *Methods Enzymol.* **1979**, *55*, 115.
- [26] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303.
- [27] L. Mathivet, S. Cribier, P. F. Devaux, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1112.
- [28] S. J. Lee, Dissertation, Emory University (USA), **1996**.

Eingegangen am 16. Juli 1998 [Z12159]

**Stichwörter:** Cytomimetische Chemie • Membranen • Phospholipide • Saponine • Vesikel