

**Systematische Untersuchungen zur Hydratation der
polaren Region in Lipiden und Lipidmodellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin

Dorit Gauger

geboren am 13. Januar 1974 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Fritzsche, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. A.S. Ulrich, Universität Karlsruhe
3. PD Dr. H. Binder, Universität Leipzig

Tag des Rigorosums: 30. Oktober 03

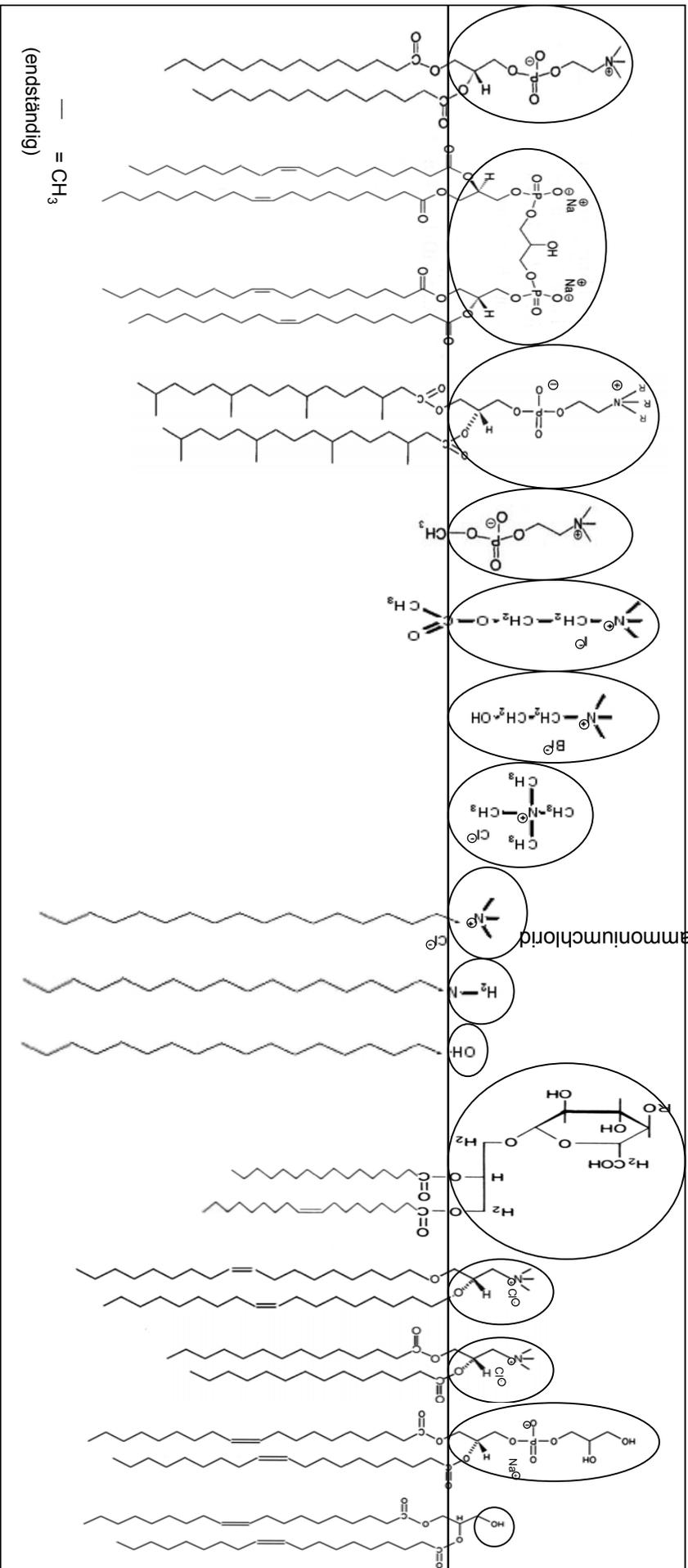
Tag der öffentlichen Verteidigung: 24. November 03

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen und Übersicht über die wichtigsten Strukturformeln	
1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1. Membranen in lebenden Systemen	1
1.2. Überblick über die Stoffgruppe Lipide	3
1.3. Selbstassemblierung der Lipide	5
1.4. Zielsetzung	7
1.5. Methoden zur Untersuchung von Lipiden	8
1.5.1. FTIR-Spektroskopie	8
1.5.2. Ergänzende Methoden	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Materialien	11
2.1.1. Verwendete Substanzen	11
2.1.2. Probenpräparation	11
2.2. Physikochemische Untersuchungsmethoden	12
2.2.1. Hydratisierung = Hydratation	12
2.2.2. FTIR-Spektroskopie	13
2.2.3. Röntgenbeugung	16
2.2.4. Karl-Fischer-Titration	17
2.2.5. Elektronenmikroskopie	19
2.2.6. Gravimetrie	19
3. Ergebnisse und Detaildiskussion	20
3.1. Methodische Grundlagen und Interpretationsregeln	20
3.1.1. Wasseraufnahmekapazität	20
3.1.2. Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren	22
3.1.3. Interpretation von Röntgenbeugungsmustern	26
3.2. Untersuchungen an PC-Lipidmodellen und deuterierten PC's	27
3.2.1. PC-Kopfgruppenmodelle ohne Acylketten: MePC, ACh, Cholin, TetraMAC	27
3.2.2. Modularer Aufbau der PC-Kopfgruppe an einer Kohlenwasserstoffkette: Stear(o)ylverbindungen	35
3.2.3. Deuterierte DMPC's: DMPC-d4, -d13, -d54, -d67	42
3.3. Systematische Strukturvariationen von Phospholipiden	48
3.3.1. Zwitterionische Phospholipide	49
3.3.1.1. Gesättigte PC's mit unterschiedlichen Kettenlängen: DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DBPC	49
3.3.1.2. Vergleich PC – PE-Kopfgruppe bei kurzkettigen Lipiden: DCPC / DCPE	53
3.3.1.3. Vergleich PC – PE-Kopfgruppe bei verzweigt-kettigen Lipiden: DPhPC / DPhPE	56
3.3.2. Anionische Phospholipide	67
3.3.2.1. DOPG	67
3.3.2.2. Cardiolipin	71
3.4. Untersuchungen an phosphatfreien Lipiden	74
3.4.1. Neutrale Lipide	74
3.4.1.1. DOG	74
3.4.1.2. Glykolipide: MGDG, DGDG	76
3.4.2. Kationische Lipide: DMTAP, DOTAP, DOTMA	81
4. Diskussion genereller Phänomene und Ausblick	84
4.1. Interaktionspotential polarer Gruppen in Lipiden	84
4.1.1. Einfluss von Kopfgruppenstruktur und Ladung	84
4.1.2. Einfluss einzelner Molekülgruppen	90
4.2. Einfluss der apolaren Kettenstruktur	93
4.3. Methodische Ergebnisse	94
4.4. Ausblick	96
5. Zusammenfassung	97
Literaturverzeichnis	I
Anhang	XII
Erklärungen	XII
Publikationen	XIII
Danksagung	XV
Lebenslauf	XVI

Abkürzungen und Symbole

∅	Durchmesser
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	attenuated total reflection
A_{wr}	relative Wasseraufnahme
A_{wrc}	" corrected
A_{wrdeut}	" der deuterierten Lipide
A_x	Integrale Extinktion der Bande(n) x
Bsp.	Beispiel
COG	centre of gravity
D	Deuterium
d	Wiederholungsabstand + s. Abb. 3.1.3.1 S. 26
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	differential scanning calorimetry = Dynamische Differenzkalorimetrie
DTGS	deuteriertes Triglycinsulfat
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Zentrum
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
H_{II}	invers hexagonal
HWL	Halbwerts(linien)breite
IR	infrarot
IR-LD	Infrarot-Lineardichroismus
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kap.	Kapitel
$L_{c,\beta, \beta',\alpha,i}$	Lamellar kristallin, Gel-, Gel- mit Kettenneigung, flüssigkristallin, interdigitiert
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
nC	Anzahl Kohlenstoffatome in der Kohlenwasserstoffkette
NMR	nuclear magnetic resonance = Kernmagnetische Resonanz
n_w	Hydratationszahl
P_α	deformiert hexagonale Phase mit fluiden Ketten
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PÜ	Phasenübergang
Q	kubisch
Ref.	Referenz
RF	relative Feuchtigkeit
s	Streuvektor
SFB	Sonderforschungsbereich
S_{IR}	Ordnungsparameter
sn	stereospezifische Nummerierung
T_m	main transition temperature = Hauptübergangstemperatur
TMA	Trimethylammonium
Üb.	Übersicht
UV	ultraviolett
VEB	Volkseigener Betrieb
Abkürzungen Lipide s. Tab. 1.4.1 S. 8	
Symbole IR-Banden s. Tab. 3.1.2.1 S. 22	



DMPC Cardiolipin Diphytanyloyle PE (R = H) MePC Acetylcholin Cholin chlorid Tetramethylammoniumchlorid Stearylamin Stearylalkohol Monoglucosyldiacylglycerol (R = H) DOTMA DMTAP DOG

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Membranen in lebenden Systemen

Biomembranen als Abgrenzung und Funktionsraum zellulärer Strukturen sind ein in allen Lebensformen verwirklichtes Prinzip. Ihr evolutionärer Erfolg ist damit belegt.

Enorme Größenunterschiede der membranumschlossenen Systeme treten je nach Zellart und –funktion auf. Zum Beispiel weisen Mikrokokken nur eine Länge von 0.15 - 0.2 μm auf, einige Pflanzenzellen dagegen sind bis zu 30 cm lang. Axone von Nervenzellen aus dem Rückenmark des Menschen können sogar bis zu einem Meter lang werden (UDE UND KOCH, 1994). Organismen existieren zudem in unterschiedlichsten Lebensräumen, wie z. B. an Orten mit hohen Temperaturen, Salzgehalten oder großer Trockenheit. Verschiedene Zellfunktionen sind an die Existenz von Membranstrukturen gebunden (s. Abb. 1.1.1 + Bsp. s. u.). Biomembranen müssen also Eigenschaften haben, die unterschiedlichen Aufgaben unter allen Bedingungen gerecht werden. So zeichnet natürliche Membranen aus, dass sie geschlossene, aber gleichzeitig flexible Strukturen, und selektiv permeabel sind. Sie bestehen aus einem Gemisch von Lipiden, Proteinen und weiteren Bestandteilen, wie Kohlenhydraten, Cholesterol und Wasser. Lipid-Doppelschichten haben eine Dicke von ca. 6 nm.

An einigen konkreten Beispielen soll verdeutlicht werden, dass die Eigenschaften von Biomembranen für die Lebensfunktionen von Organismen essentiell sind.

Um Vorgänge der **Energiegewinnung** der Zellen zu ermöglichen, werden Stoff- und Elektronengradienten an Biomembranen erzeugt. Die funktionellen Proteine sind dazu vektoriell in speziellen Membranen angeordnet, wie z. B. in Chloroplasten. Als Organellen der Photosynthese weisen ihre inneren Membranen Abschnürungen, sogenannte Thylakoide, auf. Thylakoide stellen die Matrizes für die Enzyme der Elektronentransportkette und der ATP-Synthetase der Photosynthese dar und ermöglichen so die autotrophe Energiegewinnung der photosynthetisch aktiven Organismen. In Mitochondrien, den Organellen der Atmungskette, bilden sich aus den inneren Membranen finger- oder scheibenförmige Ausstülpungen, sogenannte Cristae, aus, auf denen Enzyme der oxidativen Phosphorylierung und außerdem des Fettsäuren-, Kohlenhydrat- und z. T. des Aminosäurenabbaus lokalisiert sind. Mit Hilfe dieser biochemischen Reaktionsketten können assimilierte Verbindungen zur Energiegewinnung für die Zelle nutzbar gemacht und organische Moleküle dem **Stoffwechsel** zugeführt werden.

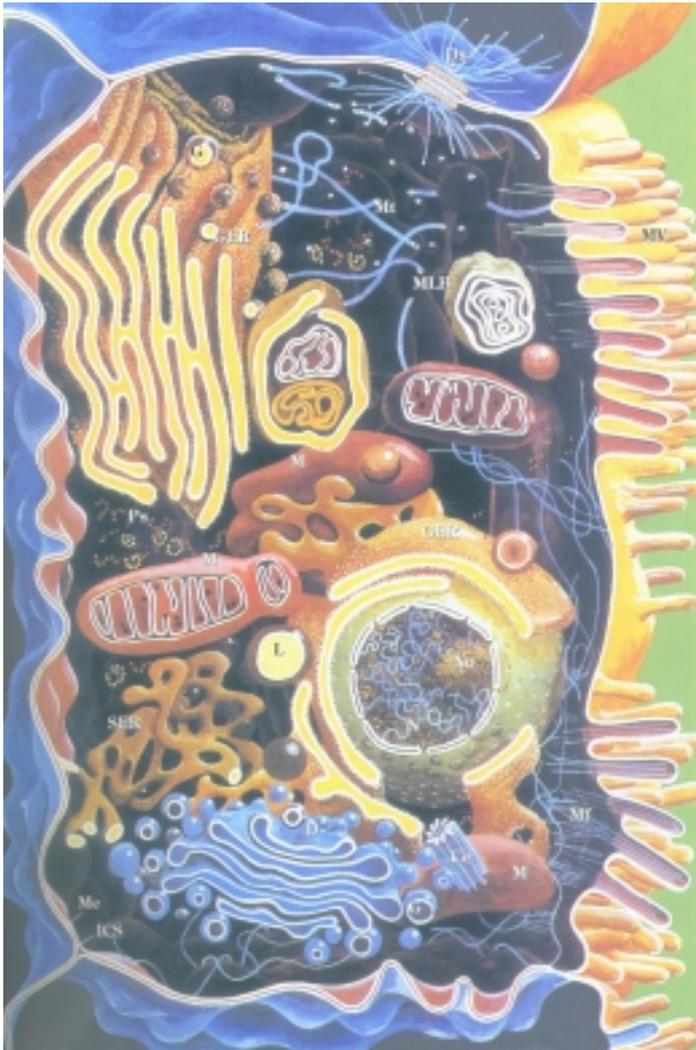


Abb. 1.1.1 Schematische Übersicht der tierischen Zelle:

- Ce - Centriol
- D - Dictyosom
- Ds - Desmosom
- G - Sekretgranulum
- GER - granuläres endoplasmatisches Retikulum
- ICS - Interzellularraum
- L - Lysosom
- M - Mitochondrium
- Me - Zellmembran
- Mf - Mikrofilamente
- Mt - Mikrotubuli
- MV - Mikrovilli
- MLB - Multilamellärer Körper
- N - Kern
- No - Nucleolus
- Ps - Polysom
- SER - agranuläres endoplasmatisches Retikulum

AUS UDE UND KOCH (1994)

Umsetzung und Weitergabe des genetischen Materials werden in Zellen eukaryotischer Organismen mit Hilfe von Zellkernen realisiert. Diese Zellkerne sind von einer Membran umgeben, die die empfindliche Chromosomenstruktur vor der Einwirkung mechanischer Kräfte schützt. Die Kernmembran gewährleistet außerdem eine räumliche Trennung von Translation und Transkription, zeichnet sich aber auch durch eine große Anzahl von Poren aus. Durch diese Poren wird der selektive Austausch mit der Umgebung ermöglicht. Direkte Nachbarschaft besteht zu einem weiteren membranösen Organell - dem granulären endoplasmatischen Retikulum, an dem die genetischen Informationen der Kern-DNA, die in Form von mRNA durch Poren aus dem Zellkern gelangen, mit Hilfe von assoziierten Ribosomen umgesetzt werden. Agranuläres endoplasmatisches Retikulum ohne Ribosomen ist mit dem Lipidstoffwechsel funktionell verbunden (KLEINIG UND SITTE, 1999; UDE UND KOCH, 1994).

Informationsweiterleitung und -verarbeitung wird z. B. mit Hilfe von Membranpotentialen realisiert. Außergewöhnliche Leistungen bezüglich des Aufbaus

solcher Membranpotentiale werden an spezialisierten Zellen des Zitteraals besonders deutlich. Nach Nervenerregung (vermittelt durch Acetylcholin) können dort Stromschläge von 800 Volt / 1 Ampere erzeugt werden. Dabei addieren sich Membranpotentiale von ca. 8000 in Serie und parallel geschalteten sogenannten Elektropaxen (spezialisierten Muskelzellen), und durch Depolarisierung werden diese Stromschläge freigesetzt (PENZLIN, 1996). Die Synchronisation dieser Entladung erfolgt mit Hilfe von Gap Junctions. Gap Junctions sind spezielle Verbindungen zwischen den Membranen benachbarter Zellen, die elektrische Übertragung von Reizen zulassen (KLEINIG UND SITTE, 1999).

Membranen verleihen durch ihre Zusammensetzung aus Lipiden und Proteinen jedem umschlossenen System **Spezifität**. Die an Erythrozytenmembranen angelagerten Blutgruppensubstanzen, die als Antigene wirken, sind ein allgemein bekanntes Beispiel.

Der Kontakt, das Aufbrechen und das erneute Verschmelzen von Membranen während solcher Prozesse wie der Ausschüttung von Neurotransmittern aus Vesikeln in Synapsen, der Phagozytose, der Befruchtung von Keimzellen oder der Zellteilung stellen außergewöhnliche Forderungen an die **mechanische Flexibilität** und Spezifität der Membranen. Die Fusion von Viren wurde z. B. für das Influenzavirus eingehend untersucht. Dabei spielt ein virales hydrophobes Fusionspeptid, Hämagglutinin₂, eine entscheidende Rolle, das eine Annäherung an den hydrophoben Bereich der Wirtsmembran verwirklicht (KLEINIG UND SITTE, 1999). Aber auch nicht-proteinvermittelte Fusion von Membranen ist möglich, z. B. über Kationen wie Zink (BINDER ET AL., 2001).

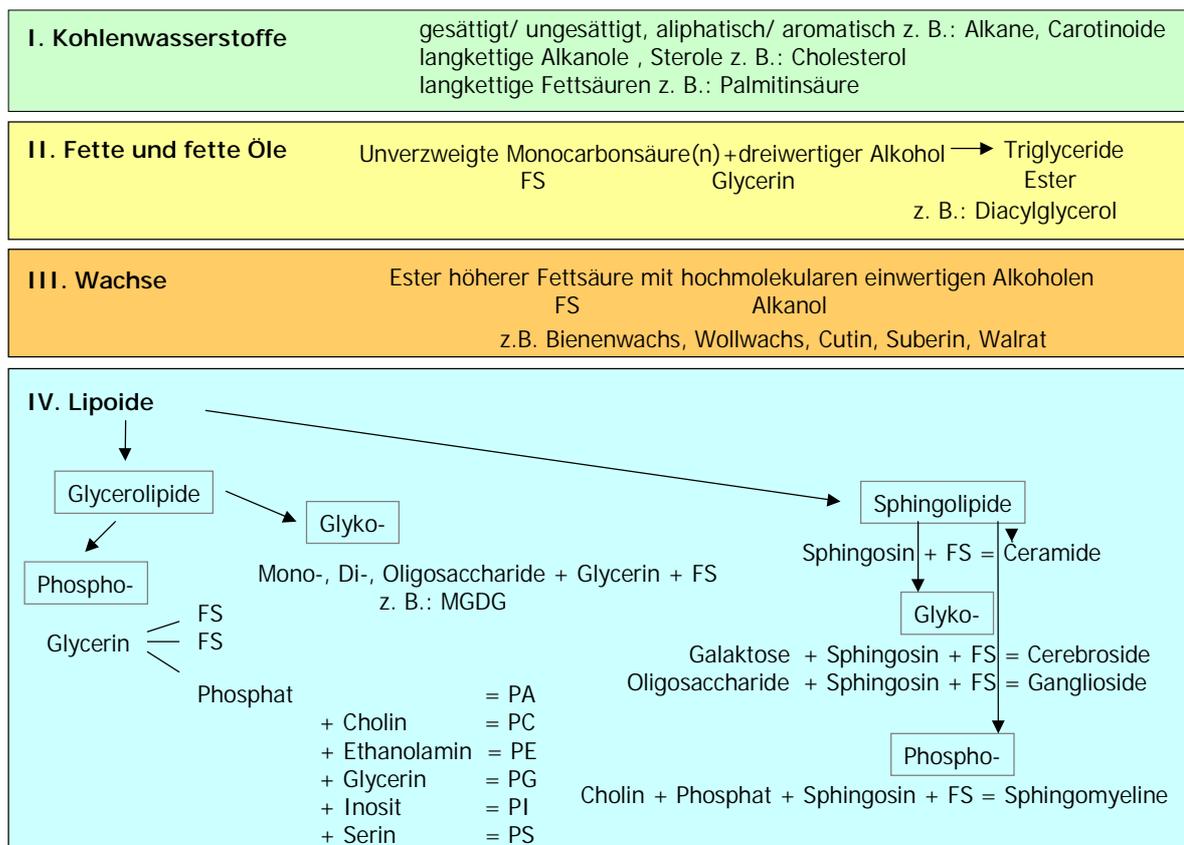
Membranen können also als Matrix für funktionelle Proteine fungieren, Barriere oder Matrix zum Aufbau von Stoff- oder Ionengradienten sein, oder z. B. durch Poren, Rezeptoren oder Kanäle den Informationsfluss mit der Umgebung und den Signaltransport innerhalb und zwischen den Zellen realisieren.

1.2. Überblick über die Stoffgruppe Lipide

Die Eigenschaften von Membranen leiten sich aus ihrer Zusammensetzung ab. Um bestimmte Eigenschaften speziellen Membrankomponenten zuordnen zu können, werden vielfältige Untersuchungen vorgenommen, wobei die Charakterisierung biophysikalischer Eigenschaften der Lipide und ihrer Wechselwirkungen mit assoziierten Komponenten im Mittelpunkt steht, z. B. LEWIS AND MCELHANEY (2002); SMALL (1986); CULLIS AND DE KRUIJFF (1979). In Anbetracht der Funktionen von Lipiden als

Membranbildner, aber auch als Energiereserve, als biologische Detergentien, als Wachs auf Federn von Vögeln, als Hormon-Ausgangssubstanzen, Pheromone etc. verwundert nun die Vielfalt der Lipide kaum. Die Definition für Lipide ist außerdem sehr weit gefasst : vom griechischen *lipos* = Fett abgeleitet, handelt es sich um eine Sammelbezeichnung für strukturell sehr unterschiedliche, in allen Zellen vorkommende Stoffe mit vergleichbaren Lösungseigenschaften: Lipide sind im allgemeinen in Wasser unlöslich. Mit polaren organischen Lösungsmitteln, wie Benzol, Ether oder Chloroform, sind sie aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe extrahierbar. Zu den Lipiden gehören die eigentlichen Fette und die fettähnlichen Stoffe. In [Übersicht 1.2.1](#) wurde der Versuch einer systematischen Gliederung natürlich vorkommender Lipide ohne Anspruch auf Vollständigkeit unternommen.

Übersicht 1.2.1 Überblick über die Stoffgruppe Lipide und ihre Komponenten : FS = Fettsäure, PA = phosphatidic acid, restliche Abkürzungen [vgl. Tab. 1.4.1 und Abkürzungsverzeichnis](#); Nomenklatur nach IUPAC (THE NOMENCLATURE OF LIPIDS, 1977).



1.3. Selbstassemblierung der Lipide

Membranbildende Lipide besitzen eine ausgeprägte Amphiphilie und formen in Gegenwart von Wasser geordnete Strukturen. Wegen dieser Eigenschaft sind sie die formgebenden Komponenten der Membranen. Die Selbstassemblierung in Form „flüssiger Kristalle“ beruht auf dem hydrophoben Effekt. Hydrophile und hydrophobe¹ Bereiche der Moleküle vermeiden so energetisch ungünstige Kontakte weitestgehend (TANFORD, 1980). Darum ist es für die Membran am günstigsten, abgeschlossene, z. B. bläschenförmige, uni- oder multilamellare Strukturen (Vesikel, Liposomen) zu bilden. Die polare Oberfläche grenzt dabei an das Wasser.

Zweikomponentensysteme aus synthetischen Lipiden und Wasser haben sich als Strukturmodelle biologischer Membranen etabliert. Eine Besonderheit solcher Modellmembranen aus nur einer Spezies von Lipiden ist ein ausgeprägtes Phasenverhalten. Das Spektrum reicht dabei von der lamellar-flüssigkristallinen Phase der natürlichen Biomembranen (Fluid-Mosaik-Modell (SINGER AND NICHOLSON, 1972), s. Abb. 1.3.1) über weitere lamellare (kristalline, Gel-) bis hin zu nichtlamellaren (kubischen, hexagonalen) Phasen (Bsp. s. Abb. 1.5.2.1). Übergänge zwischen diesen Phasen werden z. B. durch Änderung der Temperatur, Druck, pH-Wert oder Wassergehalt induziert.

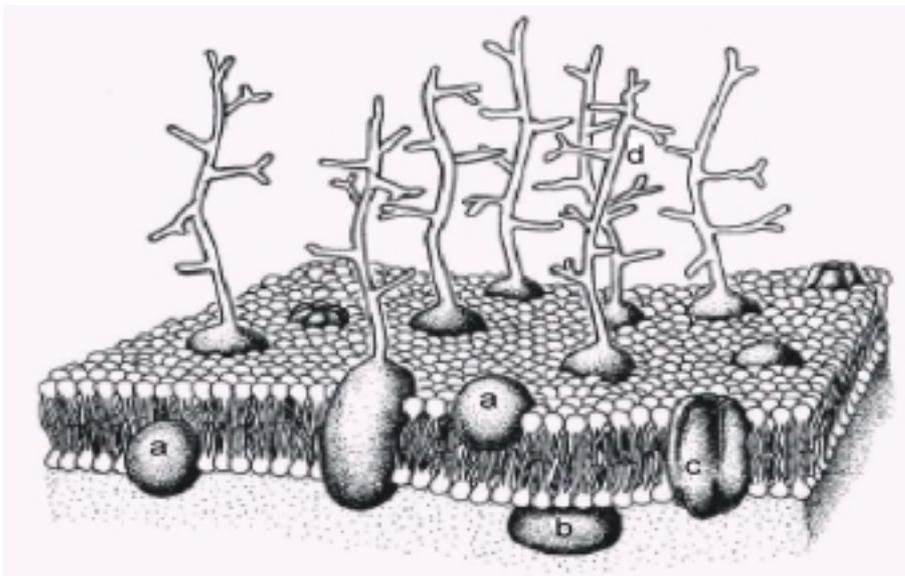


Abb. 1.3.1 Aktualisierte Variante des Fluid-Mosaik-Modells aus (BETZ ET AL., 2001)
a: integrierte -
b: periphere -
c: Tunnel-
d: Glyko-Proteine.

Die eingenommene Aggregationsform hängt hauptsächlich von drei Packungsparametern ab: der Querschnittsfläche der polaren Gruppe des Lipids, der Länge der apolaren Ketten und deren Volumen (ISRAELACHVILI ET AL., 1980). Dieses Prinzip besagt, dass sich Lipidüberstrukturen um so stärker von der *in vivo*

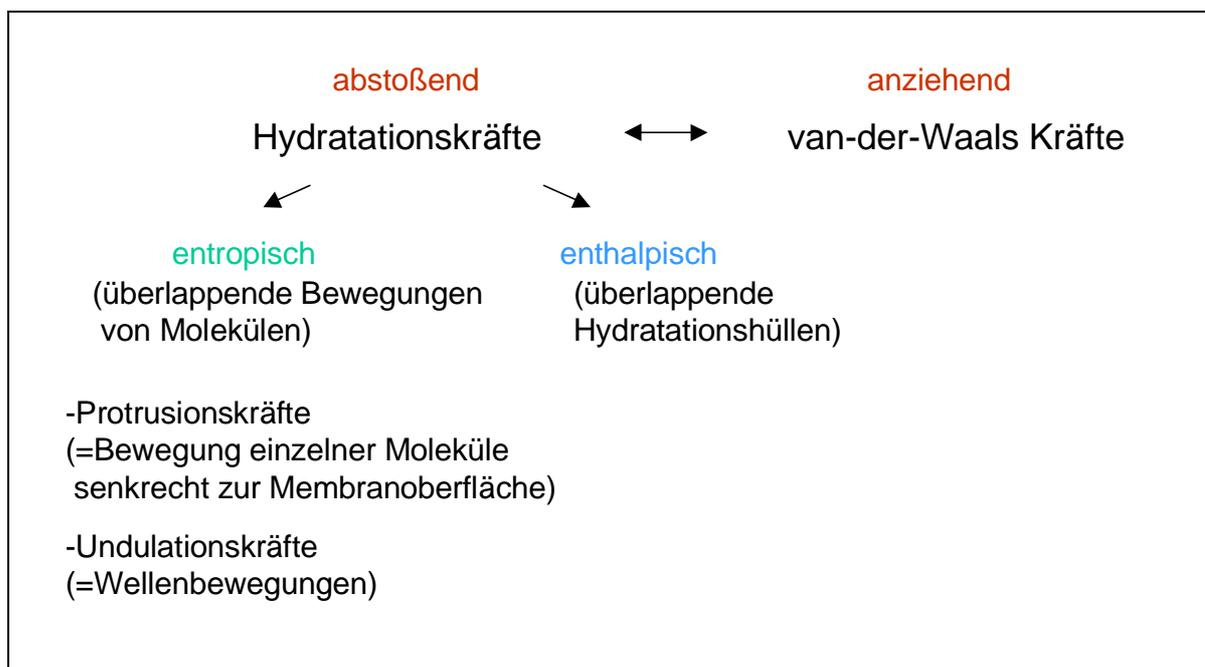
¹hydrophob bedeutet im Allgemeinen "wasserabstoßend" muss aber eigentlich besser unpolar heißen; Wasser meidet den Kontakt zu diesen Molekülgruppen (HAYMET, ET AL. 1996).

relevanten lamellaren Doppelschicht entfernen, je mehr die Form ihrer Individuen von der eines Zylinders abweicht. Es vernachlässigt allerdings chemische Eigenschaften, wie das starke Interaktionspotential der polaren Molekülteile der Lipide.

Die strukturelle Vielfalt der Lipide ergibt sich aus den Variationsmöglichkeiten in allen Molekülregionen: den polaren Kopfgruppen, der polar / apolaren Grenzschicht (Interface) und den apolaren Ketten (s. Üb. 1.2.1). Da in natürlichen Membranen Lipidgemische vorliegen, werden Phasenübergänge unscharf bzw. verschwinden ganz. Somit haben die Organismen die Möglichkeit, mit der Kombination unterschiedlicher Lipide die Membranen optimal an ihren Lebensraum und / oder die verschiedenen Aufgaben anzupassen, z. B. wird die Fluidität der Membran durch Erhöhung des Anteils von Lipiden mit ungesättigten Acylresten größer.

Die Strukturen (Phasen), die Lipide durch Selbstassemblierung bilden, hängen in erheblicher Weise auch von den Wechselwirkungskräften mit Wassermolekülen ab. Die hydrophilen Bereiche der Lipide hydratisieren und bilden die polare Grenzfläche der Membran. Zur Charakterisierung der in und zwischen Membranen wirkenden Kräfte existieren zahlreiche Untersuchungen z. B.: KATSARAS AND JEFFREY (1997). [Schema 1.3.1](#) gibt eine grobe Übersicht zu den zwischen Membranen wirkenden Kräften.

Schema 1.3.1 Kräfte zwischen wechselwirkenden Membranen



Van-der-Waals Wechselwirkungen führen zu Attraktionen während die sogenannten Hydratationskräfte im Nahbereich, d. h. bei Abständen von ca. 1 - 3 Nanometern abstoßend wirken. Sowohl entropische (durch überlappende Bewegungen von Molekülen in den wechselwirkenden Membranen) als auch enthalpische (durch überlappende Hydratationshüllen der wechselwirkenden Membranen) Ursachen werden diskutiert.

1.4. Zielsetzung

Die Lipidkopfguppe ist als Wasserbindungsort für das Hydratationsverhalten von entscheidender Bedeutung (NAGLE AND TRISTRAM-NAGLE, 2000; SEDDON ET AL., 1997; WECK ET AL., 1997; MCINTOSH, 1996; GAWRISCH ET AL., 1992). Sie ist außerdem aufgrund ihrer zwischenmolekularen Wechselwirkungen mit der Umgebung allgemein oder mit Komponenten, wie anhaftenden Proteinen oder Sterolen, im speziellen (PRENNER ET AL., 1999; WATTS, 1998; WIESE ET AL., 1998), als Angriffsort für Phospholipasen oder bei der Erkennung durch synaptische Strukturen (KARLSON ET AL., 1994) vom biologischen Standpunkt aus sehr interessant.

Auf die Besonderheiten der Einflüsse der Kopfgruppenstrukturen der Lipide auf das **Hydratationsverhalten** wurde bisher selten eingegangen (HÜBNER AND BLUME, 1998; JENDRSIAK, 1996; ULRICH AND WATTS, 1994A; ULRICH AND WATTS, 1994B; MCINTOSH AND MAGID, 1993; HAUSER, 1975). Das gilt auch für IR-spektroskopische Untersuchungen, da hierbei zumeist die Ketten- und Interfaceregion im Zentrum der Aufmerksamkeit standen (LEWIS AND MCELHANEY, 2002; MANTSCH AND MCELHANEY, 1991; CASAL AND MANTSCH, 1984). Die Untersuchungen der lipidtypischen funktionellen Untereinheiten des **polaren Molekülteils** bilden deshalb in dieser Arbeit einen Schwerpunkt.

Systematische Variationen der Strukturen der Lipide im Kopfgruppen- und Kettenbereich, z. B. die Untersuchung von Phosphocholin-Kopfgruppenfragmenten und deuterierten Lipiden dienen der **Entflechtung der Einflüsse** der einzelnen Molekülgruppen auf das Hydratations- und Phasenverhalten. Die Substanzen, die für die Bearbeitung dieser Zielstellung als geeignet befunden wurden, sind in [Tab. 1.4.1](#) dargestellt.

Die Erforschung der Wechselwirkungen von bestimmten Molekülstrukturen von Lipiden und Lipidmodellen mit Wasser stellt eine Erweiterung des Grundlagenwissens dar und kann die Interpretation der Wechselwirkungen von Membranen mit komplizierteren Systemen wie Peptiden oder Pharmaka erleichtern. Wasser ist mit der IR-Spektroskopie gut detektierbar. Wassermoleküle sind selbst polar und damit zur Sondierung der polaren Lipidregion prädestiniert. Die Kleinheit

des Wassermoleküls erhöht zusätzlich sein Interaktionspotential im Vergleich zu anderen polaren Molekülen. Die Omnipräsenz von Wasser in der belebten Welt belegt die biologische Relevanz ohnehin.

Tab. 1.4.1 Verwendete Lipide und Modellsubstanzen

Name	Abkürzung	TMA	NH _n	PO ₄ ⁻	C=O	OH	Ladung	Hersteller
Dicaproylphosphatidylcholin	DCPC = DDPC ²	x		x	x			Sigma*
Dilauroylphosphatidylcholin	DLPC	x		x	x			Avanti*
Dimyristoylphosphatidylcholin	DMPC	x		x	x			Bachem*
Dipalmitoylphosphatidylcholin	DPPC	x		x	x			Bachem*
Distearoylphosphatidylcholin	DSPC	x		x	x			Bachem*
Dibehenoylphosphatidylcholin	DBPC	x		x	x			Sigma*
d 4 = 4 Deuteronen	DMPC-d4	x		x	x			Avanti*
d 13 = 13 Deuteronen	DMPC-d13	x		x	x			Avanti*
d 54 = 54 Deuteronen	DMPC-d54	x		x	x			Avanti*
d 67 = 67 Deuteronen	DMPC-d67	x		x	x			Avanti*
Diphytanoylphosphatidylcholin	DPhPC	x		x	x			Avanti*
Diphytanoylphosphatidylethanolamin	DPhPE		x	x	x			Avanti*
Dicaproylphosphatidylethanolamin	DCPE		x	x	x			Avanti*
Tetraoleoylcardiolipin	Cardiolipin			x	x	x	-	Avanti*
Dioleoylphosphatidylglycerol	DOPG			x	x	x	-	Sigma*
Dioleoylglycerol	DOG				x	x		Sigma*
Monoglucosyldiacylglycerol	MGDG				x	x		Lewis**
Diglucosyldiacylglycerol	DGDG				x	x		Lewis**
Dimyristoyltrimethylammoniumpropan	DMTAP	x			x		+	Avanti*
Dioleoyltrimethylammoniumpropan	DOTAP	x			x		+	Avanti*
Dioleoyloxypropyltrimethylammoniumchlorid	DOTMA	x					+	Ansell**
Methylphosphocholin	MePC	x		x				Rattay**
Acetylcholin	ACh	x			x			Sigma*
Cholin	-	x				x		Sigma*
Tetramethylammoniumchlorid	TetraMAC	x						Fluka*
Stearyltrimethylammoniumchlorid	StearylTriMAC	x					+	Fluka*
Stearylamin	-		x					Sigma*
Stearylalkohol	-					x		Sigma*

*Avanti Polar Lipids (Birmingham, USA); Bachem (Heidelberg); Fluka (Neu-Ulm); Sigma Co. (München);

**S. Ansell (INEXpharm, Vancouver, Kanada); R.N.A.H. Lewis (University of Alberta, Edmonton, Kanada); B. Rattay (Martin-Luther-Universität, Halle);

1.5. Methoden zur Untersuchung von Lipiden

1.5.1. FTIR-Spektroskopie

Die Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) -Spektroskopie ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung von Biomolekülen und Wasser sowie der Wechselwirkungen zwischen ihnen. Sie ist hochempfindlich, nicht invasiv, und sie erlaubt die Beobachtung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie weiterer direkter und indirekter Einflüsse des Wassers auf bestimmte Molekülgruppen, die anhand von Verschiebung und / oder Verformung von Absorptionsbanden sichtbar werden (vgl.

² DDPC = DCPC, da decanoyl = caproyl; wurde aufgrund der Veröffentlichungen (GAUGER ET AL., 2001A) im Kap. 3.3.1.1. als DDPC und im Kap. 3.3.1.2. als DCPC (POHLE ET AL., 2002) bezeichnet.

Kap. 2.2.2.). Die FTIR-Spektroskopie ist häufig die Methode der Wahl zur Charakterisierung von Modellmembranen aus Lipiden oder Lipidgemischen oder auch Mischungen mit anderen Biomolekülen (Proteinen, Peptiden, Cholesterol, DNA etc. z. B.: INFRARED SPECTROSCOPY OF BIOMOLECULES (1996)). Deshalb wurde sie als Hauptmethode dieser Arbeit gewählt. Mit attenuated total reflection - Lineardichroismus (**ATR-LD**)-FTIR-Spektroskopie lassen sich zusätzlich Orientierungen von Molekülgruppen bestimmen.

Ein Beispiel für einen FTIR-spektroskopisch gemessenen Hydratationsscan (vgl. Kap. 2.2.1.) eines Lipids ist in Abb. 1.5.1.1 gegeben. Die Zunahme der Intensität der Bande der OH-Streckschwingungen bei 3400 cm^{-1} (großer oranger Pfeil) ist proportional zu der Menge des vom Lipid adsorbierten Wassers. Die kleinen orangen Pfeile kennzeichnen Intensitätssprünge der Bande der antisymmetrischen Methylenstreckschwingungen während des Hydratationsscans von DPhPC. Somit ist es möglich, die Hydratation direkt zu verfolgen (s. Kap. 2.2.1. und 3.1.1.). Änderungen molekularer Eigenschaften (z. B.: der Konformation) können in Zusammenhang mit der Hydratation gebracht werden (s. Kap. 3.1.2.).

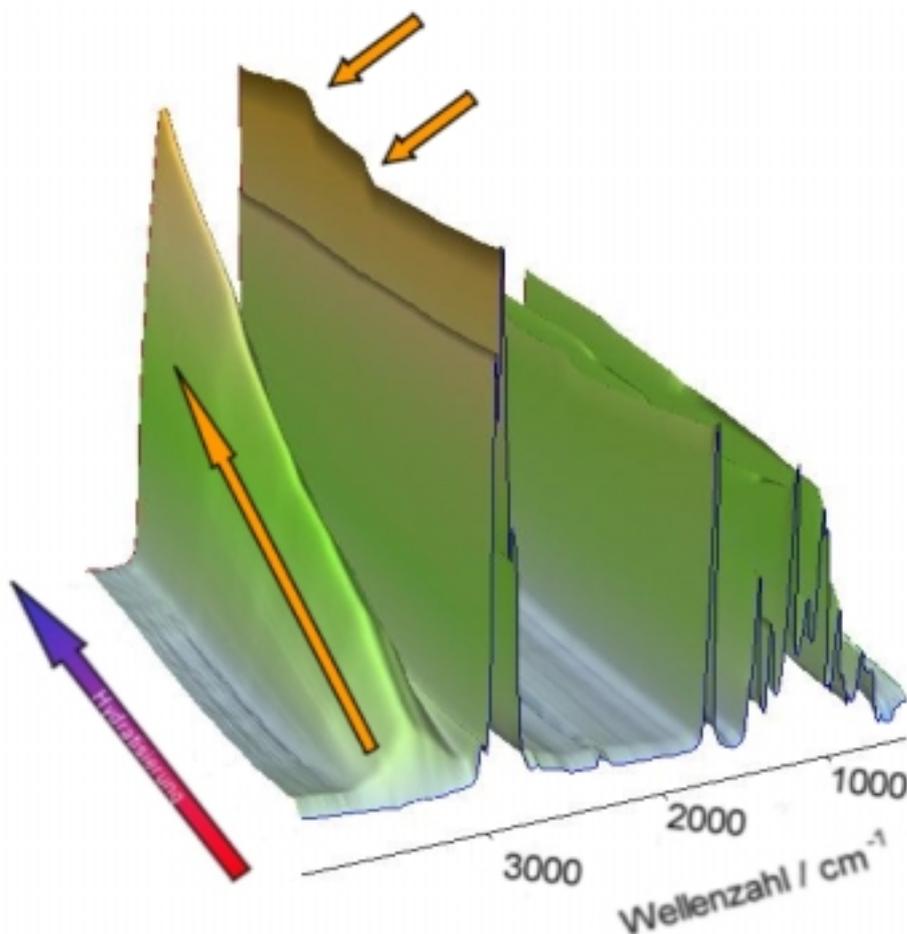


Abb. 1.5.1.1 Die quasi-dreidimensionale Darstellung eines Hydratationsscans von DPhPC. Sie wurde durch Bilden einer Fläche aus allen aufgenommenen Spektren erzeugt (Anfangsspektrum dunkelblau). Der blau-rote Pfeil zeigt die Richtung der Hydratation an, orange Pfeile s. Text.

1.5.2. Ergänzende Methoden

Komplementär zu den IR-spektroskopischen Untersuchungen liefern **Röntgenbeugung**, **Elektronenmikroskopie**, **Karl-Fischer-Titration** und **Gravimetrie** wertvolle Informationen zum Hydratations- und Phasenverhalten von Lipiden (vgl. Kap. 2.2.). Es kann weitgehende Identität der Versuchsbedingungen für alle genannten Methoden gewährleistet werden. Mit der Methode der Röntgenbeugung können Beugungsmuster bestimmter Lipidphasen sichtbar gemacht werden. Durch die Verwendung von Synchrotronstrahlung ist es möglich, Verläufe von Phasenübergängen während der Hydratation zeitaufgelöst zu verfolgen und Korrelationen mit den Ergebnissen der IR-Spektroskopie herzustellen (s. Abb. 1.5.2.1). Elektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichen die direkte Betrachtung der Lipidphasen und den Vergleich der Phasendimensionen mit Röntgenbeugungsergebnissen. Direktmessungen des Wassergehalts verschiedener Lipide mit der Karl-Fischer-Titration oder Gravimetrie erlauben die Bestimmung von Lipid-Wasser-Stöchiometrien.

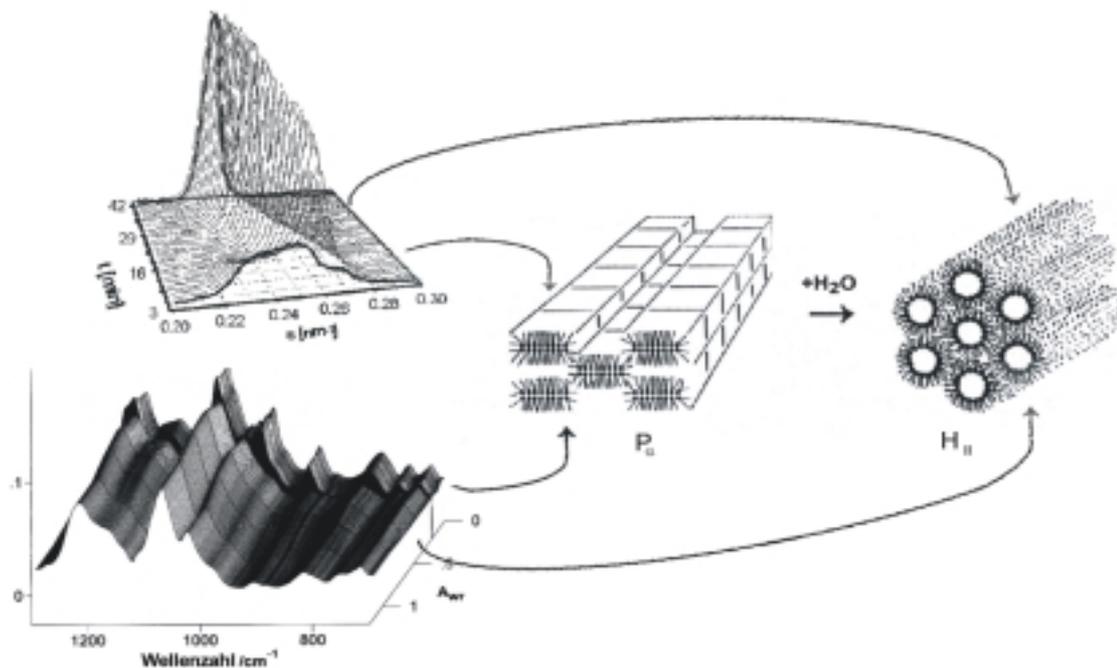


Abb. 1.5.2.1 Lyotroper Übergang von der P_{α} - in die H_{II} -Phase von Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE): unten links die quasi-dreidimensionale Auftragung der IR-Spektren eines Hydratationsscans (A_{wr} als Maß der Wasseradsorption, s. Kap. 3.1.1.) im Bereich der Banden der Phosphatstretschwingungen mit deutlichen, an der „Bruchkante“ erkennbaren, Intensitäts- und Wellenzahlsprüngen. Darüber sind die äquivalenten Röntgenbeugungsmuster in Abhängigkeit von der Zeit = t (zunehmende Hydratation) aufgetragen. Die Pfeile verbinden die experimentellen Daten mit den schematischen Abbildungen der zugehörigen Phase. (POHLE ET AL., 2001A; POHLE AND SELLE, 1996)

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verwendete Substanzen

Alle aufgeführten Lipide und Modellsubstanzen (s. Tab. 1.4.1) wurden ohne weitere Reinheitsprüfung direkt vom Hersteller verwendet. Als Lösungsmittel dienten Chloroform und Methanol der Firma Merck KGaA (Darmstadt) mit dem Reinheitsgrad für die UV-Spektroskopie. Die Substanzen für die Feuchtemessungen (s. Tab. 2.2.1.1) vom VEB Laborchemie Apolda besaßen Synthesequalität.

2.1.2. Probenpräparation

Die Proben für die Infrarotspektroskopie wurden auf Zinkselenid-Fenster (Fa. Vitron, Jena) mit \varnothing 25 mm, Dicke \approx 2 mm und einem Transmissionsbereich bis 450 cm^{-1} aufgetragen. Aus Chloroform- oder Methanollösungen von Lipiden (Konzentration 10 mg/ml) konnten durch vorsichtiges Verstreichen mit Hilfe eines Spatels unter Verdampfen des Lösungsmittels orientierte Multischichten mit einer Masse von ca. 600 μg erhalten werden (entspricht durchschnittlich 300 - 500 Lipid-Monoschichten). Die so präparierten Filme zeigten eine verbesserte Auflösung ihrer Spektren durch Erreichung schärferer Bandenformen im Gegensatz zu unverstrichenen Filmen (SELLE, 1999).

Für die Röntgenbeugungsexperimente wurden 100 – 150 μl (aus Intensitätsgründen) der gleichen Lipidlösungen unter Verdampfen des Lösungsmittels auf Glimmerfenster (Fa. Jahre, Wilhelmshaven) mit \varnothing 10 mm und einer Dicke von 0.3 mm aufgetropft. So wurden sogenannte Pulverproben, das heißt nicht zwingend trocken sondern unorientiert im Sinne von schlechterer Schichtung der Lipidlayer (verglichen mit den IR-Proben), erhalten. Dadurch wird es möglich, ohne definierten Einstrahlwinkel (s. Kap. 2.2.3.) Streumuster der statistisch orientierten Lipidstrukturen zu erhalten.

Die Karl-Fischer-Titrationsexperimente erforderten ebenfalls größere Substanzmengen, um den Wägefehler (s. Kap. 2.2.4.) gering zu halten. Ungefähr 1 mg Lipid wurde aus chloroformischen Lösungen auf Zinkselenidfenster aufgetragen. Für die drei genannten Methoden wurden Küvetten (s. Abb. 2.1.2.1) in Anlehnung an *Omni*-Küvetten (Graseby Specac, Großbritannien) verwendet, die mit Hilfe eines Messingzylinders ein definiertes Gasvolumen um den Lipidfilm gewährleisteten und über einen Stutzen die Applikation von Glaskölbchen mit Salzen, gesättigten Salzlösungen oder Wasser zur Feuchteregulierung (s. Kap. 2.2.1.) ermöglichten. Die Gummiringe dienten jeweils als Abdichtung des Gasraumes und als Druckfänger für

die empfindlichen ZnSe- / Glimmer-Fenster gegen die Verschraubung. Die äußeren Metallplatten dienen der Fixierung der Bauteile und als Adapter für die Halterung im Spektrometer.

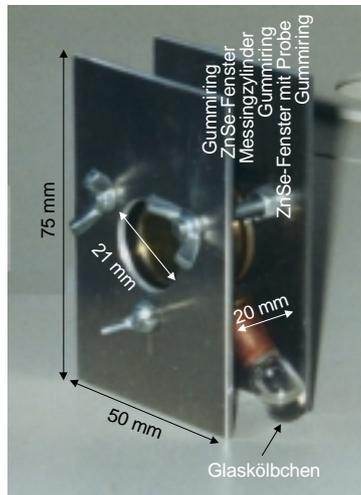


Abb. 2.1.2.1 Reihenfolge der Bauteile der Küvette für die Experimente mit FTIR-Spektroskopie und Karl-Fischer-Titration. Für die Röntgenbeugungsexperimente sind die Durchmesser der Fenster, der Öffnungen in den Aluminiumdeckplatten, des Messingzylinders und das Fenstermaterial verändert (vgl. Text). Der Messingzylinder ist mit einem leeren Fenster mit Klebstoff fest verbunden, weshalb ein Gummiring zwischen diesen beiden überflüssig ist.

2.2. Physikochemische Untersuchungsmethoden

2.2.1. Hydratisierung = Hydratation³

Zwei grundsätzliche Möglichkeiten der Hydratisierung der Lipidproben wurden in dieser Arbeit verwendet (POHLE ET AL., 1998). Die Einstellung einer bestimmten relativen Feuchte wurde mittels gesättigter Salzlösungen beziehungsweise Wasser oder ungelösten Substanzen (s. Tab. 2.2.1.1 (GREENSPAN, 1999)) in kleinen Glaskölbchen über den die Probe umgebenden Gasraum realisiert (s. Abb. 2.1.2.1, WEAST AND ASTLE, 1980; O'BRIEN, 1948). Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (27°C) durchgeführt. Bei dieser Verfahrensweise wurde die Probe *stationär* bei einer bestimmten Feuchte (i. d. R. über Nacht, jedoch mindestens 3 Stunden) bis zur Gleichgewichtseinstellung equilibriert und vermessen (32 Scans pro Spektrum).

Bei der *nichtstationären* Methode wurden Hydratisierungs- oder Dehydratisierungsscans durchgeführt. Nichtstationär bedeutet, dass z. B. an eine trockene Probe im Gleichgewicht bei 0% relativer Luftfeuchte (RF) ein wassergefülltes Kölbchen (100% RF) appliziert und Hydratisierungseffekte durch dicht aufeinander erfolgende Messungen (üblicherweise 1 Messung pro Minute, 2

³ Unter Hydratation wird die Solvation in Wasser als Lösungsmittel verstanden, wobei sich Wasser unter Beibehaltung seiner H-OH-Bindung an Ionen, Elektronen, Atome, Moleküle oder Kolloide anlagert. In der englischen Sprache wird allerdings kein Unterschied zwischen Hydratation und Hydratisierung gemacht, so dass auch in dieser Arbeit eine Gleichsetzung erfolgte (RÖMPP CHEMIELEXIKON, 1995).

Scans pro Spektrum) direkt beobachtet wurden (POHLE ET AL., 1998). Die nichtstationäre Methode hat sich als ein zeitsparendes „screening“ zum schnellen Auffinden hydratisierungsgetriebener Effekte, z. B. von Phasenübergängen in den Lipidfilmen, bewährt.

Tab. 2.2.1.1 Salze bzw. sonstige Substanzen und ihre zugehörigen RF-Werte

Substanz	RF in %	Verwendungsform
K ₂ SO ₄	98	gesättigte Lösung
BaCl ₂	88	"
KCl	86	"
KBr	84	"
(NH ₄) ₂ SO ₄	80	"
NaCl	76	"
NaNO ₂	66	"
NaBr	59	"
KNO ₂	45	"
K ₂ CO ₃	44	"
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	33	"
CaCl ₂	31	"
KAc	23	ungelöste Substanz
LiCl	15	"
NaOH	5	"
P ₂ O ₅	0	"

2.2.2. FTIR-Spektroskopie

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie ist, wie in [Kap. 1.5.1.](#) schon erwähnt, eine seit Jahrzehnten etablierte Methode zur Charakterisierung von Biomolekülen (LEWIS AND McELHANEY, 2002; INFRARED SPECTROSCOPY OF BIOMOLECULES, 1996; POHLE AND FRITZSCHE, 1990). Die Methode beruht auf der Eigenschaft der Moleküle beziehungsweise Molekülgruppen, bei Frequenzen zu schwingen, die im Bereich des mittleren Infrarot liegen. Die Vorteile der Methode liegen darin, dass sie nicht invasiv ist, d.h. der Einbau von Sonden, der zu Artefakten führen kann, ist überflüssig. Die charakteristische Zeitskala liegt bei 10^{-12} s. Die Methode ist somit schnell genug, um Momentaufnahmen der Moleküle zu ermöglichen. Die zur Frequenz der Molekülschwingung proportionale Größe Wellenzahl [in cm^{-1}] erlaubt den Zugang zur Molekülphysik.

Die relativ komplizierten Infrarotspektren von Lipiden weisen eine große Anzahl von Banden auf. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden viele Banden Molekülgruppenschwingungen zugeordnet und zu deren Charakterisierung herangezogen (POHLE ET AL., 2000; GOMEZ-FERNANDEZ AND VILLALAIN, 1998; WINTER UND NOLL,

1998; BRANDENBURG ET AL., 1997; LEWIS AND MCELHANEY, 1996; MANTSCH, 1991, 1984; FRINGELI AND GÜNTARD, 1981).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Messergebnisse wurden mit einem FT-Spektrometer IFS 66 (s. Abb. 2.2.2.1) der Firma Bruker (Karlsruhe) gesammelt. Die Probenkammer wird zur Vermeidung von Wasserdampf- und Kohlendioxidabsorptionen mit Trockenluft gespült (Adsorptionstrockner der Fa. Zander, Essen). Das Spektrometer ist mit einem automatischen Probenwechsler ausgestattet, der dicht hintereinander folgende Messungen von Referenz- und Probenküvette ohne Öffnung der Probenkammer und größere zeitliche Differenzen erlaubt. Als Strahlungsquelle dient ein Globalar (Siliciumcarbid / KBr), der durch thermische Anregung vorzugsweise im mittleren infraroten Frequenzbereich emittiert. Die Temperatur wird mit Hilfe eines Wasserumlaufkühlers reguliert. Mit einem DTGS (deuteriertes Triglycinsulfat)-Detektor/KBr ($10000 - 180 \text{ cm}^{-1}$) werden die Interferogramme detektiert.

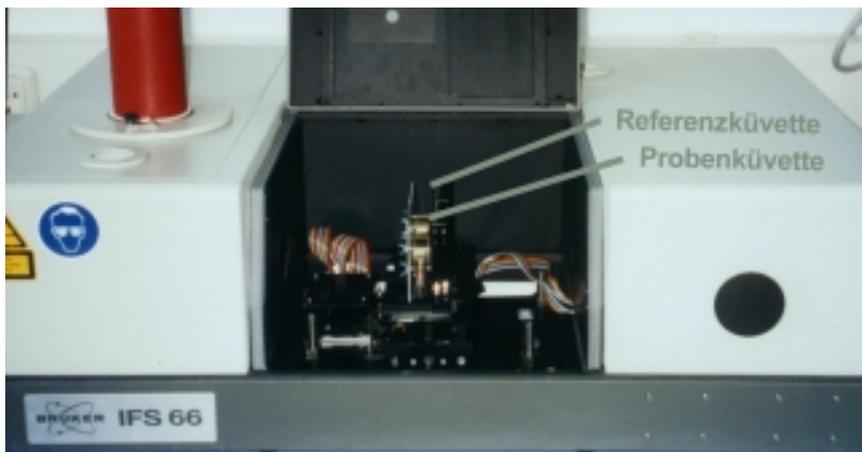


Abb. 2.2.2.1 IR-Spektrometer IFS 66 mit geöffnetem Probenraum, in dem Proben- und Referenzküvette zu sehen sind. Diese sind in einer Halterung auf dem Probenschlitten arretiert.

Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit den Auswerterroutinen der Brukersoftware OPUS 2.0, 2.1 und 3.1. Bei den stationären Hydratisierungsmethoden wurden 32 Scans, bei den dynamischen jeweils 2 Scans zu einem Spektrum akkumuliert. Für die Generierung der IR-Spektren aus den Interferogrammen mittels Fouriertransformation wurden eine Apodisierungsfunktion nach Hepp und Genzel, der Phasenkorrekturmodus nach Mertz und ein zero-filling-Faktor von 2 verwendet. Spektren im absorbance- (engl.) bzw. Extinktions-Modus⁴ mit einer Auflösung $< 2 \text{ cm}^{-1}$ wurden zur Anzeige gebracht und weiter verwendet. Aufgrund unterschiedlicher Äquilibrierungszeiten (bezüglich RF) in Proben- und Referenzküvette bei den dynamischen Messungen kam eine Überlagerung der Lipidspektren mit Wasserdampfabsorptionen zustande. Darum sind

⁴ Extinktion (E) ist eine Bezeichnung für den Ausdruck $\log(1/T)$ [früher $\log(I_0/I)$]; I = Intensität, T = Transmission.

Wasserdampfspektrensubtraktion und Glättungsroutinen (9 bis maximal 21 Glättungspunkte) angewendet worden. Bei schlecht oder gar nicht orientierten Proben waren zum Teil Basislinienkorrekturen notwendig. Die peak-picking-Routine von OPUS konnte zur Bestimmung der Wellenzahl des Bandenmaximums sowie der Halbwertslinienbreite genutzt werden, wobei eine Basislinie in manuell vorgegebenen Grenzen bzw. den Peak am günstigsten beschreibenden Frequenzbereichen automatisch bestimmt wurde.

In ausgewählten Fällen wurde der Bandenschwerpunkt (COG = centre of gravity) zur Charakterisierung hydratisierungsinduzierter Bandenverschiebungen verwendet, da dieser empfindlicher für Bandenverschiebungen ist:

$$COG = \frac{\int_{\tilde{\nu}_1}^{\tilde{\nu}_2} \tilde{\nu} \cdot A(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int_{\tilde{\nu}_1}^{\tilde{\nu}_2} A(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}$$

Als Integrationsgrenzen $\tilde{\nu}_1$ und $\tilde{\nu}_2$ wurden Wellenzahlen gewählt, die in etwa gleichen Extinktionswerten von 20% - 60% des Maximalwertes an der linken und rechten Flanke der jeweiligen Bande entsprachen (BINDER, 2000).

Infrarotlineardichroismus

Lineardichroismus-Spektren wurden in Kooperation mit Dr. H. Binder (Universität Leipzig) aufgenommen. Die Proben werden auf einen ZnSe-ATR-Kristall aufgetragen. Ein IR-Strahl wird durch den Kristall mehrfach total reflektiert. Durch Eindringen des Strahls in die aufliegenden Lipidschichten entsteht ein IR-Spektrum. Durch Änderung der Polarisationsrichtung des einfallenden Strahls können Orientierungen der Lipidmolekülgruppen aus dem dichroitischen Verhältnis

$$R = A_{||} / A_{\perp}$$

ermittelt werden. Dazu wurden die integralen Extinktionen einer IR-Bande (A) mit parallel ($_{||}$) und senkrecht ($_{\perp}$) zur Einfallsebene polarisierter Strahlung gemessen (BINDER, 2000). Daraus lässt sich der IR-Ordnungsparameter (S_{IR}) berechnen:

$$S_{IR} = (R - K_1) / (R + K_2)$$

Die Konstanten K_1 und K_2 sind Funktionen der Feldstärke am Ort der Wechselwirkung zwischen der IR-Strahlung und den Übergangsdipolen der schwingenden Atomgruppen und sind von der Geometrie und den optischen Eigenschaften des Gesamtsystems abhängig (ZnSe-Kristall $K_1 = 2$ und $K_2 = 2.55$) (VOGEL, 2001; BINDER AND SCHMIEDEL, 1999).

2.2.3. Röntgenbeugung

Für Strukturen der Größenordnung 1 - 100 nm liefert die Methode der Röntgenbeugung wertvolle Informationen in Form eines diffusen Streubildes. Da die lyotropen Lipidphasen teilgeordnete Strukturen aufweisen, sind Reflexe sowohl im Kleinwinkel- als auch im Weitwinkelbereich messbar. Letztere sind aussagekräftig zu Dimensionen und Anordnungen der Überstrukturen der Lipidmoleküle. (z. B. s. Abb. 1.5.2.1) (POHLE ET AL., 2001A; BINDER ET AL., 1998; LUZZATI AND TARDIEU, 1974; LUZZATI, 1968). Die Verwendung der Synchrotronstrahlung erlaubt zeitaufgelöste Messungen.

Die Messungen wurden am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg unter Betreuung von Dr. M.H.J. Koch (EMBL) am HASYLAB (Speicherring DORIS) an der Beamline D1/2 durchgeführt (s. Abb. 2.2.3.1). Die Anlage ermöglicht gleichzeitiges Messen von Klein- und Weitwinkelreflexen ($s = 0.05 - 0.9 \text{ nm}^{-1}$) mit einer doppelfokussierenden Monochromator-Spiegelkamera X33 (BOULIN ET AL., 1986; KOCH AND BORDAS, 1983) mit einem linearen Detektor. Die Wellenlänge der verwendeten Strahlung entspricht der CuK_α -Strahlung mit 0.15 nm.

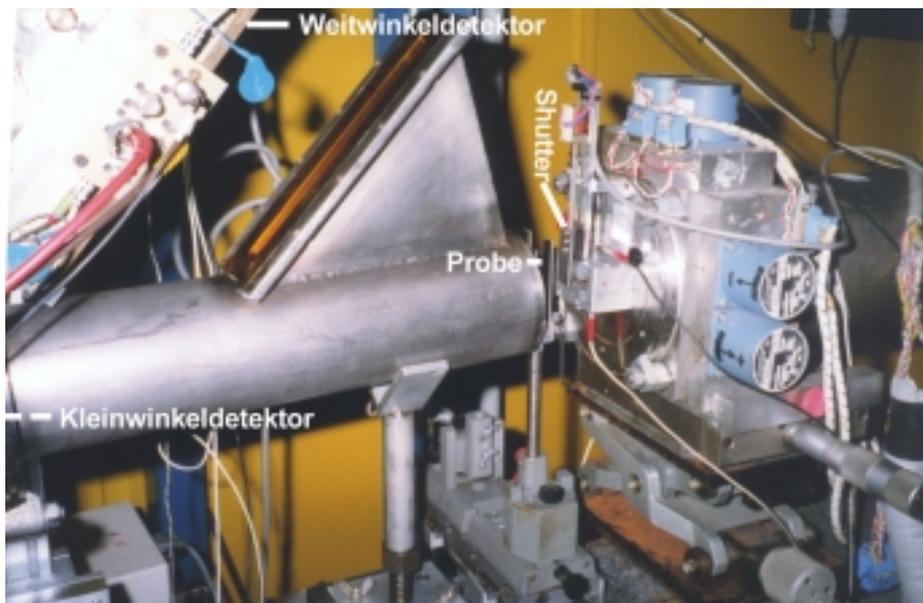


Abb. 2.2.3.1
Beamline D1/2 am
DESY Hamburg. (der
Kleinwinkeldetektor
befindet sich
außerhalb des
Bildausschnitts am
Ende der markierten
Röhre)

Die Wahrscheinlichkeit einer Degradation der Lipide wurde durch Einsatz eines automatischen Aluminiumshutters, der bei den dynamischen Messungen während der Zeiträume zwischen den Messungen zwischen die Probe und die Röntgenstrahlenquelle geschoben wurde, verringert. Die Integrität der Lipide wurde durch Reversibilität der Messergebnisse bewiesen.

Die Expositionszeiten betragen für die stationären Messungen 3, 6 und 9 Minuten (je nach Intensität der Reflexe), bei den dynamischen Messungen zu Beginn eines

Scans 30 Sekunden und 1 min Abstand zwischen den Messungen und wurden bei Verlangsamung des Prozesses auf 1 Minute Expositionszeit und 5 min Abstand der Messungen erhöht. Üblicherweise wurden die Messungen bei Raumtemperatur (26 ± 1 °C) durchgeführt. Temperierte Messungen konnten mit einem Küvetten-Adapter, der mit einem Thermostaten (Fa. Haake, Karlsruhe) verbunden ist, realisiert werden. Mit Hilfe des Programms OTOKO/SAPOKO (BOULIN ET AL., 1986; KOCH AND BORDAS, 1983) wurden die erhaltenen Daten verarbeitet. Von allen aufgenommenen Diffraktionsmustern wurde zuerst ein Referenzmuster (Küvette ohne Probe) abgezogen, um die Reflexe der Apparatur (Kapton des Detektorfensters) und das Hintergrundrauschen der umgebenden Luft zu minimieren. Dann wurden die Streulängen mit Hilfe einer Tripalmitinpulverprobe (mit bekannten Dimensionen ihrer Reflexe) für den jeweiligen Aufbau geeicht. Die Daten wurden dann in ein Origin- (Microcal Software, Northampton, USA) und / oder SigmaPlot- (SPSS, Inc., Richmond, USA) kompatibles Dateiformat gewandelt und somit für peak-picking-Routinen zugänglich gemacht.

Die dreidimensionalen (3D) Darstellungen von Hydratisierungsscans von Diffraktogrammen und IR-Spektren wurden mit der 3D-OPUS Software (Bruker, Karlsruhe) erstellt.

2.2.4. Karl-Fischer-Titration

Ein schnelles und genaues Verfahren zur Bestimmung von geringen Wassergehalten in verschiedensten Stoffen ist die Karl-Fischer-Titration. Das Grundprinzip besteht darin, dass Wasser mit Schwefeldioxid und Iod reagiert. Die Reaktion läuft in methanolischen Medien über Methylsulfid ab, welches dann in Gegenwart von Iod und Wasser zum Methylsulfat oxidiert wird. Als Basen fungieren Diethanolamin und Imidazol. Iod wird elektrochemisch an einer Platinelektrode direkt in der Reagenz erzeugt. Zur Bestimmung des Titrationsendpunktes wird mit Hilfe zweier Platinelektroden ein Strom in der Reagenzlösung gemessen. Der Indikatorstrom ist proportional zur überschüssigen Iodkonzentration in der Reagenzlösung (Hydranal coulomat, Sigma Co., München). Überschüssiges Iod tritt in dem Moment auf, wenn das gesamte Wasser aus der Probe bereits umgesetzt wurde.

Der „Karl-Fischer-Titrator Aqua 30.00“ (ECH (Elektrochemie), Halle, [s. Abb. 2.2.4.1](#)) wurde eigens mit einer Dosierschleuse ausgestattet, die die direkte Titration der Lipidfilm-Proben auf ZnSe-Fenstern erlaubt. Die gewählte Temperatur in der Dosierkammer von 110°C garantiert ein vollständiges Verdampfen des von der

Probe adsorbierten Wassers. Die Probendosierung erfolgt unter Argonzuleitung, um von der Umgebung eingetragene Wassermengen möglichst gering zu halten. Zur Bestimmung des Eintrags an Wasser aus der Luft beim Überführen der Probe aus der Küvette in den Karl-Fischer-Titrator wurde vor jeder Messung ein Vergleichswert von einem ZnSe-Fenster ohne Probe bestimmt. Die Wassermenge [in μg] wird durch Integration der Titrationskurve erhalten.

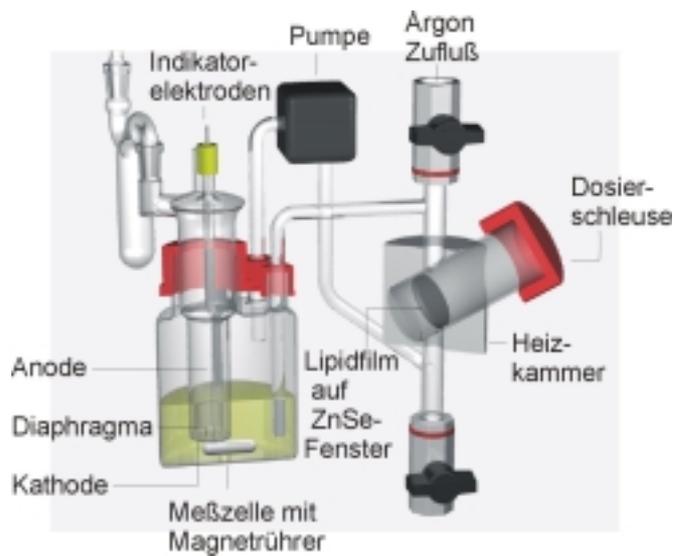


Abb. 2.2.4.1 Schematischer Aufbau des Aqua 30.0 Titrators links, fotografische Abbildung rechts.

Um die Masse des Lipidfilms zu ermitteln, wurden die Proben unter P_2O_5 mind. 24h getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre direkt auf dem ZnSe Fenster gewogen (Mikrofeinwaage M5P der Fa. Sartorius, Göttingen). Infolge des geringen Gewichts der Lipidfilme ($\leq 1 \text{ mg}$) im Vergleich zu dem hohen Gewicht der ZnSe-Fenster (ca. 4.5 g, Spezialanfertigung der Firma Vitron, Jena) wurde im obersten Bereich der Wägegenauigkeit der Waage gemessen, und somit war die Wägung die größte Fehlerquelle. Es wurden deshalb mindestens 6 Wägungen pro Probe durchgeführt. Vor und nach der Wägung sowie vor und nach der Titration wurde der Wassergehalt der Proben IR-spektroskopisch geprüft (GAUGER ET AL., 2001B).

Die Karl-Fischer-Titration ist aufgrund des unvermeidbaren kurzzeitigen Kontakts der Proben mit der normalen Luftfeuchtigkeit für manche (sehr hygroskopische oder schnell wasserabgebende) Substanzen ungeeignet.

2.2.5. Elektronenmikroskopie

Gemeinsam mit Dr. W. Richter (Friedrich-Schiller-Universität Jena) wurden Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Strukturen mit Dimensionen bis < 4 nm können aufgelöst werden und die fotografische Betrachtung von Lipidphasen ermöglichen. Eine größere Menge Lipid (> 2 mg) wurde aus der Chloroformlösung unter Verdampfen des Lösungsmittels auf einen Objektträger aufgebracht und in einer Kammer über die umgebende Luft hydratisiert. Mit Hilfe von zwei Kupferbänkchen, von denen eines in die Lipidmasse und danach mit dem anderen Bänkchen zusammen gedrückt wurde, stellte man ein „Lipidsandwich“ her, das in flüssigem Propan und anschließend in flüssigem Stickstoff sofort eingefroren wurde. Durch Auseinanderklappen der beiden Bänkchen zerfällt die Lipidmasse in zwei Gefrierbruchpräparathälften, welche durch anschließende Platin- und Kohlebedampfung für das Elektronenmikroskop sichtbar gemacht wurden. Die in Wasser abgeschwemmten und auf Kupfergitter aufgenommenen, beschichteten Proben wurden dann elektronenmikroskopisch betrachtet (Geräte- und Methodenspezifikationen in (MEYER AND RICHTER, 2001; MEYER ET AL., 2000)).

2.2.6. Gravimetrie

In Kooperation mit Dr. H. Binder (Universität Leipzig) wurden gravimetrische Messungen durchgeführt. Die Methode erlaubt die direkte Messung der Masse des adsorbierten Wassers an einen Lipidfilm unter Variation der umgebenden Feuchte und / oder der Temperatur. Zirka 0.5 mg trockenes Lipid wurden in ein computergesteuertes Feinwaagesystem eingebracht. Die Messkammer wurde von einem Stickstoffgasstrom durchflossen in dem die relative Feuchte kontinuierlich erhöht oder verringert werden konnte. Das infolge der Wasseradsorption auftretende Masseninkrement wurde registriert und als Adsorptionsisotherme in mol Wasser pro mol Lipid als Funktion von RF umgerechnet (Geräte- und Methodenspezifikationen in BINDER (2000); BINDER ET AL. (1999A); BINDER ET AL. (1999B)).

3. Ergebnisse und Detaildiskussion

3.1. Methodische Grundlagen und Interpretationsregeln

3.1.1. Wasseraufnahmekapazität

Anhand der Wasseraufnahmekapazität einer Substanz können Aussagen zu Einflüssen ihrer Struktureigenschaften auf die Wasserbindungsfähigkeit, Hydrophobizität usw. getroffen werden. Die IR-Spektren erlauben eine halbquantitative Abschätzung der Wasseradsorption mittels A_{wr} , die Karl-Fischer-Titration und die Gravimetrie ermöglichen die direkte Bestimmung von Lipid-Wasser-Stöchiometrien (n_w).

A_{wr} - die relative Wasseraufnahme

Zur Abschätzung des von einer Probe adsorbierten Wassers auf Grundlage ihres IR-Spektrums eignet sich das Integral der Fläche der Bande der OH-Streckschwingungen ($A_{\nu_{a/s}(\text{OH})} = A_{\text{OH}}$) (BINDER ET AL., 2000A; KINT ET AL., 1992; OKAMURA ET AL., 1990). A_{wr} wurde mit Hilfe von A_{OH} (im Bereich von ~ 3800 bis 3000 cm^{-1} , als Differenz von $A_{\text{CHOH}} - A_{\text{CH}}$ gewonnen) und der Fläche der Banden der CH-Streckschwingungen der Methyl(en)gruppen A_{CH} (gewöhnlich im Bereich von ~ 3100 bis 2800 cm^{-1} , s. Abb. 3.1.1.1) berechnet:

$$A_{wr} = (A_{\text{CHOH}} - A_{\text{CH}}) / A_{\text{CH}} \quad (\text{SELLE ET AL., 1997; SELLE, 1999}).$$

Nach dieser Formel werden gleichzeitig die unterschiedlichen Intensitäten der Absorptionen der Lipidfilme normiert, so dass prinzipiell Vergleiche von Lipidproben untereinander möglich waren. Ausnahmen bei der Vergleichbarkeit und Besonderheiten der A_{wr} -Berechnung aufgrund von Veränderungen der Molekülstruktur und, dadurch bedingt, des Spektrums werden bei den entsprechenden Substanzen erläutert.

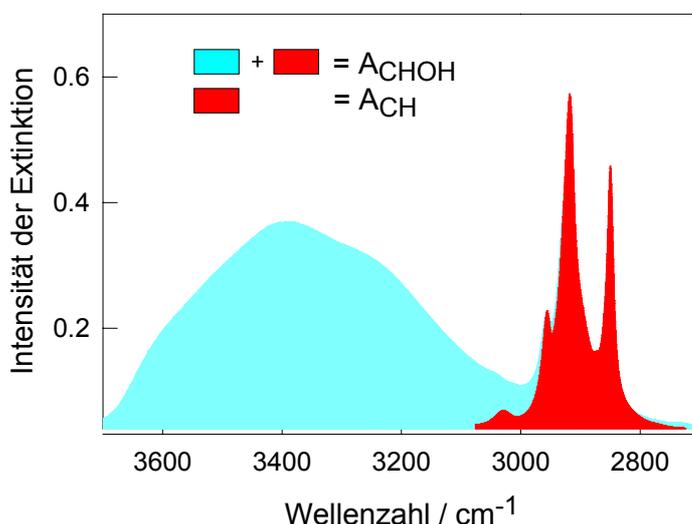


Abb. 3.1.1.1 IR-Spektrum von DMPC. Die Flächen A_{CHOH} (cyan + rot) und A_{CH} (rot) wurden markiert. A_{CH} kann bei höheren Wassergehalten der Probe durch Subtraktion der Bande der νOH mittels Basislinienkorrektur oder im Spektrum der trockenen Probe gewonnen werden.

Hydratationszahl n_w

Die Hydratationszahl n_w kann mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration oder gravimetrischen Messungen bestimmt werden. Sie stellt das Molverhältnis Wasser / Lipid dar. Der Parameter n_w kann mit IR-spektroskopisch gewonnenen Adsorptionsisothermen korreliert werden und daher auch mit A_{wr} (s. Abb. 3.1.1.2., (GAUGER ET AL., 2001B)).

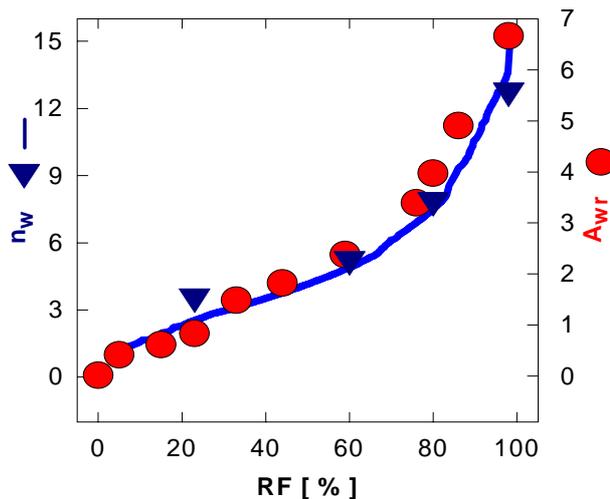


Abb. 3.1.1.2 A_{wr} (rote Punkte) der IR-Spektren eines Hydratisierungsscans von DPhPC, n_w der gravimetrischen (blaue Linie) und der Karl-Fischer-Titrationsexperimente (blaue Dreiecke) in Abhängigkeit von RF.

Restwasser

In den Spektren z. B. der meisten PC-Proben bei 0% RF sind auch nach langen Trocknungszeiten im Bereich der OH-Streckschwingungen breite Banden mit geringer Intensität zu beobachten (s. Abb. 3.1.1.3 DOPC).

Diese werden sogenanntem "Restwasser", das fest gebundenem Wasser entspricht, zugeordnet: laut Angaben in der Literatur befinden sich ca. 1 - 3 Wassermoleküle in starken Interaktionen mit den Sauerstoffatomen der Phosphodiestergruppen (PEARSON AND PASCHER, 1979; BAER, 1953) und werden mit der hier verwendeten Trocknungsmethode nicht entfernt. Nach eigenen Ergebnissen liegt der Restwassergehalt jedoch mehr oder weniger deutlich unterhalb von $n_w = 1$ (vgl. Kap. 3.3.1.3. und s. Abb. 3.1.1.2 und 3).

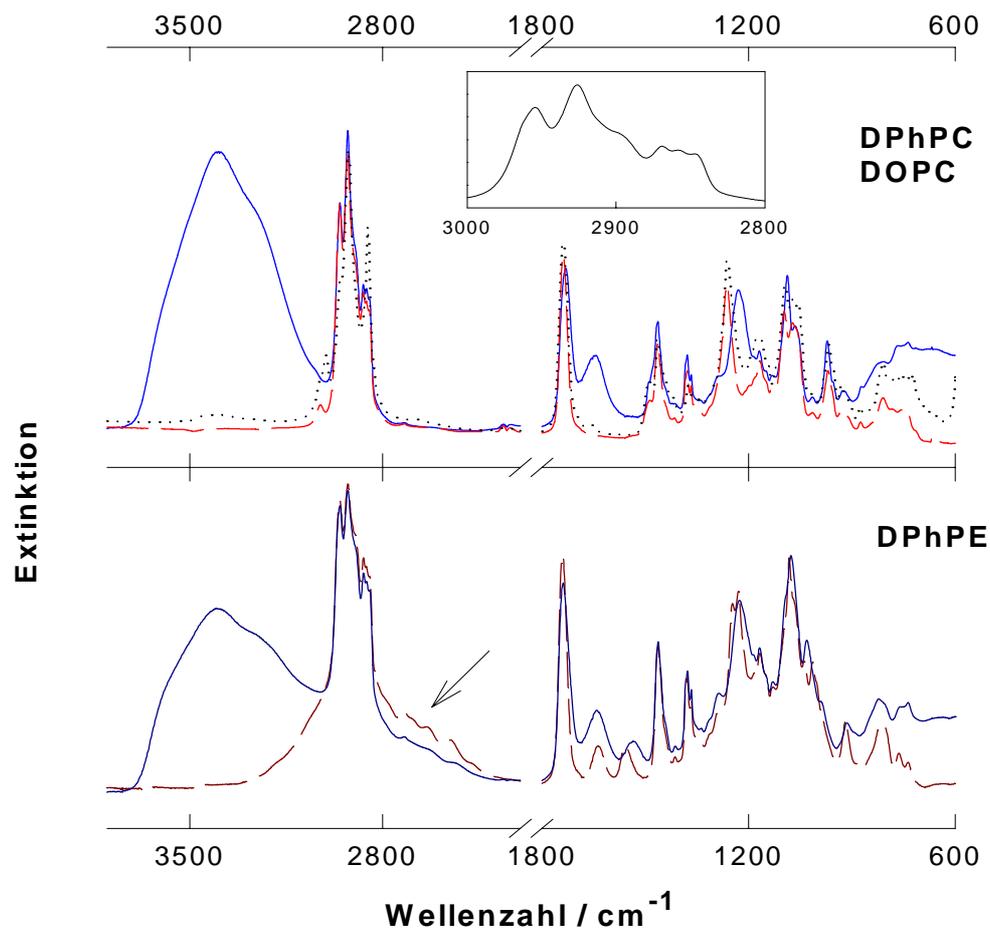


Abb. 3.1.1.3 IR-Spektren von DPhPC (oben) bei 0% RF (rot), bei 98% RF (blau) und DOPC (oben) bei 0% RF (schwarz gepunktet), Ausschnittsvergrößerung des CH-Streckschwingungsbereiches des Spektrums von DPhPC; DPhPE (unten) bei 0% RF (dunkelrot), bei 98% RF (dunkelblau); der Pfeil zeigt auf eine Sequenz von NH-Progressionsbanden der PE-Kopfgruppe.

3.1.2. Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Die FTIR-Spektroskopie erlaubt die Beobachtung direkter und indirekter Einflüsse von Wasser auf bestimmte Molekülgruppen (Schwingungsmodi [s. Tab. 3.1.2.1](#)), die anhand von z. B. Wellenzahlverschiebungen sichtbar werden.

Tab. 3.1.2.1 Nomenklatur / Symbolik für die Molekülschwingungen

Symbol *	Schwingungsmodus
ν	Streck- bzw. Valenzschwingung
δ	bending- oder Scherenschwingung (Deformationsschwingung in einer Bindungsebene)
γ	Deformationsschwingung von Bindungen aus einer Bindungsebene heraus
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl (in dieser Arbeit nur für Wellenzahlen von Valenzschwingungen verwendet)

*Erweiterungen: tiefgestellt: a = antisymmetrisch, s = symmetrisch, r = rocking, w = wagging

hochgestellt: TMA = Trimethylammoniumgruppe.

Es wird zwischen sprunghaften und kontinuierlichen Veränderungen unterschieden, wobei in erster Linie die Wellenzahl, aber auch die Intensität und / oder die Breite einer Bande betroffen sein können (POHLE ET AL., 1998; SELLE AND POHLE, 1998). Kontinuierliche Wellenzahlverschiebungen werden z. B. durch die Bindung von Wasser an Zentren wie Phosphat- oder Carbonylgruppen über Wasserstoffbrücken verursacht. Die durch Frequenzabnahme signalisierte Verringerung der Kraftkonstanten des betreffenden Oszillators korrespondiert mit einer Verminderung der Ordnung oder einer geringeren Elektronendichte der zugehörigen Bindung (POHLE ET AL., 1997). Änderungen in der Intensität einer Bande können z. B. durch Erscheinen / Verschwinden dieser Bande aufgrund von Konformationsänderungen (vgl. Kap. 3.3.1.1.) oder durch Änderung des Extinktionskoeffizienten aufgrund eines Phasenübergangs (vgl. Kap. 3.3.1.3.) erklärt werden. Halbwertslinienbreiten hängen von Rotations-, Translations- und / oder Kollisionseffekten ab. Darüber hinaus können sie Ausdruck der Heterogenität / Populationsvielfalt der absorbierenden Molekülgruppe sein (AMEY AND CHAPMAN, 1984).

Generelle Interpretationsregeln für die Veränderungen der Wellenzahlen einiger charakteristischer Banden, die bei fast allen Substanzen dieser Arbeit in den IR-Spektren auftreten, werden im Folgenden vorgestellt.

OH-Streckschwingungen

Im Bereich von 3800 bis 3000 cm^{-1} treten Banden der OH-Streckschwingungen auf. Sie können dem adsorbierten Wasser (s. Kap. 3.1.1., Abb. 1.5.1.1) zugeordnet werden. Diese Bande besteht aus mehr oder weniger gut separierten Subbanden. Je höher die Wellenzahl dieser Subbanden ist, umso weniger sind die OH-Gruppen in H-Brückenbindungen involviert. Bei $> 3600 \text{ cm}^{-1}$ kann man von monomolekularem oder freiem Wasser sprechen. Subbanden ab $< 3220 \text{ cm}^{-1}$ gehören zu hochimmobilisiertem Wasser, wie es durch starke Wasserstoffbrückenbindungen oder in Eisstrukturen auftritt (POHLE ET AL., 2000). Die Streckschwingungen der OH-Gruppen z. B. von Zuckerresten oder alkoholischen Hydroxygruppen liegen ebenfalls in diesem Wellenzahlbereich. Diese Banden werden in den entsprechenden Kapiteln betrachtet (s. Kap. 3.2.1., 3.2.2., 3.3.2. und 3.4.1.).

Kettenmethylenstreckschwingungen

Der reversible und kooperative Übergang von der lamellaren Gelphase in die flüssigkristalline Phase ist mit einer relativ hohen Umwandlungsenthalpie verbunden (10 - 60 kJ/mol je nach Lipid) und wird deshalb Hauptübergang genannt. Der Anstieg

von *gauche*- auf Kosten von *trans*-Rotameren während des sogenannten Kettenschmelzens beim Hauptübergang verursacht eine sprunghafte Frequenzerhöhung der CH₂-Streckschwingungsbanden (LEWIS AND MCELHANEY, 2002; SNYDER, 1967, z. B. Abb. 3.3.1.1.3).

Voraussetzung für das Auftreten eines lyotropen Hauptübergangs bei Raumtemperatur ist, dass die Hauptübergangstemperatur des Lipids (T_m) unterhalb dieser Raumtemperatur liegt. Die T_m des temperaturinduzierten Kettenschmelzens steigen z. B. bei PC's mit zunehmender Kettenlänge annähernd äquidistant an (HUANG ET AL., 1994; LEWIS ET AL., 1987). T_m steigt mit sinkendem Wassergehalt, da die Wechselwirkungen der Ketten durch Abnahme des effektiven Volumens der Kopfgruppen zunehmen, z. B. für DMPC um 0.44 °C pro abnehmendem % RF (SCHERER ET AL., 1990).

Die kontinuierliche Zunahme der Wellenzahlen der $\nu_s\text{CH}_2$ der Lipide außerhalb von Phasenübergangsregionen im Zuge steigenden Wassergehalts der Probe (vgl. Abb. 3.3.1.1.3) lässt sich als Anstieg des Anteils der *gauche*-Isomere und / oder der librotorsionalen Beweglichkeit der all-*trans* Segmente deuten (KODATI ET AL., 1994).

Phosphatstreckschwingungen

In Phospholipiden sind die Phosphatgruppen (genauer die Sauerstoffatome der Phosphodiestergruppen) die primären Bindungsorte von Wasser (HADZI AND GRDADOLNIK, 1993; HADZI ET AL., 1992; GRDADOLNIK ET AL., 1991; HAUSER ET AL., 1981; PEARSON AND PASCHER, 1979).

Der bei Hydratisierung sofort einsetzende Abfall der Wellenzahlen der $\nu_a\text{PO}_2^-$ -Bande (vgl. z. B. Abb. 3.3.1.2.1 DCPC) ist mit dem Absinken der Kraftkonstante aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen an die Phosphatgruppen bzw. der Schwächung der Polarität der Umgebung dieser Molekülregion erklärbar (HÜBNER AND BLUME, 1998; POHLE ET AL., 1997). Das Fehlen von Diskontinuitäten in dieser Funktion der Wellenzahl der Phosphatbande von PC-Lipiden zeigt an, dass die Kinetik der Wasserabgabe / -aufnahme an den Phosphatgruppen unabhängig vom Phasenzustand des Lipids stattfindet. Banden stark Wasserstoffbrücken-gebundener Phosphatgruppen erscheinen bei niedrigen Wellenzahlen, was bei dem Vergleich des Hydratisierungsverhaltens verschiedener Lipide hilfreich ist (vgl. z. B. Tab. 4.1.1.3).

Isosbestische Punkte (s. Abb. 3.1.2.1) im Bereich der Phosphatvalenzschwingungen zeigen Koexistenz zweier, verschieden stark hydratisierter, Subspezies von PO_2^- -Gruppen während eines Phasenübergangs an (SELLE, 1999; SELLE AND POHLE, 1998).

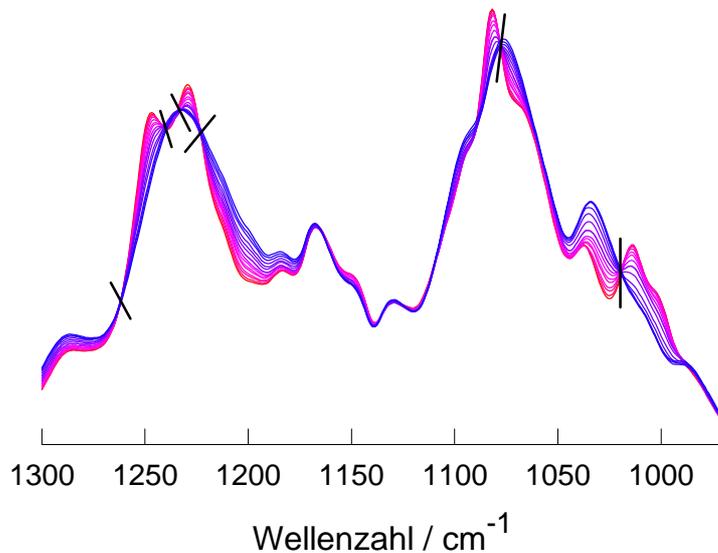


Abb. 3.1.2.1 IR-Spektren eines Hydratisierungsscans von DPhPE im Bereich der Phosphatstretschwingungen (rot geringe RF, blau hohe RF); Balken kennzeichnen isobestische Punkte.

Carbonylvalenzschwingungen

Die Carbonylbande (bei $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$) von Phospholipiden verschiebt sich im allgemeinen mit zunehmendem Wassergehalt zu niedrigeren Wellenzahlen. Dieser Prozess findet nach der Hydratisierung der Phosphatgruppen statt. Die Verschiebung der Wellenzahlen der $\nu\text{C=O}$ Valenzschwingungsbanden der Lipide ist weniger mit dem Übergang der Ketten in die fluide Phase als mit generellen Hydratisierungsvorgängen korreliert und verläuft deshalb eher kontinuierlich. Die Bande setzt sich aus mindestens zwei Subbanden zusammen (LEWIS AND MCELHANEY, 1998; LEWIS ET AL., 1994; BLUME ET AL., 1988). Aufgrund direkter Wechselwirkungen der Carbonylgruppe mit Wasser sinkt der Anteil höherfrequenter Subbanden zugunsten von niederfrequenten. Diese Subbanden können durch Dekonvolution sichtbar gemacht werden. Das Auftreten dieser Subbanden ist nicht allein durch verschieden starke Hydratisierung bzw. Polarität der Umgebung der *sn1* und *sn2* Carbonylbande im einzelnen Lipidmolekül zu erklären. Die Unterscheidung von stark und weniger stark hydratisierten Spezies der Carbonylgruppen aller Lipidmoleküle einer Probe und deren Erscheinen in Form zweier Subbanden ist schlüssiger, aber erklärt nicht ausreichend alle Phänomene. Die von SELLE (1999) durchgeführten Fourier-Selbstdekonvolutionen der Carbonylbande und Untersuchungen an C^{13} -markierten Lipiden (HÜBNER AND BLUME, 1998; LEWIS ET AL., 1994; HÜBNER ET AL., 1990) geben Hinweise darauf, dass die Subbanden auch Ausdruck unterschiedlicher Konformationen und / oder unterschiedlicher polarer / dielektrischer Umgebungen dieser Molekülgruppe sein können.

Andere Erklärungsansätze für hydratisierungsbedingte Veränderungen der Form oder Wellenzahl der Carbonylbanden sind z. B. bei DCPC, kationischen Lipiden oder den Modellsubstanzen notwendig und werden in den entsprechenden Kapiteln gegeben (vgl. Kap. 3.3.1.1., 3.4.2.).

3.1.3. Interpretation von Röntgenbeugungsmustern

Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglicht die Bestimmung der Phasen und ihrer Dimensionen von Lipiden. Die wichtigsten Verhältnisse der Reflexpositionen sollen hier genannt werden:

lamellar	1, 2, 3, 4,...
hexagonal	1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, 3, $\sqrt{12}$,...
kubisch (Bsp.: Pn3m)	$\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{6}$,...

(RAPP ET AL., 2001)

kubisch (Bsp.: Ia3d)	$\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, $\sqrt{8}$,...
----------------------	--

(LINDBLOM AND RILFORS, 1989)

Bei lamellaren Phasen kann der Wiederholungsabstand $d = 1 / s$ ($s =$ Streuvektor) ermittelt werden. Bei hexagonalen Phasen wurde $d_{\text{hex}} = d / \sin 60^\circ$ berechnet (GRUNER ET AL., 1988). In Abb. 3.1.3.1 sind beide Parameter schematisch dargestellt. Typische Dimensionen sind z. B.: für $L_{\alpha}\text{DPPC}$ $d = 6.7$ nm, $L_{\beta}'\text{DPPC}$ $d = 6.35$ nm (NAGLE AND TRISTRAM-NAGLE, 2000) oder $H_{\text{II}}\text{DOPE}$ $d_{\text{hex}} = 5.9$ nm (POHLE ET AL., 2001A).

Die Weitwinkelreflexe können Auskunft über die Kettenpackung liefern, wobei z. B. ein breiter Peak für gering geordnete, fluide Ketten, und mehrere scharfe Reflexe für eine dichtere, kristalline Kettenpackung sprechen (WINTER UND NOLL, 1998).

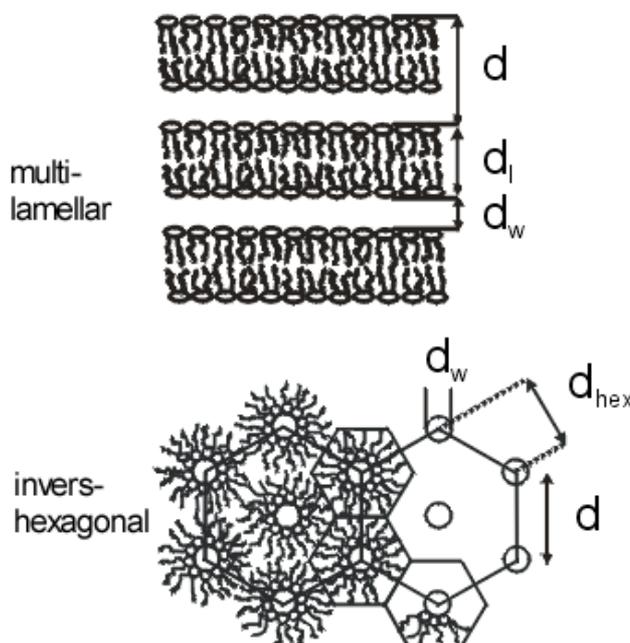


Abb. 3.1.3.1 Schematische Zeichnung einer multilamellaren und einer invers-hexagonalen Phase eines Lipids;

lamellare Phase: $d = d_l$ (Dicke der Lipiddoppelschicht) + d_w (Dicke der interlamellaren Wasserschicht);

H_{II} -Phase: $d =$ Wiederholungsabstand der Einheitszelle, $d_w =$ Durchmesser der, von Lipidmolekülen umschlossenen, Wasserzylinder, $d_{\text{hex}} = d / \sin 60^\circ$.

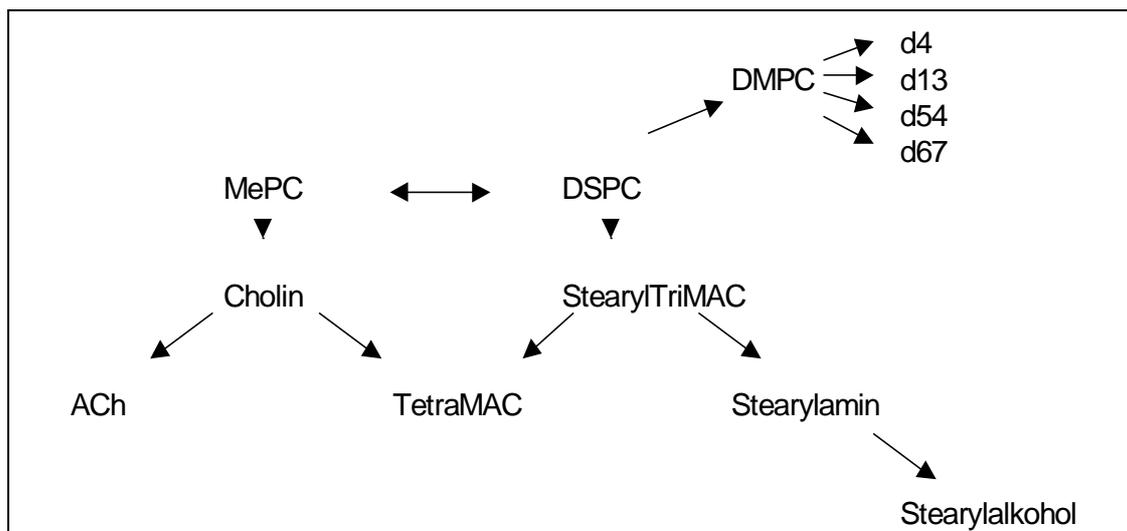
AUS (POHLE ET AL., 2001A)

3.2. Untersuchungen an PC-Lipidmodellen und deuterierten PC's

Überblick und Strategie

Um die Charakterisierung der polaren Region von Lipiden gegenüber dem aktuellen Kenntnisstand zu erweitern, wurden im ersten Abschnitt dieser Arbeit drei Richtungen verfolgt. Ausgehend von der am besten charakterisierten PC-Kopfgruppe (Bsp. DSPC) erlaubte zum einen die Verwendung von **PC-Kopfgruppenmodellen ohne Acylketten** die separate Betrachtung der Einflüsse der Hydratisierung auf diese Molekülgruppen. Dann konnten die Auswirkungen des modularen Aufbaus der PC-Kopfgruppe an einer Acylkette auf das Hydratationsverhalten mit Hilfe ausgewählter **Stearylverbindungen** veranschaulicht werden. Und schließlich wurden Bandenentflechtungen mit Hilfe von **deuteriumsubstituierten DMPC's** erzielt und die verschiedenen Molekülgruppen im „kompletten“ Phospholipid IR-spektroskopisch betrachtet (vgl. [Schema 3.2.1](#)).

Schema 3.2.1 Strategie zu PC-Lipidmodellen (vgl. [Tab. 1.4.1](#))



3.2.1. PC-Kopfgruppenmodelle ohne Acylketten: MePC, ACh, Cholin, TetraMAC

Die Namen und Strukturformeln der verwendeten Verbindungen sind in [Tab. 3.2.1.1](#) zusammengestellt. Die Phosphocholinstruktur (MePC) wird bei ACh, Cholin und TetraMAC schrittweise um Molekülteile reduziert bzw. modifiziert. Die Substanzen sind nicht nur als PC-Kopfgruppenmodelle von wissenschaftlichem Interesse, sondern besitzen auch biologische Bedeutung. So kommt MePC in Seeigeleiern (*Strongylocentrotus purpuratus*) vor (SZWERGOLD ET AL., 1990), ACh ist ein Neurotransmitter (vgl. [Kap. 1.1.](#)) und Cholin tritt als Metabolit in biochemischen

Stoffwechselwegen auf (KARLSON ET AL., 1994). TetraMAC findet Einsatz in der Pharmakologie als ganglienerregende Substanz (KUSCHINSKY ET AL., 1993).

Für Moleküle dieser Art ist eine bestimmte Art der Wasserassoziation bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden: das Clathrat (Käfigeinschlussverbindung, vgl. Abb. 4.1.1.3). Das ist eine, vom lateinischen: *clatratus* = vergittert, abgeleitete Bezeichnung für einen Typ von Einschlussverbindungen, bei dem das „Wirtsmolekül“ ein käfigartiges Kristallgitter besitzt, in dem das „Gastmolekül“ eingeschlossen ist. Bei der Ausrichtung der Gastmoleküle in der Clathratstruktur wird der Wasserkäfig so deformiert, dass maximale van-der-Waals-Kräfte ausgebildet werden können (z. B. Tetramethylammoniumsalze (JEFFREY AND SAENGER, 1991)). Ergebnisse IR-spektroskopischer Untersuchungen lassen keine direkte Identifizierung von Clathratstrukturen zu. Diese können nur z. B. mit Diffraktionsmethoden oder NMR detektiert werden, jedoch sind anhand von Wellenzahlverschiebungen und Wasseraufnahmevermögen Vermutungen über Analogien mittels IR-Spektroskopie möglich.

Tab. 3.2.1.1 Strukturformeln, Namen / Abkürzungen und Lösungsmittel der verwendeten Modellspezies

Strukturformel	Name / Abkürzung	Lösungsmittel
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	MePC	Methanol + CHCl_3 oder H_2O
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	I^- ACh	H_2O
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{Br}^-$	Cholin	H_2O
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{Cl}^-$	TetraMAC	CHCl_3

Wasseraufnahmevermögen

Bereits bei der Luftfeuchtigkeit im Labor (ca. 18% RF) ist teilweise hohe Hygroskopizität dieser vier Substanzen feststellbar. Die Experimente zeigten, dass hohe Hydratisierungsgrade mit der (in diesem Experiment / Gerät obligatorischen) vertikalen Probenposition z. T. nicht realisierbar sind: die Banden der Spektren verbreitern sich mit zunehmender Feuchte erheblich (s. [Abb. 3.2.1.1](#) blaue Spektren, [Tab. 3.2.1.2](#)) und schließlich fließen die Proben vom Trägerfenster. Die Wasserabgabe / -aufnahme erfolgt bei diesen Substanzen so schnell, dass eine Wassergehaltsbestimmung mit der Karl-Fischer-Titration nicht möglich war, da die Proben bei diesen Messungen kurzzeitig der Raumfeuchtigkeit ausgesetzt sind ([vgl. Kap. 2.2.4.](#)).

Tab. 3.2.1.2 Hydratationsvermögen der Modellschubstanzen

	Wasseradsorption ab	bis % RF	Abrutschen ab
MePC	>0	98	haftet als Tropfen
ACh	86	98	>1 Tag 98% RF
Cholin	>0	59	haftet als Tropfen
TetraMAC	0	44	>1 Tag 44% RF

Bei 0% RF (s. [Abb. 3.2.1.1](#) schwarze Spektren) hat MePC eine Restwasserbande im OH-Streckschwingungsbereich, die der gewöhnlicher Phospholipide ähnelt ([vgl. Abb. 3.1.1.3](#)). Bei Cholin befinden sich im OH-Streckschwingungsbereich sowohl die Banden der Schwingungen der Cholin-OH-Gruppen als auch die des adsorbierten Wassers, weshalb über Restwasser keine genauen Aussagen möglich sind. ACh gibt Wasser vollständig ab. Die Banden im OH-Streckschwingungsbereich von ACh sind Zerfallsprodukten (Amin-NH, OH), die wahrscheinlich in geringen Mengen beim Lösen entstanden sind (FITTKAU, 1972), zuzuordnen. Bei TetraMAC kann mit der hier verwendeten Methode keine Trocknung erreicht werden. Im Spektrum bei 0% RF ist noch eine breite OH-Streckschwingungsbande erkennbar.

A_{wr} von MePC wurde wie unter [Kap. 3.1.1](#) berechnet, es wurde jedoch A_{CH} eines trockenen Spektrums für alle Spektren, statt A_{CH} des jeweiligen Spektrums, zur Berechnung verwendet, da die Banden der CH-Streckschwingungen aufgrund ihrer geringen Intensität von den Banden der OH-Streckschwingungen bei höheren Wassergehalten der Probe stark überlagert werden. Neueste Untersuchungen erlauben eine Abschätzung von $n_w \geq 20$ bei 98% RF (BINDER, 2003).

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Banden der Molekülschwingungen der Modellsubstanzen wurden mit Hilfe der Literatur (HANDBOOK OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY, 2002; SMITH, 1999; GUAN AND THOMAS, 1996; HARMON ET AL., 1992; DERREUMAUX ET AL., 1989; WILSON ET AL., 1989; ASLANIAN, 1983; SNYDER, 1967, 1961) weitgehend zugeordnet. Die IR-spektroskopischen Ergebnisse werden im Folgenden für jede Substanz separat betrachtet.

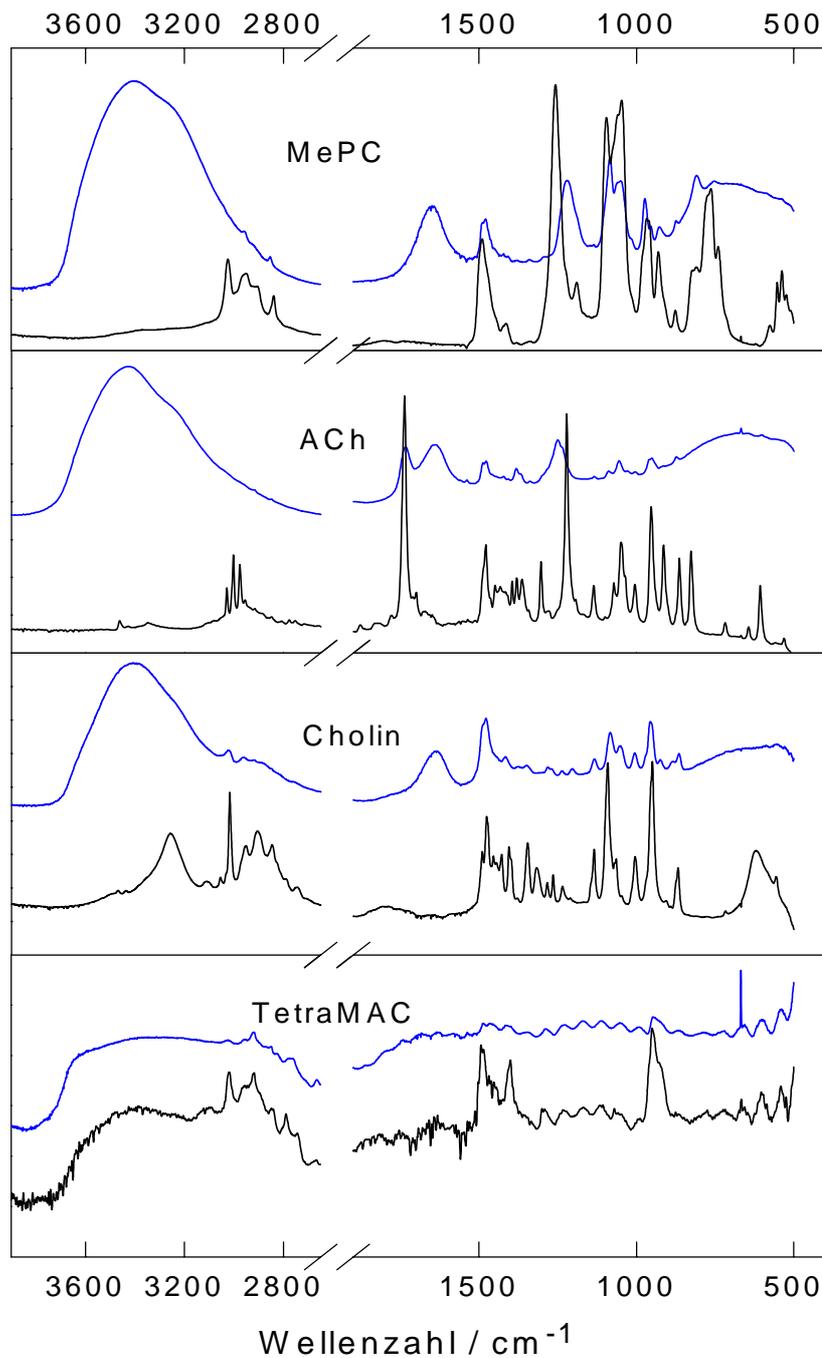


Abb. 3.2.1.1 IR-Spektren von MePC, ACh, Cholin und TetraMAC; blau maximal hydratisiert (vgl. Tab. 3.2.1.2), schwarz bei 0% RF.

MePC

Im IR-Spektrum von MePC werden die Banden der νCH_n im Bereich um 2900 cm^{-1} sichtbar. Bei Substanzen mit Acylketten wird dieser Bereich völlig von Kettenschwingungen dominiert (vgl. Kap. 3.2.3.). Abb. 3.2.1.2 zeigt $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ bei $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$ und zwei $\tilde{\nu}(\text{CH}_x)$ bei ca. 2844 und 2952 cm^{-1} in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe ($x = 2$ oder 3 , s. u., eine Zuordnung dieser Banden ist auf der Basis der Erkenntnisse schwierig.).

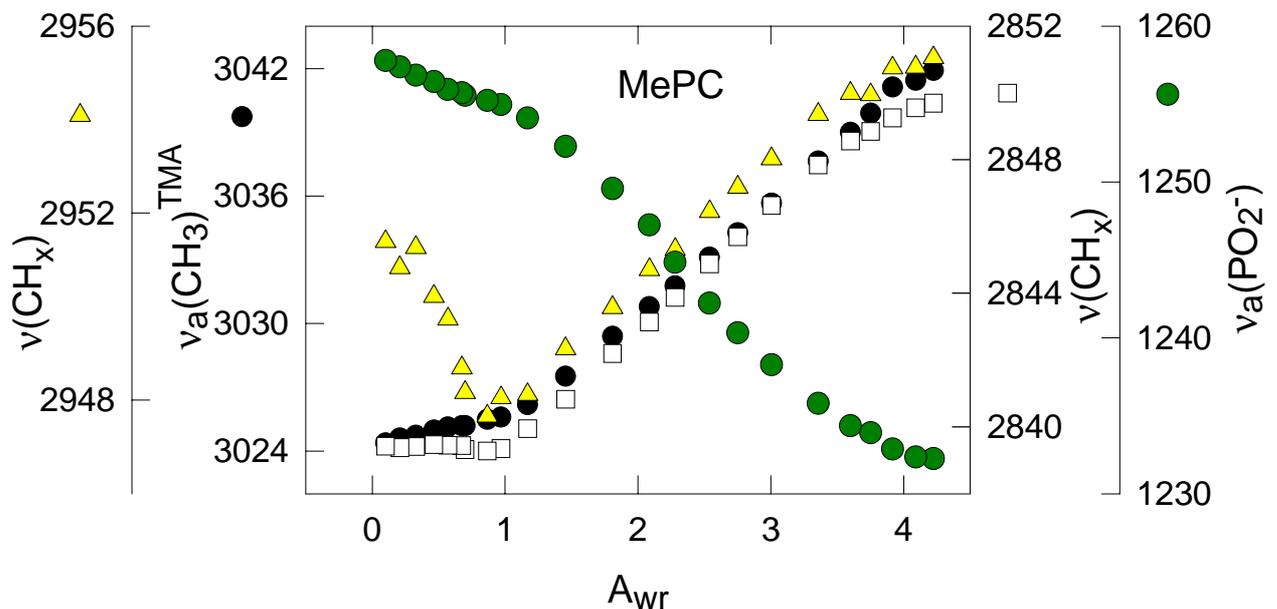


Abb. 3.2.1.2 MePC: $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ ●, $\tilde{\nu}(\text{CH}_x)$ Δ / □ und $\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$ ● in cm^{-1} , in Abhängigkeit von A_{wr} ; Achsenzuordnung mittels Symbolen.

Die Wellenzahlabhängigkeiten dieser Banden weisen Diskontinuitäten bei einem $A_{wr} \sim 1$ auf. Die Beträge der Wellenzahlverschiebungen von $\Delta - 4 / + 8\text{ cm}^{-1}$ und $\Delta + 10\text{ cm}^{-1}$ der $\nu(\text{CH}_x)$ -Banden sind ungewöhnlich hoch. Der Anstieg der $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ wird als Folge verminderter Anziehung zwischen Phosphat- und TMA-Gruppe aufgrund zunehmender Wasserbindung interpretiert (s. u.). Ansteigende Wellenzahlen von Banden der CH_2 -Streckschwingungen sind Ausdruck abnehmender Ordnung dieser Gruppen, wobei diese Interpretation vorwiegend auf die *trans* \rightarrow *gauche* Übergänge der Acylkettenkonformation bezogen wird (vgl. Kap. 3.1.2.). Da hier keine Acylketten vorhanden sind, müssen andere Effekte zugrunde liegen.

Einen möglichen Lösungsansatz bieten moleküldynamische Untersuchungen von WOOLF AND ROUX (1994). Diese zeigten, dass die Cholin-CH₂-Gruppen von MePC statt der *gauche*- eine *trans*-Konformation mit zunehmender Hydratisierung einnehmen. Das könnte eine Zunahme der Wechselwirkungsmöglichkeiten des Moleküls mit Wasser ermöglichen.

Der große Betrag der Verschiebung der Wellenzahlen der Streckerschwingungsbanden dieser Gruppen (vgl. Tab. 4.1.1.1) spricht jedoch gegen ausschließlich konformationsbedingte Änderungen und für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen:

MRAZKOVA AND HOBZA (2003) beobachteten bei Simulationen (*ab initio* quantum chemical calculations an Dimethylsulfoxid) ein Ansteigen der Frequenzen der Schwingungen von Methyl- und Methylengruppen mit zunehmender Hydratisierung und erklärten es mit der Bildung von sogenannten „improperen“ H-Brücken (HOBZA AND HAVLAS, 2000, s. Abb. 4.1.1.1).

SCHEINER ET AL. (2001) untersuchten z. B. in Alkanen die CH \cdots O Wasserstoffbrückenbindungen in Abhängigkeit von der Hybridisierung: sp³-hybridisierte CH-Bindungen kontrahieren während der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung und bewirken damit ein Ansteigen der entsprechenden Wellenzahl der CH-Streckerschwingungen.

BRANDL ET AL. (2001) zeigten mittels Computersimulationen von RNA-Basenpaaren die Präferenz negativ geladener Donoratome, *H-bond-like*-, und positiv geladener Donoratome, *anti-H-bond-like*-Interaktionen auszubilden, wobei Wellenzahlen der CH-Streckerschwingungen der *H-bond* involvierten Gruppen sinken und die der *anti-H-bond* gebundenen steigen.

Die verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungsformen werden in Kap. 4.1.1. erläutert und diskutiert. Die Richtungen der Wellenzahlverschiebungen der Banden der CH-Gruppen in MePC stimmen mit den Vorhersagen der oben genannten Computersimulationen überein.

Der Anstieg von $\Delta + 18 \text{ cm}^{-1}$ bei $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ und der Abfall der $\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$ (s. Abb. 3.2.1.2) sind Indizien für die verminderte elektrostatische Anziehung zwischen Phosphat- und Trimethylammoniumgruppe aufgrund von zunehmender Wasserbindung an beide Gruppen, wie in PC-Lipiden (GRDADOLNIK ET AL., 1991). Einflüsse ungewöhnlicher H-Brückenbildungen sind aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse jedoch nicht auszuschließen (s. Kap. 4.1.1.).

Die Position der Bande der antisymmetrischen Phosphatstretschwingungen bei 1232 cm^{-1} im voll hydratisierten und 1257 cm^{-1} im trockenen MePC und die Differenz dieser Verschiebung von 25 cm^{-1} ähneln den Verhältnissen in PC-Lipiden. Bei der Wellenzahlverschiebung der $\nu_a\text{PO}_2^-$ von MePC ist jedoch, im Gegensatz zu den kontinuierlich ablaufenden Wellenzahlverschiebungen der Phosphatbanden gewöhnlicher PC's (POHLE ET AL., 1998), eine Diskontinuität bei $A_{\text{wr}} \sim 1$ erkennbar. Die Diskontinuitäten in den Verschiebungen der Banden der CH-Gruppen von MePC treten bei dem gleichen A_{wr} auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Bildung eines Hemihydrats: von AKIN AND HARMON (1994) wurde beschrieben, dass zwischen zwei Phosphatgruppen benachbarter MePC-Moleküle und einem Wassermolekül H-Brücken ausgebildet werden. Die negativ geladenen Phosphatsauerstoffatome und die positiv geladenen $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen können aufgrund der geringen Größe des Moleküls so dicht gepackt sein, dass weitere Interaktionen mit Wasser im Hemihydrat weitgehend verhindert werden. Die hydratisierungsgetriebenen strukturellen Veränderungen im MePC könnten das Aufbrechen der metastabilen Hemihydratstruktur und darauffolgende H-Brückenbildung mit weiteren Wassermolekülen beinhalten. Aus dem gleichen Grund könnten auch die Diskontinuitäten der Wellenzahlverschiebungen der Phosphatbanden mit denen der CH-Gruppen korrelieren, da z. B. die Cholinmethylengruppen hydrationsinduzierte Konformationsänderungen durchmachen und H-Brücken bilden.

Damit konnte erstmals der Einfluss der Kopfgruppenhydratisierung auch auf die CH-Gruppen des Cholinanteils, deren Schwingungsbanden in gewöhnlichen PC-Lipiden von den Kettenschwingungen dominiert werden, experimentell gezeigt werden. Die $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ - und Phosphatgruppen erleichtern möglicherweise durch Fixierung / Polarisierung des adsorbierten Wassers dessen Wechselwirkungen mit den CH-Gruppen.

Acetylcholin

ACh ist nicht in der Lage, Restwasser zu binden. Eine signifikante Wasseradsorption setzt erst ab 86% RF ein. Elektrostatische Anziehung zwischen Carbonyl- und Trimethylammoniumgruppe, die erst durch zunehmende Wasserbindung abgeschwächt werden (HADZI AND GRDADOLNIK, 1993), oder aber ein relativ stabiles Salzbrücken-Netzwerk mit den Iodionen könnten dafür die Ursache sein.

Aufgrund der Befunde von Cholin und TetraMAC (s. u.) ist die Bildung einer Clathratstruktur wahrscheinlich. Bei ACh ist dies offenbar erst oberhalb einer bestimmten Wasseraktivität möglich.

Bandenpositionen und -formen des ACh-Spektrums weichen von denen ähnlicher Substanzen, besonders im CH-Streckschwingungsbereich, auffällig ab. Wellenzahlverschiebungen von Banden im Bereich $> 2800 \text{ cm}^{-1}$ (keine Abb.) zeigen größtenteils Trends zu höheren Beträgen mit zunehmendem Wassergehalt der Probe. DERREUMAUX ET AL. (1989) und WILSON ET AL. (1989) finden anhand unterschiedlicher Wellenzahlen zwei Konformationen von ACh in Wasser bzw. organischen Lösungsmitteln. ASLANIAN ET AL. (1977) konnten Konformationsunterschiede zwischen trockenem und gelöstem ACh erkennen.

Die Wellenzahl der Bande der $\nu\text{C=O}$ sinkt mit zunehmender Hydratisierung von ~ 1737.5 auf 1734 cm^{-1} ab. Die Ethercarbonylgruppe von ACh kann intermolekulare H-Brücken mit der Trimethylammoniumgruppe ausbilden und beeinflusst so dessen Konformation (ASLANIAN, 1983). Die Ammoniumgruppe hat physiologische Bedeutung. Sie befähigt über die Bildung von Wasserstoffbrücken C-H \cdots Akzeptor von ACh mit Akzeptoren, wie Phosphat- oder Carboxy-Gruppen, die Bindung an z. B.: Rezeptorproteine (HARMON ET AL., 1992).

Cholin

Auch Cholin ist, wie ACh, wahrscheinlich nicht in der Lage, Restwasser zu binden, kann jedoch bereits bei geringen RF Wasser adsorbieren (vgl. Tab. 3.2.1.2). Die Bandenpositionen weichen kaum von denen bei PC-Spektren ab. $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ steigt etwa in dem Umfang wie bei MePC von 3017 auf $> 3020 \text{ cm}^{-1}$ (bis 59% RF, vgl. Tab. 3.2.1.2). Bereiche höherer Luftfeuchte können hier nicht realisiert werden. Die Wellenzahlen der Banden der CH-Streckschwingungen (nicht gezeigt) steigen ebenfalls mit zunehmender Hydratisierung. Cholin (Br^-) ist offenbar aufgrund seiner geringen Größe, Geometrie und Ladungsverteilung, in der Lage, unter zunehmender Hydratisierung ein Clathrat zu bilden (HARMON ET AL., 1987).

Tetramethylammoniumchlorid

TetraMAC ist stark hygroskopisch, und es ist nicht möglich gewesen, es zu trocknen. Die Tendenz zur Clathratstrukturausbildung bei quarternären Ammoniumsalzen wurde bereits von HARMON ET AL. (1989) und HARMON ET AL. (1987) beschrieben. Bei TetraMAC ist sie offenbar noch stärker gegeben als bei Cholin. Die Symmetrie dieses Moleküls scheint für die Clathratbildung von Vorteil zu sein. Die Spektren

ähneln denen von Cholin. Wellenzahlverschiebungen sind nur in Spektrenbereichen $< 690 \text{ cm}^{-1}$ zu beobachten (nicht gezeigt) ⁵.

Zusammenfassung

Die essentielle Bedeutung der Phosphatgruppe als primärer Bindungsort für Wasser wurde durch die Fähigkeit von MePC, Restwasser und zusätzliches Wasser bereits bei niedrigen RF zu binden, unterstrichen. Die Ausbildung ungewöhnlicher Wasserstoffbrückenbindungen ist aufgrund der Wellenzahlverschiebungen der CH_n -Gruppen wahrscheinlich. ACh, Cholin und TetraMAC sind ebenfalls in der Lage, Wasser anzulagern (höchstwahrscheinlich Ausbildung von Clathratstrukturen). Die Ammoniumgruppe ist als wichtige Bindungsstelle für Wasser zu betrachten. Das Vorhandensein einer polaren Gruppe / Ladung ist für die Wasseradsorption entscheidend.

3.2.2. Modularer Aufbau der PC-Kopfgruppe an einer Kohlenwasserstoffkette: Stear(o)ylverbindungen

PC-ähnliche Kopfgruppenstrukturverhältnisse wurden durch modularen Aufbau von Alkohol-, Amino- und Trimethylammoniumgruppe an einer C_{18} -Kohlenwasserstoffkette erzeugt. Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Tab. 3.2.2.1 zusammengestellt. Das Hydratationsverhalten dieser Verbindungen wurde mit dem von DSPC verglichen.

Diese Stearylverbindungen haben Anwendungsgebiete in der Industrie z. B. zur Avivage (Behandlung von Chemiefasern zur Erhöhung des Glanzes und der Geschmeidigkeit), als Antievdaporantien und bei der Herstellung von Tensiden und Kosmetika (RÖMPP CHEMIELEXIKON, 1995; SMALL, 1986).

Tab. 3.2.2.1 Strukturformeln, Namen / Abkürzungen und Lösungsmittel der Stearylverbindungen

Strukturformel	Name / Abkürzung	Lösungsmittel
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{Cl}^-$	StearylTriMAC	(CHCl_3)
$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$	Stearylamin	(CHCl_3)
$\text{OH} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$	Stearylalkohol	(CHCl_3 + Methanol)

⁵ Die Resultate der Experimente mit ACh, Cholin und TetraMAC werden in Gauger et.al. (in prep.) belegt werden.

Wasseraufnahmevermögen

StearylTriMAC nimmt in dieser Gruppe der untersuchten Substanzen am meisten Wasser auf. A_{wr} konnte, wie unter [Kap. 3.1.1.](#) beschrieben, berechnet werden. Wegen fehlender Glycerol- und Cholin- CH_n -Gruppen und nur einer Kohlenwasserstoffkette pro StearylTriMAC-Molekül muss der A_{CH} -Wert von StearylTriMAC vor der A_{wr} -Berechnung mit einem Korrekturfaktor von 1.81 multipliziert werden ([vgl. Kap. 3.3.1.1.](#)), um A_{wr} annähernd mit dem gewöhnlicher PC's vergleichen zu können. Bei 98% RF beträgt $A_{wrc} \sim 2$ und ist somit niedriger als bei DSPC ($A_{wrc} \sim 3.3$, [s. Abb. 3.3.1.2.](#)). Die Adsorptionsisotherme von StearylTriMAC zeigt in Bereichen geringer RF einen im Vergleich zu DSPC verzögerten Anstieg von A_{wrc} ([s. Abb. 3.2.2.1.](#)). Das ist ein weiterer Beweis für die essentielle Bedeutung der Phosphatgruppe für die Bindung des initialen Wassers ([vgl. Kap. 3.2.1.](#)). Zu Beginn der Hydratisierung könnte, z. B. wie bei ACh, ein relativ stabiler Zustand bis zur Clathratbildung oberhalb einer bestimmten Wasseraktivität existieren. Stearylamin nimmt nur Spuren von Wasser auf. Stearylalkohol nimmt im Rahmen der Messgenauigkeit kein Wasser auf.

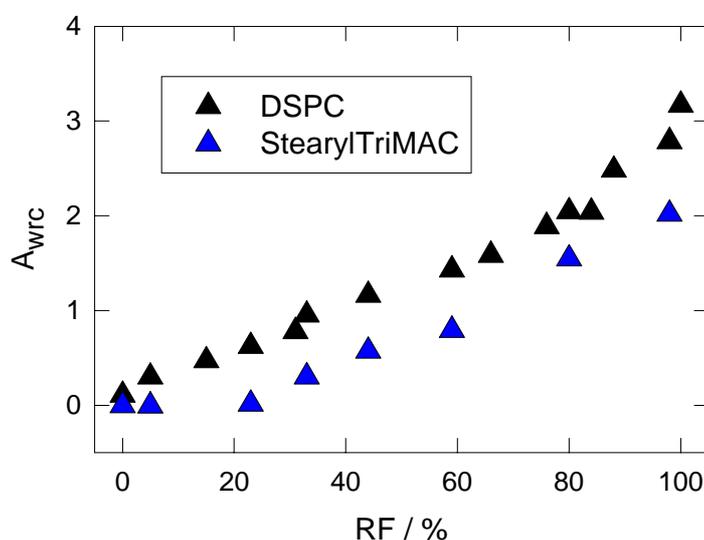


Abb. 3.2.2.1
Adsorptionsisothermen von DSPC (schwarz) und StearylTriMAC (blau).

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Die Spektren der Stearylverbindungen zeigen im Bereich der CH -Streckschwingungen Ähnlichkeiten mit Lipid-IR-Spektren ([s. Abb. 3.2.2.2.](#)). Die Veränderungen im Kopfgruppenbereich führen jedoch zu gravierenden Unterschieden der Spektren im Frequenzbereich $< 1700 \text{ cm}^{-1}$. Die Banden der symmetrischen CH_2 -Streckschwingungen der Ketten befinden sich bei allen

Stearylsubstanzen über den gesamten Hydratisierungsbereich bei $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ wie im DSPC (s. Abb. 3.3.1.1.3). Diese niedrige Wellenzahl spricht für eine hohe Kettenordnung, wie es für kristalline Phasen typisch ist. Besonderheiten des Hydratisierungsverhaltens werden im Folgenden für jede Substanz gezeigt.

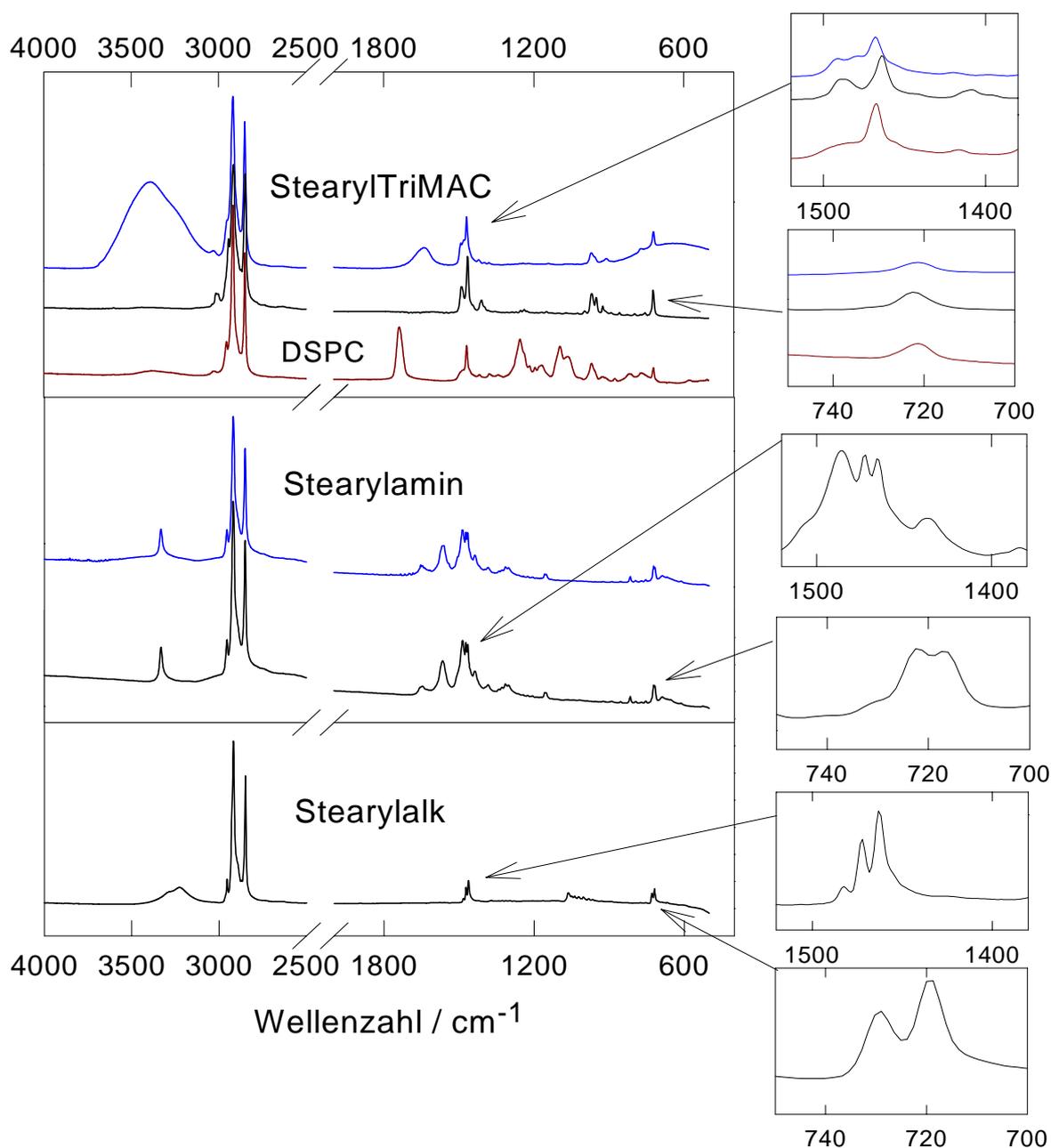


Abb. 3.2.2.2 IR-Spektren der Stearylverbindungen bei 98% RF (blau) und bei 0% RF (schwarz) und DSPC (dunkelrot, bei 0% RF). Die Regionen der δCH_2 (um 1470 cm^{-1}) und $\gamma_{\text{rock}}\text{CH}_2$ (um 720 cm^{-1}) sind rechts vergrößert dargestellt.

Stearyltrimethylammoniumchlorid

Wellenzahlverschiebungen charakteristischer Banden der Kettenschwingungen zeigen Hydratisierungseinflüsse von $A_{wrc} \sim 0$ bis ~ 0.7 ($\sim 30\%$ RF). Die $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ steigen in diesem Bereich von 2848 auf 2850 cm^{-1} an (s. Abb. 3.2.2.3).

Die $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ steigt dagegen erst oberhalb dieses Hydratisierungsbereichs stärker an. In Bereichen geringer RF ist diese Bande in drei Subbanden bei 3035, 3015 und 3003 cm^{-1} gegliedert (vgl. Kap. 3.4.2. und 4.1.). Der Betrag der Verschiebung der $\tilde{\nu}_a(\text{CH}_3)^{\text{TMA}}$ ($\Delta + 16$ von 3016 (nach Verschwinden der Subbanden bei 3003 und 3035 cm^{-1}) auf 3032 cm^{-1}) ähnelt dem von DSPC ($\Delta + 20$ von 3030 auf 3050 cm^{-1}) oder MePC ($\Delta + 18$ von 3024 auf 3042 cm^{-1}). Die Position dieser Bande von StearylTriMAC befindet sich insgesamt in etwas niedrigeren Wellenzahlbereichen. Das ist möglicherweise auf den fehlenden Einfluss von Phosphatgruppen zurückzuführen.

Ein Phasenübergang kann aufgrund dieser Befunde vermutet werden.

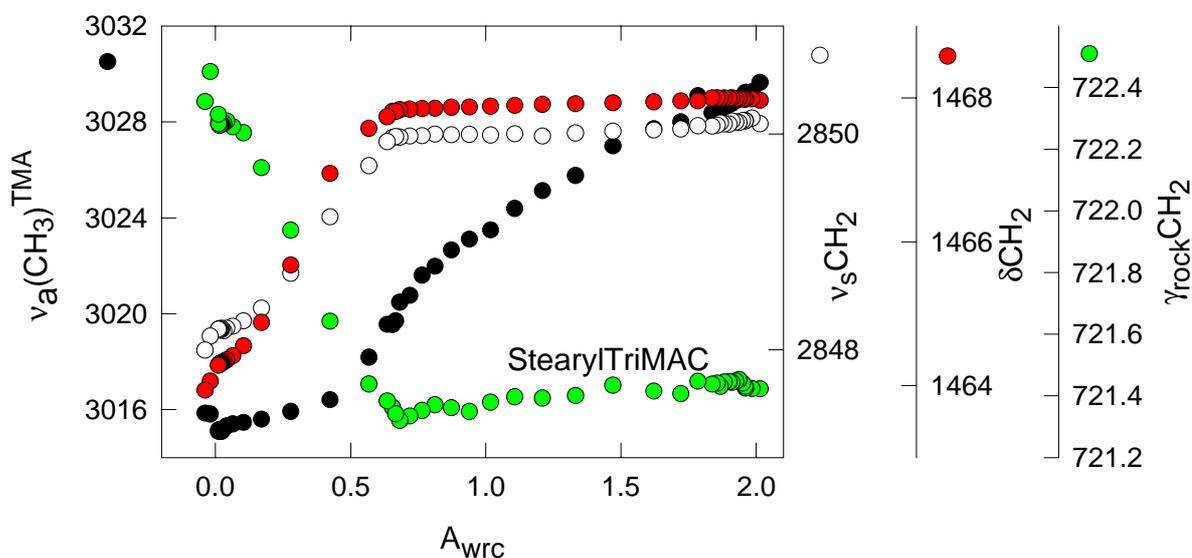


Abb. 3.2.2.3 Wellenzahlen in cm^{-1} charakteristischer Banden von StearylTriMAC-Spektren in Abhängigkeit von A_{wrc} .

Röntgenbeugungsuntersuchungen zeigen Reflexmuster für zwei lamellare Phasen (s. Abb. 3.2.2.4, vgl. Kap. 3.1.3.). Die Weitwinkelreflexe machten eine Zuordnung zu einer L_c -Phase des trockenen StearylTriMAC (mit 2.91 nm Wiederholungsabstand) und einer L_β -Phase bei 100% RF (mit 3.76 nm Wiederholungsabstand) möglich. Im

Vergleich zu DSPC (L_{β} bei 100% RF mit 6.71 nm, bei 0% RF mit 6.29 nm Wiederholungsabstand) sind die Dimensionen der lamellaren Phasen von StearylTriMAC sehr klein.

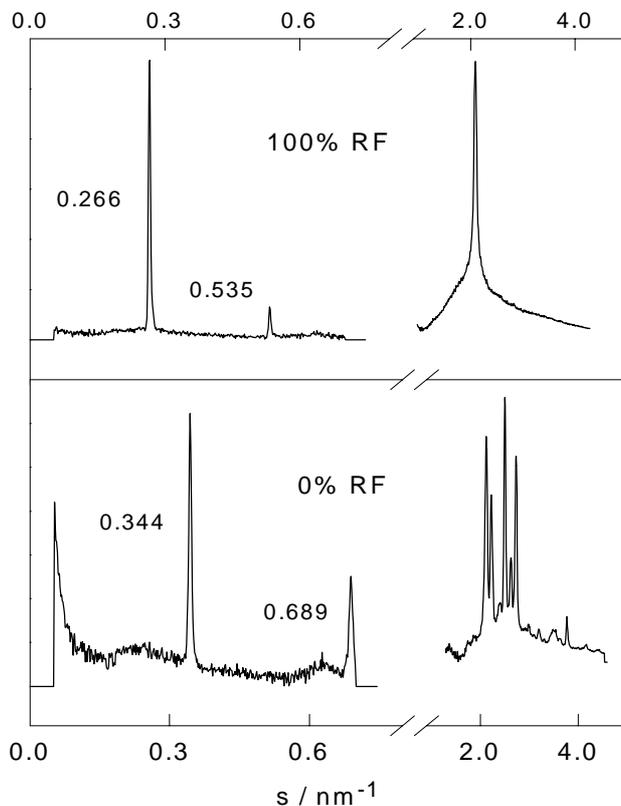


Abb. 3.2.2.4
Röntgenbeugungsmuster von StearylTriMAC bei 100% RF (oben) und 0% RF (unten); links Kleinwinkelbereich, rechts Weitwinkelbereich.

Einige weitere Besonderheiten sind in den IR-Spektren von StearylTriMAC zu erkennen. Der Anstieg der Wellenzahlen der δCH_2 -Bande von 1464 auf 1468 cm⁻¹ ist absolut ungewöhnlich. Der L_C - L_{β} -Übergang ist bei PC's mit einem Abfall der Wellenzahl dieser Bande von 1473 auf 1468 cm⁻¹ verbunden und zeigt den Übergang der triklinen in die hexagonale Kettenpackung an. Die Wellenzahlen der Bande der $\gamma_{\text{rock}}\text{CH}_2$ von StearylTriMAC sinken kontinuierlich von A_{wrc} 0 bis ~ 0.7 . Bei Phospholipiden wurden bisher nur Intensitätsverlust (beim Kettenschmelzen) oder Aufspaltung (bei Übergang in die orthorhombische Kettenpackung) dieser Bande beobachtet (LEWIS AND MCELHANEY, 2002).

Offenbar scheint die Molekülgeometrie von StearylTriMAC dafür verantwortlich zu sein, dass es unter den gewählten Versuchsbedingungen eine L_{ci} -Phase (i = interdigitiert) in Bereichen geringer und $L_{\beta i}$ -Phase in Bereichen höherer Hydratisierung bilden kann. Bei PC's können interdigitierte Phasen durch Alkohol

induziert werden (BARTUCCI ET AL., 1997; HUANG AND MCINTOSH, 1997) und treten auch bei Ether- und Lysolipiden (LAGGNER ET AL., 1987; HAUSER ET AL., 1980) auf.

Die Differenz der Verschiebung der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande bei StearylTriMAC um mehr als 2 cm^{-1} , trotz Verbleiben der Ketten in der *all-trans* Konformation, ist mit der Kettenordnung erklärbar - die librotorsionale Beweglichkeit der Ketten von StearylTriMAC scheint in der L_{β_i} -Phase deutlich gegenüber der L_{α_i} -Phase erhöht zu sein.

Stearylamin

Die Bande der νNH_2 bei 3332 cm^{-1} hat eine geringe Breite, was auf freie und nicht in H-Brückenbindungen involvierte Aminogruppen hinweist. Bei einigen Banden sind mit zunehmender Hydratisierung minimale aber systematische Wellenzahlverschiebungen festzustellen, z. B. der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande von 2850.68 auf 2850.76 cm^{-1} . Im Gegensatz zu StearylTriMAC und DSPC treten die Banden der δCH_2 und $\gamma_{\text{rock}}\text{CH}_2$ als Dublettstruktur mit Peakmaxima bei 1473 und 1465 und 723 und 716 cm^{-1} (s. Abb. 3.2.2.2) auf. Diese Bandensplits sind bei Lipiden Indizien für orthorhombisch senkrechte Kettenpackung (LEWIS AND MCELHANEY, 2002).

Die Röntgenbeugungsexperimente (Daten nicht gezeigt) deuten auf Koexistenz zweier lamellarer Phasen im Stearylamin hin. Beide Phasen reagieren mit einer Aufweitung ihrer Dimension bei steigendem Wassergehalt. Aufgrund der Vielzahl der Reflexe im Weitwinkelbereich ist mindestens eine der Phasen kristallin. Da die Phasen koexistieren, kann man die Weitwinkelreflexe jedoch nicht der einen oder anderen Phase zuordnen und nur postulieren, dass es sich um Koexistenz einer L_c - und einer L_{β} -Phase (aufgrund der Befunde bei StearylTriMAC) handeln könnte. Die Dimensionen sind $5.32 / 4.83\text{ nm}$ bei 100% RF und $5.24 / 4.57\text{ nm}$ bei 0% RF, wobei jeweils die kleineren Werte zur L_c -Phase gehören. Eine Kettenverzahnung findet im Stearylamin offenbar nicht statt.

Die höhere Wellenzahl der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande bei Stearylamin bei 2850.7 cm^{-1} zeigt, verglichen mit StearylTriMAC (2850.1 cm^{-1}), eine etwas verringerte Kettenordnung in allen Feuchtebereichen an. Das könnte mit der Koexistenz der Phasen in Stearylamin erklärt werden, bzw. mit der fehlenden Verklammerung (NH-Gruppen ohne Wasserstoffbrücken) wie in StearylTriMAC oder Stearylalkohol (s. u.). Die orthorhombisch senkrechte Kettenpackung ist in der L_c -Phase realisiert (SMALL, 1986).

Stearylalkohol

Stearylalkohol nimmt offenbar kein Wasser auf. Bei Stearylalkohol treten Banden der Valenzschwingungen der OH-Gruppen bei $\sim 3233 \text{ cm}^{-1}$ auf, die der Alkohol-Gruppe zugeordnet werden. Die Bande der νOH ist, verglichen mit der anderer alkoholischer Gruppen (Hexanol 3334 cm^{-1} , (RÖMPP CHEMIELEXIKON, 1995)), bei Stearylalkohol bei niedrigen Wellenzahlen, von geringer Intensität und hoher Bandenbreite. Diese Molekülgruppe existiert offenbar in mehreren z. T. in Wasserstoffbrücken gebundenen Subpopulationen. Die Wellenzahlen nahezu aller Banden bleiben bei zunehmender umgebender Feuchte konstant ($\tilde{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2 \sim 2849.5 \text{ cm}^{-1}$). Das Splitting der Banden der δCH_2 ($1473, 1463 \text{ cm}^{-1}$) und $\gamma_{\text{rock}}\text{CH}_2$ ($730, 720 \text{ cm}^{-1}$) tritt, wie im Stearylamin, auch hier auf (s. Abb. 3.2.2.2).

Die Röntgenbeugungsuntersuchungen (Daten nicht gezeigt) ergaben Konstanz der Reflexe unabhängig von der Hydratisierung. Eine lamellar-kristalline Phase mit Wiederholungsabständen von 4.2 nm und vielen Weitwinkelreflexen konnte bestimmt werden. Auch hier sind keine Anhaltspunkte für eine Kettenverzahnung gegeben, Die Dimension dieser Phase liegt zwischen der von StearylTriMAC (3 - 4 nm) und Stearylamin ($\sim 5 \text{ nm}$), so dass angenommen werden kann, dass die Ketten von Stearylalkohol geneigt sind (L_c' , vgl. $L_c'_{\text{DPPC}} d = 5.1 \text{ nm}$ (CEVC, 1991)). Die IR-Daten belegen orthorhombische Kettenpackung. Aufgrund der Fixierung der Kopfgruppen durch die Wasserstoffbrückenbindungen der OH-Gruppen scheint die Kettenordnung im Vergleich zu Stearylamin erhöht.

Zusammenfassung

Die Adsorption zugeführten Wassers kann bei den gewählten Versuchsbedingungen offenbar nur bei StearylTriMAC in größerem Ausmaß stattfinden. Die Ammoniumgruppe scheint notwendig, um Wasser adsorbieren zu können. Durch das Fehlen der Phosphatgruppe ist die primäre Wasserbindung im Vergleich zu DSPC verzögert. Eine Ketteninterdigitierung kann für die zwei beobachteten Phasen im StearylTriMAC angenommen werden. Die Polarität der Alkoholgruppen ermöglicht die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen (SMALL, 1986). Bei Stearylalkohol ist deren Vorhandensein aufgrund der niedrigen Wellenzahl der Bande der OH-Streckschwingungen und fehlender Wasseradsorption zu vermuten. Die Bandenbreite der NH-Streckschwingung im Stearylamin deutet auf freie NH-Gruppen. Die orthorhombische Kettenpackung wird nur bei Stearylamin und Stearylalkohol und nicht in DSPC und StearylTriMAC verwirklicht.

3.2.3. Deuterierte PC's : DMPC -d4, -d13, -d54, -d67

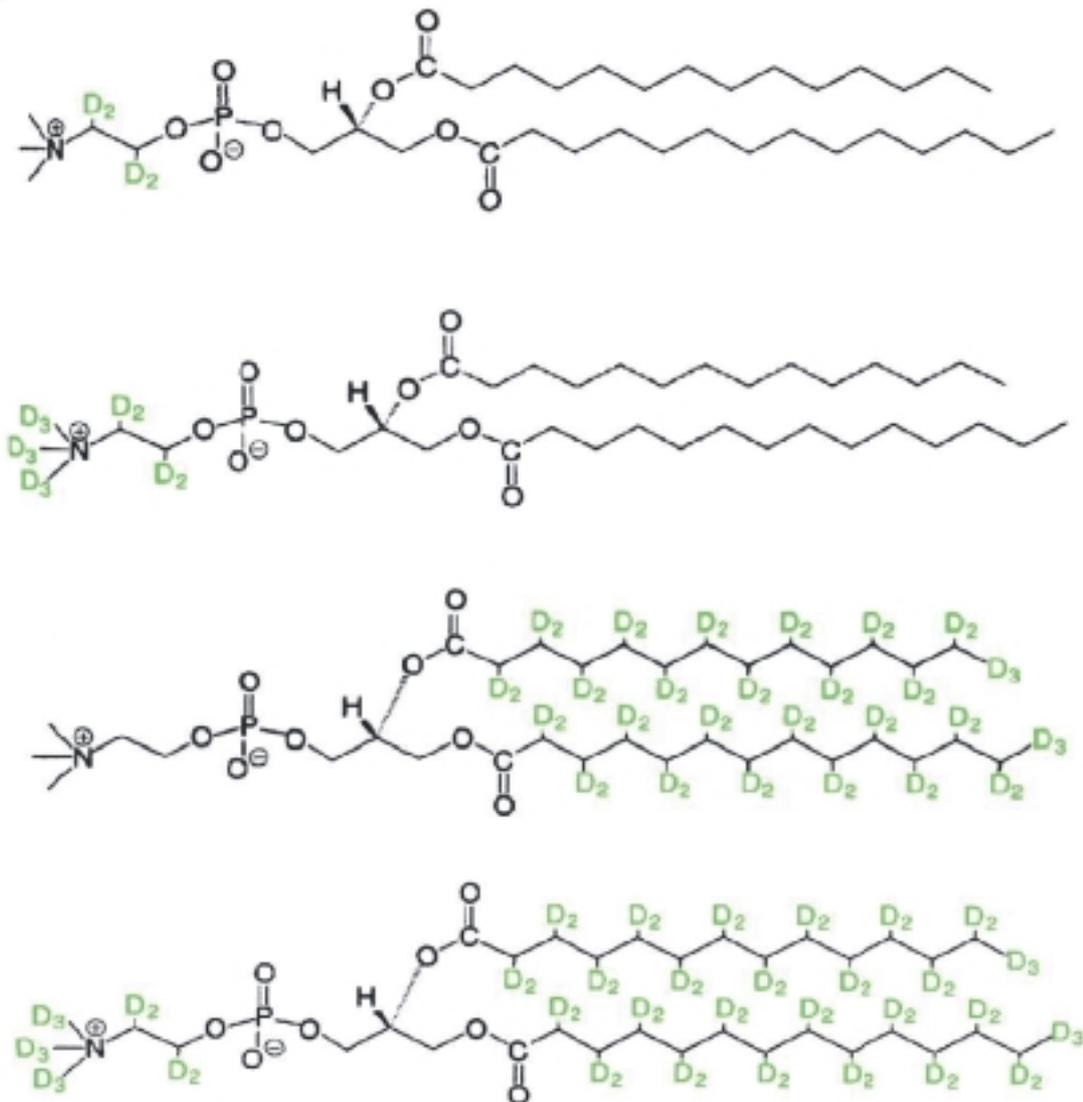


Abb. 3.2.3.1 Strukturformeln der untersuchten DMPC-Analoga; deuterierte Molekülbereiche sind grün hervorgehoben; in der Reihenfolge: DMPC-d4, -d13, -d54 und -d67.

Ein Weg, um Banden einzelner Molekülgruppen im FTIR-Spektrum entflechten zu können, ist die gezielte Isotopenmarkierung. Dazu wurde hier der Austausch von Wasserstoff durch Deuterium in bestimmten Molekülgruppen von DMPC vorgenommen (s. Abb. 3.2.3.1). Die Masse von Deuterium ($^2\text{H} = \text{D}$) ist etwa doppelt so groß wie die von Wasserstoff (^1H), die Kraftkonstante bleibt annähernd gleich (HANDBOOK OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY, 2002). Deshalb erscheinen die Stretschwingungen der deuterierten Molekülgruppen bei (um den Faktor $1/\sqrt{2}$ erniedrigten) ca. 800 cm^{-1} niedrigeren Wellenzahlen als ihre Wasserstoffanaloga

(SMITH, 1999; PINCHAS AND LAULICHT, 1971). Die Entflechtung der Banden im Spektrum eines kompletten Phospholipids wird so ermöglicht (vgl. Tab. 3.2.3.1).

Bezüglich der Interfacegruppen wurden bereits Isotopensubstitutionsexperimente durchgeführt, zum Beispiel mit ^{13}C , um die Carbonylgruppen und ihr Hydratisierungsverhalten näher zu beleuchten (HÜBNER AND MANTSCH, 1991; BLUME ET AL., 1988). Deuteriummarkierungen in Kopf- und Kettenbereichen wurden zur Betrachtung der verschiedenen CH-Spezies bisher wenig genutzt (MENDELSON ET AL., 1989; SNYDER AND POORE, 1973). Methodisch bedingte Isotopenmarkierung wurde zur Konformationsanalyse der polaren Region von Lipiden eingesetzt (ULRICH AND WATTS, 1994A). Hydratisierungsexperimente mit der Systematik der hier vorliegenden Studie existieren bisher noch nicht.

Wasseraufnahmekapazität

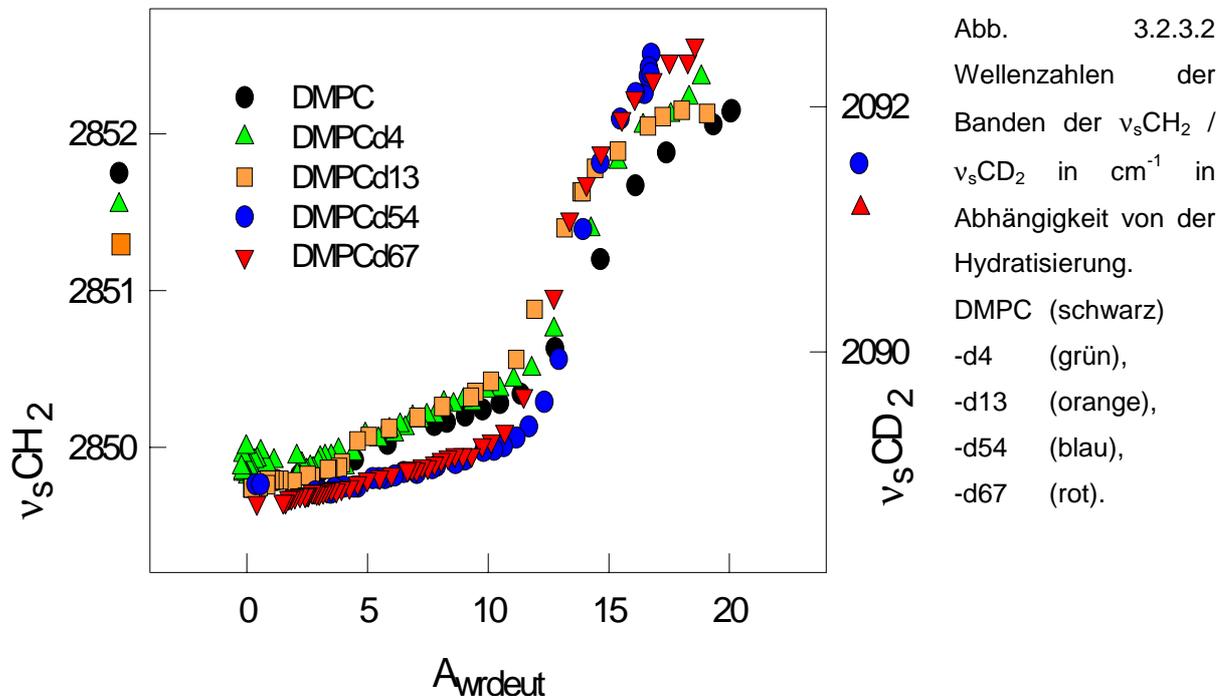
Der durch den Isotopenersatz veränderte CH-Streckschwingungsbereich erforderte eine abweichende A_{wr} -Bestimmung. A_{OH} wurde durch Subtraktion der Fläche der Banden der Valenzschwingungen der (verbleibenden) CH_n -Gruppen eines Spektrums der trockenen Probe ermittelt und von A_{CHOH} subtrahiert. Das Integral der Streckschwingungsbande der Carbonylgruppen wurde zur Eichung der Proben verwendet. Die erhaltenen A_{wrdeut} -Werte entsprechen dem ungefähr vierfachen der mit Division durch A_{CH} üblichen Beträge.

Die Adsorptionsisothermen der vier deuterierten Lipide (nicht abgebildet) gleichen innerhalb der Fehlergrenzen denen von nicht deuteriertem DMPC, so dass eine Beeinflussung der Wasseraufnahme durch Einführung der Deuterierungen weitestgehend ausgeschlossen werden kann. A_{wrdeut} bei 98% RF liegt für alle hier untersuchten Lipide bei ~ 20 ($n_w \sim 7$, (GAUGER ET AL., 2001B)).

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Erkennbar an der sprunghaften Verschiebung der Wellenzahlen der $\nu_s\text{CH}_2 / \nu_s\text{CD}_2$ der Ketten bei einem A_{wrdeut} von 13 - 14 (s. Abb. 3.2.3.2), findet der Hauptübergang von DMPC statt. Der Anstieg der $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ wurde als Indikator für den Anstieg des Anteils an *gauche*-Konformeren auf Kosten der *trans*-ständigen Methylengruppen im Kap. 3.1.2. hinreichend diskutiert und gilt ebenso für deuterierte Ketten (LEWIS AND MCELHANEY, 2002). Eine starke Beeinflussung des Phasenverhaltens durch die Isotopensubstitution kann durch diese Konformität weitgehend ausgeschlossen werden. Leichte Verschiebungen von T_m und damit $A_{\text{wrdeutPÜ}}$ entstehen aufgrund der leicht verkürzten Bindungslänge der CD-Bindung im Vergleich zur CH-Bindung und

damit verminderter Kettenwechselwirkungskräfte in den deuterierten Ketten (bei DMPC $T_m \sim 24 \text{ °C}$ $A_{\text{wrdeutPÜ}} \sim 15$, bei DMPC-d54 $T_m \sim 20 \text{ °C}$ $A_{\text{wrdeutPÜ}} \sim 13$, H. Binder, persönliche Mitteilung; bei DPPC $T_m = 41.5 \text{ °C}$ und DPPC-d62 $T_m = 37.5 \text{ °C}$ (SUNDER ET AL., 1978))



Da die Phosphat- und Carbonylgruppen das gleiche Verhalten wie in undeutertem DMPC zeigten, wurde eine Beeinflussung des Hydratisierungsverhaltens durch die Deuteriumsubstitutionen ausgeschlossen.

$\text{CH}_n / \text{CD}_n$ – Schwingungen der Kopfgruppen

Das Hauptziel der Experimente mit den deuterierten Lipiden sollte die Betrachtung des Einflusses der Hydratisierung auf die verschiedenen CH-Spezies der polaren Region sein. [Abbildung 3.2.3.3](#) zeigt die Spektrenausschnitte der Streckschwingungsbereiche der Methyl- und Methylengruppen. Erwartungsgemäß führten die Isotopensubstitutionen zu definierten Veränderungen. Die Zuordnung der Banden konnten nicht zuletzt auch aufgrund von hydratisierungsbedingten Wellenzahlverschiebungen (s. u.) getroffen werden.

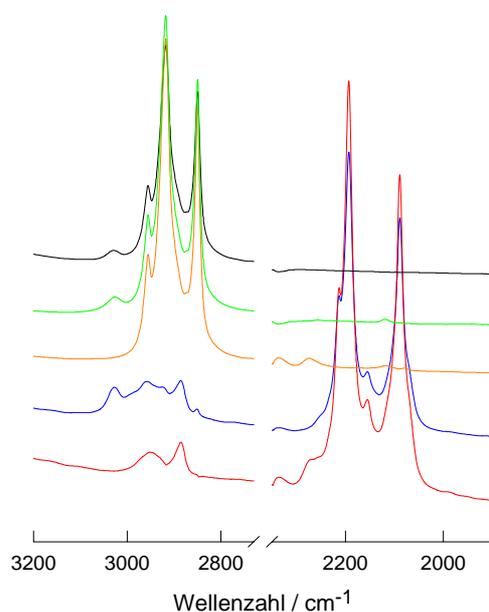


Abb. 3.2.3.3 IR-Spektren im Bereich der CH / CD-Streckschwingungen bei 0% RF von
 DMPC (schwarz)
 -d4 (grün),
 -d13 (orange),
 -d54 (blau),
 -d67 (rot).

Tab. 3.2.3.1 CH- und CD- Spezies und ihre Streckschwingungsmodi (oberer Tabellentheil) und Wellenzahlen (unterer Tabellentheil, bei 98% RF (0% RF vgl. Tab. 4.1.1.1)); sh = Schulter, nicht auswertbar;

Spezies	Gruppe	Quantität	Position	DMPC-d4	DMPC-d13	DMPC-d54	DMPC-d67
1	CH ₃	2	Kettenende			deutertiert	deutertiert
2	CH ₂	24	Kette			deutertiert	deutertiert
3	CH ₂	2	Glycerol (Interface)				
4	CH	1	Glycerol (Interface)				
5	CH ₂	2	Kopfgruppe	deutertiert	deutertiert		deutertiert
6	CH ₃	3	Kopfgruppe		deutertiert		deutertiert
	v			$\tilde{\nu}$ in cm⁻¹			
1	a			2956	2956	2213	2213
	s			2873	2873	2156	2156
2	a			2921	2921	2195	2195
	s			2852	2852	2092	2092
3,4							2964, 2895
5				(2264)*			
				2236	2236sh	2964	
				2196sh	2175sh	2927sh	
				2125	2124	2894	
					(2084)*	2852sh	
6	a			3041	2282	3041	2281

* Die Wellenzahlen in Klammern gehören höchstwahrscheinlich zu TMA- (bei DMPC-d4) bzw. Ketten-CD₂-Schwingungen (DMPC-d13) fälschlicherweise deuterierter Gruppen = Verunreinigungen der Substanzen.

Bei DMPC-d4 und DMPC-d13 lassen sich die Schwingungen der Kopfgruppenbereiche getrennt von denen der Ketten betrachten. In Abb. 3.2.3.4.

sind die $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ und $\tilde{\nu}_x\text{CD}_2$ (x = unbekannte Schwingungssymmetrie) dargestellt. Die Wellenzahlverschiebungen der deuterierten Molekülgruppen des Cholinkopfes setzen bei beiden Lipiden bereits bei deutlich geringeren Wassergehalten der Proben ein als die der Ketten-CH-Gruppen. Der Verlauf dieser Wellenzahlverschiebung ist deckungsgleich mit dem der Banden der $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}} / \nu_a\text{CD}_3^{\text{TMA}}$ (nicht gezeigt).

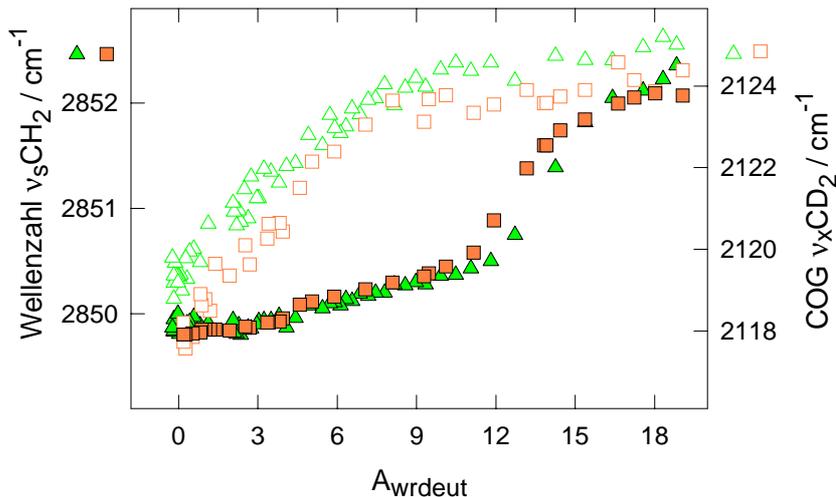


Abb. 3.2.3.4
Wellenzahlen der Banden der $\nu_s\text{CH}_2$ und COG der Banden der $\nu_x\text{CD}_2$ von DMPC-d4 (grün) und -d13 (orange). Symbole dienen der Achsenzuordnung.

Die Deuterierungen in DMPC-d54 ermöglichen ebenfalls die Trennung der Kopf- von den Kettenschwingungen. Wie in [Abb. 3.2.3.5](#) zu erkennen ist, weist die Bande bei 2955 cm^{-1} , die CH_n -Schwingungen des polaren Molekülbereichs zugeordnet werden kann, ein kontinuierliches und dem Kettenschmelzen vorgelagertes Ansteigen ihrer Wellenzahl mit zunehmender Hydratisierung auf.

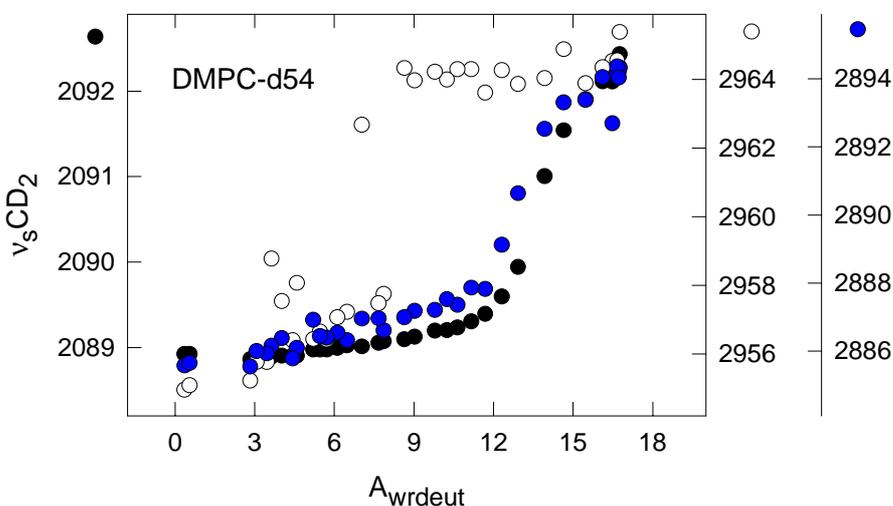
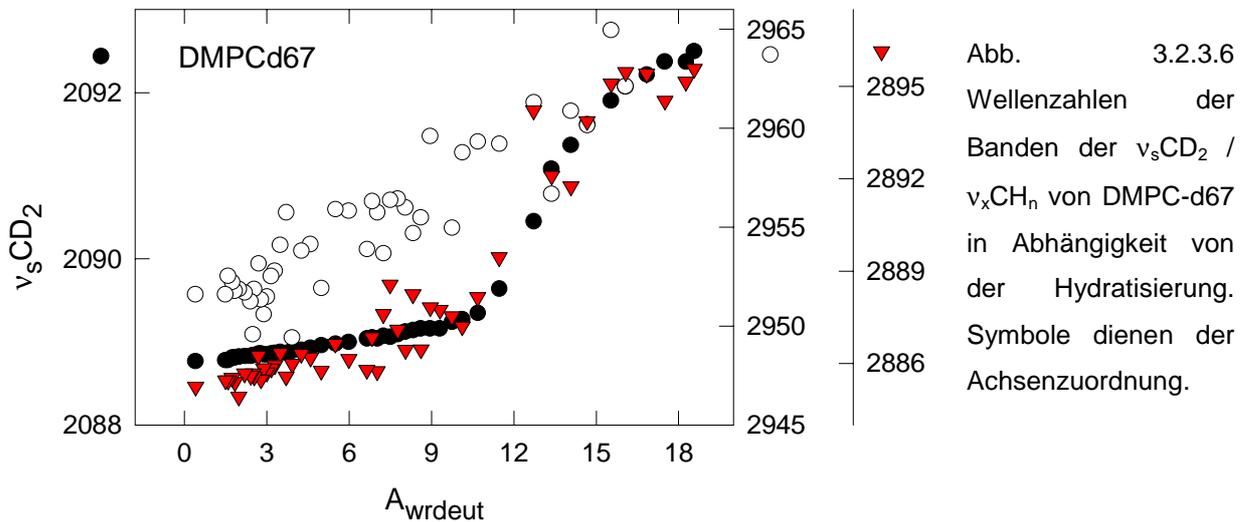


Abb. 3.2.3.5
Wellenzahlen der $\nu_s\text{CD}_2 / \nu_x\text{CH}_n$ von DMPC-d54 in Abhängigkeit von der Hydratisierung. Symbole dienen der Achsenzuordnung.

Im Gegensatz dazu spiegeln die Wellenzahlverschiebungen der Bande bei 2890 cm^{-1} den gleichen Verlauf wieder wie die der Kettenschwingungen bei 2090 cm^{-1} . Die Zuordnung dieser Banden ist unklar. In diesem Wellenzahlbereich befinden sich sowohl die Valenzschwingungen der Cholin- als auch der Interface- CH_n -Gruppen.



DMPC-d67 zeigt ungeachtet der Perdeuterierung der Kopf- und Kettenmethyl(en)gruppen zwei Banden im CH-Streckschwingungsbereich (s. [Abb. 3.2.3.6](#) und [3.2.3.7](#)), die den Valenzschwingungen der CH-Gruppen des Glyceringerüsts zugeordnet wurden. Auch in DMPC-d54 konnten diese Banden beobachtet werden. In undeuterten Proben werden sie von den Kettenschwingungsbanden völlig überlagert. Beim Vergleich mit den Substanzen Cholin, Acetylcholin und MePC (s. [Kap. 3.2.1.](#)) konnte die Bande bei ca. 2955 cm^{-1} ebenfalls wiedergefunden werden, wie in [Abb. 3.2.3.7](#) für MePC gezeigt ist.

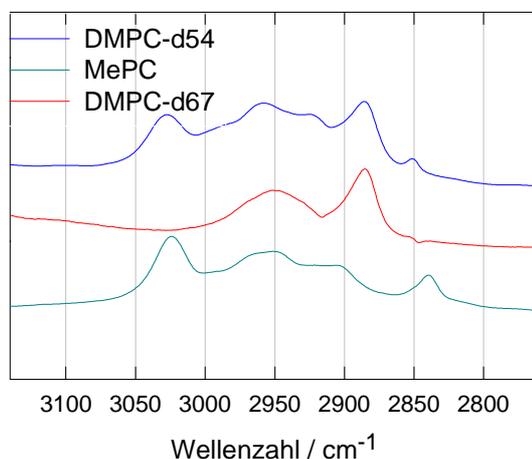


Abb. 3.2.3.7 Spektren von DMPC-d54, -d67 und MePC bei 0% RF im Bereich der CH-Streckschwingungen.

DMPC-d54 (blau);
MePC (petrol);
DMPC-d67 (rot).

Die unterschiedliche Art und Weise der Verschiebungen der Banden bei 2955 bzw. 2890 cm^{-1} könnte möglicherweise ihre Ursache darin haben, dass die Glycerin- CH_n -Gruppen in *sn1*, *sn2* oder *sn3* Position jeweils entweder von der Kopfgruppenhydratisierung oder vom Kettenschmelzen beeinflusst werden. Bei DMPC-d54 (s. Abb. 3.2.3.5) wird die Bande bei 2960 cm^{-1} von Überlagerungen von Schwingungen der Cholin- und Glycerin- CH_n -Gruppen hervorgerufen. Die Verschiebungen der Banden der Cholin- CH_2 -Gruppen und der kopfgruppenbeeinflussten CH_n -Gruppe des Glycerinrückgrats erfolgen parallel. Bei DMPC-d67 wird diese Bande nur durch Glycerin- CH_n -Gruppenschwingungen verursacht.

Zusammenfassung

Die deuterierten Molekülgruppen des Cholinkopfes bei DMPC-d4 und -d13 zeigen eine dem Kettenschmelzen vorgelagerte Verschiebung ihrer Schwingungsfrequenzen bei Hydratisierung. Ähnliche Tendenzen zeigen die Schwingungen der kopfgruppenbeeinflussten Glycerin- und Cholin- CH_n -Gruppen von DMPC-d54 und DMPC-d67. Analog erfolgt die Wellenzahländerung für die Valenzschwingung der $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ - und $\text{N}(\text{CD}_3)_3$ -Gruppe bei $\sim 3030 / 2280 \text{ cm}^{-1}$. Die CH_n der Kopfgruppen hydratisieren also deutlich vor dem Kettenschmelzen. Diese Beobachtung stimmt mit denen an Carbonyl- und Phosphatgruppen (vgl. Kap. 3.1.2.) gemachten überein. Die Beträge der Wellenzahlverschiebungen der Kopfgruppen- CH_n/CD_n -Schwingungen sind deutlich größer als die der Kettenschwingungen, was mit Wasserstoffbrücken im Kopfgruppenbereich erklärbar ist (vgl. Kap. 3.2.1., 4.1.). Im Unterschied dazu werden die Schwingungen der Ketten durch die Konformation des Kohlenstoffgerüsts (*gauche*- / *trans*-Isomerisation) wesentlich bestimmt.

3.3. Systematische Strukturvariation von Phospholipiden

Überblick und Strategie

In diesem Kapitel sollte der Einfluss bestimmter typischer Strukturelemente (Ketten, Kopfgruppen und Interface) von Phospholipiden auf das Hydratisierungs- und Phasenverhalten studiert werden. Dabei handelt es sich um die gezielte Erweiterung der Erkenntnisse über DOPC, POPC, OPPC, DPPC, DOPE und DPPE aus der Dissertation von SELLE (1999). Zuerst wurden **zwitterionische Phospholipide** untersucht. Dabei wurden 1.) PC's mit unterschiedlich langen, gesättigten Ketten, 2.) kurzkettige Phospholipide mit PC- und PE-Kopfgruppe und 3.) ein verzweigt-kettiges PC und PE betrachtet. Weiterhin werden **anionische**

Phospholipide untersucht, wobei die erste Substanz, DOPG, eine PG-Kopfgruppe besitzt und die zweite, Cardiolipin, ein mit zwei Phosphatgruppen verestertes Glycerol darstellt.

Phosphatidylcholin, -ethanolamin und -glycerol sind Kopfgruppenstrukturen von Lipiden, die häufig in biologischen Membranen zu finden sind.

3.3.1. Zwitterionische Phospholipide

3.3.1.1. Gesättigte PC's mit unterschiedlichen Kettenlängen: DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DBPC

DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC und DBPC wurden untersucht (s. Tab. 3.3.1.1.1, (GAUGER ET AL., 2001A)).

Tab. 3.3.1.1.1 Anzahl der Ketten-CH- und der gesamten CH-Gruppen, T_m und der Korrekturfaktor zur Berechnung von A_{wrc} der untersuchten Lipide.

Lipid	nCH Kette	$T_m/^\circ\text{C}^*$	nCH gesamt	Korrekturfaktor
DDPC	10	-5.7	26	1.46
DLPC	12	-1	30	1.27
DMPC	14	23.5	34	1.12
DPPC	16	41.5	38	1
DSPC	18	55	42	0.9
DBPC	22	73	50	0.76

*(CAFFREY, 1993; MARSH, 1990; LEWIS ET AL., 1987)

Ziel der Untersuchung war herauszufinden, ob die FTIR-Spektroskopie von Lipidfilmen auch quantitative Schlüsse zum Einfluss des apolaren Lipidteils auf das Hydratisierungsverhalten beim Vergleich des Wasseraufnahmevermögens verschiedener Lipide zulässt.

Wasseraufnahmevermögen

Die Abhängigkeit des Parameters A_{wr} von der Kettenlänge, die sich durch Einbeziehung der integralen Absorption der CH-Valenzschwingungen in die Berechnung ergibt, erfordert für den systematischen Vergleich des lyotropen Phasenverhaltens von Lipiden mit unterschiedlich vielen Methylengruppen pro Kette die Einführung eines Korrekturfaktors. Die Konstanz des molaren Extinktionskoeffizienten der Probe, die bei Phasenübergängen z. T. nur bedingt gewährleistet ist, wird dabei vorausgesetzt. Der Einfluss dieser Extinktionsänderung auf die integrierte Fläche wurde von SELLE (1999) jedoch als vernachlässigbar eingeschätzt.

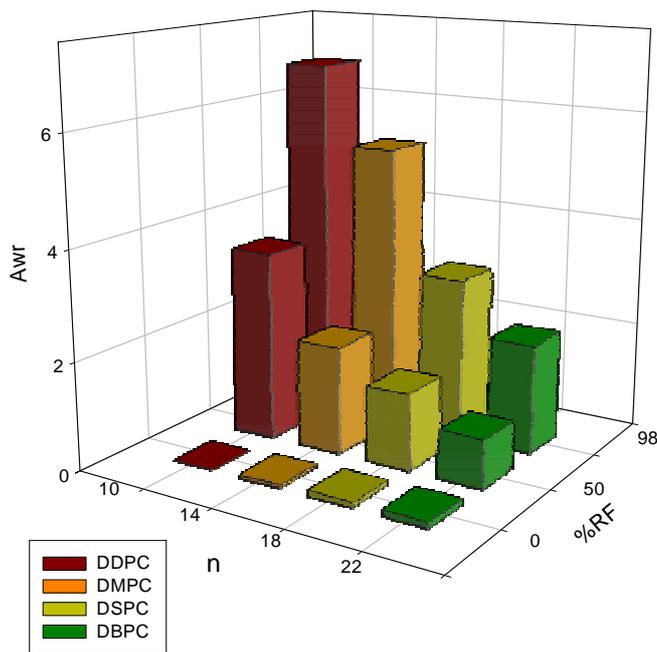


Abb. 3.3.1.1.1 Unkorrigierte Adsorptionsisothermen von DDPC (rotbraun), DMPC (ocker), DSPC (olivgrün), DBPC (dunkelgrün).

Die CH-Spezies von PC's und ihre Beiträge zur integralen Absorption A_{CH} wurden bereits aufgeschlüsselt (vgl. Tab. 3.2.3.1). Bei der Berechnung des Korrekturfaktors wurde das gut charakterisierte DPPC (SMALL, 1986) als Standardlipid mit Korrekturfaktor = 1 verwendet. Die Korrekturfaktoren der anderen Lipide wurden durch Korrelation der Anzahl der gesamten CH-Gruppen von DPPC und der Anzahl der CH-Gruppen des jeweiligen Lipids nach der Formel:

$$\text{Korrekturfaktor} = n_{\text{CHgesamtDPPC}} / n_{\text{CHgesamtDXPC}}$$

bestimmt (s. Tab. 3.3.1.1.1). Die Berechnung von A_{wr} wurde nun für jedes Lipid mit der, mit dem Korrekturfaktor multiplizierten, Fläche von A_{CH} wiederholt, woraus ein korrigierter A_{wrc} resultierte (c = corrected). Nach Anwendung dieses Verfahrens traten systematische Effekte klar hervor. Die Adsorptionsisothermen machen deutlich, dass die Lipide bei niedrigen Luftfeuchten einen etwa gleich hohen A_{wrc} -Wert erreichen. Bei hohen RF jedoch adsorbieren die drei kurz-kettigen (DDPC, DLPC, DMPC) erheblich mehr Wasser als die drei lang-kettigen (DPPC, DSPC, DBPC) (s. Abb. 3.3.1.1.1 im Vergleich mit Abb. 3.3.1.1.2).

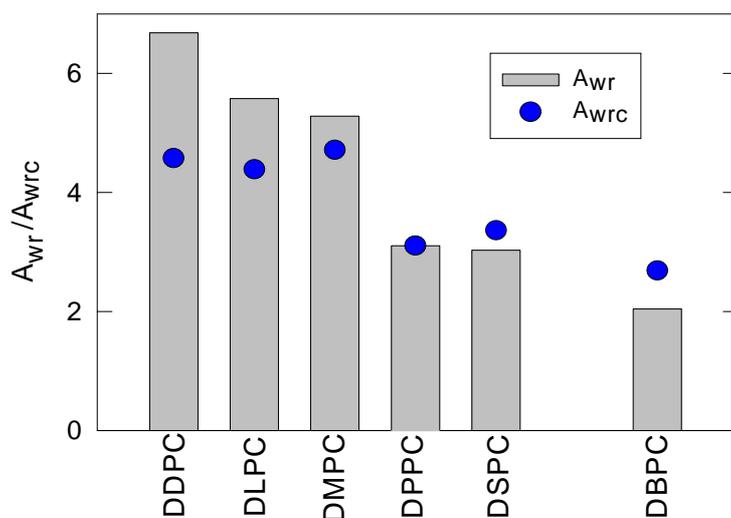


Abb. 3.3.1.1.2 A_{wrc} ● der untersuchten Lipide bei 98% RF im Vergleich zu A_{wr} (graue Balken).

A_{wrc} variiert also nicht wie A_{wr} systematisch mit der Kettenlänge, sondern die A_{wrc} -Werte nähern sich nach der Verwendung des Korrekturfaktors innerhalb von zwei Gruppen einander stark an. Die Lipide können somit aufgrund ihres Hydratisierungsverhaltens in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, nämlich in Lipide mit relativ hoher (≤ 14 C Kettenlänge, $A_{wrc} \sim 4.5$) und Lipide mit relativ geringer (> 14 C, $A_{wrc} \sim 3$) Wasseraufnahmekapazität. Die Erklärung dafür ist, dass die kürzerkettigen Lipide DDPC, DLPC und DMPC bei Raumtemperatur einen hydratisierungsbedingten Hauptübergang durchlaufen (s. Abb. 3.3.1.1.3). Sie liegen bei hohen A_{wrc} in der L_{α} -Phase vor, die gegenüber den soliden Phasen ein höheres Wasseraufnahmevermögen besitzt (MCINTOSH AND MAGID, 1993).

Die langkettigen Lipide geben in Bereichen geringer RF weniger Wasser ab als die kurzkettigen, was im sogenannten „Restwasser“-Gehalt deutlich wird (s. Abb. 3.3.1.1.1). Die Länge der hydrophoben Ketten ist bei diesem Effekt insofern ursächlich, als dass der relative Einfluss des unpolaren Anteil des Lipidmoleküls bei längeren Ketten erhöht und die Kettenpackung aufgrund der höheren Anzahl der van-der-Waals-Wechselwirkungen dichter und geordneter ist. Die Bindungsorte für Wasser im Bereich der Kopfgruppen werden dadurch stabilisiert und die Wasserabgabe im Bereich geringer Luftfeuchten ist erschwert.

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

An der Wellenzahlverschiebung der Bande der $\nu_s\text{CH}_2$ (s. Abb. 3.3.1.1.3) ist das Kettenschmelzen der Lipide ≤ 14 C erkennbar. Der Betrag des relativen Wassergehalts im Mittelpunkt des stärksten Anstiegs der $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ beim

Kettenschmelzen verschiebt sich mit steigender Anzahl der Methylengruppen in der Kette in Richtung höherer Werte ($A_{\text{wrcPÜ}}$ 0.5, 1.5, 3.5 für $n\text{C} = 10, 12, 14$). Die Systematik gleicht der der T_m -Werte beim thermischen Schmelzen (s. Tab. 3.3.1.1.1). Auch der Betrag der zugehörigen Wellenzahlverschiebung ist durch die Länge der Acylketten beeinflusst, wie an der systematischen Abnahme ihrer Differenz von ca. 3 (DDPC) über 2.5 (DLPC) hin zu 2 (DMPC) cm^{-1} erkennbar ist. Das kann als Maß für den Grad der Störung der Kettenordnung im fluiden Zustand interpretiert werden.

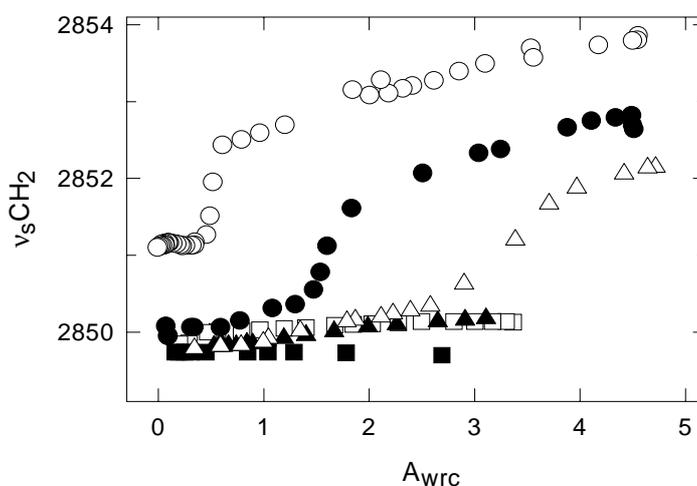


Abb. 3.3.1.1.3 $\tilde{\nu}_s(\text{CH}_2)$ in Abhängigkeit von A_{wrc} in cm^{-1} .

DDPC \circ ,
 DLPC \bullet ,
 DMPC \triangle ,
 DPPC \blacktriangle ,
 DSPC \square ,
 DBPC \blacksquare .

Banden, wie z. B. die der Phosphat- und der Carbonylstreckschwingungen, zeigen eher kontinuierliche Verschiebungen ihrer Wellenzahlen in Abhängigkeit des Hydratisierungszustandes.

Die Carbonylbande von DDPC ist in Bereichen geringer Hydratisierung in zwei Subbanden bei 1726 und 1737 cm^{-1} aufgespalten (s. Abb. 3.3.1.1.4). Sie wurde von LEWIS AND MCELHANEY (1992), LEWIS AND MCELHANEY (1990) und MANTSCH ET AL. (1985) als Indiz für das Vorhandensein einer kristallinen Phase (L_c) beschrieben. Bei Mantsch und Mitarbeitern konnte diese Aufspaltung allerdings nur durch Fourier-Selbstdekonvolution gezeigt werden und bei Lewis und Mitarbeitern war die Aufspaltung nicht so stark - offenbar aufgrund methodischer Unterschiede: in beiden Gruppen wurden voll hydratisierte Proben temperaturabhängig vermessen. Die Spaltung der $\tilde{\nu}\text{C=O}$ bei Dehydratisierung von DDPC setzt bei niedrigeren Wassergehalten ein, als das Ketteneinfrieren. Das heißt, dass die sonst für Phasenübergänge beobachtete annähernde Synchronität der Wellenzahl-

verschiebungen der Banden der Schwingungen der Ketten und der Carbonylgruppen, wie z. B. im POPC, OPFC (SELLE AND POHLE, 1998), bei diesem L_{α} - L_c - Übergang nicht auftritt. Aufgrund der Aufspaltung der $\nu C=O$ -Bande konnte diese, in anderen Lipiden sowohl in Halbwertslinienbreite als auch im Extinktionskoeffizient als stabil eingeschätzte Bande, hier nicht zur Eichung der A_{OH} - Integrale verwendet werden, wie es z. B. in [Kap. 3.2.3.](#) getan wurde.

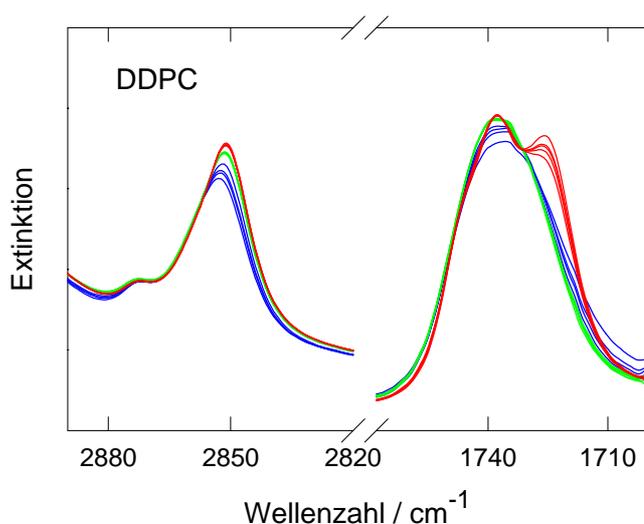


Abb. 3.3.1.1.4 Spektren eines Dehydratisierungsscans von DDPG im Bereich von $\nu_s CH_2$ und $\nu C=O$ bei 98% RF (blau) und Aufspaltung der Carbonylbände bis 0% RF (rot); grün = Übergangsbereich der Ketten.

Zusammenfassung

Zur Eichung des spektralen Hydratationsgrades A_{wr} bei Lipiden mit unterschiedlichen Kettenlängen wurde mit Hilfe eines Korrekturfaktors A_{wrc} berechnet. Das über A_{wrc} bestimmte Wasseraufnahmevermögen bei 98% RF ist jeweils bei Lipiden in der fluiden Phase und bei Lipiden in kristallinen oder Gel-Phasen nahezu gleich groß.

3.3.1.2. Vergleich PC- und PE-Kopfgruppe bei kurzkettigen Lipiden: DCPC / DCPE

Ziel des Vergleichs von DCPC und DCPE soll die Beschreibung des Einflusses der unterschiedlichen polaren Kopfgruppenstruktur in Kombination mit geringer Kettenlänge ($nC = 10$) auf das lyotrope Phasenverhalten und das Wasseraufnahmevermögen sein (Strukturformeln der Kopfgruppen [vgl. Abb. 3.3.1.3.1](#)). Der Strukturunterschied der PE-Kopfgruppe bedingt deutliche Änderungen im Phasenverhalten im Vergleich zum PC-Analogon (CHIA AND MENDELSON, 1996; MCINTOSH, 1996). Die T_m -Werte der hier untersuchten Lipide unterscheiden sich bereits erheblich: $T_{mDCPC} = -32.7 \text{ } ^\circ\text{C}$ (HUANG ET AL., 1994) und $T_{mDCPE} = 26.4 \text{ } ^\circ\text{C}$ (LEWIS AND MCELHANEY, 1993; SINGER ET AL., 1990). Das Auftreten eines hydratisierungsinduzierten

Phasenübergangs ist für DCPC schon im [Kap. 3.3.1.1.](#) gezeigt worden.

Caprylsäure-Glycerinester sind in der Natur in Ziegenbutter und Kokosnussöl, sowie in Weinfuselöl zu finden (RÖMPP CHEMIELEXIKON, 1995).

Wasseraufnahmekapazität

Die A_{wrc} -Bestimmung erfolgte bei DCPC wie unter [Kap. 3.1.1.](#) beschrieben und mit Hilfe des Korrekturfaktors (s. [Kap. 3.3.1.1.](#)), bei DCPE wurden zusätzlich die Progressionsbanden der NH-Gruppen (vgl. [Abb. 3.1.1.3](#)), die den CHOH-Streckschwingungsbereich überlagern, subtrahiert. Bei 98% RF wurde von DCPC $A_{\text{wrc}} = 4.3$ und von DCPE $A_{\text{wrc}} = 1.6$ erreicht. Die Wasseraufnahmekapazität von DCPC übertrifft die von DCPE also deutlich. Die Erklärung dafür ist aus vielen Studien bekannt: PE's bilden Wasserstoffbrücken-Netzwerke zwischen den NH_3^+ - und PO_2^- -Gruppen aus (POHLE ET AL., 1997; HAUSER ET AL., 1988; BOGGS, 1987). Nur wenige Phosphatgruppen verfügen darum über freie Bindungsstellen, was die Wasseradsorption vermindert. Verglichen mit anderen PE's (s. [Tab. 3.3.1.3.1](#): DPPE $A_{\text{wrc}} = 1$) ist $A_{\text{wrc}} = 1.6$ jedoch relativ hoch. Das ist möglicherweise auf die relative Kürze der Ketten zurückzuführen. Die damit erhöhte Unordnung der Moleküle bewirkt, dass das PE-Netzwerk geschwächt ist und Wasser etwas leichter an den polaren Gruppen binden kann.

Bei 0% RF betrug A_{wrc} DCPC = 0.02 und von A_{wrc} DCPE = 0. Die Ausbildung eines H-Brücken-Netzwerks in PE's bewirkt, dass in Bereichen geringer Luftfeuchte kein Restwasser wie in PC's gebunden wird, sondern unterhalb einer bestimmten RF (DCPE < 31%) intermolekulare H-Brückenbindungen das Wasser ersetzen (POHLE ET AL., 1997).

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Während die Positionen der meisten Banden von DCPC in Abhängigkeit vom Wassergehalt deutlichen Änderungen unterliegen, bleiben die von DCPE nahezu konstant (s. [Abb. 3.3.1.2.1](#)). An der sprunghaften Verschiebung der Bande der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung von DCPC ist der Hauptübergang (bei $A_{\text{wrc}} \sim 0.5$) von der L_c in die L_α -Phase zu erkennen. Diese Bande liegt bei DCPE nahezu konstant bei 2850.3 cm^{-1} und ist gemeinsam mit der Bande der $\nu_a\text{CH}_2$ bei 2920.5 cm^{-1} ein Indiz für relativ geordnete Ketten (im Gegensatz zu DCPC (mit entsprechenden Bandenpositionen bei $2853.8 / 2923.6 \text{ cm}^{-1}$) oder DOPE ($\sim 2853.7 / 2924.4 \text{ cm}^{-1}$) bei 98% RF). Die Banden der $\nu_{a/s}\text{CH}_2$ von längerkettigen, gesättigten PE's wie z. B. DPPE (bei $2920 / 2850 \text{ cm}^{-1}$) befinden sich in den gleichen

Wellenzahlbereichen, wie die von DCPE. Diese Lipide liegen in kristallinen Phasen vor.

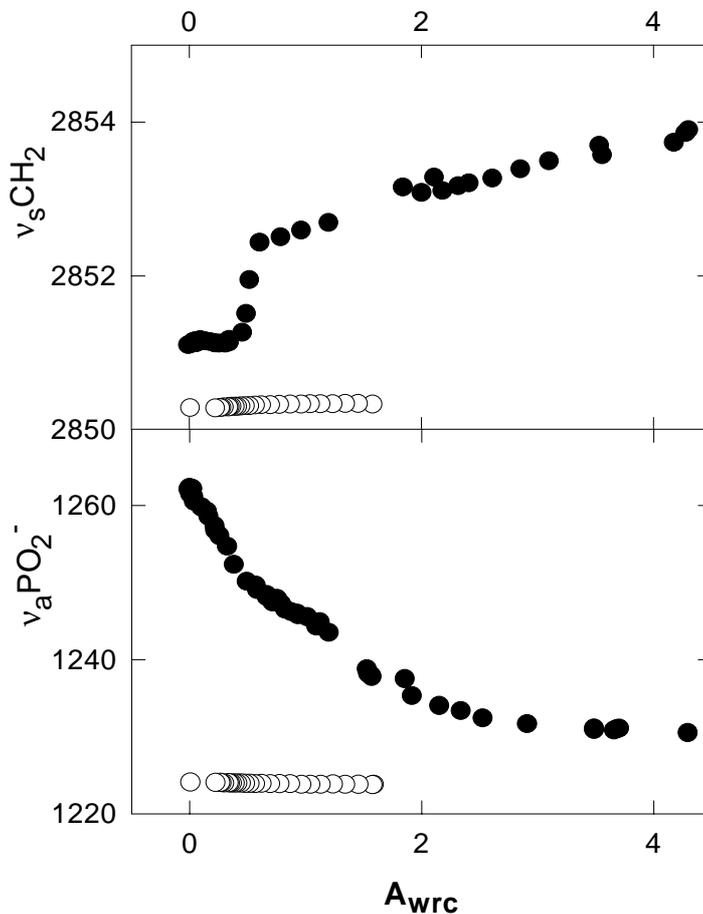


Abb. 3.3.1.2.1 $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ und $\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$ von DCPC (schwarze Punkte) und DCPE (weiße Kreise) in cm^{-1} in Abhängigkeit von A_{wrc} .

Die Position der Bande der $\nu_a\text{PO}_2^-$ von DCPE befindet sich trotz steigender Hydratisierung nahezu konstant bei 1225.5 cm^{-1} . Die Phosphatgruppen von DCPE sind demzufolge bei allen RF in starke Bindungen involviert (POHLE ET AL., 1997; MCINTOSH, 1996; LEWIS AND MCELHANEY, 1993; BOGGS, 1987). Die Bande der $\nu\text{C}=\text{O}$ von DCPE befindet sich nahezu konstant bei $\sim 1737.4 \text{ cm}^{-1}$.

Der relativ hohe A_{wrc} -Wert im DCPE bei 98% RF ist aufgrund der Befunde für die Phosphat- und Carbonylgruppen verwunderlich. Das Wasser erreicht die Kopfgruppe möglicherweise gar nicht erst oder übt keine registrierbaren Effekte auf die Gruppenschwingungen aus, wie schon für DPPE postuliert wurde (SELLE, 1999). Die Wellenzahlverschiebungen der Banden der Phosphat- (1260 bei 0% RF, 1230 cm^{-1} bei 98% RF) und Carbonylstreckschwingungen ($1737 + 1726 \text{ cm}^{-1}$ bei 0% RF, 1734 cm^{-1} bei 98% RF s. Abb. 3.3.1.1.4) des DCPC zeigen dagegen deutlich die Wasserbindung an.

Zusammenfassung

Trotz gleicher Kettenstruktur von DCPC und DCPE hydratisieren beide Lipide aufgrund ihrer unterschiedlichen Kopfgruppenstruktur völlig verschieden. Die Einflüsse der Kopfgruppen überwiegen gegenüber denen der Ketten, so dass es im DCPC zum Kettenschmelzen dieses Lipids kommt und bei DCPE nicht. Bei DCPE sind außerdem keinerlei Einflüsse des zugeführten Wassers auf polare Gruppen erkennbar.

3.3.1.3. Vergleich PC- / PE-Kopfgruppe bei verzweigt-kettigen Lipiden: DPhPC / DPhPE

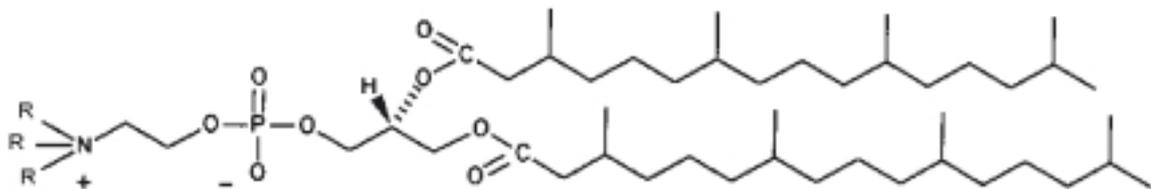


Abb. 3.3.1.3.1 R = CH₃ Strukturformel von Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC), R = H von Diphytanoylphosphatidylethanolamin (DPhPE).

Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC) und sein Ethanolaminanalogon DPhPE (Strukturformeln s. Abb. 3.3.1.3.1) wurden hier studiert, um einerseits den Vergleich PC- / PE-Kopfgruppe weiter zu verfolgen und andererseits im Vergleich mit anderen Lipiden die Besonderheiten des Einflusses der Isoprenoidstruktur der Phytanoylketten auf die Eigenschaften der polaren Gruppen herauszuarbeiten. Außerdem sind in der Literatur interessante und z. T. widersprüchliche Ergebnisse zum Hydratisierungsverhalten von DPhPC vorgestellt worden (s. u.).

Phytansäure (3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadecansäure) ist in Lipiden der Membranen von Archaeobakterien zu finden. Diese Bakterienspezies müssen aufgrund ihres unwirtlichen Lebensraumes Strategien entwickeln, um z. B. gegen dort herrschende Hitze oder hohe Salzkonzentrationen resistent zu sein. Sie gewährleisten eine stabile Zellabgrenzung mit Hilfe von Membranen, die sich durch einen hohen Anteil von Phytan(o)yllipiden auszeichnen. Die häufigste Form der Phytan(o)yllipide dieser Archaeobakterien, z. B. von *Halobacterium cutirubrum*, sind anionische Phosphatidylglycerole und Etherlipide (STEWART ET AL., 1990).

DPhPC-Modellmembranen werden häufig für Experimente, die z. B. die Rekonstitution von Ionenkanälen oder Studien von Interaktionen mit Peptiden oder DNA (KAPPEL ET AL., 2000; WIESE ET AL., 1998; HRISTOVA ET AL., 1997) beinhalten, verwendet, da von ihnen behauptet wird, hohe Bilayerstabilität, das Fehlen eines temperaturinduzierten Hauptüberganges in einem Bereich von -120 bis $+120$ °C (LINDSEY ET AL., 1979) und geringe Ionenleitfähigkeit (YAMAUCHI ET AL., 1993; REDWOOD ET AL., 1971) zu haben. Außerdem wurden DPhPC und DPhPE bereits als Helferlipide bei liposomenvermittelter Transfektion von genetischem Material getestet (MARSHALL ET AL., 2000; ANDREOPOULOS AND KASI, 1997).

HSIEH ET AL. (1997) und WU ET AL. (1995) untersuchten DPhPC-Modellmembranen, und fanden hohe Sensibilität des Phasenverhaltens von DPhPC für Dehydratisierung, zum Teil jedoch mit widersprüchlichen Ergebnissen: Hsieh und Mitarbeiter konnten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine Vielfalt von Überstrukturen von lamellaren über kubische bis hin zu hexagonalen Phasen nachweisen, wogegen Wu und Mitarbeiter mittels Röntgenbeugung ausschließlich lamellare Phasen fanden.

IR-spektroskopische Studien existierten bisher weder zu DPhPC noch zu DPhPE, sondern nur zu einigen Phytanyl-lipiden (STEWART ET AL., 1990).

Wasseraufnahmevermögen

A_{wr} wurde wie unter [Kap. 3.1.1.](#) beschrieben mit Hilfe von A_{OH} und A_{CH} berechnet, kann jedoch aufgrund der Besonderheiten im Bereich der symmetrischen Methylenvalenzschwingungsbande ([s. Abb. 3.1.1.3](#)) nur bedingt mit den A_{wr} -Werten anderer Lipide verglichen werden. Ergänzende Ergebnisse aus Gravimetrie und Karl-Fischer-Titration (GAUGER ET AL., 2001B) liefern die Korrelation zu n_w . Die maximale Wasseraufnahmekapazität von DPhPC ist hoch und erreicht $A_{wr} \sim 6.5$ ($n_w \sim 14$) bei 98% RF ([s. Abb. 3.1.1.2](#)). (Auf die Berechnung von A_{wrc} wurde wegen bereits publizierter Daten in (GAUGER ET AL., 2002) verzichtet). Ungewöhnlich für ein PC ist seine Fähigkeit zur kompletten Wasserabgabe. Im Spektrum von trockenem DPhPC bei 0% RF ist keine Bande im OH-Streckschwingungsbereich erkennbar (im Gegensatz zu DOPC, [s. Abb. 3.1.1.3](#)) und somit kein Restwasser detektierbar. Im trockenen Lipid sind Werte von $A_{wr} = 0$ bisher vor allem bei PE's zu beobachten gewesen ((POHLE ET AL., 1998; SELLE AND POHLE, 1998), [vgl. Tab. 3.3.1.3.1](#)).

Aus dem Spektrum des voll hydratisierten DPhPE ([s. Abb. 3.1.1.3](#)) kann man ein verringertes Wasseraufnahmevermögen im Vergleich zum DPhPC bereits abschätzen. Auch DPhPE gibt in Bereichen geringer Luftfeuchte Wasser vollständig

ab. Die Ursache ist ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk zwischen den NH_3^+ - und Phosphatgruppen, wie es für DCPE in [Kap. 3.3.1.2.](#) bereits beschrieben wurde. Die Wasseraufnahmekapazität bei 98% RF beträgt $A_{\text{wr}} \sim 3.5$ ($n_w \sim 5$) und liegt damit höher als bei PE's mit unverzweigten Ketten aus vorangegangenen Studien ((SELLE, 1999), [vgl. Tab. 3.3.1.3.1](#)). Die Bindungsstellen für Wasser sind in den Phytanoyllipiden offenbar leichter zugänglich, weil der Kopfgruppenbereich aufgrund der offenbar durch die Methylverzweigungen aufgelockerten Kettenpackung expandiert ist. Dadurch kommen hohe Wasseraufnahmekapazität bei großen RF und vollständige Wasserabgabe bei niedrigen RF in diesen Lipiden zustande.

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Im Gegensatz zu Spektren bisher untersuchter Lipide erscheint in den Spektren der Phytanoyllipide im Bereich der symmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande eine triplettartige Bande mit Maxima bei 2869, 2858 und 2847 cm^{-1} (s. Spektren [Abb. 3.1.1.3](#) + Ausschnittsvergrößerung, Wellenzahlen s. [Abb. 3.3.1.3.2](#)).

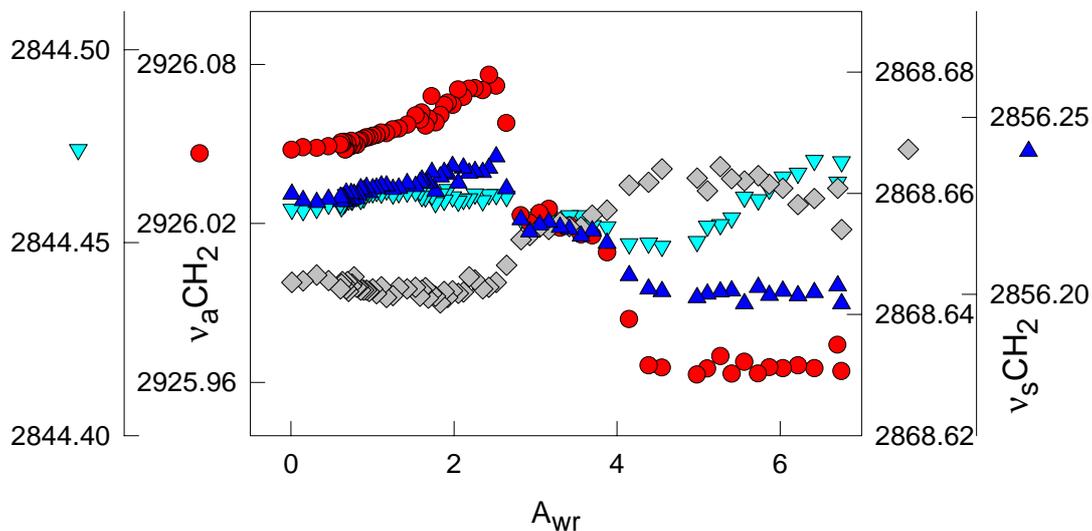


Abb. 3.3.1.3.2 COG in cm^{-1} der Banden der Streckschwingungen der Methyl(en)gruppen von DPhPC in Abhängigkeit von der Hydratisierung. Die Zuordnung der Banden erfolgt z. T. [im Text](#).

In den IR-Spektren von DPhPC während der De- und Rehydratisierungsscans sind systematische und sprunghafte Änderungen der Wellenzahlen und Intensitäten aller Banden im CH_n -Schwingungsbereich bei $A_{\text{wr}} \sim 3$ (ca. 60% RF) und ~ 4 (ca. 80% RF) zu beobachten (s. [Abb. 1.5.1.1](#), [Abb. 3.3.1.3.2](#)), die hydratisierungsgetriebenen Phasenübergängen im DPhPC zugeordnet werden können, die nach HSIEH ET AL. (1997)

zu vermuten waren. Bei DPhPE sind dagegen keine Änderungen der $\tilde{\nu} \text{CH}_n$ zu beobachten.

Die Banden bei 2926 und 2856 cm^{-1} wurden der antisymmetrischen und symmetrischen CH_2 -Streckschwingung zugeordnet (s. Abb. 3.3.1.3.2). Die Wellenzahl der Bande der $\nu_a \text{CH}_3$ sinkt im DPhPC (von 2955.69 auf 2955.5 cm^{-1} , nicht gezeigt). Die Wellenzahl der Bande bei 2868 cm^{-1} steigt dagegen mit zunehmender Hydratisierung an, weshalb sie Schwingungen der Kettenmethylgruppen der Verzweigungen zugeordnet wurde. Aufgrund der geringen Intensität und starken Überlagerung durch benachbarte Banden ist die Wellenzahlverschiebung der Bande bei 2844 cm^{-1} kaum bestimmbar und konnte weder der einen noch der anderen CH_n -Schwingung eindeutig zugeordnet werden. Aus den hohen Wellenzahlbeträgen der Streckschwingungsbanden der Methylengruppen bei DPhPC und DPhPE kann geschlussfolgert werden, dass die Ketten beider Phytanoyllipide über den gesamten Hydratisierungsbereich ungeordnet sind (s. Tab. 3.3.1.3.1 $\tilde{\nu}_a \text{CH}_2$). Die Banden liegen auch im Vergleich mit anderen Lipiden bei höheren Wellenzahlen, was wiederum einen besonders hohen Grad der Unordnung der Ketten ausdrückt.

Tab. 3.3.1.3.1 Vergleich verschiedener experimenteller Daten von PC's und PE's; n_w und Wellenzahlen gerundet.

Lipid	Wasseraufnahmekapazität			Wellenzahl / cm^{-1}				Ref.
	$\sim A_{wr}(98\% \text{ RF})$	$\sim n_w(98\% \text{ RF})$	$\sim A_{wr}(0\% \text{ RF})$	$\tilde{\nu}_a \text{CH}_2$	$\tilde{\nu} \text{C=O}$	$\tilde{\nu}_a \text{PO}_2^-$	$\tilde{\nu}_s \text{PO}_2^-$	
DPhPC	6.5	14.5	0	2926 ^e	1737-1731	1260-1230	1096-1087	
DOPC	4.5	10	0.1	2924	1738-1733	1260-1230	1094-1087	a,b
OPPC,POPC	4	9	0.05	2921-2923	1737.5-1734	1260-1230	1093-1088	a,b
DPPC	3	6.5	0.3	2920	1737.5-1736	1258-1232	1093-1089	a
DPhPE	3.5	5	0	2925.5 ^e	1739.5-1738	1233-1225	1082-1076	
DOPE	1.5	4 ^f	0	2924	1742-1740	1231.5-1224	1082-1076	c
DPPE	1		0	2920	1741	1224	1081	d

^a (POHLE ET AL., 1998), ^b (SELLE AND POHLE, 1998), ^c (POHLE AND SELLE, 1996), ^d (SELLE, 1999), ^e COG, ^f gravimetrische Ergebnisse (BINDER ET AL., 2000B).

Abb. 3.3.1.3.3 zeigt die Abhängigkeiten der Wellenzahlen der Banden der Carbonyl- und Phosphatvalenzschwingungen von DPhPC und DPhPE im Vergleich mit DOPE. Die Verschiebungen der Banden von DPhPC sind deutlich größer als die der PE's (vgl. Tab. 3.3.1.3.1). Sowohl bei der De- als auch bei der Rehydratisierung sind bei DPhPC außerdem Diskontinuitäten im Anstieg der Wellenzahlen der $\nu \text{C=O}$ zu beobachten, und zwar bei $A_{wr} \sim 2.6$ und ~ 4.5 , wo bereits bei den Wellenzahlen der

Kettenmethyl(en)schwingungen kleine Sprünge zu beobachten waren. Sollten also hydratisierungsbedingte Strukturänderungen im DPhPC stattfinden, so sind die Carbonylgruppen offenbar involviert.

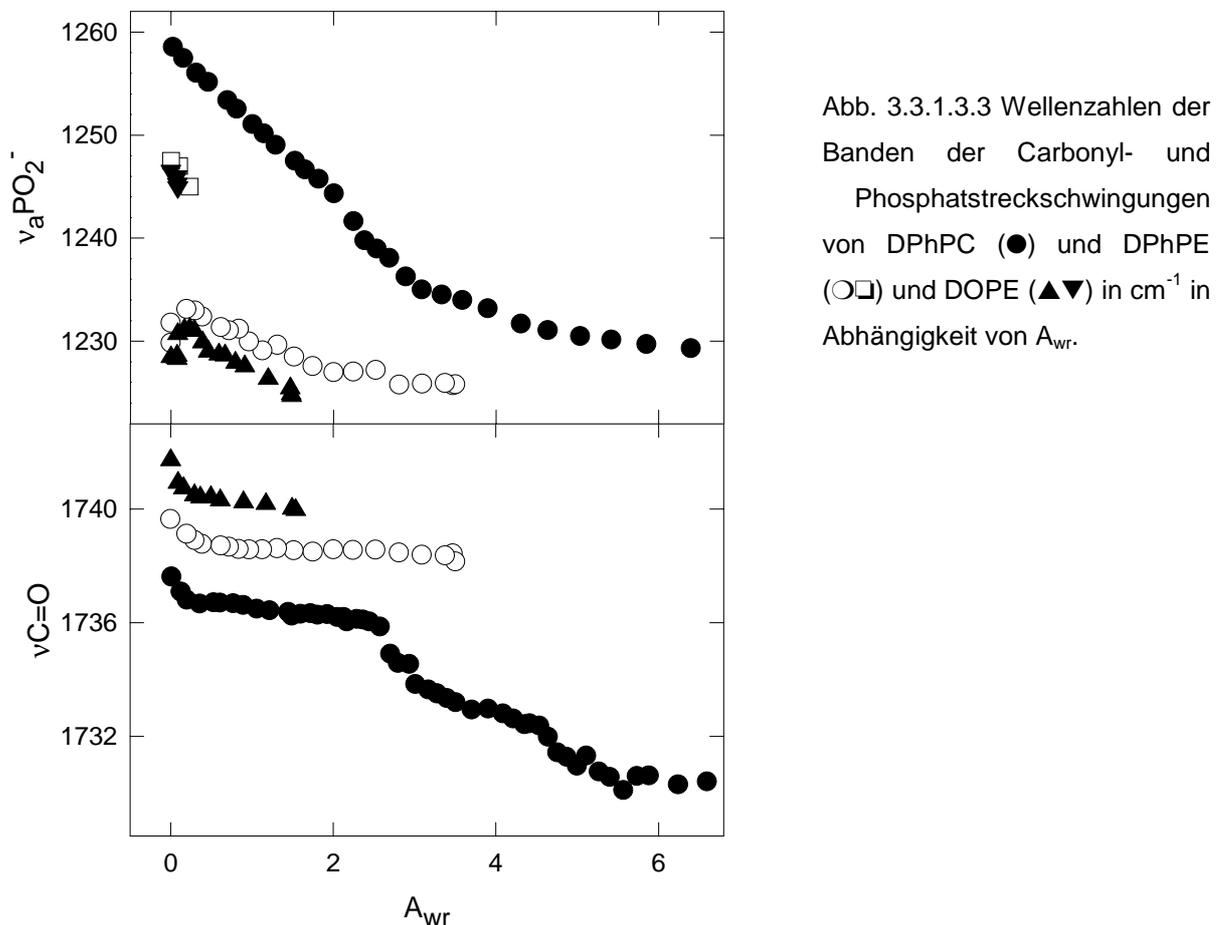


Abb. 3.3.1.3.3 Wellenzahlen der Banden der Carbonyl- und Phosphatstretschwingungen von DPhPC (●) und DPhPE (○□) und DOPE (▲▼) in cm^{-1} in Abhängigkeit von A_{wr} .

Im nahezu trockenen DPhPE zeigen sich im Bereich der Banden der Kopfgruppenschwingungen ebenfalls Indizien für strukturelle Veränderungen: Wellenzahlsprünge treten bei einem A_{wr} von ca. 0.2 bei Banden der Carbonyl- sowie der antisymmetrischen und der symmetrischen PO_2^- -Stretschwingungen auf. Die Ähnlichkeit dieser Wellenzahlverschiebungen mit denen von DOPE (BINDER AND POHLE, 2000; POHLE AND SELLE, 1996) veranlasste zu einem genaueren Vergleich mit diesem Lipid. In [Abb. 3.3.1.3.3](#) wird deutlich, dass die $\tilde{\nu} C=O$ von DPhPE kleiner sind und die Carbonylgruppen sich somit offenbar in einer mehr polaren / hydratisierten Umgebung befinden (vgl. [Kap. 3.1.2.](#)) als die von DOPE. Ein Zusammenhang mit der unvorteilhafteren Kettenpackung der Phytanoylketten und der damit verbundenen Schwächung des o. g. Netzwerks in DPhPE scheint plausibel. Die Verläufe der

Wellenzahlverschiebungen dieser Bande von DPhPE und DOPE sind perfekt parallel. Das Gleiche gilt für den Verlauf der Verschiebung der $\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$ (s. Abb. 3.3.1.3.3). Die Bandenmaxima für DPhPE liegen hier höher als im DOPE, was ebenfalls auf das schwächere Wasserstoffbrücken-Netzwerk der Kopfgruppen im DPhPE hinweist. Interessant ist die Aufspaltung der Bande der $\nu_a\text{PO}_2^-$ im Spektrum von DPhPE bei $A_{\text{wr}} < 0.2$. Im Bereich der $\nu_s\text{PO}_2^-$ -Bande von DPhPE sind außerdem isosbestische Punkte zu erkennen, die bei $A_{\text{wr}} \sim 0.2$ auftreten (s. Abb. 3.1.2.1). Diese Beobachtungen wurden ebenfalls bei der Dehydratisierung von DOPE gemacht (vgl. Abb. 1.5.2.1, (POHLE ET AL., 2001A; POHLE AND SELLE, 1996)). Aufgrund der Parallelen in den IR-spektroskopischen Befunden könnte die Phase im trockenen DPhPE wie in DOPE einer P_α -Phase entsprechen.

Röntgenbeugungs-Messungen

Abb. 3.3.1.3.4 und Abb. 3.3.1.3.5 zeigen die Reflexe, die im Verlauf eines Hydratisierungsscans von DPhPC auftreten.

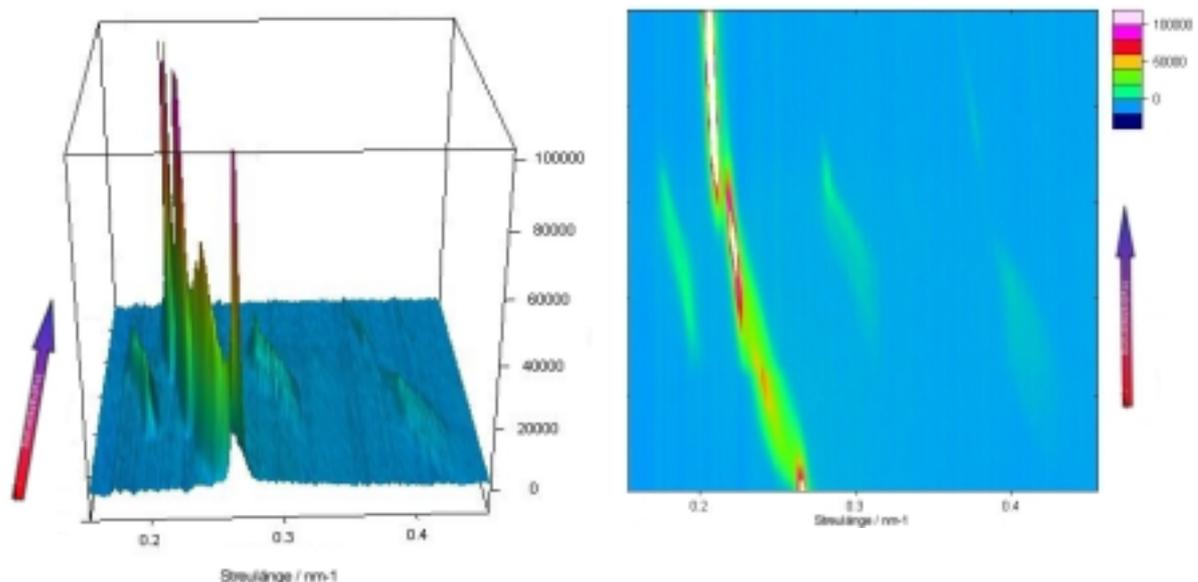


Abb. 3.3.1.3.4 Hydratisierungsscan von DPhPC, der Pfeil zeigt die Richtung der Hydratisierung an (rotes Ende = 0% RF, blaue Spitze = 100% RF), links 3-dimensionale Grafik, rechts Konturplot.

Bei 100% RF sind eindeutig äquidistante Reflexe erkennbar, die einer lamellaren Phase mit $d \sim 5.26$ nm zugeordnet werden können, was im Vergleich zu anderen Lipiden, z. B. L_α von DSPC $d = 6.7$ (eigene Ergebnisse) oder DPPC $d = 6.2$ nm (NAGLE AND TRISTRAM-NAGLE, 2000) relativ klein ist. Bei Dehydratisierung von DPhPC verringern sich die Wiederholungsabstände der lamellaren Phase (bis auf $d \sim 4.76$

nm). Bei weiterer Dehydratisierung erscheinen zusätzliche Reflexe, die höchstwahrscheinlich einer kubischen Phase (Ia3d oder Pn3m, (LINDBLOM AND RILFORS, 1989)) zugeordnet werden können, wie von HSIEH ET AL. (1997) aufgrund NMR-spektroskopischer Befunde bereits postuliert wurde. Die Phase, die das Lipid bei geringer Hydratisierung einnimmt, konnte aufgrund der Verhältnisse der Reflexe von $1 : \sqrt{3} : 2 : \sqrt{7}$ einer invers hexagonalen Phase zugeordnet werden ($d_{\text{hex}} = 4.33 \text{ nm}$, vgl. Kap. 3.1.3.).

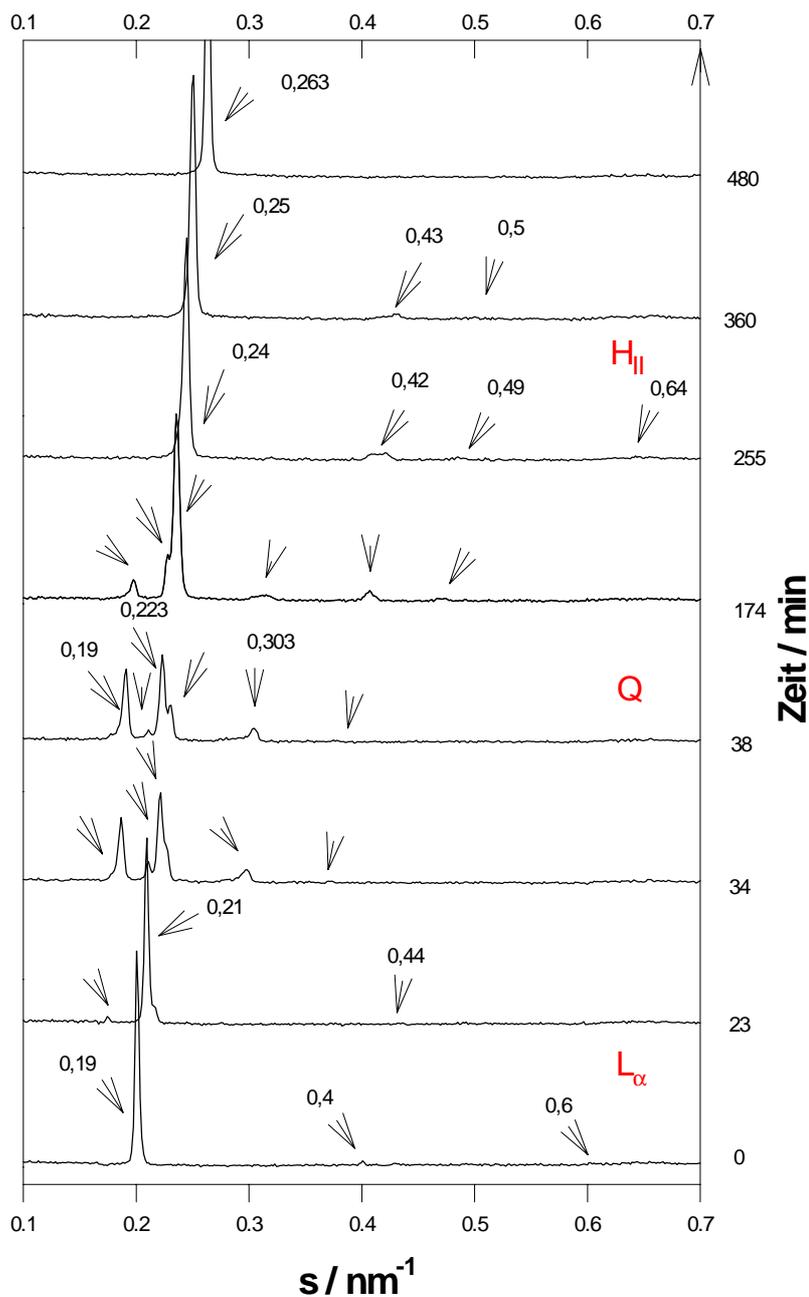


Abb. 3.3.1.3.5
Röntgenreflexmuster eines
Dehydratisierungsscans von
DPhPC von 100% RF bei 0
min bis 0% RF bei 300 min.

Untersuchungsergebnisse von DPhPC WU ET AL. (1995), HARROUN ET AL. (1996) und HUNG ET AL. (2000) mit Röntgenbeugung zeigten koexistierende lamellare Phasen. Die Dimensionen ($d = 4.8$ nm hydratisiert, $d = 4.4$ nm trocken) sind kleiner, als die hier gefundenen. Auch HSIEH ET AL. (1997) fanden mit NMR-Untersuchungen zwei lamellare Phasen. Alle vier Arbeitsgruppen postulierten einen Übergang in eine L_{α}' -Phase mit wahrscheinlich geneigten oder interdigitierten Kopfgruppen bei 80 - 90% RF.

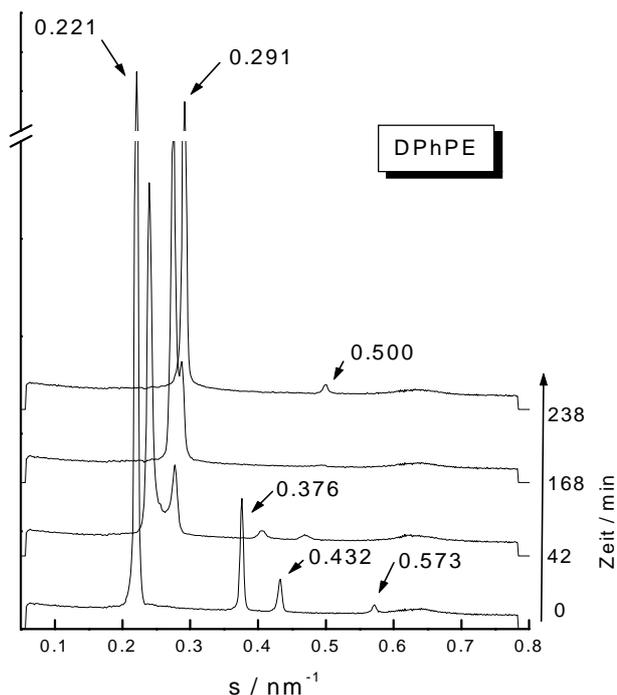


Abb. 3.3.1.3.6
Röntgenbeugungsmuster zu verschiedenen Zeitpunkten eines Dehydratisierungsscans von DPhPE (von unten nach oben abnehmende Hydratisierung).

Für voll hydratisierte DPhPE-Proben konnte eine hexagonale Phase mit $d_{\text{hex}} = 5.25$ nm gefunden werden. Die trockenen Proben zeigten 2 Streureflexe bei 0.29 und 0.5 nm⁻¹, welche aufgrund des Verlaufs der Veränderungen der Reflexmuster einer hexagonalen Phase mit kleinerer Dimension von $d_{\text{hex}} = 4.05$ nm zugeordnet werden konnten (s. Abb. 3.3.1.3.6).

Bei einigen Proben traten sowohl während Hydratisierungs- als auch Dehydratisierungsscans zwei koexistierende hexagonale Phasen mit Reflexen erster Ordnung bei 0.21 und 0.26 nm⁻¹ über weite Hydratationsbereiche auf (s. Abb. 3.3.1.3.6). Zusammen mit dem Befund der isosbestischen Punkte der FTIR-Messungen (s. Abb. 3.1.2.1) kann dies nun der Koexistenz zweier diskreter hexagonaler Phasen zugeordnet werden.

In den Reflexmustern von DPhPE konnten ebenfalls keine Hinweise auf die o. g. P_{α} -Phase gefunden werden. Möglicherweise verhindert die Kettengeometrie der Phytanoyllipide (große Krümmungstendenz) die Ausbildung dieser Phase.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die Koexistenz der verschiedenen Phasen im DPhPC direkt sichtbar zu machen, wurden Pulverproben (vgl. Kap. 2.1.2.) in verschiedenen Hydratisierungszuständen am Institut für Ultrastrukturforschung der FSU Jena mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.

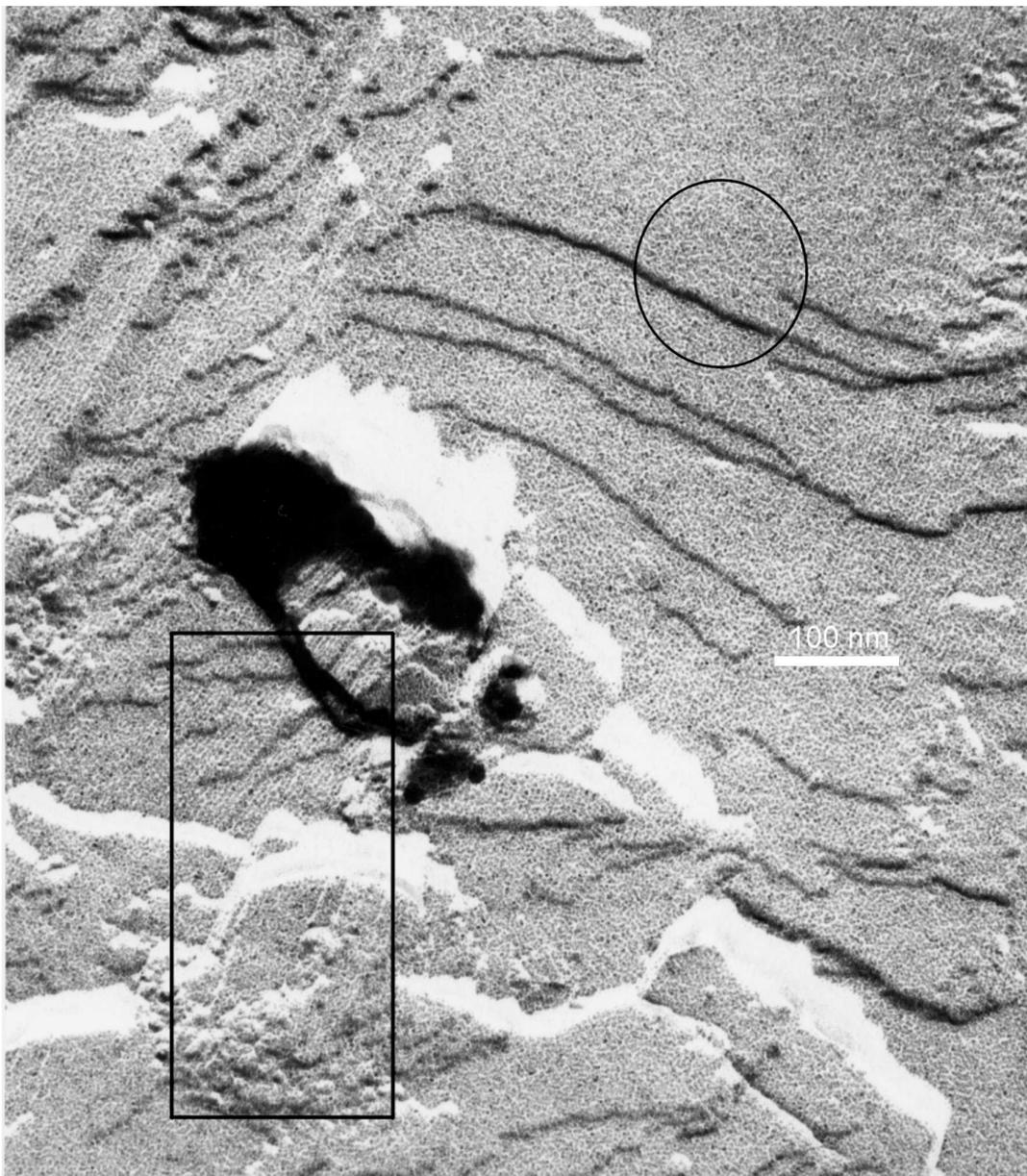


Abb. 3.3.1.3.7 Gefrierbruchelektronenmikroskopische Darstellung von Präparaten von DPhPC, das vor der Probenherstellung bei 60% RF hydratisiert wurde. Die Ausrichtung des Bildes erfolgte in Bedampfungsrichtung von unten nach oben. Die Abbildung zeigt lamellare (Kreis) und hexagonale (Rechteck) Bereiche der Probe in Koexistenz; Maßstab s. Balken.

Proben nach sehr langer Äquilibrierungszeit (Wochen) bei 60% RF konnten in einer lamellaren Anordnung fixiert werden, die durch Homogenität der Oberflächen und das Muster an Bruchstellen charakterisiert ist. Benachbarte Regionen des gleichen Gefrierbruchpräparats lassen deutliche Röhrenmuster erkennen, die hexagonalen Zylindern (d_{hex} ca. 4.8 nm) zuzuordnen sind (s. Abb. 3.3.1.3.7). Die Fixierung dieses Übergangs konnte aufgrund der Probenhydratisierung auf 60% RF gelingen, wo der Phasenübergang in die hexagonale Phase erfolgt. Die kubische Phase konnte mittels Elektronenmikroskopie nicht gezeigt werden. Möglicherweise ist diese Phase metastabil und hier aufgrund der langen Äquilibrierungszeit nicht mehr vorhanden.

DPhPE konnte in der erwarteten hexagonalen Anordnung fixiert werden und die Dimensionen wurden bei 98% RF auf $d_{\text{hex}} \sim 4.7$ nm und bei 0% RF auf $d_{\text{hex}} \sim 3.8$ nm abgeschätzt (Bild nicht gezeigt).

IR-Lineardichroismus

Die Charakterisierung der Phasen im DPhPC konnte mit Hilfe von IR-LD-Experimenten am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig erweitert werden (s. Kap. 2.2.2 und (BINDER, 2000)). Bei DPhPC veränderten sich die Kettenordnungsparameter bei diskreten RF-Werten analog zu den Wellenzahl- und Intensitätssprüngen der Streckschwingungsbanden der Kettenmethylengruppen. Dabei kann im Bereich von 98 bis $\sim 88\%$ RF von noch am meisten geordneten Ketten gesprochen werden. Diese relative Kettenordnung sinkt dann sprunghaft und ein zweiter Abfall der Kettenordnung ist unterhalb von 68% RF festzustellen. Die Differenzen der RF-Werte der Phasenübergänge im Vergleich zu den IR-spektroskopischen Messungen sind auf unterschiedliche Äquilibrierungszeiten bei den IR-LD-Experimenten zurückzuführen.

Eine horizontal expandierte lamellare Phase L_{α}' ist von BINDER AND GAWRISCH (2001) für ein StearoyldocosahexaenoylPC (18:0, 22:6 PC) beschrieben worden. Die ungewöhnliche Verkleinerung der Wiederholungsabstände der Bilayerschichten der lamellaren Phase und die abnehmende Kettenordnung während der Dehydratisierung sind auch in den Ergebnissen der Röntgenbeugungs- / IR-LD-Experimente dieses Lipids erkennbar. Aufgrund dieser Befunde wurde die lamellare Phase bei abnehmender Hydratisierung im DPhPC ebenfalls einer solchen L_{α}' -Phase zugeordnet (s. Abb. 3.3.1.3.8).

Die Korrelation der bei DPhPC röntgenografisch festgestellten Phasen mit den Intensitäts- und Wellenzahlsprüngen in den IR-spektroskopischen Messungen kann

bei Dehydratisierung also folgendermaßen getroffen werden: bei ~ 80% RF erfolgt der Übergang in die in der Bilayerebene expandierte lamellare Phase L_{α}' und bei ~ 60% RF der Übergang über eine kubische in die invers-hexagonale Phase (vgl. Abb. 4.2.1, vgl. Kap. 4.3.). Das Auftreten der L_{α}' -Phase scheint also nicht ungewöhnlich für das Phasenverhalten von PC's mit ungünstigen Kettenpackungseigenschaften zu sein.

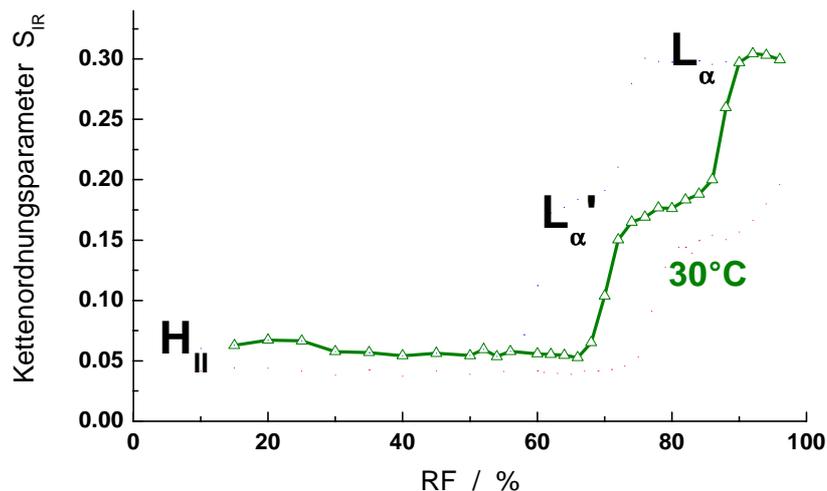


Abb. 3.3.1.3.8 Kettenordnungsparameter von DPhPC der antisymmetrischen Methylstretschwingungsbande in Abhängigkeit von RF.

Bei DPhPE konnten keine signifikanten Änderungen der Ordnungsparameter von Banden der Schwingungen von Kopfgruppen oder Ketten festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt) wie für DOPE (BINDER AND POHLE, 2000), weshalb der Übergang in eine P_{α} -Phase unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassung

Die Kettenverzweigungen der Phytanollipide bewirken schlechte Kettenpackung und damit ein stärkeres Wasseraufnahme- und -abgabevermögen der Kopfgruppen. Die eingangs erwähnte Bilayerstabilität von DPhPC konnte nicht bestätigt werden: DPhPC nimmt hydratisierungsabhängig eine lamellare, eine horizontal expandierte lamellare, eine kubische und eine invers-hexagonale Phase ein. DPhPE und DOPE unterscheiden sich trotz vieler Ähnlichkeiten IR-spektroskopischer Parameter in ihrem Phasenverhalten. Der Einfluss der Kettenverzweigungen bewirkt offenbar schwächere H-Brücken-Netzwerkausbildungen der DPhPE-Kopfgruppen größere Krümmungstendenzen und verhindert die Ausbildung einer P_{α} -Phase, wie im DOPE.

3.3.2. Anionische Phospholipide

Das natürliche Vorkommen geladener Lipide in natürlichen Membranen, wie z. B. DOPG in Bakterienmembranen oder Cardiolipin in Mitochondrienmembranen, hängt mit ihren Funktionen, z. B. als Ionenkonduktoren, zusammen.

3.3.2.1. DOPG

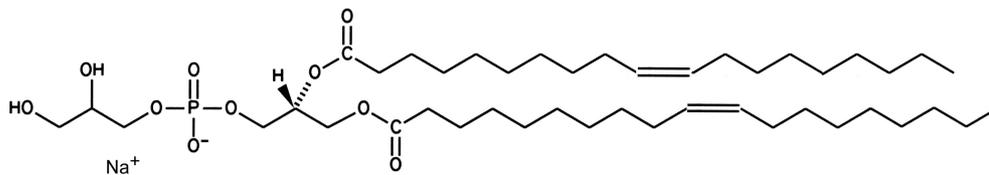


Abb. 3.3.2.1.1

Strukturformel
von DOPG.

Die strukturellen Veränderungen der Kopfgruppe des hier vorgestellten anionischen Lipids Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) bewirken das Auftreten einer negativen Nettoladung: die Cholingruppe der gewöhnlichen PC's ist in PG's durch einen Glycerolrest ersetzt (Formel s. Abb. 3.3.2.1.1). Dessen OH-Gruppen und die negative Ladung beeinflussen das Hydratisierungsverhalten dieser Substanz. Ein Phasendiagramm von DOPG ist bisher noch nicht bekannt (KOYNOVA AND CAFFREY, 2002). T_m beträgt -18 bis -25 °C ($L_c - L_\alpha$, (LINDBLOM ET AL., 1986; FINDLAY AND BARTON 1978)).

Phosphatidylglycerole haben ihre biologische Bedeutung vor allem als Lungensurfactant: die Oberflächenspannung der Lungenalveolen könnte den dehrenden Kräften bei der Einatmung außerordentlich entgegenwirken. Sie ist jedoch sehr viel geringer als erwartet, da das Alveolarepithel mit einem die Oberflächenspannung der Alveolen herabsetzenden Lipopolysaccharidfilm („surfactant“) ausgekleidet ist. Es existieren zahlreiche Untersuchungen zu diesen Lipiden und ihren Wechselwirkungen z. B. mit Peptiden (PASTRANARIOS ET AL., 1994; KRILL ET AL., 1994). Der Fakt, dass Phosphatidylglycerole als Membranbestandteile nur in Prokaryoten auftreten, erlaubt die Simulation bakterieller Membranen mit Hilfe dieser Lipide und die Untersuchung der Wirkung antibakterieller Peptide auf diese (PRENNER ET AL., 1999).

Wasseraufnahmevermögen

Die Berechnung von A_{wr} erfolgte wie für PC's (s. Kap. 3.1.1.). DOPG adsorbiert Wasser bis zu einem $A_{wr} \sim 4.9$ bei 98% RF. Das PC-Analogon nimmt ähnlich viel Wasser auf ($A_{wr} \sim 4.5$, s. Tab. 3.3.1.3.1). Aufgrund der Überlagerungen der Banden der ν_{OH} der PG-Kopfgruppe und der ν_{OH} des adsorbierten Wassers lässt sich der Restwassergehalt bei 0% RF nicht genau bestimmen (s. Abb. 3.3.2.1.2), wird aber aufgrund von Befunden im Kap. 3.3.2.2. als sehr gering bis null eingeschätzt.

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

In [Abb. 3.3.2.1.2](#) sind IR-Spektren von DOPG im Vergleich zu denen von DOPC dargestellt. Aufgrund der veränderten Kopfgruppenstruktur sind Unterschiede hauptsächlich im OH-Streckschwingungsbereich erkennbar. Die Banden der νOH der Glycerolgruppen sind nur bis zu einem A_{wr} von ~ 0.5 bis ~ 1.5 sichtbar. Im Spektrum des trockenen Lipids erscheinen zwei Banden (bei 3420 und 3240 cm^{-1}), die auf schwächer und stärker Wasserstoffbrücken-gebundene OH-Spezies hinweisen.

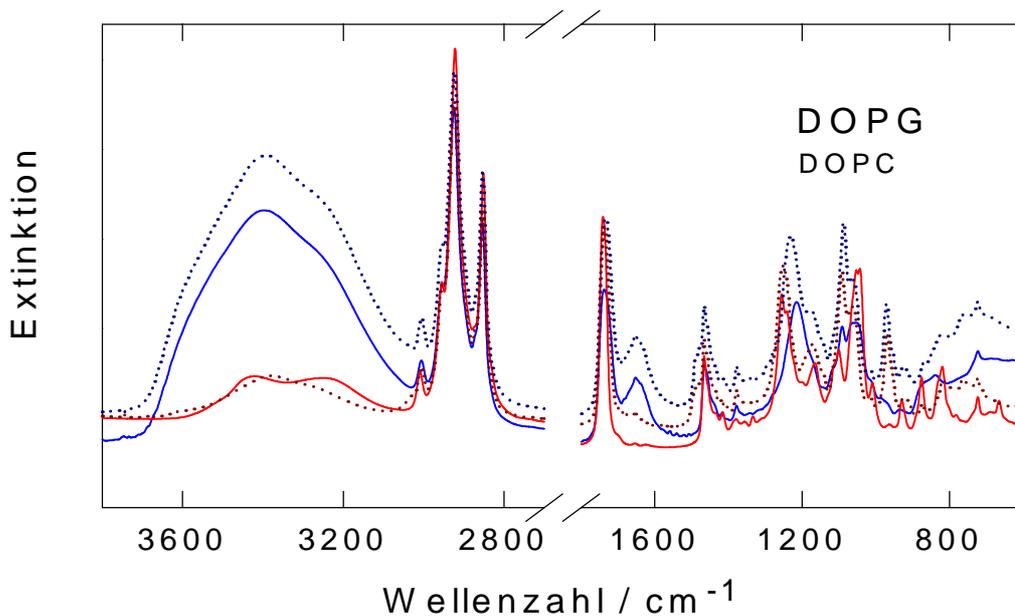


Abb. 3.3.2.1.2 Spektren von DOPG (durchgezogen), bei 98% RF (blau) und bei 0% RF (rot) und DOPC (gepunktet), bei 98% RF (dunkelblau) und 0% RF (dunkelrot).

Bei DOPG können wegen des Auftretens von Wellenzahlverschiebungen charakteristischer Banden hydratisierungsgetriebene Umstrukturierungen angenommen werden. Es findet möglicherweise Kettenschmelzen statt. FINDLAY AND BARTON (1978) ermittelten T_m Werte für DOPC -22°C und für DOPG (Na^+) -18°C . DOPC hat jedoch über den gesamten Hydratisierungsbereich bereits geschmolzene Ketten (POHLE ET AL., 1998).

In [Abb. 3.3.2.1.3](#) sind die Wellenzahlverschiebungen für $\nu_s\text{CH}_2$, $\nu\text{C}=\text{O}$ und $\nu_a\text{PO}_2^-$ eines Hydratisierungsscans von DOPG dargestellt. Auffällig sind ausgeprägte Hysteresen zwischen Dehydratisierung und Hydratisierung (nicht abgebildet), wie sie auch schon von JENDRASIAK ET AL. (1996) für Adsorptionsisothermen geladener Phospholipide festgestellt wurden. Bei der Dehydratisierung verschieben sich die Positionen aller Banden erst bei geringen A_{wr} -Werten ($A_{\text{wr}} < 0.7$). Bei der

Hydratisierung liegen die Zentren der Verschiebung für $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ bei $A_{\text{wr}} \sim 2$ gefolgt von $\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$ bei $A_{\text{wr}} \sim 2.2$ und $\tilde{\nu}\text{C=O}$ bei $A_{\text{wr}} \sim 3$. Das Kettenschmelzen, erkennbar an der Verschiebung der $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$, und die Phosphatgruppenhydratisierung scheinen den Einflüssen an der Carbonylbande voranzugehen. Anders als in PC's sind Sprünge in den Wellenzahlverschiebungen der Banden der Carbonyl- und Phosphatstreckschwingungen bei DOPG erkennbar. Wahrscheinlich spielt aufgrund der Ladungsverhältnisse in PG's die Elektrostatik bei der Hydratisierung eine größere Rolle als in PC's (s. Kap. 4.1.). Bei der Untersuchung kälteinduzierter Gelphasen von DMPG zeigt die $\tilde{\nu}\text{C=O}$ beim Übergang von der metastabilen in die stabile Gelphase ebenfalls eine sprunghafte Abwärtsverschiebung (EPAND ET AL., 1992). Epand und Mitarbeiter führten das auf direkte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Carbonyl- und Hydroxylgruppen oder indirekte, nicht Wasserstoffbrücken-vermittelte Änderungen der Orientierung / Konformation der Carbonylgruppen bei Einnahme der stabilen Gelphase zurück. Eine Schulter bei $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ ist in Spektren der stabilen Gelphase von DMPG (EPAND ET AL., 1992) sowie von hydratisiertem DOPG erkennbar.

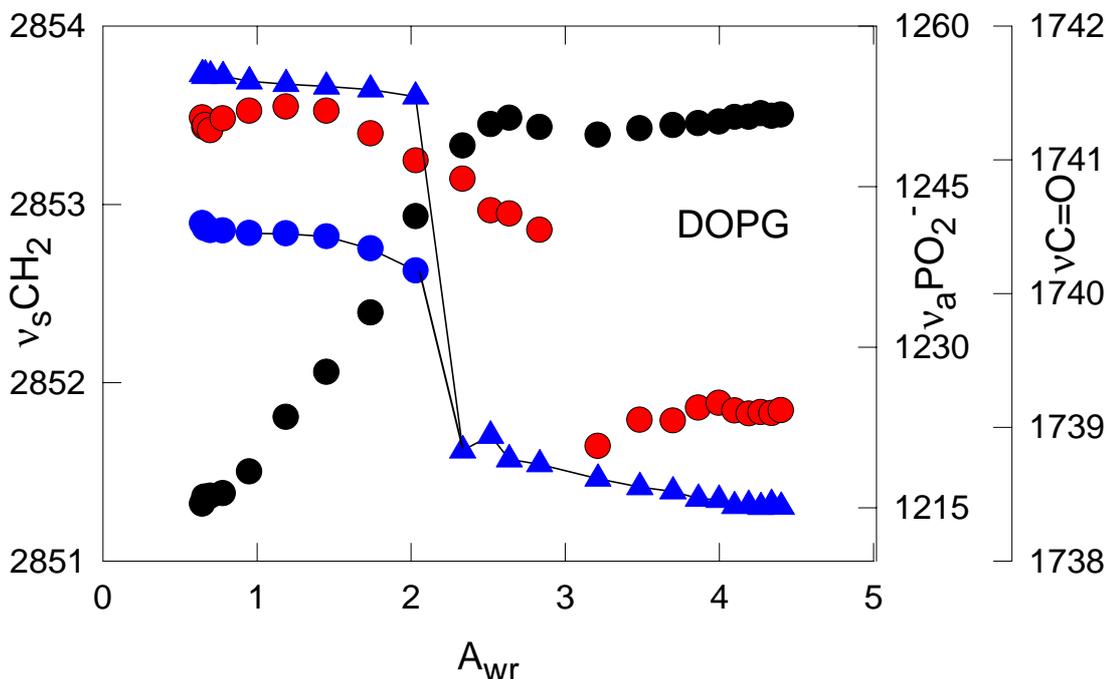


Abb. 3.3.2.1.3 Wellenzahlen der Banden der $\nu_s\text{CH}_2$, (schwarz), $\nu\text{C=O}$ (rot) und $\nu_a\text{PO}_2^-$ (blau, 2 peaks) von DOPG-Spektren eines Hydratisierungsscans in cm^{-1} .

Die Bande der $\nu_a\text{PO}_2^-$ hat in Bereichen geringer Luftfeuchte eine Dublettstruktur (s. Abb. 3.3.2.1.2, 3.3.2.1.3, bei 1255.5 und 1241.5 cm^{-1} ($A_{\text{wr}} = 0.5$)). Beide Banden "vereinigen" sich bei zunehmender Hydratisierung bei $A_{\text{wr}} \sim 2$. In

Hydratationsbereichen bis $A_{wr} \sim 2$ taucht kurzzeitig während des Hydratisierungsscans noch eine Bande bei 1261 cm^{-1} auf, die bei Dehydratisierung nicht gefunden werden kann. Ähnliche Vorgänge sind auch an der Bande der $\nu_s \text{PO}_2^-$ zu erkennen. Sie könnten Indizien für das Aufbrechen interner H-Brücken und darauffolgende Knüpfung neuer, externer Bindungen mit sorbiertem Wasser sein. Die außergewöhnlich niedrige Wellenzahl der resultierenden Bande der $\nu_a \text{PO}_2^-$ bei 1215 cm^{-1} bei 98% RF zeigt eine sehr starke H-Brückenbindung an. Lage und Form der Banden der Phosphatstretschwingungen unterscheiden sich jedoch deutlich von den Dublettstrukturen dieser Banden von DPhPE oder DOPE (s. Kap. 3.3.1.3.).

ZHANG ET AL. (1997) schlugen ein Hydratisierungsmodell vor, bei dem die negative Ladung an der Oberfläche von PG's durch Interaktionen der Glycerolhydroxylgruppen mit den Phosphatgruppen abgeschirmt wird. Die Ähnlichkeit im Wasseradsorptionsverhalten zwischen PC's und PG's würde dann mit der Ähnlichkeit der Wechselwirkungen der Kopfgruppen der PC's mit Wasser und der wechselwirkenden Glycerolhydroxyl- und Phosphatgruppen der PG's mit Wasser erklärbar sein.

In PG's wurden stärkere Interkopfguppen-Interaktionen im Vergleich zu PE's bereits von INOUE AND NIBU (1995) postuliert. Interaktionen sind bei DOPG an den Phosphat- und Hydroxylgruppenschwingungen erkennbar. Sie bedingen offenbar die hohe Ordnung der DOPG-Moleküle im Vergleich zu DOPC in Bereichen geringer Luftfeuchten. Das Kettenschmelzen und die hohe Wasseraufnahmekapazität in DOPG (vgl. Abb. 3.3.2.1.3) deuten jedoch auf größere Ähnlichkeiten zu PC's als zu PE's bezüglich der Kopfgruppen-Interaktionen hin.

Röntgenbeugung

Das Verhältnis der reziproken Streulänge von 1:2 der beiden Reflexe der Röntgenbeugungsmuster von DOPG (nicht gezeigt) in hohen Hydratisierungsbereichen lässt auf eine lamellare Phase mit 5.98 nm Wiederholungsabstand schließen. Diese Dimension ist der der lamellaren Phase von DOPC (5.2 nm) ähnlich. Im trockenen Lipid konnte ein Reflex (3.77 nm bei 0% RF) beobachtet werden. Die Zuordnung zu einer lamellar-kristallinen Phase bei geringen RF ist wahrscheinlich (vgl. DOPG, (LINDBLOM ET AL., 1986)). Die Präferenz von POPG, lamellar-kristalline Pasen zu formen, wurde von LEWIS AND MCELHANEY (2000) festgestellt.

Zusammenfassung

DOPG ähnelt hinsichtlich seines hohen Wasseraufnahmevermögens eher dem PC- als dem PE-Analogen. DOPG durchläuft offenbar einen lyotropen Hauptübergang (im Gegensatz zu DOPC). Das Verhalten der Banden der Phosphat- und OH-Streckschwingungen lässt sich mit Interaktionen dieser Molekülgruppen erklären.

3.3.2.2. Cardiolipin

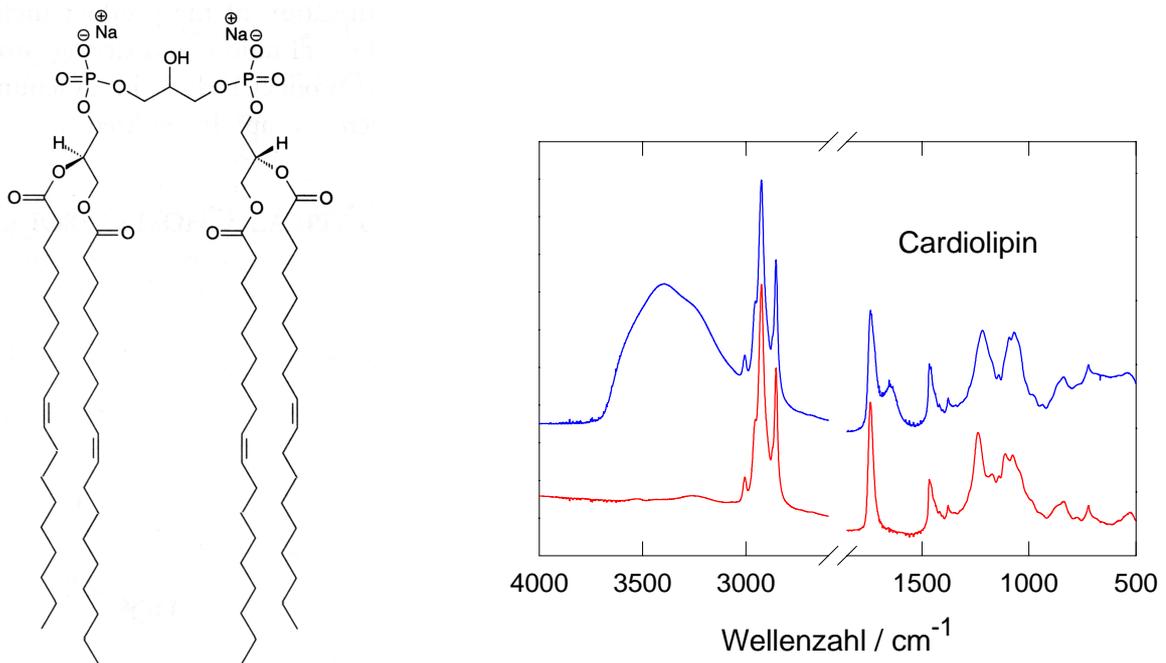


Abb. 3.3.2.2.1 Strukturformel (links) und IR-Spektren (rechts) von Cardiolipin bei 0% RF (rot) und bei 98% RF (blau).

Das zweite anionische Lipid ist Tetraoleoyl-Cardiolipin. Es wurde synthetisch hergestellt und liegt hier als Natriumsalz vor (Strukturformel s. Abb. 3.3.2.2.1). Es besitzt eine Hydroxylgruppe im Kopfbereich und zwei Nettoladungen.

Ergebnisse von früheren Untersuchungen zeigten die Tendenz von Cardiolipin, in Gegenwart divalenter Kationen oder Lokalanästhetika invertiert hexagonale Phasen zu bilden (ORTIZ ET AL., 1999; ISRAELACHVILI, 1991; CULLIS ET AL., 1978). Biologische Bedeutung von Lipiden, die bevorzugt nichtlamellare Strukturen bilden, wird z. B. bei Membranfusionsprozessen diskutiert (GRUNER, 1985; CULLIS AND DE KRUIJFF, 1979). Cardiolipin kommt in Mitochondrien-Membranen des Herzmuskels vor.

Wasseraufnahmevermögen

A_{wrc} wurde, wie unter [Kap. 3.3.1.1.](#) beschrieben, mit dem Korrekturfaktor 0.5 berechnet. Aufgrund der veränderten Kopfgruppenstruktur und ungesättigten Ketten ist A_{wrc} trotzdem nicht uneingeschränkt mit dem anderer Substanzen dieser Arbeit vergleichbar. Der Wassergehalt bei 98% RF wurde deshalb mit der Karl-Fischer-Titration bestimmt und ein $n_w \sim 12$ bei $A_{wrc} = 8.7$ konnte gefunden werden. Das Wasseraufnahmevermögen ist somit relativ groß. Restwasser im trockenen Lipid wird trotz der Überlagerung durch Banden der OH-Gruppe des Kopfes im OH-Streckschwingungsbereich nicht vermutet ([s. u.](#)).

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Das Spektrum des trockenen Cardiolipinfilmes ([s. Abb. 3.3.2.2.1.](#)) unterscheidet sich im OH-Streckschwingungsbereich von DOPG: bei 3531 und 3248 cm^{-1} treten zwei Banden auf, die bei DOPG bei 3420 und 3240 cm^{-1} liegen. Sie haben erwartungsgemäß ungefähr die halbe Intensität im Vergleich zu denen des DOPG. und können somit den Schwingungen der OH-Gruppe des Glycerinrestes (und nicht Restwasser) zugeordnet werden.

Die $\tilde{\nu}_s\text{CH}_2$ liegt über den gesamten Hydratisierungsbereich bei $\sim 2853.7 \text{ cm}^{-1}$ und zeigt ungeordnete Ketten an.

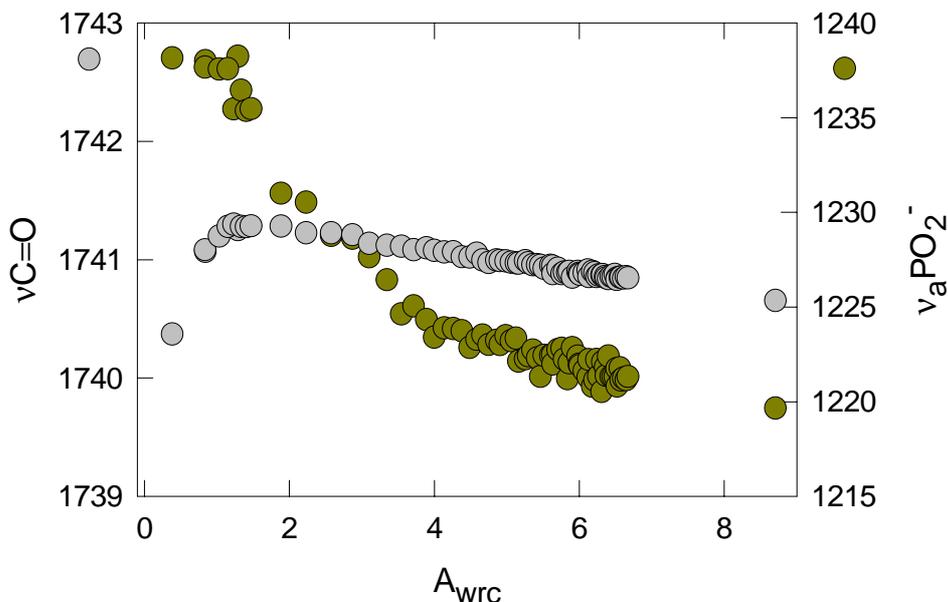


Abb. 3.3.2.2.2
 $\tilde{\nu}_{\text{C=O}}$ (grau) und
 $\tilde{\nu}_{\text{aPO}_2^-}$ (grün) in
 cm^{-1} in
 Abhängigkeit von
 A_{wrc} während der
 Rehydratisierung.

Die Wellenzahlen der Bande der $\nu_{\text{aPO}_2^-}$ -Schwingung ([s. Abb. 3.3.2.2.2](#)) sind bei maximaler Hydratisierung (1218 cm^{-1}) niedriger verglichen mit PC's (1230 cm^{-1}) und mit PE's (1225 cm^{-1}). Bei geringer Hydratisierung (1238 cm^{-1}) sind sie größer als in

fluiden PE's (1234 cm^{-1}) und kleiner als in PC's (1260 cm^{-1}). Wechselwirkungen zwischen den OH- und Phosphatgruppen sind in Bereichen geringer Hydratisierung aufgrund der niedrigen Wellenzahl und der Konstanz der Wellenzahlen zu Beginn der Hydratisierung wahrscheinlich (POHLE ET AL., 2001B; HÜBNER ET AL., 1991).

Die $\tilde{\nu}\text{C=O}$ reagiert auf zunehmende Hydratisierung (nach leichtem Ansteigen von 1740.7 auf 1741.3 cm^{-1} bis $A_{\text{wrc}} \sim 1.3$) mit einem Abfall auf 1740.6 cm^{-1} (s. Abb. 3.3.2.2.2). Die relative Konstanz der Bandenposition und die Höhe der Wellenzahl ähneln den Verhältnissen in PE's (s. Tab. 3.3.1.3.1). Die Carbonylgruppen sind in Bereichen geringer Hydratisierung, erkennbar an der etwas niedrigeren Wellenzahl, offenbar in die Wechselwirkungen mit der OH-Gruppe involviert wie die Phosphatgruppen. Bei zunehmender Hydratisierung wird diese Wechselwirkung etwas schwächer (Wellenzahl steigt geringfügig). Mit zunehmender Hydratisierung ($A_{\text{wrc}} > 1.3$) sinkt die Wellenzahl wieder etwas und gibt Hinweise auf Wechselwirkungen mit dem adsorbierten Wasser. Die $\tilde{\nu}\text{C=O}$ sind jedoch auch in Bereichen hoher Luftfeuchten hoch und stehen im Gegensatz zu der hohen Wasseraufnahmekapazität dieses Lipids (vgl. Tab. 3.3.1.3.1).

Röntgenbeugung

Aus den Röntgenbeugungsexperimenten wurde auf eine hydratisierungsbedingte Abnahme der Dimension von einer ausgedehnten in eine kompaktere invers-hexagonale Phase geschlossen (Abb. 3.3.2.2.3). Die Dimensionen entsprechen einem Abstand benachbarter Zylinderzentren von 6.37 nm für das voll hydratisierte Cardiolipin und für das trockene Lipid von 4.29 nm . Der Weitwinkelreflex ist breit, woraus auf eine geringe Kettenordnung geschlossen werden kann, wie es für die H_{II} Phase auch zu erwarten ist (ORTIZ ET AL., 1999; POWELL AND HUI, 1996).

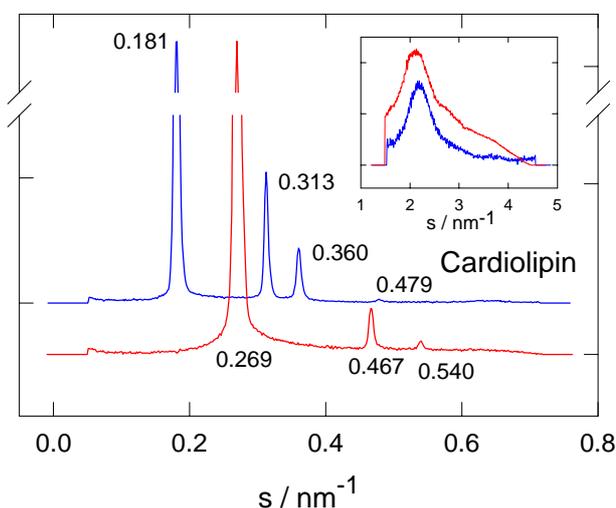


Abb. 3.3.2.2.3
Röntgenbeugungsmuster von Cardiolipin bei 0% RF (rot) und 100% RF (blau); eingefügtes Fenster zeigt Weitwinkelreflexe.

Monovalente Kationen (und nicht nur divalente, wie bisher gezeigt (CULLIS ET AL., 1978)) sind offenbar auch in der Lage, in Cardiolipin invers hexagonale Assemblierung zu ermöglichen. Lamellare Phasen wurden nicht gefunden. Im Vergleich zu DOPE sind die Dimensionen der invertierten Phasen jedoch deutlich größer, was wegen der Anzahl Ketten pro Molekül und der Größe der Kopfgruppen verständlich ist.

Zusammenfassung

Cardiolipin adsorbiert große Mengen Wasser (bis $A_{wrc} \sim 8.7$, $n_w \sim 12$), obwohl es nur hexagonale Phasen bildet, die normalerweise bei geringer Hydratisierung begünstigt sind (vgl. DPhPC, Kap. 3.3.1.3.). Die Wellenzahlverschiebungen der Banden der Carbonyl- und Phosphatschwingungen bei $A_{wrc} \sim 1.3$ könnten Ausdruck einer Kopfgruppenverzahnung beim Übergang in eine stark dehydratisierte H_{II} -Phase sein. Die Zunahme der Wechselwirkungen dieser Gruppen mit der Kopf-OH-Gruppe in Bereichen geringer Hydratisierung wurden aus den IR-spektroskopischen Befunden abgeleitet. Die veränderte Kopfgruppenstruktur von Cardiolipin beeinflusst das Phasenverhalten stark, wobei die Größe der Kopfgruppe entscheidender scheint, als der Einfluss der OH-Gruppe an sich (vgl. Kap. 3.3.2.1.). Einwertige Ionen ermöglichen die Assemblierung von Cardiolipin in invers hexagonalen Phasen in allen Hydratisierungsbereichen.

3.4. Untersuchungen an phosphatfreien Lipiden

Überblick und Strategie

In diesem Kapitel werden erst Untersuchungsergebnisse neutraler Lipide mit OH- und ohne Phosphatgruppen vorgestellt. Bei der zweiten Substanzgruppe führte das Fehlen der Phosphatgruppe zu positiver Ladung, da die Trimethylammonium-Gruppe vorhanden ist.

3.4.1. Neutrale Lipide

3.4.1.1. DOG

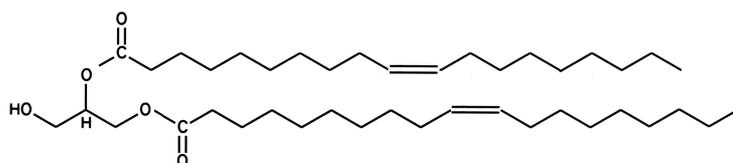


Abb. 3.4.1.1.1 Strukturformel von DOG.

Dioleoylglycerol (Formel s. Abb. 3.4.1.1.1) ist ein einfaches Modell für ein Glycolipid. Der Vergleich seines Hydratisierungsverhaltens mit dem von geladenen und / oder Substanzen mit OH-Gruppen, wie z. B. Stearylalkohol, sollte weitere Erkenntnisse

über den Einfluss dieser Strukturen auf das Hydratationsverhalten der polaren Molekülteile bringen. Diacylglycerole haben biologische Relevanz, da sie in Signaltransduktionsprozesse der Zellen involviert sind. Sie aktivieren z. B. Proteinkinase C in Anwesenheit von Ca^{2+} und Phosphatidylserinen (LISCOVITCH AND CANTLEY, 1994). Außerdem sind sie aufgrund ihrer Tendenz, invertierte Phasen in Lipidgemischen hervorzurufen, offenbar in Membranfusionsprozesse eingebunden (SIEGEL ET AL., 1989).

Wasseraufnahmevermögen

Es war nicht möglich, orientierte Filme dieser Substanz herzustellen. Aus der chloroformischen Lösung wurden 60 μl unter Verdampfen des Lösungsmittels ohne Verstreichen aufgetropft. Bei zunehmender Luftfeuchte veränderte sich die Basislinie des IR-Spektrums, was auf Homogenisierung der Probe schließen lässt. Die Intensität der OH-Streckschwingungsbande (bei 3499 cm^{-1}) bleibt dabei nahezu konstant. Diese Bande wurde den OH-Streckschwingungen der Kopfgruppe zugeordnet.

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

In [Abb. 3.4.1.1.2](#) sind IR-Spektren von DOG dargestellt. Die Banden der Spektren von DOG zeigen keine hydratisierungsbedingten Wellenzahlverschiebungen. Die Position und die große Halbwertslinienbreite der Bande bei 3466 cm^{-1} deuten auf bewegliche bzw. schwach gebundene OH-Spezies hin. Die Schwingungen der Kettenmethylengruppen liegen bei 2854 cm^{-1} und sind für ungeordnete Ketten typisch. Die Bande der Carbonylstreckschwingungen bleibt konstant bei Wellenzahlen um 1743 cm^{-1} , was auf fehlende lokale Hydratisierung und / oder unpolare Umgebung der Carbonylgruppen schließen lässt.

Die OH-Gruppen von DOG wechselwirken offenbar vorwiegend untereinander und nicht mit den Carbonylgruppen. In Stearylalkohol sind Interaktionen der OH-Gruppen dagegen wahrscheinlich ($\tilde{\nu}\text{ OH}$ bei 3233 cm^{-1}). Möglicherweise ist die durch die Doppelbindung der Oleoylketten verminderte Kettenordnung die Ursache dafür, dass in DOG derartige Interaktionen der Kopfgruppen nicht zu beobachten sind. Bei OH- $(\text{CH}_2)_{22}$ -PC interagieren die Phosphatgruppen alternierend mit den OH-Gruppen ($\tilde{\nu}\text{ OH}$ bei 3290 cm^{-1}) des Nachbarmoleküls, so dass eine ketteninterdigitierte Monolayer entsteht (POHLE ET AL., 2001B).

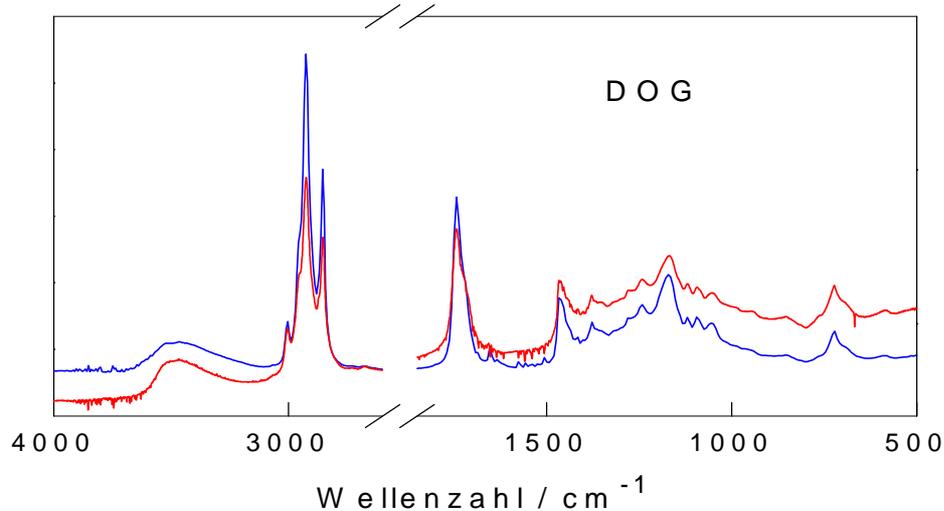


Abb. 3.4.1.1.2 IR-Spektren von DOG bei 98% RF (blau), bei 0% RF (rot).

MARSH (1997) und SCHORN AND MARSH (1996) stellten fest, dass DOG in wässrigen Lösungen isotrope Dispersionen formt. Diese scheinen auch in den Proben der hier vorgestellten FTIR-Experimente vorzuliegen.

Zusammenfassung

Das Fehlen von Ladungen oder Phosphatgruppen bewirkt offenbar, dass DOG trotz der Existenz einer polaren Kopfgruppe keine erkennbaren Wechselwirkungen mit Wasser eingehen kann. Die von GOMEZ-FERNANDEZ ET AL. (1997) beschriebene relative Hydrophobizität von Diacylglycerolen führt zur Bildung wasserfreier Aggregate. Die OH-Gruppen von DOG wechselwirken relativ schwach untereinander. Eine OH-Gruppen-Hydratisierung wie bei den Glykolipiden (vgl. Kap. 3.4.1.2.) findet nicht statt.

3.4.1.2. Glykolipide: MGDG / DGDG

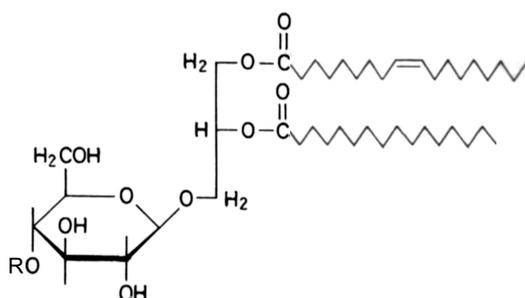


Abb. 3.4.1.2.1 Strukturformeln von MGDG (R = H) und DGDG (R = Glucose); Palmitoyl- und Oleoylketten sind statistisch verteilt.

Glykolipide besitzen als hydrophilen Molekülbereich Zuckerreste. Die für die Photosynthese in Chloroplasten wichtigen Thylakoid-Membranen (vgl. Kap. 1.1.) bestehen zu fast 50% aus Glykolipiden. Damit gehören sie zu den häufigsten Lipiden

in der Natur überhaupt.

Die hier vorgestellten Substanzen Mono- und Diglucosyldiacylglycerol (MGDG / DGDG, s. Abb. 3.4.1.2.1) wurden aus Membranen des zellwandlosen prokaryotischen *Acholeplasma laidlawii* isoliert. Die fettsäureauxotrophen Mikroorganismen wurden dafür in 1:1 Palmitoyl:Oleoyl-Fettsäure-Medien gezüchtet (LEWIS AND MCELHANEY, 1995). Die Lipide wurden von Dr. R.N.A.H. Lewis (Edmonton, Kanada) zur Verfügung gestellt.

Wasseraufnahmekapazität

Beide Glykolipide zeigen ein geringes Wasseraufnahmevermögen (vgl. Abb. 3.4.1.2.2). A_{wr} wurde nach folgender Formel berechnet: $A_{wr} = (A_{CH_{OH}} - (A_{CH_{OH}}$ des Spektrums bei 0% RF)) / A_{CH_2} , wodurch die OH-Streckschwingungsbanden der Zuckerreste subtrahiert wurden. DGDG erreicht bei 98% RF höhere A_{wr} -Werte (~ 2.6) als MGDG (~ 1). Die Bestimmung des Restwassergehaltes ist aufgrund der OH-Streckschwingungen der Zucker-OH-Gruppen nicht sicher möglich, wird aber als sehr gering bis null eingeschätzt.

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

Die Spektren beider Lipide sind in Abb. 3.4.1.2.2 dargestellt. Die Banden der ν_{OH} der OH-Gruppen der Zuckerreste zeigen hydratisierungsbedingte Wellenzahl- und Intensitätsverschiebungen. In beiden Lipiden nimmt die Intensität der Bande zwischen 3300 und 3200 cm^{-1} mit steigender Hydratisierung zu. Die deutliche Strukturierung des OH-Streckschwingungsbereiches der hydratisierten Proben überrascht: mit steigendem Wassergehalt verschmelzen diese Banden üblicherweise (vgl. DOPG, Cardiolipin s. Kap. 3.3.2.). Das lässt auf ein hochgeordnetes Wasserstoffbrücken-Netzwerk schließen. Die insgesamt geringe Wasseradsorption geht offenbar mit einer selektiven Hydratisierung einher: diskrete OH-Spezies erscheinen als separate Banden. Die Auflösung dieser Subbanden ist bei MGDG (möglicherweise aufgrund der geringeren Anzahl an OH-Gruppen) erhöht. LINDBLOM ET AL. (1986) vermuteten bereits, dass sich die "Zuckerkopfgruppen" wie Wassermoleküle verhalten: die Wasseraufnahmekapazität wird durch die Zahl der möglichen Wasserstoffbrücken zwischen Glucose und Wasser bestimmt. Diese Vermutung kann durch die IR-spektroskopischen Ergebnisse gestützt werden.

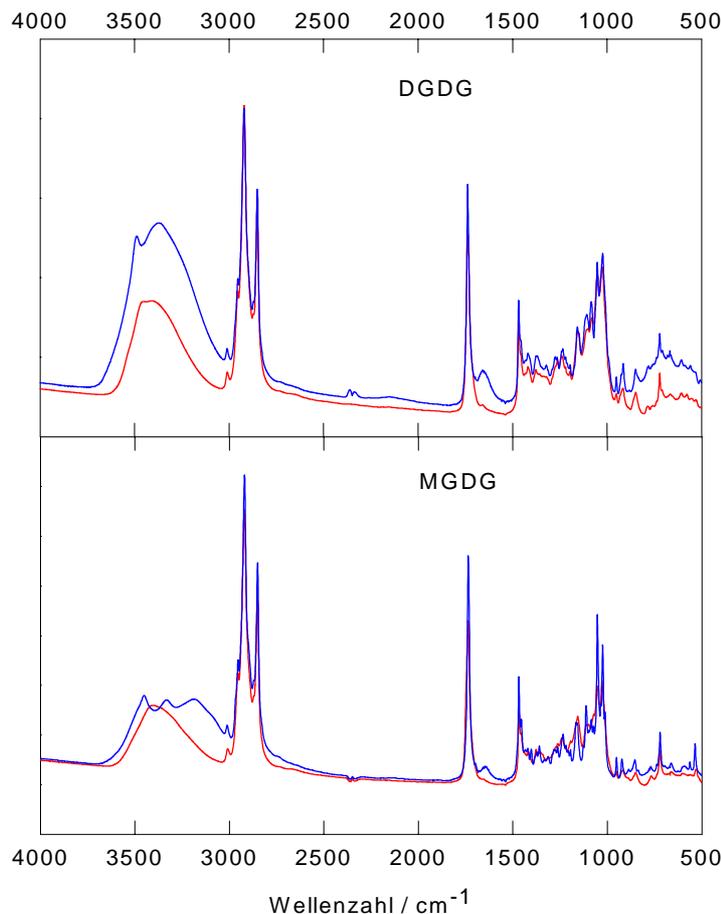


Abb. 3.4.1.2.2 IR-Spektren von DGDG (oben) und MGDG (unten) bei 98% RF (blau) und bei 0% RF (rot).

Die Wellenzahlen der Kettenschwingungen von $\nu_a\text{CH}_2$ und $\nu_s\text{CH}_2$ von DGDG liegen bei 2920.6 und 2850.7 cm^{-1} . Die von MGDG befinden sich an nahezu gleicher Position bei 2919.8 und 2850.5 cm^{-1} und zeigen geordnete Ketten an.

Die Verschiebungen der Banden der $\nu\text{C}=\text{O}$ beider Lipiden zeigen Hysteresen in Hydratisierungs- und Dehydratisierungsscans. Die Lage der Banden der $\nu\text{C}=\text{O}$ der Glykolipide bei $\sim 1736.6 \text{ cm}^{-1} \pm 0.6$ (über den gesamten Hydratisierungsbereich) lässt höchstens auf teilweise H-Brücken-Gebundenheit dieser Molekülgruppen schließen. Die Halbwertsbreite der Bande der $\nu\text{C}=\text{O}$ nimmt mit abnehmender Feuchte in beiden Lipiden zu (s. Abb. 3.4.1.2.3). Die Anzahl der C=O-Subspezies ist bei geringen Wassergehalten der Proben am größten. Im Vergleich zu PC's ist die Halbwertsbreite dieser Banden jedoch gering. Die Zuckergruppen bilden ein H-Brücken-Netzwerk, welches die C=O Gruppen nicht, oder nur in geringem Maße einschließt. Dadurch sind die Carbonylgruppen teilweise vom Wasser abgeschirmt.

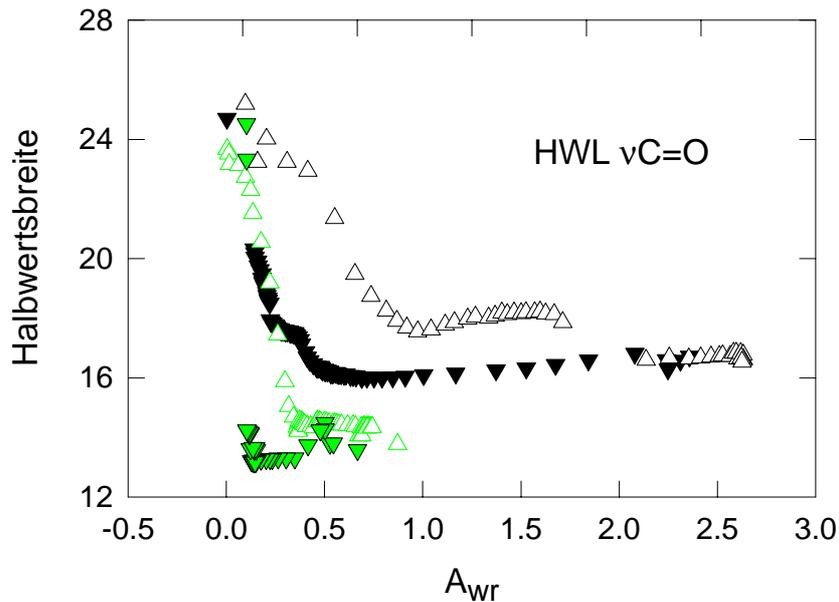


Abb. 3.4.1.2.3 Halbwertsbreite der Carbonylbande von MGDG (grün) und DGDG (schwarz) während De- ∇ / Rehydratisierungsscans Δ .

Röntgenbeugung

Aus den Röntgenbeugungsmustern (s. Abb. 3.4.1.2.4 + Tab. 3.4.1.2.1) konnte für DGDG abgeleitet werden, dass bei 100% RF Muster für zwei koexistierende lamellare Phasen (schwarze ($d = 6.25$ nm) und braune ($d = 5.75$ nm) Zahlen und Pfeile) erscheinen. Bei 0% RF entsprechen die Reflexe den gleichen Phasen mit komprimierten Dimensionen ($d = 5.98$ bzw. 4.81 nm).

Tab. 3.4.1.2.1 Reziproke Wiederholungsabstände s / nm^{-1} von MGDG und DGDG.

MGDG		Reflexpositionen / nm^{-1}									
100% RF	lamellar	0.167									0.537
	lamellar		0.185					0.368			0.554
	kubisch			0.23		0.297			0.459		
0% RF	lamellar	0.176					0.351			0.527	
	lamellar		0.186					0.369			0.555
	kubisch				0.261						
DGDG											
100% RF	lamellar	0.16				0.481		0.642			
	lamellar		0.174		0.348		0.525				
0% RF	lamellar	0.167		0.33		0.494		0.66			
	lamellar		0.208		0.41		0.61				

MGDG zeigt bei 100% RF ebenfalls ein Muster für zwei koexistierende lamellare Phasen (schwarze ($d = 5.98$ nm) und braune ($d = 5.4$ nm) Zahlen und Pfeile) an (s. Abb. 3.4.1.2.4 + Tab. 3.4.1.2.1). Daneben erscheinen Reflexe in MGDG, die einer höchstwahrscheinlich kubischen Phase (grüne Zahlen und Pfeile, wahrscheinlich $Pn3m$ (LINDBLOM AND RILFORS, 1989)) zugeordnet werden können. Bei 0% RF sind neben den Reflexen der lamellaren Phasen ($d = 5.68$ bzw. 5.38 nm) ebenfalls ein Reflex

erkennbar, der aufgrund des Verlaufs der Reflexverschiebungen bei der Dehydratisierung der kubischen Phase zugeordnet werden kann. Zusätzlich treten Weitwinkelreflexe auf, die die Vermutung nahe legen, dass mindestens eine lamellar kristalline Phase in beiden Lipiden existiert.

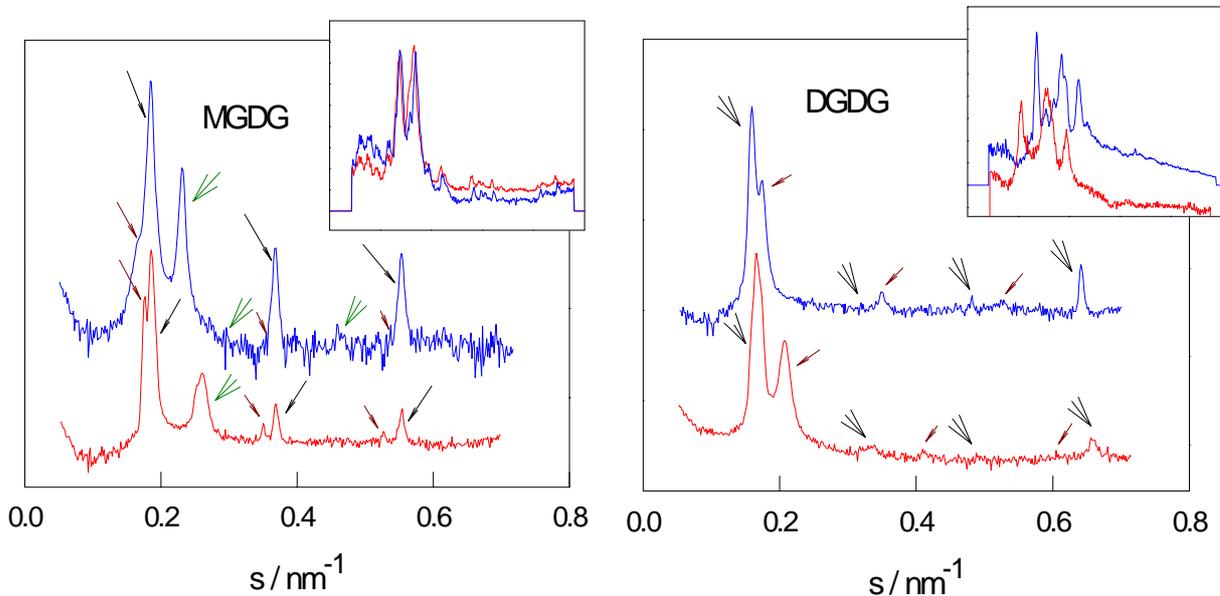


Abb. 3.4.1.2.4 Röntgenreflexmuster (Kleinwinkelbereich großes, Weitwinkelbereich kleines Rechteck) von MGDG und DGDG bei 98 (blau) und 0% RF (rot). Die Pfeile entsprechen den Reflexpositionen in Tab. 3.4.1.2.1 mit entsprechender Farbcodierung.

MGDG ist aus NMR- und DSC-Studien bekannt dafür, bei Wasserüberschuß invers nichtlamellare Phasen zu formen, wogegen DGDG unter gleichen Bedingungen lamellare Phasen bildet (LEWIS AND MCELHANEY, 1995; LINDBLOM ET AL., 1986). Offenbar bleibt die kubische Phase in MGDG auch in Bereichen geringer RF z. T. erhalten. Die Dimensionen der lamellaren Phasen entsprechen annähernd denen der PC-Analoga (DPPC $d = 6.35$, (NAGLE AND TRISTRAM-NAGLE, 2000), DOPC $d = 5.2$ bei 98% RF).

Zusammenfassung

Bei MGDG und DGDG hat die Anzahl an OH-Gruppen erheblichen Einfluss auf die Wasseraufnahmekapazität: die Höhe der Wasseraufnahme der Glykolipide ist von der Zahl der möglichen Wasserstoffbrücken zu den Zucker-OH-Gruppen limitiert. Eine heterogene Hydratisierung in Kombination mit Phasenseparation von Palmitat- oder Oleat-reichen Domänen könnte die Ursache für die Koexistenz verschiedener lamellarer und nichtlamellarer Phasen bei MGDG sein. Die Koexistenz von rigiden kristallinen bzw. Gelphasen und fluiden nichtlamellaren Phasen wurde bereits für ein System aus DMPC und Flufenaminsäure gezeigt (GRAGE ET AL., 2000).

3.4.2. Kationische Lipide: DMTAP, DOTAP, DOTMA

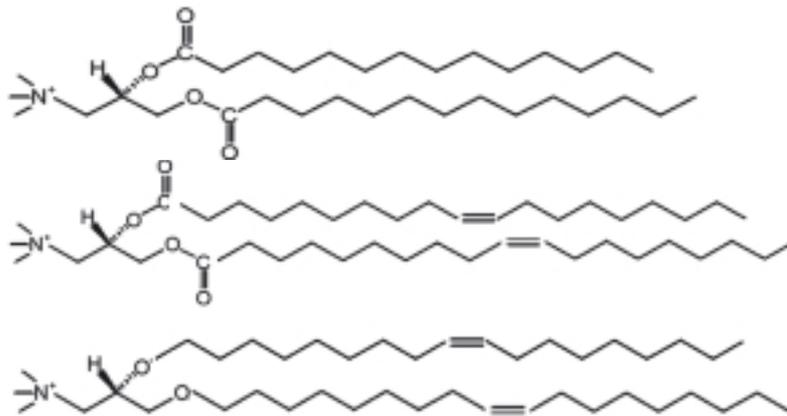


Abb. 3.4.2.1 Strukturformeln der hier untersuchten kationischen Lipide: von oben nach unten DMTAP, DOTAP, DOTMA.

Die strukturellen Modifikationen der Kopfgruppen der in diesem Kapitel untersuchten Lipide gegenüber PC's betreffen sowohl die Phosphat- als auch die Carbonylgruppen. Durch das Fehlen der Phosphatgruppen sind diese Lipide positiv geladen (s. Abb. 3.4.2.1).

Kationische Lipide haben als Bildner stabiler Modellmembranen Bedeutung erlangt (LEWIS ET AL., 2001) und sind in der Diskussion, als antimikrobielle und antiinflammatorische Substanzen genutzt zu werden (FILION AND PHILLIPS, 1997). Auf der Suche nach Systemen für die Transfektion (Einschleusung genetischen Materials in Zellen) sind diese Lipide aufgrund ihrer Ladung geeignet, mit der negativ geladenen DNA Komplexe zu bilden, und somit als Transfektionsagenzien zu fungieren. Solche lipophilen Komplexe wurden bereits mehrfach beschrieben (POHLE ET AL., 2000; MILLER, 1998; PAUKKU ET AL., 1997; RÄDLER ET AL., 1997; MAY AND BEN-SHAUL, 1997; BALASUBRAMANIAM ET AL., 1996; MAHATO ET AL., 1995; FELGNER ET AL., 1987).

Die Strukturformeln sind in Abb. 3.4.2.1 gezeigt. Alle drei Lipide lagen als Chlorid vor. DMTAP (Dimyristoyltrimethylammoniumpropan) wurde mit DOTAP (Dioleoyl~) verglichen, um Informationen zu den Einflüssen der Kettensättigung zu erhalten. Dioleoyloxypropyltrimethylammoniumchlorid (DOTMA) hat keine Carbonylgruppe, so dass deren Einfluss im Vergleich zu DOTAP studiert werden kann. DOTMA ist in Lipofectin® bereits routinemäßig in *in-vivo* Transfektionsversuchen in Verwendung (OBIKA ET AL., 1999; MOK AND CULLIS, 1997) und wurde uns freundlicherweise von Prof. P. Cullis und Dr. S. Ansell (Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellt.

Wasseraufnahmevermögen

A_{wr} wurde, wie unter Kap. 3.1.1. beschrieben, berechnet. Bei 98% RF adsorbiert DOTMA die größte Menge Wasser ($A_{wr} = 6.5$), gefolgt von DOTAP ($A_{wr} = 5.0$) und

DMTAP ($A_{wr} = 2.5$). Die geringe Wasseraufnahme in DMTAP (z. B. im Vergleich mit DMPC s. Kap. 3.2.3.) hat seine Ursachen wahrscheinlich in einem Salzbrücken-Netzwerk, welches durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Cl^- und den TAP^+ -Einheiten gebildet wird (POHLE ET AL., 2000). Die Hauptübergangstemperatur des DMTAP liegt bei 53 °C, d. h. etwa 30 °C höher als die von DMPC. In DOTAP führt die aufgelockerte Kettenpackung der ungesättigten Ölsäureketten offenbar zu einer Schwächung der Wechselwirkungen der Kopfgruppen verbunden mit stärkerer Wasseradsorption. Alle drei kationischen Lipide dehydratisieren vollständig.

Hydratisierungsbedingte Änderungen in den IR-Spektren

In den Spektren von DMTAP sind über den gesamten Hydratisierungsbereich geordnete Ketten ($\tilde{\nu}_{sCH_2}$ 2848.5 cm^{-1}) und eine konstante Position der Bande der $\nu C=O$ ($\tilde{\nu} C=O$ 1734 cm^{-1}) zu verzeichnen (s. Abb. 3.4.2.2). Dagegen liegt $\tilde{\nu}_{sCH_2}$ von DOTMA über den gesamten Hydratisierungsbereich bei 2854 cm^{-1} und zeigt ungeordnete Ketten an. Im Fall von DOTAP kann aufgrund hydrationsinduzierter Wellenzahländerungen charakteristischer Banden (z. B.: $\tilde{\nu}_{sCH_2}$ 2852.3 \leftrightarrow 2853.5 cm^{-1} , $\tilde{\nu} C=O$ 1745 \leftrightarrow 1740 cm^{-1}) von strukturellen Änderungen ausgegangen werden (s. Abb. 3.4.2.2).

DOTMA unterscheidet sich von DOTAP lediglich durch die Substitution der Ester- durch Etherbindungen bei identischen Ketten und Kopfgruppen. Im Unterschied zu DOTMA sind in DOTAP hydratisierungsbedingte Strukturänderungen erkennbar, wobei die Unordnung der Ketten und die hohe Wellenzahl der Bande der $\nu C=O$ einer Ausbildung eines Salzbrücken-Netzwerkes wie in DMTAP widersprechen. Die Position der Bande der $\nu C=O$ von DOTAP verschiebt sich nicht so deutlich, wie in PC's (vgl. Tab. 3.3.1.3.1), sondern ist mit der in DOPG vergleichbar. Das in DMTAP das Wasseraufnahmevermögen behindernde Salzbrücken-Netzwerk kann in DOTMA wahrscheinlich ebenfalls nicht aufgebaut werden. Eventuell ist die Wasseranlagerung in DOTMA vergleichbar mit den Clathrat-Bildungen in Cholin (s. Kap. 3.2.1.). Für die Ammoniumgruppe von PC's wurden bereits Clathratstrukturen postuliert (PERERA ET AL., 1996; HSIEH AND WU, 1996; DAMODARAN & MERZ 1993).

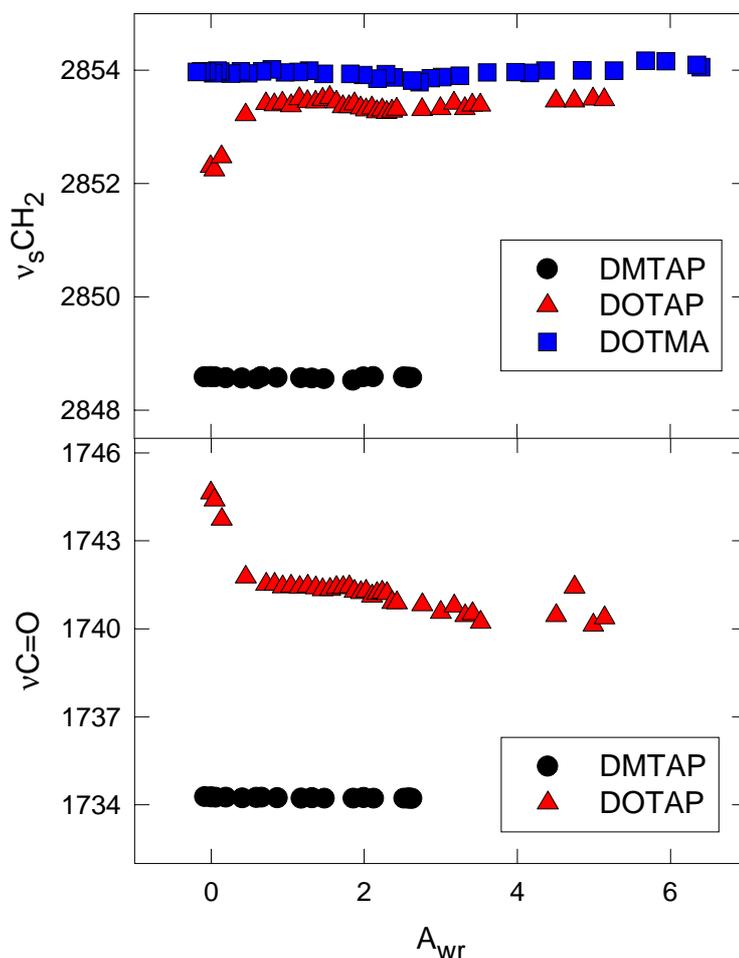


Abb. 3.4.2.2 Wellenzahlen der $\nu_s\text{CH}_2$ (oben) und der $\nu\text{C}=\text{O}$ (unten) von DMTAP (schwarz), DOTAP (rot) und DOTMA (blau) in cm^{-1} in Abhängigkeit von A_{wr} .

Die Überlagerung der Bande der $\nu_a\text{CH}$ der Doppelbindung bei $\sim 3010\text{ cm}^{-1}$ in DOTAP und DOTMA verhindert die Auswertung der Bande der $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$, so dass über Wasserstoffbrückenbindungen (vgl. Kap. 4.1.) keine Aussagen getroffen werden können. Bei DMTAP ist die $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ -Bande in drei Subbanden mit konstanten Wellenzahlen bei 3036, 3014 und 2984 cm^{-1} untergliedert (vgl. Kap. 3.2.2. und 4.1.). Die Struktur dieser Bande hängt möglicherweise mit dem Netzwerk von Salzbrücken zwischen den TAP-Einheiten und den Chloridionen zusammen.

Zusammenfassung

DMTAP zeigt ein nur geringes Wasseraufnahmevermögen und, damit verbunden, nahezu unveränderte IR-Spektren im gesamten Hydratationsbereich. Salzbrücken-Netzwerke zwischen den Cl^- und TAP^+ -Einheiten werden hier gebildet. DOTAP hat offenbar wegen der erhöhten Unordnung der Ketten nicht die Möglichkeit zur Ausbildung eines Salzbrücken-Netzwerks und deshalb ein erhöhtes

Wasseraufnahmevermögen. Die Wellenzahlen der Banden der $\nu\text{C}=\text{O}$ sinken mit zunehmender Hydratisierung ähnlich wie bei PC's. DOTMA nimmt unter den untersuchten kationischen Lipiden am meisten Wasser auf. Das Fehlen von Phosphatgruppen bedingt die vollständige Wasserabgabe dieser Lipide bei geringen Luftfeuchten.

4. Diskussion genereller Phänomene und Ausblick

Lipide und Lipid-Modellsubstanzen mit unterschiedlichen Molekülstrukturen wurden in dieser Arbeit bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit Wasser untersucht. Substanzspezifische Befunde dieser Experimente wurden in den einzelnen Ergebniskapiteln bereits diskutiert. Generelle Phänomene, die übergreifend im Sinne der Systematik der Zielstellung (vgl. Tab. 1.4.1) ergründet werden sollten, werden in diesem Kapitel erörtert. Einflüsse sowohl der polaren als auch der apolaren Bereiche der Moleküle auf das Hydratisierungsverhalten werden analysiert.

4.1. Interaktionspotential polarer Gruppen in Lipiden

4.1.1. Einfluss von Kopfgruppenstruktur und Ladung

PC-Kopfgruppe

PC-Kopfgruppen weisen ein relativ hohes Wasseradsorptionsvermögen auf. Feste Gelphasen nehmen bei vergleichbaren Bedingungen weniger Wasser auf als flüssigkristalline (vgl. Kap. 3.3.1.1. und 4.2.). Die Hydratisierung der Kopfgruppen kann durch Verschiebungen von Schwingungsbanden der Phosphat- und Carbonylgruppen direkt verfolgt werden. Wasser wechselwirkt vorrangig mit den Phosphatsauerstoffatomen und in zweiter Linie mit den Carbonylgruppen (vgl. Kap. 3.1.2.). Wellenzahlverschiebungen der $\nu_{\text{a}}\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ -Bande wurden als Hinweise für die mit zunehmender Hydratisierung verminderte elektrostatische Anziehung zwischen Phosphat- und Trimethylammoniumgruppe gewertet (GRDADOLNIK ET AL., 1991).

Durch Verwendung partiell-deuterierter Lipide konnten überlappende Banden getrennt und Einflüsse der Hydratisierung auf die CH-Gruppen der Lipidkopfgruppen separiert werden (vgl. Kap. 3.2.3.). Mittels kopfgruppendeutertem DMPC-d4 konnte gezeigt werden, dass die Kopfgruppenstruktur durch die primäre Hydratisierung beeinflusst wird: Verschiebungen der νCD_2 -Bande der Cholingruppe und der $\nu_{\text{a}}\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ -Bande setzen sofort mit Beginn der Hydratisierung ein. Dagegen korrelieren Wellenzahlverschiebungen von Streckschwingungsbanden der

Methylengruppen im Glycerolrückgrat von DMPC-d54 und DMPC-d67 entweder mit der Verschiebung der Bande der $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ oder den erst bei höheren Hydratisierungsgraden einsetzenden Änderungen von Schwingungsbanden der Kohlenwasserstoffketten. In [Tab. 4.1.1.1](#) sind die Wellenzahlen von Schwingungen der Ketten- und Kopfgruppenmethyl(en)gruppen zusammengefasst. Generell sind Bandenverschiebungen mit zunehmender Hydratisierung in Richtung höherer Wellenzahlen zu beobachten.

Tab. 4.1.1.1 $\tilde{\nu}\text{CH}_n / \tilde{\nu}\text{CD}_n$ der Ketten und Kopfgruppen bei minimaler (linker Wert) und maximaler Hydratisierung (rechter Wert) und deren Differenz, in cm^{-1} , auf 0.5 cm^{-1} gerundet.

Substanz	$\tilde{\nu}_s\text{CH}_2 / \tilde{\nu}_s\text{CD}_2$ Kette	Differenz	$\tilde{\nu}\text{CH}_n / \text{CD}_n$ Kopf	Differenz	$\tilde{\nu}\text{CH}_n$ Kopf	Differenz
PC's	2850-2853	+3				
PE's	2850					
Cardiolipin	2854					
DOPG	2851-2853.5	+2.5				
DOG	2854					
MGDG	2850.5					
DGDG	2850.5					
DMTAP	2848.5					
DOTAP	2852-2853.5	+1.5				
DOTMA	2854					
MePC			2948-2956	+8	2840-2850	+10
Cholin					2847-2852	+5
StearylTriMAC	2848-2850	+2				
Stearylamin	2850					
Stearylalkohol	2849.5					
DMPC-d4	2850-2852	+2	2118-2125	+7		
DMPC-d13	2850-2852	+2	2117-2124	+7		
DMPC-d54	2089-2092	+3	2955-2964	+9	2886-2894	+8
DMPC-d67	2089-2092	+3	2949-2964	+15	2886-2895	+9

Die Molekülgruppe $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ist nicht nur in PC's, sondern auch in DMTAP, DOTAP, DOTMA, MePC, ACh, Cholin, StearylTriMAC und TetraMAC ($(\text{N}-\text{CH}_3)_4$) vorhanden. Entsprechende Wellenzahlverschiebungen sind in [Tab. 4.1.1.2](#) dargestellt.

Tab. 4.1.1.2 $\tilde{\nu}_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ bei minimaler (linker Wert) und maximaler Hydratisierung (rechter Wert) und ihre Differenz, in cm^{-1} , auf 0.5 cm^{-1} gerundet.*

Substanz	$\tilde{\nu}_a\text{CH}_3 / \text{CD}_3^{\text{TMA}}$	Differenz
PC's	3030 - 3050 / 2272 - 2282	+20 / +10
DMTAP	3035 + 3015 + 2984	0
MePC	3024 - 3042	+18
Cholin	3017 - 3020 (59% RF)	+3
StearylTriMAC	3035 + 3015 + 3003 - 3032	+17

bei TetraMAC, ACh, DOTAP und DOTMA waren die Bandenpositionen nicht exakt zuzuordnen ([s. Kap. 3.2.1. und 3.4.2.](#)); bei StearylTriMAC ist die Hauptbande fettgedruckt.

Die Wellenzahlverschiebungen der Banden der TMA-Gruppen übertreffen die der in [Tab. 4.1.1.1](#) gezeigten Verschiebungen der Banden der Kopfgruppen-CH_n-Schwingungen. Die Wellenzahlverschiebungen der Banden der Kopfgruppen-CH_n-Schwingungen sind größer als die der Kettenschwingungen (s. [Tab. 4.1.1.1](#) und [4.1.1.2](#)). Diskontinuierliche Wellenzahlverschiebungen der Kettenschwingungen ($\Delta 2 - 3 \text{ cm}^{-1}$) sind Ausdruck von Konformationsübergängen, wie der zwischen *all-trans*-Ketten und Ketten mit einem erheblichen Anteil von *gauche*-Defekten (vgl. [Kap. 3.1.2](#)). Die kontinuierlichen Verschiebungen der $\tilde{\nu}_{\text{aCH}_3^{\text{TMA}}}$ ($\Delta 15 - 30 \text{ cm}^{-1}$) und die der $\tilde{\nu}_{\text{CH}_n}$ der Cholin- und Glycerol-CH_n-Gruppen ($\Delta 8 - 15 \text{ cm}^{-1}$) sind nicht mit Konformationsübergängen zu erklären, sondern weisen durch hydrationsinduzierte Änderungen auf intermolekulare Wechselwirkungen hin. Die Trimethylammoniumgruppe ist von Konformationsänderungen, wenn überhaupt, nur sehr indirekt betroffen, und die möglichen Änderungen der Cholin- oder Glycerol-CH_n-Konformationen bezüglich ihrer Torsionswinkel oder höherer Polarität der Umgebung dieser Gruppen verursachen wahrscheinlich nicht solche großen, kontinuierlichen Wellenzahlverschiebungen.

Eine Erklärung bietet das Modell der sogenannten "improperen" H-Brücken. **Impropere Wasserstoffbrücken** (HOBZA AND HAVLAS, 2000) (= anti-H-bond, (BRANDL ET AL., 2001), [vgl. 3.2.1.](#)) sind von Standard-Wasserstoffbrücken zu unterscheiden. Die Ausbildung einer impropere H-Brücke geht mit einer Kontraktion der Bindungslänge der beteiligten Molekülgruppe, verbunden mit der Frequenzerhöhung (blue-shift) der Schwingungen dieser Gruppe, einher (s. [Abb. 4.1.1.1](#)).

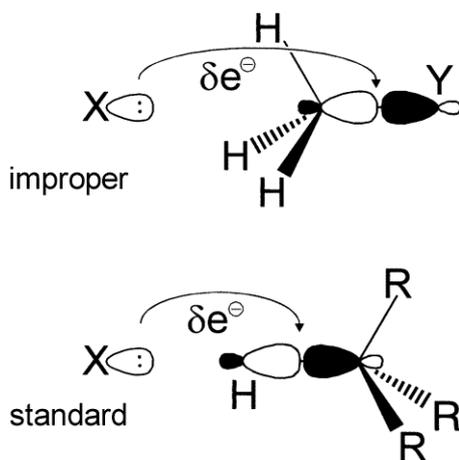


Abb. 4.1.1.1 Schematische Abbildung des Elektronendichte-Transfers (δe^-) in einem impropere blue-shifted Wasserstoffbrücken-Komplex (oben) und einem Standard red-shifted Wasserstoffbrücken-Komplex (unten). Im impropere H-Brücken-Komplex geht der Haupt-(δe^-)-Transfer vom Elektronenpaar von X zum C-Y antibindenden Orbital, während im Standard-H-Brücken-Komplex der Haupt-(δe^-)-Transfer zum antibindenden Orbital der C-H-Bindung, die in die H-Brücke involviert ist, stattfindet; aus HOBZA AND HAVLAS (2000).

Die impropere Wasserstoffbrücke verursacht z. B. eine Kontraktion von C-H-Bindungen in einer C-H \cdots Y (Y = Protonenakzeptor, z. B.: O, N) -Wasserstoffbrücke,

indem ein Ladungstransfer zu einem entfernteren Teil des Protonendonors, der nicht direkt in die C-H \cdots Y- Interaktionen involviert ist, erfolgt (MRAZKOVA AND HOBZA, 2003). Für CF₃H stellen FAN ET AL. (2002) fest, dass der Kohlenstoff durch die Fluoratome polarisiert und somit positiv geladen ist. Damit muss die Anziehungskraft zwischen C und Y mit in die Betrachtung der Y \cdots H Interaktion einbezogen werden. Durch die C-Y-Anziehung nähern sich die beiden so stark an, dass H Pauli-Abstoßungskräfte spürt und die C-H-Bindung kontrahiert. Ähnliche Verhältnisse liegen in der TMA-Gruppe mit positivem Stickstoff vor, welcher eine stark Elektronen-anziehende Wirkung haben dürfte. Die Kontraktion der Bindungslänge wurde von BRANDL ET AL. (2001) z. B. für C-H \cdots O/N berechnet und beträgt ~ 0.002 Ångström, was in einer Frequenzverschiebung von ~ 14 cm⁻¹ resultiert.

In der Literatur wird für die PC-Kopfgruppe andererseits ein Clathratmodell (vgl. Kap. 3.2.1.) diskutiert (PERERA ET AL., 1996; HSIEH AND WU, 1996; DAMODARAN & MERZ 1993). HSIEH AND WU (1996) stellten mit NMR-Untersuchungen an DMPC, DMPC-d₄ und -d₁₃ fest, dass 2 Hydratwasser bei den Phosphatgruppen und 5 - 6 Wassermoleküle als Wassercluster ringförmig um die TMA-Gruppe angelagert sind (s. Abb. 4.1.1.2).

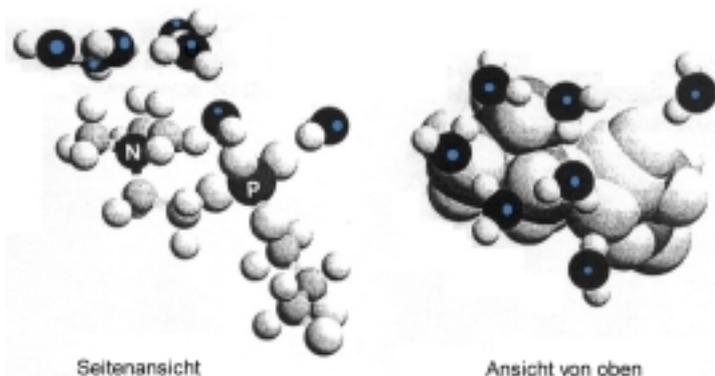


Abb. 4.1.1.2 PC-Clathratmodell aus HSIEH AND WU (1996). Links Seitenansicht und rechts Ansicht von oben der PC-Kopfgruppe mit 7 Wassermolekülen (mit blauen Punkten markiert) vgl. Text.

Im Clathrat von Cholin ((UDACHIN AND RIPMEESTER, 1999), vgl. Kap. 3.2.1.) existieren Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der OH-Gruppe von Cholin und Wassermolekülen der Käfigstruktur.

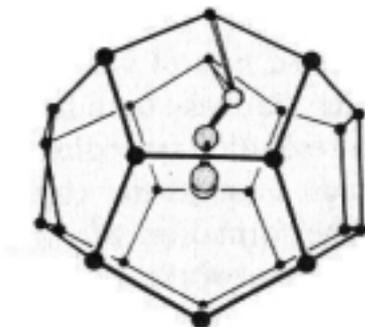


Abb. 4.1.1.3 Semi-Clathrat (14-Hedron von Isopropylaminhydrat). Die N-Atome des Gastmoleküls sind über Wasserstoffbrücken in die Käfigstruktur eingebunden; aus JEFFREY AND SAENGER (1991).

JEFFREY AND SAENGER (1991) nannten Clathratstrukturen, in denen durch H-Brückenbindung z. B. NH-Gruppen von Alkylaminen in die Wasserkäfigstruktur eingebunden sind, **Semi-Clathrate** (s. Abb. 4.1.1.3). Dieser Begriff wäre dann auch auf PC's anwendbar.

In allen Modellen sind direkte Interaktionen der CH_n -Gruppen mit adsorbiertem Wasser möglich und aufgrund der hier gefundenen experimentellen Daten auch wahrscheinlich. Die berechneten und beobachteten Wellenzahlverschiebungen stimmen gut überein (auch mit neuesten Berechnungen an PC-Kopfgruppen-Fragmenten, (MRAZKOVA ET AL., unveröffentlicht)). Die Ausbildung einer *Semi-Clathrat*struktur kann bei der Hydratisierung von PC's und einigen Modell-Substanzen oberhalb einer bestimmten Wassermenge vermutet werden. Die Verschiebung der Bande der $\nu_{\text{a}}\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ ist nicht mehr nur als Indiz für die verminderte elektrostatische Anziehung zwischen Phosphat und Stickstoff aufgrund von zunehmender Wasserbindung (GRDADOLNIK ET AL., 1991) zu betrachten, sondern offenbar in erster Linie als Folge der Bildung direkter Wasserstoffbrücken der Methylgruppen der TMA-Gruppe mit adsorbiertem Wasser.

PE-Kopfgruppe

Erstmals wurden DCPE im Vergleich mit DCPC und DPhPE im Vergleich mit DPhPC IR-spektroskopisch bezüglich ihres Hydratisierungsverhaltens untersucht und mit bekannten Daten von DPPE und DOPE (SELLE, 1999) verglichen. Unterschiede der PE- und PC-Kopfgruppen gehören zu den am besten charakterisierten Eigenschaften der Phospholipide, siehe z. B.: McMULLEN ET AL. (1999); McINTOSH (1996); KOYNOVA AND CAFFREY (1994).

In PE's vermindert ein **Wasserstoffbrücken-Netzwerk** zwischen den Phosphat- und NH_3 -Gruppen die Wechselwirkungen mit Wasser und verursacht geringeres Wasseraufnahmevermögen der PE-Lipide verglichen mit den analogen PC's. Es konnte gezeigt werden, dass die Einflüsse der Kopfgruppen dominant gegenüber denen der Ketten sind: in DCPC findet ein $L_c \leftrightarrow L_\alpha$ Übergang statt, wogegen DCPE trotz geringer Wasseradsorption völlig invariant gegenüber der Hydratisierung ist (vgl. Abb. 3.3.1.2.1). Das Wasser erreicht hier die Kopfgruppe möglicherweise gar nicht erst oder übt keine registrierbaren Effekte auf die Gruppenschwingungen aus, wie schon für DPPE postuliert wurde (SELLE, 1999). DPhPC zeigt ebenfalls im Gegensatz zu DPhPE höhere Wasseraufnahmekapazität und ein komplexes Phasenverhalten (vgl. Kap. 3.3.1.3.+ s. u.).

Anionische Lipide

Das Interaktionspotential von PG's könnte aufgrund der OH-Gruppen prinzipiell ähnlich dem der PE's eingeschätzt werden. Die Untersuchung von DOPG zeigte jedoch, dass die PG-Kopfgruppe im Hydratisierungsverhalten mehr ihrem PC- als ihrem PE-Analogon ähnelt. Der Unterschied der Wechselwirkungen zwischen NH-Gruppen der PE's und OH-Gruppen von PG's mit den jeweiligen Phosphatgruppen ist offenbar groß. Diese Unterschiede sind nicht nur am Wasseraufnahmevermögen zu erkennen, sondern spiegeln sich auch in den Wellenzahlen der Banden der Phosphatgruppenschwingungen der voll hydratisierten Lipide wider. Die PG-Kopfgruppen sind bei geringer Hydratisierung stärker in H-Brückenbindungen involviert als die Kopfgruppen aller bisher untersuchten Phospholipide (vgl. Tab. 4.1.1.3). Bei Wasseradsorption verringern sich die Interaktionen im DOPG jedoch und es kommt zu einem Phasenübergang (vgl. Kap. 3.3.2.1.).

In Cardiolipin werden ebenfalls starke Wasserstoffbrücken zu den Phosphatgruppen ausgebildet und bei hohen Hydratisierungsgraden ähnlich niedrige Wellenzahlen der $\nu_a\text{PO}_2^-$ -Bande wie bei DOPG erreicht. In Bereichen geringer RF sind die Phosphatgruppen von Cardiolipin offenbar in Wechselwirkungen mit der OH-Gruppe des Glycerols involviert, da ihre Wellenzahlen für Schwingungen nahezu freier Phosphatgruppen zu niedrig sind (vgl. Tab. 4.1.1.3).

Tab. 4.1.1.3 $\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$ bei minimaler (linker Wert) und maximaler Hydratisierung (rechter Wert), in cm^{-1} , auf 0.5 cm^{-1} gerundet.

Substanz	$\tilde{\nu}_a\text{PO}_2^-$	Differenz
PC's	1260 - 1230	-30
MePC	1257 - 1232	-25
DPhPE	1245 + 1233* - 1225	-8
DOPG	1255.5 + 1241.5 - 1215	~-40
Cardiolipin	1238 - 1218	-20

* bei DPhPE Hauptbande fettgedruckt;

In beiden anionischen Lipiden werden möglicherweise OH-Phosphatgruppen-Netzwerke ausgebildet, die die Ursache für die z. T. niedrigen Wellenzahlen der $\nu_a\text{PO}_2^-$ -Bande sein könnten, wie sie bereits für ein bipolares Lipid (OH-(CH₂)₂₂-PC) beobachtet wurden (POHLE ET AL., 2001B).

Kationische Lipide

In DMTAP konnte die Existenz eines **Salzbrücken-Netzwerks** beobachtet werden. Dabei bestehen alternierende Wechselwirkungen zwischen Cl^- und den TAP^+ -Einheiten. Die Wasseraufnahmekapazität ist bei DMTAP dadurch stark vermindert. In DOTAP ist die Ausbildung eines solchen Netzwerks durch aufgelockerte Kettenpackung aufgrund ungesättigter Ketten nicht möglich und es kommt zu stärkerer Wasseradsorption als in DMTAP (vgl. Kap. 3.4.2.). DOTMA hat offenbar wegen des Fehlens von Phosphat- und Carbonylgruppen ein verändertes Wasseradsorptionsverhalten (s. u.).

4.1.2. Einfluss einzelner Molekülgruppen

Phosphat

Das Vorhandensein einer Phosphatgruppe, wie in den PC's, MePC und den anionischen Lipiden befähigt die entsprechenden Substanzen, auch in Bereichen geringer Luftfeuchte Wasser zu adsorbieren und z. T. Restwasser fest zu binden. In PE's sind die Phosphatgruppen in ein starkes Wasserstoffbrücken-Netzwerk involviert (s. o.), weshalb die Wasseraufnahme im Vergleich zu PC's deutlich vermindert ist und Restwasser nicht auftritt.

Das Fehlen der Phosphatgruppen in den Glykolipiden, kationischen Lipiden, den Stearylverbindungen, TetraMAC, Acetylcholin und Cholin führt zur Ausbildung von unterschiedlichsten Hydratisierungsmustern und im Fall von DOG oder Stearylalkohol zum Unvermögen, Wasser adsorbieren zu können. In Bereichen geringer Luftfeuchte geben diese Substanzen Wasser vollständig ab (mit Ausnahme der hygroskopischen PC-Kopfgruppenmodelle).

Trimethylammonium

PC's, DMTAP, DOTAP, DOTMA, MePC, ACh, Cholin, TetraMAC und StearylTriMAC adsorbieren große Mengen Wasser. Die Positivierung der Ammonium-Gruppe ist offenbar dafür notwendig (vgl. Stearylamin s. u.).

Die Modellsubstanzen ohne Fettsäureketten haben die Tendenz, Clathratstrukturen auszubilden (HARMON ET AL., 1987). DOTMA scheint trotz vorhandener Fettsäureketten Clathrat-ähnliche Hydratisierungsmuster zu haben. Auch für PC's wurde diese Hydratisierungsform bereits postuliert (s. o., (PERERA ET AL., 1996; HSIEH AND WU, 1996)).

Bei DMTAP und StearylTriMAC ist eine Gliederung der Bande der $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ in drei Subbanden in Bereichen geringer Hydratisierung zu beobachten (s. Tab. 4.1.1.2). Die Ausbildung von Salzbrücken-Netzwerken mit den Cl^- - und TAP^+ -Einheiten des

DMTAP wurde bereits gezeigt. Bei StearylTriMAC bestehen offenbar ähnliche Wechselwirkungen zwischen den TMA⁺- und Cl⁻- Einheiten. Diese scheinen die Aufspaltung der Bande der $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ bei beiden Substanzen zu bewirken. Bei StearylTriMAC verschwindet die Feinstruktur dieser Bande in Bereichen höherer Luftfeuchten, bei DMTAP dagegen nicht. Die Wasseradsorption von StearylTriMAC findet offenbar vorwiegend an der TMA-Gruppe statt und bewirkt die Verschiebung der $\nu_a\text{CH}_3^{\text{TMA}}$ -Bande ähnlich wie in PC's. Die Wechselwirkungen der Kopfgruppen im StearylTriMAC sind trotz Hydratisierung noch stark genug, um einen Phasenübergang dieses Lipids von einer L_{ci}- in eine L_{βi}-Phase, ohne Auflösung der Salzbrücken-Verklammerung zuzulassen (s. Kap. 3.2.2.).

Carbonyl

Carbonylgruppen sind bei allen untersuchten Substanzen außer DOTMA, MePC, Cholin, TetraMAC und den Stearylverbindungen vorhanden (Wellenzahlen s. Tab. 4.1.2.1).

Tab. 4.1.2.1 $\tilde{\nu}\text{C=O}$ bei minimaler Hydratisierung (linker Wert) und maximaler Hydratisierung (rechter Wert) und deren Differenz, in cm^{-1} , auf 0.5 cm^{-1} gerundet.

Substanz	$\tilde{\nu}\text{C=O}$	Differenz
PC's	1738 - 1734	-4
DOPG	1742 - 1737	-5
PE's	1740	
Cardiolipin	~1740*	
DOG	1743	
MGDG	~1736.6*	
DGDG	~1736.6*	
DMTAP	1734	
DOTAP	1745 - 1740	-5
ACh	1737.5 - 1734	-3.5

* ~ schwankt um den Wert

Bei PC's sinkt die mittlere Wellenzahl der Bande der $\nu\text{C=O}$ mit steigender Hydratisierung, wobei Wellenzahlen um 1738 cm^{-1} für nahezu freie Carbonylgruppen in einer apolaren Umgebung und Wellenzahlen um 1734 cm^{-1} für eine erhöhte Polarität der Umgebung bzw. H-Brückenbindung charakteristisch sind (vgl. Kap. 3.1.2.).

In DMTAP werden besonders niedrige Wellenzahlen der $\nu\text{C=O}$ -Bande beobachtet. Das Salzbrücken-Netzwerk entspricht offenbar einer stark polaren Umgebung. Wechselwirkungen mit adsorbiertem Wasser scheinen die Carbonylgruppen über den gesamten Hydratisierungsbereich nicht einzugehen. Dies lassen konstant niedrige Wellenzahlen der $\nu\text{C=O}$ Bande erkennen. Bei DOTAP befinden sich die

Carbonylgruppen offenbar konstant in apolarer Umgebung ohne Interaktionen mit Wasser, da die Wellenzahlen trotz einer Verschiebung insgesamt in Wellenzahlbereichen $\geq 1740 \text{ cm}^{-1}$ verbleiben.

Die Lage der $\nu\text{C=O}$ Banden der Glykolipide lässt dagegen auf H-Brückenbindung bzw. erhöhte Polarität der Umgebung dieser Molekülgruppen schließen.

In PE's und DOG ist die Carbonylgruppe nahezu unbeeinflusst, und ihre Absorptionsbanden liegen in Wellenzahlbereichen freier Carbonylgruppen.

OH-Gruppen

OH-Gruppen (vgl. Tab. 4.1.2.2) treten in den Kopfgruppen von DOPG, DOG, Cardiolipin, MGDG, DGDG und Stearylalkohol und in Cholin auf. Die OH-Gruppe ist ein weniger starker Protonendonator als die NH_3 -Gruppe (BOGGS, 1987). Trotzdem verleiht sie den Substanzen die Möglichkeit, inter- oder intramolekular z. B. mit Phosphat- oder Carbonylgruppen, oder mit Wasser in Wechselwirkung zu treten.

Tab. 4.1.2.2. $\tilde{\nu}\text{OH}$ bei 0% RF, Bereich der schwach (linke Spalte) und stark (rechte Spalte) H-Brücken-gebundenen OH-Spezies, in cm^{-1} , auf 0.5 cm^{-1} gerundet.

Substanz	$\tilde{\nu}\text{OH}$	
DOG	3465	
DOPG	3420	3244
Cardiolipin	3531	3248
MGDG	3455 + 3405	
DGDG	3411 + 3307	
Cholin	3470 + 3437	3254
Stearylalkohol		3233
H_2O	~3390	
Ethanol	3334*	

*(SMITH, 1999)

Die Phosphatgruppen von Cardiolipin wechselwirken mit den OH-Gruppen. Stark und schwach Wasserstoffbrücken-gebundene Subspezies von OH-Gruppen werden durch zwei Banden der νOH angezeigt. In DOPG sind, erkennbar an den extrem niedrigen Wellenzahlen der Banden der Phosphatstreckschwingungen, starke Interaktionen von Phosphat- und Hydroxylgruppen zu vermuten. Auch im OH-Streckschwingungsbereich lassen sich die stark H-Brücken-gebundenen Subspezies bei 3244 cm^{-1} erkennen. Cardiolipin und DOPG adsorbieren jedoch trotz der Phosphat-OH-Interaktionen relativ viel Wasser. Diese Kopfgruppen ähneln bezüglich ihres Hydratisierungsverhaltens eher PC's (s. o.).

Die Hydroxylgruppen der Zuckerreste in MGDG und DGDG sind vor allem in inter- und intramolekularen H-Brücken gebunden. Die Höhe der Wasseraufnahme der

Glykolipide ist von der Zahl der möglichen Wasserstoffbrücken zu den Zucker-OH-Gruppen limitiert (LINDBLOM ET AL., 1986).

Bei DOG und Stearylalkohol ist keine Wasseraufnahme möglich. Die $\tilde{\nu}$ OH befinden sich bei DOG im Bereich schwach gebundener und bei Stearylalkohol im Bereich stark gebundener OH-Gruppen und zeigen damit die unterschiedliche Stärke ihrer intermolekularen Wechselwirkungen an.

NH_n-Gruppen

Die NH₂-Kopfgruppe ohne Ladung befähigt Stearylamin offenbar nicht zur Wasseradsorption: Die Bande der Streckschwingung der Aminogruppe bleibt bei allen RF konstant bei 3332 cm⁻¹. Die NH₃-Gruppe in Anwesenheit von Phosphatgruppen bei PE's schränkt aufgrund des o. g. Wasserstoffbrücken-Netzwerks deren Wasseraufnahmekapazität stark ein.

4.2. Einfluss der apolaren Kettenstruktur

Bei der Untersuchung einer Reihe von PC-Lipiden mit verschiedenen **Kettenlängen** (s. Kap. 3.3.1.1.) wurde deutlich, dass das Wasseraufnahmevermögen primär von der vom Lipid eingenommenen Phase abhängt. Lipide mit lyotropem Phasenübergang in die flüssigkristalline Form erreichen annähernd gleiche A_{wrc}-Werte in hohen RF-Bereichen. Diese sind verglichen mit den ebenfalls untereinander angenäherten maximalen A_{wrc}-Werten der Lipide, die in der Gelphase verbleiben, höher. Die A_{wrc}-Werte beim Phasenübergang hängen allerdings systematisch von der Kettenlänge ab - kurzkettige Lipide schmelzen bei geringeren A_{wrc} als längerkettige.

Verzweigungen, wie in den Isoprenketten von Phytanoyllipiden, führen zu ungewöhnlichem lyotropem Phasenverhalten. DPhPC durchläuft während der Dehydratisierung verschiedene Phasen, jedoch alle mit fluiden Ketten: - eine lamellare wandelt sich in eine parallel zur Bilayeroberfläche expandierte lamellare, mit fortschreitender Dehydratisierung übergangsweise in eine kubische, und schließlich in eine invertiert hexagonale Phase um (vgl. Abb. 4.2.1). Diese Übergänge sind von geringen, aber signifikanten Wellenzahlverschiebungen und Intensitätssprüngen begleitet und konnten mittels Röntgenbeugung und IR-LD sicher zugeordnet werden. Damit wurde erstmals der hydrationsbedingte Übergang eines PC's von der lamellar flüssigkristallinen in die invertiert hexagonale Phase gezeigt. Die biologische Bedeutung dieser lyotropen Phasenvielfalt der Membranlipide der Archaeobakterien könnte im Zusammenhang mit ihren extremen Lebensräumen

gesehen werden. Die Stabilität der L_{α} -Phase von DPhPC ist über weite Bereiche temperaturunabhängig, verringert sich jedoch deutlich bei Feuchtigkeitsverlust. Der Verlust der Bilayerstruktur kann bis zu einem gewissen Grad (hier bis 60% RF) mit dem Übergang in eine zweite lamellare Phase (s. Abb. 4.2.1.) verzögert werden.

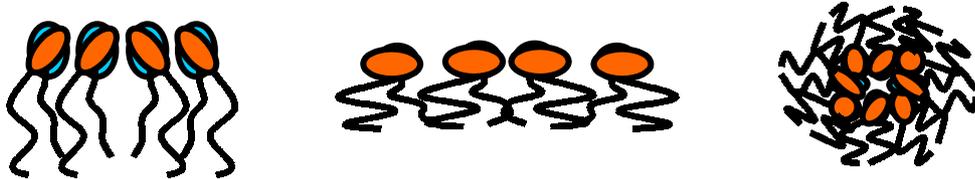


Abb. 4.2.1 Schematische Darstellung der L_{α} , L_{β} und der H_{II} -Phase von DPhPC, abnehmende Hydratisierung von links nach rechts.

Die Ähnlichkeit des Einflusses von Methylverzweigungen in den Phytanoylketten und von Doppelbindungen in **ungesättigten** Ketten ist erkennbar. Beide Strukturen stören die Kettenpackung verbunden mit dem Resultat erhöhter Fluidität. Der Effekt der verzweigten Ketten ist stärker als der der ungesättigten Ketten. Das Wasseraufnahmevermögen ist in diesen Lipiden erhöht, im Gegensatz zu den entsprechenden Analoga mit gesättigten, unverzweigten Ketten, (s. Kap. 3.3.1.2., (SELLE, 1999)). Die H-Brücken-Netzwerkstruktur von DOPE und DPhPE ist aufgrund der ungesättigten bzw. verzweigten Ketten so beeinflusst (erkennbar vor allem an den Wellenzahlveränderungen der Banden der $\nu_a\text{PO}_2^-$), dass es in beiden Lipiden in Bereichen geringer Hydratisierung zu Phasenübergängen kommt ($H_{II} \rightarrow P_{\alpha}$ bzw. H_{II}'). DOTMA befindet sich über den gesamten Hydratisierungsbereich bedingt durch die ungesättigten Ketten und durch die fehlende Kopfgruppenvernetzung in einer fluiden Phase. DMTAP verharrt dagegen in der Gelphase während DOTAP einen hydratisierungsinduzierten Übergang (Phasenzuordnung nicht bestimmt) unter gleichen Versuchsbedingungen durchmacht.

4.3. Methodische Ergebnisse

Wasseraufnahmevermögen

Die IR-Spektroskopie ist in erster Linie zur Untersuchung von Strukturen, Konformationen und Interaktionen von Molekülen und Molekülgruppen geeignet. Eine quantitative Bewertung der Wasseradsorption (Restwasser und Adsorptionsisothermen) kann mit Hilfe der normierten Extinktionsparameter A_{wr} und A_{wrc} erreicht werden. Die Vergleichbarkeit dieser Parameter zwischen verschiedenen

Lipidspezies ist jedoch besonders bei ungesättigten oder verzweigten Ketten oder stark abweichenden Kopfgruppenstrukturen begrenzt. Die zusätzliche Einbeziehung von Methoden zur Wasserbestimmung, wie der Karl-Fischer-Titration oder der Gravimetrie erwies sich als sinnvoll (GAUGER ET AL., 2001B).

Bandenzuordnungen unpolarer Kopfgruppensegmente

Mit Hilfe von Acylketten-freien Modellsustanzen, Stearylverbindungen mit reduzierten PC-Kopfgruppenelementen und deuterierten Lipiden (s. Kap. 3.2.1., 3.2.2. und 3.2.3.) konnten Bandenpositionen von Glycerol- und Cholin-CH_n-Gruppen zugeordnet werden (s. Tab. 4.1.1.1). Ein Zugang zu Details der Kopfgruppenhydratisierung wurde damit ermöglicht und das *Semi-Clathrat*-Modell mit improperen C-H \cdots O Wasserstoffbrücken zwischen Wasser und Lipid für PC-ähnliche Kopfgruppenstrukturen vorgeschlagen (s. o.).

Koexistenz lamellarer und nichtlamellarer Phasen

Die Charakterisierung nichtlamellarer Phasen allein mittels IR-Spektroskopie ist nach wie vor schwierig (LEWIS AND McELHANEY, 2002). Die Untersuchungsergebnisse zu den in dieser Arbeit gefundenen nichtlamellaren Phasen machen dies deutlich. Die Übereinstimmung IR-spektroskopischer Befunde bei DOPE und DPhPE steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Röntgenbeugungsuntersuchungen (s. Kap. 3.3.1.3.), wobei mit letzteren in DPhPE ein H_{II}-H_{II}-, bei DOPE dagegen ein H_{II}-P_α-Übergang gefunden wurde. Bei MGDG sind weder an großen Halbwertsbreiten von Banden noch an Wellenzahlschwankungen Indizien für die Koexistenz von lamellaren und nichtlamellaren Phasen erkennbar. In diesem Fall musste die Röntgenbeugung entscheidende Ergänzungen liefern. Bei DPhPC können mit Hilfe der Röntgenbeugung vier Phasen unterschieden werden, mittels Elektronenmikroskopie zwei Phasen, und die IR-spektroskopischen Ergebnisse (inkl. IR-LD) liefern Indizien für drei Phasen. Bei DPhPC sind jedoch diskontinuierliche Wellenzahlverschiebungen an Banden der CH_n-, Phosphat- und Carbonylstreckschwingungen beim Übergang in die nichtlamellare Phase zu beobachten (vgl. Abb. 3.3.1.3.2 und 3.3.1.3.3). Diese Banden wurden als Marker des thermotrop induzierten Übergangs von Eigelb-PE von der flüssigkristallinen in die invers-hexagonale Phase verwendet (CASTRESANA ET AL., 1992). Möglicherweise kann die IR-Spektroskopie zumindest deutliche Hinweise auf lamellar-nichtlamellare Phasenübergänge geben.

4.4. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten wichtige Ergänzungen zum Grundlagenwissen über das Hydratisierungs- und Phasenverhalten von Lipiden und Modellsubstanzen. Voraussagen zu Einflüssen von Kopfgruppenstrukturen, bestimmten Molekülgruppen oder Ladungen auf potentielle Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Molekül(grupp)en können auf dieser Grundlage getroffen werden. Die Experimente mit Lipiden z. B. in Modellmembranen oder als Liposomen, könnten durch die Auswahl geeigneter Systeme optimiert und experimentelle Befunde besser dem Lipid oder dem untersuchten System (z. B. Peptid, Protein, Pharmakon) zugeordnet werden. Die Untersuchung geeigneter Mischsysteme verschiedener Lipide und anderer Substanzen müssen diese Zuordnung weiter erleichtern helfen. Die Kenntnisse über die genauen Vorgänge bei der Hydratisierung von Lipiden sollten durch Korrelation theoretischer Modelle, z. B. der PC-Kopfgruppe, mit experimentellen Daten erweitert werden, wie es mit Hilfe von quantenchemischen Berechnungen im Vergleich mit experimentellen Ergebnissen von MePC bereits bearbeitet wird (MRAZKOVA, ET AL., unveröffentlicht). Die Optimierung von Ausgangsstrukturen für Moleküldynamik-Simulationen der Hydratisierung der PC-Kopfgruppe könnte aufgrund hier gezeigter Untersuchungsergebnisse verbessert werden.

5. Zusammenfassung

Lipide aggregieren aufgrund ihres amphiphilen Aufbaus in polaren Lösungsmitteln. Sie sind die Grundbausteine von Biomembranen. Ihr Aggregationsverhalten hängt in erheblicher Weise von ihren Wechselwirkungen mit Wasser ab. Der Aufbau des polaren Molekülteils ist für diese Wechselwirkungen bestimmend.

Die IR-Spektroskopie ist eine etablierte Methode, Lipide zu untersuchen. Wasser und seine Wechselwirkungen mit einzelnen Molekülgruppen sind mit dieser Methode gut detektierbar. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die IR-spektroskopische Untersuchung der Hydratation des polaren Molekülteils. Komplementäre Methoden, wie IR-LD, Röntgenbeugung, Elektronenmikroskopie, Karl-Fischer-Titration oder Gravimetrie lieferten wichtige Ergänzungen zur Struktur der Assemblierungen und der Wasseraufnahmekapazität.

Bandenentflechtungen mit Hilfe deuterierter Lipide und Modellsubstanzen erlaubten detaillierte Betrachtungen der Hydratisierung bestimmter Kopfgruppen- und Interfacebereiche. Die vermeintlich apolaren Methyl(en)gruppen der Trimethylammonium (TMA⁺)-, Cholin- und Glycerinreste bilden offenbar sogenannte "impropere" Wasserstoffbrücken aus. Aufgrund der experimentellen Befunde konnten theoretische Vorhersagen zur Ausbildung solcher Wasserstoffbrücken bestätigt werden. Als neues Hydratisierungsmodell für PC-Kopfgruppen werden impropere Wasserstoffbrücken und eine *Semi-Clathrat*struktur vorgeschlagen.

Ammoniumgruppen können bei PE's mit den Phosphatgruppen intermolekular ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk aufbauen und so Wasseradsorption graduell verhindern. Diese Netzwerkstruktur wird jedoch von der Kettenstruktur beeinflusst: z. B. DPhPE mit verzweigten Ketten zeigte einen hydratisierungsbedingten Phasenübergang im Gegensatz zu DCPE mit gesättigten Ketten.

Ladungen führen zu speziellen Interaktionen der Moleküle und ihrer Gegenionen, wie z. B. die Ausbildung von Salzbrücken-Netzwerken der TMA-Gruppen und ihrer Gegenionen bei kationischen Lipiden. Bei StearylTriMAC führt die Molekülgeometrie zusammen mit einem Salzbrückennetzwerk zwischen TMA und Chloridionen zum Auftreten fest verklammerter interdigitierter Phasen mit ungewöhnlichen IR-Charakteristika. Anionische OH-Gruppen-haltige Lipide bilden Wasserstoffbrücken zwischen OH- und Phosphatgruppen aus, nehmen jedoch viel Wasser auf und ähneln insgesamt in ihrem Hydratisierungsverhalten eher den PC's als den PE's.

Es gelang eine Abschätzung des Interaktionspotentials von verschiedenen Kopfgruppen mit Wasser, speziell von OH-, NH-, TMA-, Carbonyl- und Phosphatgruppen. Die Höhe der Wasseraufnahme der Glykolipide z. B. ist von der Zahl der möglichen Wasserstoffbrücken zu den Zucker-OH-Gruppen limitiert. Stearylamin und -alkohol nehmen im Gegensatz zu StearylTriMAC kein Wasser auf.

Kettenverzweigungen verursachen hohe Kettenunordnung und das Auftreten einer neuen lamellaren Phase im DPhPC. Im DPhPE verhindert die veränderte Kettengeometrie offenbar die Ausbildung einer P_{α} -Phase, wie sie im DOPE auftritt.

Die Koexistenz lamellarer und nichtlamellarer Phasen wurde bei MGDG und DPhPC mit Röntgenbeugung bzw. Elektronenmikroskopie gefunden und mit IR-spektroskopischen Befunden korreliert.

In dieser Arbeit wurde die Entflechtung der Einflüsse einzelner Komponenten des polaren Molekülteils und apolarer Bestandteile auf das Hydratations- und Phasenverhalten mittels IR-Spektroskopie gezeigt und ein neues Hydratisierungsmodell für PC's vorgeschlagen.

Literaturverzeichnis

1. Akin,A.C. and K.M.Harmon. 1994. Hydrogen Bonding Part.55 IR and thermodynamic study of the lower hydrates of phenylphosphorylcholine and methylphosphorylcholine. *J. Mol. Struct.* 319:55-64.
2. Amey,R.L. and D.Chapman. 1984. Infrared spectroscopic studies of model and natural biomembranes. *In Biomembrane Structure and Function*. D.Chapman, (Ed.) Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Basel. 199-256.
3. Andreopoulos,D. and L.P.Kasi. 1997. ^{99m}Tc-labelled diphytanoylphosphatidylcholine liposomes: in vitro and in vivo studies. *J. Microencapsulation* 14(4):427-436.
4. Aslanian,D. 1983. Vibrational spectroscopic approach to the study of acetylcholine and related compounds. *Life Sciences* 32:2809-2825.
5. Aslanian,D., M.Balkanski, and A.Lautie. 1977. On the conformational changes of Acetylcholine and some of its analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 99/6:1974-1976.
6. Baer,E. 1953. On the Crystallisation, Structure and Infrared Spectra of Saturated L- α -Lecithins. *J. Amer. Chem. Soc.* 75:621-623.
7. Balasubramaniam,R.P., M.J.Bennett, A.M.Aberle, J.G.Malone, M.H.Nantz, and R.W.Malone. 1996. Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: The hydrophobic domain. *Gene Therapy*. 3:163-172.
8. Bartucci,R., G.Montesano, and L.Sportelli. 1997. Lipid Chain Mobility in Interdigitated DPPC Systems. *Appl. Magn. Reson.* 12:41-52.
9. Betz, E., Reutter, K., Mecke, D., und Ritter, H. *Biologie des Menschen*. 15.Aufl. 2001. Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co., Wiebelsheim.
10. Binder, H. *Infrarot-Lineardichroismus molekulargeordneter Systeme - Untersuchungen zur Hydratation und Struktur von Dienlipiden*. 2000. Diss./Leipzig. 1-178. Universität Leipzig.
11. Binder,H. 2003. The Molecular Architecture of Lipid Membranes - New Insights from Hydration - Tuning Infrared Linear Dichroism Spectroscopy. *Appl. Spectr. Reviews* 38(1):15-69.
12. Binder,H., K.Arnold, A.S.Ulrich, and O.Zschörnig. 2000a. The effect of Zn²⁺ on the secondary structure of a histidine-rich fusogenic peptide and its interaction with lipid membranes. *BBA* 1468:345-358.
13. Binder,H., K.Arnold, A.S.Ulrich, and O.Zschörnig. 2001. Interaction of Zn²⁺ with phospholipid membranes. *Biophys. Chem.* 90:57-74.
14. Binder,H., U.Dietrich, M.Schalke, and H.Pfeiffer. 1999a. Hydration-Induced Deformation of Lipid Aggregates before and after Polymerisation. *Langmuir* 15:4857.
15. Binder,H. and K.Gawrisch. 2001. Dehydration induces lateral expansion of polyunsaturated 18:0-22:6 phosphatidylcholine in a new lamellar phase. *Biophys. J.* 81:969-982.
16. Binder,H., T.Gutberlet, A.Anikin, and G.Klose. 1998. Hydration of the Dienic Lipid Dioctadecadienoylphosphatidylcholine in the Lamellar Phase - An Infrared Linear Dichroism and X-Ray Study on Headgroup Orientation, Water Ordering, and Bilayer Dimensions. *Biophys. J.* 74:1908-1923.
17. Binder,H., B.Kohlstrunk, and H.Heerklotz. 1999b. Hydration and lyotropic melting of amphiphilic molecules - a thermodynamic study using humidity titration calorimetry. *J. Coll. Interf. Sci.* 220(2):235-249.

18. Binder,H., B.Kohlstrunk, and W.Pohle. 2000b. Thermodynamic and Kinetic Aspects of Lyotropic Solvation Induced Transitions in Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Assemblies Revealed by Humidity Titration Calorimetry. *J. Phys. Chem.* 104:12049-12055.
19. Binder,H. and W.Pohle. 2000. Structural Aspects of Lyotropic Solvation Induced Transitions in Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Assemblies Revealed by Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 104:12039-12048.
20. Binder,H. and H.Schmiedel. 1999. Infrared dichroism investigations on the acyl chain ordering in lamellar structures: I. Order parameter formalism and its application to polycrystalline stearic acid. *Vibr. Spectrosc.* 21:51-73.
21. Blume,A., W.Hübner, and G.Messner. 1988. Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phospholipids. Hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* 27:8239-8249.
22. Boggs,J.M. 1987. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *BBA* 906:353-404.
23. Boulin,C., R.Kempf, M.H.J.Koch, and S.M.McLaughlin. 1986. Data Appraisal, Evaluation and Display for Synchrotron Radiation Experiments: Hardware and Software. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A*249:399-407.
24. Brandenburg,K., S.Kusumoto, and U.Seydel. 1997. Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *BBA* 1329:183-201.
25. Brandl,M., M.Meyer, and J.Sühnel. 2001. Quantum-Chemical Analysis of C-H...O and C-H...N Interactions in RNA Base Pairs - H-Bond versus Anti-H-Bond Pattern. *J. Biomol. Struct. & Dynam.* 18:545-555.
26. Caffrey,M. 1993. Lipid Thermotropic Phase Transitions. NIST Standard Reference Database 34. Standard Reference Data. National Institut of Standards and Technology, Gaithersburg.
27. Casal,H.L. and H.H.Mantsch. 1984. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *BBA* 779:381-402.
28. Castresana,J., J.-L.Nieva, E.Rivas, and A.Alonso. 1992. Partial dehydration of phosphatidylethanolamine phosphate groups during hexagonal phase formation, as seen by i.r. spectroscopy. *Biochem. J.* 282:467-470.
29. Cevc,G. 1991. Isothermal lipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* 57:293-307.
30. Chia,N.-C. and R.Mendelsohn. 1996. Conformational disorder in unsaturated phospholipids by FTIR spectroscopy. *BBA* 1283:141-150.
31. Cullis,P.R. and B.De Kruijff. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *BBA* 559:399-420.
32. Cullis,P.R., A.J.Verkleij, and P.H.J.Th.Ververgaert. 1978. Polymorphic Phase Behaviour of Cardiolipin as Detected by ^{31}P NMR and Freeze-Fracture Techniques. *BBA* 513:11-20.
33. Damodaran,K.V. and K.M.Merz. 1993. Head group-water interactions in lipid bilayers: A comparison between DMPC- and DLPE-based lipid bilayers. *Langmuir* 9:1179-1183.
34. Derreumaux,P., K.J.Wilson, G.Vergoten, and W.L.Peticolas. 1989. Conformational Studies of Neuroactive Ligands. 1. Force Field and Vibrational Spectra of Crystalline Acetylcholine. *J. Phys. Chem.* 93:1338-1350.
35. Epand,R.M., B.Gabel, R.F.Epand, A.Sen, S.-W.Hui, A.Muga, and W.K.Surewicz. 1992. Formation of a new stable phase of phosphatidylglycerols. *Biophys. J.* 63:327-332.

36. Fan, J.-M., L. Liu, and Q.-X. Guo. 2002. Substituent effects on the blue-shifted hydrogen bonds. *Chem. Phys. Lett.* 365:464-472.
37. Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofectin: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.
38. Fillion, M.C. and N.C. Phillips. 1997. Anti-inflammatory activity of cationic lipids. *Br. J. Pharmacol.* 122:551-557.
39. Findlay, E.J. and P.G. Barton. 1978. Phase Behavior of synthetic phosphatidylglycerols and binary mixtures with phosphatidylcholines in the presence and absence of calcium ions. *Biochem.* 17:2400-2405.
40. Fittkau, S. Kompendium der organischen Chemie. 1972. Jena, Gustav Fischer Verlag.
41. Fringeli, U.P. and H.H. Günthard. 1981. Infrared membrane spectroscopy. *In Membrane Spectroscopy*. E. Grell, (Ed.) Springer-Verlag, New York. 270-332.
42. Gauger, D.R., H. Binder, A. Vogel, C. Selle, and W. Pohle. 2002. Comparative FTIR-Spectroscopic Studies of the Hydration of Diphytanoylphosphatidylcholine and -ethanolamine. *J. Mol. Struct.* 614:211-220.
43. Gauger, D.R., C. Selle, H. Fritzsche, and W. Pohle. 2001a. Chain-length dependence of the hydration properties of saturated phosphatidylcholines as revealed by FTIR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 565-566:25-29.
44. Gauger, D.R., C. Selle, M. Hahn, and W. Pohle. 2001b. Defining the Water Content in Oriented Lipid Films by Karl-Fischer Titration. *Anal. Biochem.* 299:108-110.
45. Gawrisch, K., D. Ruston, J. Zimmerberg, V.A. Parsegian, P. Rand, and N. Fuller. 1992. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys. J.* 61:1213-1223.
46. Gomez-Fernandez, J.C. and J. Villalain. 1998. The use of FT-IR for quantitative studies of the apparent pK_a of lipid carboxyl groups and the dehydration degree of the phosphate group of phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* 96:41-52.
47. Gomez-Fernandez, J.C., J. Villalain, and F.J. Aranda. 1997. Phase behavior of membranes containing bioactive lipids. *Current Topics Membranes* 44:193-236.
48. Grage, S., D.R. Gauger, C. Selle, W. Pohle, W. Richter, and A.S. Ulrich. 2000. The amphiphilic drug flufenamic acid can induce a hexagonal phase in DMPC: a solid state ^{31}P and ^{19}F NMR study. *PCCP* 2:4574-4579.
49. Grdadolnik, J., J. Kidric, and D. Hadzi. 1991. Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles and multilayers - an infrared spectroscopic study. *Chem. Phys. Lipids* 59:57-68.
50. Greenspan, L. 1999. Saturated salt solutions for controlling relative humidity. <http://www.natmus.min.dk/cons/tp/satslt/satsol.htm>.
51. Gruner, S.M. 1985. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: A role for nonbilayer lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3665-3669.
52. Gruner, S.M., M.W. Tate, G.L. Kirk, P.T.C. So, D.C. Turner, D.T. Keane, C.P.S. Tilcock, and P.R. Cullis. 1988. X-ray Diffraction Study of the Polymorphic Behavior of N-Methylated Dioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry* 27:2853-2866.
53. Guan, Y. and G.J. Thomas. 1996. Vibrational Analysis of Nucleic Acids. V. Force Field and Conformation-Dependent Modes of the Phosphodiester Backbone Modeled by Diethyl Phosphate. *Biophys. J.* 71:2802-2814.

54. Hadzi,D. and J.Grdadolnik. 1993. Conformation of the choline chain of phosphatidylcholines - A FTIR study of the symmetric C-N(CH₃)₃ stretching mode. *J. Chim. Phys.* 90:1771-1785.
55. Hadzi,D., M.Hodoscec, J.Grdadolnik, and F.Avbelj. 1992. Intermolecular effects on phosphate frequencies in phospholipids - infrared study and ab-initio model calculation. *J. Mol. Struct.* 266:9-19.
56. Handbook of Vibrational Spectroscopy. 2002. J.M. Chalmers, P.R. Griffith, (Ed.) Wiley&Sons, New York.
57. Harmon,K.M., G.F.Avci, and A.C.Thiel. 1987. Hydrogen Bonding. Part 24. Dichotomous hydration behavior of quaternary ammonium halides. *J. Mol. Struct.* 161:205-218.
58. Harmon,K.M., N.J.De Santis, and D.O.Brandt. 1992. Hydrogen bonding; Part 39. Hydrogen bonding by α -CH in quaternary ammonium salts and the possible role of C-H...B hydrogen bonds in acetylcholine-receptor interactions. *J. Mol. Struct.* 265:47-57.
59. Harmon,K.M., T.E.Nelson, and M.S.Janos. 1989. β Hydrogen Bonding; Part 28. NMR study of β -CH to ¹⁴N coupling as a function of hydration of tetraethylammonium halides. *J. Mol. Struct.* 213:185-191.
60. Harroun,T., K.He, W.T.Heller, S.J.Ludtke, H.W.Huang, C.H.Hsieh, and W.Wu. 1996. Lyotropic phases of diphytanoylphosphatidylcholine. *Biophys. J.* 70:A 88.
61. Hauser,H. 1975. Lipids. *In Water - A Comprehensive Treatise.* F.Franks, (Ed.). Plenum Press, New York, London. 209-304.
62. Hauser,H., I.Pascher, R.H.Pearson, and S.Sundell. 1981. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *BBA* 650:21-51.
63. Hauser,H., I.Pascher, and S.Sundell. 1980. Conformation of phospholipids. Crystal structure of a lysophosphatidylcholine analogue. *J. Mol. Biol.* 137:249-264.
64. Hauser,H., I.Pascher, and S.Sundell. 1988. Preferred conformation and dynamics of the glycerol backbone in phospholipids. An NMR and X-ray single-crystal analysis. *Biochemistry* 27:9166-9174.
65. Haymet,A.D.J., K.A.T.Silverstein, and K.A.Dill. 1996. Hydrophobicity reinterpreted as "minimisation of the entropy penalty of solvation". *Faraday Discuss.* 103:117-124.
66. Hobza,P. and Z.Havlas. 2000. Blue-Shifting Hydrogen Bonds. *Chem. Rev.* 100:4253-4264.
67. Hristova,N.I., I.Tsoneva, and E.Neumann. 1997. Sphingosine-mediated electroporative DNA-transfer through lipid bilayers. *FEBS Lett.* 415(1):81-86.
68. Hsieh,C.H., S.C.Sue, P.C.Lyu, and W.G.Wu. 1997. Membrane Packing Geometry of Diphytanoylphosphatidylcholine Is Highly Sensitive to Hydration: Phospholipid Polymorphism Induced by Molecular Rearrangement in the Headgroup Region. *Biophysical Journal* 73:870-877.
69. Hsieh,C.H. and W.G.Wu. 1996. Structure and dynamics of primary hydration shell of phosphatidylcholine bilayers at subzero temperatures. *Biophys. J.* 71:3278-3287.
70. Huang,C. and T.J.McIntosh. 1997. Probing the Ethanol-Induced Chain Interdigitations in Gel-State Bilayers of Mixed-Chain Phosphatidylcholines. *Biophys. J.* 72:2702-2709.
71. Huang,C., Z.Wang, H.Lin, E.E.Brumbaugh, and S.Li. 1994. Interconversion of bilayer phase transition temperatures between phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines. *BBA* 1189:7-12.

72. Hung,W.C., F.Y.Chen, and H.W.Huang. 2000. Order-disorder transition in bilayers of diphtanoylphosphatidylcholine. *BBA* 1467:198-206.
73. Hübner,W. and A.Blume. 1998. Interactions at the lipid-water interface. *Chem. Phys. Lipids* 96:99-123.
74. Hübner,W. and H.H.Mantsch. 1991. Orientation of specifically $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phosphatidylcholine multilayers from polarized attenuated total reflectance FT-IR spectroscopy. *Biophys. J.* 59:1261-1272.
75. Hübner,W., H.H.Mantsch, and H.L.Casal. 1990. Beware of frequency shifts. *Applied Spectrosc.* 44:732-734.
76. Hübner,W., H.H.Mantsch, and M.Kates. 1991. Intramolecular hydrogen bonding in cardiolipin. *BBA* 1066:166-174.
77. Infrared Spectroscopy of Biomolecules. 1996. Mantsch,H.H.; Chapman,D., (Ed.). Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
78. Inoue,T. and Y.Nibu. 1995. Miscibility of binary phospholipid mixtures under hydrated and non-hydrated conditions .4. Phosphatidylglycerols with different acyl chain length. *Chem. Phys. Lipids* 76:181-191.
79. Israelachvili,J. 1991. Intermolecular & Surface Forces. Harcourt Brace & Company, London,SanDiego,NY,Boston,Sydney,Tokyo,Toronto.
80. Israelachvili,J.N., S.Marcelja, and R.G.Horn. 1980. Physical principles of membrane organization. *Quart. Rev. Biophys.* 13:121-200.
81. Jeffrey,G.A. and W.Saenger. 1991. Hydrogen Bonding in Biological Structures. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
82. Jendrasiak,G.L. 1996. The hydration of phospholipids and its biological significance. *J. Nutr. Biochem.* 7:599-609.
83. Jendrasiak,G.L., R.L.Smith, and W.Shaw. 1996. The water adsorption characteristics of charged phospholipids. *BBA-Biomembranes* 1279:63-69.
84. Kappel,T., R.H.Anken, W.Hanke, and H.Rahmann. 2000. Gangliosides affect membrane-channel activities dependent on ambient temperature. *Cellular and Molecular Neurobiology* 20(5):579-590.
85. Karlson,P., D.Doenecke, and J.Koolman. 1994. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
86. Katsaras,J. and K.R.Jeffrey. 1997. Evidence of the hydration force in gel phase lipid multibilayers. *Europhys. Lett.* 38:43-48.
87. Kint,S., P.H.Wermer, and J.R.Scherer. 1992. Raman spectra of hydrated phospholipid bilayers. 2.water and head-group interactions. *J. Phys. Chem.* 96:446-452.
88. Kleinig,H. und P.Sitte. 1999. Zellbiologie. 4. Aufl.,Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm.
89. Koch,M.H.J. and J.Bordas. 1983. X-ray Diffraction and Scattering on Disordered Systems Using Synchrotron Radiation. *Nuclear Instruments & Methods* 208:461-469.
90. Kodati,V.R., R.Eljastimi, and M.Lafleur. 1994. Contribution of the intermolecular coupling and librotorsional mobility in the methylene stretching modes in the infrared spectra of acyl chains. *J. Phys. Chem.* 98:12191-12197.

91. Koynova,R. and M.Caffrey. 1994. Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines. *Chem. Phys. Lipids* 69:1-34.
92. Koynova,R. and M.Caffrey. 2002. An index of lipid phase diagrams. *Chem. Phys. Lipids* 115:107-219.
93. Krill,S.L., S.L.Gupta, and T.Smith. 1994. Pulmonary lung surfactant synthetic peptide concentration-dependent modulation of DPPC and POPG acyl chain order in a DPPC: POGG:palmitic acid lipid mixture. *Chem. Phys. Lipids* 71:47-59.
94. Kuschinsky, G., H.Lüllmann, und K.Mohr. Pharmakologie und Toxikologie. 13. Aufl. 1993. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
95. Laggner,P., K.Lohner, G.Degovics, K.Müller, and A.Schuster. 1987. Structure and thermodynamics of the dihexadecylphosphatidylcholine-water system. *Chem. Phys. Lipids* 44:31-60.
96. Lewis,R.N.A.H., N.Mak, and R.N.McElhaney. 1987. A Differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains. *Biochemistry* 26:6118-6126.
97. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 1990. Subgel phases of n-saturated diacylphosphatidylcholines: A fourier-transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry* 29:7946-7953.
98. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 1992. Structures of the subgel phases of n-saturated diacyl phosphatidylcholine bilayers. FTIR spectroscopic studies of $^{13}\text{C}=\text{O}$ and ^2H labeled lipids. *Biophys. J.* 61:63-77.
99. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 1993. Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase behavior of a homologous series on n-saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamines. *Biophys. J.* 64:1081-1096.
100. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 1995. Acholeplasma laidlawii B membranes contain a lipid (Glycerolphosphoryldiglucoyl-diacylglycerol) which forms micelles rather than lamellar or reversed phases when dispersed in water. *Biochemistry* 34:13818-13824.
101. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 1996. Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Hydrated Lipids and Lipid Bilayer Membranes. *In Infrared Spectroscopy of Biomolecules.* H.H.Mantsch and D.Chapman, (Ed.). Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 159-202.
102. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 1998. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chem. Phys Lipids* 96:9-21.
103. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 2000. Surface Charge Markedly Attenuates the Nonlamellar Phase-Forming Propensities of Lipid Bilayer Membranes: Calorimetric and ^{31}P -Nuclear Magnetic Resonance Studies of Mixtures of Cationic, Anionic, and Zwitterionic Lipids. *Biophys. J.* 79:1455-1464.
104. Lewis,R.N.A.H. and R.N.McElhaney. 2002. Vibrational spectroscopy of lipids. *In Handbook of vibrational spectroscopy.* John M.Chalmers and Peter R.Griffiths, (Ed.). Chichester. 3447-64.
105. Lewis,R.N.A.H., R.N.McElhaney, W.Pohle, and H.H.Mantsch. 1994. Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerol bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* 67:2367-2375.
106. Lewis,R.N.A.H., S.Tristram-Nagle, J.F.Nagle, and R.N.McElhaney. 2001. The thermotropic phase behavior of cationic lipids: calorimetric, infrared spectroscopic and X-ray diffraction studies of lipid bilayer membranes composed of 1,2-di-O-myristoyl-3-N,N,N-trimethylaminopropane (DM-TAP). *BBA* 1510:70-82.

107. Lindblom,G., I.Brentel, M.Sjölund, G.Wikander, and A.Wieslander. 1986. Phase Equilibria of Membrane Lipids from *Acholeplasma laidlawii*: Importance of a Single Lipid Forming Nonlamellar Phases. *Biochemistry* 25:7502-7510.
108. Lindblom,G. and L.Rilfors. 1989. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance. *BBA* 988:221-256.
109. Lindsey,H., N.O.Petersen, and S.I.Chan. 1979. Physicochemical characterisation of 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems. *BBA* 555:147-167.
110. Liscovitch,M. and L.C.Cantley. 1994. Lipid second messengers. *Cell* 77:329-334.
111. Luzzati,V. 1968. X-ray Diffraction Studies of Lipid-Water Systems. *In Biological Membranes*. D.Chapman, (Ed.). Academic Press, New York. 71-123.
112. Luzzati,V. and A.Tardieu. 1974. Lipid Phase: Structure and Structural Transitions. *Annu. Rev. Phys. Chem.*79-94.
113. Mahato,R.I., K.Kawabata, T.Nomura, Y.Takakura, and M.Hashida. 1995. Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA cationic liposome complexes. *J. Pharm. Sci.* 84:1267-1271.
114. Mantsch, H. H. 1984. The Application of FTIR-Spectroscopy to the Study of Membranes. T.Theophanides (Ed.). D.Reidel Publishing company., *FTIR* 125-135.
115. Mantsch,H.H. 1991. Bioanalytical Applications of FT-IR Spectroscopy. *Kemia-Kemi* 18:183-185.
116. Mantsch,H.H., C.Madec, R.N.A.H.Lewis, and R.N.McElhaney. 1985. Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing isobranched fatty acids. 2. Infrared and ³¹P NMR spectroscopic studies. *Biochemistry* 24:2440-2446.
117. Mantsch,H.H. and R.N.McElhaney. 1991. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 57:213-226.
118. Marsh,D. 1990. CRC Handbook of Lipid Bilayers. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston.
119. Marsh,D. 1997. Nonlamellar Packing Parameters for Diacylglycerols. *Biophys. J.* 72:2834-2836.
120. Marshall,J., J.B.Nietupski, E.R.Lee, C.S.Siegel, P.W.Rafter, S.A.Rudginsky, C.D.Chang, S.J.Eastman, D.J.Harris, R.K.Scheule, and S.H.Cheng. 2000. Cationic lipid structure and formulation considerations for optimal gene transfection of the lung. *J. Drug Targeting* 7(6):453-469.
121. May,S. and A.Ben-Shaul. 1997. DNA-Lipid Complexes: Stability of Honeycomb-Like and Spaghetti-Like Structures. *Biophys. J.* 73:2427-2440.
122. McIntosh,T.J. 1996. Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* 81:117-131.
123. McIntosh,T.J. and A.D.Magid. 1993. Phospholipid Hydration. *In Phospholipids Handbook*. G.Cevc, (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hongkong. 553-78.
124. McMullen,T.P.W., R.N.A.H.Lewis, and R.N.McElhaney. 1999. Calorimetric and spectroscopic studies of the effects of cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of a homologous series of linear saturated phosphatidylethanolamine bilayers. *BBA* 1416:119-134.

125. Mendelsohn,R., M.A.Davies, J.W.Bauner, H.F.Schuster, and R.A.Dluhy. 1989. Quantitative determination of conformational disorder in the acyl chains of phospholipid bilayers by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 28:8934-8939.
126. Meyer,H.W. and W.Richter. 2001. Freeze-fracture studies on lipids and membranes. *Micron* 32:615-644.
127. Meyer,H.W., K.Semmler, W.Rettig, W.Pohle, A.S.Ulrich, S.Grage, C.Selle, and P.J.Quinn. 2000. Hydration of DMPC and DPPC at 4°C produces a novel subgel phase with convexconcave bilayer curvatures. *Chem. Phys Lipids* 105:149-166.
128. Miller,A.D. 1998. Kationische Liposomen für die Gentherapie. *Angew. Chem.* 110:1862-1880.
129. Mok,K.W.C. and P.R.Cullis. 1997. Structural and Fusogenic Properties of Cationic Liposomes in the Presence of Plasmid DNA. *Biophys. J.* 73:2534-2545.
130. Mrazkova,E. and P.Hobza. 2003. Hydration of Sulpho and Methyl Groups in Dimethyl Sulfoxide is Accompanied by Formation of Red-shifted Hydrogen Bonds and Improper Blue-shifted Hydrogen Bonds: An *Ab initio* Quantum Chemical Study. *Journal of Physical Chemistry A*, 107(7):1032-1039.
131. Mrazkova,E., T.Kubar, W.Pohle, D.R.Gauger, M.Bohl, and P.Hobza. unveröffentlicht. Hydration of the phosphocholine apolar and polar headgroups yields blue and red shifts of the C-H and P-O stretch frequencies: *ab initio* quantum chemical calculations.
132. Nagle,J.F. and S.Tristram-Nagle. 2000. Structure of lipid bilayers. *BBA* 1469:159-195.
133. O'Brien,F.M.E. 1948. The control of humidity by saturated salt solutions. *J. Sci. Instruments* 25:73-76.
134. Obika,S., W.Yu, A.Shimoyama, T.Uneda, T.Minami, K.Miyashita, T.Do, and T.Imanishi. 1999. Properties of Cationic Liposomes Composed of Cationic Lipid YKS-220 Having an Ester Linkage: Adequate Stability, High Transfection Efficiency, and Low Cytotoxicity. *Biol. Pharm. Bull.* 22:187-190.
135. Okamura,E., J.Umemura, and T.Takenaka. 1990. Orientation studies of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine multibilayers by polarized FTIR-ATR spectroscopy. *BBA* 1025:94-98.
136. Ortiz,A., J.A.Killian, A.J.Verkleij, and J.Wilschut. 1999. Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations. *Biophys. J.* 77:2003-2014.
137. Pastranarios,B., C.R.Flach, J.W.Brauner, A.J.Mautone, and R.Mendelsohn. 1994. A Direct Test of the Squeeze-Out Hypothesis of Lung Surfactant Function - External Reflection FT-IR at the Air/Water Interface. *Biochemistry* 33:5121-5127.
138. Paukku,T., S.Lauraeus, I.Huhtaniemi, and P.K.J.Kinnunen. 1997. Novel cationic liposomes for DNA-transfection with high efficiency and low toxicity. *Chemistry and Physics of Lipids* 87:23-29.
139. Pearson,R.H. and I.Pascher. 1979. The molecular structure of lecithin dihydrate. *Nature* 281:499-501.
140. Penzlin,H. 1996. Lehrbuch der Tierphysiologie. 6. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena.
141. Perera,L., U.Essmann, and M.L.Berkowitz. 1996. Role of water in the hydration force acting between lipid bilayers. *Langmuir* 12:2625-2629.
142. Pinchas, S. and Laulicht, I. Infrared spectra of labelled compounds. 1971. London, Academic Press.

143. Pohle,W. and H.Fritzsche. 1990. Infrared spectroscopy as a tool for investigations of DNA structure and DNA-ligand interactions. *J. Mol. Struct.* 219:341-346.
144. Pohle,W., D.R.Gauger, U.Dornberger, E.Birch-Hirschfeld, C.Selle, A.Rupprecht, and M.Bohl. 2002. Hydration of Biological Molecules: Lipids Versus Nucleic Acids. *Biopolymers (Biospectroscopy)* 67:499-503.
145. Pohle,W. and C.Selle. 1996. Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Evidence for a Novel Lyotropic Phase Transition Occurring in Dioleoylphosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* 82:191-198.
146. Pohle,W., C.Selle, H.Fritzsche, and H.Binder. 1998. Fourier-transform infrared spectroscopy as a probe for the study of the hydration of lipid self-assemblies. I. Methodology and general phenomena. *Biospectroscopy* 4:267-280.
147. Pohle,W., C.Selle, H.Fritzsche, and M.Bohl. 1997. Comparative FTIR Spectroscopic Study upon the Hydration of Lecithins and Cephalins. *J. Mol. Struct.* 408-409:273-277.
148. Pohle,W., C.Selle, D.R.Gauger, and K.Brandenburg. 2001a. Lyotropic phase transitions in phospholipids as evidenced by small-angle synchrotron X-ray scattering. *J. Biomol. Struct. & Dynam.* 19:351-364.
149. Pohle,W., C.Selle, D.R.Gauger, R.Zantl, F.Artzner, and J.O.Rädler. 2000. FTIR spectroscopic characterization of a cationic lipid-DNA complex and its components. *PCCP* 2:4642-4650.
150. Pohle,W., C.Selle, W.Rettig, U.Heiser, B.Dobner, and S.Wartewig. 2001b. Phase Transitions and Hydrogen Bonding in a Bipolar Phosphocholine Evidenced by Calorimetry and Vibrational Spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 396:151-161.
151. Powell,G.L. and S.-W.Hui. 1996. Tetraoleoylpyrophosphatidic acid: a four acyl-chain lipid which forms a hexagonal II phase with high curvature. *Biophys. J.* 70:1402-1406.
152. Prenner,E.J., R.N.A.H.Lewis, L.H.Kondejewski, R.S.Hodges, and R.N.McElhaney. 1999. Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes. *BBA* 1417:211-223.
153. Rapp,G., S.S.Funari, F.Richter, and D.Woo. 2001. X-ray Diffraction Studies on the Effect of Additives on the Phase Behaviour of Lipids. *In Lipid Bilayers - Structure and Interactions.* J.Katsaras and T.Gutberlet, (Ed.). Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 165-87.
154. Rädler,J.O., I.Koltover, T.Salditt, and C.R.Safinya. 1997. Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science* 275:810-840.
155. Redwood,W.R., F.R.Pfeiffer, J.A.Weisbach, and T.E.Thompson. 1971. Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane. *BBA* 233:1-6.
156. Römpp Chemielexikon. 1995. Falbe,J. & Regitz,M., Thieme Stuttgart, New York.
157. Scheiner,S., S.J.Grabowski, and T.Kar. 2001. Influence of Hybridization and Substitution on the Properties of the CH...O Hydrogen Bond. *J. Phys. Chem. A* 105:10607-10612.
158. Scherer,J.R., S.Kint, B.A.Bolton, and G.F.Bailey. 1990. Raman spectra of hydrated phospholipid bilayers. Part 1. Measurement of humidity-dependent phase transitions. *J. Mol. Struct.*245-257.
159. Schorn,K. and D.Marsh. 1996. Lipid chain dynamics and molecular location of diacylglycerol in hydrated binary mixtures with phosphatidylcholine: Spin label ESR studies. *Biochemistry* 35:3831-3836.

160. Seddon, J.M., R.H.Templer, N.A.Warrender, Z.Huang, G.Cevc, and D.Marsh. 1997. Phosphatidylcholine-fatty acid membranes: effects of headgroup hydration on the phase behaviour and structural parameters of the gel and inverse hexagonal (H_{II}) phases. *BBA* 1327:131-147.
161. Selle, C. Untersuchungen zur Hydratisierung von Phospholipidfilmen mittels FTIR-Spektroskopie und anderer physikochemischer Methoden. 1999. Diss./Jena. 1-98. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
162. Selle, C. and W.Pohle. 1998. Fourier-transform infrared spectroscopy as a probe for the study of the hydration of lipid self-assemblies. II. Water binding versus phase transitions. *Biospectroscopy* 4:281-294.
163. Selle, C., W.Pohle, and H.Fritzsche. 1997. Monitoring the Stepwise Hydration of Phospholipids in Films by FTIR Spectroscopy. *Microchim. Acta Suppl.* 14:449-450.
164. Siegel, D., J.Banschbach, A.Alford, H.Ellens, L.J.Lis, P.J.Quinn, P.L.Yeagle, and J.Bentz. 1989. Physiological levels of diacylglycerols in phospholipid membranes induce membrane fusion and stabilize inverted phases. *Biochem.* 28:3703-3709.
165. Singer, M.A., L.Finegold, P.Rochon, and T.J.Racey. 1990. The formation of multilamellar vesicles from saturated phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamines: morphology and quasi-elastic light scattering measurements. *Chem. Phys Lipids* 54:131-146.
166. Singer, S.J. and G.L.Nicholson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
167. Small, D. M. The Physical Chemistry of Lipids. 1986. New York, London, Plenum Press. Handbook of Lipid Research, 4.
168. Smith, B. C. Infrared spectral interpretation: a systematic approach. 1999. Boca Raton; London; New York; Washington, D.C., CRC Press LLC.
169. Snyder, R.G. 1961. Vibrational spectra of crystalline n-paraffins II. Intermolecular effects. *J. Mol. Spectrosc.* 7:116-144.
170. Snyder, R.G. 1967. Vibrational study of the chain conformation in the liquid n-paraffins and molten polyethylene. *J. Chem. Phys.* 47:1316-1360.
171. Snyder, R.G. and M.W.Poore. 1973. Conformational Structure of Polyethylene Chains from the Infrared Spectrum of the Partially Deuterated Polymer. *Macromolecules* 6:708-715.
172. Stewart, L.C., M.Kates, P.W.Yang, and H.H.Mantsch. 1990. Intra- and inter-molecular hydrogen bonding in diphytanyl glycerol phospholipids: an infrared spectroscopic investigation. *Biochemistry and cell biology* 68:266-273.
173. Sunder, S., D.Cameron, H.H.Mantsch, and H.J.Bernstein. 1978. Infrared and laser Raman studies of deuterated model membranes: Phase transition in 1,2-perdeuterodipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Can. J. Chem.* 56:2121-2126.
174. Szwergold, B.S., F.Kappler, L.H.Cohen, D.Nanavati, and T.R.Brown. 1990. Identification of a naturally occurring methyl-ester of phosphate, methyl-phosphorylcholine (Methyl-2-(N,N,H Trimethylamino) ethyl phosphate), in the eggs of the Sea Urchin *S. Purpuratus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:855-861.
175. Tanford, C. 1980. The Hydrophobic Effect. John Wiley and Sons, New York.
176. The Nomenclature of Lipids. 1977. *Eur. J. Biochem.* 79:11-21.
177. Udachin, K.A. and J.A.Ripmeester. 1999. A complex clathrate structure showing bimodal guest hydration. *Nature* 397:420-423.

178. Ude, J. und M. Koch. 1994. *Die Zelle*. 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena.
179. Ulrich, A.S. and A. Watts. 1994a. Lipid headgroup hydration studied by ²H-NMR: a link between spectroscopy and thermodynamics. *Biophys. Chem.* 49:39-50.
180. Ulrich, A.S. and A. Watts. 1994b. Molecular Response of the Lipid Headgroup to Bilayer Hydration Monitored by H-²-NMR. *Biophys. J.* 66:1441-1449.
181. Vogel, A. ATR-FT-IR-Untersuchungen zur Lipidverankerung eines N-Ras-Peptides an Modellmembranen. 2001. Dipl./Leipzig. 1-77. Universität Leipzig.
182. Watts, A. 1998. Solid-state NMR approaches for studying the interaction of peptides and proteins with membranes. *BBA* 1376:297-318.
183. Weast, R.C. and M.J. Astle. 1980. Saturated salt solutions. *In* CRC handbook of chemistry and physics.
184. Weck, M., R. Fink, and H. Ringsdorf. 1997. Molecular Recognition via Hydrogen Bonding at the Air-Water Interface: An Isotherm and Fourier Transform Infrared Reflection Spectroscopy Study. *Langmuir* 13:3515-3522.
185. Wiese, A., M. Munstermann, T. Gutschmann, B. Lindner, H. Kawahara, U. Zahringer, and U. Seydel. 1998. Molecular mechanisms of polymyxin B Membrane interactions: Direct correlation between surface charge density and self-promoted transport. *J. Membr. Biol.* 162(2):127-138.
186. Wilson, K.J., P. Derreumaux, G. Vergoten, and W.L. Peticolas. 1989. Conformational Studies of Neuroactive Ligands 2. Solution-State Conformations of Acetylcholine. *J. Phys. Chem.* 93:1351-1357.
187. Winter, R. und F. Noll. 1998. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner, Stuttgart.
188. Woolf, T.B. and B. Roux. 1994. Conformational flexibility of o-phosphorylcholine and o-phosphorylethanolamine: A molecular dynamics study of solvation effects. *J. Am. Chem. Soc.* 116:5916-5926.
189. Wu, Y., K. He, S.J. Ludtke, and H.W. Huang. 1995. X-ray diffraction study of lipid bilayer membranes interacting with amphiphilic helical peptides: diphytanoylphosphatidylcholine with alamethicin at low concentrations. *Biophys. J.* 68:2361-2369.
190. Yamauchi, K., K. Doi, Y. Yoshida, and M. Kinoshita. 1993. Archaeobacterial lipids: highly proton-impermeable membranes from 1,2-diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *BBA* 1146:178-182.
191. Zhang, Y.P., R.N.A.H. Lewis, and R.N. McElhaney. 1997. Calorimetric and Spectroscopic Studies of the Thermotropic Phase Behavior of the n-Saturated 1,2-Diacylphosphatidylglycerols. *Biophys. J.* 72:779-793.

Erklärungen

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 22. April 03

Erklärung zur Bewerbung

Ich erkläre, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Dr. rer. nat. beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o. g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena, den 22. April 03

Publikationsliste

1. S.L. Grage, **D.R. Gauger**, C. Selle, W. Pohle, W. Richter, A.S. Ulrich:
The amphiphilic drug flufenamic acid can induce a hexagonal phase in DMPC: a ^{31}P and ^{19}F -NMR study.
Phys. Chem. Chem. Phys. **2** (2000) 4574-4579.
2. W. Pohle, C. Selle, **D.R. Gauger**, R. Zantl, F. Artzner, J.O. Rädler:
FTIR-spectroscopic characterization of a cationic lipid-DNA complex and its components.
Phys. Chem. Chem. Phys. **2** (2000) 4642-4650.
3. W. Pohle, **D.R. Gauger**, H. Fritzsche, B. Rattay, C. Selle, H. Binder, H. Böhlig:
FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds.
J. Mol. Struct. **563-564** (2001) 463-467.
4. D.R. Gauger, C. Selle, H. Fritzsche, W. Pohle:
Chain-length dependence of the hydration properties of saturated phosphatidylcholines as revealed by FTIR spectroscopy.
J. Mol. Struct. **565-566** (2001) 25-29.
5. W. Pohle, C. Selle, **D.R. Gauger**, K. Brandenburg:
Lyotropic phase transitions in phospholipids as evidenced by small-angle synchrotron X-ray scattering.
J. Biomol. Struct. & Dynam. **19** (2001) 351-364
6. D.R. Gauger, C. Selle, M. Hahn, W. Pohle:
Defining the water content in oriented lipid films by Karl-Fischer titration.
Analytical Biochemistry **299** (2001) 108-110
7. W. Pohle, **D.R. Gauger**, U. Dornberger, E. Birch-Hirschfeld, C. Selle., A. Rupprecht, M. Bohl:
Hydration of biological molecules: lipids versus nucleic acids.
Biopolymers (Biospectroscopy) **67** (2002) 499-503
8. D.R. Gauger, H. Binder, A. Vogel, C. Selle, W. Pohle:
Comparative FTIR-spectroscopic studies of the hydration of diphytanoylphosphatidylcholine and -ethanolamine.
J. Mol. Struct. **614** (2002) 211-220
9. W. Pohle, **D.R. Gauger**, M. Bohl, E. Mrazkova, P. Hobza:
Lipid Hydration: Headgroup CH Moieties are Involved in Water Binding.
Biospectroscopy, im Druck

Berichte, Tagungsbeiträge und in Journalen veröffentlichte Abstracts

- a) D.R. Gauger, C. Selle, W. Pohle, M.H.J. Koch: Comparative X-ray diffraction study of diphytanoylphosphatidylcholine and -ethanolamine under different states of hydration. HASYLAB Jahresbericht 1999, Annu. Rep. 2 (H. Bartunik, V. Lamzin, M. Wilmanns, H. Schulte-Schrepping, Eds.), 373-374.
- b) C. Selle, R.N.A.H. Lewis, W. Pohle, **D.R. Gauger**, M.H.J. Koch: Phase behaviour of *sn*-2-(2-alkyl)-DPPC analogues. HASYLAB Jahresbericht 1999, Annu. Rep. 2 (H. Bartunik, V. Lamzin, M. Wilmanns, H. Schulte-Schrepping, Eds.), 391-392.
- c) D.R. Gauger, C. Selle, W. Pohle: Neutron scattering on differently hydrated lipid assemblies. BENSC Experimental Reports 1999 (Y. Kirschbaum, A. Möller, R. Michaelsen, Eds.), 257.
- d) D.R. Gauger, C. Selle, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, M.H.J. Koch, W. Pohle: Hydration-dependent phase behavior of two related glycolipids derived from *Acholeplasma laidlawii* B. HASYLAB Jahresbericht 2000 (ohne SZ, aber im Netz aufrufbar).
- e) D.R. Gauger, W. Pohle, M.H.J. Koch, C. Selle: Spectroscopic and X-ray diffraction studies of the hydration of diphytanoyllecithins and -cephalins (Abstract). Europ. Biophys. J. **29** (2000) 289 (3A-7).

Wissenschaftliche Vorträge:

- 04.00 SFB Jahrestagung Bad Kösen: "Hydratisierungsverhalten von gesättigten Phosphocholinen in Abhängigkeit von der Kettenlänge"
- 06.01 University of Alberta, Dep. of Biochemistry, Edmonton: "FTIR-spectroscopic Studies of the Hydration of MGDG and DGDG"
- 07.01 University of British Columbia, Dep. of Biochemistry & Molecular Biology, Vancouver: "FTIR-spectroscopic Study of a Lipid-DNA-Complex"

Erklärung über eigene Beiträge zu den Veröffentlichungen und Manuskripten

- zu 1.) Die Röntgenbeugungs-Messungen und die Bearbeitung der Daten stammen zur Hälfte von mir.
- zu 2.) Die Auswertung, Bildung der Differenzspektren und die graphische Darstellung der IR-spektroskopischen Untersuchungsergebnisse wurden von mir durchgeführt.
- zu 3.) Alle Messungen, Auswertungen und Darstellungen der Ergebnisse wurden von mir durchgeführt.
- zu 4.) Die IR-spektroskopischen Messungen, die Auswertung, Berechnung und Darstellung der Ergebnisse wurden alle von mir durchgeführt.
- zu 5.) Die Röntgenbeugungs-Messungen von DPPC und die Auswertung und Darstellung dieser Daten stammen von mir.
- zu 6.) Alle Messungen, Auswertungen und Abbildungen wurden von mir bearbeitet.
- zu 7.) Die Messungen, Auswertungen und Darstellungen der IR-spektroskopischen Untersuchungsergebnisse der Lipide DCPC und DCPE sind von mir.
- zu 8.) Alle Messungen mit FTIR-Spektroskopie und Karl-Fischer-Titration, Auswertungen und Darstellungen wurden von mir bearbeitet.
- zu 9.) Die experimentellen Daten zu MePC und PC-Lipiden, die in dieser theoretischen Arbeit zu Vergleichszwecken herangezogen werden, stammen von mir.

- zu a) Alle Messungen und Auswertungen wurden von mir durchgeführt.
- zu b) Ein Teil der Messungen wurde von mir durchgeführt.
- zu c) Alle Messungen und Auswertungen stammen von mir.
- zu d) Die Röntgenbeugungsuntersuchungen wurden von mir aufgenommen und ausgewertet.
- zu e) Alle Messungen und Auswertungen wurden von mir ausgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Fritzsche möchte ich für das Vertrauen danken, mir die Bearbeitung dieses Themas zu überlassen und für alle Unterstützungen, Anregungen und Freiheiten während der ganzen Zeit.

Herrn Dr. Pohle danke ich für seine freundliche Unterstützung. Er war ein wichtiger Diskussionspartner für alle Fragen.

Frau Prof. Ulrich möchte ich danken, mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir wertvolle Tipps zu Fragen dieser Arbeit gegeben zu haben.

Herrn Dr. Selle danke ich für einen guten Start im "Lipidmilieu" und im SFB.

Frau Scheiding danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und ermutigenden Worte. Dafür danke ich auch allen Kollegen: den Herren Dr. Walter, Dr. Gollmick, Dr. Flemming, DP Dürr, Dr. Dornberger und Frau Dr. Fandrei.

Großer Dank gilt Herrn PD Dr. Binder. Er gab mir die Möglichkeit, bei ATR- / IR-LD-Messungen in seinem Labor zu assistieren und führte gravimetrische Messungen an meinen Lipiden durch. Außerdem trug er durch anregende Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn DP Vogel danke ich für die Überlassung von nützlicher Software rund um den COG und die freundschaftliche Atmosphäre auf diversen SFB-Tagungen, für die ich auch allen anderen Mitgliedern des SFB an dieser Stelle danken möchte.

Herrn Dr. Richter möchte ich für die Möglichkeit danken, in seinem Labor bei der Herstellung und Vermessung elektronenmikroskopischer Gefrierbruchpräparate assistieren zu dürfen und für die Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Dr. Lewis und Herrn Prof. McElhaney danke ich für die Überlassung von Glykolipiden aus ihren *Acholeplasma laidlawii* -Kulturen und die Möglichkeit, diese Substanzen auch in ihrem Labor mit der DSC zu vermessen und die Ergebnisse zu diskutieren.

Herrn Prof. Cullis und Herrn Dr. Ansell danke ich für die Überlassung von DOTMA und anregende Diskussion meiner Daten.

Dem SFB danke ich für das kooperative Umfeld und die Finanzierung meines Kanadaaufenthalts.

Herrn Dr. Koch danke ich für seine freundliche Unterstützung bei den Röntgenbeugungsmessungen am DESY. Dem HASYLAB möchte ich für die Finanzierung dieser Messaufenthalte danken.

Herrn Dr. Hauß gilt mein Dank für alle Hilfestellungen bei der Neutronenstreuung am Hahn-Meitner-Institut. Dem BENSC möchte ich für die Finanzierung der Messaufenthalte danken.

Herrn Dr. Hahn danke ich für die Betreuung der Soft- und Hardware rund um die Karl-Fischer-Titration und Herrn Dr. Hartmann für das gleiche bei der IR-Spektroskopie.

Herrn Prudlow danke ich für die Bekämpfung aller Probleme rund um die Computer.

Herrn Michel, Herrn Keller und Herrn Blochberger danke ich für diverse Bastel- und Reparaturarbeiten.

Meinem Freund Ulf und meinen Eltern möchte ich für ihre Geduld, Unterstützung und alle Blitzableitungen herzlich danken.

Lebenslauf

Name: Dorit Gauger
Geburtsdatum und –ort : 13. Januar 1974, Jena
Nationalität : deutsch

1980-1982 POS Erich Weinert, Jena
1982-1990 POS Adolf Reichwein mit erweitertem Russischunterricht,
Jena
1990-1992 Staatliches Gymnasium Am Anger, Jena

1992-1998 Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
1996-1998 Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie
03. Nov. 1998 Diplom

seit 04. Jan. 99 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Promotion am Institut für
Molekularbiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

09. Juni - 05. Juli 2001 Forschungsaufenthalt in Kanada mit den Mitteln des
jährlichen Nachwuchs-Preises des SFB 197

Jena, 22. April 03