

# Kristalline Lipiddomänen: Charakterisierung durch Röntgenbeugung und ihre Rolle in der Biologie

Roy Ziblat, Leslie Leiserowitz und Lia Addadi\*

Lipiddomänen · Lipide · Zellmembran ·  
Röntgenbeugung

**B**iologische Membranen enthalten Tausende verschiedenartiger Lipide, die sich in ihren Alkylketten, ihren Kopfgruppen und ihrem Sättigungsgrad unterscheiden. Es wird geschätzt, dass 5 % der Gene des menschlichen Genoms für die Regulation der Lipidzusammensetzung von Zellmembranen zuständig sind. Eine Erklärung für diese Vielfalt findet sich zumindest ansatzweise in der Fähigkeit von Lipiden, in spezifische Domänen zu segregieren, die wichtig für die Zellfunktion sind. Immer häufiger wurden Röntgenbeugungsmethoden genutzt, um die Packung und das Phasenverhalten von Lipiden in Membranen zu charakterisieren. Kristalline Domänen wurden in synthetischen Membranen mithilfe von Weit- und Kleinwinkel-Röntgenstreuung sowie durch Röntgenbeugung unter streifendem Einfall untersucht. In diesem Kurzaufsatz fassen wir jüngste Ergebnisse zusammen, die mit den verschiedenen Röntgenmethoden erhalten wurden, und diskutieren die Beziehung zwischen kristallinen Domänen und flüssig-geordneten Domänen, die mit komplementären Methoden untersucht wurden, sowie die Bedeutung von kristallinen Domänen für funktionelle Lipiddomänen in biologischen Membranen.

## 1. Lipide der Zellmembran und Röntgenstreuung

Zellmembranen sind dünne Schichten bestehend aus zwei gegenüberliegenden Lipidmonoschichten. Sie fassen Zellen und Zellkompartimente ein und wirken als selektiv permeable Barrieren, die auf diese Weise den zellulären Transport von Molekülen regulieren. Neben ihrer Funktion als Umgrenzungen können Membranen auch als aktive Schnittstellen wirken, an denen biologische Prozesse stattfinden. Tatsächlich kontrollieren Zellen die Reaktionsgeschwindigkeiten spezifischer biologischer Vorgänge, indem sie die Lipid-

zusammensetzung ihrer Membranen verändern. In manchen Fällen laufen chemische Reaktionen an der Grenzfläche schneller ab als im Volumen, da Rotations- und Translationsdiffusion der Reaktionspartner eingeschränkt werden. Zellplasmamembranen machen normalerweise nur 2–5 % der gesamten Membranmasse aus; der Hauptanteil befindet sich innerhalb der Zellen, in den Organellen.<sup>[1]</sup> Das Verhältnis von Membranoberfläche zu Zellvolumen ist deshalb außerordentlich hoch, was darauf hinweist, dass Prozesse an den Grenzflächen essenziell für das Überleben und die Funktion der Zelle sind.

Lipide in der Doppelschicht segregieren in unterschiedliche Lipiddomänen. Geordnete Lipiddomänen – auch als „Lipid-Flöße“ oder „Rafts“ bezeichnet – wurden intensiv erforscht, seitdem ihre Bedeutung als Organisationszentren für den Zusammenbau von Signalmolekülen und für den Proteintransport durch Membranen festgestellt wurde.<sup>[2]</sup> Membranproteine partitionieren selektiv in diesen Domänen, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung und Organisation unterscheiden. Daraus folgt, dass die Anordnung von Lipiden zu Domänen direkt oder indirekt mit der Steuerung der Zellfunktion zusammenhängt. Ob und in welchem Ausmaß

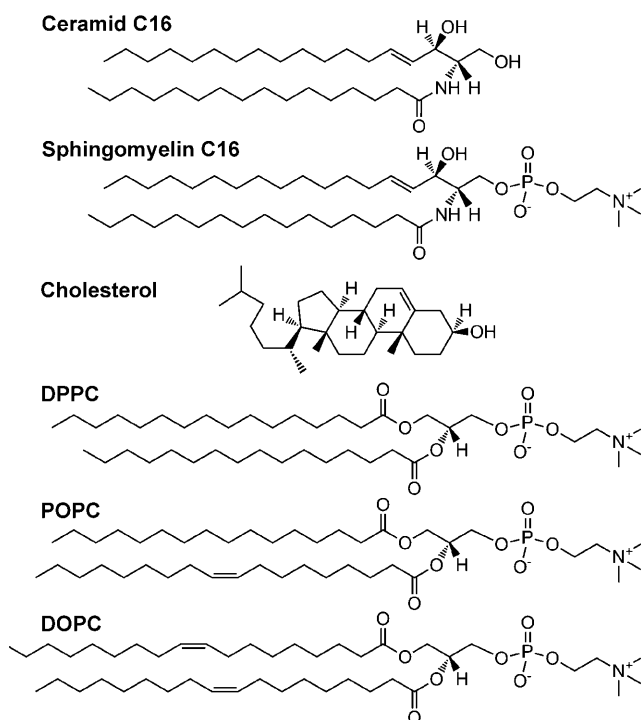
[\*] R. Ziblat, Prof. L. Addadi  
Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science  
76100 Rehovot (Israel)  
Fax: (+ 972) 8-934-4136  
E-Mail: lia.addadi@weizmann.ac.il  
Homepage: [http://www.weizmann.ac.il/sb/faculty\\_pages/Addadi/home.html](http://www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Addadi/home.html)

Prof. L. Leiserowitz  
Department of Materials and Interfaces  
Weizmann Institute of Science  
76100 Rehovot (Israel)

diese Domänen einen geordneten periodischen Aufbau haben, der durch Röntgenbeugung detektiert werden kann, ist noch immer Gegenstand der Debatte und Kernthema dieses Kurzaufsatzes.

### 1.1. Lipidmoleküle

Lipide der Zellmembran können in drei Hauptklassen unterteilt werden: 1) Glycerolipide (Fettsäureester des Glycerols), 2) Sphingolipide (Fettsäureamide des aliphatischen Aminoalkohols Sphingosin) und 3) Sterole (Schema 1). Das häufigste Sterol in Säugerzellen ist Cholesterol. Cholesterol



Schema 1.

spielt eine wichtige Rolle für die dynamischen und mechanischen Eigenschaften von Membranen. Eine übermäßige Anreicherung von Cholesterol in den Zellen ist mit mehreren Krankheiten<sup>[3]</sup> verbunden, z. B. Atherosklerose<sup>[4]</sup> und grauem Star.<sup>[5]</sup> Große Mengen von Cholesterolmonohydrat-Kristallen werden in Gallensteinen<sup>[6]</sup> und in Schaumzellen<sup>[7]</sup> in atherosklerotischen Plaques gefunden.

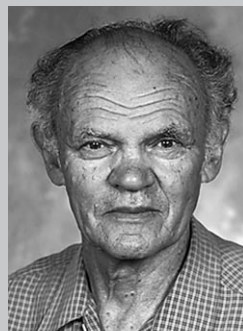
Phosphocholinderivate von Glycerolipiden und Sphingolipiden bilden diejenige Gruppe von Lipiden, die in den höchsten Konzentrationen in Zellen vorkommt.<sup>[8]</sup> Ungesättigte Lipide wie Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin (POPC) und Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), die eine oder mehrere *cis*-Doppelbindungen in den Fettsäureketten aufweisen, können nicht zu geordneten Doppelschichtstrukturen packen, weil die Doppelbindungen Knicke in den Alkylketten erzeugen. Außer dass bekannt ist, dass diese Moleküle keine kristallinen Domänen *in vitro* bilden können, weiß man auch, dass sie sich in den ungeordneten Regionen der Zellmembran anreichern.<sup>[8]</sup>



Roy Ziblat erhielt seinen BSc in Physik und Mathematik 2003 und seinen MSc 2005 an der Hebrew University in Jerusalem für Arbeiten über photonische Kristalle und die Implementierung von Oberflächenplasmonen auf Zellen. Er promovierte am Structural Biology Department des Weizmann Institute of Science in Rehovot (Israel) über die Charakterisierung von Lipiddomänen durch Röntgenbeugung. Als Postdoktorand beschäftigt er sich zurzeit mit der Erforschung von Lipidmembranen.



Lia Addadi erwarb ihren BSc und MSc in Organischer Chemie und promovierte 1979 im Bereich Strukturchemie am Weizmann Institute of Science. An gleicher Stelle wurde sie 1988 zum Associate Professor und 1993 zum Full Professor ernannt. Ihre Forschungsinteressen gelten der Stereochemie und molekularen Erkennung an biologischen Grenzflächen, der Biomineralisation in Organismen, Mechanismen der Zelladhäsion und der Antikörpererkennung durch organisierte molekulare Aggregate, insbesondere durch Lipiddomänen in Zellmembranen.



Leslie Leiserowitz studierte Ingenieurwissenschaften und Physik in Kapstadt (Südafrika) sowie Festkörperchemie am Weizmann Institute of Science. Nach einem Postdoktorat in Heidelberg kehrte er an das Weizmann Institute zurück, wo er in Zusammenarbeit mit M. Lahav über Reaktionswege in Kristallen forscht. Seine jüngeren Arbeiten gelten der pathologischen Kristallbildung (Cholesterol, Bildung von biogenem Hämozyon) und der laserinduzierten Anordnung von Kristallfilmen.

Dagegen sind gesättigte Lipide wie Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) oder Sphingomyelin (SM) und dessen Vorstufe Ceramid aufgrund der linearen Geometrie ihrer Alkylketten leicht in der Lage, zu geordneten Strukturen in künstlichen Lipidschichten zu packen. Vor allem DPPC,<sup>[9]</sup> SM<sup>[10]</sup> und Ceramid<sup>[11]</sup> sind deshalb als Vertreter der gesättigten Glycerolipide bzw. Sphingolipide durch Röntgenbeugung untersucht worden. Die sogenannten detergensresistenten Membrandomänen (DRMs), die direkt aus Zellmembranen extrahiert werden, enthalten erhöhte Mengen an Cholesterol und Sphingomyelin, die demzufolge als die Hauptkomponenten von Lipid-Rafts angesehen werden.<sup>[2b,12]</sup>

### 1.2. Röntgenstudien

Die ersten Röntgenstudien an Lipiden wurden in den 1920er Jahren an 3D-Kristallen von getrockneten Lipiden durchgeführt und boten Einblicke in die Wechselwirkungen der Kohlenwasserstoffketten. Die Strukturinformationen, die in diesen ersten Studien erbracht wurden, wurden jedoch in Zweifel gezogen, weil die Lipide nicht immer in einer lamellaren Struktur organisiert waren und die Kristalle Verunreinigungen enthielten.<sup>[13]</sup> Beginnend in den 1980er Jahren

lieferten dann Röntgenstreuungsstudien an hydratisierten Lipidschichten die ersten soliden Daten über den Schichtabstand und die Dicke der lamellaren Strukturen.<sup>[14]</sup> Beobachtete Schwankungen dieser Parameter wiesen auf Phasenübergänge oder Phasentrennungen hin. Mit der Entwicklung der Röntgenbeugung unter streifendem Einfall (grazing incidence X-ray diffraction; GIXD) an flüssigen Grenzflächen in den späten 80er Jahren<sup>[15]</sup> gelang ein echter Durchbruch auf dem Gebiet, und es war nun möglich, einzelne Lipidschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu untersuchen. Der vermutlich wichtigste konzeptionelle Beitrag dieser frühen Studien war der Beweis, dass sich Monoschichten amphiphiler Moleküle – obwohl diese klein und beweglich sind<sup>[17]</sup> – spontan in kristalline 2D-Domänen selbstorganisieren können.<sup>[16]</sup> Die gängige Meinung bis dahin basierte hauptsächlich auf Daten von Druck-Fläche-Isothermen und war, dass solche Schichten nicht kristallin sein können, es sei denn unter Druck. Die Beugungsstudien an Lipidmonoschichten bewiesen das Gegenteil.

### 1.3. Röntgenmethoden

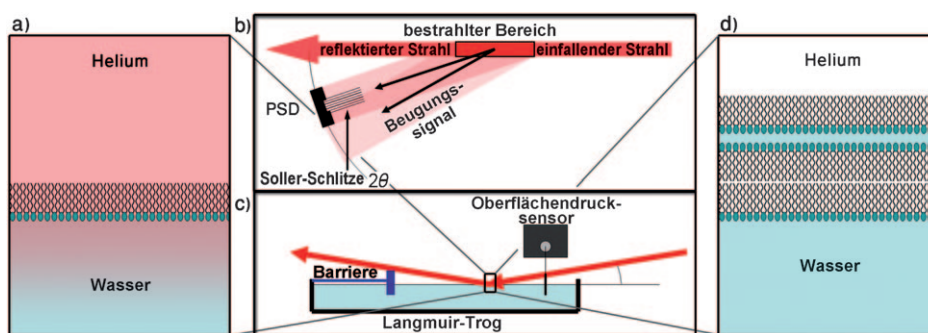
Die hauptsächlichsten Methoden zur Untersuchung kristalliner Lipiddomänen in dünnen Schichten sind die Klein- und Weitwinkelröntgenstreuung (SAXS und WAXS) und die GIXD, die an Monoschichten, Doppelschichten oder Multischichten unter verschiedenartigen Bedingungen angewendet werden können.

Konventionelle Röntgenstreuungsexperimente liefern Beugungsintensitäten, die proportional zum Volumen der beugenden Probe sind. Bei 2D-Filmen mit ihrem kleinen Volumen werden daher keine detektierbaren Signale erhalten. Bei der GIXD trifft der Röntgenstrahl die Probe in einem Einfallswinkel, bei dem evaneszente Wellen auftreten. Diese haben ein exponentiell abklingendes elektromagnetisches Feld (rot in Abbildung 1a), und das Trägermaterial trägt nicht zur Hintergrundstreuung bei. Die Messung ist deshalb außerordentlich empfindlich für Proben an der

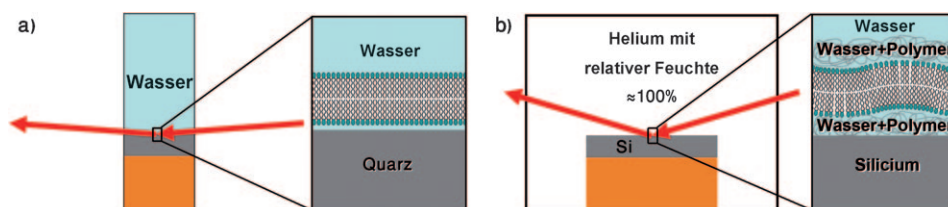
Grenzfläche, wie Monoschichten oder kollabierte Multischichten (Abbildung 1). Monoschichten sind allerdings keine idealen Modelle für Zellmembranen, weil der hydrophobe Teil der Moleküle der Atmosphäre zugewandt ist und somit die Wechselwirkung mit einem gegenüberliegenden Lipidblatt, wie sie in einer Doppelschichtmembran auftritt, fehlt. Hydratisierte Doppelschichten sollten in dieser Hinsicht besser geeignet sein.

Um bei einer Membrandoppelschicht mit hydrophobem Inneren und hydrophiler äußerer Oberfläche die Strukturintegrität zu gewährleisten, müssen beide Seiten der Doppelschicht benetzt sein. Allerdings sind GIXD-Experimente an Lipiddoppelschichten wegen der starken Hintergrundstreuung von flüssigem Wasser sehr schwer auszuführen. Ein Weg, um GIXD-Messungen an einzelnen Lipiddoppelschichten zu realisieren, ist die Anwendung hochenergetischer Röntgenstrahlen, deren Strahlabschwächung durch Wasser gemildert ist (Abbildung 2a).<sup>[9e,18]</sup> Eine neue Methode, die bei Proben auf einem Polymerträger erfolgreich eingesetzt wurde, beinhaltet die Bestrahlung der Probe mit niederenergetischen Röntgenstrahlen in Gegenwart einer dünnen ( $<1\ \mu\text{m}$ ) Wasserschicht auf der Doppelschichtprobe (Abbildung 2b).<sup>[9g,19]</sup> Diese GIXD-Technik, die bei hoher Feuchte angewendet wird, liefert ein relativ starkes Signal und ermöglicht Studien an kristallinen Domänen mit niedriger Beugungsintensität (Abbildung 3).

Die Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS, Abbildung 4) ist eine Methode, die zur Bestimmung mittlerer Größen von Partikeln in Lösung genutzt wird. SAXS erwies sich als nützliches Werkzeug zur Untersuchung lamellarer Strukturen und liefert Informationen über Lipiddoppelschichtphasen, Schichtabstände und Schichtdicken im Bereich weniger Nanometer bis zu mehreren 10 nm.<sup>[20]</sup> Die Weitwinkelröntgenstreuung (WAXS) liefert Informationen über Lipidpackungen auf der Å-Skala, sofern kristalline Phasen in den Doppelschichten vorhanden sind. Informationen über die Verkipfung der Moleküle können durch Verwendung ausge richteter Multischichtproben erhalten werden. SAXS/WAXS-Studien an multilamellaren Vesikeln liefern zusätzli-



**Abbildung 1.** Prinzip von GIXD-Messungen an a) einer Monoschicht und d) kollabierten Schichten. b,c) Die dünnen Schichten werden auf einem Langmuir-Trog an der Luft-Wasser-Grenzfläche abgeschieden, und die Beugungssignale werden mit einem ortsempfindlichen Detektor (PSD) aufgezeichnet, der die Probe entlang dem Winkel  $\theta$  abtastet. Reflektivitätsmessungen liefern ein gemittelttes Elektronendichteprofil der Probe, aus dem verlässliche und detaillierte Informationen über die Dicke und Wellenform der Probe abgeleitet werden können. Oberflächen- und Volumeneigenschaften, wie Oberflächendruck der Lipidschicht, Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und der Einschluss von Proteinen oder anderen Molekülen können eingestellt werden. Wird die Monoschicht über einen bestimmten Oberflächendruck hinaus komprimiert, kann die Monoschicht (je nach Zusammensetzung der Probe) zu Multischichten kollabieren. Messungen an kollabierten Multischichten bieten keine Informationen über die Zahl der Schichten, ihre Homogenität, den Oberflächendruck und den wasserhaltigen Zwischenraum zwischen den Schichten. Darüber hinaus zwingt die Luft-Wasser-Grenzfläche die Schicht in eine flache Geometrie, was zu Störungen der Lipidpackung führen kann.

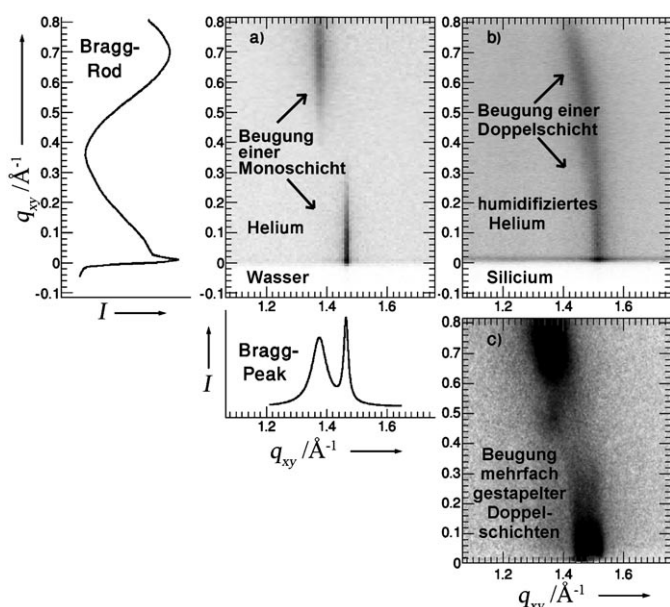


**Abbildung 2.** a) Prinzip einer GIXD-Messung an einzelnen Doppelschichten mit einem Hochenergiestrahl von 18–23 keV ( $\lambda = 0.54\text{--}0.7\text{ \AA}$ ).<sup>[9e,18]</sup> Bisher ging man so vor, dass die Lipiddoppelschicht direkt auf dem Siliciumwafer abgeschieden wurde, wobei eine 10 Å dicke Wasserschicht zwischen dem Wafer und der Doppelschicht eingeschlossen wird. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide innerhalb der Doppelschicht wird durch die Wechselwirkungen mit dem Wafer beträchtlich verringert, was die Fließeigenschaften der Membran beeinträchtigt;<sup>[49]</sup> die Doppelschicht ist flach, und Proteine innerhalb der Membran können nicht frei diffundieren.<sup>[50]</sup> Diese Nachteile könnten teilweise ausgeglichen werden, indem man die Lipidprobe auf einem stark hydratisierten Polymerkissen abscheidet und auf dem Wafer aufbringt. b) Die auf einem Polymerkissen abgeschiedenen Proben werden in einer Feuchtechamber nahe am Taupunkt vermessen. Die Probe wird mit Röntgenstrahlen von 9.5 keV ( $\lambda = 1.3\text{ \AA}$ ) bestrahlt, und auf der Doppelschichtprobe wird eine dünne ( $< 1\text{ }\mu\text{m}$ ) Wasserschicht aufrechterhalten.<sup>[9g,19]</sup> Reflektivitätsmessungen sind in diesem Aufbau schwierig, Salzkonzentrationen und pH-Wert können nicht eingestellt werden, und es kann nur reines Wasser verwendet werden. Proteine und andere Moleküle, von denen man annimmt, dass sie in Membranen eingebettet sind, können im Prinzip eingeführt werden.

che Informationen über die Korrelationen zwischen den Lipiden, indem sie einen Ordnungsparameter innerhalb der Lipidschichten ermitteln.

## 2. Strukturparameter von kristallinen Lipiddomänen

Die Röntgenbeugungssignale von Lipidschichten stammen hauptsächlich vom hydrophoben Teil des Moleküls, was darauf hinweist, dass der hydrophile Teil nicht gut geordnet ist oder dass sein Beitrag zum Gesamtsignal deutlich schwächer ist als derjenige der Kette, weil die enthaltenen Atome nicht in Phase streuen. Die „kristallinen Domänen“ können als kleine, hoch dynamische Monoschichten oder Doppelschichten von Lipiden beschrieben werden, die in der Weise geordnet sind, dass ihr periodisches Gitter eine diskrete konstruktive Interferenz der reflektierten Röntgenstrahlen erzeugt. Die Beugung an Lipiddomänen ist normalerweise durch wenige 2D-Peaks für die Packung gemischter Phasen in einer sogenannten flüssig-geordneten ( $l_o$ ) Phase charakterisiert. Dennoch kann eine überraschende Fülle von Informationen aus diesen scheinbar dürtigen Daten abgeleitet werden, insbesondere aus der Peakposition, der Signalform und der Signaltbreite (aus Analysen der Bragg-Peaks und Bragg-Rods; Abbildung 3).

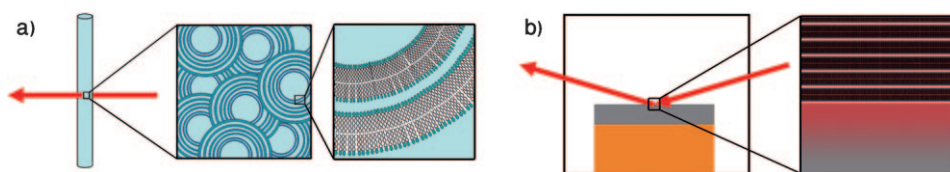


**Abbildung 3.** Röntgenbeugungsprofile, erhalten durch: a) GIXD einer DPPC-Monoschicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche bei 7°C; b) GIXD einer DPPC-Doppelschicht zwischen einem Polyethylenimin (PEI)-Kissen und einem Silicium-Wafer bei 7°C; c) WAXS mehrfach gestapelter Doppelschichten von DPPC/DOPC (9:1) auf einem Si-Wafer, aufgenommen mit streifendem Winkel und Umgebungstemperatur.<sup>[9b]</sup> Das Signal in (b) ist infolge einer 10°-Wellung der Doppelschicht verschmiert. Die starke Intensität, die bei WAXS-Messungen erzielt wird, kann zu Satelliteneffekten führen, wie dies etwa in (c) in der Nähe des Hauptsignals zu beobachten ist.<sup>[51]</sup> Analyse der Röntgendaten: Die Daten werden durch den in reziproken Einheiten gemessenen Streuvektor  $q\text{ [Å}^{-1}\text{]}$  abgebildet, der mit dem Beugungswinkel direkt verknüpft ist. Integration von (a) entlang  $q_y$  ergibt die vertikale Komponente („Bragg-Rod“), Integration entlang  $q_z$  ergibt die horizontale Komponente („Bragg-Peak“). Die  $q_y$ -Positionen der Bragg-Peaks ergeben die Gitterabstände  $d = 2\pi/q_y$ , die durch die zwei Miller-Indizes  $h,k$  indiziert werden können, um die Elementarzelle zu erhalten. Die Halbwertsbreite (FWHM) der Bragg-Peaks ergibt die laterale Kohärenzlänge  $L_{xy} \approx 0.9(2\pi)/\text{FWHM}(q_y)$ . Auf ähnliche Weise ergibt sich aus dem Bragg-Rod-Profil  $q_z$  die Dicke des kristallinen Films.<sup>[16]</sup>

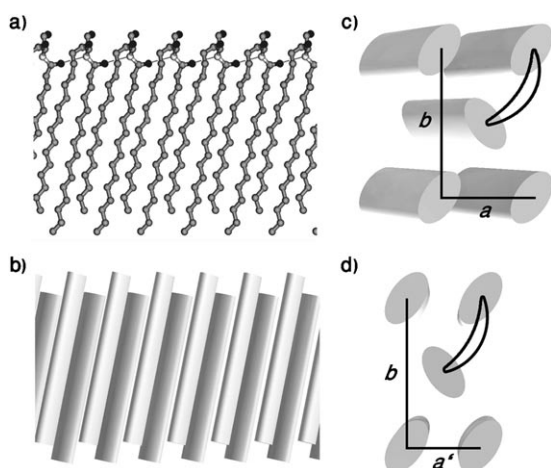
### 2.1. Packung der Elementarzellen und Kristallinität

**Gesättigte Glycerolipide und Sphingolipide:** Monoschichten und Doppelschichten, die ausschließlich aus gesättigten Lipidmolekülen aufgebaut sind, haben weitgehend ähnliche Abmessungen ihrer Elementarzellen in einem Bereich zwischen  $5.0 \times 7.5\text{ \AA}^2$  und  $4.5 \times 8.7\text{ \AA}^2$ , sofern die Moleküle nicht gekippt sind (Abbildung 5).<sup>[21,9g]</sup> Die Domänengrößen reichen von wenigen Nanometern bis zu mehreren 10 nm. Obgleich diese Unterschiede sehr gering erscheinen, sind sie dennoch reproduzierbar und spezifisch.

Ceramid bildet beim Ausbreiten an der Luft-Wasser-Grenzfläche spontan kristalline Monoschichtdomänen<sup>[11c,22]</sup> mit einem mittleren Durchmesser von ungefähr 15 nm (Abbildung 5). Sphingomyelin, das ein Ceramid-Rückgrat aufweist, bildet hingegen keine kristallinen Domänen, solange es nicht stark komprimiert wird.<sup>[10a,d,23]</sup> Als Ursache für dieses Verhalten wurde die große hydrophile Kopfgruppe des Sphingomyelins ausgemacht (Schema 1), die die Packung der



**Abbildung 4.** a) SAXS und WAXS multilamellarer Vesikel (MLVs) und b) von Multistapeln von Lipiddoppelschichten. Die Probenvorbereitung für die SAXS/WAXS-Studien ist normalerweise einfach. Der Röntgenstrahl passiert eine dünnwandige Kapillare, die mit der hydratisierten Lipidprobe in Form a) multilamellarer Versikel oder b) von trägerfixierten Multistapeln mit mehr als tausend Lipiddoppelschichten auf einem Siliciumwafer befüllt ist.<sup>[52]</sup> Das bei weitem höchste Signal-Rausch-Verhältnis wird mit der WAXS-Methode erzielt. Es ist möglich, dass jeder der Doppelschichtfilme innerhalb einer Probe unterschiedliche Charakteristika hat und dass das Beugungssignal als deren Mittelwert erscheint. Ebenfalls unklar ist, in welchem Ausmaß benachbarte Doppelschichtfilme miteinander wechselwirken. Die trägerfixierten Proben werden bei einem Einfallswinkel unterhalb des kritischen Winkels vermessen, ähnlich wie beim GIXD-Verfahren. Allerdings ist der Lichtpunkt durch den Strahldurchmesser mindestens 20 mm breit. Ohne die Verwendung eines Strahlkollimators ist die Winkelaufösung verringert, insbesondere bei weiten Winkeln.



**Abbildung 5.** a) Ceramid-Monoschicht. b) Darstellung der Alkylketten als Stäbe. c) Eine Draufsicht auf (b) zeigt die Elementarzelle der kristallinen Domäne mit den Abmessungen  $a$  und  $b$  und einem Winkel  $\gamma$  von ungefähr  $90^\circ$ . Die Ketten sind jeweils zu Paaren verknüpft. d) Projizierte Elementarzelle (Blick entlang der Stabachse) mit den Abmessungen  $a'$  und  $b$  ( $a' < a$ ).

dünnen hydrophoben Ketten stört, was zu dem sogenannten Umbrella-Effekt führt.<sup>[24]</sup> Die hydrophile Kopfgruppe nimmt nicht an der Kristallpackung teil, bestimmt aber zu einem gewissen Grad, welche Struktur gebildet wird. Eine Konsequenz des Umbrella-Effekts ist, dass Moleküle mit kleinen Kopfgruppen, wie Cholesterol und Ceramid, bereitwillig gemischte Phasen mit SM bilden, da sie die Wechselwirkungen zwischen den sperrigen SM-Kopfgruppen verdünnen. Anders als SM bildet dagegen DPPC spontan kristalline Domänen an der Luft-Wasser-Grenzfläche bei verschwindendem Oberflächendruck, obwohl es die gleiche Phosphocholin-Kopfgruppe hat.<sup>[9c,d,g]</sup> Darüber hinaus bilden DPPC, SM und Ceramid gemischte Domänen mit Cholesterol, die alle die gleiche Struktur haben.<sup>[9g,10e,19]</sup> Solche Mischungen von Cholesterol und gesättigten Lipiden bilden selbst bei verschwindenden Oberflächendrücken geordnete Lipiddomänen mit Molekül-Abständen, die vom Verhältnis Cholesterol/Lipid abhängen.<sup>[9f,10d]</sup>

**Cholesterol:** Eine Monoschicht von Cholesterol an der Luft-Wasser-Grenzfläche bildet spontan kristalline Domänen mit trigonalen Überzellen mit  $a = b = 11.4 \text{ \AA}$  und  $\gamma = 120^\circ$

und ungefähr 10 nm Durchmesser. Die Cholesterolmoleküle sind normal zum Wasser ausgerichtet und nehmen damit eine Fläche pro Molekül von  $38 \text{ \AA}^2$  ein.<sup>[25]</sup> Die exocyclischen Ketten sind ungeordnet. In der Doppelschicht sind die Moleküle um  $19^\circ$  verkippt, und die exocyclischen Ketten greifen teilweise ineinander, sodass eine relativ dicht gepackte Struktur mit einer hohen Kohärenzlänge von 40–60 nm und einer rechteckigen Elementarzelle von  $10 \times 7.5 \text{ \AA}^2$  entsteht.<sup>[9g,18b,25,26]</sup> Diese Elementarzellenstruktur entspricht derjenigen der makroskopisch metastabilen monoklinischen Chol- $\text{H}_2\text{O}$ -Doppelschichtphase. Wenn sich die Doppelschichten zu Multischichten stapeln (mit geordneten Wassermolekülen zwischen den Doppelschichten), wandelt sich die Struktur spontan in die triklinische Monohydratphase um, die das  $12.4 \times 12.4 \text{ \AA}^2$ -Doppelschichtmotiv ( $\gamma = 100.8^\circ$ ) aufweist.<sup>[27]</sup>

## 2.2. Größe der kristallinen Domänen

Kristalline Domänen enthalten typischerweise zwischen mehreren Dutzend bis zu Tausenden von Molekülen. Diese beschränkten Ausmaße sind in guter Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Größen der Lipid-Rafts in Zellmembranen,<sup>[28]</sup> sie widersprechen aber der aus der theoretischen Physik abgeleiteten Auffassung,<sup>[29]</sup> dass 2D-Kristalle nicht spontan gebildet werden können. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch ist, dass die ungefähr 5 nm dicke Lipiddoppelschicht in Wirklichkeit eine dritte Dimension hat, die durch multiple Wechselwirkungen zwischen Alkylketten stabilisiert wird. Auf der anderen Seite wird die Größe der kristallinen Domänen durch die starke thermische Bewegung und die hohe Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle begrenzt. Darüber hinaus sind mit Röntgenbeugungsmethoden nur periodische Strukturen nachweisbar. Es wird davon ausgegangen, dass die kristallinen Domänen von einer weniger geordneten Population von Lipidmolekülen umgeben sind. Eine solche Randpopulation würde die Grenzflächenspannung zwischen benachbarten Domänen oder zwischen einer Domäne und der ungeordneten Lipidumgebung erniedrigen.

Nähere Einblicke bieten sich aus dem Verhalten von Mischungen gesättigter Lipide mit Lipiden, die zwei ungesättigte Alkylketten enthalten, z.B. DPPC/DOPC.<sup>[30]</sup> Von

solchen Systemen ist zu erwarten, dass sie eine Phasentrennung in geordnete und ungeordnete Domänen eingehen. Die Domänen sollten bei Annäherung an den Gleichgewichtszustand größer werden, da auf diese Weise die Grenzflächenspannung an den Domänenrändern verringert wird. Brewster et al. schlugen vor, dass die Zugabe eines „hybriden Lipids“ mit einer gesättigten und einer ungesättigten Alkylkette, z. B. POPC, zu einer Verringerung der Grenzflächenspannung führen könnte und das System zur Bildung kleinerer Domänen treibt.<sup>[30,31]</sup> In Übereinstimmung mit dieser Vorhersage zeigten GIXD-Messungen, die an Monoschichten aus DPPC/DOPC/POPC mit DPPC/DOPC = 1:1 vorgenommen wurden, einen drastischen, aber anisotropen Abfall der Kohärenzlänge von 115 auf 30 Å, wenn die Konzentration von POPC in der Mischung erhöht wurde.<sup>[53]</sup>

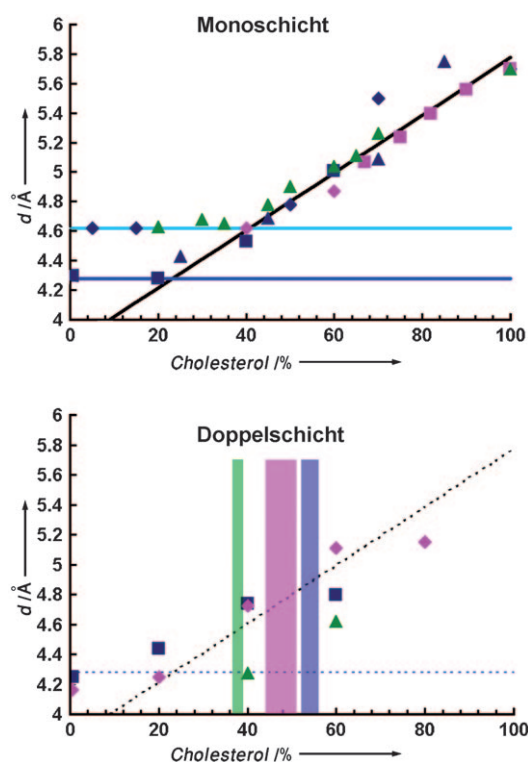
### 2.3. Strukturvergleiche zwischen Monoschichten, Doppelschichten und Multischichten

Die Strukturen, die aus Röntgenbeugungsmessungen an Lipidmonoschichten, -doppelschichten und -multischichten abgeleitet werden, unterscheiden sich typischerweise nicht allzu sehr. Wir wollen hier jedoch eine Auswahl solcher Fälle betrachten, in denen signifikantere Unterschiede vorliegen, um einen Eindruck zu gewinnen, welche Auswirkungen die molekularen Wechselwirkungen auf die Struktur haben können.

Abbildung 6 zeigt die Schichtabstände  $d$  für Monoschichten und Doppelschichten bestehend aus SM/Chol,<sup>[10d,19]</sup> DPPC/Chol<sup>[9f,g]</sup> und Ceramid/Chol<sup>[22]</sup> (Daten der Ceramid/Chol-Doppelschichten aus Lit. [53]). Die reine Cholesterol-Monoschicht erzeugt ein Beugungssignal bei  $q_{xy} = 1.09 \text{ Å}^{-1}$ . Bei steigenden Konzentrationen von SM, DPPC oder Ceramid behält die Monoschicht eine einzelne kristalline Phase bei, die durch einen einzelnen breiten Bragg-Peak charakterisiert ist. Die Signallage ist bei niedrigen Cholesterolkonzentrationen konstant und verschiebt sich bei höheren Lipidkonzentrationen linear zu höheren  $q_{xy}$ . Die Lipidmoleküle stehen senkrecht zur Schichtebene, selbst bei verschwindendem Oberflächendruck.

Die Lage des Plateaus bei niedrigen Cholesterolkonzentrationen scheint von der Temperatur abzuhängen. Dagegen ist die Geradensteigung bei hohen Cholesterolkonzentrationen unabhängig von der Temperatur (7–30 °C) und dem Oberflächendruck (0–30 mN m<sup>-1</sup>) und außerdem für SM/Chol-, DPPC/Chol- und Ceramid/Chol-Mischungen identisch. Diese lineare Abhängigkeit der Peakposition von der Cholesterolkonzentration scheint eigentümlich, wenn man bedenkt, dass das Cholesterolmolekül eine projizierte Fläche von ungefähr 38 Å<sup>2</sup> hat, während beim DPPC, SM und Ceramid die projizierte Fläche jeder Alkylkette rund 20 Å<sup>2</sup> beträgt.

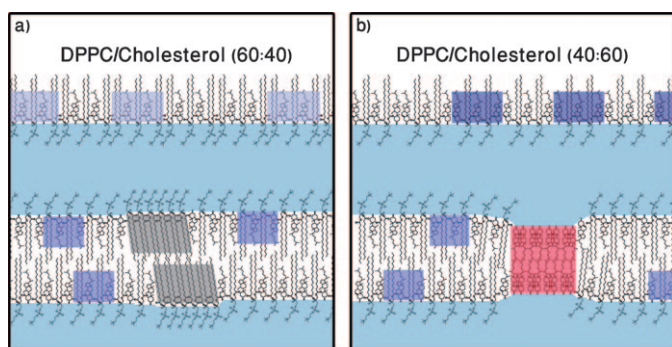
Es wurde vorgeschlagen, dass das System feste Cholesterol/Lipid-Stöchiometrien hat, und der sanfte Übergang der breiten Bragg-Peaks aus einer Überlagerung spezifischer Peaks resultiert.<sup>[10d,32]</sup> Eine andere Interpretation ist, dass Cholesterol in allen Verhältnissen geordnete Domänen bildet und die Fläche pro Molekül infolge von Positionsverlage-



**Abbildung 6.** Schichtabstände  $d$  von Monoschichten (oben) und Doppelschichten (unten) gemischter Phasen als Funktion der Cholesterolkonzentration: SM/Chol (grün), DPPC/Chol (blau) und Ceramid/Chol (magenta). Dunkelblaue Linie: Datenaufnahme bei 7 °C; hellblaue Linie: Datenaufnahme bei 25–30 °C. Die Daten für die Monoschichten wurden aufgenommen bei 20 mN m<sup>-1</sup>, 23 °C (violette  $\diamond$  und  $\blacktriangle$ ),<sup>[9f]</sup> bei 30 mN m<sup>-1</sup>, 7 °C (violette  $\blacksquare$ ),<sup>[9g]</sup> bei 30 mN m<sup>-1</sup>, 7 °C (magenta  $\diamond$ ), bei ca. 0 mN m<sup>-1</sup>, 7 °C (magenta  $\blacksquare$ )<sup>[22]</sup> und bei 25 mN m<sup>-1</sup>, 30 °C (grüne  $\blacktriangle$ ).<sup>[10d]</sup> Die Daten für die Doppelschichten wurden bei 30 mN m<sup>-1</sup> und 7 °C aufgenommen.<sup>[9g,19]</sup> Die farbigen Streifen markieren die Schwellenwerte für die Cholesterol-Nukleation in Mischungen mit SM (grün), Ceramid (magenta) und DPPC (violett).

rungen des Cholesterols entlang der senkrechten Achse der Membran variiert.<sup>[9f]</sup> Die Kohärenzlänge der gemischtphasigen Domänen beträgt ungefähr 2 nm, entsprechend 10–15 Molekülen. Daher könnte das Auftreten der breiten Peaks auch dadurch erklärt werden, dass ein nahezu amorphes Material mit einem mittleren Abstand zwischen den Molekülen vorliegt.

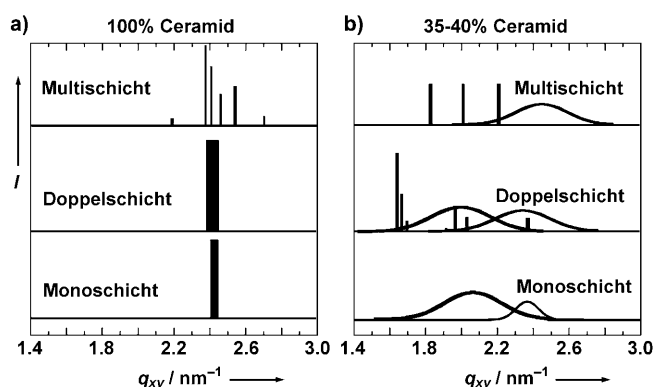
In Doppelschichten ist das Verhalten der gemischten Phasen anders. Die Position der Steigung und des Plateaus aus dem Monoschicht-Diagramm gibt nicht die Schichtabstände  $d$  in der Doppelschicht wieder, und diese unterscheiden sich auch bei SM/Chol-, DPPC/Chol- und Ceramid/Chol-Mischungen gleicher Verhältnisse. Bei Doppelschichten gibt es für jede der Mischungen eine charakteristische Cholesterolkonzentration, bei der Cholesterol nukleiert und reine Kristalle von Cholesterol-Doppelschichten bildet (Abbildung 6, farbige Streifen). Jenseits der kritischen Zusammensetzung existieren in der Doppelschicht zwei Phasen aufgrund der Wechselwirkung der beiden gegenüberliegenden Blätter im Zentrum der Membran. In der Monoschicht gibt es hingegen nur eine Mischphase. In ähnlicher Weise wurden in



**Abbildung 7.** Darstellungen a) einer Monoschicht (oben) und einer Doppelschicht (unten) von DPPC/Chol (60:40) sowie b) einer Monoschicht (oben) und einer Doppelschicht (unten) von DPPC/Chol (40:60). Das Phasenverhalten der Doppelschichten und entsprechenden Monoschichten unterscheidet sich bei beiden Zusammensetzungen. In jeder Monoschicht existiert eine einzelne kristalline Mischphase (hellblau für DPPC/Chol 60:40, dunkelblau für DPPC/Chol 40:60), während in den entsprechenden Doppelschichten eine Phasentrennung stattfindet. Beide Doppelschichten haben eine ähnliche Zusammensetzung der Mischphase von DPPC/Chol im ungefähren Verhältnis 50:50. (a) zusätzlichen Phasen sind in (a) kristallines DPPC (grau) und in (b) kristalline Cholesterol-Doppelschichten (rot).

DPPC/Chol-Doppelschichten bei einem molaren Verhältnis von 60:40 eine reine DPPC-Phase und eine gemischte DPPC/Chol-Phase beobachtet, während in der Monoschicht nur eine Mischphase vorliegt (Abbildung 7).<sup>[9]</sup> Die Rolle der Cholesterol-Nukleation wird in Abschnitt 4.2 näher diskutiert.

Als ein Beispiel, bei dem die Elementarzelle der kristallinen Domänen stark von der Zahl der benachbarten Schichten abhängt, betrachten wir Ceramid C16/Cholesterol-Mischungen. Abbildung 8 zeigt Bragg-Peaks von Ceramid und Ceramid/Chol-Mischungen mit 35–40 Mol-% Ceramid für Monoschichten,<sup>[22]</sup> einzelne Doppelschichten und nicht-orientierte Multischichten, d.h. multilamellare Vesikel



**Abbildung 8.** Mit GIXD erhaltene Bragg-Spektren. Unten: gemischte Ceramid/Chol-Monoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche bei  $30 \text{ mN m}^{-1}$  Kompression; Mitte: gemischte Ceramid/Chol-Doppelschichten bei  $30 \text{ mN m}^{-1}$  Kompression; oben: WAXS von gemischten multilamellaren Ceramid/Chol-Vesikeln.<sup>[11d]</sup> a) 100% Ceramid C16; b) Mono- und Doppelschichten aus Ceramid/Chol (40:60) und Multischicht aus Ceramid/Chol (35:65). Die GIXD-Messungen wurden bei  $7^\circ\text{C}$  und die WAXS-Messungen bei Umgebungstemperatur durchgeführt.

(MLVs).<sup>[11d]</sup> Die Mono- und Doppelschichten aus reinem Ceramid C16 zeigen einen einzelnen Beugungspeak, der einer früher bereits untersuchten Elementarzelle zuzuordnen ist.<sup>[11c]</sup> Die Multischicht erzeugt mehrere Peaks, die viel schärfer sind als der Doppelschicht-Peak, was eine höhere Kohärenzlänge von ungefähr  $45 \text{ nm}$  anzeigt. Bei 40 Mol-% Ceramid zeigt die Monoschicht zwei breite Banden, von denen die eine vermutlich von reinem Ceramid mit einer kleinen Kohärenzlänge und die andere von einer Ceramid/Cholesterol-Mischung stammt. Im Fall der Doppelschicht sind dieselben Phasen von einem scharfen Beugungssignal zweier kristalliner Cholesterolpolymorphe begleitet. Im Fall der Multischicht erscheint ein breiter Peak (vermutlich vom Ceramid stammend) zusammen mit einem scharfen Signal einer nichtidentifizierten kristallinen Phase. Es ist klar ersichtlich, dass sich die Kristallstrukturen der Doppel- und Multischichten unterscheiden.

### 3. Untersuchung von Lipiddomänen durch Röntgenbeugung und andere Techniken

#### 3.1. Struktur und Dynamik

Die Röntgenbeugung liefert strukturelle Einblicke auf der Sub-Angström-Skala und ist die einzige Methode, die Informationen über die Periodizität der kristallinen Domänen bietet. Eine Röntgenbeugungsmessung an dünnen Filmen dauert zwischen einigen Minuten bis zu Stunden. Daher bieten solche Studien keine Informationen über dynamische Prozesse in Lipiddomänen, die auf viel kürzeren Zeitskalen ablaufen. NMR- und FTIR-Messungen erfordern deutlich weniger Zeit, liefern aber, ähnlich wie Beugungsstudien, Daten, die über große Bereiche gemittelt sind. Im Unterschied zur Röntgenbeugung vermessen diese Techniken die gesamte Lipidprobe und nicht nur die kristallinen Domänen, was, je nach Bedingungen, ein Vorteil oder ein Nachteil sein kann. Die NMR-Spektroskopie kann Informationen über die Dynamik der Domänen liefern (Organisation, Diffusionsgeschwindigkeiten).<sup>[33]</sup> Die NMR-Spektroskopie ist empfindlich für molekulare Wechselwirkungen und wird daher routinemäßig verwendet, um zwischen Vesikeln, stabförmigen und lamellaren Strukturen zu unterscheiden.<sup>[34]</sup> Die FTIR-Spektroskopie kann genutzt werden, um die Ausrichtung der Moleküle innerhalb der Lipidschichten zu untersuchen,<sup>[35]</sup> und ist sehr nützlich, um Strukturübergänge bei Änderung der Probenumgebung zu verfolgen.

#### 3.2. Lokalisation

Der Röntgenstrahl erfasst eine Fläche von einigen  $10 \text{ mm}^2$  bei Techniken mit streifendem Einfall und eine Fläche von  $< 1 \text{ mm}^2$  bei Messungen von MLVs, und das Beugungssignal kommt von allen bestrahlten kristallinen Domänen. Daher können die oben beschriebenen Methoden keine Informationen über die Lage der Domänen im Raum und ihre Verteilung liefern. Es ist somit unklar, ob die Domänen gleichmäßig in der Probe verteilt sind oder sich zu Clustern zu-

sammenlagern und eine mosaikförmige Anordnung bilden. Während GIXD-Messungen wird die Probe nicht rotiert, sodass nur ein kleiner Teil der kristallinen Domänen abhängig von ihrer Orientierung zum Beugungssignal beiträgt, da die Domänen wie in einem zweidimensionalen Pulver zufällig verteilt sind. Andere Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie<sup>[36]</sup> und Elektronenmikroskopie (EM) scheinen besser geeignet, um die Lokalisation von Lipiddomänen auf der Mikro- bzw. Nanometerskala zu untersuchen. Nur wenige Kryo-EM-Studien, die eine direkte Lokalisierung der Lipiddomänen anstatt einer Markierung der domänenassoziierten Proteine bieten, wurden bisher veröffentlicht. Im Hinblick auf Auflösung und Genauigkeit ist diese Technik am vielversprechendsten.<sup>[37]</sup>

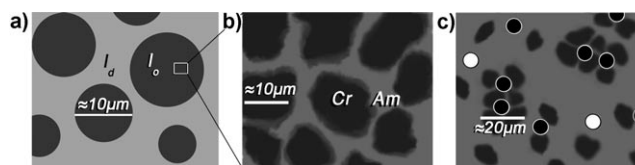
### 3.3. Lipidphasen

Das Phasenverhalten von Lipiden wurde im Zusammenhang mit der Bildung von Lipiddomänen in Zellmembranen ausführlich untersucht, und die aus Röntgenbeugungsmessungen erhaltenen Daten müssen dieser großen Menge an existierender Information gegenübergestellt werden. Zur Untersuchung von Lipidphasen wurden zahlreiche Techniken wie NMR-,<sup>[33]</sup> FTIR-<sup>[35]</sup> und Fluoreszenzspektroskopie<sup>[36b,38]</sup> sowie Kalorimetrie genutzt. Leider weichen die erhaltenen Phasendiagramme je nach Methode voneinander ab.<sup>[39]</sup> Dennoch gibt es genügend Übereinstimmung zwischen den erhaltenen Resultaten, um einige gültige Aussagen über das Phasenverhalten von Lipiden treffen zu können.

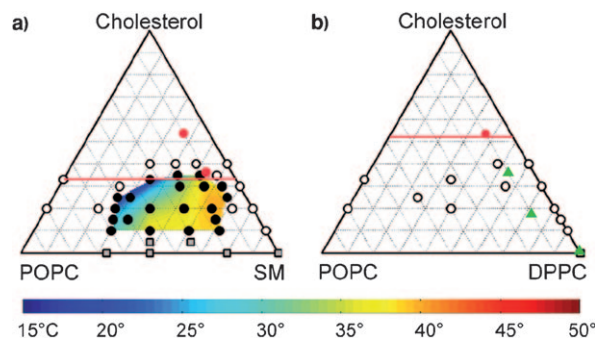
Die in Lipidmischungen koexistierenden Phasen können anhand ihrer Schmelztemperaturen in flüssig-ungeordnete ( $l_d$ ), flüssig-geordnete ( $l_o$ ) und fest-geordnete Phasen ( $S_o$ , auch als „Gel-artige Domänen“ bezeichnet) unterteilt werden. Jede dieser Phasen ist durch charakteristische Diffusionskoeffizienten gekennzeichnet.

Bei den untersuchten Fällen von gesättigten Lipidmischungen scheint es in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen den kristallinen Domänen und dem Phasenverhalten zu geben. Um die Arten von Domänen auseinanderhalten zu können, die einmal durch eine Phasentrennung und zum anderen anhand ihrer Beugung definiert sind, führen wir die Begriffe „Phasendomänen“ bzw. „kristalline Domänen“ ein. Insbesondere ist zu erwähnen, dass bei Zusammensetzungen, für die eine  $l_o$ -Phase beschrieben wurde, die Kohärenzlängen der kristallinen Phasen einige Nanometer betragen. Bei Zusammensetzungen, für die über eine  $S_o$ -Phase berichtet wurde, fand man hingegen Kohärenzlängen der kristallinen Domänen von mehreren 10 nm (Abbildungen 9 und 10).

Allerdings gibt es auch Unstimmigkeiten zwischen den Phasendiagrammen und dem kristallinen Verhalten: Anders als dies aus den ternären/binären Phasendiagrammen abzulesen wäre, bildet Cholesterol bei hohen Konzentrationen eine  $S_o$ -Phase und verbleibt also mit größter Wahrscheinlichkeit nicht als flüssige Phase ( $l_o$  oder  $l_d$ ) (Abbildung 10). Auch sollte reines SM laut Phasendiagrammen als fest-geordnete Phase vorliegen, während GIXD-Studien zeigen, dass das Gegenteil der Fall ist: Nach der Kohärenzlänge zu urteilen, scheint SM nur bei Kompression in einer  $l_o$ -Phase



**Abbildung 9.** a) Schema einer Phasentrennung, wie man sie mit einem optischen Mikroskop in Phasendomänen beobachten würde. Hellgraue Bereiche kennzeichnen eine  $l_d$ -Phase und dunkelgraue Bereiche eine  $l_o$ -Phase bestehend aus überwiegend gesättigten Lipiden. b) Nach unserer Interpretation sollte eine nähere Betrachtung der  $l_o$ -Phase kristalline Domänen (Cr) erkennen lassen, die von einer amorphen Phase (Am) umgeben sind. c) Proteine (wiedergegeben als schwarze und weiße Kreise) könnten mit den kristallinen Lipiddomänen aggregieren und größere Domänen erzeugen.<sup>[28b]</sup> Dieser Prozess könnte für „schwarze“ Proteine selektiv sein, während „weiße“ Proteine ungebunden bleiben.



**Abbildung 10.** Mischbarkeitsdiagramme für ternäre Lipidmischungen von a) POPC/SM/Chol und b) POPC/DPPC/Chol. Zusammensetzungen, bei denen ein Mischbarkeitsübergang beobachtet wird, sind durch gefüllte schwarze Kreise gekennzeichnet. Der farbige Bereich kennzeichnet einen extrapolierten Angleich der gemessenen Übergangstemperaturen. Offene Kreise zeigen an, dass bis hinab zu 10 °C nur eine einzelne Flüssigphase vorliegt. Graue Quadrate markieren die direkte Nukleation von festen Domänen aus einer einheitlichen Flüssigphase beim Absenken der Temperatur.<sup>[36a]</sup> Rote Kreise entsprechen Zusammensetzungen, bei denen mittels GIXD Kristalle von Cholesterol-Doppelschichten nachgewiesen wurden. Die roten Linien markieren eine abgeschätzte Nukleationsschwelle für die Nukleation von Cholesterol. Grüne Dreiecke markieren kristalline DPPC-Domänen. Auch gemischte kristalline Domänen (nicht gezeigt) werden für die meisten SM/Chol- und DPPC/Chol-Verhältnisse beobachtet. Die farbigen Symbole repräsentieren Messungen an trägerfixierten Doppelschichten bei 7 °C, während die Originaldaten an Vesikeln bei 15–50 °C erhalten wurden. Die Nukleationsschwelle (rote Linie) könnte sich bei Erhöhung der Temperatur nach oben verschieben; dennoch wurden auch bei 37 °C Cholesterolkristalle beobachtet. Wiedergabe (mit zusätzlichen roten Punkten, Linien und grünen Dreiecken) nach Lit. [63].

vorzuliegen. Es wird interessant sein, diese Diskrepanz zwischen Phasendomänen und kristallinen Domänen erneut unter die Lupe zu nehmen, sobald vollständigere Informationen verfügbar sind.<sup>[15c,40]</sup> Die neue Linie für die  $l_o + S_o$ -Phasengrenze könnte sogar bei Cholesterolkonzentrationen erscheinen, die für Vesikelstudien relevant sind.<sup>[19]</sup>

In vitro wird beobachtet, dass Phasendomänen bis zur Mikrometerskala wachsen, während man bei Zellmembranen davon ausgeht, dass die funktionellen Domänen in der Größenordnung von einigen 10 nm vorliegen, d.h. innerhalb des durch Röntgenbeugung ermittelten Bereichs. Wir merken an,

dass die mikroskaligen Regionen, wie sie in Phasendomänen experimentell nachgewiesen werden, aus Mosaikstrukturen der mittels GIXD gemessenen Nanodomänen bestehen könnten, die möglicherweise durch amorphe Grenzbereiche, in denen sich ungesättigte Lipide aufhalten, begrenzt werden (Abbildung 9). Eine solche Interpretation könnte eine Erklärung für die Diskrepanzen bezüglich der Domänengröße zwischen künstlichen Membranen und Zellmembranen bieten, was in der Literatur eindringlich diskutiert wird.<sup>[28b,30,31,41]</sup> Während die Größe der Grundstruktureinheiten aller Domänen in der gleichen Größenordnung von mehreren 10 nm läge, wüchsen die Phasendomänen bei der Annäherung an den Gleichgewichtszustand bis zur Mikrometerskala – eine Situation, wie sie in Zellen niemals auftritt.

#### 4. Untersuchung kristalliner Lipiddomänen mit Röntgenbeugung: Bedeutung für die Biologie

##### 4.1. Proteinsortierung

Der Mechanismus der Proteinsortierung in Lipiddomänen ist nicht gut verstanden. Drei Hypothesen wurden vorgeschlagen: 1) Die Membrandicke steuert den Einbau von Proteinen entsprechend der Dicke des hydrophoben Membranteils. 2) Der hydrophobe Teil bestimmt auf ähnliche Weise die lokale Membrankrümmung, was ebenfalls zu einer Selektivität für Proteine mit passender Geometrie führt.<sup>[42]</sup> 3) Die Trennung der Lipidphasen in geordnete und ungeordnete Domänen wird ausgenutzt.

Einige Dutzend Lipide würden wahrscheinlich genügen, um eine Proteinsortierung nach diesen drei Mechanismen zu erreichen. Damit ist nicht erklärbar, warum Zellen Tausende von verschiedenen Lipiden enthalten. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, dass Membrandicke und -krümmung sowie einige wenige durch Phasentrennung gebildete Domänen in der Lage sein sollten, Tausende von Membranproteinen selektiv zu sortieren. Die Vielzahl von Strukturen, die in den nanoskaligen kristallinen Lipiddomänen existieren, können einen zusätzlichen Hierarchiegrad für die Sortierung von Proteinen entsprechend ihrer strukturellen und chemischen Komplementarität beisteuern. Die Abmessungen und Periodizität der Elementarzellen könnten die Längen der Alkylketten widerspiegeln und darüber einen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit nichtlipiden Membranmolekülen wie Proteinen ausüben.

Hancock<sup>[28b]</sup> schlug vor, dass die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipidnanodomänen zur Bildung von größeren und stabileren Clustern mit einer verlängerten Lebensdauer führt (Abbildung 9). Die hier diskutierten kristallinen Domänen könnten als Bausteine dieser Cluster dienen.

##### 4.2. Nukleation von Cholesterol

Für den Cholesterolspiegel in der Plasmamembran wurden hohe Werte von 25–50 % berichtet.<sup>[8,43]</sup> Bedenkt man, dass die Lipide nicht homogen in der Membran verteilt sind, so kann die lokale Konzentration von Cholesterol sehr hohe

Werte erreichen. Daher sind die Nukleationsschwellen von Cholesterol, die bei künstlichen Doppelschichtmischungen beobachtet wurden, wichtig für eine Abschätzung zellulärer Konzentrationen. Die durch Röntgenbeugung untersuchte Bildung von Cholesterolkristallen lässt darauf schließen, dass die 3D-Cholesterolkristalle, die zu atherosklerotischer Entzündung und atherosklerotischer Plaque führen,<sup>[44]</sup> aus den zytoplasmatischen Membranen nukleieren könnten.<sup>[45]</sup> Es ist interessant zu spekulieren, wie die lokale Zusammensetzung der Zellmembran die Segregation von Cholesterol in spezifische Domänen kontrolliert und es beim Versagen des Kontrollmechanismus zur Nukleation von Cholesterolkristallen kommt und möglicherweise krankheitsverursachende Kettenreaktionen ausgelöst werden.

##### 4.3. Welche Technik für welchen Zweck?

Wie oben erläutert, hat jede der Beugungsmethoden für die Untersuchung von Lipidschichten ihre Vor- und Nachteile. Einfacher fällt die Entscheidung, wenn es um die Untersuchung von biologisch relevanten Systemen geht. So dürfte für Nukleationsstudien von 3D-Lipidkristallen und multilamellaren Systemen wie dem Stratum corneum<sup>[11d,46]</sup> und dem Lungensurfactant<sup>[47]</sup> die Multischichtmethode (Abbildung 4) am aussagekräftigsten sein. Das Lungensurfactant weist relativ wenige Schichten von Lipiden auf, die auf einer Seite der Luft ausgesetzt sind. Deshalb sind GIXD-Messungen an einem Langmuir-Trog (Abbildung 1) auch für diese Studien relevant, da sie eine dynamische Kompression der Lipidschichten ermöglichen und auf diese Weise die Kompressions- und Dekompressionszustände nachahmen, wie sie beim Ein- und Ausströmen von Luft in die bzw. aus der Lunge auftreten.

Die Doppelschichtmethoden (Abbildung 2) sind relevanter für Zellmembranstudien; sie wurden bislang aber nur für die Untersuchung von symmetrischen Doppelschichten eingesetzt. Obwohl bekannt ist, dass die Lipide unsymmetrisch zwischen den Membranblättern verteilt sind,<sup>[48]</sup> ist die spezifische Zusammensetzung in jedem Blatt nicht gesichert, und auf der Nanoskala ist die Zusammensetzung der Lipiddomänen in gegenüberliegenden Blättern gänzlich unbekannt. Abgesehen von der Cholesterol-Doppelschicht wurde in den bisher untersuchten Doppelschichtproben keine strukturelle Kopplung zwischen den Blättern beobachtet. Inwiefern die Doppelschichtmethode Vorteile für das Ausbilden von Wechselwirkungen zwischen gegenüberliegenden Blättern bringen kann, ist daher unsicher, solange die tatsächlichen Zusammensetzungen nicht bestimmt worden sind.

#### 5. Abschließende Bemerkungen

Die Membrandoppelschichten von Zellen bestehen aus Tausenden von Lipidmolekülen verschiedenster chemischer Zusammensetzungen und Molekülstrukturen. Seit jüngster Zeit stehen Röntgenbeugungsmethoden zur Verfügung, die die Bestimmung von Strukturparametern periodischer Strukturen in dünnen Schichten aus Lipiden ermöglichen.

Die Anwendung dieser Techniken offenbart die Existenz einer Vielzahl kristalliner Domänen in Modellen von Monoschicht-, Doppelschicht- und Multischichtlipidmischungen. Hierbei handelt es sich um geordnete, einige 10 nm durchmessende Molekülzusammenlagerungen, die im dynamischen Austausch mit der Umgebung stehen und vornehmlich durch intermolekulare Wechselwirkungen der aliphatischen Ketten stabilisiert werden.

Wir schlagen vor, dass diese Vielfalt von Strukturen eine zusätzliche Hierarchieebene der Organisation widerspiegelt, die für das Verständnis der Zellmembranfunktion essenziell sein könnte. Die Existenz solcher kristalliner Domänen könnte eine wichtige Rolle bei der Proteinsortierung, der Phasentrennung und bei pathologischen Kristallisationen spielen, und sie könnte der Schlüssel sein, um die Diskrepanzen bezüglich der Domänengrößen und -strukturen zwischen künstlichen und biologischen Systemen zu erklären.

*Wir danken dem Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB für Strahlzeit und dem ELISA-Programm der EU für finanzielle Unterstützung. Diese Arbeit wurde durch die Israel Science Foundation und das Helen and Martin Kimmel Center for Nanoscale Science gefördert. L.A. hält den Dorothy and Patrick Gorman Professorial Chair of Biological Ultrastructure.*

Eingegangen am 21. Juli 2010

Online veröffentlicht am 25. Februar 2011

- [1] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl., Garland Science, New York, **2002**.
- [2] a) D. A. Brown, J. K. Rose, *Cell* **1992**, 68, 533–544; b) D. A. Brown, E. London, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 240, 1–7; c) K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, 1, 31–39; d) K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569–572; e) M. F. Hanzal-Bayer, J. F. Hancock, *FEBS Lett.* **2007**, 581, 2098–2104.
- [3] a) E. Ikonen, *Physiol. Rev.* **2006**, 86, 1237–1261; b) F. R. Maxfield, I. Tabas, *Nature* **2005**, 438, 612–621.
- [4] R. P. Mason, T. N. Tulenko, R. F. Jacob, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2003**, 1610, 198–207.
- [5] R. J. Cenedella, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1987**, 257, 1602–1602.
- [6] D. Weihs, J. Schmidt, I. Goldiner, D. Danino, M. Rubin, Y. Talmon, F. M. Konikoff, *J. Lipid Res.* **2005**, 46, 942–948.
- [7] T. N. Tulenko, M. Chen, P. E. Mason, R. P. Mason, *J. Lipid Res.* **1998**, 39, 947–956.
- [8] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 112–124.
- [9] a) T. T. Mills, S. Tristram-Nagle, F. A. Heberle, N. F. Morales, J. Zhao, J. Wu, G. E. S. Toombes, J. F. Nagle, G. W. Feigenson, *Biophys. J.* **2008**, 95, 682–690; b) T. T. Mills, J. Y. Huang, G. W. Feigenson, J. F. Nagle, *Gen. Physiol. Biophys.* **2009**, 28, 126–139; c) A. Aroti, E. Leontidis, E. Maltseva, G. Brezesinski, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 15238–15245; d) G. Brezesinski, A. Dietrich, B. Struth, C. Böhm, W. G. Bouwman, K. Kjaer, H. Möhwald, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, 76, 145–157; e) E. B. Watkins, C. E. Miller, D. J. Mulder, T. L. Kuhl, J. Majewski, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 102, 238101; f) A. Ivankin, I. Kuzmenko, D. Gidalevitz, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, 104, 108101; g) R. Ziblat, L. Leiserowitz, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9920–9927.
- [10] a) D. Vaknin, M. S. Kelley, B. M. Ocko, *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 7697–7704; b) C. Chachaty, D. Rainteau, C. Tessier, P. J. Quinn, C. Wolf, *Biophys. J.* **2005**, 88, 4032–4044; c) G. Staneva, C. Chachaty, C. Wolf, P. J. Quinn, *J. Lipid Res.* **2010**, 51, 1810–1822; d) M. K. Ratajczak, E. Y. Chi, S. L. Frey, K. D. Cao, L. M. Luther, K. Y. C. Lee, J. Majewski, K. Kjaer, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 103, 028103; e) C. Ege, M. K. Ratajczak, J. Majewski, K. Kjaer, K. Y. C. Lee, *Biophys. J.* **2006**, 91, L1L3.
- [11] a) G. Staneva, C. Chachaty, C. Wolf, K. Koumanov, P. J. Quinn, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2008**, 1778, 2727–2739; b) L. Scheffer, A. H. Futerman, L. Addadi, *ChemBioChem* **2007**, 8, 2286–2294; c) D. Vaknin, M. S. Kelley, *Biophys. J.* **2000**, 79, 2616–2623; d) S. L. Souza, M. J. Capitan, J. Alvarez, S. S. Funari, M. H. Lameiro, E. Melo, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 1367–1375.
- [12] a) R. J. Schroeder, S. N. Ahmed, Y. Z. Zhu, E. London, D. A. Brown, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 1150–1157; b) K. Fiedler, T. Kobayashi, T. V. Kurzchalia, K. Simons, *Biochemistry* **1993**, 32, 6365–6373; c) C. Arnulphi, J. Sot, M. Garcia-Pacios, J. L. R. Arrondo, A. Alonso, F. M. Goni, *Biophys. J.* **2007**, 93, 3504–3514.
- [13] D. M. Small, *Handbook of Lipid Research: The Physical Chemistry of Lipids*, Vol. 4, Plenum, New York, **1986**.
- [14] T. J. McIntosh, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1978**, 513, 43–58.
- [15] a) K. Kjaer, J. Als-Nielsen, C. A. Helm, L. A. Laxhuber, H. Möhwald, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, 58, 2224–2227; b) P. Dutta, J. B. Peng, B. Lin, J. B. Ketterson, M. Prakash, P. Georgopoulos, S. Ehrlich, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, 58, 2228–2231; c) V. M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, *Rev. Mod. Phys.* **1999**, 71, 779–819.
- [16] J. Als-Nielsen, D. Jacquemain, K. Kjaer, F. Leveiller, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Phys. Rep.* **1994**, 246, 252–313.
- [17] E. Sackmann, H. Trauble, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4482–4491.
- [18] a) C. E. Miller, J. Majewski, E. B. Watkins, D. J. Mulder, T. Gog, T. L. Kuhl, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, 100, 058103; b) I. Solomonov, J. Daillant, G. Fragneto, K. Kjaer, J. S. Micha, F. Rieutord, L. Leiserowitz, *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.* **2009**, 30, 215–221; c) J. Daillant, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, 14, 396–401.
- [19] R. Ziblat, K. Kjaer, L. Leiserowitz, L. Addadi, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9120–9123; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8958–8961.
- [20] a) R. P. Rand, V. Luzzati, *Biophys. J.* **1968**, 8, 125–137; b) L. A. Feigin, D. I. Svergun, *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum, New York, **1987**.
- [21] I. Kuzmenko, H. Rapaport, K. Kjaer, J. Als-Nielsen, I. Weissbuch, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 1659–1696.
- [22] L. Scheffer, I. Solomonov, M. J. Weygand, K. Kjaer, L. Leiserowitz, L. Addadi, *Biophys. J.* **2005**, 88, 3381–3391.
- [23] M. K. Ratajczak, C. Ege, Y. T. C. Ko, J. Majewski, K. Kjaer, K. Y. C. Lee, *Biophys. J.* **2005**, 88, 73a–73a.
- [24] J. Y. Huang, G. W. Feigenson, *Biophys. J.* **1999**, 76, 2142–2157.
- [25] H. Rapaport, I. Kuzmenko, S. Lafont, K. Kjaer, P. B. Howes, J. Als-Nielsen, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Biophys. J.* **2001**, 81, 2729–2736.
- [26] I. Solomonov, M. J. Weygand, K. Kjaer, H. Rapaport, L. Leiserowitz, *Biophys. J.* **2005**, 88, 1809–1817.
- [27] B. M. Craven, *Nature* **1976**, 260, 727–729.
- [28] a) K. Simons, W. L. C. Vaz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 269–295; b) J. F. Hancock, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 456–462.
- [29] L. D. Landau, E. M. Lifshitz, *Statistical Physics*, Vol. 5, 3. Aufl., Pergamon, **1980**.
- [30] R. Brewster, P. A. Pincus, S. A. Safran, *Biophys. J.* **2009**, 97, 1087–1094.
- [31] R. Brewster, S. A. Safran, *Biophys. J.* **2010**, 98, L21–L23.
- [32] a) H. M. McConnell, A. Radhakrishnan, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2003**, 1610, 159–173; b) H. M. McConnell, M. Vrljic, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32, 469–492.

- [33] C. P. S. Tilcock, P. R. Cullis, S. M. Gruner, *Chem. Phys. Lipids* **1986**, 40, 47–56.
- [34] A. M. Dopico, *Methods in Membrane Lipids*, Vol. 400, Humana, New York, **2007**.
- [35] a) R. D. Hunt, M. L. Mitchell, R. A. Dluhy, *J. Mol. Struct.* **1989**, 214, 93–109; b) G. Brezesinski, H. Möhwald, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, 100, 563–584.
- [36] a) S. L. Veatch, S. L. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 94, 148101; b) S. N. Pinto, L. C. Silva, R. F. M. deAlmeida, M. Prieto, *Biophys. J.* **2008**, 95, 2867–2879.
- [37] a) F. M. Konikoff, D. Danino, D. Weihs, M. Rubin, Y. Talmon, *Hepatology* **2000**, 31, 261–268; b) J. Majewski, L. Margulis, *Langmuir* **1994**, 10, 2081–2083; c) V. Weissig, *Liposomes: Methods and Protocols*, Vol. 2 (Biological Membrane Models), Humana, New York, **2010**; d) D. Weihs, J. Schmidt, D. Danino, I. Goldiner, D. Leikin-Gobbi, A. Eitan, M. Rubin, Y. Talmon, F. M. Konikoff, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, 1771, 1289–1298.
- [38] a) S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2003**, 85, 3074–3083; b) B. M. Castro, L. C. Silva, A. Fedorov, R. F. M. deAlmeida, M. Prieto, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 22978–22987.
- [39] F. M. Goni, A. Alonso, L. A. Bagatolli, R. E. Brown, D. Marsh, M. Prieto, J. L. Thewalt, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2008**, 1781, 665–684.
- [40] G. W. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, 1788, 47–52.
- [41] a) S. L. Veatch, O. Soubias, S. L. Keller, K. Gawrisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 17650–17655; b) A. R. Honerkamp-Smith, P. Cicuta, M. D. Collins, S. L. Veatch, M. den Nijs, M. Schick, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2008**, 95, 236–246; c) G. S. Longo, M. Schick, I. Szelefer, *Biophys. J.* **2009**, 96, 3977–3986.
- [42] a) O. S. Andersen, R. E. Koeppe, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, 36, 107–130; b) R. Phillips, T. Ursell, P. Wiggins, P. Sens, *Nature* **2009**, 459, 379–385.
- [43] E. Ikonen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 125–138.
- [44] P. Duewell, H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung, E. Latz, *Nature* **2010**, 464, 1357–1361.
- [45] D. S. Ong, J. J. Anzinger, F. J. Leyva, N. Rubin, L. Addadi, H. S. Kruth, *J. Lipid Res.* **2010**, 51, 2303–2313.
- [46] a) J. A. Bouwstra, G. S. Gorris, K. Cheng, A. Weerheim, W. Bras, M. Poncet, *J. Lipid Res.* **1996**, 37, 999–1011; b) T. J. McIntosh, M. E. Stewart, D. T. Downing, *Biochemistry* **1996**, 35, 3649–3653.
- [47] a) P. C. Stenger, G. H. Wu, C. E. Miller, E. Y. Chi, S. L. Frey, K. Y. C. Lee, J. Majewski, K. Kjaer, J. A. Zasadzinski, *Biophys. J.* **2009**, 97, 777–786; b) K. Y. C. Lee, J. Majewski, T. L. Kuhl, P. B. Howes, K. Kjaer, M. M. Lipp, A. J. Waring, J. A. Zasadzinski, G. S. Smith, *Biophys. J.* **2001**, 81, 572–585.
- [48] M. Bretschke, *Nature New Biol.* **1972**, 236, 11–12.
- [49] a) R. Merkel, E. Sackmann, E. Evans, *J. Phys. (Paris)* **1989**, 50, 1535–1555; b) E. Evans, E. Sackmann, *J. Fluid Mech.* **1988**, 194, 553–561.
- [50] E. Sackmann, *Science* **1996**, 271, 43–48.
- [51] W. J. Sun, R. M. Suter, M. A. Knewton, C. R. Worthington, S. Tristramnagle, R. Zhang, J. F. Nagle, *Phys. Rev. E* **1994**, 49, 4665–4676.
- [52] T. T. Mills, G. E. S. Toombes, S. Tristram-Nagle, D. M. Smilgies, G. W. Feigenson, J. F. Nagle, *Biophys. J.* **2008**, 95, 669–681.
- [53] R. Ziblat, PhD Thesis, Weizmann Institute of Science.