

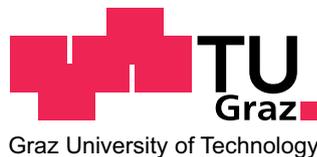
Alexander Rieder, BSc

**Aufbau und Optimierung einer
Rapid Solvent Exchange
Apparatur zur Herstellung
künstlicher Zellmembranen**

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Ingenieur

Masterstudium Technische Physik



Technische Universität Graz

Betreuer:

Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.techn. Georg Pabst
Institut für Materialphysik

Graz, den 3. Juni 2014

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG
AFFIDAVIT

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources, and that I have explicitly indicated all material which has been quoted either literally or by content from the sources used. The text document uploaded to TUGRAZonline is identical to the present master's thesis.

Datum / Date

Unterschrift / Signature

Findet die Wahrheit, denn die Wahrheit macht euch frei.

Albertus Magnus

DANKSAGUNG

Ich widme diese Arbeit meiner von uns gegangenen Mutter in Liebe, Dankbarkeit und immerwährender Verbundenheit.

Ich danke meinem Vater für sein treues und standhaftes Herz, meiner Freundin für Ihre Geduld und Liebe und meinem Mentor, Herrn Professor Nagypal, für seine Freundschaft und weisen Worte.

Ich danke Herrn Professor Pabst für die engagierte und vorbildliche Betreuung sowie Zusammenarbeit. Seine scharfe Beobachtungsgabe und professionelle Methodik dienten mir als Vorbild und Grundpfeiler für den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten.

Unserem Arbeitsgruppenleiter, Herrn Professor Karl Lohner, danke ich für die vielfachen, anregenden Diskussionen und ausführlichen Erklärungen in Hinblick auf biochemische Fragestellungen.

Herrn Professor Ernst, Institutsvorstand der Experimentalphysik, möchte ich meinen Dank aussprechen für die Möglichkeit, Bauteile für unsere Versuchsanordnung in seiner Werkstatt anfertigen zu dürfen. Herrn Professor Windholz sowie Herrn Maierhofer danke ich für ihre Unterstützung beim Entwurf sowie der Anfertigung der Anlagenteile.

Dank ergeht an Benjamin Kollmitzer und Peter Heftberger für die nette Einführung in die Methoden der Biophysik und ihre stete Hilfsbereitschaft im Physikeralltag.

Daniel Koller sei gedankt für seine unschätzbaren Einführungen in zahllose biochemische Mess- und Präparationsverfahren sowie seine hilfreichen Tipps und einprägsamen Anekdoten zum Laboralltag.

Sabrina Riedl möchte ich danken für die Betreuung der Polarisationsmikroskopie, Gebhard Schratte für die Aufsicht der Nano Tracking Analysen, Regina Leber und Dagmar Zweytick für die Unterstützung bei den Kalorimetrie-messungen sowie Johann Krebs, Alexandra Zenz und Hanna Lindermuth für ihre Hilfe in organisatorischer Hinsicht.

Dem gesamten Institut danke ich für die freundliche Aufnahme sowie die Hilfsbereitschaft und Kollegialität, welche mir zu jedem Zeitpunkt meiner Tätigkeit entgegengebracht wurden.

ZUSAMMENFASSUNG

Künstliche Zellmembranen aus Phospholipiden sind experimentell und theoretisch gut etablierte Systeme zur Erforschung der Physik biologischer Membranen. Rapid Solvent Exchange (RSE) ist eine neuartige Herstellungsmethode künstlicher Zellmembranen, bei der durch einen schlagartigen Austausch des apolaren Lösungsmittels durch ein polares Dispersionsmittel (Wasser, Puffer) Lipidvesikel entstehen. Ziel der Arbeit war die Konstruktion bzw. der Aufbau einer RSE Apparatur und die Optimierung der Ausbeute von multilamellaren Vesikeln. Typischerweise liefert die RSE Methode unilamellare Liposomen, sowie multilamellare Aggregate mit großer externer Oberfläche, in unterschiedlicher Dimensionierung. Im Rahmen der experimentellen Tätigkeit konnte gezeigt werden, dass in physiologisch relevanten, wässrigen Puffersystemen insbesondere die dem System aufgeprägte Frequenz sowie der Energieeintrag und die Anzahl der chemischen Systemkomponenten einen entscheidenden Einfluss auf die Größenverteilung und Lamellarität der Vesikel haben. So konnte bei Anwendung geringer Vortexfrequenz trotz hoher Anzahl von Systemkomponenten eine beinahe hundertprozentige Ausbeute an multilamellaren Vesikeln erreicht werden. Als Qualitätskontrolle dienten dynamische Differenzkalorimetrie, Lichtstreuung, Mikroskopie sowie Röntgenklein- und -weitwinkelstreuung.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation	1
2	Lipide	3
2.1	Lipide und Lipidomik	3
2.2	Lipidklassifizierung	7
2.2.1	Glycerophospholipide	7
2.2.2	Sphingolipide	9
2.2.3	Sterollipide	9
2.2.4	Schmelzpunkte von Membranlipiden	11
2.3	Selbstassemblierung von Lipiden	14
2.3.1	Mesophasen	14
2.3.2	Chemisches Potential und Freie Energie	14
2.3.3	Aggregation unpolarer Moleküle	15
2.3.4	Aggregation amphiphiler Moleküle	16
3	Die Modellmembran	28
3.1	Kräfteverteilung innerhalb der Membran	28
3.2	Molekulare Dynamik der Membran	29
3.3	Thermodynamik der Membran	30
3.3.1	Wärmekapazität	31
3.3.2	Kompressibilität	32
3.3.3	Systemfluktuationen	32
3.4	Thermotropes Phasenverhalten der Membran	33
3.4.1	Einfaches Phasenübergangsmodell in zwei Dimensionen	35
3.4.2	Dreidimensionale Phasen	37
3.4.3	Thermodynamisch komplexe Phasenübergänge	38
3.4.4	Interdigitierte Phasen	42
3.4.5	Kooperative Phasenübergänge der Membran	42
3.5	Rafts in der Membran	43
3.6	Lyotropes Phasenverhalten der Membran	45
3.7	Symmetrie der Membran	46

3.8	Permeabilität von Membranen	46
3.9	Arten von Lipidvesikeln	46
3.10	Interaktionen von Membranen	49
3.10.1	Stabilisierung durch gelöste Ionen	51
3.11	Das Membranlipid DPPC	51
4	Herstellung von Liposomen	55
4.1	Einleitung	55
4.2	Lipiddünnsfilmhydratationsmethode	55
4.2.1	Herstellung von MLVs	55
4.2.2	Herstellung von SPLVs	57
4.2.3	Sanfte Lipiddünnsfilmhydratationsmethode	57
4.3	Rapid Solvent Exchange Methode	57
4.4	Elektroformation	60
4.4.1	Herstellung von GUVs mittels Lipiddünnsfilmhydratationsmethode	60
4.4.2	Herstellung von GUVs mittels RSE	61
4.5	Ethanol-Injektionsmethode	61
4.6	Reverse Phase Evaporation Methode	61
4.7	Organisch-wässriges-Zweiphasensystem Methode	62
4.8	Nachbearbeitungsverfahren	62
4.8.1	Ultraschallverfahren	62
4.8.2	Gefrier-Tau-Verfahren	62
4.8.3	Extrusionsverfahren	62
5	Analyse von Liposomen	63
5.1	Einleitung	63
5.2	Röntgenkleinwinkelstreuung	63
5.2.1	Aufbau und physikalische Grundlagen	64
5.2.2	Streuung an Lipiddoppelschichtstapeln	64
5.2.3	Experimenteller Vorgang	71
5.3	Röntgenweitwinkelstreuung	72
5.4	Dynamische Differenzkalorimetrie	73
5.4.1	Experimenteller Vorgang	73
5.4.2	Theoretische Betrachtungen	74
5.4.3	DSC-Thermogramm am Beispiel von DPPC	77
5.5	Photonenkorrelationsspektroskopie	79
5.6	Nanoparticle Tracking Analysis	81
5.7	Polarisationsmikroskopie	81

6	Details zur RSE Methode	82
6.1	Einleitung	82
6.2	Aufbau der RSE Apparatur	82
6.2.1	Vakuumpumpe	85
6.2.2	Gaszuführung	88
6.2.3	Kugelhahn	88
6.2.4	Druckmessgerät	89
6.2.5	Rüttler	89
6.2.6	Heizvorrichtung	89
6.2.7	Realisierter Aufbau	90
6.3	Handhabung der RSE Apparatur	90
6.3.1	Inbetriebnahme	90
6.3.2	Schritt 1	91
6.3.3	Schritt 2	91
6.3.4	Schritt 3	93
7	Messungen und Analyse	94
7.1	Methodik	94
7.1.1	Lipiddünnschichthydratation	94
7.1.2	Rapid Solvent Exchange	95
7.1.3	DSC	95
7.1.4	Röntgenkleinwinkelstreuung	96
7.1.5	Röntgenweitwinkelstreuung	97
7.1.6	Photonenkorrelationsspektroskopie	97
7.1.7	Nanoparticle Tracking	97
7.1.8	Polarisationsmikroskopie	98
7.2	DSC-Auswertungen	98
7.2.1	Herstellung von DPPC-Vesikeln mittels Lipiddünnschicht- hydratation	98
7.2.2	Herstellung von DPPC-Vesikeln mittels RSE	101
7.3	PCS-Auswertungen	122
7.4	NTA-Auswertungen	122
7.5	Polarisationsmikroskopie-Auswertungen	122
7.6	SAXS-Auswertungen	125
7.6.1	Gel- und Fluidphase	125
7.6.2	Rippelphase	127
7.6.3	Berechnung des Elektronendichteprofiles einer Lipiddop- pelschicht in der Gelphase	128
7.7	WAXS-Auswertungen	129
7.7.1	Berechnung der Lipidfläche	131

8 Ausblicke	133
8.1 Präparation von DPPG-Vesikeln	133
9 Conclusio	136
A Schmelzpunkte und Kettenlängen wichtiger Membranlipide	145
B Baupläne des RSE-Grundgerüsts	147

Abbildungsverzeichnis

2.1	Lipidzusammensetzung von Zellmembranen sowie zellulärer Kompartiments und davon abgewandelten Metaboliten [1] . . .	4
2.2	Lipidomik in Zusammenhang mit der Interaktomik in einer Zelle [3]	5
2.3	Entwicklung der Forschungstätigkeit im Bereich der Lipidomik [1]	6
2.4	Familie der Lipide nach LIPID MAPS [8]	12
2.5	Struktur der wichtigsten Membranlipide	13
2.6	Struktur der Phosphoglyceride am Beispiel von Phosphatidylcholin [9]	13
2.7	Struktur von Cholesterin [9]	13
2.8	Einfluss der Geometrie amphiphiler Moleküle auf die Organisationsstruktur [14]	17
2.9	Krümmung einer planaren Lipiddoppelschicht zu einem Lipidvesikel [9]	20
2.10	Schematische Darstellung der DLVO-Theorie [17]	23
2.11	Schematische Darstellung der Hydratationskräfte und der hydrophoben Kraft [21]	23
2.12	Schematische Darstellung der Ondulationen sowie Protrusionen von Membranen [21]	25
2.13	Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit des Phasenverhaltens amphiphiler Lipide [22]	27
3.1	Druckprofil einer Lipiddoppelschicht [25]	29
3.2	Freiheitsgrade der in Membranen eingebetteten Lipide [26] . . .	30
3.3	Phasenverhalten von Lipiddoppelschichten am Beispiel eines Phosphatidylcholin-Wasser-Gemisches [29]	34
3.4	Mögliche Rotationen von Kohlenwasserstoffketten am Beispiel von Butan [28]	36
3.5	Gitterveränderungen beim Schmelzen der Kohlenwasserstoffketten in der Rippelphase [36]	37

3.6	Karte der Elektronendichte einer Rippelphase sowie die skizzierte Lage der Lipidmoleküle in Relation zur Membranebene [33]	38
3.7	Krümmung triggert Schmelzübergang von Membranlipiden [37]	39
3.8	Thermogramme von DPPC; Vergleich der Hauptübergänge von MLVs, extrudierten LUVs sowie sonifizierten LUVs [36] . .	40
3.9	Thermogramme von DPPC; Gegenüberstellung von DPPC-Dispersionen bestehend aus MLVs, LUVs sowie SUVs [37] . . .	40
3.10	Komplexe Wärmekapazitätsprofile von DMPC und DMPG [28]	41
3.11	Berechnung der Halbwertsbreite von Phasenübergangsenthalpien mit unterschiedlichen Kooperativitätszahlen n [28]	43
3.12	Phasenverhalten von Lipiddoppelschichten [27]	44
3.13	Zwei künstliche Lipidvesikel [9]	44
3.14	Lyotropes (und thermotropes) Phasenverhalten eines DPPC-Wasser-Gemisches [30]	45
3.15	Diffusion durch synthetische Lipidmembran [9]	47
3.16	Geometrie von LUVs, SUVs, MLVs und MVVs [44]	48
3.17	Logarithmischer Druck Π zwischen Membranen in Abhängigkeit von der Dicke der Intermembranwasserschicht d_w	50
3.18	Hofmeister-Serie für Kationen und Anionen [46]	51
3.19	Darstellung von DPPC [47]	52
3.20	Ladungsverteilung innerhalb eines DPPC-Moleküls berechnet mittels der RESP-Methode [48, 49]	52
3.21	DPPC-Doppelschicht bei unterschiedlichen Temperaturen [48]	53
4.1	Entstehung multilamellarer Vesikel [50]	56
4.2	Klassischer RSE-Prozess wie von Buboltz und Feigenson in [54] beschrieben	58
5.1	Stapel von Lipiddoppelschichten [28]	65
5.2	Streuung an zwei planaren Ebenen mit der Wiederholddistanz D [28]	65
5.3	Beugungspeaks unter Störeinfluss [69]	70
5.4	Aufenthaltswahrscheinlichkeiten und Elektronendichten von Molekülbestandteilen des Lipids SOPC sowie von Wasser	71
5.5	Fit von Messungen am Lipid SOPC [71]	72
5.6	Streubilder von multilamellaren DPPC-Vesikeln in wässriger Lösung	73
5.7	Beispielhafte, schematische Darstellung eines Thermogramms [39]	75
5.8	Relevante Daten des Wärmekapazitätsthermogramms [35] . . .	75
5.9	Thermogramm von DPPC [30]	77

5.10	Thermogramm einer DPPC-Dispersion mit SUVs und LUVs [39]	78
5.11	Streuung von Licht an suspendierten Teilchen [75]	79
5.12	Intensitätsverteilung einer PCS-Aufnahme [75]	79
5.13	Intensitätsschwankungen in Abhängigkeit von der Zeit für kleine und große Partikel [76]	80
5.14	Korrelation der Intensitätsverteilungen unterschiedlicher Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Zeit [75]	80
6.1	Schematischer Aufbau der RSE-Apparatur	85
6.2	CAD Darstellung der RSE-Apparatur	86
6.3	Vergleich des Dampfdrucks von reinem Chloroform, Methanol, Dichlormethan und Wasser	87
6.4	RSE Anordnung	90
6.5	Probenherstellung mittels RSE-Apparatur, Schritt 2: Weg 1	92
6.6	Probenherstellung mittels RSE-Apparatur, Schritt 2: Weg 2	92
6.7	Probenherstellung mittels RSE-Apparatur, Schritt 3	93
7.1	Herstellung von Referenzproben mittels Filmmethode	99
7.2	Darstellung der Kalibrierungsunterschiede der zur Verfügung stehenden DSC-Messanordnungen	101
7.3	Erste Herstellung von DPPC-Vesikeln mittels RSE-Methode	103
7.4	Lösungsmittelvergleich	106
7.5	RSE-Präparationen mit Napi-Puffer als Dispersionsmittel	109
7.6	RSE-Präparationen mit bidestilliertem Wasser als Dispersionsmittel	109
7.7	Unterschiedliche Lipidausgangskonzentrationen mit NAPI-Puffer	111
7.8	Unterschiedliche Lipidausgangskonzentrationen mit H_2O_{bidest}	112
7.9	Verhältnis Lösungsmittel - Dispersionsmittel NAPI	114
7.10	Verhältnis Lösungsmittel - Dispersionsmittel H_2O_{bidest}	116
7.11	Unterschiedliche Evakuierungsgeschwindigkeiten mit NAPI	118
7.12	Unterschiedlichen Evakuierungsgeschwindigkeiten mit H_2O_{bidest}	119
7.13	Verringerte Vortexgeschwindigkeit	121
7.14	Polarisationsmikroskopieaufnahmen der Probe X	124
7.15	Charakteristische Größenangaben in Bezug auf Lamellen multilamellarer Vesikel in der Gel- und Flüssigphase [22]	126
7.16	SAXS Auswertungen der Proben A, K, L und X	126
7.17	Charakteristische Größenangaben in Bezug auf Lamellen multilamellarer Vesikel in der Rippelphase [22]	127
7.18	Kalottenmodell, AA FF Molekularsimulation sowie Elektrodendichte von DPPC [48]	130
7.19	WAXS Auswertungen der Proben A, K, L und X	131

7.20	Gitteranordnung der Lipidketten [22]	132
8.1	DSC-Auswertung von DPPG-Proben hergestellt mittels Film- methode sowie RSE-Methode	135
B.1	Bodenplatte	148
B.2	Stangen	149
B.3	Abstandhalter	150
B.4	Gehäuseplatte oben	151
B.5	Gehäuseplatte unten	152
B.6	Innengewindestäbe	153
B.7	Kugelhahnhalterung	154
B.8	Verteilerbuchsen für Gehäuseplatten	155
B.9	Verteiler	156
B.10	Verteiler-Reagenzglas-Adapter	157

Tabellenverzeichnis

2.1	Natürlich vorkommende, für Membranlipide relevante, Fettsäuren [10] [6]	8
2.2	Ausgewählte, wichtige Glycerolipidklassen und deren Alkoholreste [6]	10
3.1	Eckdaten von DPPC [29, 47]	54
4.1	Externe Oberfläche und eingeschlossenes Volumen von Liposomen in Abhängigkeit von der Präparationsmethode [54] . . .	59
6.1	Koeffizienten für die Berechnung der Dampfdruckkurven von Chloroform, Methanol, Dichlormethan und Wasser [80]	87
7.1	Microcal-Parameter für DSC Messung von DPPC	96
7.2	Messpunkte der SAXS/WAXS-Messungen für DPPC	96
7.3	Herstellungsparameter der Referenzproben F1 bis F4 (man vergleiche mit Literaturdaten aus Tabelle 3.1)	99
7.4	Herstellungsparameter der Proben F4 und F4a	100
7.5	Herstellungsparameter der Proben RSE A und RSE B	102
7.6	Herstellungsparameter der Proben RSE A bis D	106
7.7	Herstellungsparameter der Proben RSE A bis F	108
7.8	Herstellungsparameter der Proben RSE G bis L	108
7.9	Herstellungsparameter der Proben RSE A bis F	111
7.10	Herstellungsparameter der Proben I, J, G, H, K, L	112
7.11	Herstellungsparameter der Proben RSE M bis Q	114
7.12	Herstellungsparameter der Proben R, S, G, H, K, L	115
7.13	Herstellungsparameter der Proben RSE A bis D	117
7.14	Herstellungsparameter der Proben RSE G, K, H, L	117
7.15	Herstellungsparameter der Proben RSE T bis X (man vergleiche Referenzdaten aus Tabelle 7.3 und Literaturdaten aus Tabelle 3.1)	121

7.16	Doppelschichtwiederholdistanz für die Gel- und Flüssigphase von RSE K, L, X und A gemessen bei 25 °C und bei 50 °C . .	127
7.17	Rippelwiederholperiode $d_{(010)}$ und Doppelschichtwiederholdistanz $d_{(100)}$ für die Rippelphase von RSE A und X	128
8.1	Herstellungparameter der DPPG-Referenzproben F5 bis F8 .	134
8.2	Herstellungparameter der RSE-Probe	134
A.1	Schmelzpunkte und Kettenlängen der wichtigsten Modellmembranlipide	146

Kapitel 1

Motivation

Durch immer feinere und zugleich effizientere wissenschaftliche Methoden sowie detailliertere Fragestellungen sind Biologie und Medizin in Bereiche der Molekular- und Atomphysik vorgestoßen. Die Biophysik gewinnt daher in den letzten Jahren als interdisziplinärer naturwissenschaftlicher Bereich, die Medizin, Biologie, Chemie und Physik umfassend, zunehmend an Bedeutung. Um nun Erklärungen und Lösungen für Fragestellungen in meso- und nanoskaligen Dimensionen zu finden wird es nötig, theoretische und experimentelle physikalische Methoden zusätzlich zu den gängigen biologischen und chemischen Methoden einzuführen und zu etablieren.

Die Lipidomik (siehe Kapitel 2) als Teilbereich der Metabolomik ist ein solches interdisziplinäres Gebiet, dessen Fortschritt in hohem Maße auf der Schaffung physikalischer Modellsysteme und Erschließung der sich durch Selbstassemblierung bildenden nanoskopischen Strukturen anhand physikalischer Analysemethoden wie NMR, Röntgendiagnostik, Kalorimetrie, Spektroskopie und Spektrometrie beruht.

Trotz Klassifizierung sowie Strukturbestimmung der zellulären Entitäten und molekularen Bestandteile bleiben die Funktionsweisen jedoch vielfach unklar. So lassen sich beispielsweise Zusammenhänge zwischen Stoffwechselerkrankungen und Lipidzusammensetzungen von Zellen bzw. Organellen zwar qualitativ nachweisen, die physikochemischen Bindeglieder bleiben jedoch nach wie vor im Dunkeln. Große Anstrengungen werden daher insbesondere dahingehend unternommen, mittels Darstellung vorerst einfacher, liposomaler Gebilde eine schrittweise komplexere Modellierung zellmembranähnlicher Systeme zu erreichen, um in absehbarer Zukunft die gewonnenen Erkenntnisse auf in vivo Modelle übertragen zu können. Zu diesem Behufe wird stets nach Methoden zur raschen und flexiblen Herstellung von Lipidvesikeln vielfältiger chemischer Zusammensetzung gesucht. Das in dieser Arbeit beschriebene Rapid Solvent Exchange Verfahren verspricht eben jenen Anforderungen

Genüge zu tun. Eine Adaptierung der Methode soll der Zellmembranstrukturforschung dazu dienen, neue Modellsysteme für die Untersuchung mittels Röntgenstrukturanalyse in großer Menge zeitnah herstellen zu können. Die Einführung und Adaptierung der RSE-Methode bildet das Herzstück dieser Arbeit.

Kapitel 2

Lipide

2.1 Lipide und Lipidomik

Lipide stellen neben Nukleinsäuren, Polysacchariden und Proteinen eine der wesentlichen Gruppen von Biomolekülen dar. Sie sind kleine, nicht polymere Einheiten mit einem Molekulargewicht unter 2000 Da, welche nicht genetisch kodiert, sondern durch enzymatische Reaktionen generiert und metabolisiert werden. Diese Reaktionen werden durch die Umgebung des ihnen zugrundeliegenden biologischen Systems, wie beispielsweise die Nahrung, chronobiologische Einflussfaktoren oder Temperatur, beeinflusst. Man schätzt die Anzahl der biologisch aktiven Lipide auf 10.000 bis 100.000 - die Ursache für die Vielzahl der chemischen Ausprägungen bleibt vorerst im Dunkeln. [1]

Die Verwendung und Funktion von Lipiden im zellulären Gewebe erstreckt sich über eine Vielzahl von Bereichen.

Ein wohlbekannter Anwendungsbereich ist der Aufbau von Zellmembranen und zellulären Kompartiments wie Organellen und Lipidkörpern. Mittelpunkt des Interesses ist hier seit jeher die strukturelle Beschaffenheit, sowie Dynamik und Interaktion der Lipidmembran. Abbildung 2.1 zeigt einerseits die unterschiedliche Ausprägung der zellulären und intrazellulären Lipidmembran sowie einige charakteristische Baustoffe, andererseits Bestandteile der Lipidkörper. [2]

Die Lipide wurden in diesem Zusammenhang jedoch lange als passive Elemente betrachtet. Neuere Forschungen belegen au contraire, dass Membranlipide auch als Vorläufersubstanzen für lösliche Botenstoffe dienen. Die durch Phospholipase gesteuerte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat führt zu Sekundärbotenstoffen wie beispielsweise Arachidonsäure, welche wiederum Vorläufersubstanz von Eicosanoiden ist, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind (vergleiche Abbildung 2.1). Abseits von ihrer Eigenschaft als

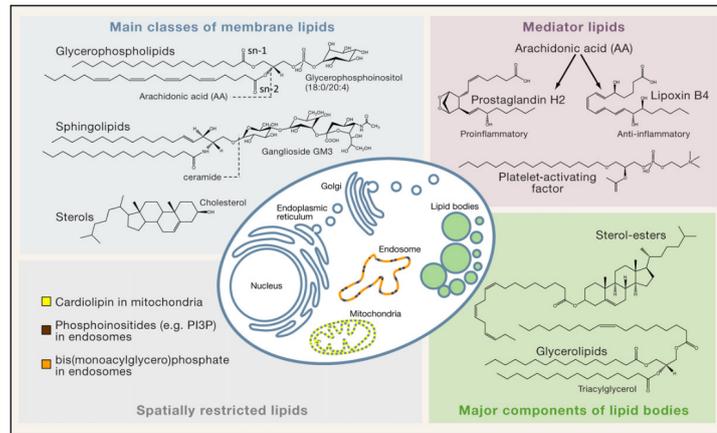


Abbildung 2.1: Lipidzusammensetzung von Zellmembranen sowie zellulärer Kompartiments und davon abgewandelten Metaboliten [1]
 Links oben: Vertreter der wichtigsten Membranlipidklassen
 Links unten: Erläuterung der Zusammensetzung von Organellmembranen
 Rechts oben: Beispiele für Metaboliten von Membranlipiden
 Rechts unten: Bestandteile von Lipidkörpern
 Mitte: Zelle mit Organellen

Präkursoren sind Membranlipide auch oftmals selbst als Signalstoffe tätig. Sphingolipide sind an Entzündungsprozessen beteiligt, eine ihrer Untergruppen, die Ceramide, dienen als Regulatoren für Zellwachstum und -tod. Phosphatidylinositol wiederum ist in einer Vielzahl von Zellmechanismen, wie der Ca-Homöostase, dem Membranverkehr oder aber der Zytoskelett-Dynamik involviert. [2]

Große Bedeutung kommt dem Lipidmetabolismus auch im Bereich der Energiespeicherung und Energiehomöostasis zu. Von der Zerlegung von Nahrungsfetten in Fettsäuren, deren Aufnahme, dem Transport bis zur Fettsäurespeicherung sind Lipidenzyme sowie Lipidbindungsproteine beteiligt. Lipide müssen sich also als Teil der Energiehomöostase stetiger dynamischer, metabolischer Umwandlungen unterziehen - zur Ausbalancierung externer Reize wie Nahrungsaufnahme oder aber schwankenden hormonellen Aktivitäten des Verdauungssystems. Sie übernehmen dabei einerseits die Rolle von Metaboliten, andererseits die Rolle von Regulatoren. [2]

Auch die Bedeutung der enzymatischen Aktivität von Lipiden ist in der Lipidmetabolikforschung mehr und mehr von Interesse. [1]

Fragestellungen rund um den Aufbau, die Kräfte und die Dynamik innerhalb von Aggregaten wie Membranen sowie deren spezifische als auch unspezifische Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung bilden die Grundlage des physika-

lischen Lipidforschungskanonen. Veränderungen der Lipidzusammensetzung der Membran, wie beispielsweise Einbau von membranmodulierten Ceramiden, wirken sich nicht nur auf die physikalischen Parameter aus, sondern erzeugen auch Rückkopplungen mit der einbettenden Matrix und Botenstoffen.

Um sich der hohen Diversität und Komplexität der Stoffklasse der Lipide anzunehmen, wurde vor wenigen Jahren ein neuer Ast der Metabolomik, die Lipidomik, aus der Wiege gehoben. In internationalen Projekten wie dem amerikanischen „Lipid Maps“¹ und dem europäischen „ELife“² versucht man, Lipide zu charakterisieren und klassifizieren, vereinheitlichte Nomenklaturen zu schaffen, sowie Daten über Lipidzusammensetzungen, -mengen, -netzwerke, -stoffwechselfade und -strukturen zu sammeln. [3] Außerdem werden Informationen über die Zusammenhänge mit der Transkriptomik und Proteomik, wie beispielsweise Lipidproteome³ sowie über gängige Analyseverfahren zur Verfügung gestellt. [3, 4] Abbildung 2.2 zeigt die Verzahnung der einzelnen Forschungsfelder und gibt die Zusammenhänge schematisch wieder. Im Rah-

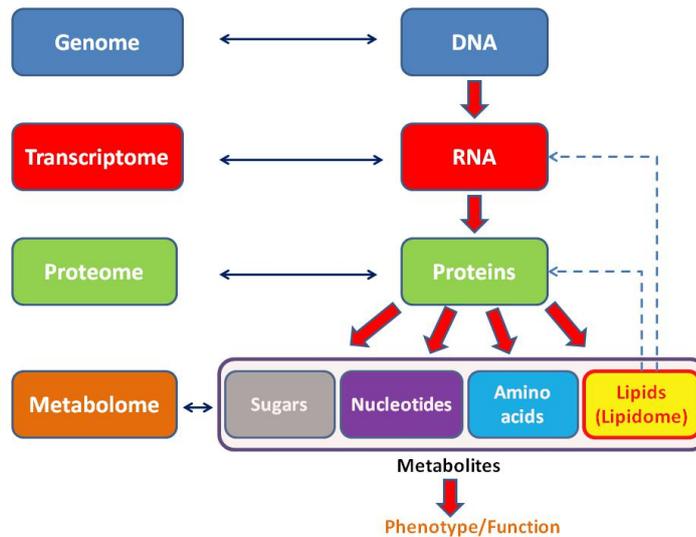


Abbildung 2.2: Lipidomik in Zusammenhang mit der Interaktomik in einer Zelle [3]

men dieses Forschungsnetzwerks wurde auch eine neue Definition für Lipide geschaffen:

¹Lipid Metabolites And Pathways Strategy

²European Lipidomics Initiative

³Proteine, welche am Lipidmetabolismus beteiligt sind

„Lipide sind hydrophobe oder amphipathische, kleine Moleküle, welche zur Gänze oder teilweise durch carbanion-basierte Kondensation von Thioestern (Fettacycle, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Saccharolipide, Polyketide) und/oder carbokation-basierte Kondensation von Isopreneinheiten (Prenollipide, Sterollipide) entstehen.“ [5]

Trotz der großen Anstrengungen die international unternommen werden, steckt die Lipidomik, im Vergleich zu etablierten Gebieten wie der Genomik oder Proteomik, noch in den Kinderschuhen (vergleiche Abbildung 2.3). [1] Die ursprünglichen genetischen, zellbiologischen und biochemischen Analy-

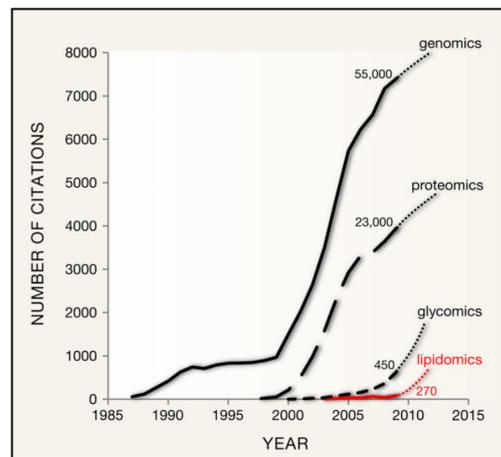


Abbildung 2.3: Entwicklung der Forschungstätigkeit im Bereich der Lipidomik [1]

severfahren, wie Chromatographie, boten nicht die nötige Effizienz um der gewaltigen Mengen an Lipiden, welche in so unterschiedlichen Konzentrationen intrazellulär vorkommen, in gebührender Zeit Herr zu werden. Erst mit dem Einzug physikalischer Methoden wie hochauflösender Massenspektrometrie (wie dem MALDI-TOF-Verfahren [6], einer Kopplung von Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation sowie Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse) und Kernspinresonanzverfahren in die Lipidomik war die Grundlage für effiziente Forschung gelegt. Nur wenige Labors weltweit bedienen sich jedoch bis jetzt dieser Techniken. Als bildgebendes Verfahren etabliert sich mehr und mehr die kohärente Anti-Stokes Ramanmikroskopie. [1, 7]

Die gesammelten Anstrengungen der Lipidomik münden in dem Bestreben, die Rolle der Lipide so gut zu verstehen, dass man Zusammenhänge mit Pathologien im menschlichen Körper herzustellen vermag.

Der Lipidhaushalt des Körpers wird örtlich und zeitlich streng reguliert. Ab-

weichungen von der Norm sind mitverantwortlich für neurologische Krankheiten wie bipolare Störungen oder Schizophrenie (viele Proteine in den Synapsen binden direkt an Lipide), zelluläres Eindringen sowie Mimikry von Pathogenen durch Veränderung von Membranlipiden, immunologische Veränderungen und Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes oder Krebs. [1, 2]

Wir wollen im Rahmen dieser Arbeit die grundlegenden Fragestellungen im Bereich der Membranstrukturbildung fokussieren. Dazu verschaffen wir uns in Kapitel 2.2 zunächst einen kurzen Überblick hinsichtlich der unterschiedlichen Lipidarten, insbesondere jener Lipide, welche für die Selbstassemblierung von Membranen beim Menschen relevant sind.

2.2 Lipidklassifizierung

Die große Stoffgruppe der Lipide lässt sich gemäß Abbildung 2.4 klassifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die, für eukaryotische sowie künstliche Zellmembranen besonders relevanten, amphiphilen Lipide aus der Gruppe der Glycerophospho-, der Sphingo- und der Sterollipide näher eingegangen. Abbildung 2.5 zeigt schematisch den Aufbau jener Membranlipide.

2.2.1 Glycerophospholipide

Die Phosphoglyceride zählen zur Gruppe der Glycerolipide und bilden die wichtigsten Phospholipide in der Mehrzahl tierischer Zellen. Ihr Gerüst wird, wie in Abbildung 2.5(a) ersichtlich, von dem Alkohol Glycerin gebildet.

Durch eine Veresterung zweier benachbarter Hydroxylgruppen des Glycerin sind zwei Fettsäuren an das Glycerin gebunden. Die übliche Kohlenwasserstoffkettenlänge der Fettsäuren, sowohl bei Tieren, Pflanzen als auch Bakterien, liegt zwischen 14 und 24 C-Atomen. In der Regel bestehen diese Lipide aus einer ungesättigten Fettsäurekette, welche eine oder mehrere *cis*-Doppelbindungen aufweist, und einer gesättigten Kette. Die Doppelbindungen bewirken, dass die ansonsten lineare Kettenstruktur durch kleine Knicke unterbrochen wird. [9] Tabelle 2.1 listet die natürlich vorkommenden Fettsäuren, welche für die Veresterung in Frage kommen. Die Durchnummerierung der Kohlenstoffatome erfolgt von der Carboxylgruppe aus, die Position der Doppelbindung wird durch ein Δ versinnbildlicht. Die gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen ist auf die Natur ihrer Biosynthese zurückzuführen. [10] An der dritten Hydroxylgruppe des Glycerin hängt eine Phosphatgruppe, welche ihrerseits wiederum unterschiedliche Alkoholreste bindet. Tabelle 2.2 listet wichtige Glycerolipidklassen und deren entsprechende Alkoholreste auf.

C-Atome	Doppelbindungen	Trivialname	Systematischer Name	Strukturformel	Schmelzpunkt /°C
12	0	Laurinsäure	n-Dodecansäure	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	44
14	0	Myristinsäure	n-Tetradecansäure	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	54
16	0	Palmitinsäure	n-Hexadecansäure	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	63
18	0	Stearinsäure	n-Octadecansäure	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	70
20	0	Arachinsäure	n-Eicosansäure	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	75
22	0	Beheninsäure	n-Docosansäure	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	80
24	0	Lignocerinsäure	n-Tetracosansäure	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	84
16	1	Palmitoleinsäure	<i>cis</i> - Δ^9 -Hexadecensäure	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	0
18	1	Oleinsäure	<i>cis</i> - Δ^9 -Octadecensäure	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	13
18	2	Linolensäure	<i>cis</i> , <i>cis</i> - Δ^9, Δ^{12} -Octadecadiensäure	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	-5
18	3	α -Linolensäure	<i>all</i> - <i>cis</i> - $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ -Octadecatriensäure	$CH_3(CH_2)(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	-11
20	4	Arachidonsäure	<i>all</i> - <i>cis</i> - $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ -Eicosatetraensäure	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_6COOH$	-49

Tabelle 2.1: Natürlich vorkommende, für Membranlipide relevante, Fettsäuren [6, 10]
 $\Delta \dots$ Position der Doppelbindungen

Von diesen wichtigen Verbindungen zählen jene mit Phosphatidylcholin- oder Phosphatidylethanolaminresten zu den neutralen Phospholipiden, jene mit Phosphatidsäure-, Phosphatidylglycerol-, Phosphatidylinositol- und Phosphatidylserinresten zu den sauren Vertretern. [6]

Abbildung 2.6 zeigt am Beispiel eines Phosphatidylcholinmoleküls die Struktur eines typischen Phosphoglycerids. Die Kopfgruppe, bestehend aus dem Alkohol Cholin, der Phosphatgruppe sowie dem Glycerolkörper, ist polar und stellt somit den hydrophilen Teil des Lipids dar. Die langen Kohlenwasserstoffketten des Lipids sind apolar und somit hydrophob. [9]

2.2.2 Sphingolipide

Aus der Gruppe der Sphingolipide sind für die Membranphysik die Phospho- sowie die Glycosphingoide von besonderer Bedeutung.

2.2.2.1 Phosphosphingoide

Phospholipide aus der Gruppe der Sphingolipide besitzen als Rumpfeinheit Sphingosin, welches aus zwei Hydroxylgruppen sowie einer Acylkette mit einer Aminogruppe besteht. Wie Abbildung 2.5(b) zeigt, ist das Sphingosin an eine Phosphatgruppe als auch an eine Fettsäure (vergleiche Tabelle 2.1) gebunden. Alkohole, welche als wichtige Bindungspartner für die Phosphatgruppe in Frage kommen sind, wie schon bei den Phosphoglyceriden, der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Ein besonders wichtiger Vertreter der Sphingolipide ist das Sphingomyelin. Dessen Phosphatgruppe bindet an Cholin. [9]

2.2.2.2 Glycosphingoide

Glycosphingolipide zeigen den gleichen Aufbau wie Phosphosphingoide (siehe Abbildung 2.5(c)) mit Ausnahme ein oder mehrerer Kohlenhydrateinheiten, welche die Stelle der Phosphatgruppe einnehmen. [10]

2.2.3 Sterollipide

Aus der Gruppe der Sterollipide ist für die Membranphysik das Cholesterol von besonderer Bedeutung.

2.2.3.1 Cholesterin

Cholesterin zählt zu der Lipidgruppe der Steroide. Das Gerüst bilden hier Sterane, welche, an eine OH-Gruppe gebunden, die Grundeinheit der Sterine bilden. Wie Abbildung 2.5(d) zeigt, wird aus Sterin, zusammen mit

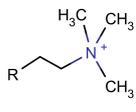
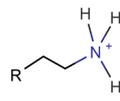
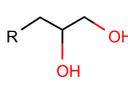
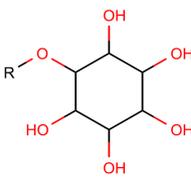
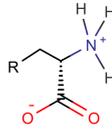
Klasse	Kurzbezeichnung	Restbezeichnung	Reststruktur	Ladung
Phosphatid- säure	PA	Wasserstoff	$R-H$	sauer
Phosphatidyl- cholin	PC	Cholin		neutral
Phosphatidyl- ethanolamin	PE	Ethanolamin		neutral
Phosphatidyl- glycerol	PG	Glycerol		sauer
Phosphatidyl- inositol	PI	Inositol		sauer
Phosphatidyl- serin	PS	Serin		sauer

Tabelle 2.2: Ausgewählte, wichtige Glycerolipidklassen und deren Alkoholreste [6]

einer aliphatischen Gruppe, das Cholesterin gebildet. Die kompakte Struktur des Cholesterins geht aus der Kalottendarstellung in Abbildung 2.7 hervor. Die Hydroxylgruppe bildet einen besonders kleinen hydrophilen Kopf, gefolgt von einem starren Steroidkörper. Der Kohlenwasserstoffschwanz ist hydrophob. [9]

2.2.4 Schmelzpunkte von Membranlipiden

Der Schmelzpunkt von Lipiden wird durch folgende Faktoren bestimmt:

- pH-Wert der Umgebung: Je höher der pH-Wert, desto niedriger ist der Schmelzpunkt. Durch Ionisierung der polaren Kopfgruppe kann es zu Abstoßungstendenzen kommen. Dadurch gewinnen die Ketten mehr Platz und schmelzen leichter. [11]
- Kohlenwasserstoffkettenlänge: Je kürzer die Kohlenwasserstoffketten, je niedriger also das Molekulargewicht, desto niedriger ist der Schmelzpunkt. Dies ist auf die Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Ketten zurückzuführen. [11]
- Sättigung der Fettsäureketten: Generell kann gesagt werden, dass der Schmelzpunkt umso niedriger ist, je mehr Doppelbindungen vorhanden sind. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die linearen, gesättigten Fettsäureketten durch Doppelbindungen geknickt werden und es nicht mehr möglich ist, die Lipide eng zu packen. Dies führt zur Abnahme der Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Lipiden. Ungesättigte Fettsäuren können in *cis*- und *trans*-Verbindungen gegliedert werden. Die *cis*-Bindung führt zu einem Knick einer Fettsäurekette um 30 Grad und schwächt so, durch sehr starke Verringerung der Van-der-Waals-Wechselwirkung, den Schmelzpunkt in besonderem Maße. Außerdem führen *cis*-Doppelbindungen zu erhöhter Flexibilität. Bei *trans*-Fettsäuren ist der Knick in der Kette nicht sehr ausgeprägt, sie sind steifer und weisen, im Vergleich zu *cis*-Fettsäuren, höhere Schmelzpunkte auf. [11]
- Größe der polaren Gruppe: Ist eine Kopfgruppe besonders groß, so kann der Schmelzpunkt sinken. Grund dafür ist die Tatsache, dass die Kohlenwasserstoffketten durch das höhere Platzangebot früher ihre *all-trans*-Konformation verlassen können. [11]

KAPITEL 2. Lipide

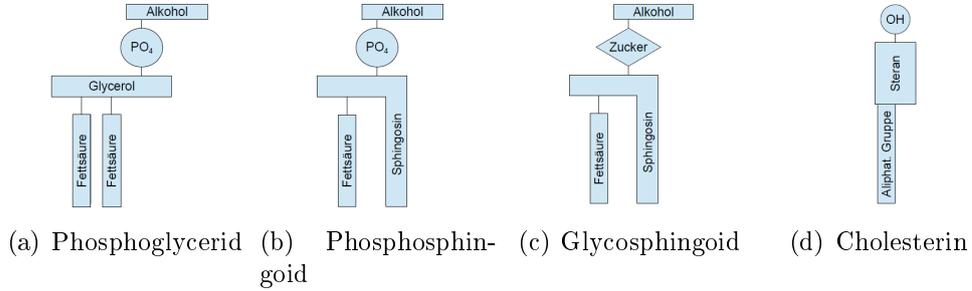


Abbildung 2.5: Struktur der wichtigsten Membranlipide

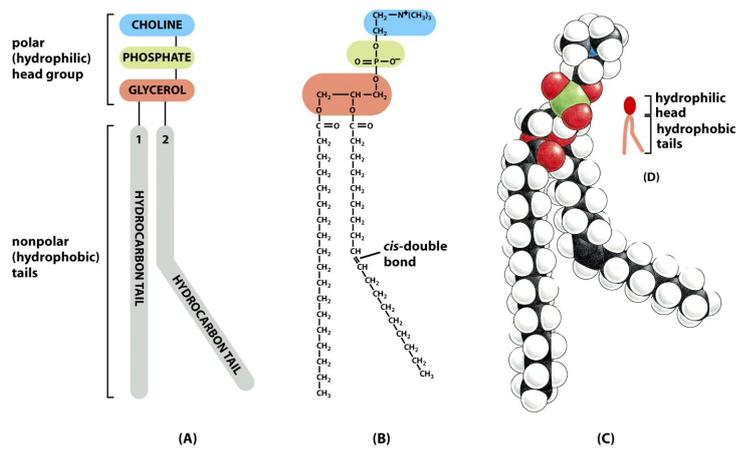


Abbildung 2.6: Struktur der Phosphoglyceride am Beispiel von Phosphatidylcholin [9]

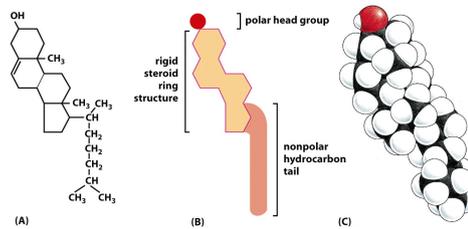


Abbildung 2.7: Struktur von Cholesterin [9]

2.3 Selbstassemblierung von Lipiden

2.3.1 Mesophasen

Unter Mesophasen versteht man Zustände zwischen flüssiger und fester Phase. Zu diesen zählt unter anderem die Gruppe der flüssigkristallinen Stoffe, welche sich unterteilen lässt in einen thermotropen und einen lyotropen Zweig. Thermotrope⁴ Flüssigkristalle entstehen durch Ausbildung von Mesophasen in der Schmelze reiner Substanzen in Abhängigkeit von der vorherrschenden Temperatur.⁵ Lyotrope⁶ Flüssigkristalle bilden sich als Mesophasen in Lösungsmitteln in Abhängigkeit von der Konzentration der gelösten Substanz. [14, 15]

Viele biologische Substanzen, wie auch die Lipide, zählen zur Klasse der lyotropen Flüssigkristalle. Sie neigen dazu, bei Überschreitung gewisser Schwellkonzentrationen flüssigkristalline Phasen zu bilden. Diese apolaren Substanzen und Stoffe amphiphilen Charakters tendieren in polaren Lösungsmitteln zu einer Entmischung in Folge der im Anschluss diskutierten energetischen und geometrischen Überlegungen.

2.3.2 Chemisches Potential und Freie Energie

Ein Gleichgewicht der Phasen stellt sich gemäß [16] ein, wenn das chemische Potential

$$\mu = \mu_N = \epsilon_N + \frac{k_b T}{N} \ln \left(\frac{X_N}{N} \right) = const. \quad (2.1)$$

μ ... Chemisches Potential der einzelnen Lipide

μ_N ... Chemisches Potential der N-fachen Aggregate

ϵ_N ... Freie Energie-Änderung wenn ein einzelnes Molekül aus der Lösung genommen wird und in ein N-faches Aggregat gesetzt wird

k_b ... Boltzmannkonstante

T ... Temperatur

N ... Anzahl der aggregierten Teilchen

X_N ... Volumsanteil von gelösten Molekülen in Aggregat mit N Molekülen

⁴Thermotrope Stoffe zeigen differenziertes Phasenverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen. [12]

⁵Man unterscheidet je nach Geometrie der phasenbildenden Stoffe zwischen nematischen, smektischen und diskotischen Phasen.

⁶Lyotrope Stoffe und Phasen sind solche, deren Verhalten durch die Gegenwart und die Eigenschaften von Lösungsmitteln bestimmt wird. [13]

der gelösten Moleküle mit dem Gesamtvolumensanteil $\phi = \sum X_N$ in allen Aggregaten gleich ist. Aus dieser Überlegung gewinnt man für den Volumensanteil von Aggregaten mit N Molekülen gemäß [16] die Gleichung

$$X_N = N(X_1 e^{\frac{\epsilon_1 - \epsilon_N}{k_b T}})^N. \quad (2.2)$$

$X_1 \dots$ Volumensanteil von einzelnen gelösten Molekülen
 $\epsilon_1 \dots$ Freie Energie eines einzelnen gelösten Moleküls

Die entscheidende Rolle hinsichtlich der Aggregatsbildung spielt die freie Energie ϵ , welche für biologische Systeme in der Regel in ein Minimum läuft. Für den Fall dass ϵ_N kleiner ist als ϵ_1 , werden sich also N-Aggregate bilden. [16]

2.3.3 Aggregation unpolarer Moleküle

Bei einfachen Molekülen wie Neutrallipiden liegt das Minimum von ϵ_N bei $N \rightarrow \infty$ und es findet eine vollständige Phasentrennung statt. Für den Fall sphärischer Aggregate ergibt sich für ϵ_N gemäß [16] die Form

$$\begin{aligned} \epsilon_N &= \epsilon_\infty + \frac{4\pi\gamma r^2}{N} = \\ &= \epsilon_\infty + \frac{4\pi\gamma}{N} \left(\frac{3NV}{4\pi} \right)^{\frac{2}{3}}. \end{aligned} \quad (2.3)$$

$\epsilon_\infty \dots$ Freie Energie-Änderung, wenn ein einzelnes Molekül aus der Lösung genommen wird und in ein für N gegen unendlich laufendes Aggregat gesetzt wird

$V \dots$ Molekularvolumen

$\gamma \dots$ Oberflächenspannung

Im zweiten Term von Gleichung 2.3 fließt über den Radius des Oberflächenenergieterms $4\pi\gamma r^2$ das Molekularvolumen und die Anzahl der Aggregatteilnehmer ein. Dieser Term wird für sehr große N unbedeutend. Zusammenfassend lässt sich nach [16] für ϵ_N

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{\alpha k_b T}{N^{\frac{1}{3}}} \quad (2.4)$$

$\alpha k_b T \equiv 4\pi\gamma \left(\frac{3V}{4\pi} \right)^{\frac{2}{3}}$
 schreiben.

Hinsichtlich der Entstehungswahrscheinlichkeit von N-Aggregaten gibt uns, wie in [16] ersichtlich, die Gleichung 2.5, geformt aus Gleichung 2.2 und 2.3, nähere Auskunft.

$$\begin{aligned} X_N &= N(X_1 e^\alpha)^N e^{-\alpha N^{\frac{2}{3}}} \approx \\ &\approx N(X_1 e^\alpha)^N \end{aligned} \quad (2.5)$$

Würde X_1 in Gleichung 2.5 größer als eine bestimmte kritische Aggregationskonzentration⁷ $\phi_c = e^{-\alpha}$, so müsste der Volumsanteil X_N über 1 steigen. Dies ist nicht möglich. Deshalb verbinden sich hinzugefügte einzelne Teilchen mit N-Aggregaten. Da ϵ wie besprochen mit zunehmendem N monoton abnimmt, wird eine Bildung des ∞ -Aggregats einsetzen. [16]

2.3.4 Aggregation amphiphiler Moleküle

Welche Aggregate sich im Falle amphiphiler Moleküle bildet, hängt in hohem Maße von der Molekülform und der freien Energie ab. Die Molekülgeometrie bestimmt die Struktur des Aggregats, das Minimum der freien Energie die Größe.

2.3.4.1 Aggregatform

Der wesentliche Formfaktor der beteiligten Moleküle ist gemäß [16] gegeben durch

$$\frac{V}{la} \leq \frac{1}{3} \quad (2.6a)$$

$$\frac{1}{3} < \frac{V}{la} \leq \frac{1}{2} \quad (2.6b)$$

$$\frac{V}{la} \approx 1 \quad (2.6c)$$

$$\frac{V}{la} > 1. \quad (2.6d)$$

V ... Volumen der Fettsäureketten

a ... Fläche der Lipidkopfgruppe

l ... Länge der Fettsäureketten

⁷CAC = critical aggregation concentration

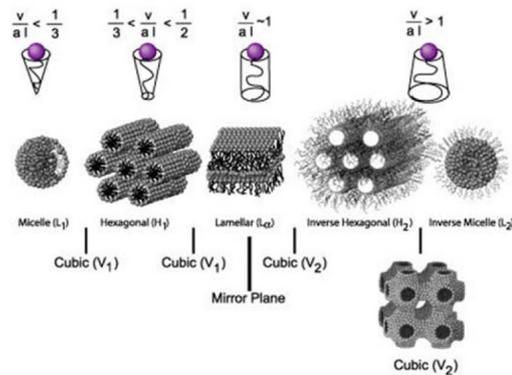


Abbildung 2.8: Einfluss der Geometrie amphiphiler Moleküle auf die Organisationsstruktur [14]

Im Falle von Gleichung 2.6a bilden sich sphärische Mizellen, zylindrische Mizellen entstehen unter der Bedingung 2.6b, die Werte in 2.6c liefern Doppelschichten. Für Geometrien gemäß 2.6d formen sich inverse Strukturen. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 2.8 dargestellt.

2.3.4.2 Aggregatgröße

Gleichung 2.2 aus Kapitel 2.3.2 gilt auch für komplexere Moleküle, wie die hier beschriebenen amphiphilen Lipide. Das Minimum der freien Energie für ein N-Aggregat liegt nun jedoch nicht mehr bei $N = \infty$, wie für neutrale Lipide, sondern im Endlichen. [16]

Hinsichtlich der Entstehungsgröße kann abhängig von der Aggregatform folgende Unterscheidung getroffen werden:

1. Für sphärische Mizellen gilt gemäß [17] in Hinblick auf die Freie Energie die Gleichung

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{4\pi r^2 \gamma}{N}. \quad (2.7)$$

Daraus lässt sich die Beziehung

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{\alpha k_b T}{N^{\frac{1}{3}}}. \quad (2.8)$$

ableiten.

Das Minimum der freien Energie liegt im Endlichen mit einer Verteilung ähnlich der Gauß'schen Verteilungsfunktion. Dadurch entstehen

sphärische Mizellen. Es gilt nach [16]

$$\begin{aligned} X_N &= N(X_1 e^\alpha)^N e^{-\alpha N^{\frac{2}{3}}} \approx \\ &\approx N(X_1 e^\alpha)^N. \end{aligned} \quad (2.9)$$

Bilden sich kleine Mizellen, so können die hydrophilen Kopfgruppen die hydrophoben Molekülteile nicht gegenüber der polaren Flüssigkeit abschirmen, sind die Aggregate zu groß, so werden polare Kopfgruppen ins Innere der Mizelle gedrängt was wiederum zu einem energetisch unvorteilhaften Zustand führt. [16]

2. Für zylindrische Formen spielt die Ausdehnung des Aggregats, im Gegensatz zum Volumen bei der Kugel (siehe Gleichung 2.3), energetisch keine entscheidende Rolle. Die wesentlichen Beiträge stammen, wie in Gleichung 2.10 ersichtlich, lediglich von den Enden des Zylinders, wo energetisch ungünstige Krümmungsparameter zum Abschirmen der hydrophoben Molekülteile vor dem polaren Lösungsmittel nötig sind bzw. eine hundertprozentige Abschirmung erst gar nicht möglich ist. [16]

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{2E_{\text{Ende}}}{N} \quad (2.10)$$

Äquivalent dazu lässt sich wie schon in Gleichung 2.4 gemäß [16] schreiben

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{\alpha k_b T}{N}. \quad (2.11)$$

Der Volumensanteil an gelösten Molekülen in einem N-Aggregat ergibt sich in diesem Falle nach [16] zu

$$X_N = N(X_1 e^\alpha)^N e^{-\alpha} \quad (2.12)$$

Der im Vergleich zu Gleichung 2.5 zusätzliche Exponentialterm $e^{-\alpha}$ bedingt, dass sich im Gegensatz zu den sphärischen Aggregaten hier eine sehr breite Verteilung von N-Aggregaten bildet. Der Drang zur Minimierung der Zylinderenden führt zur Fusion der Tubuli, der Gewinn an Entropie bedingt die Aufspaltung. Dadurch kommt es zu stetigen Aufspaltungs- und Fusionsprozessen.

3. Für Doppelschichtaggregate spielt die flächige Ausdehnung energetisch ebenfalls keine entscheidende Rolle. Die wesentlichen Beiträge stammen, wie in Gleichung 2.13 ersichtlich, von den Rändern der Aggregate, wo, wie schon bei den zylindrischen Formen, energetisch ungünstige

Krümmungsparameter zum Abschirmen der hydrophoben Molekülteile vor dem polaren Lösungsmittel nötig sind bzw. vollständige Abschirmung erst gar nicht möglich ist. [16]

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{E_{rand}}{N} \quad (2.13)$$

Äquivalent dazu lässt sich wie schon in Gleichung 2.4 sowie Gleichung 2.11 nach [16] schreiben

$$\epsilon_N = \epsilon_\infty + \frac{\alpha k_b T}{N^{\frac{1}{2}}}. \quad (2.14)$$

Man beachte dabei die unterschiedlichen Exponenten des Terms N . Der Volumsanteil an gelösten Molekülen in einem N -Aggregat ergibt sich gemäß [16] in diesem Falle zu

$$\begin{aligned} X_N &= N(X_1 e^\alpha)^N e^{-\alpha N^{\frac{1}{2}}} \approx \\ &\approx N(X_1 e^\alpha)^N \end{aligned} \quad (2.15)$$

Durch den Faktor $N^{\frac{1}{2}}$ wird die Anzahl von endlich großen Doppelschichten exponentiell klein. Hier wird, ohne Berücksichtigung der Möglichkeit einer Vesikelbildung über der kritischen Aggregationskonzentration die Bildung eines scheibenförmigen ∞ -Aggregats einsetzen (vergleiche Gleichung 2.5).

2.3.4.3 Vesikelbildung amphiphiler Aggregate

Zieht man nun auch die Möglichkeit in Betracht, durch eine Krümmung des Doppelschichtaggregats die Randoberfläche und somit die Energie des Objektes zu minimieren (vergleiche dazu Abbildung 2.9) und in diesem Zuge sphärische Objekte zu formen, so wird deren Entstehung energetisch nach [16] von 3 Komponenten abhängen:

- dem Energieaufwand bedingt durch die zu formende Krümmung des flächigen Aggregats

$$E_{krumm} = \frac{K_c}{2} \int [(J - J_0)^2 + \kappa_G K] dA \quad (2.16)$$

K_c ... Biegefestigkeit

J ... Gesamtkrümmung

J_0 ... Spontane Krümmung

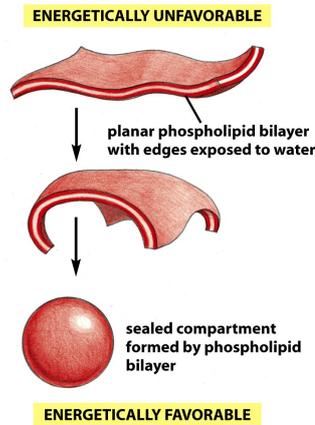


Abbildung 2.9: Krümmung einer planaren Lipiddoppelschicht zu einem Lipidvesikel [9]

κ_G ... Modul der Gauß'schen Krümmung
 K ... Gauß'sche Krümmung

- dem Energiegewinn durch die Minimierung der Berandungsoberflächen des Aggregats

$$E_{rand} = -\frac{\alpha k_b}{2} \quad (2.17)$$

- dem Energiegewinn durch Translationsentropie der einzelnen, endlichen Aggregate.

Diese sphärischen Objekte werden „normale Vesikel“⁸ genannt. [18] In weiterer Folge werden wir synonym für Vesikel auch den Begriff Liposom⁹ gebrauchen.

2.3.4.4 Langreichweitige Ordnung durch Interaktion amphiphiler Aggregate bei hohen Konzentrationen

Wurde die kritische Aggregationskonzentration überschritten und wird die Anzahl der sich in der Lösung befindlichen Aggregate groß genug, so beginnen diese zu interagieren. Ausschlaggebend dafür sind unter anderen unspezifische Kräfte:

⁸Unter Vesikeln versteht man bestimmte polymolekulare Aggregate gewisser amphipatischer Moleküle welche sich in wässrigen Lösungen bilden. Sie schließen kleine Volumina der wässrigen Lösung ein und können aus einer oder mehreren Hüllen bestehen. [18]

⁹aus dem griechischen; lipos steht für ‚Fett‘, soma für ‚Körper‘ [19]

DLVO-Kräfte

- Van-der-Waals-Wechselwirkung:
Van-der Waals-Kräfte wirken zwischen allen Körpern. Gewöhnlich sind sie anziehender Art, sie können aber auch abstoßenden Charakter aufweisen.

Im klassischen Sinne liegt die Entstehung der van-der-Waals-Kräfte in Fluktuationen elektrischer Dipolmomente, welche bei Annäherung von Teilchen zu korrelieren beginnen, begründet. Man unterscheidet die Kraft zwischen zwei permanenten Dipolen (Keesomkraft), zwischen einem permanenten und einem induzierten Dipol (Debye kraft) und zwischen zwei induzierten Dipolen (London Dispersionskräfte). Für Atome und Moleküle fällt die Van-der-Waals-Kraft mit zunehmendem Abstand D sehr schnell ab ($U = -C_{vdW}/D^6$), im Falle sphärischer, makroskopischer Gebilde ergibt sich laut Pargesian [20] eine Kraft

$$U = -\frac{A}{6D} \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right). \quad (2.18)$$

- A ... Hamakerkonstante
- R_1 ... Radius Makrosphäre 1
- R_2 ... Radius Makrosphäre 2
- D ... Abstand der Makrosphären

Modernere Betrachtungsweisen gehen von den quantenmechanischen Überlegungen Plancks zu elektromagnetischen Moden in einem Hohlraum aus. Casimir führte darauf basierend Überlegungen zu freien Energien von elektromagnetischen Moden zwischen leitenden Platten aus. Die Anzahl der erlaubten Moden zwischen den Platten ist, im Gegensatz zu den unendlich vielen möglichen Nullpunktfuktuationen des elektromagnetischen Feldes im freien Raum rund um die Platten, begrenzt. Durch diesen äußeren Modenüberschuss entsteht eine elektrodynamische Kraft auf die Platten. Lifshitz ergänzte Casimirs Ideen dahingehend, dass er auch Penetration von elektromagnetischen Moden in oberflächennahe Bereiche der beschränkenden Materialien zuließ. Somit werden die vorherrschenden Kräfte mit elektromagnetischen Eigenschaften von Festkörpern in Verbindung gesetzt. Diese können durch das elektromagnetische Absorptionsspektrum bestimmt werden und sind von der Permittivität $\epsilon(\omega)$ und der magnetischen Suszeptibilität $\mu(\omega)$ abhängig. [20]

- Elektrostatische und Doppelschicht-Kräfte:
Elektrostatische Kräfte wirken zwischen geladenen Teilchen und können

abstoßender als auch anziehender Natur sein. Für Atome und Moleküle gilt $U = C_{ES}e^{-\kappa D}$, die Krafteinwirkung auf makrosphärische Gebilde kann geschrieben werden als

$$U = \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) Z e^{-\kappa D}. \quad (2.19)$$

Z ... Wechselwirkungskonstante

$1/\kappa$... Debyelänge

$\frac{1}{\kappa}$ wird als Debyelänge bezeichnet und beschreibt die charakteristische Abklingdistanz der Wechselwirkung. Im Falle von Lösungen ist die Debyelänge abhängig von der Art und der Konzentration der vorhandenen Elektrolyte sowie von der Temperatur. [20] Man spricht dann von abgeschirmten ionischen Kräften. Letztere treten auf, wenn sich gemäß der Debye-Theorie in kolloidalen Lösungen eine elektrochemische Doppelschicht und eine Sternschicht um Partikel bilden.

Die DLVO-Theorie führt die Konzepte der Van-der-Waals-Wechselwirkungen und der Elektrostatik im Sinne der elektrochemischen Doppelschichten zusammen und erklärt das komplexe Verhalten kolloidaler Lösungen im Nahbereich und im Fernbereich. Durch die unterschiedlichen Gesetzmäßigkeiten der Kräfte (die Van-der-Waals-Wechselwirkung folgt einem Potenzgesetz, die elektrostatischen Kräfte einem Exponentialgesetz) ergibt sich ein komplexes Wechselwirkungsenergie-Diagramm. Man vergleiche dazu Abbildung 2.10. Teilchen mit hoher Oberflächenladungsdichte σ verspüren ein primäres (es findet Koagulierung statt, irreversibel) sowie sekundäres (es findet Flockung statt, reversibel) Energieminimum. Je schwächer die Teilchen geladen sind, desto mehr gleicht sich das Potential dem der Van-der-Waals-Wechselwirkung an. [17, 20]

Strukturkräfte Kommen Flüssigkeiten mit Oberflächen in Berührung oder werden sie mit eingeschränkten Geometrien konfrontiert, so wirken diese Umstände auf die Flüssigkeitsteilchen strukturbildend. Nähern sich zwei Oberflächen bis auf etwa 10 Molekulardurchmesser an, so ändert sich der Charakter der Van-der-Waals-Wechselwirkung dahingehend, dass sich eine Solvatationskraft bildet. Im Falle von Wasser als Lösungsmittel spricht man von einer Hydratationskraft. Diese Kraft oszilliert bei starren Oberflächen mit variierendem Abstand der Flächen mit einer Periode, welche dem Molekulardurchmesser σ entspricht. Die Oszillation kommt durch die quasi-diskreten Schichten der sich anordnenden Moleküle zustande. Beschrieben wird diese

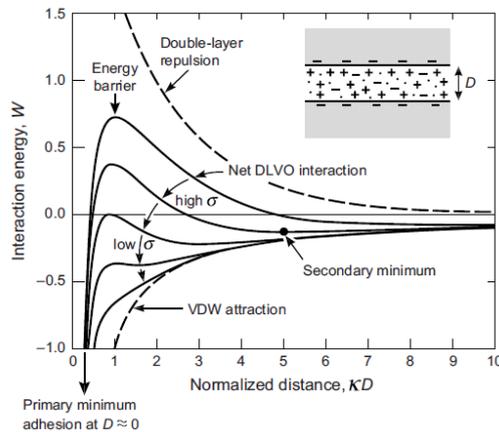


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der DLVO-Theorie [17]
 σ ... Oberflächenladungsdichte

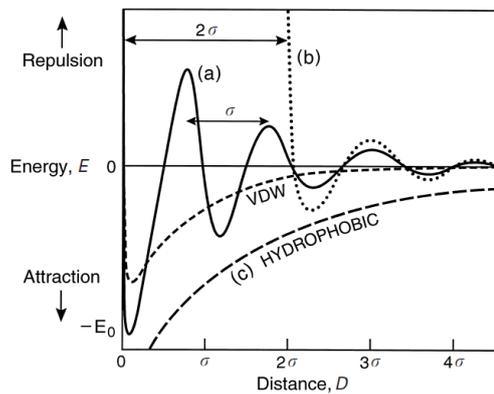


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Hydratationskräfte und der hydrophoben Kraft [21]

Kraft nach [21] durch das Potential

$$U(D) \approx -E_0 \cos\left(\frac{2\pi D}{\sigma}\right) e^{-\frac{D}{\sigma}}. \quad (2.20)$$

E_0 ... primäres Energieminimum

σ ... charakteristische Abklinglänge der Einhüllenden des \cos -Terms

Abbildung 2.11 zeigt die oszillierende Energie und das primäre Energieminimum bei $-E_0$ anhand von Graph (a). Liegt eine starke Bindung zwischen Oberfläche und Flüssigkeit vor, so entsteht eine Solvatationshülle entlang der Oberfläche und das primäre Energieminimum verschiebt sich, wie Graph (b) in Abbildung 2.11 zeigt.

Zwischen hydrophoben Oberflächen (intert und unpolar) wird die Hydrationskraft, wie man an Graph (c) in Abbildung 2.11 erkennt, monoton anziehend. Die hydrophobe Kraft lässt sich gemäß [21] durch

$$U(D) = -2\gamma e^{-\frac{D}{\lambda}}. \quad (2.21)$$

γ ... Oberflächenenergie

λ ... Abklinglänge

als Exponentialgesetz beschreiben. Sie wird kaum durch Art und Konzentration von Ionen in der Flüssigkeit beeinflusst, was auf einen nicht-elektrostatischen Ursprung hinweist. Der Ursprung der hydrophoben Kraft bleibt vorerst noch im Dunkeln. Eine mögliche Erklärung für, der hydrophoben Kraft zu Grunde liegende, Faktoren ist die Bildung von Clathraten um hydrophobe Oberflächen. Dadurch kommt es zur Abnahme von Entropie. Dieser Umstand führt dazu, dass hydrophobe Stoffe dazu tendieren, in polaren Flüssigkeiten zu aggregieren.

Thermische Fluktuationskräfte Im Falle biegsamer Oberflächen treten monoton abstoßende, sterische Kräfte auf, welche auf thermische Fluktuationen zurückzuführen sind. Diese Kräfte bilden ein stabilisierendes Gegenstück zu den Van-der-Waals-Wechselwirkungen in biologischen Systemen. Sie sind der Hauptgrund, warum biologische Systeme wie Mizellen, Membranen oder Emulsionstropfen nur sehr schwach aneinander haften. Für zwei eng beieinander liegende Membranen, welche aus Lipiden mit hydrophilen Kopfgruppen bestehen, kann die entropische Abstoßung durch Protrusionen, wie in [21] nachzulesen, abgeschätzt werden als

$$U(D) = +3\Gamma kT e^{-\frac{D}{\lambda_0}}. \quad (2.22)$$

Γ ... Oberflächendichte von protrudierten Molekülen

λ_0 ... Abklinglänge, abhängig von der hydrophoben Energie der Kohlenwasserstoffketten der Lipide

Im Falle von Membranen müssen die Protrusionskräfte von Ondulationskräften unterschieden werden. Erstere basieren auf den Bewegungen einzelner Lipidmoleküle senkrecht zur Membranoberfläche, letztere auf den wellenartigen Bewegungen der Membran selbst. Die Ondulationen entstehen, indem durch Annäherung zweier biegsamer Oberflächen deren Freiheitsgrade stark beschränkt werden und es zur Entropieerniedrigung kommt. Die wirkenden Kräfte werden nach [21] beschrieben durch

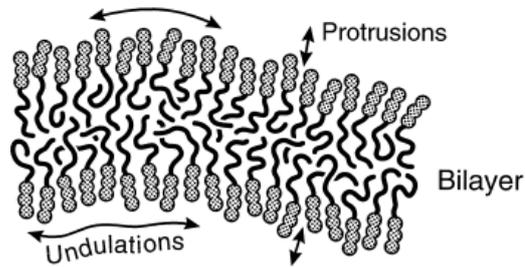


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Ondulationen sowie Protrusionen von Membranen [21]

$$U(D) = + \left(\frac{k_b T}{2\pi} \right)^2 \frac{1}{\kappa} A_{fl} \exp^{-\frac{D}{\lambda_{fl}}} . \quad (2.23)$$

κ ... Biegefestigkeit der Membran

A_{fl}, λ_{fl} ... Membranfluktuationsparameter

Abbildung 2.12 vermittelt einen Eindruck davon.

Verarmungskräfte Diese Kräfte entstehen durch einen osmotischen Druck zwischen dem Bulk-Wasser, welches beispielsweise ein Polymer der Konzentration c enthält, und dem Raum zwischen zwei eng beieinanderliegenden Oberflächen, der polymerfrei ist. Das Wasser in dieser sogenannten Verarmungszone wird nun ins Bulk-Wasser gedrückt, wodurch sich die Oberflächen annähern. [21]

Sterische Kräfte und Brückenkräfte durch polymerartige Bestandteile biologischer Membranen Es sei hier noch angemerkt, dass bei biologischen Membranen, welche an ihren Oberflächen Protein- und Glucosekomplexe tragen, abstoßende, sterische Kräfte sowie anziehende Brückenkräfte auftreten. [21]

Auswirkung der Kräfte auf das Phasenverhalten Im Falle anziehender Kräfte entstehen ungeordnete, bei abstoßender Wechselwirkung geordnete Phasen. Da Vesikel, im Gegensatz zu Kolloiden, ihre Größe und Gestalt den physikalischen Gegebenheiten anpassen können, entsteht eine Vielzahl möglicher Organisationsmuster. [16]

Betrachtet man nun Lipidsysteme bei hohen Konzentrationen, so unterteilt Marsh [22] im Hinblick auf eine langreichweitige Ordnung Strukturen in

- L ... eindimensionale Phasen (lamellar)
- H ... zweidimensionale Phasen (hexagonal)
- P ... zweidimensionale Phasen (schief oder zentriert)
- Q ... dreidimensionale Phasen (kubisch)
- R ... dreidimensionale Phasen (rhomboedrisch)
- M ... ungeordnete Phasen (mizellär).

Entsprechend der Lage der Lipide in den Phasengebilden unterscheidet man

- Typ | ... Lipid in Wasser
- Typ || ... Wasser in Lipid (invers).

2.3.4.5 Kurzreichweitige Ordnung von Lipidaggregaten

Gemäß der kurzreichweitigen Ordnung von Lipiden klassifiziert man nach [22] folgende Zustände:

- α ... ungeordnet (flüssig)
- β ... teilweise geordnet (gestreckt, ungekippt)
- β' ... teilweise geordnet (gestreckt, gekippt)
- δ ... teilweise geordnet (helikal)
- C ... kristallin.

Abbildung 2.13 stellt nun die soeben besprochenen Konzepte der kurz- und langreichweitigen Ordnung von Lipidaggregaten in Abhängigkeit von der Temperatur sowie der Konzentration für amphiphile Lipidklassen dar.

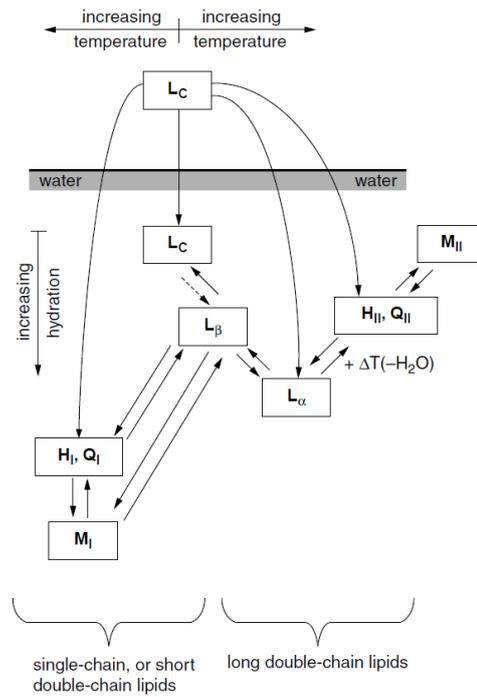


Abbildung 2.13: Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit des Phasenverhaltens amphiphiler Lipide [22]

L_c ... Lamellar kristalline Phase

L_α ... Lamellar ungeordnete Phase (flüssig)

L_β ... Lamellar teilweise geordnete Phase, ungekippt

H_1 ... Hexagonale Phase (Lipid in Wasser)

H_{II} ... Invers hexagonale Phase, (Wasser in Lipid)

Q_1 ... Kubische Phase (Lipid in Wasser)

Q_{II} ... Invers kubische Phase (Wasser in Lipid)

M_1 ... Mizelläre Phase (Lipid in Wasser)

M_{II} ... Invers mizelläre Phase (Wasser in Lipid)

Kapitel 3

Die Modellmembran

Biologische Systeme besitzen komplexe Membranstrukturen, welche sowohl aus Lipiden als auch aus eingelagerten Proteinen bestehen. Der Transmembranproteinanteil kann dabei bis zu 15 Volumsprozent ausmachen und kann das Membranverhalten stark beeinflussen. [23] Deshalb bedient man sich einfacher Modellsysteme, welche helfen sollen, ein tieferes Verständnis hinsichtlich des Verhaltens reiner Lipidmembranen zu erlangen.

In Kapitel 2.3 wurde ausführlich erörtert, wie es durch langreichweitige Ordnung zur Bildung von lamellaren, liposomalen Phasengebilden, insbesondere vesikularen Strukturen kommt. Nun soll beleuchtet werden, welche Unterscheidungen bei Lipiddoppelschichten in Hinblick auf kurz- und langreichweitige Ordnung getroffen werden können und welche Mechanismen molekularer Dynamik in einer Membran zu finden sind.

3.1 Kräfteverteilung innerhalb der Membran

Das laterale Druckprofil der Lipiddoppelschicht lässt sich anhand des strukturellen Lipidaufbaus erklären. Die Lipidstrukturen ergeben sich durch eine Kompromisslösung hinsichtlich der freien Energien der hydrophilen und hydrophoben Lipidbestandteile. [24]

Die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Membran liegen durch die eingeschränkten Freiheitsgrade gestreckter und geordneter vor, als sie es als Einzelmoleküle tun würden. Der damit einhergehende Verlust an Entropie führt zu erheblichem lateralen Druck, der von der Kettenlänge, ihrer Struktur und ihrem Sättigungsgrad bestimmt wird. [24]

An der Grenzschicht zwischen hydrophobem und hydrophilem Lipidteil herrscht eine hohe Grenzflächenspannung auf Grund des Bestrebens der hydrophilen Kopfgruppen, die freie Energie möglichst gering zu halten indem die neu-

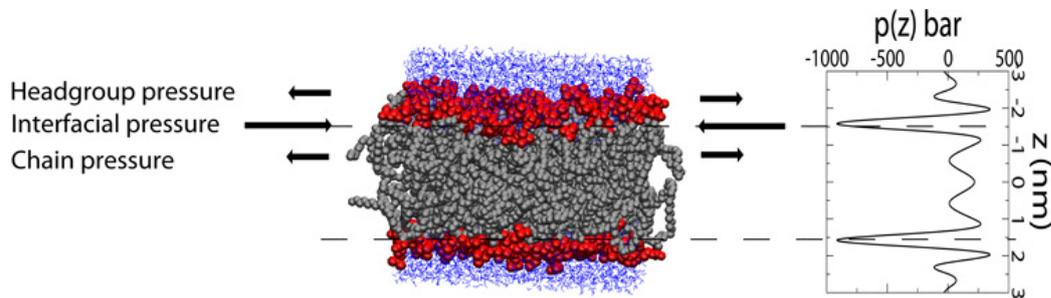


Abbildung 3.1: Druckprofil einer Lipiddoppelschicht, berechnet durch atomistische Molekulardynamiksimulation [25]

Blauer Bereich ... Wasser

Roter Bereich ... Polare Lipidkopfguppen

Grauer Bereich ... Apolare Kohlenwasserstoffketten

tralen Ketten von den polaren Wassermolekülen getrennt werden. [24] An der Grenzfläche zwischen dem polaren und dem apolaren Lipidteil herrschen dadurch Druckdifferenzen von mehreren hundert bar [23].

Die Lipidkopfguppen werden einerseits durch entropische Kräfte bewegt. Durch den Druck an der Grenzschicht werden sie eng aneinandergedrückt [24]. Gleichzeitig besteht das Bestreben, möglichst wenig Wassermoleküle bzw. gelöste Stoffe an der Membranoberfläche, sprich den Kopfguppen, zu binden und sie hierdurch mancher ihrer Freiheitsgrade zu berauben [23]. Andererseits wirken zwischen den Kopfguppen abstoßende, sterische als auch elektrostatische Kräfte [24].

Das sich durch obige Überlegungen ergebende Druckprofil ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Im Falle symmetrischer Doppelschichten gilt als Stabilitätskriterium gemäß [14]

$$\int_0^{d_b/2} p(z) dz = 0. \quad (3.1)$$

0 ... Mitte der Membran

d_b ... Doppelschichtdicke

p ... Druck

z ... Achse des Doppelschichtquerschnitts

3.2 Molekulare Dynamik der Membran

Lipide in wässriger Lösung zeigen flüssigkristallines Verhalten und können nach [14] Liposomen mit einer Vielzahl möglicher Freiheitsgrade für einzelne Lipidmoleküle bilden:

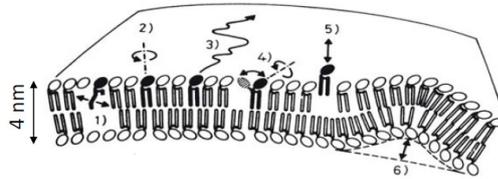


Abbildung 3.2: Freiheitsgrade der in Membranen eingebetteten Lipide [26]

- 1 ... Konformationsänderungen der Fettsäureketten
- 2 ... Rotationsdiffusion
- 3 ... Laterale Diffusion
- 4 ... Kopfgruppenbewegung
- 5 ... Protrusionsmoden
- 6 ... Kollektive Undulationsbewegungen

- Konformationsänderungen der Fettsäureketten
- Rotationsdiffusion
- Laterale Diffusion
- Kopfgruppenbewegung
- Protrusionsmoden
- Kollektive Undulationsbewegungen

Abbildung 3.2 gibt die Freiheitsgrade schematisch wieder.

Zusätzlich zu den oben erwähnten Bewegungen kann es auch zu transversaler Diffusion zwischen den 2 Membranschichten kommen, sogenannten flip-flops. Dieser Vorgang ist energetisch ungünstig und vollzieht sich sehr langsam, kann jedoch bei Molekülen wie Cholesterol, welche besonders kleine polare Kopfgruppen besitzen, durchaus Geschwindigkeiten im Sekundenbereich annehmen. [27]

3.3 Thermodynamik der Membran

Im Sinne der experimentellen Zugänglichkeit von thermodynamischen Größen wollen wir in aller Kürze auf die Wärmekapazität sowie die Kompressibilität von Modellsystemen eingehen.

3.3.1 Wärmekapazität

Die innere Energie eines Systems ist gemäß [28] durch den ersten Hauptsatz der Thermodynamik gegeben als

$$dU = dQ + dW. \quad (3.2)$$

dU ... Änderung der inneren Energie

dQ ... Änderung der Wärme

dW ... Arbeit die am System verrichtet wird

Wie in [28] ersichtlich erhält man mit der Relation

$$dS = \frac{dQ}{T} \quad (3.3)$$

dS ... Änderung der Entropie

T ... Temperatur

für die Enthalpie reversibler Systeme

$$dH = dU + d(pV) = TdS + Vdp. \quad (3.4)$$

H ... Enthalpie

p ... Druck

V ... Volumen

Die Enthalpie umfasst sowohl die innere Energie des Systems als auch die Arbeit welche nötig ist, um dem System in seiner Umgebung Platz zu schaffen. Experimentell zugänglich wird nach [28] die Enthalpie sowie die Entropie über Messungen der Wärmekapazität

$$c_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p. \quad (3.5)$$

c_p ... Wärmekapazität

Die Wärmekapazität gibt an, wieviel Wärme das Lipidsystem bei kleinen Temperaturänderungen und konstantem Druck aufnimmt. Für konstanten Druck lässt sich Gleichung 3.5 zusammen mit den Gleichungen 3.3 und 3.4 laut [28] schreiben als

$$c_p = \left(\frac{dH}{dT} \right)_p. \quad (3.6)$$

und

$$c_p = T \left(\frac{dS}{dT} \right)_p . \quad (3.7)$$

woraus folgt

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} c_p dT \quad (3.8)$$

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_1} \frac{c_p}{T} dT \quad (3.9)$$

Kapitel 5.4 führt obige Überlegungen weiter aus und steuert einen Abriss der experimentellen Vorgangsweise zur Erlangung der Wärmekapazitäten bei.

3.3.2 Kompressibilität

Die Volumskompressibilität

$$\kappa_T^V = -\frac{1}{V} \left(\frac{dV}{dp} \right)_T \quad (3.10)$$

κ_T^V ... Volumskompressibilität

beschreibt gemäß [28] die Änderung des spezifischen Volumens des Lipidsystems, wenn bei konstanter Temperatur kleine Druckänderungen stattfinden. Die Flächenkompressibilität

$$\kappa_T^A = -\frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\Pi} \right)_T \quad (3.11)$$

κ_T^A ... Flächenkompressibilität

Π ... lateraler Druck

beschreibt nach [28] die Änderung der spezifischen Fläche des Lipidsystems wenn bei konstanter Temperatur kleine laterale Druckänderungen stattfinden.

3.3.3 Systemfluktuationen

Sowohl für die Wärmekapazität als auch für die Kompressibilität existieren enge Zusammenhänge in Hinblick auf Lipidsystemfluktuationen, man denke dabei in erster Linie an Fluktuationen welche nahe an Phasenübergängen auftreten.

Die Wärmekapazität steht laut [28] in Verbindung mit Enthalpiefluktuationen gemäß

$$c_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2}. \quad (3.12)$$

R ... Universelle Gaskonstante

Die Kompressibilitäten sind gemäß [28] verknüpft mit Fluktuationen des Volumens bzw. der Oberfläche.

$$\kappa_T^V = \frac{\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2}{\langle V \rangle RT^2} \quad (3.13)$$

$$\kappa_T^A = \frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{\langle A \rangle RT^2} \quad (3.14)$$

Die Änderung von c_p ist nahe dem Schmelzübergang proportional zu Änderungen der Volums- und Flächenkompressibilität. Da Δc_p an Phasenübergängen sehr groß werden kann, sind Membranen nahe dem Schmelzübergang stark komprimierbar und weich, die Biegeelastizität und somit die Krümmungsfluktuationen sind sehr hoch. [28]

Die Fluktuationen der Enthalpie, der Fläche und des Volumens sind besonders an Domänengrenzen stark ausgeprägt. Dies bedingt, dass an Grenzflächen welche beispielsweise durch Lipid/Protein-Komplexe oder aber Gel/Fluid-Phasen gebildet werden, die physikalischen Eigenschaften von Membranen zum Teil stark von denen des übrigen Systems abweichen können. [28]

Die Grenzflächen können auf Grund genannter Eigenschaften Ursprünge starker Verformungen von Lipidvesikeln sein [28].

3.4 Thermotropes Phasenverhalten der Membran

Die Eigenschaften von Membranlipiden sind in hohem Maße von den vorherrschenden Temperaturverhältnissen des biologischen Systems abhängig. Temperaturveränderungen induzieren Phasenübergänge in Lipidsystemen, welche für die meisten, aus biologischen Membranen extrahierten, Lipide zwischen $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis $60\text{ }^\circ\text{C}$ liegen.[28]

In weiterer Folge wollen wir uns mit diesen Phasenübergängen näher beschäftigen und uns dabei auf jene Phasen konzentrieren, welche in Hinblick auf Strukturuntersuchungen von Doppelschichtaggregaten von besonderem Interesse sind. Abbildung 3.3 stellt diese Lipidphasen schematisch dar.

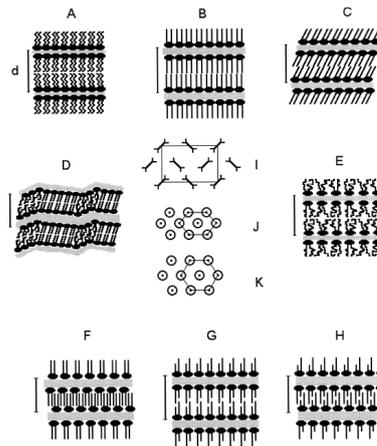


Abbildung 3.3: Phasen von Lipiddoppelschichten am Beispiel eines Phosphatidylcholin-Wasser-Gemisches [29]

Querschnitt durch eine Modellmembran:

d ... Lamellenabstand

A ... Subgelphase L_c

B ... Gelphase L_β , ungekippte Ketten

C ... Gelphase $L_{\beta'}$, gekippte Ketten

D ... Rippelphase $P_{\beta'}$

E ... Fluide Phase L_α

F ... Interdigitierte Gelphase L_β^{int}

G ... Teilweise interdigitierte Gelphase

H ... Gemischt interdigitierte Gelphase

Aufsicht auf Modellmembran - Einige gängige Anordnungen der Kohlenwasserstoffketten in der Gelphase:

I ... orthorhombisch

J ... quasi-hexagonal

K ... hexagonal

3.4.1 Einfaches Phasenübergangsmodell in zwei Dimensionen

Betrachtet man die Membran als starre zweidimensionale Matrix in einem dreidimensionalen Raum so können wir für unsere rudimentären Überlegungen die Möglichkeit von Membranondulationen in der dritten Dimension beiseiteschieben und uns auf den zweidimensionalen Raum beschränken.

3.4.1.1 Tieftemperaturphasen

In niederen Temperaturbereichen findet man die Lipide zunächst in einem Tieftemperaturäquilibrium wieder, welches in die Subgelphase L_c übergeht. [29]

3.4.1.2 Subgelphase L_c

Die Kohlenwasserstoffketten liegen in der Subgelphase gestreckt und parallel zur Membranebene ausgerichtet in der energetisch bevorzugten *all-trans*-Konformation vor. [30] Die Packungsdichte der Ketten ist sehr hoch, die Rotationsmöglichkeiten der Lipide entlang ihrer Längsachse durch starke Van-der-Waals-Wechselwirkungen und sterische Einschränkungen begrenzt. [31] Gemäß Katsaras und Raghunathan [32] lässt sich aus Röntgendaten zu den vorliegenden Kettenanordnungen ein Kopfgruppengitter konstruieren. Die Kopfgruppen liegen also geordnet vor, die genaue Packung lässt sich jedoch aus den Daten nicht ableiten. Der sogenannte Subübergang um T_c , hin zur Gelphase, verläuft in 2 Schritten. [29] Zunächst findet bei Erwärmung eine Umordnung der Kohlenwasserstoffketten statt. Dabei werden die Van-der-Waals- sowie die sterischen Wechselwirkungen durch zunehmende, thermisch angeregte Rotationsbewegungen der Kohlenwasserstoffketten vermindert. Danach erfolgt ein Verlust der Gitterordnung der Kopfgruppen und eine Zunahme der Hydratation. [29, 31]

3.4.1.3 Gelphasen L_β und $L_{\beta'}$

In der lamellaren Gelphase, auch solid-ordered Phase S_o genannt, besitzen die Lipidkopfgruppen, gemäß [32], wie oben beschrieben, kein Gitter. Es besteht lediglich eine Nahordnung mit hohem NMR-Ordnungsparameter. Die Fettsäureketten sind gestreckt und parallel ausgerichtet, hohe Packungsdichten werden erzielt. Wie auch in der Subgelphase liegt hier eine *all-trans*-Konformation vor. Man unterscheidet zwischen der Phase $L_{\beta'}^1$, welche sich durch Neigung der Ketten in Relation zur Membranoberfläche auszeichnet,

¹Die $L_{\beta'}$ -Phase besteht eigentlich aus drei unterscheidbaren Phasen. [32]

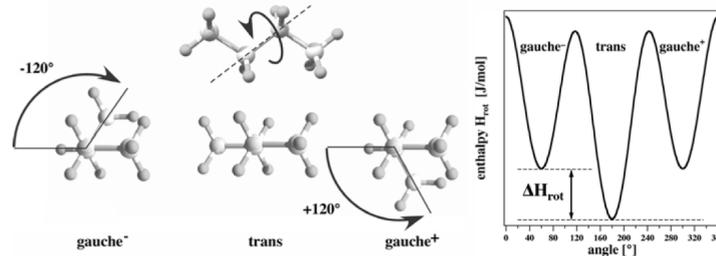


Abbildung 3.4: Mögliche Rotationen von Kohlenwasserstoffketten am Beispiel von Butan; Absolutes Enthalpieminimum für *trans*-Konfiguration, Nebenminima für *gauche*⁺ und *gauche*⁻-Konfiguration [28]

und der L_β -Phase, deren Ketten keine Neigung aufweisen. Der Grad der Kettenverkipfung ist unter anderem abhängig von der Art der Lipidkopfgruppen und der Stärke ihrer Hydratation sowie den Gegenionen in der Flüssigkeit. [27] Große Kopfgruppen bzw. größere Abstände zwischen den Kopfgruppen lassen den Ketten mehr Raum als sie bevorzugen. Diese tendieren daher dazu, das freie Volumen durch Verkipfung auszufüllen. [33] Man vergleiche dazu Abbildung 3.3.

Erhöht man die Temperatur, so wachsen die Lateral- bzw. Rotationsbewegungen entlang der Längsachse der Lipide an. Bei der Temperatur T_m findet der Übergang in die fluide Phase L_α statt. Die Lage der Temperatur T_m ist hauptsächlich von der Länge und Sättigung der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten abhängig. (vergleiche dazu Kapitel 2.2 bzw. Tabelle 2.1). [34] Dieser Übergang ist ein hochkooperativer. DSC-Messungen an DPPC²-Lipiden zeigen Übergangshalbwertsbreiten $\Delta T_{1/2}$ von 0.067 °C und Cooperativity Units (CU) (siehe Kapitel 3.4.5) jenseits von 1000 Lipidmolekülen. [29]

3.4.1.4 Flüssige Phase (Fluide Phase) L_α

Beim Phasenübergang hin zur fluiden Phase vollziehen die Ketten, welche in der Gelphase ausschließlich in *trans*-Konfiguration vorliegen, eine *trans* – *gauche* Isomerisierung (siehe Abbildung 3.4). Dies führt zu einer Zustandsmischung aus *trans*, *gauche*⁺ und *gauche*⁻ Zuständen und einer Verringerung der Kettenlänge. Lateral- sowie Rotationsdiffusion nehmen zu. [27] Hand in Hand damit geht eine laterale Expansion der Doppelschicht durch die erhöhte Kettenmobilität und eine gleichzeitige Abnahme der Doppelschichtdicke. [35] [31]

In der fluiden Phase L_α sind grundsätzlich die liquid-disordered Phase L_d

²1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin

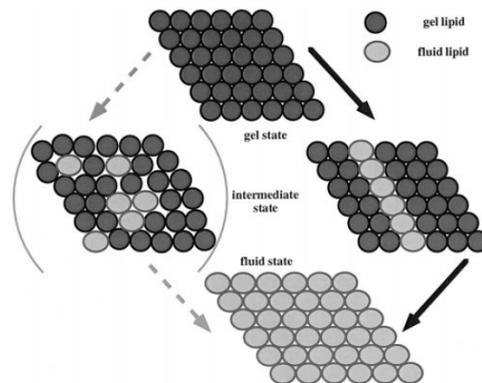


Abbildung 3.5: Gitterveränderungen beim Schmelzen der Kohlenwasserstoffketten in der Rippelphase [36]

und die liquid-ordered Phase L_o zu unterscheiden. Man vergleiche dazu Kapitel 3.5 sowie Abbildung 3.12.

3.4.2 Dreidimensionale Phasen

Wirken sich die strukturellen Veränderungen der Membran auch auf die dritte Dimension aus, so können Zwischenphasen, wie beispielsweise die Rippelphase, entstehen. [28]

3.4.2.1 Rippelgelphase $P_{\beta'}$

Bei manchen Lipiden bildet sich zwischen der Gel- und Fluidphase im Temperaturbereich von T_p (Vorübergang) bis T_m (Hauptübergang) eine sogenannte Rippelphase $P_{\beta'}$ aus.

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Rippelphase liefert Heimburg in [36]: Beim Schmelzen der Lipidketten ändert sich die Lipidfläche um bis zu 24 %. Dadurch entstehen nulldimensionale Defekte, sogenannte Punktdefekte, welche die Ordnung in großer Menge zerstören würden. Daher scheint es naheliegend, dass diese Defekte nicht isoliert auftreten, sondern gekoppelt eindimensionale Liniendefekte bilden. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 3.5 dargestellt. Auf Grund des engen Kontakts der beiden Schichten der Membran korrelieren deren Defektanordnungen. Dies führt zu lokalen Biegungen der Membran. Geometrische Randbedingungen führen sodann zu periodischen Mustern von Gel- und Fluidphase welche als sogenannte Rippel sichtbar werden. [28]

Katsaras und Raghunathan [32] sowie Sengupta et al. [33] merken jedoch an, dass dieses Modell für die Rippelphase den Membranzustand nur unge-

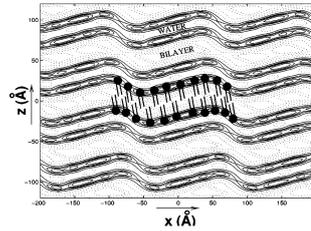


Abbildung 3.6: Karte der Elektronendichte einer Rippelphase sowie die skizzierte Lage der Lipidmoleküle in Relation zur Membranebene [33]

nügend zu beschreiben und erklären vermag. Es ist außerdem anzumerken, dass Heimburg [36] von einer hohen Fernordnung der Kopfgruppen in der Gelphase ausgeht, welche im Widerspruch zu Literaturangaben wie bei [32] oder [33] steht. Sengupta et al. [33] führen die Rippelphase auf eine Verkipfung der Lipidketten entlang des Rippelwellenvektors zurück. Im langen Rippelarm weicht die Kettenneigung kaum vom Normalvektor der Doppelschichtebene ab, im kurzen Arm beträgt die Abweichung etwa 30° bis 35° . Man vergleiche dazu Abbildung 3.6. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass im langen Arm entweder die Kopfgruppen in kleinerem Abstand zueinander liegen und somit den Ketten weniger Platz zur Verfügung steht sodass sie sich senkrecht zur Membranebene ausrichten müssen, oder aber dass sich nicht alle Ketten in der *trans*-Konformation befinden und somit mehr Platz benötigen. [33]

Zeitaufgelöste Röntgenanalysen zeigen, dass die L_α Phase beim Abkühlen nicht mehr in die ursprüngliche $P_{\beta'}$ Phase, sondern in eine langlebige, metastabile Phase $P_{\beta'}^{mst}$ übergeht. [29]

3.4.3 Thermodynamisch komplexe Phasenübergänge

Zumeist sind die Phasenübergänge von Lipiden deutlich komplexer als soeben erörtert. Die Zunahme der Komplexität ist zurückzuführen auf Veränderungen der gesamten Vesikelstruktur. [28]

3.4.3.1 Übergangsverbreiterung

Die Verbreiterung der Übergangstemperatur lässt sich auf die Krümmung der Membran zurückführen. Abhängig von positiver oder negativer Krümmung entsteht an der Doppelschicht Dehnung oder Kompression. Die Dehnung veranlasst Lipide dazu, bei niedrigeren Temperaturen in die Flüssigphase überzugehen, die Kompression führt zu einer Erhöhung der Übergangstemperatur. [28] Abbildung 3.7 stellt den Sachverhalt graphisch dar. Je nach

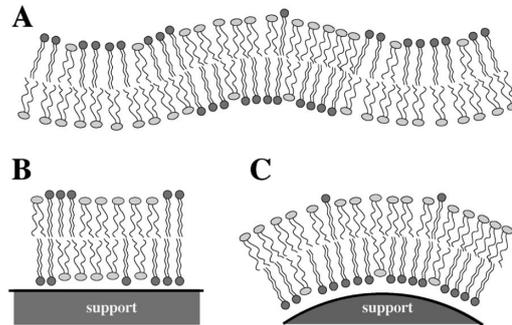


Abbildung 3.7: Krümmung triggert Schmelzübergang von Membranlipiden; A: Freie Membran mit Krümmungsfluktuationen, B: Membran auf flacher Oberfläche, C: Membran auf gekrümmter Oberfläche [37]

Größe der Lipidvesikel herrschen unterschiedliche Krümmungsverhältnisse. Diese bestimmen sodann die Breite des Phasenübergangs. Kleine Vesikel mit hoher Krümmung weisen breite Übergänge auf, große Vesikel schmale. [28] Einen weiteren Einflussfaktor für die Übergangsverbreiterung stellt die Lamellarität der Lipidvesikel dar. Multilamellare Vesikel bestehen aus bedeutend mehr Lipidmolekülen als unilamellare Liposomen. Die einzelnen Lipiddoppelschichten wechselwirken miteinander und verhalten sich daher beim Phasenübergang kooperativ. Abbildungen 3.8 zeigt anhand eines Thermogramms von DPPC typische Verläufe der Wärmekapazität für multilamellare sowie große unilamellare Vesikel. Wie zu erwarten ist der Phasenübergang multilamellarer Vesikel besonders scharf ausgeprägt, große unilamellare Vesikel zeigen auf Grund der geringeren Kooperativität einen verbreiterten Übergang. Abbildung 3.9 vergleicht das Thermogramm multilamellarer Vesikel mit dem großer und kleiner unilamellarer Vesikel. Kleine unilamellare Vesikel besitzen auf Grund ihrer hohen Krümmung in Verbindung mit niedriger Kooperativität einen besonders breiten Phasenübergang. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen. [36, 38]

3.4.3.2 Übergangverschiebung

Bei sehr kleinen Lipidvesikeln wirkt sich die Krümmung stark auf die Packung der Moleküle aus. Geringere Orientierungsordnung, größere Bewegungsfreiheiten der Kohlenwasserstoffketten und unterschiedliche Molekülanordnungen der Innen- sowie Außenlipidschicht sind die Folge. [31] Kleine Änderungen der Vesikelgröße gehen mit großen Veränderungen der Packungsanordnung einher. Dies hat zur Folge, dass die Übergangstemperatur bei kleinen Liposomen stark variiert. Für große, unilamellare Vesikel, spielt die Ände-

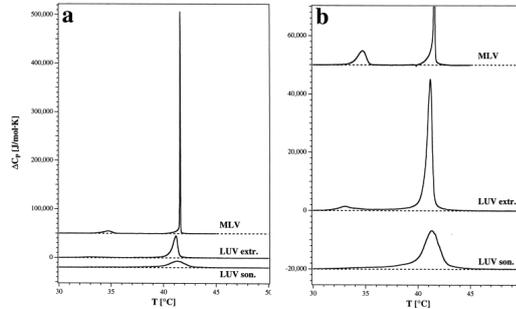


Abbildung 3.8: Thermogramme von DPPC; Vergleich der Hauptübergänge von MLVs, extrudierten LUVs sowie sonifizierten LUVs [36]

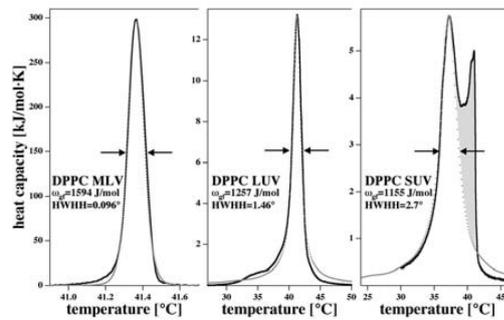


Abbildung 3.9: Thermogramme von DPPC, Gegenüberstellung von DPPC-Dispersionen bestehend aus MLVs, LUVs sowie SUVs; die SUV Dispersion beinhaltet auch LUVs deren Beitrag zum Thermogramm grau hinterlegt wurde [37]

HWHH ... Halbwertsbreite

ω_{gf} ... Wechselwirkungsparameter, bestimmt die Kooperativität des Systems

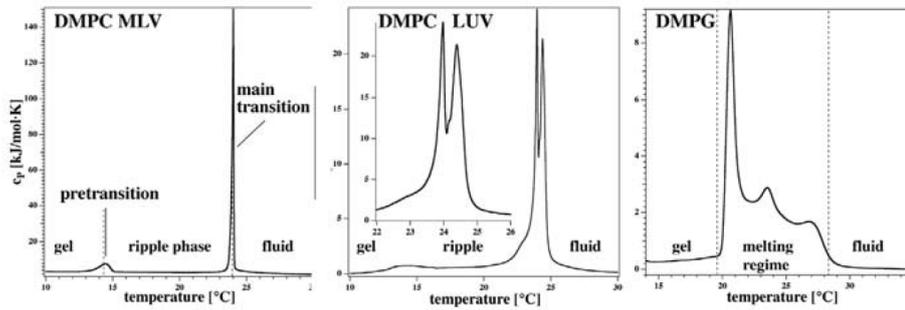


Abbildung 3.10: Komplexe Wärmekapazitätsprofile von DMPC und DMPG; links: Multilamellare DMPC Vesikel mit Vor- und Hauptübergang, mittig: Extrudierte DMPC LUVs mit Vorübergang und aufgespaltenem Hauptübergang, rechts: Übergang von DMPG bei niedriger Ionenstärke der wässrigen Lösung [28]

zung der Krümmung mit der Größe nur noch eine untergeordnete Rolle, die Übergangstemperatur bleibt konstant. [39]

3.4.3.3 Übergangsaufspaltung

Geometrieänderungen von Vesikeln rufen in Phasenübergängen teils komplexe Ausbildungen von mehreren Wärmekapazitätsmaxima hervor. Entscheidende Einflussfaktoren in Hinblick auf Strukturveränderungen der Vesikeln sind

- Ionenkonzentration bzw. pH-Wert der Lösung
- Kettenlänge (je kürzer die Kette desto eher erfolgt Geometrieänderung)
- Temperatur
- Kopfgruppe. [28]

Abbildung 3.10 zeigt das Verhalten von DMPC³ mit zwitterionischer (neutraler) und DMPG mit geladener Kopfgruppe an Phasenübergängen. DMPC MLVs zeigen die charakteristische Zweiteilung in Vor- und Hauptübergang. Extrudierte DMPC LUVs weisen eine Aufspaltung des Hauptübergangs aus. Man vermutet, dass im Bereich zwischen den 2 Peaks eine andere Vesikelgeometrie vorliegt.

Das geladene DMPG zeigt in wässriger Lösung mit niedriger Ionenkonzentration einen komplexen Phasenübergang mit erhöhter Viskosität der Dispersion. Dies deutet laut Heimburg [28] auf die Existenz eines komplexen

³1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin

Doppelschichtnetzwerkes während des Übergangs hin. Die Ionenkonzentration in wässriger Lösung spielt bei geladenen Lipiden eine entscheidende Rolle bei der Vesikelbildung und beim Verhalten von Lipidvesikeln. So beträgt bei einer Ionenstärke von 100 mM die Abschirmlänge des elektromagnetischen Potentials der Kopfgruppen 0,9 nm, bei einer Ionenstärke von 1 mM etwa 9 nm. Da letztere Abschirmlänge deutlich größer ist als der durchschnittliche Abstand von Doppelschichten multilamellarer Vesikel, formen geladene Lipide in Lösungen niedriger Ionenkonzentration kaum MLVs. [28]

3.4.4 Interdigitierte Phasen

Je nach Ausprägung der Lipidkohlenwasserstoffketten können sich unterschiedliche interdigitierte Phasen manifestieren, welche in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt sind. [29]

3.4.5 Kooperative Phasenübergänge der Membran

Nähert sich eine sich erwärmende Gelphase dem Gel-Fluid Phasenübergang, so setzen im Lipidsystem kooperative Umordnungen ein. Dies bedeutet, dass die Bewegungen der einzelnen Lipide in Wechselwirkung mit den Bewegungen der Lipide in unmittelbarer Umgebung stehen. Je näher man dem Phasenübergang kommt, desto stärker ist dieses Phänomen ausgeprägt. Knapp vor dem Phasenübergang können sich L_d -Inseln mit besonders hoher Kooperativität bilden. Die Größe der Inseln wird durch die Cooperativity Unit (CU) zum Ausdruck gebracht. Je größer die Kooperativität einer Doppelschicht vor dem Übergang, desto abrupter der Phasenübergang. Auf Grund der hohen Kooperativität der Lipiddoppelschichtkomponenten beim Hauptübergang T_m von multilamellaren Vesikeln, handelt es sich bei solchen Systemen auf den ersten Blick um Phasenübergänge 1. Ordnung. Phasenübergänge 1. Ordnung zeichnen sich dadurch aus, dass sich die Enthalpie und das Volumen schlagartig ändern. Da es jedoch keine hundertprozentige Kooperativität geben kann, kommt es zu Verbreiterungen des Übergangs bzw. zu Vorübergangseffekten (beispielsweise Rippelphase), welche die Enthalpie- und Konfigurationsänderungen zeitlich ausdehnen. [38]

Es handelt sich also bei Phasenübergängen von Lipiden um sogenannte schwache Übergänge erster Ordnung. Abbildung 3.11 stellt Phasenübergangsenthalpien dar, welche mit unterschiedlichen Kooperativitätszahlen n errechnet wurden. Die Simulation zeigt, dass sich erst ab einer CU von rund 1000 experimentelle Übergangsdaten von DPPC MLVs erklären lassen. [28]

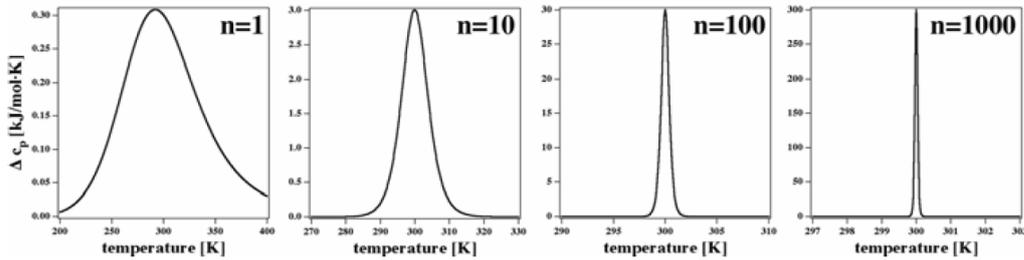


Abbildung 3.11: Berechnung der Halbwertsbreite von Phasenübergangsenthalpien mit unterschiedlichen Kooperativitätszahlen n [28]

3.5 Rafts in der Membran

Es wird heutzutage vermutet, dass biologische Membranen aus einer L_d -Phase bestehen, in der L_o -Phasen-Domänen, sogenannte Rafts, eingebettet sind. Diese sind reich an Cholesterin bzw. Sphingomyelin. [40]

Die Fettsäureketten der L_d -Phase sind völlig ungeordnet, der NMR-Ordnungsparameter ist geringer als der des Gelzustands S_o . Die L_d -Phase selbst ist arm an Cholesterin und besteht überwiegend aus ungesättigten Lipiden mit niedrigem Schmelzpunkt. [34] Als Beispiele für ungesättigte Lipide seien Vertreter aus der Gruppe der Glycophospholipide zu nennen, welche in biologischen Membranen zumeist mit ungesättigten Ketten an der *sn*-2 Position des Glycerin vorliegen. Die Doppelbindungen in *cis*-Konfiguration führen, wie schon erörtert, zu einem Knick der Fettsäurekette und verhindern somit eine dichte, geordnete Packung der Moleküle. [27]

In der L_o -Phase werden die Fettsäurereste durch Cholesterin bzw. Sphingolipide geordnet, sodass in dieser Hinsicht ein Zustand zwischen L_d und S_o entsteht. [34] In Bezug auf die Kopfgruppen findet man NMR-Ordnungsparameter, deren Werte jenen der S_o -Phase entsprechen. Sphingolipide tragen durch ihre langen, gesättigten Fettsäureketten, Cholesterin durch seine kleine Kopfgruppe zur Ordnung der L_o -Phase bei. [27] Man betrachte dazu Abbildung 3.12.

Die Größe und Form der Rafts ist einerseits von der Linienspannung der Phasengrenze und vom „hydrophobic mismatch“, hervorgerufen durch die unterschiedliche Länge der beteiligten Lipide, andererseits von entropischen Einflussfaktoren abhängig. Durch den hohen Energieaufwand für die Phasengrenze und isotrope Linienspannung entstehen in künstlichen Vesikeln vorzüglich große, kreisförmige Rafts. [40] Abbildung 3.13 zeigt zwei künstliche Lipidvesikel. Das linke Vesikel besteht aus Phosphatidylcholin sowie Sphingomyelin und weist keinerlei Phasenseparation auf. Das auf der rechten Seite abgebildete Vesikel besteht aus Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und

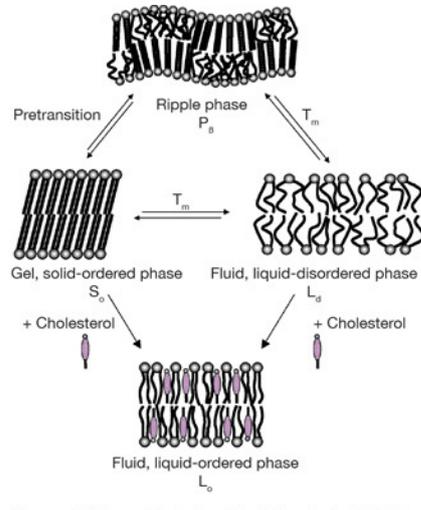


Abbildung 3.12: Phasenverhalten von Lipiddoppelschichten [27]
 S_o ... fester, geordneter β -Zustand (solid-ordered) $\hat{=}$ $L_\beta, L_{\beta'}$
 L_d ... flüssiger ungeordneter α -Zustand (liquid-disordered) $\hat{=}$ L_α
 L_o ... flüssiger geordneter α -Zustand (liquid-ordered)

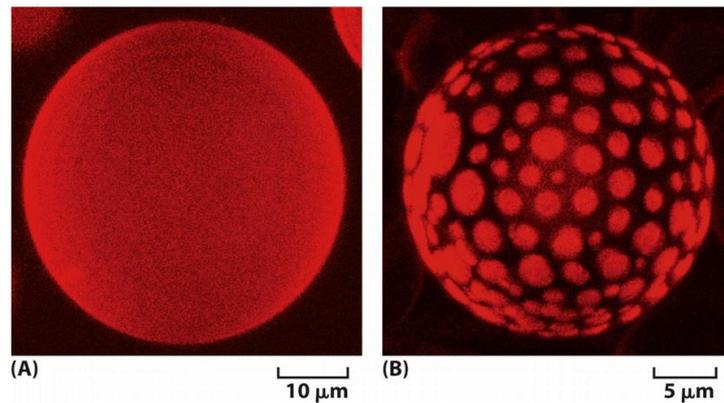


Abbildung 3.13: Zwei künstliche Lipidvesikel, (A): Vesikel aus Phosphatidylcholin sowie Sphingomyelin ohne Phasenseparation, (B): Vesikel aus Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterin mit Phasenseparation [9]

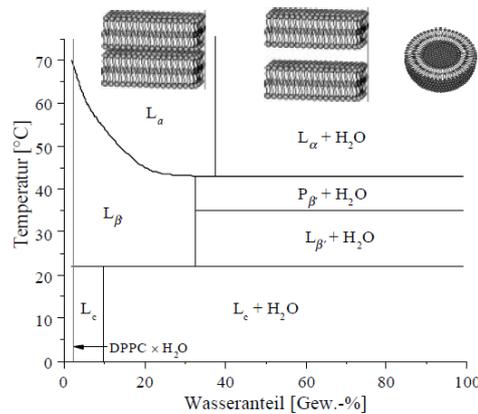


Abbildung 3.14: Lyotropes (und thermotropes) Phasenverhalten eines DPPC-Wasser-Gemisches [30]

Cholesterin. Ganz klar sind 2 scharf abgegrenzte Phasen zu erkennen. [9] In Zellmembranen sind Rafts bedeutend kleiner als in künstlich hergestellten Modellmembranen. Man vermutet, dass sie zur Konzentrierung sowie Separierung von eingebetteten Molekülen wie beispielsweise Proteinen beitragen. [40] Wiewohl die Existenz von L_d - und L_o -Phasen in biomimetischen Membranen unbestritten ist, so ist der oben beschriebene Formungsmechanismus in Hinblick auf biologische Membranen umstritten und wird mehr und mehr angezweifelt. Alternative Erklärungen für die Entstehung der lateralen Submikrometerinhomogenitäten reichen von Proteinwechselwirkungen über dynamische Fluktuationen bis hin zu heterogenen Lipidmischungen. [27]

3.6 Lyotropes Phasenverhalten der Membran

Membranbildende Lipide liegen auf Grund ihres hygroskopischen Charakters im getrockneten Zustand als Monohydratdoppelschichten vor. Wird nun Wasser zugeführt, so kommt es nach und nach zur Sättigung der polaren Lipidkopfgruppen. Erreicht der Wasseranteil der Dispersion zwischen 10 und 40 Gewichtsprozent (abhängig von der Temperatur), so entstehen lamellare Phasen voll hydratisierter, parallel angeordneter Lipiddoppelschichten, welche durch wässrige Phasen getrennt werden. Steigt der Wasseranteil weiter an, so bilden sich nach und nach Lipidvesikel. [30] Dieser Vorgang ist in Abbildung 3.14 am Beispiel eines DPPC-Wasser-Gemisches grob skizziert.

3.7 Symmetrie der Membran

Es soll an dieser Stelle nur erwähnt werden, dass in biologischen Systemen die beiden Schichten einer Membran unterschiedliche Zusammensetzungen besitzen. Im Falle einfacher Modellmembranen, wie sie in dieser Arbeit dargestellt werden sollen, herrschen jedoch symmetrische Zusammensetzungen.

3.8 Permeabilität von Membranen

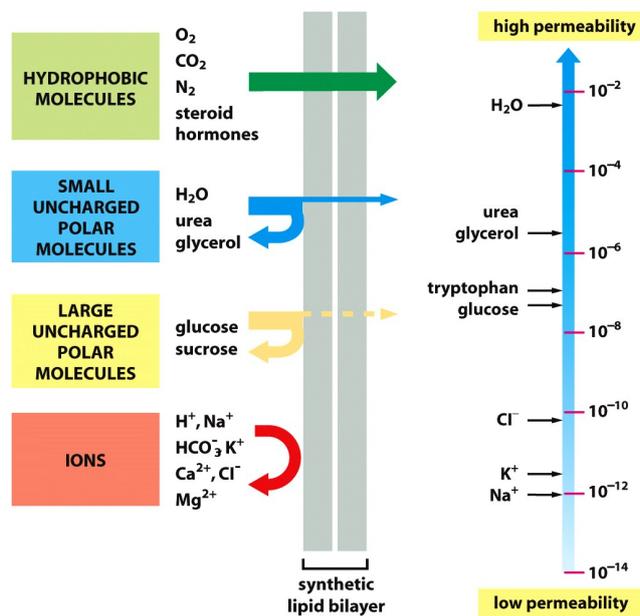
Diffusion durch eine synthetische Lipiddoppelschicht ist eine Funktion der Lipidbeschaffenheit sowie der zur Verfügung stehenden Zeit. Je größer ein Molekül ist, desto geringer die Wahrscheinlichkeit, dass eine Diffusion stattfindet, da es sich nicht zwischen die polaren Kopfgruppen zu zwängen vermag. Je apolarer das Molekül, desto leichter dringt es durch die Membran, da es leichter durch das Membraninnere gelangt. Kleine, apolare Moleküle wie O_2 oder CO_2 sind daher für Diffusion prädestiniert. Kleine, polare Moleküle wie Wasser oder Harnstoff dringen ebenfalls relativ einfach durch die Doppelschicht. Für geladene Teilchen sowie Moleküle jeglicher Größe hingegen stellt die Doppelschicht eine schier unüberwindliche Grenze dar. Sowohl die Ladung als auch die Hydratationshülle um die Moleküle verhindern das Diffundieren in die Kohlenwasserstoffschicht. Abbildung 3.15(a) skizziert die Permeabilität der unterschiedlichen Molekülklassen, Abbildung 3.15(b) vermittelt ein Gefühl für die außerordentlich hohe Bandbreite an Permeabilitätskoeffizienten. In Zellmembranen sind Membranproteine als Pumpen und Kanäle für den Transport von geladenen Molekülen sowie Ionen zuständig. [9]

Heimburg [28] merkt jedoch an, dass reine Lipidmembranen an Schmelzübergängen sehr wohl ausgeprägte Leitfähigkeit für Ionen zeigen. Es wurden quantisierte Ströme beobachtet. Diese werden auf die bereits erwähnten Änderungen der lateralen Kompressibilität und die damit verbundenen Fluktuationen der Fläche zurückgeführt. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Mathai et al. [41]. Man vermutet, dass sich stabile Poren bilden. Die Bildung der Poren ist abhängig von der Temperatur, dem Druck, der angelegten Spannung, dem pH-Wert, der Ionenkonzentration und vielem mehr. [28]

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die selektive Permeabilität der Membran liefert Pollack [42] anhand von sogenannten „Exclusion Zones“.

3.9 Arten von Lipidvesikeln

Vesikel müssen insbesondere hinsichtlich ihrer Größe und Lamellarität unterschieden werden. In Bezug auf die Lamellarität lassen sich



(a) Permeabilität für unterschiedliche Molekülklassen (b) Permeabilitätskoeffizienten für unterschiedliche Moleküle

Abbildung 3.15: Diffusion durch synthetische Lipidmembran [9]

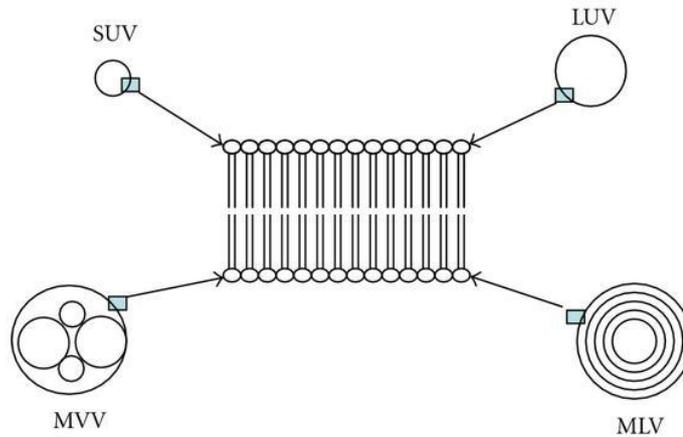


Abbildung 3.16: Geometrie von LUVs, SUVs, MLVs und MVVs [44]

- ULV (Unilamellare Vesikel)
- OLV (Oligolamellare Vesikel) (100 bis 1000 nm)
- MLV (Multilamellare Vesikel) (> 500 nm)
- MVV (Multivesikuläre Vesikel) (> 1000 nm)

unterscheiden. Unilamellare Vesikel bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, oligolamellare aus einigen wenigen und multilamellare Vesikel aus vielen Doppelschichten. Multivesikuläre Vesikel bestehen aus mehreren Vesikeln die nicht konzentrischen Ursprungs sind. [43] Genaue und einheitliche Abgrenzungen hinsichtlich Lamellarität und Größe von Vesikeln existieren in der Literatur nicht.

Unilamellare Vesikel wiederum lassen sich unterteilen in

- SUV⁴ (Kleine unilamellare Vesikel) (20 - 100 nm)
- LUV⁵ (Große unilamellare Vesikel) (100 - 1000 nm)
- GUV⁶ (Riesige unilamellar Vesicles) (> 1000 nm). [43]

Abbildung 3.16 zeigt schematisch die Geometrie von LUVs, SUVs, MLVs und MVVs.

Vesikelsuspensionen werden unter anderem charakterisiert durch

⁴Small Unilamellar Vesicles

⁵Large Unilamellar Vesicles

⁶Giant Unilamellar Vesicles

- Homogenität der Vesikel im Sinne der chemischen Zusammensetzung,
- Durchschnittsgröße der Vesikel,
- durchschnittliche Lamellarität der Vesikel und
- das von Vesikeln eingeschlossene Volumen der wässrigen Lösung.

Vesikel in wässriger Lösung stellen meist Dispersionen weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht dar. Die Lipide befinden sich in einem metastabilen, kinetisch gefangenen Zustand. Dies bedeutet, dass es mit der Zeit zu Alterungsprozessen wie Fusion oder Aggregation von Einzellipiden kommt. [18]

3.10 Interaktionen von Membranen

Findet man in Dispersionen nun multilamellare Vesikel vor, so muss man sich zwangsläufig die Frage nach der Interaktion der einzelnen Doppelschichtlamellen untereinander stellen. Sowohl für neutrale, als auch geladene Lipide gilt, dass sich die Lamellen durch ein Wechselspiel aus abstoßenden und anziehenden Kräften in einer Gleichgewichtslage anordnen werden, getrennt durch einen Dispersionsmittelfilm. Die freie Wechselwirkungsenergie pro Einheitsfläche lässt sich gemäß [45] darstellen als

$$\begin{aligned}
 f(d_w, T) &= f_{vdW} + f_{hyd} + f_{und} + f_{elec} = \\
 &= -\frac{H}{12\pi} \left(\frac{1}{d_w^2} - \frac{2}{(d_w + d_l)^2} + \frac{1}{(d_w + 2d_l)^2} \right) + \\
 &\quad + P_h \lambda_h \exp^{-\frac{d_w}{\lambda_h}} + \left(\frac{k_b T}{2\pi} \right)^2 \frac{1}{\kappa} A_{fl} \exp^{-\frac{d_w}{\lambda_{fl}}} + f_{elec}.
 \end{aligned} \tag{3.15}$$

- f_{vdW} ... Freie Energie der Van-der-Waals-Kräfte
 f_{hyd} ... Freie Energie der Hydratationskräfte
 f_{und} ... Freie Energie der Ondulationskräfte
 f_{elec} ... Freie Energie der elektrostatischen Kräfte
 H ... Hamakerkoeffizient
 d_l ... Membrandicke
 d_w ... Dicke der interlamellaren Wasserschicht
 P_h ... Hydratationsdruckkonstante
 λ_h ... Hydratationslänge
 κ ... Biegefestigkeit der Membran
 A_{fl}, λ_{fl} ... Membranfluktuationsparameter

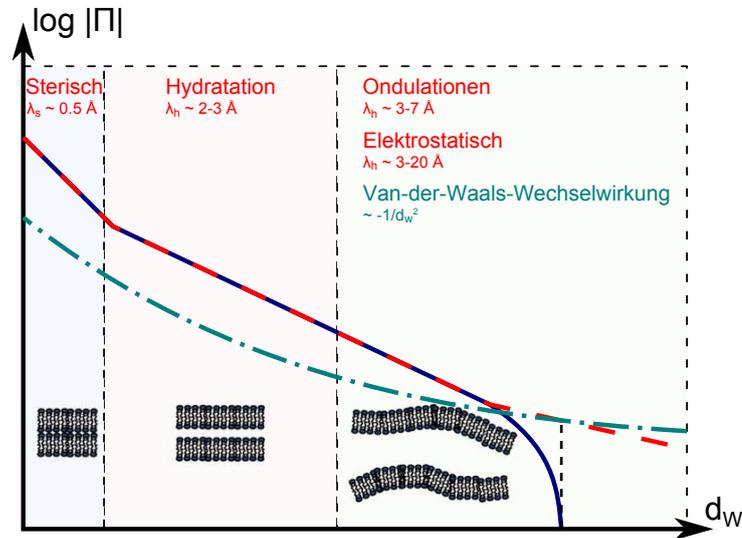


Abbildung 3.17: Logarithmischer Druck Π zwischen Membranen in Abhängigkeit von der Dicke der Intermembranwasserschicht d_w

Neutrale Membranen verspüren kurzreichweitige, abstoßende Hydratationskräfte welche auf die Strukturierung des Wassers an den Lipidgrenzflächen zurückzuführen sind und zu einer freien Hydratationsenergie f_{hyd} führen sowie abstoßende entropische Kräfte, hervorgerufen durch Undulationsbewegungen der Membran, welche zu einer freien Energie der Undulationskräfte f_{und} führen. Diesen Kräften wirkt die ebenfalls kurzreichweitige, jedoch anziehende, Van-der-Waals-Wechselwirkung entgegen, welche wiederum ihren Beitrag f_{vdW} zur freien Energie leistet.

Bei geladenen Membranen müssen außerdem die langreichweitigen elektrostatischen Kräfte (abhängig von der Ionenstärke, dem pH-Wert und den dielektrischen Eigenschaften der beteiligten Phasen) und deren Anteil f_{elec} an der freien Gesamtenergie berücksichtigt werden. [45]

Abbildung 3.17 zeigt einen typischen logarithmischen Druckverlauf zwischen zwei Membranen in Abhängigkeit von der Dicke der Intermembranwasserschicht. Die rote Kurve zeigt die Summe der abstoßenden Kräfte, die grüne repräsentiert die anziehende Van-der-Waals-Wechselwirkung. Blau eingezeichnet ist die Summe dieser Kräfte. Der Nahbereich bis etwa $0,5 \text{ \AA}$ wird von sterischen Kräften beherrscht, im Abstand von zwei bis drei \AA gesellen sich Hydratationskräfte hinzu. Ab etwa 3 \AA müssen auch Ondulationen und elektrostatische Kräfte berücksichtigt werden. Die Van-der-Waals-Wechselwirkung fällt proportional zu $-1/d_w^2$ ab.



Abbildung 3.18: Hofmeister-Serie für Kationen und Anionen [46]

3.10.1 Stabilisierung durch gelöste Ionen

Ionen in wässriger Lösung neigen gemäß Schwierz et al. [46] dazu, sowohl an hydrophilen als auch hydrophoben Oberflächen abhängig von ihrer Größe und Ladung mehr oder minder stark zu adsorbieren. Damit beeinflussen sie die Löslichkeitseigenschaften von Materie in wässriger Phase. Die Hofmeister-Serie ordnet Ionen und ionische Verbindungen nach ihren Fällungseigenschaften von Proteinen (vergleiche Abbildung 3.18). Dies gilt generell auch für ionen-spezifische Wechselwirkungen in kolloidalen Systemen.

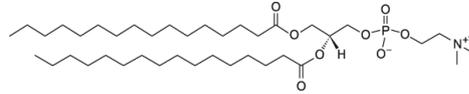
Die Ausprägung der Wechselwirkungen von Lipiddoppelschichten ist daher in hohem Maße auch von der Anlagerung von Ionen an die polaren Lipidkopfguppen abhängig.

3.11 Das Membranlipid DPPC

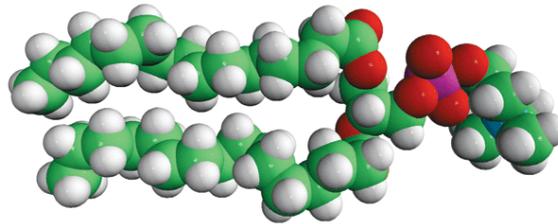
Präparationen mittels der RSE-Apparatur, wie sie in dieser Arbeit in weiterer Folge näher erörtert werden, wurden mit dem Lipid DPPC⁷ durchgeführt. Abbildung 3.19 stellt das einzelne Molekül DPPC modellhaft dar.

Abbildung 3.20 veranschaulicht die Ladungsverteilung innerhalb der einzelnen chemischen Gruppen des DPPC-Moleküls. Klar zu erkennen sind der zwitterionische, beinahe neutrale Kopfteil mit den Cholin-, Phosphat- und Carbonylgruppen sowie die neutralen, gesättigten Kohlenwasserstoffketten der veresterten Palmitinsäuren. Die Ladungen in Klammern beziehen sich auf Wasserstoffatome, $\alpha_{3,4,5}$ bezeichnen Torsionswinkel. Lässt man DPPC-Moleküle Selbstassemblieren, so formen sich Lipiddoppelschichten. Die Dynamik sowie Aggregationsart solcher Molekülensembles, eingebettet in das Dispersionsmittel Wasser, lässt sich mittels All-Atom Force Field Molekulardynamiksimulationen darstellen. Die Abbildung 3.21 zeigt das Verhalten der DPPC-Moleküle, insbesondere der Kohlenwasserstoffketten, bei 293 ($L_{\beta'}$, linkes Bild), 323 (L_{α} , mittleres Bild) und 353 (L_{α} , rechtes Bild) Kelvin. Mit zunehmender Temperatur ist ein Anstieg der Unordnung der Kohlenwasserstoffketten verbunden. [48]

⁷1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin



(a) 2D Modelldarstellung von DPPC in Keilstrichform



(b) 3D Modelldarstellung von DPPC als Kalottenmodell

Abbildung 3.19: Darstellung von DPPC [47]

Partial atomic charges	Electron density groups
-0.38 (+0.19)	-0.38 (+0.19)
-0.20 (+0.09)	+0.20
	-0.38 (+0.19)
α_5	+0.17 (+0.03)
-0.49	
α_3 +1.58	
-0.86	
O=P-O	-0.86
	PO ₄ , phosphate
-0.49	
	-0.11 (+0.07)
	+0.48 (+0.04)
-0.47	+0.13 (+0.06)
-0.65	-0.47
	+0.79
	-0.65
-0.06 (+0.03)	-0.06 (+0.03)
0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
	CH ₂ , methylenes
0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
+0.047 (-0.007)	+0.047 (-0.007)
-0.081 (+0.016)	-0.081 (+0.016)
sn-2	sn-1
	CH ₃ , methyls

Abbildung 3.20: Ladungsverteilung innerhalb eines DPPC-Moleküls berechnet mittels der RESP-Methode [48, 49]

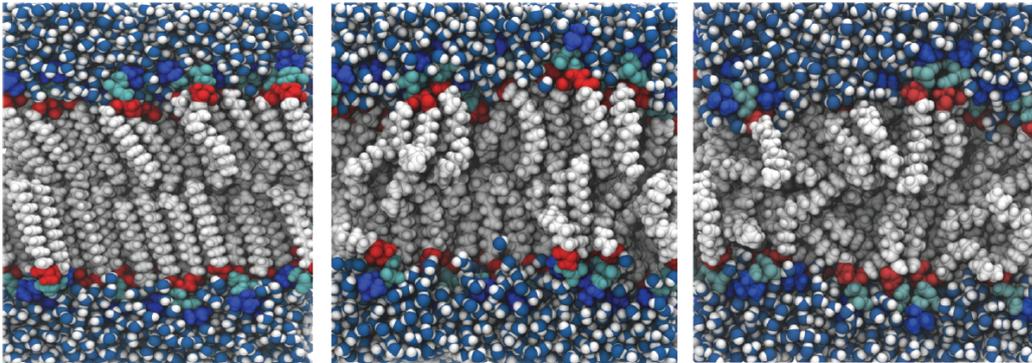


Abbildung 3.21: DPPC-Doppelschicht bei unterschiedlichen Temperaturen; 293 K ($L_{\beta'}$, linkes Bild), 323 K (L_{α} , mittleres Bild) und 353 K (L_{α} , rechtes Bild) [48]

In Tabelle 3.1 werden einige wichtige Parameter des DPPC-Moleküls zusammengefasst.

Name	DPPC
Synonym	16:0 PC Dipalmitoylphosphatidylcholin 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin 1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin PC (16:0/16:0)
Molekulargewicht	734,039 g/mol
Subübergangstemperatur $L_c \rightarrow L_\beta$	(18,8 ± 3,1) °C
Subübergangsenthalpie $L_c \rightarrow L_\beta$	(3,4 ± 1,1) kcal/mol
Vorübergangstemperatur $L_\beta \rightarrow P_\beta$	(34,4 ± 2,5) °C
Vorübergangsenthalpie $L_\beta \rightarrow P_\beta$	(1,1 ± 1,0) kcal/mol
Hauptübergangstemperatur $P_\beta \rightarrow L_\alpha$	(41,3 ± 1,8) °C
Hauptübergangsenthalpie $P_\beta \rightarrow L_\alpha$	(8,2 ± 1,4) kcal/mol
Summenformel	$C_{40}H_{80}NO_8P$
CMC	0,46 nM

Tabelle 3.1: Eckdaten von DPPC [29, 47]

Kapitel 4

Herstellung von Liposomen

4.1 Einleitung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich das Anforderungs- sowie Anwendungsspektrum für liposomale Vesikel stets erweitert. Um den unterschiedlichen Bedürfnissen in Hinblick auf Form und Zustand der Vesikel gerecht werden zu können, wurde eine Vielzahl an Herstellungsmethoden für die Lipidvesikeldarstellung entwickelt. Im Folgenden wird auf jene Verfahren Bezug genommen, welche der Präparation der in dieser Schrift behandelten Proben dienen bzw. diesen Methoden verwandt sind oder aber diese ergänzen.

4.2 Lipiddünnsfilmhydratationsmethode

4.2.1 Herstellung von MLVs

Die klassische Herstellungsart von multilamellaren Vesikeln sowie der erste Schritt zur Gewinnung unilamellarer Liposomen ist die Lipiddünnsfilmhydratationsmethode. Dazu wird das Pulver eines Lipids bzw. einer Lipidmischung in eine organische, apolare Lösung eingebracht und gut gemischt, sodass eine klare Flüssigkeit entsteht. Danach wird die Lösung in einem Wasserbad erhitzt und mit Stickstoff umflutet.¹ Nach und nach verdampft das Lösungsmittel, zurück bleibt ein multilamellarer Lipidfilm, der anschließend im Vakuumtrockenschrank gelagert wird, um letzte Reste des Lösungsmittels zu eliminieren. [50] Wahlweise kann auch eine Lyophilisierung erfolgen. Dazu wird der Lipidfilm gefroren und in einer Vakuumkammer gelagert. Der Vorteil der Gefriertrocknung besteht darin, dass die Eiskristalle (unter Umgehung der flüssigen Phase) direkt in die Gasphase übergehen und somit eine schonende

¹Alternativ können Rotationsverdampfer verwendet werden.

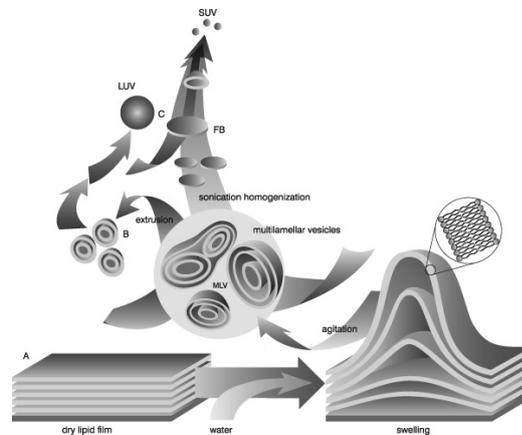


Abbildung 4.1: Entstehung multilamellarer Vesikel [50]

Trocknung stattfindet. [51] Ist die Trockenphase abgeschlossen, so findet die Hydratation des Films statt. Es ist dabei darauf zu achten, dass sich der Prozess bei Temperaturen abspielt, die etwa $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ über der Schmelztemperatur der beteiligten Lipide liegen. Ein ausgiebiges Schütteln oder Rühren über einen längeren Zeitraum bzw. in bestimmten Intervallen wird empfohlen. Beim Lösen hydratisierter Teile der Lipidschichten bilden sich multilamellare Vesikel. Die Lamellenzwischenräume der MLVs sind mit Wasser gefüllt, die Abstände der Schichten stark abhängig von der Art und Ladung der Kopfgruppen. [50] Abbildung 4.1 zeigt schematisch die Entstehung der MLVs. Die Lipidfilmdicke, Geometrie und Oberflächenbeschaffenheit des Präparationsgefäßes, als auch die Dauer der mechanischen Agitation der Proben beeinflussen die Eigenschaften der MLVs ganz entscheidend. In Bezug auf Größe und Lamellarität sind die mittels Filmmethode hergestellten MLVs in der Regel sehr heterogen. [18] Außerdem kann sich ein osmotischer Druck zwischen dem Dispersionsmittel außerhalb von MLVs und dem interlamellaren Dispersionsmittelanteil einstellen. Dies ist bedingt durch eine geringere Konzentration gelöster Ionen im Inneren des Vesikels. [52] Gruner et al. [52] sehen eine mögliche Erklärung darin, dass bei der Bildung der äußersten Lipidhülle der MLVs die Hydratisierung im Inneren noch nicht abgeschlossen ist. Da die Lipiddoppelschicht für Wassermoleküle, im Gegensatz zu den gelösten Ionen, durchlässig ist, wird reines Wasser ins Innere des Vesikels gezogen, bis die Hydratation vollständig abgeschlossen ist.² Gruner differenziert daher zwischen MLVs, welche herstellungsseitig über einen osmotischen Druck verfügen, und

²Die Permeabilität der Membran in Hinblick auf Wassermoleküle ist dabei hauptsächlich von der pro Lipid eingenommenen Fläche abhängig. [41]

SPLVs³, welche keinen osmotischen Gradienten aufweisen.

4.2.2 Herstellung von SPLVs

Die Herstellung von SPLVs erfolgt bei Gruner et al. [52] auf 2 unterschiedliche Arten:

- Ein klassisch hergestellter Lipidfilm wird in Ethylether gelöst. Nach Zugabe von wässriger Lösung wird die Flüssigkeit in einem Ultraschallbad mit Stickstoff umflutet bis der Ether verdampft ist. Zurück bleibt eine Dispersion von SPLVs.
- Ein klassisch hergestellter Lipidfilm wird in Ethanol gelöst und wässrige Lösung beigefügt. Die Flüssigkeit wird in einem Rotationsverdampfer verdampft. Die Löslichkeit von Ethanol in Wasser führt dazu, dass sich gelöste Ionen - im Gegensatz zur klassischen Filmmethode - auch im interlamellaren Bereich absetzen. Bei der anschließenden Rehydratation entstehen wiederum SPLVs.

Methoden zur Weiterverarbeitung der heterogenen Lipidvesikel werden in Kapitel 4.8 diskutiert.

4.2.3 Sanfte Lipiddünnsfilmhydratationsmethode

Die sanfte Lipiddünnsfilmhydratationsmethode (auch Gentle Hydration Method) unterscheidet sich von der klassischen Lipiddünnsfilmhydratationsmethode dadurch, dass die Rehydratation des Films über einen Zeitraum von einigen Stunden ohne Einwirkung von Vortexern oder Rotationsverdampfern geschieht. Dadurch entstehen überwiegend GUVs. [53]

4.3 Rapid Solvent Exchange Methode

Die klassische RSE-Methode, von Buboltz und Feigenson in [54] vorgestellt, basiert darauf, dass ein unpolares Lösungsmittel und darin gelöste Lipide in eine evakuierte Kammer, welche gevortext wird, eingespritzt werden. Sobald das Lösungsmittel die Spritze verlässt, verdampft es durch den plötzlichen Druckabfall. Das durch das Vortexen an der Gefäßinnenwand einen dünnen Film bildende Dispersionsmittel nimmt die verdampfenden Lösungsmitteltröpfchen auf und gibt Wärme an sie ab, was zum vollständigen Verdampfen der restlichen apolaren Flüssigkeit führt. Die Lipide formen Vesikel

³Stabile plurilamellare Vesikel

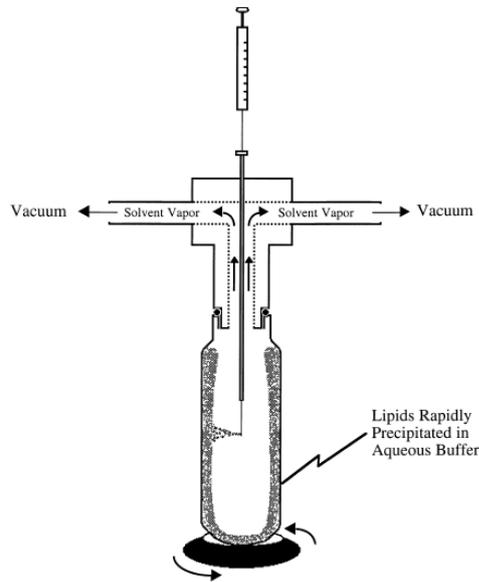


Abbildung 4.2: Klassischer RSE-Prozess wie von Buboltz und Feigenson in [54] beschrieben

und gehen in Dispersion über. Abbildung 4.2 zeigt schematisch den Übergangsprozess des Lipids von apolarer zu polarer Phase. [54]

Eine überarbeitete, im Sinne einer Zeitersparnis prozessoptimierte Variante des RSE-Prozesses, wurde von Buboltz in [55] vorgestellt. Dafür werden polares Dispersionsmittel sowie apolares Lösungsmittel mit darin gelösten Lipiden zusammengemischt und gevortext um eine hohe Flüssigkeitsoberfläche zu gewährleisten. Durch Absenken des Umgebungsdruckes zwischen den Dampfdruck des Dispersionsmittels und den des verwendeten organischen Lösungsmittels verdampft die organische Phase schlagartig und die Lipide gehen selbstassemblierend in das Dispersionsmittel über. Bei diesem Übergang erfolgt die Bildung multilamellarer Vesikel in Größenordnungen von 0.1 bis 1 μm . [55]

Für die RSE-Methode spricht, dass die Lipide nicht, wie bei der Filmablagerung oder Lyophilisierung [56], eine feste Phase durchlaufen müssen. Während dieses festen, lamellaren Zustands sind die Lipide hoch geordnet und es kann zur Entmischung der Lipidkomponenten kommen. Dies kann sich in weiterer Folge negativ auf das Phasenverhalten der Lipide in Doppelschichten auswirken. Insbesondere Cholesterol neigt zu Entmischung und kristallisiert in Form von Cholesterin-Monohydraten aus. Der Grund für die Kristallisation von Cholesterin liegt darin, dass feste Mischungen (Filme) leichter phasenseparieren als Flüssigkeiten. Da man bei der Filmmethode mit ge-

Tabelle 4.1: Externe Oberfläche und eingeschlossenes Volumen von Liposomen in Abhängigkeit von der Präparationsmethode [54]

Präparationsmethode	Anteil externer Oberfläche [%]	Eingeschlossenes Volumen [$\mu\text{l}/\mu\text{mol}$]
Filmmethode	-	0.25 (± 0.04)
Filmmethode/Extrudiert	47.1 (± 3.9)	-
Filmmethode/Gefrier-Tau-Verfahren	13.4 (± 2.5)	4.07 (± 0.06)
RSE-Methode	33.1 (± 1.6)	4.50 (± 0.09)

trockneten Lipidfilmen arbeitet liegt der Schluss nahe, dass gerade in diesem trockenen Zustand Cholesterinkristalle entstehen. [54] Andererseits besagt nach Huang und Feigenson [57] die Schirmtheorie, dass der Cholesterinkörper durch polare Kopfgruppen der anderen Lipide (mit schlankem Körper) von wässriger Phase mit abgeschirmt wird, da die eigene Kopfgruppe zu klein für die Abschirmung ist. Ist nun der Cholesterinanteil der Mischung zu hoch, so kann eine vollständige Abschirmung nicht mehr stattfinden und es kommt zum Ausfall von Cholesterin.⁴ Diese beiden Tatsachen bewirken, dass die Reproduktion der Löslichkeitsgrenze von mit klassischen Methoden eingearbeitetem Cholesterin mit verschiedenen Detektions- bzw. Analysemethoden nicht möglich ist. Die klassischen Präparationsmethoden sind also für die Herstellung solcher homogenen Proben nur begrenzt einsetzbar. [54]

Darüber hinaus bietet RSE gegenüber Methoden, bei welchen wasserlösliche organische Lösungsmittel Verwendung finden, den Vorteil, dass Rückstände von organischen Lösungsmitteln schnell und vollständig entfernt werden können. [58]

Gemäß Buboltz und Feigenson [54] entstehen bei der RSE Präparation multilamellare Vesikel mit großem Anteil externer Oberfläche wie man es von Extrusionsmethoden kennt (vergleiche Kapitel 4.8.3). Dies spricht für das Auftreten multilamellarer Vesikel mit einer geringen Anzahl von Schichten. Das Einschlussvolumen der Vesikel ist dem von Liposomen, welche mittels Gefrier-Tau-Verfahren (vergleiche Kapitel 4.8.2) präpariert werden, ähnlich. Tabelle 4.1 führt die genauen Größenverhältnisse an.

Es ist anzunehmen, dass die RSE-Methode stabile plurilamellare Vesikel (SPLVs) hervorbringt. Das RSE-Verfahren ähnelt jenen Methoden, welche in Kapitel 4.2.2 zur Herstellung von SPLVs erörtert werden. Zwar wird die Präparation eines anfänglichen Lipidfilms umgangen, während der Synthese

⁴Baykal-Caglar et al. [58] berichten beispielsweise, dass bei klassischen Synthesemethoden die Standardabweichung der GUV-Lipidzusammensetzung im Vergleich zu RSE steigt und der Molanteil des Cholesterins in GUVs sinkt.

der Vesikel liegt jedoch durch das Vortexen eine Emulsion vor, welche die Bildung von SPLVs begünstigen sollte.

Die wichtigsten Vorteile der RSE-Methode lassen sich wie folgt zusammenfassen [54]:

- Schnelligkeit
- Homogene Verteilung der Lipide über die Lamellen
- Niedrige durchschnittliche Lamellarität
- Große Einschlussvolumina der Vesikel
- Keine feste Zwischenphase

4.4 Elektroformation

Die Elektroformation von Vesikeln ist eine Methode, die es erlaubt, mittels elektrischen Feldern GUVs in der Größenordnung von 5 bis 200 μm herzustellen. [18]

4.4.1 Herstellung von GUVs mittels Lipiddünnschichthydratationsmethode

Hierbei werden die Platindraht-Elektroden mit einem getrockneten Lipidfilm mittels der oben beschriebenen Filmmethode überzogen, anschließend hydratisiert und danach eine Wechselspannung von etwa einem Volt im Bereich von 1 bis 10 Hz angelegt. Es entstehen - abhängig von der Lipidstruktur - GUVs zwischen 5 und 200 μm , deren Lipidzusammensetzung relativ inhomogen ist, da man auf die Methode der Filmablagerung zurückgreifen muss, ganz im Gegensatz zur Herstellung von GUVs unter Zuhilfenahme von RSE. [18, 58] Der zugrundeliegende Entstehungsprozess ist nicht zur Gänze verstanden, es wird jedoch vermutet, dass die elektroosmotische Bewegung der Wassermoleküle für die Trennung und das Aufschwellen der Doppelschichten an den Elektroden verantwortlich ist. Im Hinblick auf Homogenität der GUV-Größenverteilung, Ausbeute, Unilamellarität und Defektdichte ist die Elektroformation alternativen Methoden wie der „Gentle Hydration Method“ bzw. der „Solvent Evaporation Method“ überlegen. [59] Wenn es darum geht, Proben mit hohen Konzentrationen geladener Lipide bzw. hohen Ionenanteilen in wässriger Lösung herzustellen, so ist die „Gentle Hydration Method“ vorzuziehen. [60] Alternative Elektrodenformen wie beispielsweise

ITO-beschichtete planare bzw. interdigitierte Elektroden erlauben dank erhöhter Anzahl variierbarer Parameter eine bessere Kontrolle hinsichtlich der Ausprägung der Vesikeleigenschaften. [61]

4.4.2 Herstellung von GUVs mittels RSE

Es werden hierzu zunächst Vesikel unter Zuhilfenahme der RSE-Methode hergestellt. Danach wird die Lösung auf ITO-beschichtete⁵ Trägerplättchen aufgebracht. Nun muss in einem ganz bestimmten Zeitfenster getrocknet werden. Zu kurze Trocknung führt nicht in gewünschtem Ausmaß zu GUVs, zu lange Trocknung kann wie bei Filmablagerung zu unerwünschten Entmischungseffekten führen. Danach wird der Film hydratisiert und eine Wechselspannung von etwa einem Volt im Bereich von 1 bis 10 Hz angelegt. [58] Der Vorteil der RSE-Methode liegt auch hier darin begründet, dass es nicht zu ungewünschten Entmischungseffekten bei der Präparation kommt. Dies ist insbesondere für Mikroskopieuntersuchungen der riesigen Liposomen von hoher Relevanz.

4.5 Ethanol-Injektionsmethode

Die Lipide für die Ethanol-Injektionsmethode werden zunächst in Ethanol gelöst. Danach wird die Lösung bei einer Temperatur über T_m schnell in eine wässrige Lösung eingebracht. Dabei lösen sich die Alkoholmoleküle auf Grund der Löslichkeit von Ethanol in Wasser von den Lipiden, es kommt zu einer spontanen Entstehung von Vesikeln. Die Homogenität der Liposomen in Bezug auf die Größe und Lamellarität hängt insbesondere von der Lipidkonzentration im Ethanol ab, welche auf Grund der stark limitierten Löslichkeit von Lipiden im Alkohol relativ gering ist. Wahlweise kann auch Wasser einer Ethanol-Lipidlösung beigemischt und hernach das Ethanol in einem Verdampfer der Mischung entzogen werden. [18]

4.6 Reverse Phase Evaporation Methode

Die Reverse Phase Evaporation Methode erfolgt durch Mischung von apolarem Lösungsmittel mit niedrigem Siedepunkt, Dispersionsmittel und gewünschtem Lipid. Die Lösung wird gevortext und mit Ultraschall behandelt, sodass eine feine Emulsion von Wassertröpfchen in der apolaren Phase entsteht. Hernach wird das organische Lösungsmittel bei erniedrigtem Druck und Temperaturen über T_m ausgedampft. Größenverteilungen von 200 bis

⁵Indiumzinnoxid, findet Verwendung beim Aufbau transparenter Elektroden [62]

1000 nm werden beobachtet. [18] Entscheidend für die Entstehung uni- oder aber multilamellarer Vesikel ist das Verhältnis von Lipid zu wässriger Lösung. Übersteigt der Lipidanteil in der Emulsion die nötige Menge, um alle emulgierten Wassertröpfchen mit einer Lipidschicht zu überziehen, so entstehen überwiegend MLVs. [63]

4.7 Organisch-wässriges-Zweiphasensystem Methode

Eine schnelle Methode zur Herstellung von GUVs beinhaltet die Zubereitung einer Lipidlösung in einer Chloroform-Methanol-Mischung, die vorsichtige Beimengung von wässriger Phase und anschließende Entfernung des Lösungsmittels bei erhöhter Temperatur und erniedrigtem Druck in einem Rotationsverdampfer. [18, 64] Die Methode ähnelt - bis auf die Herstellung der feinen Emulsion - der Reverse Phase Evaporation Methode.

4.8 Nachbearbeitungsverfahren

4.8.1 Ultraschallverfahren

Ultraschall kann eingesetzt werden, um aus MLVs kleine unilamellare Vesikel zu erzeugen. Die Beschallung erfolgt oberhalb der Schmelztemperatur der Lipide. Restliche, große Vesikel können mittels Zentrifugieren rasch entfernt werden. [50]

4.8.2 Gefrier-Tau-Verfahren

Die unter der Bezeichnung „Freeze and thaw“ bekannte Methode basiert darauf, die Dispersion mehrmals hintereinander mittels flüssigem Stickstoff schockzufrieren und wieder aufzutauen. Dabei entstehen große, unilamellare Vesikel. Die Methode hat ebenfalls oberhalb der Lipidschmelztemperatur zu erfolgen. [65]

4.8.3 Extrusionsverfahren

Beim Extrudieren werden die Vesikel durch eine Membran mit angepasstem Porendurchmesser gepresst. Dadurch erhält man SUVs bzw. LUVs mit relativ schmaler Größenverteilung. [50]

Kapitel 5

Analyse von Liposomen

5.1 Einleitung

Die Membranbiophysik verfügt über ein breites Spektrum von Analyseverfahren, welches sich sowohl aus chemischen als auch physikalischen Methoden zusammensetzt. Wir wollen uns in diesem Kapitel lediglich auf die von uns verwendeten Verfahren beschränken und einen kurzen Überblick der Techniken und Technologien vermitteln.

5.2 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung, im Englischen kurz SAXS¹, findet ihre Anwendung bei der Analyse von kolloiden und makromolekularen Objekten unter Zuhilfenahme von Strahlung im Röntgenbereich. Sie liefert im Falle von Membranuntersuchungen wertvolle Informationen über

- Elektronendichten,
- Schichtdicken,
- Wiederholungsabstände von Lamellen und Lagen,
- Anzahl von Lagen und
- Flexibilität. [66]

¹Small Angle X-ray Scattering

5.2.1 Aufbau und physikalische Grundlagen

Eine SAXS Apparatur besteht aus

- einer Röntgenquelle
- einem kollimierenden Linsen- und Blendensystem (hier: Kratky-Optik)
- einer Probenhalterung mit Probe
- einem Beamstop und
- einem Detektionssystem.

Die Röntgenquelle stellt einen möglichst monochromatischen Photonenstrahl zur Verfügung, welcher durch das Linsen- und Blendensystem so weit kollimiert werden muss, dass eine Detektion der Photonen der Kleinwinkelstreuung, welche mit einem Streuwinkel zwischen 0.1° und 10° sehr nahe am Primärstrahl liegen, möglich wird. Den geringen Streuwinkel verdankt die Anlage dem Umstand, dass mit größer werdenden streurelevanten Dimensionen des Probeninhalts in Relation zu einer bestimmten Lichtquellenwellenlänge die Beugungswinkel kleiner werden. Dies bedeutet, dass man sich im Falle von membranartigen Strukturen im Kleinwinkelbereich bewegt. [66] In der Probe interagiert der Röntgenstrahl auf unterschiedliche Art und Weise. Absorption von Photonen durch Elektronen ist eine Möglichkeit. Sie stellt jedoch im Falle von SAXS einen unerwünschten Nebeneffekt dar, genauso wie die inelastische Comptonstreuung. Dabei geben Photonen einen Teil ihrer Energie an Elektronen ab, es kommt zu einer inkohärenten Streustrahlung ohne feste Phasenbeziehung und somit auch ohne Interferenzmöglichkeit. Entscheidend für SAXS ist die elastische Rayleigh- oder Thomsonstreuung. Hierbei wird ein Photon von einem Elektronen absorbiert. Das oszillierende Elektron strahlt mit einer bestimmten statistischen Verteilung ein neues Photon gleicher Energie aus. Die ausgesandten Photonen benachbarter Atome besitzen dabei ein festes Phasenverhältnis, die Strahlung ist also kohärent und interferenzfähig. Somit kann sie Informationen über den strukturellen Aufbau der Probe liefern. [67]

5.2.2 Streuung an Lipiddoppelschichtstapeln

Abbildung 5.1 zeigt einen Stapel von Lipiddoppelschichten mit der Wiederholdistanz D , Abbildung 5.2 skizziert vereinfacht dargestellt die Thomsonstreuung an eben zwei solchen planaren Strukturen. [28]

Die Phasendifferenz der einlaufenden und gestreuten Welle ist gemäß [28] gegeben durch

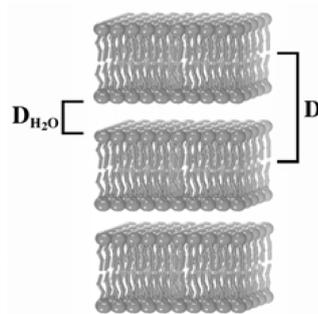


Abbildung 5.1: Stapel von Lipiddoppelschichten [28]

D ... Wiederholddistanz

D_{H_2O} ... Intermembranwasserschichtdicke

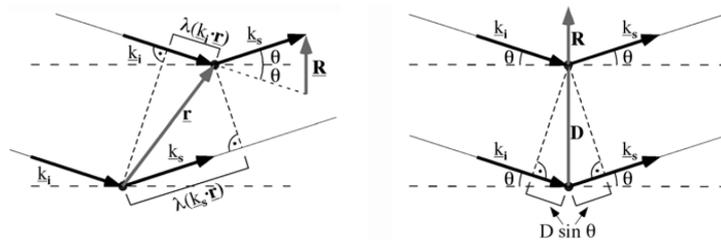


Abbildung 5.2: Streuung an zwei planaren Ebenen mit der Wiederholddistanz D [28]

\mathbf{k}_i ... Wellenvektor der einlaufenden Welle

\mathbf{k}_s ... Wellenvektor der auslaufenden Welle

\mathbf{r} ... Abstandsvektor der Streupunkte

2θ ... Streuwinkel

λ ... Wellenlänge $k = \frac{1}{\lambda}$

$$\Delta = 2\pi\mathbf{r}(\mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i) = 2\pi\mathbf{r}\mathbf{R}, \quad (5.1)$$

die der zwei gestreuten Wellen durch

$$|R| = \frac{2\sin\theta}{\lambda}. \quad (5.2)$$

Man erkennt, dass R proportional zum Winkel θ ist. Für Braggbeugung an den 2 Ebenen muss die Bedingung

$$\mathbf{r}\mathbf{R} = |\mathbf{r}||\mathbf{R}| = 2D\frac{\sin\theta}{\lambda} = n \quad (5.3)$$

$n \dots 1, 2, 3, \dots$

$$|\mathbf{r}| = D$$

gelten. [28] Die Intensität des Streusignals, welches man bei der Messung von Lipiddoppelschichtstapeln, gemittelt über alle Orientierungen im dreidimensionalen Raum, erhält, lässt sich laut [28] schreiben als

$$I(q) \propto \frac{\langle |f(q)|^2 s(q) \rangle}{q^2} \quad (5.4)$$

$q \dots 2\pi R$, Betrag des Streuvektors

$f \dots$ Formfaktor

$s \dots$ Strukturfaktor

Der Formfaktor beschreibt die Fouriertransformierte eines Elektronendichteprofiles des Querschnitts einer Lipiddoppelschicht. Der Strukturfaktor spiegelt die quasikristalline bzw. kristalline Struktur des Gitters des Lipiddoppelschichtstapels wieder. [28]

Eine Mittelung der Doppelschichtfluktuationen ist möglich unter der Annahme, dass die Fluktuationen in der Doppelschicht unabhängig von denen der Gitterpunkte sind. Somit lässt sich die Intensität gemäß [28] darstellen als

$$I(q) \propto \frac{\langle |f(q)|^2 \rangle \langle s(q) \rangle + N(\langle |f(q)|^2 \rangle - \langle |f(q)| \rangle^2)}{q^2}. \quad (5.5)$$

$N \dots$ Gesamtanzahl der Lipiddoppelschichten

Der erste Term von Gleichung 5.5 beschreibt die Streuung an multilamellaren Vesikeln, der zweite Term berücksichtigt die diffuse Streuung an unilamellaren Strukturen. Der zweite Term kann für Auswertungen von Bragg-Peaks vernachlässigt werden. [68, 69]

In diesem Falle kann der Formfaktor F als konstant in jedem Bragg-Peak Intervall angenommen werden und die Intensität lässt sich, wie z.B. in [69], schreiben als

$$\begin{aligned} I(q) &\propto \frac{|\langle f_h(q) \rangle|^2 s(q)}{q^2} \\ &= \frac{|F_h(q)|^2 S_h(q)}{q^2}. \end{aligned} \quad (5.6)$$

$h \dots$ Ordnung der Reflexionen

5.2.2.1 Formfaktor

Wir definieren nun, wie beispielsweise in [70], die Streuamplitude

$$F(\mathbf{q}) = A * f * e^{i\mathbf{r}\mathbf{q}}. \quad (5.7)$$

$A \dots$ Amplitude

$f \dots$ Streukraft

Treten nun k Streuvorfälle ein, so lässt sich die Interferenz von k Sekundärwellen als Superposition von Streuamplituden darstellen.

$$A(\mathbf{q}) = \sum_{n=1}^k A * f_n * e^{i\mathbf{r}_n\mathbf{q}} \quad (5.8)$$

Da die summierten Streukräfte an den Orten \mathbf{r}_n experimentell und rechnerisch nicht handhabbar sind, geht man über zu einer Elektronendichteverteilung $\rho(\mathbf{r})$ und erhält somit laut [70] für die Streuamplitude (sei $A = 1$)

$$A(\mathbf{q}) = \int_{\mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) * e^{i\mathbf{r}\mathbf{q}} d\mathbf{r}. \quad (5.9)$$

$\rho \dots$ Elektronendichteverteilung

Da die Elektronendichte der Lipiddoppelschichten in zwei Dimensionen (parallel zur Membranoberfläche) beinahe homogen erscheint, lässt sich auch nach [70] schreiben

$$A(q) = \int_z \rho(z) * e^{izq} dz. \quad (5.10)$$

Über eine Fouriertransformation ist somit die Streuamplitude im reziproken Raum mit der Elektronendichteverteilung im Ortsraum verknüpft und es gilt gemäß [70]

$$\rho(z) = \int_q A(q) * e^{-izq} dq. \quad (5.11)$$

Für multilamellare Vesikel mit einer Doppelschichtwiederholdistanz $\rho(z + nD) = \rho(z)$ erhält man schließlich, wie in [28] nachzulesen ist,

$$A(q) = \left(\sum_{n=1}^N e^{iqnD} \right) \int_{z=0}^D \rho(z) * e^{izq} dz. \quad (5.12)$$

N ... Gesamtanzahl der Doppelschichten

wobei der Summenterm Interferenzfunktion $G(q)$, der Integralterm Formfaktor $F(q)$ mit

$$F(q) = \int_{z=0}^D \rho(z) * e^{izq} dz. \quad (5.13)$$

genannt wird. Experimentell zugänglich ist nach [28] lediglich die gemessene Intensität

$$I = |F(q)|^2, \quad (5.14)$$

die Phaseninformation geht verloren. Für eine symmetrische Membran lässt sich jedoch der Formfaktor, entsprechend [28], weiters schreiben als

$$\begin{aligned} F(q) &= \int_{-D/2}^{D/2} \rho(z) e^{izq} dz = \\ &= \int_{-D/2}^{D/2} \rho(z) \cos(zq) dz + i \int_{-D/2}^{D/2} \rho(z) \sin(zq) dz. \end{aligned} \quad (5.15)$$

Da $\sin(x) = -\sin(-x)$ verschwindet der Imaginärteil und man erhält, wie in [28] ausgeführt,

$$F(q) = \int_{-D/2}^{D/2} \rho(z) \cos(zq) dz. \quad (5.16)$$

Wissend, dass der Sinusterm verschwinden muss, kann man nun laut [28] den Formfaktor auch als

$$F(q) = |F(q)| e^{i\phi} = |F(q)| \cos(\phi) + i |F(q)| \sin(\phi). \quad (5.17)$$

anschreiben und sich überlegen, wann $i|F(q)|\sin(\phi)$ Null wird. Dies ist offensichtlich dann der Fall wenn gilt $\phi = n\pi$. Dadurch ergibt sich für den Formfaktor gemäß [28]

$$F(q) = \pm|F(q)|. \quad (5.18)$$

Für eine zentrosymmetrische Struktur lässt sich die Elektronendichte somit laut Pabst et al. [68] schreiben als

$$\rho(z) = \sum_{h=1}^{h_{max}} \pm F_h \cos(q_h z). \quad (5.19)$$

$$q_h \dots \frac{2\pi h}{D}$$

5.2.2.2 Strukturfaktor

Der Strukturfaktor beschreibt, wie schon erwähnt, die quasikristalline bzw. kristalline Struktur des Gitters des Lipiddoppelschichtstapels und lässt sich für ein perfekt ausgerichtetes, eindimensionales Gitter nach [69] schreiben als

$$S(q) = N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N - k) \cos(kqD) \quad (5.20)$$

$N \dots$ Anzahl der positionell korrigierten Gitterpunkte

In der Kristallographie existiert theoretisch eine perfekte, langreichweitige Ordnung und somit haben die Brechungspeaks alle dieselbe Intensität. Im Falle von Lipiddoppelschichten muss man jedoch den Einfluss von Störungen berücksichtigen. Einen wesentlichen Einflussfaktor stellen thermische Störungen dar, kleine Fluktuationen um eine fixe Doppelschichtposition, welche gemäß [69] durch

$$S_{TD}(q) = N + 2e^{-\frac{q^2 \Delta^2}{2}} \sum_{k=1}^{N-1} (N - k) \cos(kqD) \quad (5.21)$$

zum Ausdruck gebracht werden. Beim vorliegenden Exponentialterm handelt es sich um den Debye-Waller Temperaturfaktor mit Δ als Symbol für die durchschnittlichen quadratischen Fluktuationen der Doppelschicht. Des weiteren berücksichtigt man kleine Abweichungen der Doppelschichtabstände durch eine Ableitung aus der parakristallinen Theorie laut [69] mit

$$S_{PT}(q) = N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N - k) \cos(kqD) e^{-\frac{k^2 q^2 \Delta^2}{2}}. \quad (5.22)$$

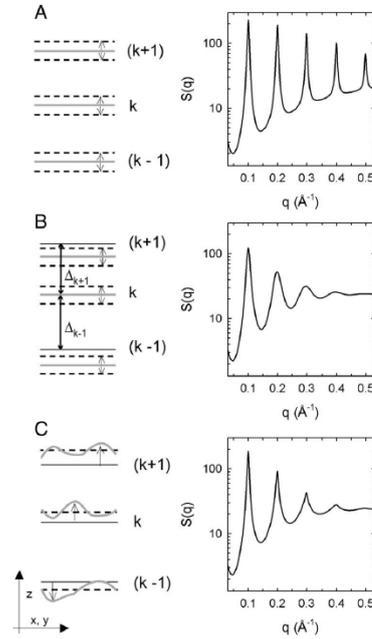


Abbildung 5.3: Beugungspeaks unter Störeinfluss; A: Einfluss thermaler Störungen, B: Einfluss der Gitterstörungen, C: Einfluss von Biegefluktuationen [69]

Biegefluktuationen, wie sie im Speziellen in der Fluidphase auftreten, werden, wie in [69] beschrieben, anhand der modifizierten Caillé-Theorie erklärt:

$$S_{MCT}(q) = N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N - k) \cos(kqD) e^{\left(\frac{-D}{2\pi}\right)^2 * \eta[\gamma + \ln(\pi k)]} \quad (5.23)$$

γ ... Eulerkonstante
 η ... Caillé Parameter

Abbildung 5.3 zeigt den Einfluss der soeben besprochenen Störungseinflüsse auf das Beugungsmuster des Lipiddoppelschichtsystems. Auf der linken Seite sind die Abweichungen von der idealen Gitterstruktur skizziert, auf der rechten Seite wird der zugehörige Strukturfaktor $S(q)$ dargestellt.

5.2.2.3 Streuintensität

Meist wird, über Inverse Fouriertransformation abgeleitet, aus einer modellierten Elektronendichteverteilung ein passender Formfaktor für das zu untersuchende Modellsystem gefunden. Abbildung 5.4 zeigt exemplarisch auf

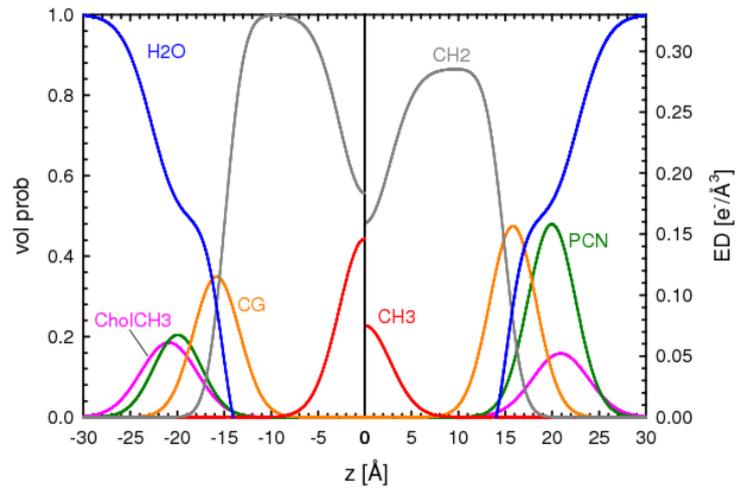


Abbildung 5.4: Links: Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von Molekülbestandteilen des Lipids SOPC sowie von Wasser; rechts: Elektronendichten von Molekülbestandteilen des Lipids SOPC sowie von Wasser [71]

der linken Seite die modellierten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von Molekülbestandteilen des Lipids SOPC² sowie von Wasser. Daraus kann die Elektronendichte, ersichtlich auf der rechten Seite der Abbildung, berechnet werden. Diese wiederum dient als Grundlage für den Formfaktor welcher, zusammen mit dem Strukturfaktor für die modifizierte Caillé Theorie, in die Gleichung

$$I(q) \propto \frac{|F(q)|^2 S_{MCT}(q) + N_{diff} |F(q)|^2}{q^2} \quad (5.24)$$

einbettet wird. Der zweite Term von Gleichung 5.24 berücksichtigt diffuse Streuung, welche während des experimentellen Vorgangs auf Grund positionell unkorrelierter Schichten (Defekte, ULV) auftreten kann. Relation 5.24 wird zum Fitten von experimentellen Daten herangezogen. [68] Abbildung 5.5 zeigt das Streubild eine Messung von SOPC am Synchrotron in Triest und den entsprechenden Fit mittels Gleichung 5.24. [71]

5.2.3 Experimenteller Vorgang

Die meisten Photonen gelangen als Primärstrahl ohne Ablenkung durch die Probe und müssen auf Grund der sehr hohen Intensität durch einen Beamstop am Einfall in den Detektor gehindert werden. Die Kleinwinkelstreuung hingegen trifft auf den Detektor und kann mittels entsprechender Software ausge-

²1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin

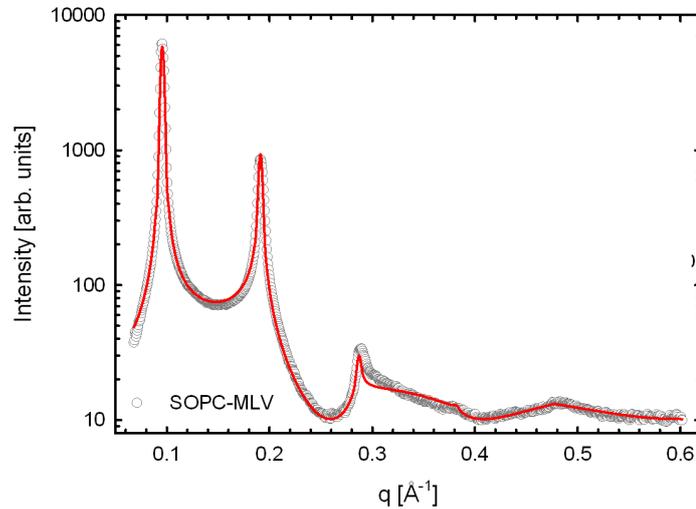


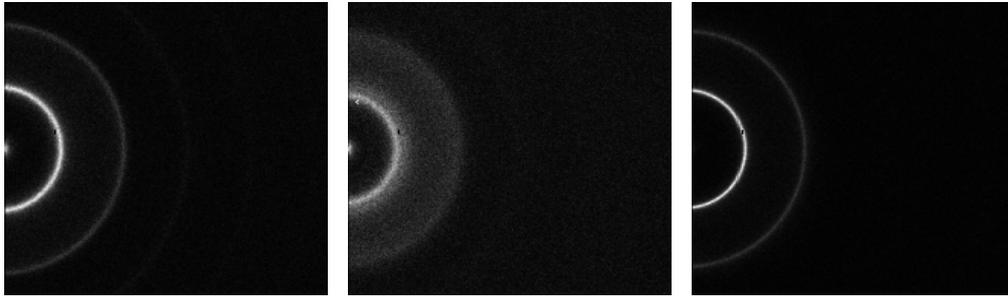
Abbildung 5.5: Fit von Messungen am Lipid SOPC [71]

wertet werden. Detektiert wird das Intensitätsquadrat, somit gehen Phaseninformationen verloren, womit eine räumliche Rekonstruktion des Probenaufbaus nicht mehr direkt möglich ist. Es entsteht somit eine zweidimensionale Intensitätsverteilung. Abbildung 5.6 zeigt Bilder der Röntgenstreuung an multilamellaren DPPC-Vesikel in wässriger Phase. Abbildung 5.6(a) stellt die Gelphase, Abbildung 5.6(b) die Rippelphase und Abbildung 5.6(c) die Fluidphase dar. Klar zu erkennen ist die winkelunabhängige konzentrische Intensitätsverteilung auf Grund der Symmetrie der räumlichen Mittelung.

5.3 Röntgenweitwinkelstreuung

Um kleinere streurelevante Dimensionen des Probeninhalts in Relation zu einer bestimmten Lichtquellenwellenlänge analysieren zu können, werden bei der Röntgenweitwinkelstreuung, im Englischen kurz WAXS³, Photonen mit einem Beugungswinkel im Bereich von 10° bis 90° detektiert. Mit dem größeren Beugungswinkel ist im Vergleich zu SAXS die Detektion von deutlich kleineren Strukturen verbunden. [67] Lässt sich mit SAXS, wie in Kapitel 5.2.2 erörtert, die Struktur der Lipiddoppelschichten studieren, so ermöglicht WAXS Einblicke in die Positionierung der einzelnen Lipidmoleküle innerhalb einer Lipiddoppelschicht zueinander bzw. der Bestandteile wie Kopfgruppen und Kohlenwasserstoffketten. So kann mittels WAXS beispielsweise die

³Wide Angle X-ray Scattering



(a) 2D Streubild einer DPPC-Probe in der Gelphase
(b) 2D Streubild einer DPPC-Probe in der Rippelphase
(c) 2D Streubild einer DPPC-Probe in der Fluidphase

Abbildung 5.6: Streubilder von multilamellaren DPPC-Vesikeln in wässriger Lösung

Packung der Fettsäureketten analysiert werden. Hierbei handelt es sich um Strukturabstände in der Größenordnung von 0,35 bis 0,5 nm.

5.4 Dynamische Differenzkalorimetrie

Wie in Kapitel 3.4.5 erwähnt, kann es bei Wärmezufuhr bzw. abfuhr in Lipidsystemen zu Phasenübergängen ähnlich denen 1. Ordnung kommen. Die dabei auftretende Enthalpieänderung macht man sich bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie, kurz DSC⁴, zu Nutze.

5.4.1 Experimenteller Vorgang

Es wird für die Messung ein Messvolumen mit einer Referenzlösung ohne thermotrope Phasenübergänge (meist das reine Lösungsmittel) gefüllt, ein zweites Volumen mit der zu analysierenden Lipidprobe. Die Temperatur beider Volumina wird nun mit konstanter Rate erhöht und die Wärmeaufnahme der jeweiligen Flüssigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet. Kommt es zu Phasenübergängen in der Lipidprobe, so ändert sich die Wärmekapazität schlagartig. Aus der daraus resultierenden, unterschiedlichen Wärmeaufnahme von Referenzzelle und Probenzelle kann mit dieser Methode auf die Wärmekapazität, die Enthalpie und damit auf die Lipid-Phasenübergänge rückgeschlossen werden. [72] Da vornehmlich sehr kleine Wärmekapazitätsänderungen untersucht werden, sind gleiche Volumina von

⁴Differential Scanning Calorimetry

Mess- und Referenzflüssigkeit sowie ausreichender Schutz vor äußeren Einflüssen von großer Bedeutung. [35]

5.4.2 Theoretische Betrachtungen

Da die konstante Temperaturänderung bei konstantem Druck vonstattengeht, ist der Wärmefluss gemäß [73] gleich der Enthalpieänderung

$$\left(\frac{dQ}{dt}\right)_p = \frac{dH_{cal}}{dt} \quad (5.25)$$

Q ... Wärme

H_{cal} ... kalorimetrische Enthalpie

t ... Zeit

p ... Druck

Die Wärmeflussdifferenz zwischen Probe und Referenz ergibt sich nach [73] zu

$$\Delta \frac{dH_{cal}}{dt} = \left(\frac{dH_{cal}}{dt}\right)_{Probe} - \left(\frac{dH_{cal}}{dt}\right)_{Referenz}, \quad (5.26)$$

die Wärmekapazität lässt sich schreiben als

$$c_p = \left(\frac{dQ}{dT}\right)_p = \left(\frac{dH_{cal}}{dT}\right)_p. \quad (5.27)$$

c_p ... Wärmekapazität

T ... Temperatur in Kelvin

Mit der konstanten Heiz- bzw. Kühlrate $\frac{dT}{dt}$ wird die Wärmekapazität, wie in [73] erörtert, durch die Kettenregel zu

$$c_p = \frac{dH_{cal}}{dT} = \frac{dH_{cal}}{dt} \frac{dt}{dT}. \quad (5.28)$$

Die Gleichung

$$\Delta c_p = \Delta \frac{dH_{cal}}{dT} = \Delta \frac{dH_{cal}}{dt} \frac{dt}{dT}. \quad (5.29)$$

beschreibt die Differenz der Wärmekapazitäten der Referenz- und Probenflüssigkeit. [73]

Der von der DSC-Apparatur aufgezeichnete differentielle Wärmefluss wird als sogenannte thermoanalytische Kurve bezeichnet und dargestellt. Dabei wird, wie in Abbildung 5.7 und 5.8 ersichtlich, die Wärmekapazität über der Temperatur aufgetragen.

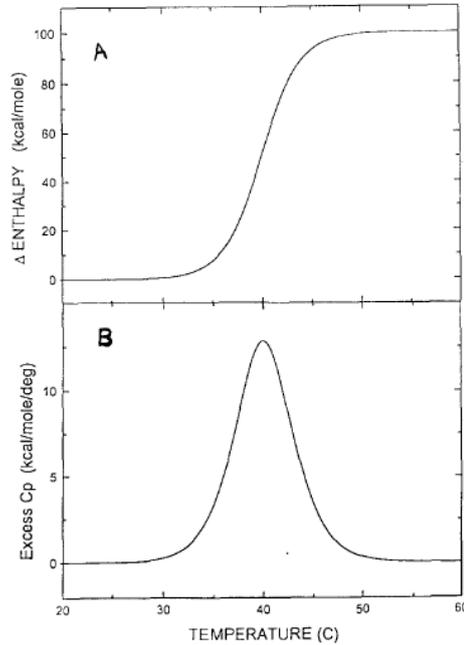


Abbildung 5.7: Beispielhafte, schematische Darstellung eines Thermogramms [39]
 C_p ... Wärmekapazität

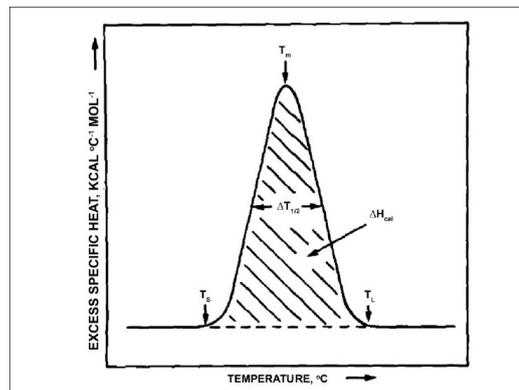


Abbildung 5.8: Relevante Daten des Wärmekapazitätsthermogramms [35]
 T_m ... Maximale Wärmekapazität des Phasenübergangs, Schmelzpunkt
 $\Delta T_{1/2}$... Halbwertsbreite
 ΔH_{cal} ... Enthalpiedifferenz zwischen Probe- und Referenzflüssigkeit
 T_S ... Anfang des spezifischen Wärmeüberschusses des Phasenübergangs
 T_L ... Ende des spezifischen Wärmeüberschusses des Phasenübergangs

Die Integration der Wärmekapazität über einen bestimmten Temperaturbereich gibt die spezifische kalorimetrische Enthalpie wieder. [35] Dies kann laut [73] geschrieben werden als

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_S}^{T_L} \Delta c_p dT \quad (5.30)$$

T_S ... Anfang des spezifischen Wärmeüberschusses des Phasenübergangs

T_L ... Ende des spezifischen Wärmeüberschusses des Phasenübergangs

und wird in Abbildung 5.7 dargestellt. Gemäß [38] lässt sich aus der Gleichung

$$\Delta H_{vH} = 4RT_m^2 \frac{c_{p,max}}{\Delta H_{cal}} \quad (5.31)$$

H_{vH} ... van't Hoff'sche Enthalpie

R ... Universelle Gaskonstante

T_m ... Schmelzpunkt

$c_{p,max}$... Maximale Wärmekapazität des Phasenübergangs

die scheinbare Reaktionsenthalpie, die van't Hoff'sche Enthalpie, H_{vH} , gewinnen. Die van't Hoff'sche Enthalpie entspricht der Menge Wärme, welche für jede einzelne kooperative Einheit (CU) nötig ist, um den Phasenübergang zu bewerkstelligen. Ein Phasenübergang erster Ordnung ist vollständig kooperativ, hat somit theoretisch einen unendlich scharfen Übergang. Dies bedeutet, dass alle Lipidmoleküle im gleichen Augenblick den Phasenübergang vollziehen. Geschieht dies ohne den Umweg über etwaige Zwischenphasen so spricht man von einem zwei-Zustands-Phasenübergang erster Ordnung. Für einen solchen Übergang entspricht ΔH_{vH} genau ΔH_{cal} . [38] Mit kleiner werdenden kooperativen Einheiten nimmt auch ΔH_{vH} allmählich ab. Da es sich bei Phasenübergängen von Lipiden um keine reinen Übergänge erster Ordnung handelt, gilt für diese $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$.

Die Relation

$$\Delta CU = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} \quad (5.32)$$

CU ... kooperative Einheit (cooperativity unit)

lässt, wie in [38] dargestellt, Rückschlüsse auf die Größe der kooperativen Einheiten zu. Wie sofort ersichtlich ist, verfügen stark kooperative Phasenübergänge über eine hohe van't Hoff'sche Enthalpie.

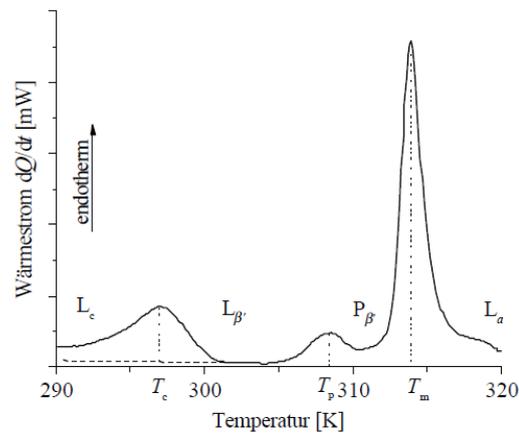


Abbildung 5.9: Thermogramm von DPPC [30]

5.4.3 DSC-Thermogramm am Beispiel von DPPC

Am Beispiel von DPPC soll nun ein typisches DSC-Diagramm erörtert werden. Abbildung 5.9 skizziert den Thermogrammverlauf mit den einzelnen DPPC-Phasen sowie deren Übergänge. Abbildung 3.8 zeigt und vergleicht reale Thermogramme von DPPC LUVs sowie MLVs in wässriger Lösung.

Der Wärmestrom bzw. Wärmekapazitätsänderungen von MLVs eignen sich besonders gut zur DSC-Analyse, da sehr scharfe, abgegrenzte Maxima, besonders beim Übergang von der Rippel- in die Fluidphase, vorhanden sind. Untersuchungen an unilamellaren Vesikeln zeigen, dass sich Lage, Höhe und Halbwertsbreite der Übergänge gegenüber den Werten multilamellarer Vesikel stark verändern können.

Die Lage von T_m ist abhängig von der Größe der unilamellaren Vesikel. Je kleiner die Partikel werden, desto kleiner wird die Übergangstemperatur. [35] Dies ist auf die unterschiedliche Oberflächenkrümmung und die damit verbundene unterschiedliche Packung der Kohlenwasserstoffketten zurückzuführen (siehe Kapitel 3.4.3). [74] Für SUVs bis 35 nm liegt der Hauptübergang bei rund 37 °C, hinsichtlich unilamellarer Liposomen zwischen 35 und 70 nm wandert dieser bis hin zur Hauptübergangstemperatur von MLVs bei etwa 41 °C wo er auch für ULVs über 70 nm konstant verbleibt. [35] Abbildung 5.10 zeigt das Thermogramm einer DPPC-Dispersion mit SUVs und LUVs. Der Graph „a“ zeigt eine Aufnahme nach Inkubierung der Probe für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur, Graph „b“ eine Aufzeichnung nach 72 Stunden. Klar zu erkennen ist die Tendenz der SUVs, bei Temperaturen unterhalb von T_p zu fusionieren und LUVs zu bilden. [39]

Die Halbwertsbreite der Übergänge unilamellarer Vesikel nimmt gegenüber der von MLVs zu. Bei Mischungen aus LUVs und MLVs verbreitern die LUVs

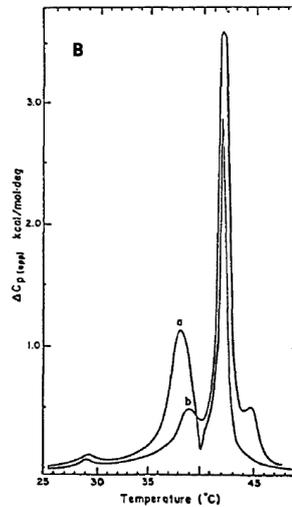


Abbildung 5.10: Thermogramm einer DPPC-Dispersion mit SUVs und LUVs; a: Aufnahme nach 1,5 Stunden Inkubierung bei Raumtemperatur, b: Aufnahme nach 72 Stunden Inkubierung bei Raumtemperatur [39]

den stark ausgeprägten MLV-Übergang, bei SUV-Dispersionen zwischen 30 und 50 nm Durchmesser kann die Halbwertsbreite bis zu 3,5 °C betragen (im Gegensatz zu weniger als 0,1 °C bei MLVs). [29]

Die Höhe der Enthalpiekurven nimmt bei unilamellaren Vesikeln im Vergleich zu MLVs ab. [29] Somit ist das Thermogramm ein guter Indikator für die Homogenität der gelösten Vesikel.

Der Übergang bei T_p ist darüber hinaus auch ein guter Indikator für verschiedenste Unreinheiten in der Dispersion, welche den Übergang auch in kleinen Mengen schon zum Verschwinden bringen. [35] Die Enthalpie des Hauptübergangs ist abhängig von der Kohlenwasserstoffkettenlänge. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil der Wärme beim Übergang in die Umordnung der Ketten fließt. [29] Je länger die Kohlenwasserstoffketten werden, desto enger rücken T_m und T_p zusammen, bis sie bei einer Länge von 22 C-Atomen ineinander übergehen [35]. Die Lage und Form des Subübergangs ist stark von der Art und Weise der gesamten Wärmebehandlung der Dispersion vor der Messung abhängig und kann deshalb kaum für weiterführende Aussagen herangezogen werden [29].

Die Bildung des Übergangs bei T_c ist nur detektierbar wenn die Probe längere Zeit gekühlt gelagert wird, da die Entstehung der L_c -Phase sehr langsam vor sich geht und kinetisch gehemmt ist [29].

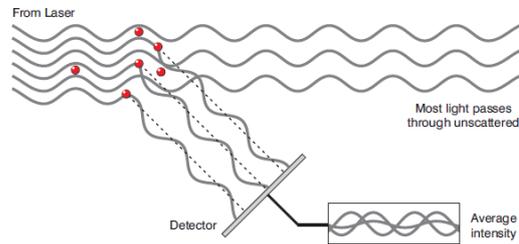


Abbildung 5.11: Streuung von Licht an suspendierten Teilchen [75]

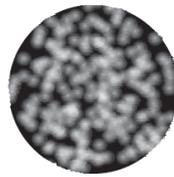


Abbildung 5.12: Intensitätsverteilung einer PCS-Aufnahme [75]

5.5 Photonenkorrelationspektroskopie

Photonenkorrelationspektroskopie, kurz PCS⁵, erlaubt es, anhand von zeitaufgelösten Intensitätsmessungen gestreuten Laserlichts an suspendierten Partikeln Rückschlüsse auf Größe, Anzahl und Volumeneinschluss der Teilchen zu ziehen [75]. Wie in Abbildung 5.11 ersichtlich, wird Laserlicht an den suspendierten Liposomen gestreut. Durch konstruktive und destruktive Interferenz entsteht auf dem Detektor ein Licht- und Schattenbild. Dies ist in Abbildung 5.12 grob skizziert. Die Teilchen führen entsprechend der vorliegenden Temperatur Brown'sche Bewegungen aus. Große Teilchen bewegen sich auf Grund ihrer Trägheit langsam, kleine Teilchen schnell. Dies führt, wie in Abbildung 5.13 dargestellt, zu unterschiedlich raschen Intensitätsschwankungen. Wird nun für die Zeitpunkte t und $t + \delta t$ die Intensitätsverteilung des Interferenzmusters des gestreuten Lichts aufgenommen, so unterscheiden sich diese Aufnahmen auf Grund eben dieser Brown'schen Zitterbewegung. Die Bilder können alsdann hinsichtlich ihrer Korrelation untersucht werden. Eine große Veränderung der Intensitätsverteilung lässt auf kleine, schnell bewegliche Teilchen schließen. In diesem Falle nimmt die Korrelation zweier Aufnahmen mit fortschreitender Zeit rasch ab. Kleine Veränderungen deuten indes auf sich langsam bewegendende Teilchen hin. Die Korrelation der Bilddaten bleibt im zeitlichen Verlauf länger bestehen. Dieser Umstand wird in Abbildung 5.14 klar ersichtlich. Über die Stokes-Einstein-Relation lässt sich

⁵Photon Correlation Spectroscopy

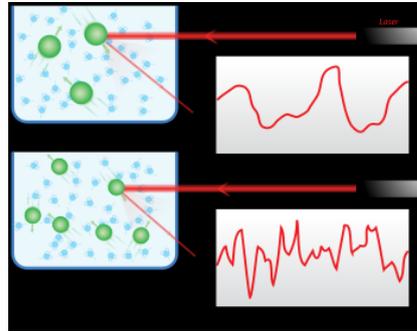


Abbildung 5.13: Intensitätsschwankungen in Abhängigkeit von der Zeit für kleine und große Partikel [76]

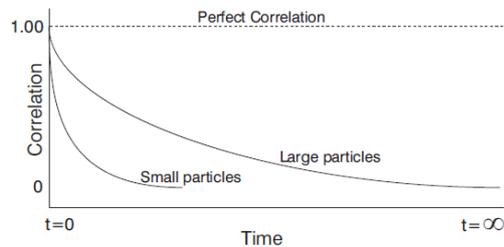


Abbildung 5.14: Korrelation der Intensitätsverteilungen unterschiedlicher Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Zeit [75]

ein Zusammenhang zwischen Brown'scher Bewegung und der Teilchengröße herstellen. [75]

Außerdem lässt sich über die Intensität unter Zuhilfenahme der Mie-Theorie auch auf das Teilchenvolumen und dadurch wiederum auf die Anzahl der Teilchen rückschließen. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die Umrechnung der Intensitäten mit großen Fehlern behaftet sein kann und die Daten dementsprechend mit Bedacht zu interpretieren sind. Größenverteilungen der Proben mit einem PDI⁶ < 0.7 sind für eine aussagekräftige Analyse notwendig. Die analysierbaren Partikelgrößen liegen zwischen 0,3 nm und 10 μm . [75]

⁶Polydispersitätsindex; Prozesse zur Herstellung von Polymeren führen zu unterschiedlichen Graden der Polymerisierung von Polymeren in einer Probe. Es entsteht eine Polymerisationsverteilung, welche durch das Massenmittel und durch das Zahlenmittel charakterisiert wird. Der Quotient der beiden Maße bildet den Polydispersitätsindex, welcher Auskunft über die Breite der Verteilung der Polymerisationsgrade gibt.[16]

5.6 Nanoparticle Tracking Analysis

Die Nanoparticle Tracking Analyse, kurz NTA, erlaubt wie die PCS-Methode die Auswertung der Größe und Anzahl von Nanopartikeln. Die detektierbaren Vesikelgrößen liegen zwischen 10 und 2000 nm⁷. Mit einem Laserstrahl werden die Teilchen beleuchtet. Das gestreute Licht wird mit einer hochauflösenden Kamera aufgezeichnet und die damit ersichtliche Brown'sche Bewegung mittels spezieller Software für jedes einzelne Teilchen mitverfolgt. Über die Stokes'schen Gleichungen kann hernach die Bewegung mit der Teilchengröße in Verbindung gesetzt werden. Der Vorteil gegenüber der PCS-Analyse liegt darin begründet, dass nicht Interferenzen ganzer Teilchenensembles betrachtet werden, sondern jedes aufgezeichnete Teilchen einzeln ausgewertet wird. Dadurch lässt sich eine exaktere Größenverteilung errechnen. [77]

5.7 Polarisationsmikroskopie

Ein Polarisationsmikroskop ist ein Lichtmikroskop, welches Objekte in einem polarisierten Lichtstrahl darstellt. Dazu wird unterhalb der Probe ein Polarisationsfilter (Polarisator) in den Strahlengang eingeführt, welcher lediglich für in eine bestimmte Richtung polarisierte Photonen durchgängig ist. Oberhalb der Probe sitzt ein weiterer Filter, Analysator genannt, der zum Polarisator um 90 Grad gedreht ist und somit das zuvor gefilterte Licht blockiert. Setzt man nun eine optisch isotrope Probe in den Strahlengang, so wird die Lichtpolarisation nicht verändert und der Analysator lässt keine Photonen passieren. Wird jedoch eine optisch anisotrope Probe eingesetzt, so verändert diese die Polarisationsrichtung der Photonen, sodass dieses Licht den Analysator ungehindert passieren kann. [78] Werden nun multilamellare Vesikel in den Strahlengang eingeführt, so stellen diese eine anisotrope Probe dar. Das Licht wird von MLVs so gedreht, dass sie unter dem Mikroskop die Form von Malteserkreuzen annehmen. Für ausführliche Informationen in Hinblick auf anisotrope Eigenschaften multilamellarer Vesikel sei auf [79] verwiesen.

⁷Erfahrungswerte zeigen, dass eine zuverlässige Größenbestimmung lediglich bis 800 nm möglich ist.

Kapitel 6

Details zur RSE Methode

6.1 Einleitung

Das RSE-Verfahren wurde in dieser Arbeit gemäß [54, 55] nachvollzogen und entsprechend den vorherrschenden Laborbedürfnissen adaptiert. Dazu wurden Ergänzungen und Änderungen beim Aufbau der Anlage selbst vorgenommen sowie der Präparationsmodus an sich angepasst. Kapitel 6.2 sowie die Baupläne im Anhang B beschreiben den genauen Aufbau der Anlage. Kapitel 6.3 geht näher auf die Handhabung der Apparatur ein, Kapitel 7 schließlich erörtert die Methodik der RSE-Präparation und deren Adaptierung in Hinblick auf die Herstellung großer, stabiler, plurilamellarer Vesikel.

6.2 Aufbau der RSE Apparatur

Der Aufbau der an unserem Institut konstruierten RSE-Apparatur geht auf Unterlagen zurück, die von Buboltz 2009 in [55] publiziert wurden. Die von uns angefertigten Konstruktionszeichnungen (siehe Anhang B) sind detailliert ausgeführt und erlauben somit einen einfachen Nachbau unserer Kernapparatur mit gängigen Werkstattkomponenten eines technischen Instituts. Nachfolgend sei eine Auflistung aller, über die in Anhang B dokumentierten Bauteile hinaus verwendeten, Zusatzkomponenten gegeben, welche den Aufbau in seiner Gesamtheit vervollständigen.

6.2.0.1 Gas-Zubehör

- Air Liquide (Graz, Österreich) Argon-Gasflasche Alphagaz 1 Ar B10L L
- Air Liquide (Graz, Österreich) Absperrventil LM 45-0,5

- Air Liquide (Graz, Österreich) Druckminderer HBS 200-10-3,5
- Schlauchtülle 10,0 mm/G3/8
- Überwurfmutter G3/8RH
- Schlauch 4 x 1 mm PFA LAS/SPG
- Stützhülse MS 6(4)mm SPG

6.2.0.2 Vakuumzubehör

- Vacuubrand (Wertheim, Deutschland) MZ 2C NT VARIO, regelbare Vakuumpumpe, Endvakuum ohne Gasballast: 7 mbar
- Vakuumschlauch Nalgene Premium Tubing Non Toxic Autoclavable LAB/FDA/USP VI Grade 1/4" ID
- Y-Verbinder Kunststoff 1/4"
- Schlauchschellen

6.2.0.3 Rüttler

- Stuart (Staffordshire, United Kingdom) Vortex Mixer SA8 mit kleinem Aufnahmeteller und regelbarer Drehzahl (bis 2500 UPM)

6.2.0.4 Heizvorrichtung

- Leister (Kägiswil, Schweiz) Mistral 6 System 230V / 2300 W
- Leister (Kägiswil, Schweiz) Edelstahlfilter (Robust/Longlife)
- Leister (Kägiswil, Schweiz) Klappreflektor ø 50.5 mm, 72 x 70 mm
- Leister (Kägiswil, Schweiz) Temperaturregler CSS EASY
- Thermoelement-Messsonde mit 1 m Kabel und Stecker
- Steuerkabel LHS SYSTEM

6.2.0.5 RSE Kernapparatur - Anschlüsse, Leitungen, Ventile, Messsysteme

- Vögtlin (Aesch, Schweiz) red-y compact regulator, regulierbarer Mas-sendurchflussmesser
- Wika (Wien, Österreich) DM63, Manometer, -1 bis +3 bar, 1/4“ NPT Anschluss unten
- PTFE Schlauch 1/8“, Type POM 3,2 x 1,5 mm
- Hoke (Spartanburg, USA) Gyrolok Einschraubverschraubung 2CM4-316
- Hoke (Spartanburg, USA) 3-Wege-Ventil Selectomite, Typ V 7165 G6YMM
- Hoke (Spartanburg, USA) Gyrolok Einschraubadapter , Typ 6AM4-316MMRT
- Hoke (Spartanburg, USA) 2 x Gyrolok T-Verschraubung, Typ 6TTT-316MM-ITA
- Hoke (Spartanburg, USA) Gyrolok Aufschraubadapter, Typ 6AF4-316MME
- Edelstahlrohr nahtlos für Reinstgase, 6 x 1 mm
- Edelstahlrohr nahtlos für Reinstgase 1/16“, 1,6 x 0,8 mm

Abbildung 6.1 zeigt schematisch die Zusammensetzung der in obiger Aufzählung gelisteten Bauteile.

6.2.0.6 RSE Kernapparatur - Bestandteile für Zusammensetzung des RSE-Grundgerüsts

- Bodenplatte, vgl. Abb. B.1
- 2 x Stahlstäbe, vgl. Abb. B.2
- Abstandhalter, vgl. Abb. B.3
- Gehäuseplatte oben, vgl. Abb B.4
- Gehäuseplatte unten, vgl. Abb B.5
- 6 x Innengewindestäbe, vgl. Abb B.6
- Kugelhahnhalterung, vgl. Abb B.7

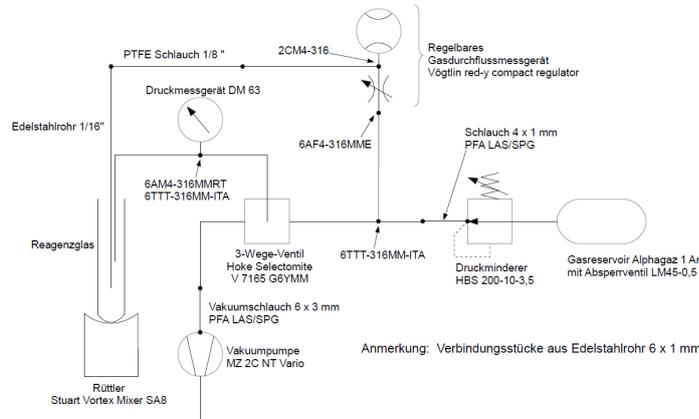


Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau der RSE-Apparatur

- Verteilerbuchsen für Gehäuseplatten, vgl. Abb B.8
- Verteiler, vgl. Abb B.9
- Verteiler-Reagenzglas-Adapter, vgl. Abb B.10
- Hennelich (Suben, Österreich) Flachdichtungsring, 20 x 10 x 2 mm, Qual. EPDM85
- Hennelich (Suben, Österreich) Präzisions-O-Ring 4 x 1 mm, Qual. NBR70
- 4 x Hennelich (Suben, Österreich) Präzisions-O-Ring 22 x 2 mm, Qual. NBR70
- Hennelich (Suben, Österreich) Präzisions-O-Ring 12,5 x 2,5 mm, Qual. NBR70
- Feder, Innendurchmesser 18 mm, Länge 30 mm

Abbildung 6.2 zeigt in Form einer teilweisen CAD-Explosionsdarstellung die in obiger Aufzählung gelisteten Bauteile. Der fertige Aufbau kann in Abbildung 6.4¹ betrachtet werden.

6.2.1 Vakuumpumpe

Die Vakuumpumpe ist über einen Vakuumschlauch und ein Edelstahlrohrstück mit dem 3-Wege-Ventil der Apparatur verbunden und kann stufenlos

¹Mit freundlicher Unterstützung von Benjamin Kollmitzer

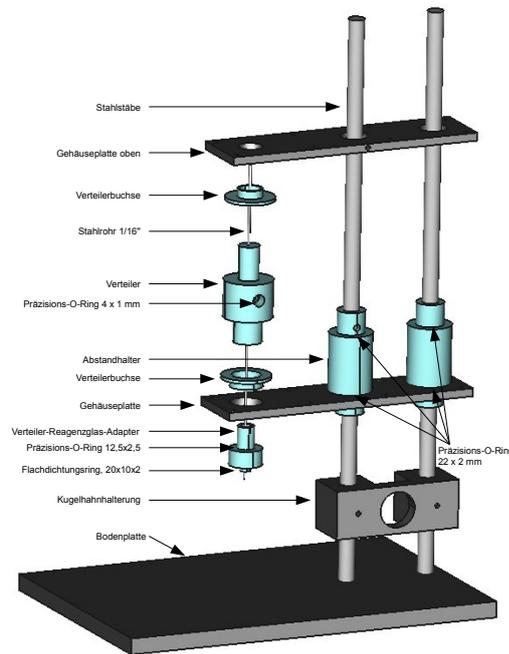


Abbildung 6.2: CAD Darstellung der RSE-Apparatur

von Atmosphärendruck bis auf etwa 7 mbar (ohne Gasballast) geregelt werden. Dies ist notwendig, um den Druck in einen Bereich zwischen den Dampfdruck des polaren Dispersionsmittels (z.B. Wasser) und den Dampfdruck des apolaren Lösungsmittels (z.B. Chloroform oder Dichlormethan) führen zu können. Da es auf Grund unterschiedlicher Schmelzpunkte von Lipiden nötig sein kann, die Temperatur der Lösung für den Arbeitsgang anzupassen, muss auf die sich damit ändernden Dampfdrücke der Lösungsmittel Rücksicht genommen werden. Anhand der Gleichung 6.1

$$p = e^{A \cdot \ln(T) + \frac{B}{T} + C + DT^2} \quad (6.1)$$

A, B, C, D ... Koeffizienten

T ... Temperatur

wurden für gängige Lösungs- und Dispersionsmittel mit den Koeffizienten aus Tabelle 6.1 Dampfdrücke in Abhängigkeit von der Temperatur errechnet. [80] Die in Abbildung 6.3 dargestellten Werte können zu groben Abschätzungen der erforderlichen Evakuierungsparameter durchaus herangezogen werden. Es muss jedoch immer ein etwaiger zeotroper bzw. azeotroper Charakter von Mischungen bedacht bzw. berücksichtigt werden. In diesen Fällen lässt sich keine einfache Abschätzung über das Raoult'sche Gesetz mehr vornehmen.

Koeffizient	Chloroform	Methanol	Wasser	Dichlormethan
A	-1,007089E+01	-9,372816E+00	-7,342973E+00	-1,008632E+01
B	-6,351140E+03	-7,029198E+03	-7,276391E+03	-6,030610E+03
C	8,114393E+01	7,909415E+01	6,702455E+01	8,087786E+01
D	9,127608E-06	7,992729E-06	4,161914E-06	9,812512E-06

Tabelle 6.1: Koeffizienten für die Berechnung der Dampfdruckkurven von Chloroform, Methanol, Dichlormethan und Wasser [80]

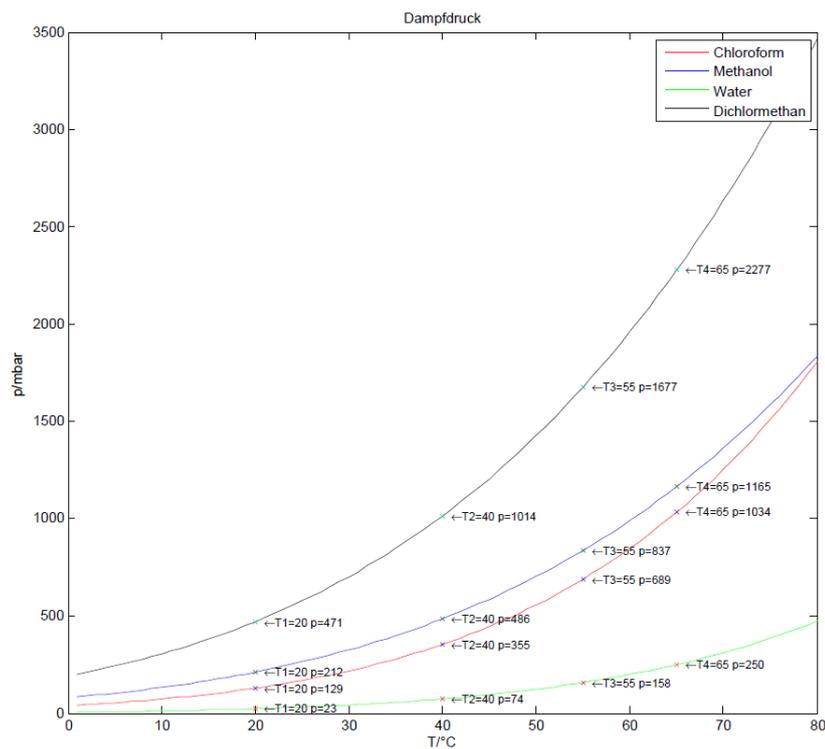


Abbildung 6.3: Vergleich des Dampfdrucks von reinem Chloroform, Methanol, Dichlormethan und Wasser

Die Vakuumpumpe wird im Inneren eines Abzugs betrieben um die Dämpfe von Lösungsmitteln wie Chloroform und Methanol effizient abführen zu können.

6.2.2 Gaszuführung

Die Argon-Gasflasche ist über ein Absperrventil, einen Druckminderer, anschließendem Schlauch und Edelstahlrohr über ein T-Stück mit dem 3-Wege-Kugelhahn und dem Durchflussmesser verbunden. Der Druckminderer ist im niedrigen bar-Bereich genau einstellbar und sollte auf Werte um 2 bar gesetzt werden. Dieser niedrige Wert liegt einerseits innerhalb der Eingangsdruck-Grenzwerte für den Durchflussmesser, andererseits erleichtert er während des RSE-Betriebs die Dosierung des Gasdurchflusses mittels Durchflussmesser. Das Schutzgas selbst ist hochreines Argon 5.0. Als Gasdurchflussmesser wurde ein Massendurchflussmesser gewählt um eine möglichst temperatur- und eingangsdruckunabhängige, präzise Einstellung des Gasdurchflusses zu ermöglichen. Mittels Drehknopf und Digitalanzeige lassen sich die Durchflussraten so bis auf 0.1 l/min genau justieren. Wie Buboltz in seiner Arbeit [55] zeigt, erreicht die Apparatur beim Verdampfen von organischem Lösungsmittel ohne Argonfluss nur eine etwa 20 prozentige Effizienz gegenüber Flussraten von etwa 1 cc/s. Es zeigt sich jedoch auch, dass bei 1 cc/s Gasdurchfluss bereits 97 % der maximalen Effizienz der Apparatur erreicht ist und dass eine weitere Erhöhung der Durchflussmengen in keiner Relation zu dem dadurch erzielbaren Mehrwert steht. Der Durchflussmesser ist über einen 1/8 Zoll Schlauch mit einem 1/16 Zoll Edelstahlrohr verbunden, welches in das Reagenzglas, bis knapp über die Lösungsmitteloberfläche, hineinreicht.

6.2.3 Kugelhahn

Der Kugelhahn vermag einerseits die Vakuumpumpe vom restlichen RSE-System zu trennen, andererseits kann er den direkten Gaszufluss in das Reagenzglasvolumen unterbrechen. Es existieren 3 Kugelhahnstellungen:

- Stellung 1: Die Verbindung Apparatur-Vakuumpumpe ist offen, die direkte Verbindung Gasreservoir-Reagenzglas ist geschlossen.
- Stellung 2: Die Verbindung Apparatur-Vakuumpumpe ist geschlossen, die direkte Verbindung Gasreservoir-Reagenzglas ist offen.
- Stellung 3 (wie in Abbildung 6.1 gezeigt): Sowohl die Verbindung Apparatur-Vakuumpumpe als auch die direkte Verbindung Gasreservoir-Reagenzglas sind unterbrochen.

Der Hahn ist einerseits über ein Edelstahlrohr und anschließenden Vakuumschlauch mit der Vakuumpumpe verbunden, andererseits über ein zweites Edelstahlrohr mit dem Druckmessgerät. Der dritte Anschluss ist mit einem kurzen Edelstahlrohr an ein T-Stück gekoppelt, welches Verbindungen zum Gasdurchflussmesser und zum Gasreservoir herstellt.

6.2.4 Druckmessgerät

Das Druckmessgerät ist über ein T-Stück einerseits mittels Einschraubadapter und Edelstahlrohr mit dem Kugelhahn verbunden, andererseits mittels Edelstahlrohr, Vakuumschlauch und Verteiler mit dem Reagenzglas. Es dient dazu

- etwaige Lecks in der verschraubten Apparatur frühzeitig zu erkennen,
- feststellen zu können, ob der Übergang Flachdichtungsring-Reagenzglas beim Einsetzen des Rüttelns dicht bleibt,
- zu erkennen wann das flutende Schutzgas Atmosphärendruck im Reagenzglas erreicht hat und
- herauszufinden wann bei Flutung des Systems mit Luft über die Vakuumpumpe Atmosphärendruck erreicht worden ist.

6.2.5 Rüttler

Der Rüttler kann von 200 bis 2500 UPM stufenlos geregelt werden. Im klassischen Präparationsprotokoll von [54] dient er dazu, eine Emulsion aus polarer Flüssigkeit und apolarem Lösungsmittel zu erzeugen, welche durch die Fliehkraft an die Außenwand des Reagenzglases gepresst wird und dort einen dünnen Film mit großer Oberfläche bildet.

6.2.6 Heizvorrichtung

Das Heißluftgebläse wird über einen externen Temperaturregler angesteuert und kann somit in einem Bereich von knapp über Raumtemperatur bis etwa 650 °C mit einer Genauigkeit von ± 1 °C justiert werden. Der Heißluftstrom wird über einen zylinderförmigen Klappreflektor über die ersten 10 cm der Reagenzglaslänge homogen verteilt. Eine Messsonde innerhalb des Klappreflektors gibt das Regelsignal an den Temperaturregler weiter.

6.2.7 Realisierter Aufbau

Abbildung 6.4 zeigt die voll funktionsfähige RSE-Apparatur, welche für die in Kapitel 7 erörterten Messungen verwendet wurde.

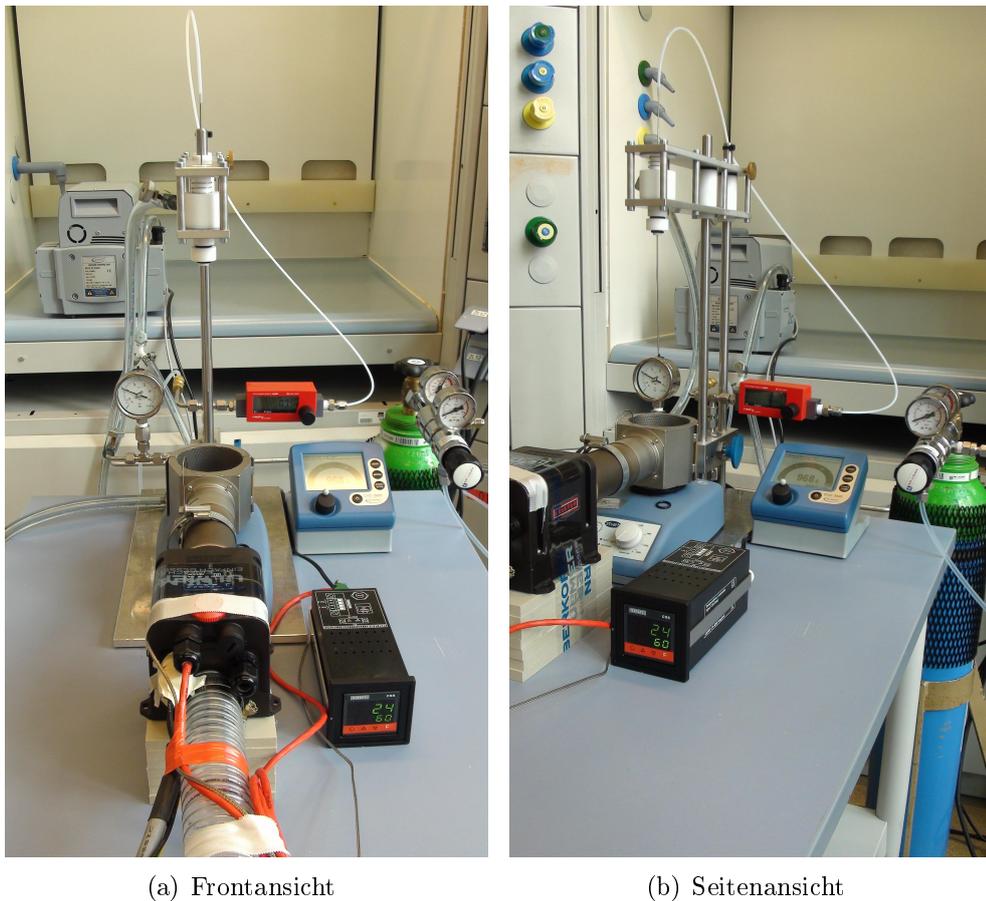


Abbildung 6.4: RSE Anordnung

6.3 Handhabung der RSE Apparatur

Es soll nun ein kurzer Abriss über die Handhabung und Funktionsweise der RSE-Apparatur gegeben werden.

6.3.1 Inbetriebnahme

Auf Grund der von der Vakuumpumpe abtransportierten Lösungsmitteldämpfe muss die Apparatur (oder aber zumindest die Pumpe) in einem

Abzug betrieben werden. Dieser wird zunächst aktiviert. Danach kann die Vakuumpumpe eingeschaltet, das Absperrventil der Gasflasche geöffnet und der Druckminderer auf den in Kapitel 6.2.2 erörterten Druck eingestellt werden. Der Durchflussmesser wird auf eine Durchflussrate von etwa 60 ml/min (entspricht 1 cc/s) eingestellt. Das Heißluftgebläse wird zusammen mit dem Temperaturregler aktiviert und der Klappreflektor zusammen mit dem Temperaturfühler über dem Rüttler positioniert.

6.3.2 Schritt 1

Im ersten Schritt wird das Pyrexbehältnis auf den deaktivierten Rüttler gesetzt und das Gehäuse samt Verteiler-Reagenzglas-Adapter abgesenkt bis der Flachdichtungsring am Adapter durch die Feder am Verteiler fest an den Pyrexglasrand gepresst wird. Danach aktiviert man den Rüttler.

6.3.3 Schritt 2

Nun kann wahlweise wie folgt vorgegangen werden:

1. Weg 1: Dies ist der vom Autor empfohlene Weg, da er mehr Kontrolle ermöglicht. Der 3-Wege-Hahn wird, wie in Abbildung 6.5 ersichtlich, auf Stellung 1 (vgl. Kapitel 6.2.3) gedreht. Anschließend hat man 2 Möglichkeiten zu verfahren:
 - (a) Variante 1: Der Regler der Vakuumpumpe wird auf einen, der angenommenen Temperatur des Dispersionsmittel-Lösungsmittel-Gemischs entsprechenden, Dampfdruck zwischen demjenigen der wässrigen Flüssigkeit und dem der organischen Lösung gestellt. Das automatische Abpumpen wird gestartet.
 - (b) Variante 2: Man startet das Abpumpen und regelt den zu erreichenden Enddruck langsam per Hand nach unten. Dies gibt dem Bediener maximale Kontrolle über die Geschehnisse und ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Arbeitsparameter dazu tendieren, starke Schaumbildung der Flüssigkeiten beim Verdampfen auszulösen.
2. Weg 2: Der 3-Wege-Hahn wird, wie in Abbildung 6.6 auf der linken Seite ersichtlich, auf Stellung 3 (vgl. Kapitel 6.2.3) gedreht sodass der Kugelhahn in alle Richtungen geschlossen ist. Nun wird der Regler der Vakuumpumpe auf einen, der angenommenen Temperatur des Dispersionsmittel-Lösungsmittel-Gemischs entsprechenden, Dampfdruck

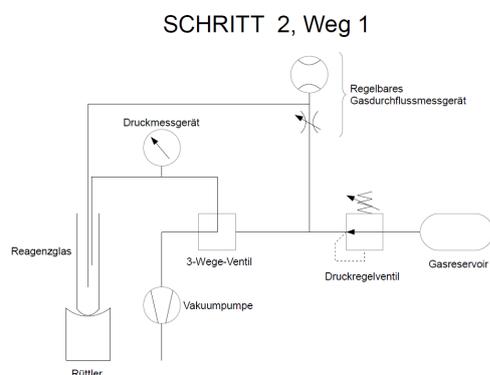


Abbildung 6.5: Probenherstellung mittels RSE-Apparatur, Schritt 2: Weg 1

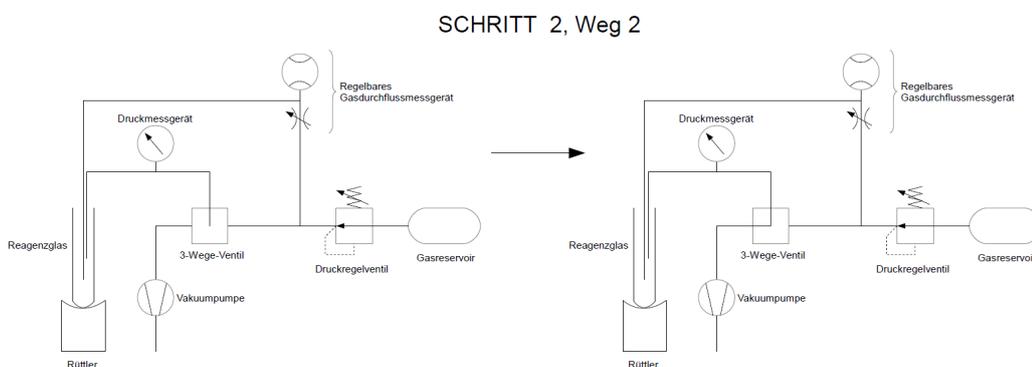


Abbildung 6.6: Probenherstellung mittels RSE-Apparatur, Schritt 2: Weg 2

zwischen demjenigen der wässrigen Flüssigkeit und dem der organischen Lösung gestellt. Man startet das automatische Abpumpen und wartet, bis der Sollenddruck erreicht ist. Sodann dreht man den Kugelhahn abrupt auf Stellung 1 (Abbildung 6.6 auf der rechten Seite), es kommt zu spontaner Unterdruckbildung, das Verdampfen des Lösungsmittels setzt instantan ein. Diese Vorgehensweise ist die von Buboltz in [55] beschriebene Methodik. Es kommt hierbei jedoch oftmals (insbesondere bei hohen Lipidkonzentrationen) zu starker Schaumbildung.

In jedem Falle ist bei Erreichen des Enddrucks bereits der Großteil des Lösungsmittels verdampft. Buboltz und Feigenson [54] sprechen im Falle von Dichlormethan als Lösungsmittel von mehr als 99,99 % Verdampfung innerhalb der ersten Sekunde mit der unter „Weg 2“ beschriebenen Präparationsmethode. Um Restbestände des Lösungsmittels zu entfernen, lässt man die Apparatur noch mindestens 20 bis 30 Sekunden nachlaufen.

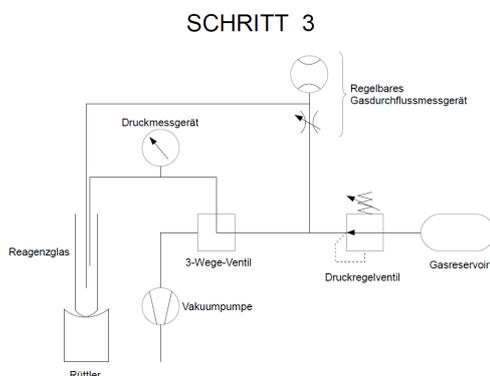


Abbildung 6.7: Probenherstellung mittels RSE-Apparatur, Schritt 3

6.3.4 Schritt 3

Nach vollendetem Verdampfen wird die Vakuumpumpe deaktiviert. Hernach kann, wie in Abbildung 6.7 skizziert, der Kugelhahn vorsichtig zum Gasreservoir hin geöffnet werden (Stellung 2, vgl. Kapitel 6.2.3). Das Gas füllt nun zügig das Reagenzglas. Es ist darauf zu achten, den raschen Druckanstieg am Druckmesser mitzuverfolgen und beim Erreichen des Atmosphärendrucks das Ventil wieder zu schließen. Nun kann das Gehäuse samt Verteiler-Reagenzglas-Adapter angehoben und das Reagenzglas entnommen werden.

Kapitel 7

Messungen und Analyse

Die RSE-Methode wird zunächst für das Lipid DPPC etabliert, um in einem nächsten Schritt das Verfahren auf andere gängige Lipidsysteme ausweiten zu können. Das Verhalten der Selbstassemblierung von DPPC wurde eingehend untersucht, um eine Möglichkeit zur Adaptierung der RSE-Methode in Hinblick auf die Herstellung von SPLVs bzw. MLVs mit geringer externer Oberfläche zu finden. Eine Überprüfung, ob es sich bei den hergestellten Vesikeln um MLVs oder SPLVs handelt, wurde auf Grund der Irrelevanz hinsichtlich der Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. In weiterer Folge wollen wir stellvertretend für beide möglichen Ausprägungen stets von MLVs sprechen.

In Kapitel 8 werden erste Messungen am Membranlipid DPPG diskutiert um festzustellen, ob sich die adaptierte, und an DPPC erprobte, RSE-Methode auch zur Herstellung von MLVs mit geladenen Lipidmolekülen eignet.

7.1 Methodik

7.1.1 Lipiddünnfilmhydratation

Um Referenzwerte für die RSE-Methode zur Verfügung stellen zu können, wurden zunächst anhand der etablierten Filmmethode DPPC Vesikel präpariert.

Dazu wurden folgende Schritte unternommen:

- Lösung von DPPC in polarer Flüssigkeit
- Verdampfung von polarem Lösungsmittel in einem auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmten Wasserbad mit Stickstoff umspült, sodass alles sichtbare Lösungsmittel verdampft

- Trocknung des Lipidfilms über Nacht in Vakuumtrockenschrank (bei Raumtemperatur)
- Hydratation des Lipidfilms mit NAPI-Puffer¹ (bei Raumtemperatur)
- Wahlweise Nachbearbeitung:
 - Inkubierung der Dispersion für 4 Stunden bei 50 °C (Sandbad in Wärmeschrank), wobei alle 30 Minuten für 2 bis 3 Minuten gevortext wird
 - Inkubierung der Dispersion für 30 Minuten bei 50 °C, währenddessen ständiges Rütteln
 - Inkubierung der Dispersion für 60 Minuten bei 50 °C, währenddessen ständiges Rütteln
 - Inkubierung der Dispersion für 120 Minuten bei 50 °C, währenddessen ständiges Rütteln

7.1.2 Rapid Solvent Exchange

Die Herstellung von DPPC Lipidvesikeln mittels der RSE-Anordnung erfolgte in folgenden Schritten:

- Lösung von DPPC in apolarer Flüssigkeit und anschließender Vermengung mit dem Dispersionsmittel
- Vorbehandlung wie in Kapitel 7.2.2.2 beschrieben
- Anwendung der RSE-Apparatur wie in Kapitel 6.3 beschrieben
- Nachbehandlung wie in Kapitel 7.2.2.2 beschrieben

7.1.3 DSC

Die DSC-Analyse erfolgte mittels

- Microcal (Northampton, USA) VP-DSC
- Softwarepaket Microcal LLC DSC, VPViewer2000

Um Verunreinigungen der Mess- und Referenzzelle durch etwaige Protein- bzw. Lipidreste zu vermeiden, wurden in einem ersten Schritt beide Zellen mit Pufferlösung gefüllt und das Ergebnis des Testlaufs kontrolliert. Für die eigentlichen Messungen wurden folgende Schritte durchgeführt:

¹20 mM Na-Phosphat-Puffer, 130 mM NaCl

Wichtige Parameter	Wert
Anzahl Scans	4
Postcycle Thermostat	20 °C
Starttemperatur	20 °C
Endtemperatur	50 °C
Scanrate	30 °C/h
Prescan Temperatur	30 min
Postscan Temperatur	1 min

Tabelle 7.1: Microcal-Parameter für DSC Messung von DPPC

Messpunkt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1	$L_{\beta'}$	25	30
2	$P_{\beta'}$	36	30
3	L_{α}	50	30

Tabelle 7.2: Messpunkte der SAXS/WAXS-Messungen für DPPC

- Befüllung der Messzelle mit DPPC Dispersion mit Konzentrationen von 1 mg/ml
- Einstellung der softwareseitigen Parameter gemäß Tabelle 7.1
- Auswertung des zweiten Heizdurchlaufs

7.1.4 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstrukturanalyse erfolgt mittels

- Hecus (Graz, Österreich) S3Micro Anlage
- Xenocs (Sassenage, Frankreich) Genix 3D Röntgengenerator
- Dectris (Baden, Schweiz) Pilatus Detektor

Es wurden SAXS-Daten der DPPC Proben mit einer Konzentration von 50 mg/ml sowie des reinen Dispersionsmittels aufgezeichnet, wobei Messpunkte und Messzeiten gemäß Tabelle 7.2 festgelegt wurden. Der Pilatus-Detektor speichert ein zweidimensionales Bild, wobei jeder Pixel an der Stelle $\mathbf{r} = (x, y)$ die Intensität der auftreffenden Strahlung registriert. Mit den Koordinaten des Primärstrahls, $\mathbf{r}_0 = (x_0, y_0)$ ist man alsdann in der Lage, die Relativkoordinaten $\Delta\mathbf{r} = (x, y)$ einzuführen, welche wiederum mit dem Streuvektor \mathbf{q} über die Relation $\mathbf{q} = c\Delta\mathbf{r}$ zusammenhängen.

Durch Messung eines Kalibrierungsstandards ist es möglich, c und \mathbf{r}_0 zu bestimmen und damit aus den Rohdaten der Probenmessung den Streuvektor \mathbf{q} zu berechnen. Da es sich bei den Proben um isotrope Vesikel handelt, bilden sich konzentrische Streustrukturen wie in Abbildung 5.6 gezeigt. Daher ist es naheliegend, eine Mittelung der Intensitäten durchzuführen. Dies geschieht durch Integration über alle Pixel mit demselben q -Wert ($|\mathbf{q}| = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$). Diese Berechnungen wurden unter Zuhilfenahme der Software Fit2D von Dr. Hammersley (Grenoble, France) durchgeführt.

Die so erhaltenen Rohdaten wurden mittels der Software Origin von Origin-Lab Corp. (Northampton, USA) ausgewertet.

7.1.5 Röntgenweitwinkelstreuung

Die Röntgenweitwinkelstrukturanalyse erfolgt mittels

- Hecus (Graz, Österreich) S3Micro Anlage
- Xenocs (Sassenage, Frankreich) Genix 3D Röntgengenerator
- Hecus (Graz, Österreich) PSD Detektor

Es wurden WAXS-Daten der DPPC Proben mit einer Konzentration von 50 mg/ml sowie des reinen Dispersionsmittels aufgezeichnet, wobei Messpunkte und Messzeiten gemäß Tabelle 7.2 festgelegt wurden.

Mittels des Programms „SWAXS Data Reduction 0.9.3“² erfolgte die q -Achsen-Kalibrierung sowie das Abziehen des Signaluntergrundes. Die so erhaltenen Daten wurden mittels Origin ausgewertet.

7.1.6 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die PCS-Analyse erfolgte mittels

- Malvern (Herrenberg, Deutschland) Zetasizer Nano
- Softwarepaket Zetasizer 7.02

7.1.7 Nanoparticle Tracking

Die NT-Analyse erfolgte mittels

- Nanosight (Amesbury, United Kingdom) NanoSight LM10
- Softwarepaket Nanosight NTA 2.3

²Programmierung: Georg Pabst

7.1.8 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie-Analyse erfolgte mittels

- Leica (Wien, Österreich) DMI6000B
- Leica Application Suite

7.2 DSC-Auswertungen

Im Folgenden sei eine Zusammenfassung der Messergebnisse ausgewählter Proben aus unterschiedlichen Versuchsreihen und Präparationen gegeben. Fehlgeschlagene Präparationen, wie sie bei der Etablierung neuer Methoden häufig auftreten, finden in dieser Zusammenstellung keine Erwähnung. Die Herstellungsparameter der Proben werden in entsprechenden Tabellen aufgelistet. T_m , $\Delta T_{1/2,m}$ sowie $\Delta H_{cal,m}$ bezeichnen dabei die Übergangstemperatur, die Halbwertsbreite und die kalorische Enthalpie des Hauptübergangs, T_p , $\Delta T_{1/2,p}$ sowie $\Delta H_{cal,p}$ die Charakteristika des Vorübergangs.³ Die anschließenden Abbildungen veranschaulichen die Messergebnisse der tabellarisch aufgeführten Präparationen.

Literaturreferenzwerte für Übergangstemperaturen sowie Enthalpien der Übergänge von multilamellaren DPPC Vesikeln werden in Kapitel 3.11 aufgelistet.

7.2.1 Herstellung von DPPC-Vesikeln mittels Lipiddünnsfilmhydratation

Zunächst wurden mehrere Abwandlungen der Filmmethode herangezogen, um Referenzproben (man vergleiche dazu auch Tabelle 3.1) für die Untersuchung mit DSC zu gewinnen. Probe F1 wurde nach der Rehydratation 4 Stunden lang bei 50 °C inkubiert und zu jeder halben Stunde zwei bis drei Minuten lang gevortext. Die Proben F2, F3 und F4 wurden nach der Rehydratation jeweils 30 Minuten, ein Stunde bzw. 2 Stunden bei 50 °C in einen Shaker gesetzt. Tabelle 7.3 listet die Herstellungsparameter auf, Abbildung 7.1 gibt die Auswertungen der DSC-Messungen wieder. Man erkennt die für DPPC typischen Vor- und Hauptübergänge. Sowohl Schmelztemperaturen als auch die Halbwertsbreiten der Übergänge entsprechen den Literaturdaten. Der Verlauf der Thermogrammkurve entspricht dem der Literaturdaten aus Abbildung 3.8 in Kapitel 3.

Außerdem konnte durch Vergleichsmessungen festgestellt werden, dass die zwei zur Verfügung stehenden, baugleichen DSC-Messanordnungen auf Grund

³Eine detaillierte Erörterung der Thematik erfolgt in Kapitel 5.4

Tabelle 7.3: Herstellungsparameter der Referenzproben F1 bis F4 (man vergleiche mit Literaturdaten aus Tabelle 3.1)

Probe	F1	F2	F3	F4
Präparationsmethode	Vortex	Shake 30 min	Shake 60 min	Shake 120 min
Ausgangskonz. [mg/ml]	50			
Lösungsmittel	Chloroform/Methanol			
Dispersionsmittel	NAPI			
Abbildung	7.1			
T_m [°C]	41,4	41,5	41,5	41,5
$\Delta T_{1/2,m}$ [°C]	0,13	0,14	0,13	0,15
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	10324	7674	10277	9765
T_p [°C]	35,4	35,4	35,6	35,4
$\Delta T_{1/2,p}$ [°C]	1,6	1,8	1,8	2,1
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1804	1344	1753	1648

NAPI ... 20 mM Na-Phosphat-Puffer, 130 mM NaCl

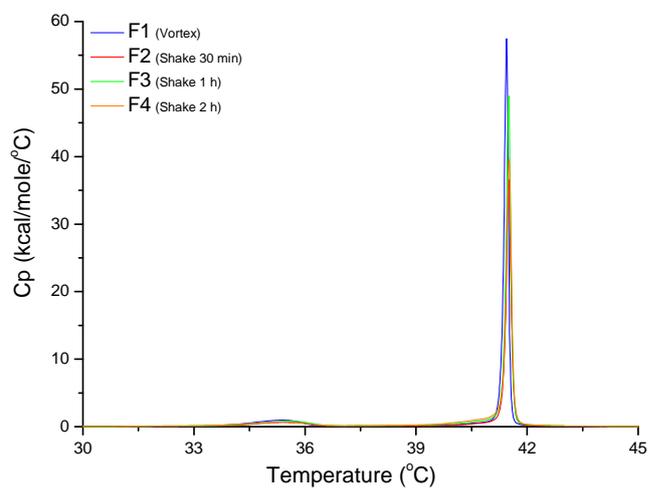


Abbildung 7.1: Herstellung von Referenzproben mittels Filmmethode

Tabelle 7.4: Herstellungsparameter der Proben F4 und F4a

Probe	F4	F4a
Messanordnung	I	II
Präparationsmethode	Shake 120 min	Shake 120 min
Ausgangskonz.	50	
Lösungsmittel	Chloroform/Methanol	
Dispersionsmittel	NAPI	
Abbildung		
$T_m [^{\circ}C]$	41,84	41,51
$\Delta T_{1/2,m} [^{\circ}C]$	0,16	0,15
$\Delta H_{cal,m} [cal/mol]$	10453	9765
$T_p [^{\circ}C]$	35,84	35,41
$\Delta T_{1/2,p} [^{\circ}C]$	2,10	2,10
$\Delta H_{cal,p} [cal/mol]$	2002	1648

unterschiedlicher Kalibrierung verschiedene Übergangstemperaturen ausgehen. Für den Hauptübergang liegt diese Messabweichung bei $\Delta T_m = 0,3^{\circ}C$. Die Vergleichsdaten werden in Tabelle 7.4 aufgelistet. Abbildung 7.2 stellt den Unterschied der Übergangstemperaturen graphisch dar. Den Temperaturunterschied gilt es zu beachten, wenn Inhalte von Thermogramm-Abbildungen der folgenden Kapitel verglichen werden. Innerhalb der einzelnen Abbildungen wurde darauf geachtet, stets Daten von ein und demselben DSC-Gerät zu verwenden.

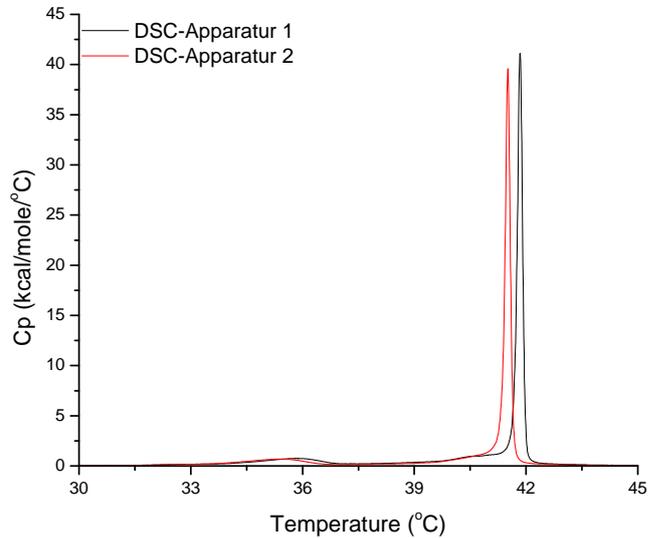


Abbildung 7.2: Darstellung der Kalibrierungsunterschiede der zur Verfügung stehenden DSC-Messanordnungen

7.2.2 Herstellung von DPPC-Vesikeln mittels RSE

7.2.2.1 Eingehende Bemerkungen

Das RSE-System wird durch grundlegende physikochemische Einflussfaktoren gesteuert. Dabei handelt es sich um

- Energieeinträge
 - Thermische Energie (v. a. Heißluftbeheizung, vgl. Kap. 7.2.2.2)
 - Mechanische Energie (v. a. Vortexer, vgl. Kap. 7.2.2.8)
- Geometrien und Oberflächen der Behausung (v. a. Beschaffenheit der Präparationsgefäße, vgl. Kap. 7.2.2.2)
- Anzahl und Verhältnis physikochemischer Systemkomponenten (v. a. Probenzusammensetzung, vgl. Kap. 7.2.2.3, 7.2.2.4, 7.2.2.5, 7.2.2.6)
- Zeitliche Faktoren
 - Dauer von Handlungsabläufen (v. a. Evakuierungsgeschwindigkeiten, vgl. Kap. 7.2.2.7)

Tabelle 7.5: Herstellungsparameter der Proben RSE A und RSE B

Probe	RSE A	RSE B
Evakuierung	auto	
Lösungsmittel (LM)	Chloroform/Methanol	
Dispersionsmittel (DM)	NAPI	
DM : LM	1:1	
Ausgangskonz. [mg/ml]	50	
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500	
Temperatur [$^{\circ}C$]	70	
Abbildung	7.3	
T_m [$^{\circ}C$]	41,8	41,8
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,13	0,15
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	6530	7060
T_p [$^{\circ}C$]	35,3	34,7
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	2,9	3,2
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1046	1442

NAPI ... 20 mM Napi, 130 mM NaCl; Konzentrationen wurden für alle weiteren RSE-Proben beibehalten

- Dem System aufgeprägte Frequenzen (v. a. Vortexfrequenz, vgl. Kap. 7.2.2.8)

Diese Faktoren werden in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet und in Bezug auf ihren Einfluss auf die Entstehung multilamellarer Vesikel experimentell untersucht.

7.2.2.2 Erste Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurden DPPC Vesikel nach der von Buboltz [55] beschriebenen Methode hergestellt. Auf Grund starker Schaumbildung bei den von uns eingesetzten hohen Lipidkonzentrationen wurde die Etablierung des Vakuums von uns, gemäß der Beschreibung in Kapitel 6.3.3 (Weg 1), abgewandelt. In den nachfolgenden Tabellen wird für das in Kapitel 6.3.3 beschriebene manuelle Steuern der Evakuierung die Bezeichnung „man“, für das automatische Abpumpen der Begriff „auto“ verwendet. Wird die klassische Vorgehensweise nach Buboltz, wie in Kapitel 6.3.3 (Weg 2) beschrieben, angewandt, so ist dies mit dem Vermerk „Ventil“ gekennzeichnet.

Tabelle 7.5 listet die Parameter der ersten Proben, die mittels oben beschriebener Adaptierung der RSE-Methode hergestellt wurden, auf.

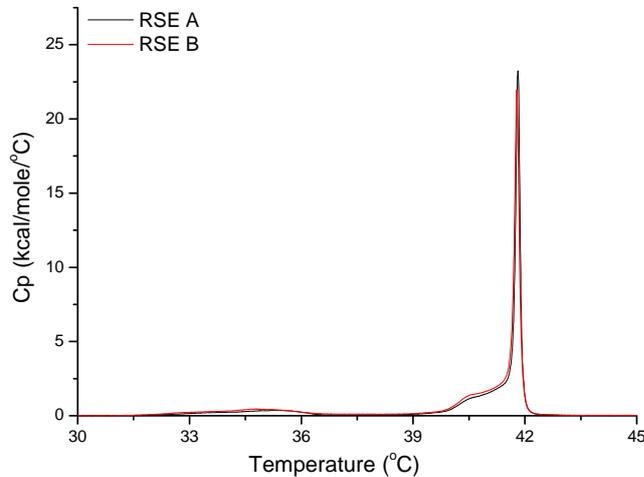


Abbildung 7.3: Erste Herstellung von DPPC-Vesikeln mittels RSE-Methode

Abbildung 3.8 in Kapitel 3 als auch Abbildung 7.1 zeigen Thermogramme, wie man sie sich von einem DPPC Lipidsystem bestehend aus MLVs in Dispersion zu erwarten hat. Wie Abbildung 7.3 erkennen lässt, ist diese Struktur bei den in Tabelle 7.5 angeführten Proben nicht in ausreichendem Maße gegeben. Man sieht einen stark verbreiterten Vorübergang und eine ausgeprägte Schulter vor dem Hauptübergang.

Es wird vermutet, dass die Schulter das Vorhandensein großer Mengen von SUVs in den hergestellten Proben zum Ausdruck bringt. Dies wird durch die Literaturangaben in [39], [74] und [70] untermauert. Die Hauptübergänge von SUVs bis 70 nm liegen, wie in Kapitel 5.4 ausführlich erörtert, abhängig von der Vesikelgröße deutlich versetzt vom Hauptübergang der MLVs. Die Minderung der Schulter im Laufe der mehrfachen Heiz- und Kühlvorgänge der DSC (Daten nicht gezeigt) könnte man als zunehmende Fusion und damit Größenzunahme der unilamellaren Vesikel deuten. Denn insbesondere Liposomen mit einem Durchmesser kleiner als 40 nm sind unterhalb ihres Schmelzübergangs instabil und tendieren zu Fusion.⁴ [74] Die Übergangstemperatur von Vesikeln mit Durchmessern um 20 nm liegt bei 37°C und steigt sukzessive bis zu einem Wert von 41,5°C - eben jener Wert der für MLV-Hauptübergänge gemessen wird - für Liposomendurchmesser von rund 70 nm an. Jenseits der 70 nm ist die Phasenübergangstemperatur unabhän-

⁴Lagert man beispielsweise DPPC SUVs bei niedrigen Temperaturen, etwa 4°C, 12 Tage lang, so fusionieren diese zu SUVs mit einer durchschnittlichen Größe von 70 nm. [81] [74]

gig von der Vesikelgröße. [74] Auf Grund der Größe und Multilamellarität der MLVs findet sich jedoch die überwiegende Anzahl von Lipidmolekülen in eben diesen Aggregationsformen wieder. Dies führt auch bei bedeutenden SUV- sowie LUV-Anteilen zu ausgeprägten MLV-Hauptübergängen. Da die Halbwertsbreite der Hauptübergänge gegenüber der Referenz nicht erhöht ist, kann man daraus schließen, dass sich nur eine geringe Anzahl an Lipidmolekülen innerhalb der LUV-Verbände befindet.

Die Vermessung der Probe A mittels Röntgenstreuung (vgl. Kap. 7.6) lieferte unauffällige Daten. Dies deutet ebenfalls auf das Vorhandensein multilamellarer Vesikel hin, lässt jedoch ohne eingehendere Untersuchungen keine weiteren Schlüsse zu.

Auch bei Variation des RSE-Prozesses in Hinblick auf Vor- und Nachbehandlung der Proben offenbarte sich dasselbe Phänomen (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der gleichbleibenden Ergebnisse im Hinblick auf unterschiedliche Vor- und Nachbereitungsmethoden wurde für den weiteren Versuchsreihenverlauf folgende Verfahrensweise festgesetzt:

- Vorbereitung
 - Manuelle Nachreinigung der Pyrex-Behältnisse mit Ethanol und bidestilliertem Wasser sowie Trocknung
 - Befüllen der 11 bzw. 20 ml Pyrex-Gläser mit Dispersionsmittel
 - Aufwärmen der 11 bzw. 20 ml Pyrex-Gläser im Ofen auf $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Aufwärmen der 5 ml Pyrex-Gläser zum Umfüllen auf $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Nachbereitung
 - Umfüllen der hergestellten Proben in die vorgewärmten 5 ml Pyrex-Gläser
 - 1 Stunde Nachwärmen der umgefüllten Proben im Ofen bei $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Lagerung der Proben bei Raumtemperatur um etwaiges Fusionieren von SUVs zu minimieren

Bei hohen Konzentrationen wie die hier verwendeten 50 mg/ml entstehen zähflüssige Dispersionen. Diese haben die unangenehme Eigenschaft, dass sie beim Anlegen des Unterdrucks schlagartig große Mengen an Schaum ausbilden, die sich an den Gefäßwänden absetzen. Der so entstandene Satz an den Glaswänden der verwendeten Pyrexgefäße ist im Allgemeinen - und wenn überhaupt - nur mit großem Aufwand wieder der Bulk-Lösung zuzuführen. Dies führt zu teils großen Lipidverlusten und verhindert exakte Aussagen

hinsichtlich der verbliebenen Lipidkonzentrationen in Dispersion. Zum Behufe der Vermeidung von Schaumbildung und Wasserverlust wurden folgende Vorgehensweisen zur Methodenoptimierung in Erwägung gezogen:

1. Die Temperatur sollte auf 55 bis 65 °C abgesenkt werden. Damit wurde der thermische Energiebeitrag für alle nachfolgenden Experimente festgelegt.
2. Man verwendet Gefäße mit größerem Volumen und Durchmesser, um eine etwaige Schaumbildung zu unterdrücken oder aber zumindest zu verhindern, dass der entstandene Schaum bis in die RSE-Apparatur vordringt. Die 11 ml Pyrex-Glasgefäße wurden im weiteren Verlauf der Versuche gegen 20 ml Pyrex-Glasgefäße ausgetauscht. Damit wurden Geometrie und Oberflächenbeschaffenheit der Probenbehaltung für alle nachfolgenden Experimente festgelegt.
3. Man strebt niedrigere Lipidkonzentration an, um Schaumbildung zu unterdrücken und die Viskosität der Dispersion zu verringern. Davon wird jedoch, wie in den weiteren Kapiteln näher erörtert, auf Grund der vorliegenden Messergebnisse wieder Abstand genommen.

7.2.2.3 Lösungsmittelaustausch

Um den Einfluss der Lösungsmittelwahl auf das Präparationsergebnis zu studieren, wurde als Substitut zur herkömmlichen Lösungsmittelwahl (Chloroform/Methanol Mischung im Verhältnis 9:1) Dichlormethan ausgewählt. Die Herstellungsparameter der Vergleichsproben sind in Tabelle 7.6 aufgelistet. Wie Abbildung 7.4 erkennen lässt, hat die Wahl des Lösungsmittels offenbar keine erkennbare Auswirkung auf die Schulter vor dem Hauptübergang der RSE-Präparationen. Die Proben RSE A, C und D liefern ein sehr ähnliches Übergangsprofil. Auf Grund starker Schaumentwicklung blieb bei den Proben A und B ein Teil des Lipids an der Glasoberfläche haften, was an den verringerten Enthalpiewerten zu erkennen ist. Die Probe C wurde durch Ausheizen von Dichlormethan vor dem Anlegen des Vakuums hergestellt. Das langsame Ausdampfen des Lösungsmittels führt offenbar zu einer stark ausgeprägten Schulter vor dem Hauptübergang. Der Grund dafür mag sein, dass durch den langsamen Prozess des Erwärms zu wenig Lipid gleichzeitig in das Dispersionsmedium abgegeben wird um große, multilamellare Vesikel bilden zu können, sodass die Bildung von SUVs begünstigt wird. Somit liegt der Schluss nahe, dass das Lösungsmittel nicht der Auslöser der ungewöhnlichen Thermogrammausprägungen, sprich der dem Hauptübergang vorgelagerten Schulter, ist.

Tabelle 7.6: Herstellungsparameter der Proben RSE A bis D

Probe	RSE A	RSE B	RSE C	RSE D
Evakuierung	auto		man	auto
Lösungsmittel (LM)	C/M		DCM	
Dispersionsmittel (DM)	NAPI			
DM : LM	1:1			
Ausgangskonz. [mg/ml]	50			
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500			
Temperatur [$^{\circ}C$]	65			
Abbildung	7.1			
T_m [$^{\circ}C$]	41,8	41,8	41,7	41,8
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,13	0,15	0,14	0,12
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	6530	7060	15916	10708
T_p [$^{\circ}C$]	35,3	34,7	35,6	35,7
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	2,9	3,2	4,1	1,5
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1046	1442	2156	1462

C/M ... Chloroform/Methanol

DCM ... Dichlormethan

auto ... automatisch

man ... manuell

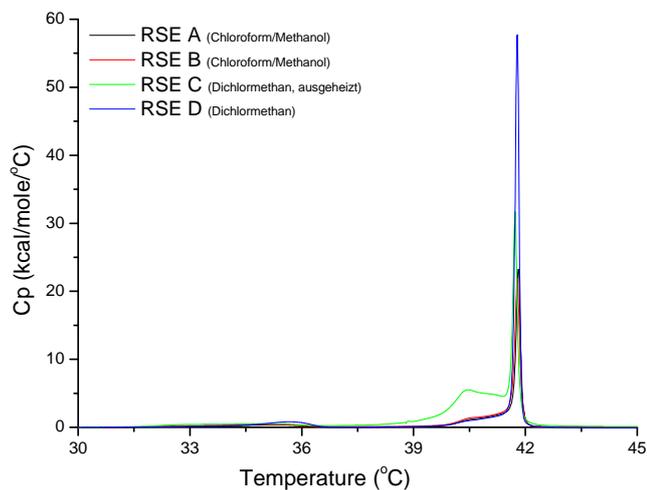


Abbildung 7.4: Vesikelpräparationen wahlweise mit Chloroform/Methanol-Mischung und Dichlormethan

7.2.2.4 Dispersionsmitteltausch

Der Einfluss des Dispersionsmittels auf das Präparationsergebnis wurde durch Austausch von NAPI-Puffer gegen bidestilliertes Wasser überprüft. Tabelle 7.7 listet die Herstellungsparameter der mit NAPI-Puffer präparierten Proben, Tabelle 7.8 die der Proben mit bidestilliertem Wasser als Dispersionsmittel.

Mit der Veränderung des Dispersionsmittels geht eine deutliche Veränderung der Thermogramme einher, wie aus den Abbildungen 7.5 sowie 7.6 klar ersichtlich wird. Die Napi-Puffer-Proben A, B und D weisen die bereits in Kapitel 7.2.2.2 besprochene Schulter vor dem Hauptübergang auf, wohingegen die Vesikel in bidestilliertem Wasser durchwegs der Referenz entsprechende Thermogramme liefern. Der Grund für das unterschiedliche Verhalten der RSE-Methode bei unterschiedlichen Dispersionsmitteln mag folgender Tatsache geschuldet sein: Das Vortexen der Probe lässt an der Glaswand einen dünnen Flüssigkeitsfilm hochsteigen. Durch Temperaturgradienten zwischen Flüssigkeit und Glasoberfläche sowie Unebenheiten der Gefäßinnenwand kommt es zu Mikroturbulenzen. [82] Diese Mikroturbulenzen nehmen Einfluss auf die Struktur der entstehenden Lipidvesikel. Die Anzahl der vorliegenden Mikroturbulenzen steht in engem Zusammenhang mit der Anzahl der chemischen Systemkomponenten, der Geometrie und Oberflächenbeschaffenheit des Präparationsgefäßes, dem thermischen bzw. mechanischen Energieeintrag sowie der dem System aufgeprägten Frequenz. Die Präparationen mit bidestilliertem Wasser verfügen über eine geringe Anzahl von Systemkomponenten (bidestilliertes Wasser, Lösungsmittel und Lipid) wodurch sich weniger Mikroturbulenzen bilden und die Entstehung großer, multilamellarer Vesikel begünstigt wird. Mit der Verwendung von NAPI-Puffer werden der wässrigen Phase Natrium-, Phosphor- und Chlorionen beigefügt. Dies führt zu einem Anstieg der Mikroturbulenzen und somit zu einer häufigeren Bildung von Lipidvesikeln mit geringerer Lipidmasse.

Die Probe C wurde, wie schon erwähnt, durch Ausheizen von Dichlormethan vor dem Anlegen des Vakuums hergestellt. Das langsame Ausdampfen des Lösungsmittels in Verbindung mit hohen Vortexgeschwindigkeiten führt zu einer stark ausgeprägten Schulter vor dem Hauptübergang. Die Proben E und F wurden mit einer geringeren Lipidkonzentration von 1 mg/ml präpariert. Die deutlichen Kurvenverlaufsunterschiede von E und F im Vergleich zu A, B und D lassen darauf schließen, dass eine hohe Initialkonzentration für die Präparation von RSE Proben von Vorteil sein kann (dasselbe lässt sich auch für die Proben I und J aus Kapitel 7.2.2.6, deren Halbwertsbreiten deutlich erhöht sind, feststellen). Auf die Auswirkungen der unterschiedlichen Lipidausgangskonzentrationen wird in Kapitel 7.2.2.5 näher eingegangen.

Tabelle 7.7: Herstellungsparameter der Proben RSE A bis F

Probe	RSE A	RSE B	RSE C	RSE D	RSE E	RSE F
Evakuierung	auto	auto	man	auto	man	
Lösungsmittel (LM)	C/M		DCM			
Dispersionsmittel (DM)	NAPI					
DM : LM	1:1					
Ausgangskonz. [mg/ml]	50				10	1
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500					
Temperatur [$^{\circ}C$]	65					
Abbildung	7.5					
T_m [$^{\circ}C$]	41,8	41,8	41,7	41,8	41,8	41,4
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,13	0,15	0,14	0,12	0,16	0,33
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	6530	7060	15916	10708	9511	10835
T_p [$^{\circ}C$]	35,3	34,7	35,3	35,7	32,7	31,5
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	2,9	3,2	4,1	1,5	4,6	4,1
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1046	1442	2156	1462	1202	824

Tabelle 7.8: Herstellungsparameter der Proben RSE G bis L

Probe	RSE G	RSE H	RSE I	RSE J	RSE K	RSE L
Evakuierung	auto	man	auto			man
Lösungsmittel (LM)	DCM		C/M		DCM	
Dispersionsmittel (DM)	H_2O_{bidest}					
DM : LM	1:1					
Ausgangskonz. [mg/ml]	50		10		50	
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500					
Temperatur [$^{\circ}C$]	70		55	65		
Abbildung	7.6					
T_m [$^{\circ}C$]	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,14	0,16	0,20	0,22	0,16	0,14
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	9427	8757	9638	6225	9553	6885
T_p [$^{\circ}C$]	35,6	35,4	34,9	35,1	35,5	35,5
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	1,6	1,4	1,4	1,5	1,5	1,3
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1533	897	1024	885	1641	985

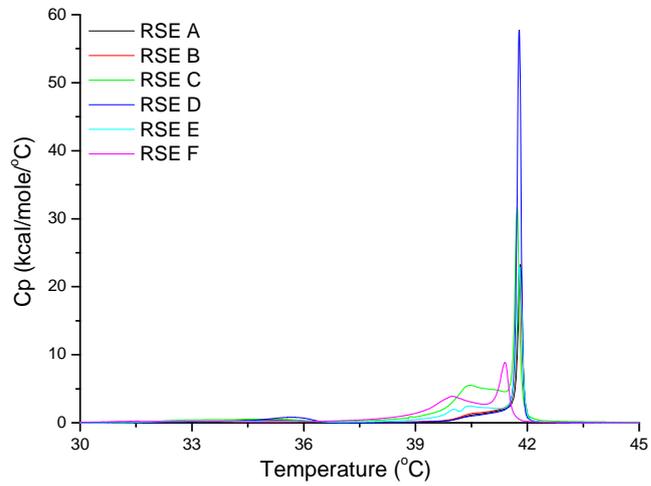


Abbildung 7.5: RSE-Präparationen mit Napi-Puffer als Dispersionsmittel

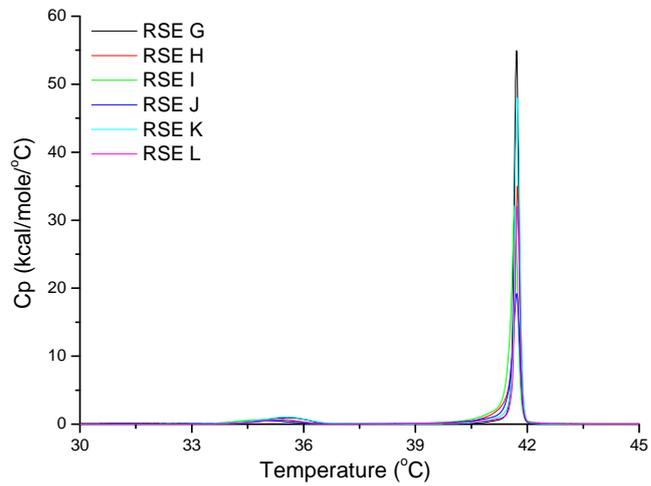


Abbildung 7.6: RSE-Präparationen mit bidestilliertem Wasser als Dispersionsmittel

7.2.2.5 Unterschiedliche Lipidausgangskonzentrationen

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen für die Präparation von Lipidvesikeln zu untersuchen, wurden für Dispersionen mit NAPI-Puffer die Proben A, B, D mit 50 mg/ml den Proben E und F mit jeweils 10 mg/ml bzw. 1 mg/ml Lipidausgangskonzentration gegenübergestellt. Die Herstellungsparameter wurden in Tabelle 7.9 zusammengefasst. Abbildung 7.7 bildet die Ergebnisse ab.

Die Thermogramme der Proben E und F mit niedrigen Ausgangskonzentrationen zeigen ausgeprägtere Schultern vor dem Hauptübergang als jene der Proben A, B und D mit Konzentrationen von 50 mg/ml. Dies deutet darauf hin, dass die Konzentration der Lipide in Lösung im Moment des Übergangs zur Dispersion möglichst hoch sein sollte. Die Probe F hat offenbar so wenig Lipidteilchen innerhalb einzelner, emulgierter Lösungskügelchen, dass eine Bildung von nennenswerten Mengen multilamellarer Vesikel nicht mehr möglich ist. Die Halbwertsbreiten des Hauptübergangs der Proben E und F sind vergrößert, die Übergangstemperaturen des Vorübergangs sind, im Vergleich zu den Proben A, B und C, zu niedrigeren Temperaturen hin verschoben.

Im Hinblick auf Dispersionen in bidestilliertem Wasser wurden die Proben I und J mit Ausgangskonzentrationen von 10 mg/ml und die Proben G, H, K und L mit Konzentrationen von 50 mg/ml zur näheren Untersuchung herangezogen. Tabelle 7.10 beinhaltet die Herstellungsparameter der Proben, Abbildung 7.8 zeigt die Resultate der Probenauswertung. Wie schon bei den Proben E und F sind auch bei I und J die Halbwertsbreiten der Hauptübergänge vergrößert, die Übergangstemperaturen der Vorübergänge sind, im Vergleich zu den Proben G, H, K und L zu niedrigeren Temperaturen hin verschoben.

Die bereits in Kapitel 7.2.2.4 erörterte unterschiedliche Anzahl von Mikroturbulenzen in den Systemen mit NAPI-Puffer bzw. bidestilliertem Wasser bewirkt, dass die Lösungsmitteltröpfchen im bidestillierten Wasser so groß bleiben, dass auch bei niedrigeren Konzentrationen von 10 mg/ml noch genügend Lipidmasse zur Bildung von überwiegend großen, multilamellaren Vesikeln vorhanden ist. Im Vergleich zu Probe E ist bei den Proben I und J keine auffällige Schulterbildung sichtbar.

Das Dispersionsmittel konnte als ein grundlegender Einflussfaktor auf die Schulter vor dem Hauptübergang im Thermogramm von DPPC identifiziert werden. Da NAPI-Puffer physiologisch relevanter ist als bidestilliertes Wasser, folgen weitere Untersuchungen mit NAPI-Puffer in Hinblick auf Einflussfaktoren des Übergangsprofils.

Tabelle 7.9: Herstellungsparameter der Proben RSE A bis F

Probe	RSE F	RSE E	RSE A	RSE B	RSE D
Evakuierung	man	man	auto	man	auto
Lösungsmittel (LM)	DCM		C/M	DCM	
Dispersionsmittel (DM)	NAPI				
DM : LM	1:1				
Ausgangskonz. [mg/ml]	1	10	50		
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500				
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	65				
Abbildung	7.7				
T_m [$^{\circ}\text{C}$]	41,4	41,8	41,8	41,8	41,8
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}\text{C}$]	0,33	0,16	0,13	0,15	0,12
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	10835	9511	6530	7060	10708
T_p [$^{\circ}\text{C}$]	31,5	32,7	35,3	34,7	35,7
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}\text{C}$]	4,1	4,6	2,9	3,2	1,5
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	824	1202	1046	1442	1462

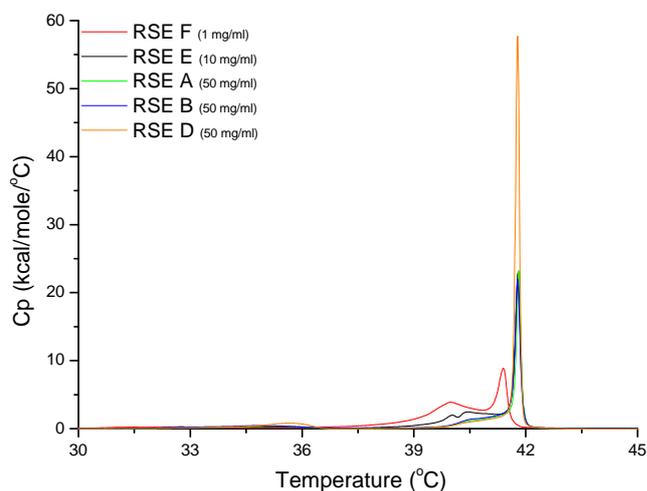


Abbildung 7.7: Unterschiedliche Lipidausgangskonzentrationen mit NAPI-Puffer als Dispersionsmittel

Tabelle 7.10: Herstellungsparameter der Proben I, J, G, H, K, L

Probe	RSE I	RSE J	RSE G	RSE H	RSE K	RSE L
Evakuierung	auto	auto	auto	man	auto	man
Lösungsmittel (LM)	C/M		DCM			
Dispersionsmittel (DM)	H_2O_{bidest}					
DM : LM	1:1					
Ausgangskonz. [mg/ml]	10		50			
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500					
Temperatur [$^{\circ}C$]	55	65	70		65	
Abbildung	7.10					
T_m [$^{\circ}C$]	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7	41,7
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,20	0,22	0,14	0,16	0,16	0,14
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	9638	6225	9427	8757	9553	6885
T_p [$^{\circ}C$]	34,9	35,0	35,6	35,4	35,5	35,5
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	1,4	1,47	1,6	1,4	1,5	1,3
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1024	885	1533	897	1641	985

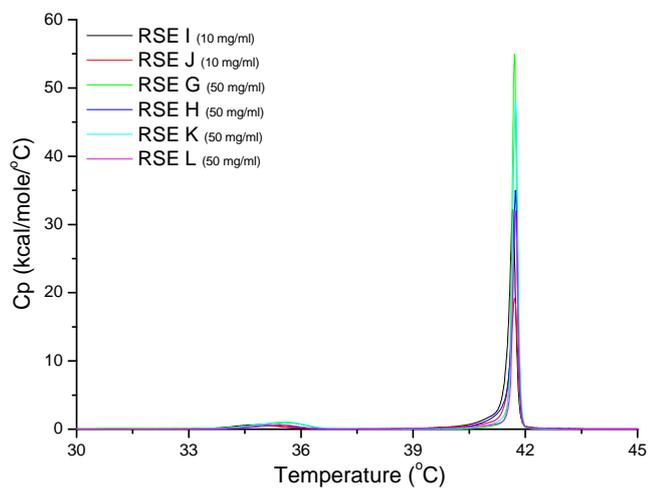


Abbildung 7.8: Unterschiedliche Lipidausgangskonzentrationen mit H_2O_{bidest} als Dispersionsmittel

7.2.2.6 Verhältnis Dispersions- zu Lösungsmittel

Ergänzend zu den in Kapitel 7.2.2.5 erörterten unterschiedlichen Lipidausgangskonzentrationen soll hier das Verhältnis von Dispersions- zu Lösungsmittel bei hohen Ausgangskonzentrationen untersucht werden.

Die erste Vergleichsserie, deren Daten in Tabelle 7.11 gelistet sind, wurde mit NAPI-Puffer präpariert. Abbildung 7.9 stellt die gesammelten Resultate graphisch dar. Die Proben A, B und D mit Flüssigkeitsverhältnis 1:1 dienen als Referenz. Die Probe Q mit dem Flüssigkeitsverhältnis 20:1 besitzt die wohldefinierte, erwartete Übergangstemperatur von $41,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Probe N, welche sich von Q lediglich in Hinblick auf die Geschwindigkeit der Evakuierung unterscheidet, weist eine leichte Verschiebung der Hauptübergangstemperaturen zu niedrigeren Werten auf. Dies geht Hand in Hand mit einer Verbreiterung der Übergangskurve. Die Proben O und P, mit einem Flüssigkeitsverhältnis von 30:1, zeigen deutliche Verschiebungen der Hauptübergangstemperaturen zu niedrigeren Werten sowie eine zunehmende Verbreiterung der Übergangskurven. Wiederum ist die Geschwindigkeit der Evakuierung als entscheidender Einflussfaktor erkennbar. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist der Umstand der Übergangstemperaturverschiebung der zunehmenden Entstehung von SUVs geschuldet. Die abnehmende Kooperativität der Lipidmoleküle in UVs sorgt darüber hinaus für das Zerfließen der, im Falle von MLVs, scharfen Übergangskurven. Im Hinblick auf die Evakuierungsgeschwindigkeit lässt sich feststellen, dass zu schnelles Anlegen des Vakuums (Ventilöffnung) der Bildung großer, multilamellarer Vesikel abträglich erscheint. Dies mag auf den Umstand zurückzuführen sein, dass im Moment der Verdampfung starke mechanische Kräfte auf die sich im Begriff der Bildung von Vesikeln befindlichen Lipidmoleküle wirken. Diese Kräfte treiben die durch die hohen Scherkräfte der Vortexbewegung (und die damit entstehenden Mikroturbulenzen (vgl. Kapitel 7.2.2.4)) einerseits und die hohe Verdünnung andererseits bereits stark dispergierten Lipidlösungskügelchen zusätzlich auseinander und führen zu einem nochmaligen absinken der lokalen Lipidkonzentrationen und -mengen.

Die Methode der Ventilöffnung konnte für die Proben N, M und P angewandt werden, da die feine Dispersion von Lösungsmittel bei Mischungsverhältnissen von 20:1 und 30:1 dafür sorgen, dass Schaumbildung weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Die Probe M muss auf Grund der speziellen Präparationsumstände gesondert betrachtet werden. Der Vortexer setzte während des Evakuierungsvorganges der Probe M kurzzeitig seine Tätigkeit aus. Der dadurch resultierende Abfall der auf die Flüssigkeit einwirkenden Scherkräfte führte zu einer deutlich geringeren Bildung von Mikrofluktuationen und somit höheren punktuellen

Tabelle 7.11: Herstellungsparameter der Proben RSE M bis Q

Probe	RSE M	RSE P	RSE O	RSE N	RSE Q	RSE A	RSE B	RSE D
Evakuierung	Ventil		auto	Ventil	auto			
Lösungsm. (LM)	DCM	C/M			DCM	C/M		DCM
Dispersionsm. (DM)	NAPI							
DM : LM	30:1			20:1		1:1		
Ausgangskonz. [mg/ml]	30:1			20:1		50		
Vortexgeschw. [UPM]	2500							
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	65					70		
Abbildung	7.9							
T_m [$^{\circ}\text{C}$]	41,6	40,5	41,3	41,6	41,8	41,8	41,8	41,8
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}\text{C}$]	0,31	1,34	0,26	0,16	0,14	0,13	0,15	0,12
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	10298	10308	11796	10765	10842	6530	7060	10708
T_p [$^{\circ}\text{C}$]	35,0	35,1	34,1	34,2	35,5	35,3	34,7	35,7
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}\text{C}$]	2,3	0,9	4,5	3,1	2,5	2,9	3,2	1,5
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1418	993	1672	551	1853	1046	1442	1462

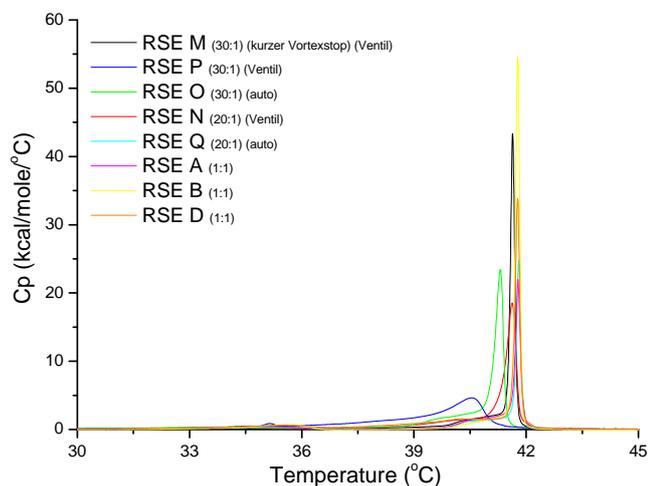


Abbildung 7.9: Veränderung des Verhältnisses von Lösungsmittel zu NAPI-Puffer als Dispersionsmittel

Tabelle 7.12: Herstellungsparameter der Proben R, S, G, H, K, L

Probe	RSE S	RSE R	RSE G	RSE H	RSE K	RSE L
Evakuierung	auto	auto	auto	man	auto	man
Lösungsmittel (LM)	C/M		DCM			
Dispersionsmittel (DM)	H_2O_{bidest}					
DM : LM	50:1	30:1	1:1			
Ausgangskonz. [mg/ml]	50	30	50			
Vortexgeschw. [UPM]	2500					
Temperatur [$^{\circ}C$]	65		70		65	
Abbildung	7.10					
T_m [$^{\circ}C$]	41,2	41,5	41,7	41,7	41,7	41,7
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	1,08	0,59	0,14	0,16	0,16	0,14
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	7142	9995	9427	8757	9553	6885
T_p [$^{\circ}C$]	31,2	33,3	35,6	35,4	35,5	35,5
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	3,54	5,4	1,6	1,4	1,5	1,3
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	481	1178	1533	897	1641	985

Lipidmengen. Dieser Umstand fördert die Bildung von größeren, multilamellaren Vesikeln. Die Tatsache, dass trotz der Anwendung der für MLV-Entstehung unvorteilhaften Methode der Ventilöffnung die Messergebnisse auf größere Mengen an multilamellaren Vesikeln hindeuten macht deutlich, wie entscheidend die Vortexgeschwindigkeit für die RSE-Präparation von DPPC zu sein scheint. Dieser Umstand wird in Kapitel 7.2.2.8 näher beleuchtet.

Zusammenfassend kann für NAPI-Puffer in Hinblick auf unterschiedliche Verhältnisse zwischen Dispersions- und Lösungsmittel gesagt werden, dass sich hohe Mischungsverhältnisse, das bedeutet niedrige Endkonzentrationen, negativ auf die Präparationsresultate auswirken. Es kommt bei den Proben N bis Q zu Verschiebungen und Verbreiterungen der Hauptübergänge.

Die Daten der zweiten Vergleichsserie, welche mit bidestilliertem Wasser präpariert wurde, sind in Tabelle 7.12 angeführt. Abbildung 7.10 stellt die Ergebnisse der DSC-Auswertungen gegenüber.

Die Proben G, H, K und L, mit einem Flüssigkeitsverhältnis von 1:1, bereits in Kapitel 7.2.2.4 besprochen, dienen als Referenz. Die Proben R und S mit Flüssigkeitsverhältnissen von 30:1 bzw. 50:1 verhalten sich ähnlich wie die vorhin besprochenen, verdünnten NAPI-Puffer-Proben. Die vermehrte Bildung von LUVs und SUVs führt zur Verschiebung von Haupt- sowie Vorübergangstemperaturen und Vergrößerung der Haupt- sowie Vorübergangshalbwertsbreiten. Der Umstand, dass die Verschiebung der Übergangstemperaturen bei destilliertem Wasser geringer ausfällt als bei NAPI-Puffer mag auf

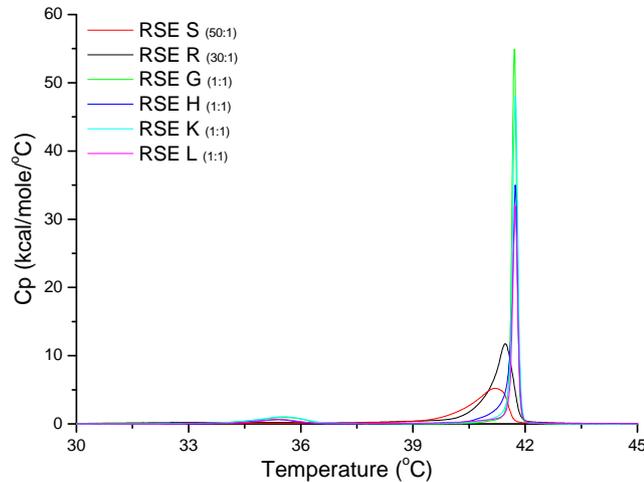


Abbildung 7.10: Veränderung des Verhältnisses von Lösungsmittel zu H_2O_{bidest} als Dispersionsmittel

die Tatsache zurückzuführen sein, dass der NAPI-Puffer, wie schon erörtert, mehr Mikrofluktuationen hervorruft.

7.2.2.7 Evakuierungsgeschwindigkeit

Unterschiedliche Evakuierungsgeschwindigkeiten wurden für Dispersionen in NAPI-Puffer anhand der Proben A bis D, für Dispersionen in bidestilliertem Wasser mittels der Proben G, K, H und L näher betrachtet. Die Herstellungsparameter sind in den Tabellen 7.13 und 7.14 vermerkt.

Im Zusammenhang mit NAPI-Puffer zeigt langsames Evakuieren der Probe C deutliche Spuren in Form einer ausgeprägten Schulter vor dem Hauptübergang, was in Abbildung 7.11 klar ersichtlich wird. Dies lässt auf die vermehrte Bildung von SUVs mit breitgestreuter Größenverteilung schließen, da eine Erhöhung der Halbwertsbreite des Hauptübergangs nicht stattfindet. Die erhöhte Enthalpie ist dem Umstand geschuldet, dass bei langsamem Evakuierungsprozess deutlich mehr Dispersionsflüssigkeit verlorengeht als bei abruptem Abpumpen. Wie bereits in Kapitel 7.2.2.4 erörtert, bedingt NAPI-Puffer eine Erhöhung der Anzahl von Mikroturbulenzen. Die geringe Evakuierungsgeschwindigkeit sorgt nun zusätzlich dafür, dass nur wenig Lipid zum gleichen Zeitpunkt die polare Lösungsmittelphase verlässt und im Dispersionsmittel zur Bildung von Vesikeln übergeht. Auf Grund der geringen reaktiven Lipidmasse kommt es seltener zur Formung von LUVs bzw. MLVs. Die Proben

Tabelle 7.13: Herstellungsparameter der Proben RSE A bis D

Probe	RSE A	RSE B	RSE D	RSE C
Evakuierung	auto	auto	auto	man
Lösungsmittel (LM)	C/M		DCM	
Dispersionsmittel (DM)	NAPI			
DM : LM	1:1			
Ausgangskonz. [mg/ml]	50			
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500			
Temperatur [$^{\circ}C$]	65			
Abbildung	7.11			
T_m [$^{\circ}C$]	41,8	41,8	41,8	41,7
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,13	0,15	0,12	0,14
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	6530	7060	10708	15916
T_p [$^{\circ}C$]	35,3	34,7	35,7	35,6
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	2,9	3,2	1,5	4,1
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1046	1442	1462	2156

Tabelle 7.14: Herstellungsparameter der Proben RSE G, K, H, L

Probe	RSE G	RSE K	RSE H	RSE L
Evakuierung	auto	auto	man	man
Lösungsmittel (LM)	DCM			
Dispersionsmittel (DM)	H_2O_{bidest}			
DM : LM	1:1			
Ausgangskonz. [mg/ml]	50			
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	2500			
Temperatur [$^{\circ}C$]	70	65	70	65
Abbildung	7.12			
T_m [$^{\circ}C$]	41,7	41,7	41,7	41,7
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}C$]	0,14	0,16	0,16	0,14
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	9427	9553	8757	6885
T_p [$^{\circ}C$]	35,6	35,5	35,4	35,5
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}C$]	1,6	1,5	1,4	1,3
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1533	1641	897	985

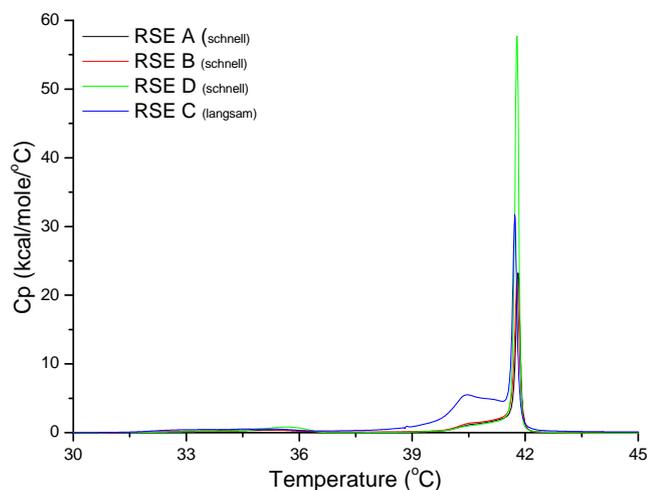


Abbildung 7.11: Unterschiedliche Evakuierungsgeschwindigkeiten von Proben mit NAPI-Puffer als Dispersionsmittel

A, B und D zeigen die, bereits in Kapitel 7.2.2.2 und 7.2.2.3 erörterte Schulter vor dem Hauptübergang.

Zieht man Wasser als Dispersionsmittel heran, so bedingt die geringere Anzahl an Mikroturbulenzen die Bildung größerer Lipidansammlungen. Der Effekt langsamer Evakuierung beschränkt sich hier lediglich auf eine leichte Verbreiterung der Basis des Hauptübergangspeaks bei Probe H. Da die Halbwertsbreite des Übergangs keine nennenswerte Veränderung aufweist, kann man davon ausgehen, dass auch hier keine LUVs entstehen, lediglich SUVs bis knapp unter 70 nm. Die Vergleichsdaten werden in Abbildung 7.12 gegenübergestellt.

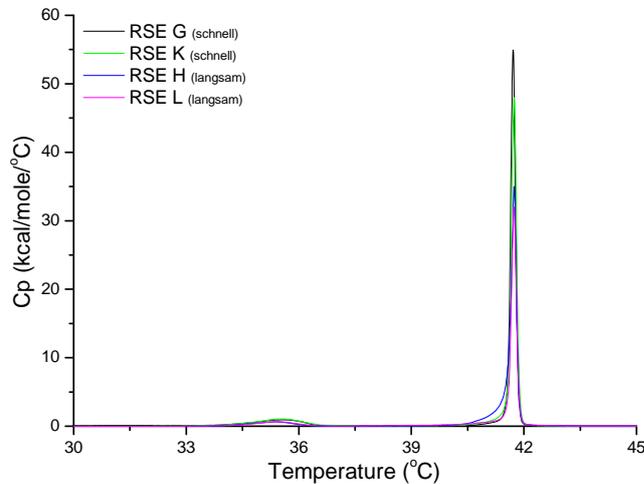


Abbildung 7.12: Unterschiedliche Evakuierungsgeschwindigkeiten von Proben mit H_2O_{bidest} als Dispersionsmittel

7.2.2.8 Verringerte Vortexgeschwindigkeit

Wie bereits in Kapitel 7.2.2.6 erwähnt, spielt die Vortexgeschwindigkeit beim Präparationsprozess mit der RSE-Apparatur eine entscheidende Rolle. Die Proben T bis X wurden mit verminderter Vortexgeschwindigkeit von 600 UPM präpariert. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 7.15 zu finden. Auf Grund der Erfahrungswerte mit vorhergegangenen Experimenten, wonach MLVs mit bidestilliertem Wasser deutlich leichter herzustellen sind, konnte von einer Wiederholung der Experimente mit hochreinem Wasser abgesehen werden. Wir wollen nun dem Gedankengang aus Kapitel 7.2.2.4 folgen, und zum Modell der Mikroturbulenzen zurückkehren. Wie bereits bemerkt wurde, ist die Vortexgeschwindigkeit einer der Hauptparameter im Hinblick auf die Entstehung der Mikroturbulenzen. Mit ihr wird einerseits die dem System aufgeprägte Frequenz sowie der mechanische Energieeintrag gesteuert. Die verminderte Vortexgeschwindigkeit führt dazu, dass die Flüssigkeit im Pyrexbehältnis nicht mehr als ein dünner Film entlang der Glasoberfläche hochsteigt, sondern lediglich einen stark ausgeprägten Konus am Boden des Präparationsgefäßes bildet. Dies führt zu geringen Scher- und Reibungskräften, die Anzahl der Mikroturbulenzen bleibt ebenfalls gering. Trotz der vielen Systemkomponenten des NAPI-Puffers reicht diese Maßnahmen aus, um fast ausschließlich (vgl. Kap. 7.3) große, multilamellare Vesikel entstehen zu lassen.

Es kommt jedoch beim Evakuieren deutlich schneller zu unerwünschten Schaumbildungen. Um dies zu vermeiden wurde der Unterdruck manuell allmählich aufgebaut. Dabei wurde die Flüssigkeit stets beobachtet und bei Anzeichen von Blasenbildung der Unterdruck kurz stabil gehalten bzw. ein wenig abgebaut. Dadurch ergaben sich Abpumpzeiten von 3 bis 4 Minuten. Auch die Auswirkungen längerer Evakuierungszeiten (vgl. Kap. 7.2.2.7) werden offenbar durch niedrige Vortexgeschwindigkeiten kompensiert. Der Umstand, dass durch langsames Evakuieren nur wenig Lipid gleichzeitig in die wässrige Phase übertritt scheint durch die geringe Anzahl der durch das langsame Vortexen bedingten Mikroturbulenzen mehr als aufgewogen zu werden.

Die Proben T, U, V und X wurden nach der Präparation gemäß beschriebenen Standardprozedere behandelt. Probe W wurde evakuiert, bis das Dispersionsmittel vollständig verdampft war. Danach erfolgte eine Rehydratation und anschließende Bearbeitung laut Standardprotokoll.

Die Ergebnisse, wie sie in Tabelle 7.15 und Abbildung 7.13 aufgeführt sind, zeigen, dass die RSE-Methode mit abgesenkter Vortexgeschwindigkeit gut reproduzierbare Daten liefert. Die Übergangstemperaturen entsprechen der Referenz, die Halbwertsbreiten liegen deutlich unter denen der Referenzproben (vergleiche dazu Tabelle 7.3). Auch höhere Mischungsverhältnisse von Dispersions- und Lösungsmittel tun der Stabilität der Ergebnisse keinen Abbruch. Die Enthalpiewerte unterliegen ähnlichen Schwankungen wie jene der Referenzproben. Grund dafür dürfte der Heizprozess im Zusammenspiel mit nicht exakt festlegbaren Evakuierungszeiten und damit variierendem Dispersionsmittelverlust durch Verdampfen sein.

Die Vortexgeschwindigkeit, und somit die dem System aufgeprägte Frequenz wie auch zugleich der mechanische Energieeintrag, lässt sich also, neben der Anzahl der Systemkomponenten (vgl. Kapitel 7.2.2.4), als zweiter großer Einflussfaktor in Hinblick auf den Kurvenverlauf der Thermogramme (insbesondere die Schulter vor dem Hauptübergang) identifizieren.

Tabelle 7.15: Herstellungsparameter der Proben RSE T bis X (man vergleiche Referenzdaten aus Tabelle 7.3 und Literaturdaten aus Tabelle 3.1)

Probe	RSE T	RSE U	RSE V	RSE W	RSE X
Evakuierung	man				
Lösungsmittel (LM)	C/M				
Dispersionsmittel (DM)	NAPI				
DM : LM	10:1				1:1
Ausgangskonz. [mg/ml]	50				
DM-Volumen [μ l]	500				400
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	600				
Temperatur [$^{\circ}$ C]	65				
Abbildung	7.13				
T_m [$^{\circ}$ C]	41,5	41,5	41,5	41,5	41,4
$\Delta T_{1/2,m}$ [$^{\circ}$ C]	0,10	0,11	0,11	0,11	0,12
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	9414	7968	10901	10162	8923
T_p [$^{\circ}$ C]	35,4	35,5	35,4	35,4	35,3
$\Delta T_{1/2,p}$ [$^{\circ}$ C]	1,45	1,43	1,6	1,6	1,6
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1545	1293	1875	1878	1390

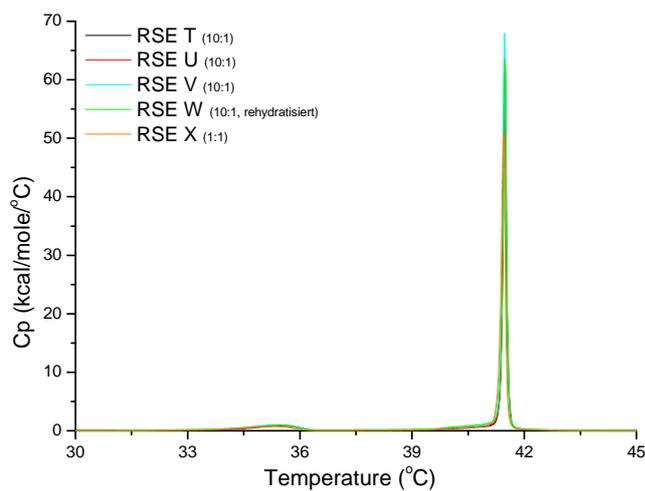


Abbildung 7.13: Verringerte Vortexgeschwindigkeit

7.3 PCS-Auswertungen

Die Auswertung einiger ausgewählter Proben mittels PCS lieferte Ergebnisse, welche lediglich einer qualitativen Bewertung zugrunde gelegt werden können, da die Messapparatur nicht für die Messung polydisperser Proben mit einem Polydispersitätsindex größer 0,7 ausgelegt ist.

Die Referenzproben F1 bis F4 zeigen heterogene Größenverteilungen mit einer großen Population im Bereich von 500 bis 1500 nm. Die DSC-Auswertungen liefern unauffällige, publizierten Thermogrammverläufen entsprechende, Resultate.

Die Proben A bis S, welche mit voller Vortexgeschwindigkeit präpariert wurden, zeigen eine heterogene Größenverteilungen mit Populationsschwerpunkten im Bereich von 30 bis wenigen hundert Nanometern und im Bereich um 1000 nm. Die Heterogenität der Vesikelgrößen kommt in den DSC-Auswertungen durch unterschiedliche Übergangstemperaturen sowie Halbwertsbreiten zum Ausdruck. Schon wenige Prozent an großen, multilamellaren Vesikeln reichen jedoch aus, um unauffällige SAXS und WAXS-Daten zu erhalten (siehe Kapitel 7.6 und 7.7).

Für die Proben T bis X, welche mit gedrosselter Vortexgeschwindigkeit hergestellt wurden, zeigt sich ein deutlicheres Bild. Es entstehen Vesikel mit Größenordnungen im Bereich zwischen ein und fünf μm . Kleinere Vesikel waren mit dieser Methode nicht nachweisbar. Die DSC-Auswertungen sowie SAXS-Ergebnisse und Aufnahmen der Polarisationsmikroskopie entsprechen den Literaturdaten.

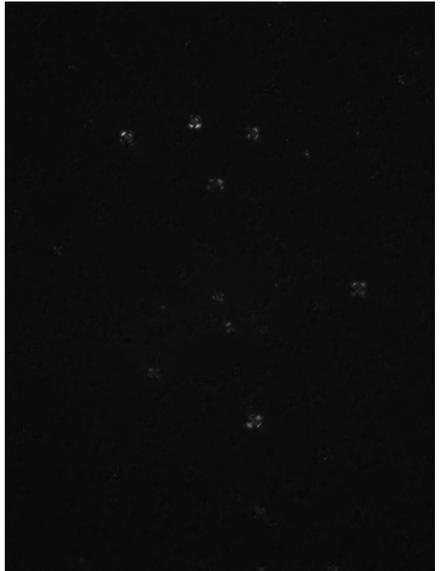
7.4 NTA-Auswertungen

Zur Überprüfung der PCS-Daten wurden einige Proben von A bis S zusätzlich mittels NTA vermessen. Die NTA-Ergebnisse bestätigen die PCS-Daten in Hinblick auf die angegebenen Größenordnungen der Lipidvesikelgrößenverteilung. Es ist jedoch zu bedenken, dass NTA lediglich Aussagen im Bereich von 10 bis etwa 800 nm treffen kann.

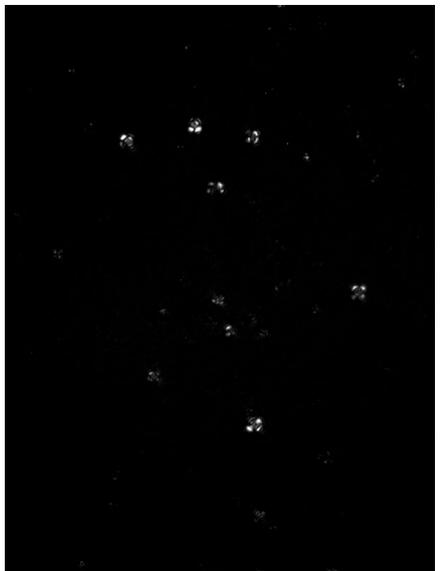
7.5 Polarisationsmikroskopie-Auswertungen

Zur optischen Überprüfung der Herstellung multilamellarer Vesikel wurden die Proben aus der Serie A bis S und Proben aus der Serie T bis X mittels Polarisationsmikroskopie untersucht. Vergleicht man mit NAPI präparierte Proben aus den beiden Serien, so bemerkt man, dass die Proben T bis X deutlich mehr MLVs in sich bergen.

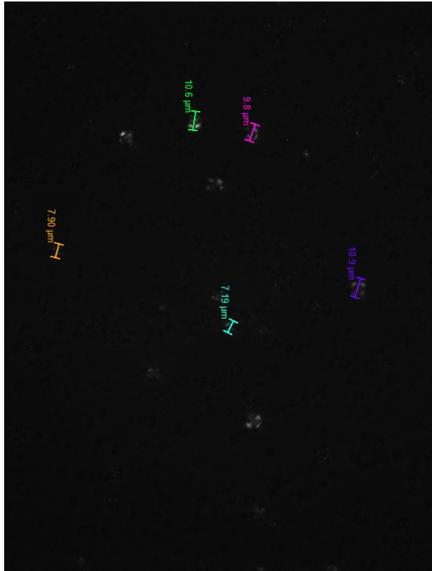
Im polarisierten Licht erscheinen die multilamellaren Vesikel, wie schon in Kapitel 5.7 erwähnt, als Malteserkreuze. Beispielhaft stellt Abbildung 7.14 eine Polarisationsmikroskopieaufnahmen der Probe X mit einer Konzentration von 1 mg/ml dar. Abbildung 7.14(a) zeigt die Originalaufnahme einer untersuchten MLV-Probe, Abbildung 7.14(b) verstärkt den Kontrast, Abbildung 7.14(c) demonstriert die Größenverhältnisse mehrerer multilamellarer Vesikel und Abbildung 7.14(d) präsentiert die Probe im Normalfeld.



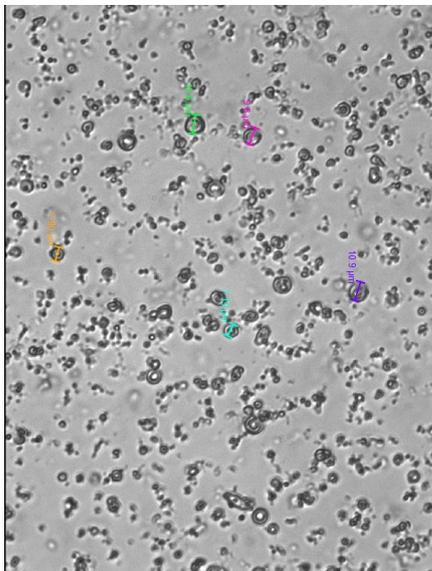
(a) Originalaufnahme



(b) Erhöhter Kontrast



(c) Größenangaben einiger MLVs



(d) Aufnahme Normalfeld

Abbildung 7.14: Polarisationsmikroskopieaufnahmen der Probe X

7.6 SAXS-Auswertungen

Anhand der Kleinwinkelstreuung können mesoskopische Details von multilamellaren Vesikeln wie die eindimensionale Doppelschichtwiederholdistanz untersucht werden.

7.6.1 Gel- und Fluidphase

Abbildung 7.15 zeigt die Wiederholdistanz $d_{(100)}$ der Lipiddoppelschichten für die Gel- und Flüssigphase.

Diese ist experimentell zugänglich und wurde für die Gel- und Flüssigphase von DPPC-Vesikeln der Proben RSE A, K, L und X bei 25°C vermessen. Die Beugungsintensitäten sind in Abbildung 7.16 zusammengefasst. Man erkennt sehr deutlich die Beugungsmaxima der unterschiedlichen periodischen Lipidvesikelstrukturen. Die wesentlichen Maxima wurden mit Millerindizes versehen um eine sofortige Zuordnung zu den einzelnen Gitterstrukturen zu ermöglichen. Bei näherer Betrachtung der Beugungsintensitäten fällt der variierende diffuse Untergrund der einzelnen Probenmessungen auf. Dies ist, wie in Kapitel 5.2.2.3 näher erörtert wurde, auf positionell unkorrelierte Schichten, hervorgerufen durch unilamellare Vesikel oder unterschiedliche Defekte in Lipidaggregatsystemen, zurückzuführen. So zeigt sich beispielsweise bei Probe A in der Flüssigphase ein deutlich erhöhter Untergrund. Dies korreliert gut mit den ausgewerteten DSC-Daten (Kapitel 7.2.2.2), welche besagen, dass die Probe große Mengen an unilamellaren Vesikeln enthielt. Auch fiel das Signal in der Rippelphase für Probe A deutlich schwächer aus.

Über die Relation

$$d = \frac{2\pi h}{q} \quad (7.1)$$

d ... Abstand im Ortsraum

h ... Index des Brechungspeaks

q ... Streuachse im Fourierraum

lässt sich aus Abbildung 7.16 die Doppelschichtwiederholdistanz $d_{(100)}$ für die Gel- und Flüssigphase berechnen. In Tabelle 7.16 sind die $d_{(100)}$ -Werte vermerkt. Sun et al. [83] geben für die Gelphase, vermessen bei 25°C , einen $d_{(100)}$ -Wert von 6,38 nm an. Nagle und Tristram-Nagle [84] stellen Vergleichsdaten für Messungen der Gelphase bei 20°C und der Fluidphase bei 50°C zur Verfügung. Die Doppelschichtwiederholdistanz beträgt demnach für $L_{\beta'}$ 6,35 Nanometer, für L_{α} 6,70 Nanometer.

Weiters ist in Abbildung 7.15 A_l , die Fläche pro Lipidmolekül in der Ebene parallel zur Doppelschicht, die Fläche pro Kohlenwasserstoffkette des Lipids

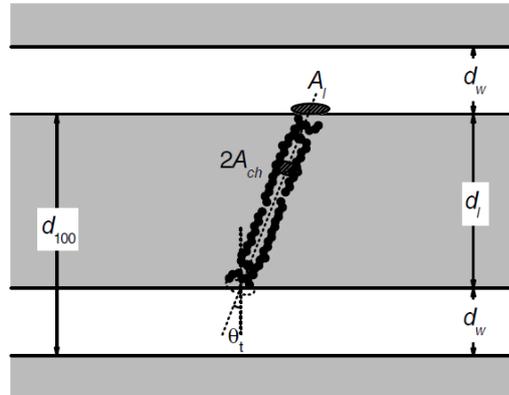


Abbildung 7.15: Charakteristische Größenangaben in Bezug auf Lamellen multilamellarer Vesikel in der Gel- und Flüssigphase [22]

$d_{(100)}$... Eindimensionale Doppelschichtwiederholdistanz

d_l ... Doppelschichtdicke

d_w ... Dicke der interlamellaren Wasserschichten

A_l ... Fläche pro Lipidmolekül in der Ebene parallel zur Doppelschicht

A_{ch} ... Fläche pro Kohlenwasserstoffkette des Lipids in der Ebene senkrecht zu den Ketten

θ_t ... Neigungswinkel der Kohlenwasserstoffketten in der Gelphase

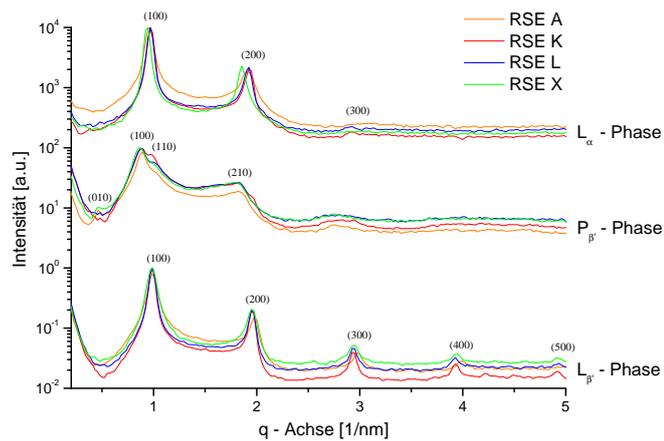


Abbildung 7.16: SAXS Auswertungen der Proben A, K, L und X

Tabelle 7.16: Doppelschichtwiederholdistanz für die Gel- und Flüssigphase von RSE K, L, X und A gemessen bei 25 °C und bei 50 °C

Phase	$d_{A, (100)}$ [nm]	$d_{K, (100)}$ [nm]	$d_{L, (100)}$ [nm]	$d_{X, (100)}$ [nm]
Gelphase ($L_{\beta'}$)	$6,33 \pm 0,02$	$6,38 \pm 0,06$	$6,35 \pm 0,14$	$6,40 \pm 0,03$
Flüssigphase (L_{α})	$6,56 \pm 0,03$	$6,51 \pm 0,05$	$6,48 \pm 0,04$	$6,74 \pm 0,04$

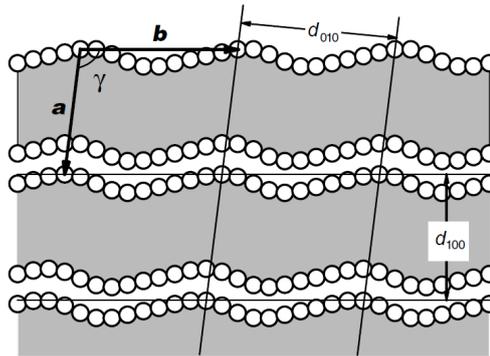


Abbildung 7.17: Charakteristische Größenangaben in Bezug auf Lamellen multilamellarer Vesikel in der Rippelphase [22]

γ ... Winkel

\mathbf{a}, \mathbf{b} ... Vektoren der Einheitszelle

$d_{(010)}$... Rippelwiederholperiode

$d_{(100)}$... Doppelschichtwiederholdistanz

in der Ebene senkrecht zu den Ketten, A_{ch} , und der Winkel θ_t der Kohlenwasserstoffketten in der Gelphase sowie die Doppelschichtdicke d_l und die Dicke der Wasserschicht d_w verzeichnet.

Die Doppelschichtdicke lässt sich anhand der Elektronendichte der Doppelschicht bestimmen. Dies geschieht in Kapitel 7.6.3.

7.6.2 Rippelphase

Die Rippelphase wurde für die Proben A, K, L und X bei 36 °C vermessen, das Röntgenstreubild ist in Abbildung 7.16 dargestellt. Abbildung 7.17 skizziert die ondulierenden Lamellen der Rippelphase mit der Distanz der Rippelwiederholperiode $d_{(010)}$ und der Doppelschichtwiederholdistanz $d_{(100)}$. Die Werte für $d_{(010)}$ sowie $d_{(100)}$ wurden für die Proben A und X berechnet und sind in Tabelle 7.17 vermerkt.⁵ Wack und Webb führen in ihrer Ar-

⁵Daten für die Proben K und L wurden nicht ausgewertet, da die Amplitude des $d_{(010)}$ -Peaks zu schwach ist.

Tabelle 7.17: Rippelwiederholperiode $d_{(010)}$ und Doppelschichtwiederholdistanz $d_{(100)}$ für die Rippelphase von RSE A und X

Phase	$d_{A, (100)}$ [nm]	$d_{A, (010)}$ [nm]	$d_{X, (100)}$ [nm]	$d_{X, (010)}$ [nm]
Rippelphase ($P_{\beta'}$)	7,12	13,58	7,33	13,81

beit [85] für DPPC-Vesikel, bei 39°C und einer Wassersättigung der Lamellen von $c_w=0,332$, eine Doppelschichtwiederholdistanz $d_{(100)}$ von 6,88 nm an. Es wurden keine Werte für die Rippelwiederholperiode $d_{(010)}$ angegeben, der ermittelte Betrag des Vektors \mathbf{b} der Einheitszelle jedoch liegt bei 14,19 nm. Die Achsen der Einheitszellen sind über die Relationen

$$a = \frac{d_{(100)}}{\sin(\gamma)} \quad (7.2)$$

und

$$b = \frac{d_{(010)}}{\sin(\gamma)} \quad (7.3)$$

mit den Messdaten verbunden. [22]

7.6.3 Berechnung des Elektronendichteprofiles einer Lipiddoppelschicht in der Gelphase

Die Berechnung des Elektronendichteprofiles einer Lipiddoppelschicht erfolgt, wie in Kapitel 5.2.2 ausführlich erörtert, mittels der Gleichung

$$\rho(z) = \sum_{h=1}^{h_{max}} \pm F_h \cos\left(\frac{2\pi h z}{d}\right). \quad (7.4)$$

ρ ... Elektronendichte

\pm ... Phase, muss für jeden Summanden separat angepasst werden

F_h ... Formfaktor des h-ten Brechungspeaks

z ... Ort entlang Lamellenquerschnitt

Abbildung 7.18 zeigt im unteren Diagramm die errechnete Elektronendichte für die Probe RSE X bei 25°C . Vergleicht man das Resultat mit jenem von All-Atom Force-Field Molekulardynamiksimulationen von Jämbeck und Lyubartsev [48], wie sie im oberen Diagramm von Abbildung 7.18 durch die schwarze Linie dargestellt sind, so bemerkt man jedoch deutliche Abweichungen. Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, dass für die Berechnung über Gleichung 7.4 nur die ersten 5 Ordnungen der Brechungspeaks der

Gelphase herangezogen werden konnten und ein manueller Fit, wie er hier angewandt wurde, nicht die Genauigkeit softwareseitiger Auswertungen der Röntgendaten aufweisen kann. Die MD-Simulation erlaubt nicht nur exaktere Vorhersagen, sondern auch eine Aufgliederung der Elektronendichtebeiträge der einzelnen Molekülbestandteile. Diese Beiträge sind im Diagramm unter der Gesamtelektronendichte farblich ausgeführt. Das Kalottenmodell der Lipiddoppelschicht in Abbildung 7.18 bildet den mittels MD-Simulation errechneten Elektronendichtequerschnitt maßstabsgerecht ab. Die Kohlenwasserstoffketten sind in grau dargestellt, die Glycerol/Carbonylgruppen in rot, Phosphatgruppen in cyan und Cholingruppen in blau gehalten. Die Wassermoleküle linker und rechter Hand der Lipiddoppelschicht bestehen aus weißen und blauen Formen.

Der Abstand der Maxima der Elektronendichte, dort wo sich die Kopfgruppen der Lipide befinden, kann zur Berechnung der Doppelschichtdicke d_l herangezogen werden. Dies ist nur eine von mehreren möglichen Definitionen von d_l . Eine so definierte Doppelschichtdicke wird in der Literatur als d_{HH} angeführt. Die Doppelschichtdicke d_l der Probe X beträgt bei $25^\circ C$

$$d_l = d_{HH} = 4,17 \text{ nm}.$$

Sun et al. [83] geben für die Membrandicke d_{HH} von DPPC in der Gelphase, gemessen bei $25^\circ C$, einen Wert von 4,28 nm an. Andererseits erhalten Jämbek und Lyubartsev [48] aus ihren Simulationen für d_l bei $30^\circ C$ Werte um 3,77 nm.

Aus den Daten zur Lipiddoppelschichtdicke lässt sich über die Relation

$$d_w = d_{(100)} - d_l \tag{7.5}$$

auch die Dicke der Gelphasenwasserschichten berechnen. [22]

7.7 WAXS-Auswertungen

Auswertungen von WAXS-Messungen werden oftmals herangezogen, um die Daten aus vorausgegangenen SAXS-Analysen zu bestätigen bzw. zu untermauern. Die Proben A, K, L und X wurden auf Grund dessen auch einer WAXS-Vermessung unterzogen.

Im Röntgenstreubild der Abbildung 7.19 erkennt man in der Gelphase einen dafür charakteristischen Doppelpack. Die dicht aneinandergereihte schmale und breite Schulter ist typisch für ein verzerrt hexagonales Gitter, wie es die Kohlenwasserstoffketten in der Gelphase bilden. Man vergleiche dazu die linke Seite der Abbildung 7.20. Die Rippelphase bildet hexagonal angeordnete

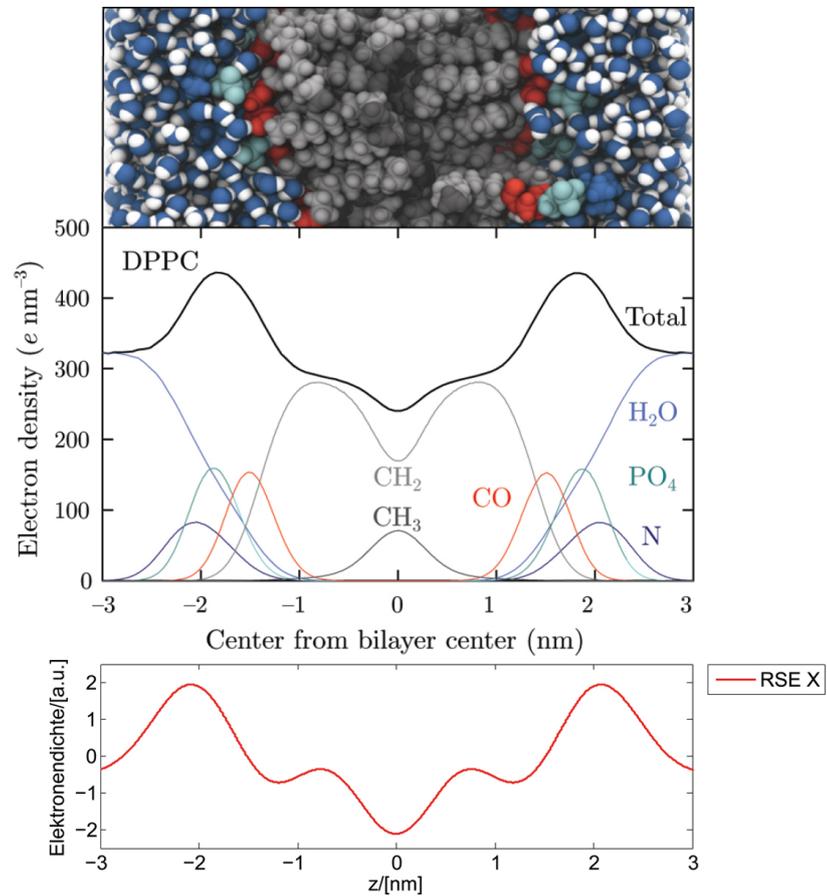


Abbildung 7.18: Von oben nach unten:

1. Kalottenmodell einer DPPC-Doppelschicht: Cholingruppen in blau, Phosphatgruppen in cyan, Glycerol/Carbonylgruppe in rot, Kohlenwasserstoffketten in grau, Wassermoleküle in Weiß/Blau [48]
2. All-Atom Force-Field Molekularsimulation der Elektronendichte einer DPPC-Doppelschicht, farbig die Beiträge der einzelnen Molekülbestandteile, schwarz die Gesamtelektronendichte [48]
3. Mittels Formel 7.4 berechnete Elektronendichte der DPPC-Doppelschicht der Probe RSE X

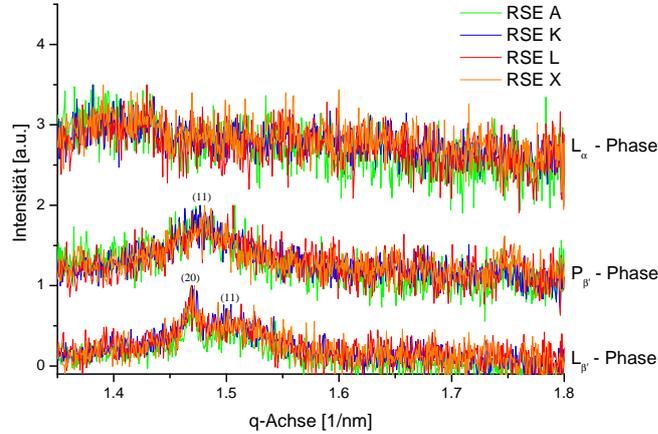


Abbildung 7.19: WAXS Auswertungen der Proben A, K, L und X

Kohlenwasserstoffketten aus, wodurch die Symmetrie erhöht wird und nur noch eine Schulter hervortritt. Dieser Umstand wird in Abbildung 7.20 auf der rechten Seite dargestellt.

7.7.1 Berechnung der Lipidfläche

Die Fläche pro Lipidmolekül in der Ebene parallel zur Doppelschicht (siehe Abbildung 7.15), A_l , soll für die Probe X berechnet werden.

Gemäß [86, 87] lässt sich die Fläche pro Lipidkette A_{ch} , welche senkrecht zur Kettenachse steht (man vergleiche dazu Abbildung 7.15), berechnen durch die Formel

$$A_{ch} = \frac{4\pi^2}{\sqrt{q_{20}^2 q_{11}^2 - \frac{q_{20}^4}{4}}}. \quad (7.6)$$

Die Werte für q_{20} sowie q_{11} können den in Abbildung 7.19 gezeigten WAXS-Daten entnommen werden. Für die Probe X ergibt sich eine Kettenfläche von

$$A_{ch} = 20,5 \text{ \AA}^2.$$

Sun et al. [83] liefern als Vergleichswert $20,2 \text{ \AA}^2$. Nach [83] gilt für die Doppelschichtdicke

$$d_{HH} = 2Nd_m \cos\theta_t + 2d_H. \quad (7.7)$$

N ... Länge der Kohlenwasserstoffketten, hier $N=16$ für DPPC

d_m ... auf die Kettenachse projizierter Abstand zwischen angrenzenden Methylgruppen, nach [83] $d_m = 1,27 \text{ \AA}^2$

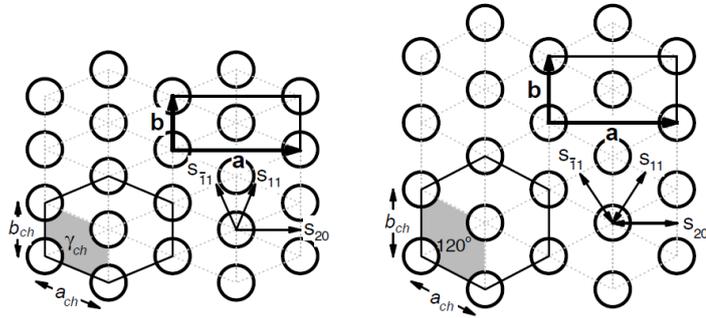


Abbildung 7.20: Gitteranordnung der Lipidketten; links: verzerrt hexagonales Gitter einer Gelphase, rechts: hexagonales Gitter einer Rippelphase [22] $a_{ch}, b_{ch}, \gamma_{ch} \dots$ Vektoren und Winkel der primitiven Einheitszelle (grau hinterlegt) im realen Raum

$s_{hk} \dots$ Vektoren der Reflexionen im reziproken Raum mit Indizes h und k
 $a, b \dots$ Vektoren der rechteckigen Einheitszelle im realen Raum

$d_H \dots$ Kopfgruppendicke, nach [83] $d_H = 4,12 \text{ \AA}^2$

Aus obiger Gleichung lässt sich der Winkel θ_t gewinnen, für den im Falle der Probe X gilt

$$\theta_t = 34,6^\circ.$$

Die Literatur [83] gibt einen Wert von $31,6^\circ$ für θ_t an. Der größere errechnete Winkel ist auf die unterschiedlichen Größenangaben von d_{HH} zurückzuführen. Die Fläche pro Lipidmolekül in der Ebene parallel zur Doppelschicht (siehe Abbildung 7.15), A_l , kann nun nach [83] berechnet werden durch

$$A_l = \frac{2A_{ch}}{\cos\theta_t} \quad (7.8)$$

Die Probe X liefert dementsprechend einen Wert von

$$A_l = 49,8 \text{ \AA}^2.$$

Sun et al. [83] liefern als Vergleichswert $47,3 \text{ \AA}^2$. Abweichungen der Fläche pro Lipidmolekül A_l von den Literaturdaten sind hauptsächlich dadurch bedingt, dass für die Ermittlung der Doppelschichtdicke d_{HH} von einem softwareseitigen Fit abgesehen wurde und stattdessen eine manuelle Auswertung, wie in Kapitel 7.6.3 beschrieben, erfolgte.

Kapitel 8

Ausblicke

8.1 Präparation von DPPG-Vesikeln

Basierend auf den Erfahrungen, die durch die Präparation von DPPC-Proben mittels RSE gesammelt wurden, sind Versuche mit dem Lipid DPPG¹ initiiert worden. Wiederum wurde die Lipiddünnschichthydratationsmethode als Referenzverfahren zur Kontrolle der RSE-Daten herangezogen. Tabelle 8.1 listet die Daten der Referenzproben, Tabelle 8.2 jene der RSE-Präparationen. In Abbildung 8.1 werden die Ergebnisse der DSC-Messungen gegenübergestellt.

Die Übergangstemperaturen der Proben Y und Z entsprechen den Referenzwerten. In Hinblick auf die Halbwertsbreiten der Übergänge schneiden die RSE-Proben deutlich besser ab als die Referenzproben. Sowohl die Probe Y als auch die Probe Z wurden mit einer hohen Ausgangskonzentration von 50 mg/ml präpariert, das Mischungsverhältnis von Lösungsmittel zu Suspensionsmittel wurde jedoch unterschiedlich gewählt.

Abweichungen der Halbwertsbreiten von Referenz- und RSE-Proben deuten darauf hin, dass Vorkommen von LUVs eine Verbreiterung des Hauptübergangs der Referenzsysteme herbeiführen. Alle Präparationen weisen leichte bis starke Ausprägungen einer Schulter vor dem Hauptübergang auf. Die Schulter kann, wie schon bei DPPC, ein Hinweis auf große Bestände kleiner unilamellarer Vesikel sein. Der deutliche Unterschied zwischen der Schulterausprägung von Probe Y und Probe Z mag dem unterschiedlichen Mischungsverhältnis von Dispersions- und Suspensionsmittel geschuldet sein. Diesbezüglich gilt es, weitere Versuche anzustellen und die in Kapitel 7 angeführten Präparationsparameter optimal auf das Selbstassemblierungsverhalten von DPPG abzustimmen.

¹1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol

Tabelle 8.1: Herstellungsparameter der DPPG-Referenzproben F5 bis F8

Probe	F5	F6	F7	F8
Präparationsmethode	Vortex	Shake 30 min	Shake 60 min	Shake 120 min
Ausgangskonz. [mg/ml]	50			
Lösungsmittel	Chloroform/Methanol			
Dispersionsmittel	NAPI			
Abbildung	8.1			
T_m [°C]	40,8	40,9	40,8	40,8
$\Delta T_{1/2,m}$ [°C]	0,39	0,39	0,40	0,40
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	11353	10015	11189	8493
T_p [°C]	33,2	32,7	32,9	32,8
$\Delta T_{1/2,p}$ [°C]	3,3	2,8	3,7	4,35
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1788	1400	1768	1275

Tabelle 8.2: Herstellungsparameter der RSE-Probe

Probe	RSE Y	RSE Z
Vakuumpumpe	man	
Lösungsmittel (LM)	C/M	
Dispersionsmittel (DM)	NAPI	
DM : LM	10:1	1:1
Ausgangskonz. [mg/ml]	50	
Vortexgeschwindigkeit [UPM]	600	
Temperatur [°C]	65	
Abbildung	8.1	
T_m [°C]	40,8	40,8
$\Delta T_{1/2,m}$ [°C]	0,34	0,31
$\Delta H_{cal,m}$ [cal/mol]	10942	11241
T_p [°C]	33,8	33,5
$\Delta T_{1/2,p}$ [°C]	2,7	2,7
$\Delta H_{cal,p}$ [cal/mol]	1455	1090

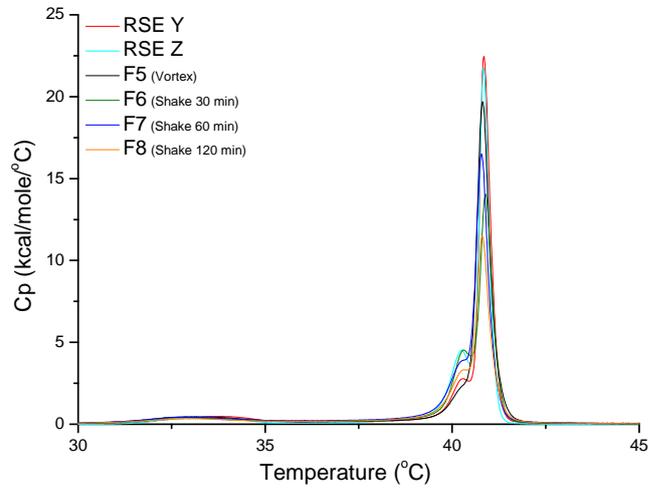


Abbildung 8.1: DSC-Auswertung von DPPG-Proben hergestellt mittels Film-
methode sowie RSE-Methode

Literaturdaten zu den Thermogrammcharakteristika von DPPG finden sich
bei Zhang et al. [88].

Kapitel 9

Conclusio

Es scheint, als habe die von uns adaptierte RSE-Methode in Zukunft das Potential, für eine breite Palette von Lipiden als effiziente und einfache Präparationsmethode von multilamellaren Vesikeln dienen zu können. Zwar müssen für jedes Lipid die optimalen Präparationsparameter erst gefunden werden, die im Anschluss daran möglichen Effizienzsteigerungen in Bezug auf Probenherstellung wiegen diesen Mehraufwand jedoch allemal auf.

Bezug nehmend auf das Membranlipid DPPC, welches Hauptgegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit war, kann gefolgert werden, dass Haupteinflussfaktoren in Hinblick auf die Präparation von Vesikeln mittels RSE die Art des Dispersionsmittels, und damit die Anzahl der chemischen Systemkomponenten, die Vortexgeschwindigkeit, und damit die dem System aufgeprägte Frequenz wie auch zugleich der mechanische Energieeintrag, sowie die Ausgangskonzentration der Lipide in Lösung sind.

Eine weitere, eingehendere Untersuchung physikalischer Parameter, welche auf die Selbstassemblierung von biologischen Systemen einwirken, sollte angedacht werden. Dabei rücken folgende Themenbereiche in den Vordergrund:

- Art des Energieeintrages (hier: mechanisch, elektromagnetisch)
- Geometrien und Oberflächen der Behausungen (hier: Präparationsgefäße)
- Anzahl und Verhältnis chemischer Systemkomponenten (hier: Probenzusammensetzung)
- Zeitliche Faktoren (hier v.a. dem System aufgeprägte Frequenzen)

Das umfassendere Verständnis des Einflusses physikalischer Randbedingungen auf die Selbstassemblierung biologischer Systeme kann und muss dazu beitragen, Wachstumsvorgänge und Organisation in lebenden Organismen besser verstehen zu lernen, um letztendlich der Diskussion von fundamentalen Fragestellungen, wie etwa der Ursächlichkeit des Lebens an sich, als wissenschaftliche Grundlage zu dienen.

Literatur

1. Wenk, M. R. Lipidomics: New Tools and Applications. *Cell* **143**, 888–895 (2010).
2. Wenk, M. R. The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 594–610 (2005).
3. *Lipodomics* — *Wikipedia, Die freie Enzyklopädie* [Online; Stand 25. Mai 2013]. URL: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lipodomics&oldid=512090992> (2013).
4. *LIPID MAPS Lipidomics Gateway* [Online; Stand 13. April 2014]. URL: <http://www.lipidmaps.org/> (2014).
5. Fahy, E. *u. a.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research* **50**, 9–14 (Supplement 2008).
6. Süß, R., Zschörnig, O. & Schiller, J. *Lipidanalytik mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie* (Universität Leipzig, Leipzig, 2005).
7. Hummel, J. *u. a.* Ultra performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry for the analysis of plant lipids. *Frontiers in Plant Science* **2**. (2011).
8. Fahy, E. A comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research* **46**, 839–862 (2005).
9. Alberts, B. *u. a.* *Molekularbiologie der Zelle* 5. Aufl. (Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Weinheim, 2011).
10. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Stryer Biochemie* 6. Aufl. (Elsevier, München, 2007).
11. Götz, W. *Infrarot-Nahfeldmikroskopie von Phospholipiden* Diss. (Ruhruniversität Bochum, Bochum, 2007).

12. *Academic Dictionaries and Encyclopedias* [Online; Stand 14. Mai 2014]. URL: <http://wiktionary.academic.ru/200977/thermotropic> (2014).
13. *Academic Dictionaries and Encyclopedias* [Online; Stand 14. Mai 2014]. URL: http://universal_lexikon.deacademic.com/145027/lyotrop (2014).
14. Pabst, G. *Biologische und biobasierte Materialien* Vorlesung. Graz, 2012.
15. Kato, T., Hirai, Y., Nakaso, S. & Moriyama, M. Liquid-crystalline physical gels. *Chemical Society Reviews* **36**, 1857–1867 (2007).
16. Jones, R. A. L. *Soft Condensed Matter* 1. Aufl. *Oxford Master Series in Condensed Matter Physics* **6** (Oxford University Press, Oxford, New York, 2002).
17. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces* 3. Aufl. (Elsevier, Santa Barbara, 2011).
18. Walde, P. in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 43–79 (American Scientific Publishers, ETH Zürich, 2004).
19. *Liposom* — *Wikipedia, Die freie Enzyklopädie* [Online; Stand 25. Februar 2014]. URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Liposom&oldid=127034563> (2014).
20. Parsegian, V. A. *Van der Waals Forces* 1. Aufl. (Cambridge University Press, New York, 2006).
21. Leckband, D. & Israelachvili, J. N. Intermolecular forces in biology. *Quarterly reviews of biophysics* **34**, 105–267 (2001).
22. Marsh, D. *Handbook of Lipid Bilayers* 2. Aufl. (CRC Press, 2013).
23. Pabst, G. in *Advances in planar lipid bilayers and liposomes. Volume 18* (Hrsg. Iglic, A. & Kulkarni, C.) (2013).
24. Janmey, P. A. & Kinnunen, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology* **16**, 538–546 (2006).
25. Ollila, S. *Lateral pressure in lipid membranes and its role in function in membrane proteins* Diss. (Tampere University of Technology, Tampere, 2010).
26. Pfeiffer, W., Henkel, T., Sackmann, E., Knoll, W. & Richter, D. Local Dynamics of Lipid Bilayers Studied by Incoherent Quasi-Elastic Neutron Scattering. *Europhysics Letters* **8**, 201–206 (1989).

-
27. Eeman, M. & Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **14**, 719–736 (2010).
 28. Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes* 1. Aufl. (Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Copenhagen, 2007).
 29. Koynova, R. & Caffrey, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et biophysica acta* **1376**, 91–145 (1998).
 30. Brückner, E. *Solubilisierung lipophiler Substanzen durch Phospholipid-vesikel* Diss. (Universität Gesamthochschule Essen, Essen, 2000).
 31. Ruthven, N. A. H. & McElhandy, R. N. in *The Structure of Biological Membranes* (Hrsg. Yeagle, P. L.) 2. Aufl. (CRC Press LLC, Boca Raton, 2011).
 32. Katsaras, J. & Raghunathan, V. A. in *Lipid Bilayers: Structure and Interactions* (Hrsg. Gutberlet, T. & Katsaras, J.) 1. Aufl. (Springer, Berlin; New York, 2001).
 33. Sengupta, K., Raghunathan, V. A. & Katsaras, J. Structure of the ripple phase of phospholipid multibilayers. *Physical review E: Statistical, non-linear, and soft matter physics* **68**, 031710 (2003).
 34. Cevc, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 675–711 (2004).
 35. Prenner, E. & Chiu, M. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **3**, 39–59 (2011).
 36. Heimburg, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal* **78**, 1154–1165 (2000).
 37. Ivanova, V. & Heimburg, T. Histogram method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers, and membranes containing peptides. *Physical Review E* **63**. (2001).
 38. Ohline, S. M., Campbell, M. L., Turnbull, M. T. & Kohler, S. J. *Differential Scanning Calorimetry of Bilayer Membrane Phase Transitions* [Online; Stand 23. April 2014]. URL: <http://www.colby.edu/chemistry/PChem/lab/DSCMembrane.pdf> (2000).
 39. Biltonen, R. L. & Lichtenberg, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids* **64**, 129–142 (1993).

40. Kuzmin, P. I., Akimov, S. A., Chizmadzhev, Y. A., Zimmerberg, J. & Cohen, F. S. Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt. *Biophysical Journal* **88**, 1120–1133 (2005).
41. Mathai, J. C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J. F. & Zeidel, M. L. Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *The Journal of General Physiology* **131**, 69–76 (2007).
42. Pollack, G. H. *The Fourth Phase of Water* 1. Aufl. (Ebner und Sons Publishers, Seattle, 2013).
43. Dua, J. S., Rana, A. C. & Bhandari, A. K. Liposome: methods of preparation and application. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* **3**, 14–20 (2 2012).
44. Zhang, Z. & Huang, G. Micro- and nano-carrier mediated intra-articular drug delivery systems for the treatment of osteoarthritis. *Journal of Nanotechnology* **2012**, 1–11 (2012).
45. Harries, D. & Raviv, U. in *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application* (Hrsg. Pabst, G., Kucerka, N., Nieh, M. & Katsaras, J.) 1. Aufl. (CRC Press, Boca Raton, 2014).
46. Schwierz, N., Horinek, D. & Netz, R. R. Anionic and Cationic Hofmeister Effects on Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. *Langmuir* **29**, 2602–2614 (2013).
47. Avanti Polar Lipids Inc. *16:0 PC (DPPC) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine 850355* [Online; Stand 07. April 2014]. URL: https://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=216&Itemid=206&catnumber=850355 (2014).
48. Jämbeck, J. P. M. & Lyubartsev, A. P. Derivation and systematic validation of a refined all-atom force field for phosphatidylcholine lipids. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 3164–3179 (2012).
49. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. & Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry* **97**, 10269–10280 (1993).
50. Avanti Polar Lipids Inc. *Preparation of Liposomes* [Online; Stand 28. Mai 2013]. URL: http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372 (2013).

-
51. *Gefriertrocknung* — *Wikipedia, Die freie Enzyklopädie* [Online; Stand 28. Mai 2013]. URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Gefriertrocknung&oldid=127194142> (2014).
 52. Gruner, S. M., Lenk, R. P., Janoff, A. S. & Ostro, N. J. Novel multilayered lipid vesicles: comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles. *Biochemistry* **24**, 2833–2842 (1985).
 53. Reeves, J. P. & Dowben, R. M. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *Journal of Cellular Physiology* **73**, 49–60 (1969).
 54. Buboltz, J. T. & Feigenson, G. W. A novel strategy for the preparation of liposomes: rapid solvent exchange. *Biochimica et biophysica acta* **1417**, 232–245 (1999).
 55. Buboltz, J. T. A more efficient device for preparing model-membrane liposomes by the rapid solvent exchange method. *Review of Scientific Instruments* **80**, 124–301 (2009).
 56. Huang, J., Buboltz, J. T. & Feigenson, G. W. Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochimica et biophysica acta* **1417**, 89–100 (1999).
 57. Huang, J. & Feigenson, G. W. A Microscopic Interaction Model of Maximum Solubility of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **76**, 2142–2157 (1999).
 58. Baykal-Caglar, E., Hassan-Zadeh, E., Saremi, B. & Huang, J. Preparation of giant unilamellar vesicles from damp lipid film for better lipid compositional uniformity. *Biochimica et biophysica acta* **1818**, 2598–2604 (2011).
 59. Bagatolli, L. A., Parasassi, T. & Gratton, E. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. *Chemistry and Physics of Lipids* **105**, 135–147 (2000).
 60. Rodriguez, N., Pincet, F. & Cribier, S. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **42**, 125–130 (2005).
 61. Bi, H., Yang, B., Wang, L., Cao, W. & Han, X. Electroformation of giant unilamellar vesicles using interdigitated ITO electrodes. *Journal of Materials Chemistry A* **1**, 7125–7130 (2013).

62. *Indiumzinnoxid* — *Wikipedia, Die freie Enzyklopädie* [Online; Stand 28. Mai 2013]. URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Indiumzinnoxid&oldid=123291172> (2013).
63. Pidgeon, C., Hunt, A. H. & Dittrich, K. Formation of multilayered vesicles from water/organic-solvent (w/o) emulsions: theory and practice. *Pharmaceutical research* **3**, 23–34 (1986).
64. Moscho, A., Orwar, O., Chiu, D., Biren, M. & Zare, R. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 11443–11557 (1996).
65. Berger, C. *Herstellung von Liposomen und die Untersuchung der kationeninduzierten Membranfusion durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer* (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Leipzig, 2010).
66. Dörfler, H. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie; mit 88 Tabellen* (Springer, Berlin [u.a.], 2002).
67. Schnablegger, H. & Yashveer, S. *The SAXS Guide* Graz, 2011.
68. Pabst, G., Rappolt, M., Amenitsch, H. & Laggner, P. Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: full q-range fitting with high quality x-ray data. *Physical Review E: Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics* **62**, 4000–4009 (2000).
69. Pabst, G. *u. a.* Structural analysis of weakly ordered membrane stacks. *Journal of Applied Crystallography* **36**, 1378–1388 (2003).
70. Krywka, C. *Ein Aufbau für Röntgenkleinwinkelstreuung an Protein-Lösungen an der Synchrotronstrahlungsquelle DELTA* Diss. (Technischen Universität Dortmund, Dortmund, 2008).
71. Heftberger, P. *u. a.* Global small-angle X-ray scattering data analysis for multilamellar vesicles: the evolution of the scattering density profile model. *Journal of Applied Crystallography* **47**, 173–180 (1 2014).
72. Fennell, E. & Wennerström, H. *The Colloidal Domain* 2. Aufl. (Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Canada, 1999).
73. Department of Chemistry, Colby College. *Differential Scanning Calorimetry; First and Second Order Transitions in Polymers* URL: <http://www.colby.edu/chemistry/PChem/lab/DiffScanningCal.pdf> (2007).
74. Lichtenberg, D. *u. a.* Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles. *Biochemistry* **20**, 3462–3467 (1981).

-
75. *Zetasizer Nano Series User Manual* (Malvern Instruments Ltd., Malvern, 2004).
 76. *Dynamic light scattering* — *Wikipedia, Die freie Enzyklopädie* [Online; Stand 17. März 2013]. URL: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dynamic_light_scattering&oldid=598553530 (2014).
 77. NanoSight Ltd. *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)* [Online; Stand 03. April 2014]. URL: <http://www.nanosight.com/technology> (2014).
 78. Haus, J. *Optische Mikroskopie* 1. Aufl. (Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Weinheim, 2014).
 79. Mishima, K., Satoh, K. & Ogihara, T. Optical birefringence of phosphatidylcholine liposomes in gel phases. *Biochimica et biophysica acta* **898**, 231–238 (1987).
 80. ChERIC. *Korea Thermophysical Properties Data Bank* [Online; Stand 25. Februar 2014]. URL: <http://www.cheric.org/research/kdb/hcprop/cmprch.php> (2014).
 81. Wong, M., Anthony, F. H., Tillack, T. W. & Thompson, T. E. Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles at 4 °C. *Biochemistry* **21**, 4126–4132 (1982).
 82. Nagypal, T. *Persönliche Kommunikation* 2014.
 83. Sun, W. J., Tristram-Nagle, S., Suter, R. M. & Nagle, J. F. Structure of gel phase saturated lecithin bilayers: temperature and chain length dependence. *Biophysical Journal* **71**, 885–891 (1996).
 84. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et biophysica acta* **1469**, 159–195 (2000).
 85. Wack, D. C. & Webb, W. W. Synchrotron x-ray study of the modulated lamellar phase $P\beta'$ in the lecithin-water system. *Physical Review A: Atomic, Molecular and Optical Physics* **40**, 2712–2730 (5 1989).
 86. Pabst, G., Danner, S., Karmakar, S., Deutsch, G. & Raghunathan, V. A. On the propensity of phosphatidylglycerols to form interdigitated phases. *Biophysical journal* **93**, 513–525 (2007).
 87. Tristram-Nagle, S. *u. a.* Measurement of chain tilt angle in fully hydrated bilayers of gel phase lecithins. *Biophysical Journal* **64**, 1097–1109 (1993).
 88. Zhang, Y. P., Lewis, R. N. & McElhaney, R. N. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of the n-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. *Biophysical journal* **72**, 779–793 (1997).

Anhang A

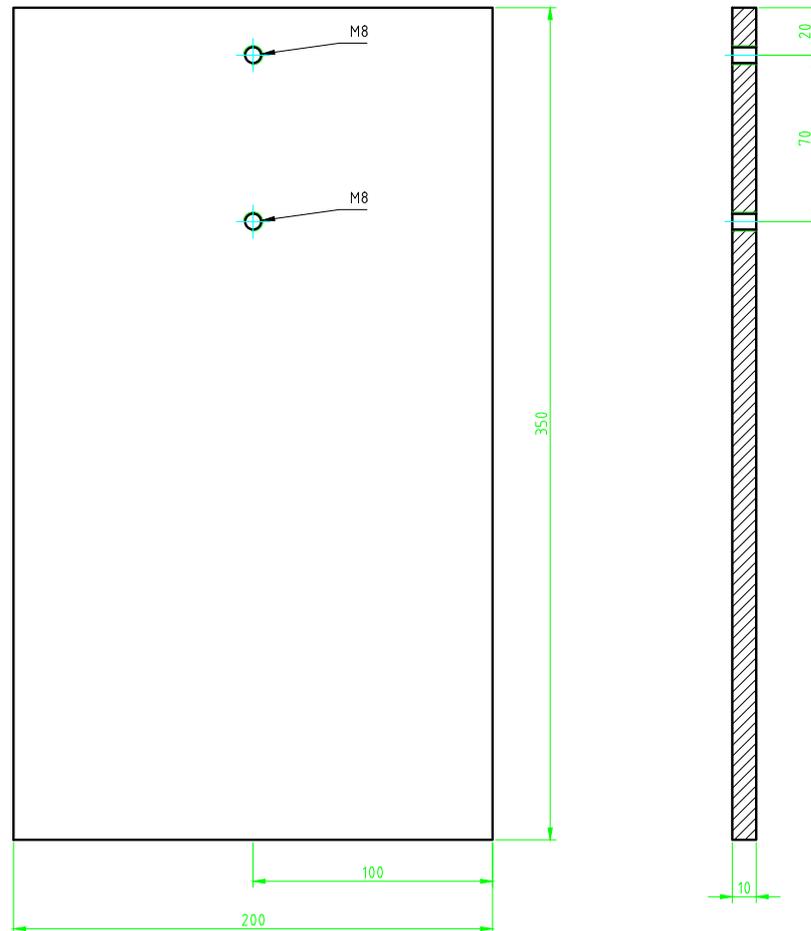
Schmelzpunkte und Kettenlängen wichtiger Membranlipide

Lipid	Ketten	Schmelztemp./°C
DLPC	12:0	-1
DMPC	14:0	23
DPPC	16:0	41
DSPC	18:0	55
DOPC	10:1c9	-20
POPC	16:0 - 18:1	-2
DLPG	12:0	-3
DMPG	14:0	23
DPPG	16:0	41
DSPG	18:0	55
DOPG	18:1	-18
POPG	16:0 - 18:1	-2
DMPS	14:0	35
DPPS	16:0	54
DSPS	18:0	68
DOPS	18:1	-11
POPS	16:0 - 18:1	14
DLPA	12:0	31
DMPA	14:0	50
DPPA	16:0	67
DSPA	18:0	75
DOPA	18:1	-8
POPA	16:0 - 18:1	28
DLPE	12:0	29
DMPE	14:0	50
DPPE	16:0	63
DSPE	18:0	74
DOPE	18:1c9	-16
POPE	16:0 - 18:0	25

Tabelle A.1: Schmelzpunkte und Kettenlängen der wichtigsten Modellmembranlipide

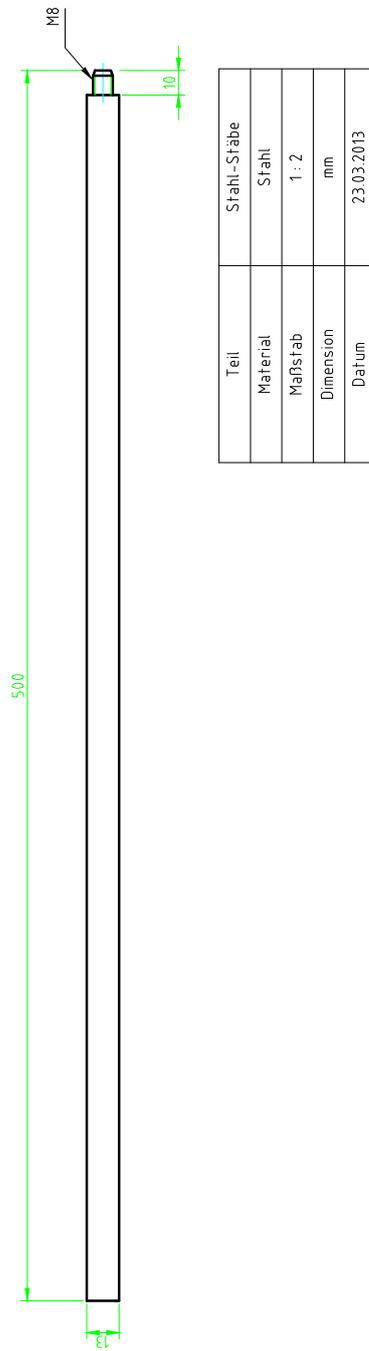
Anhang B

Baupläne des RSE-Grundgerüsts



Teil	Bodenplatte
Material	Aluminium
Maßstab	1 : 2
Dimension	mm
Datum	23.03.2013

Abbildung B.1: Bodenplatte



Anmerkung: 2-fache Ausführung

Abbildung B.2: Stangen

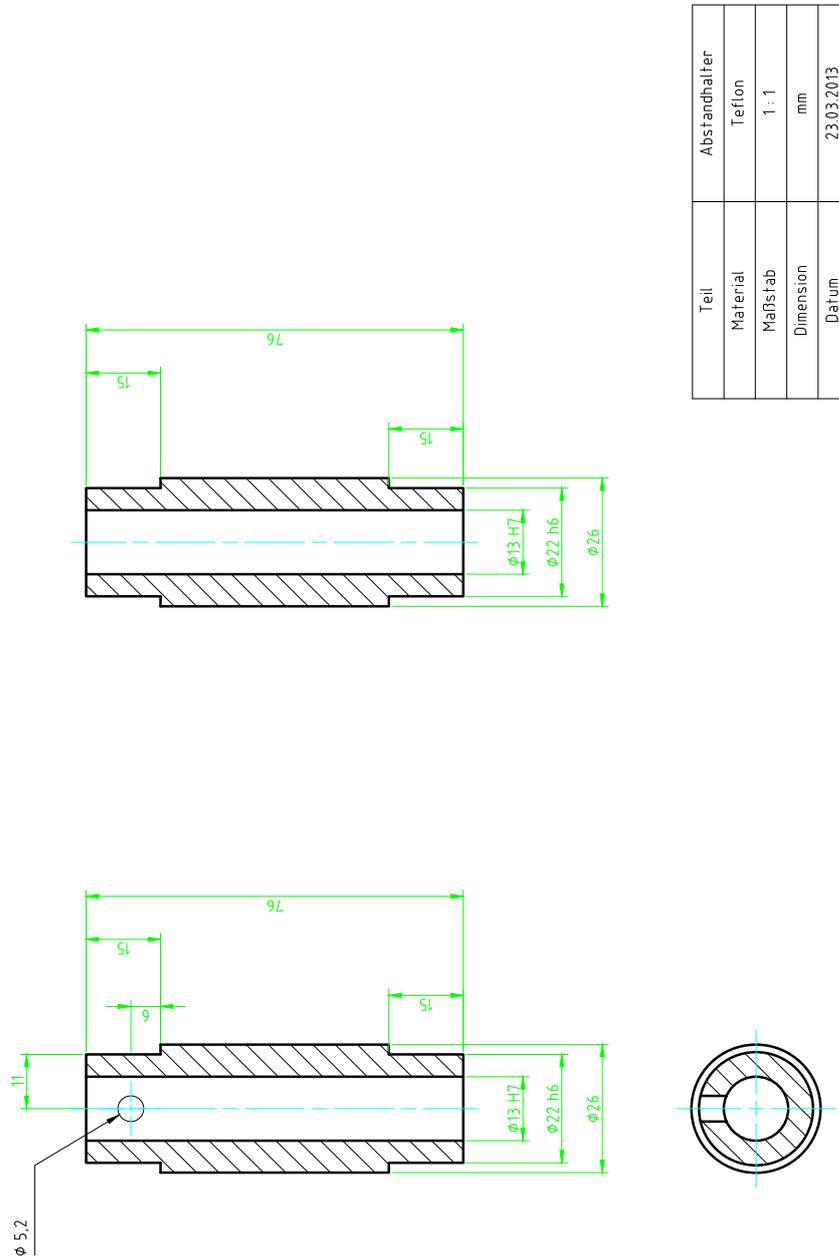


Abbildung B.3: Abstandhalter

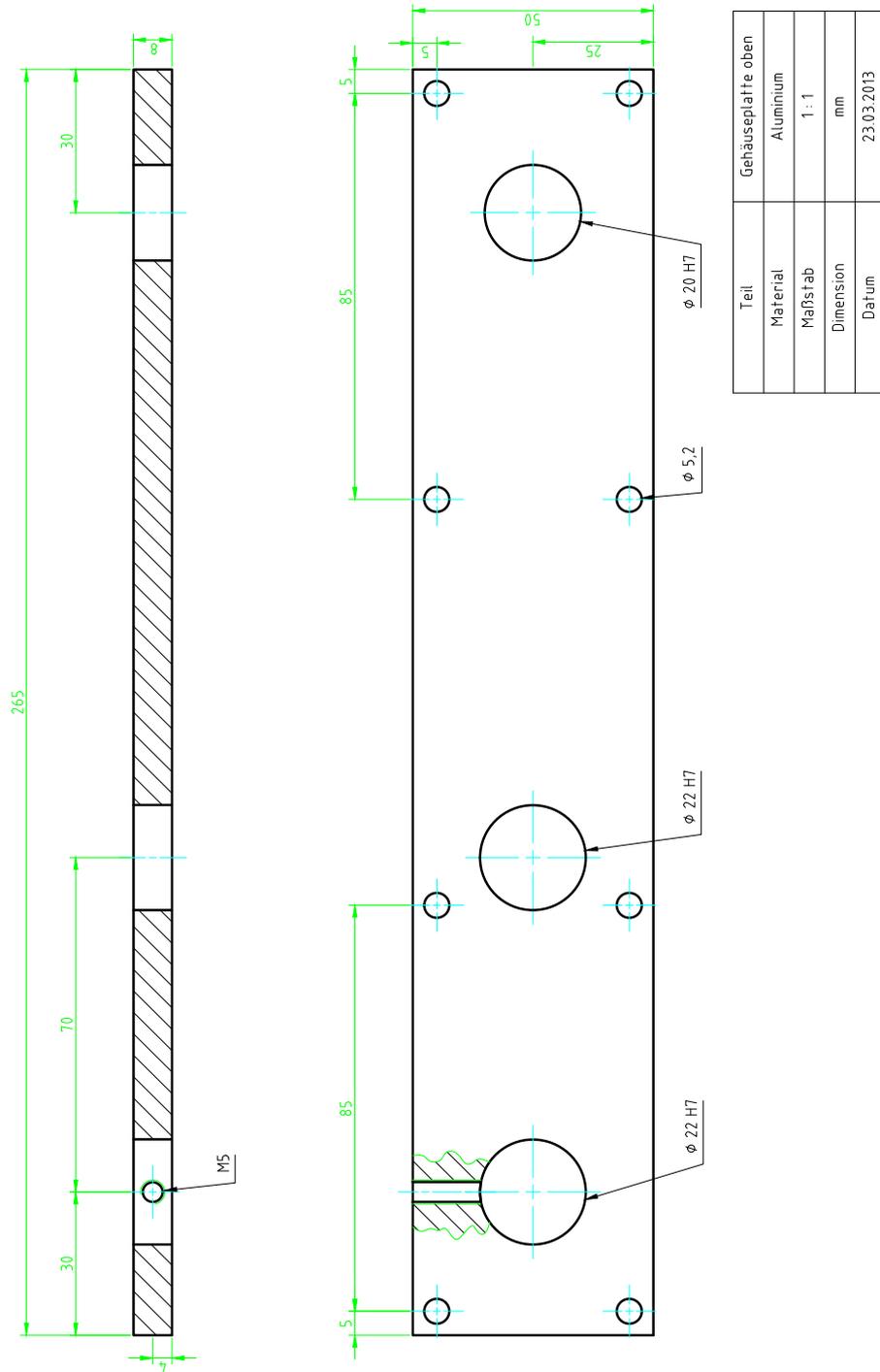


Abbildung B.4: Gehäuseplatte oben

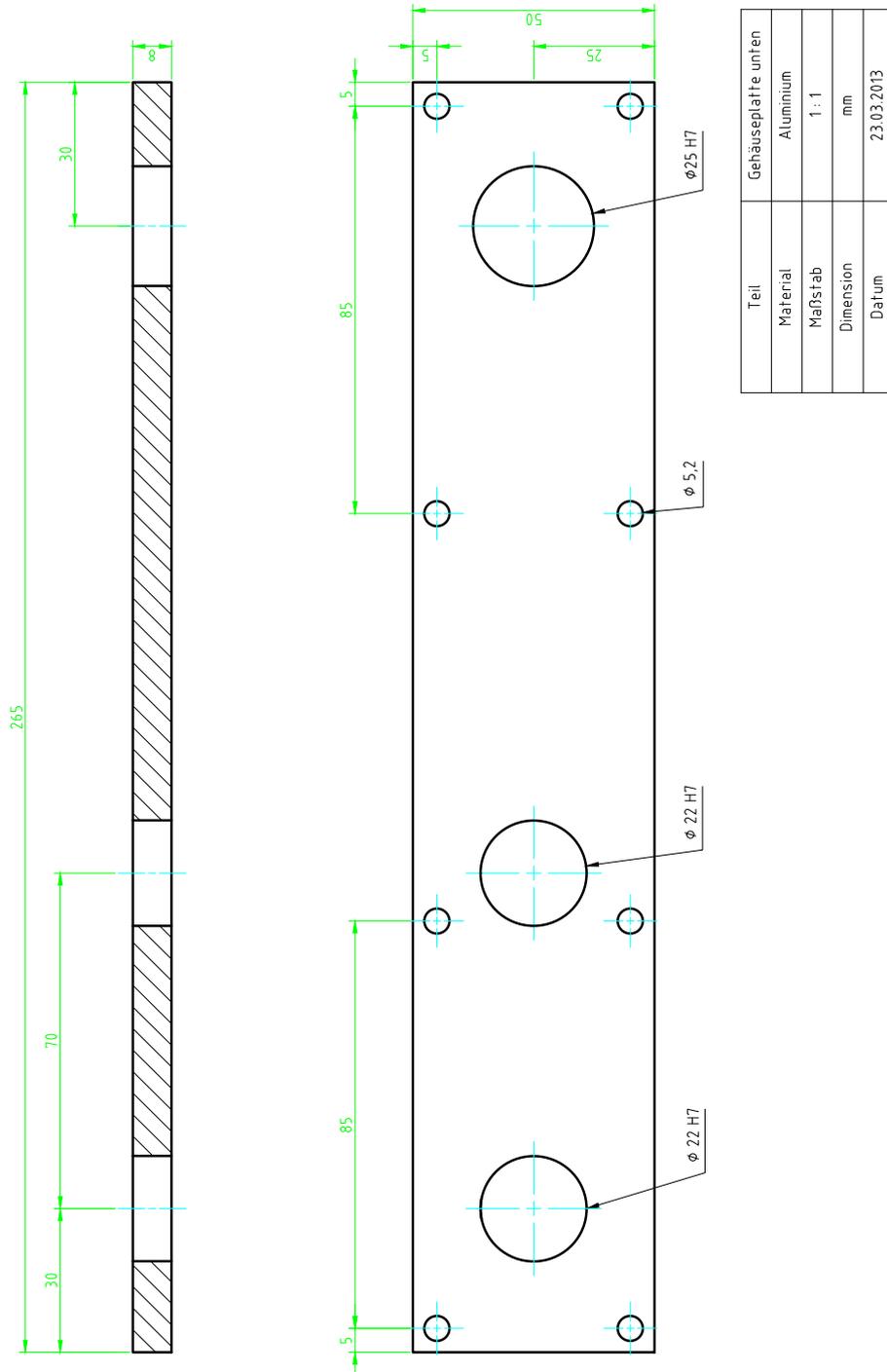
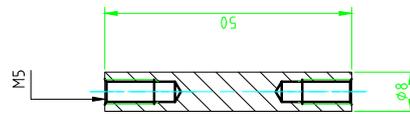


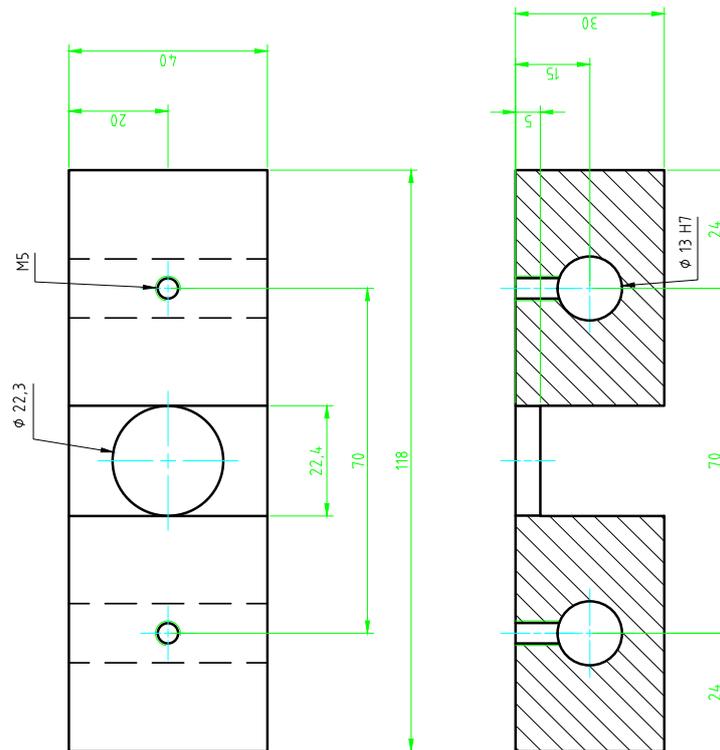
Abbildung B.5: Gehäuseplatte unten



Teil	Innengewindestäbe
Material	Aluminium
Maßstab	1 : 1
Dimension	mm
Datum	23.03.2013

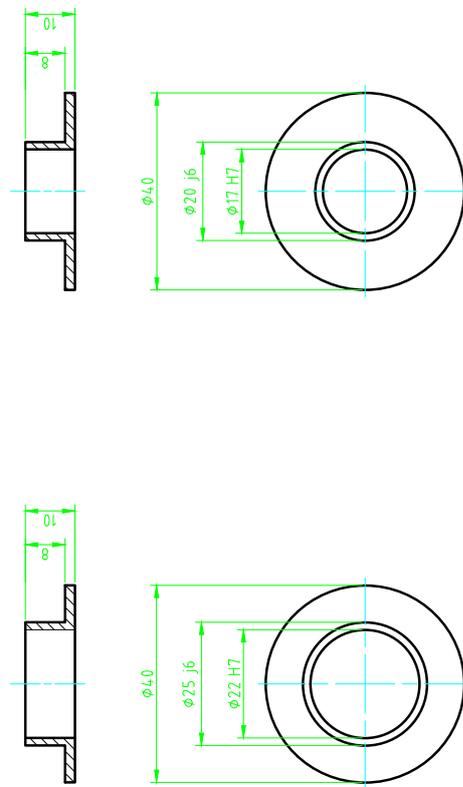
Anmerkung: 8-fache Ausführung

Abbildung B.6: Innengewindestäbe



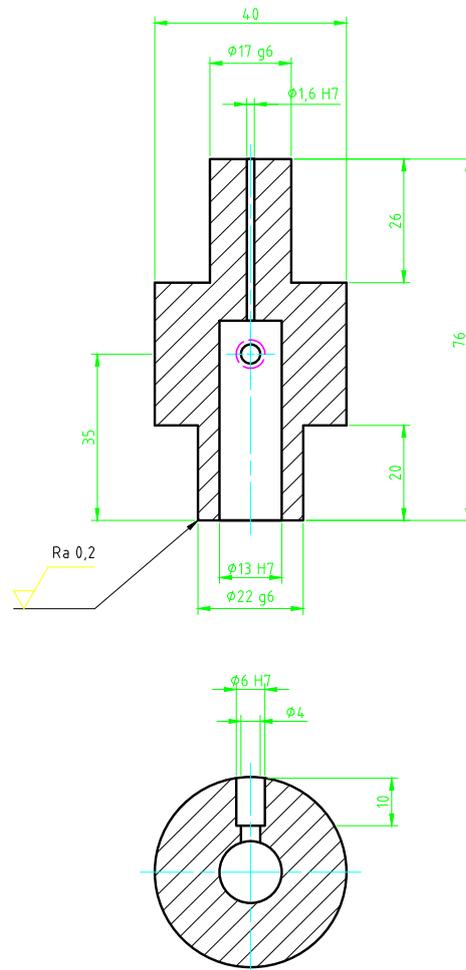
Teil	Kugelhahnhalterung		
Material	Aluminium		
Maßstab	1 : 1		
Dimension	mm		
Datum	23.03.2013		

Abbildung B.7: Kugelhahnhalterung



Teil	Verteilerbuchsen für Gehäuseplatten
Material	Teflon
Maßstab	1 : 1
Dimension	mm
Datum	23.03.2013

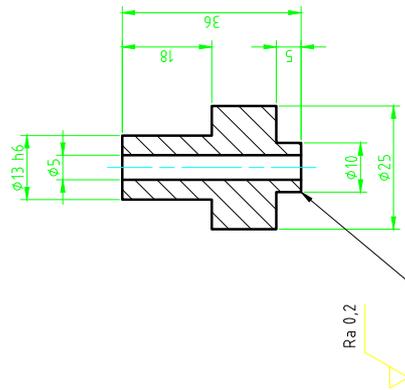
Abbildung B.8: Verteilerbuchsen für Gehäuseplatten



Teil	Verteiler
Material	Teflon
Maßstab	1 : 1
Dimension	mm
Datum	23.03.2013

Anmerkung: alles Ra 0,2

Abbildung B.9: Verteiler



Teil	Verteiler-Reagenzglas-Adapter
Material	Teflon
Maßstab	1 : 1
Dimension	mm
Datum	23.03.2013

Anmerkung: alles Ra 0,2

Abbildung B.10: Verteiler-Reagenzglas-Adapter