

**Asymmetrische Bischicht-Bildung durch Zusammenfügen
zweier Monoschichten**
Wissenschaftliche Grundlagen und technologische Anwendungen

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
(Dipl.-Ing.) Marcel Vrânceanu
aus Iași, Rumänien

Referent: Prof. Dr.-Ing. habil. Hermann Nirschl
Korreferent: Prof. Dr.-Ing. Heike P. Schuchmann
Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2011

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Carl Gustav Carus-Institut in Kollaboration mit dem Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik des Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

„Es ist nicht wenig Zeit, die wir haben,
sondern
es ist viel Zeit, die wir nicht nutzen.“

(Lucius Annaeus Seneca)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld vieler Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im Folgenden herzlich bedanken möchte.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl, danke ich ganz herzlich für die offene Aufnahme als externer Doktorand in seinen Arbeitskreis, für die stets gewährte große forschersische Freiheit, für die Ermutigung und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Ich danke Herrn Dr. Gero Leneweit für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, für sein Vertrauen und seine stete Unterstützung, die die vorliegende Arbeit erst ermöglicht hat. Herr Leneweit hat mit sehr viel Engagement und Interesse meine Arbeit betreut und war jederzeit ein hervorragender Gesprächs- und Diskussionspartner, offen für alle neuen Ideen und Gedankengänge! Außerdem danke ich ganz herzlich für seine Geduld, sein Interesse und seine Unterstützung, die für mich so wichtig beim Erlernen der deutschen Sprache waren, und für alle Seminar- und Diskussionsgelegenheiten, die mir eine vielseitige Entwicklung ermöglicht haben.

Prof. Dr.-Ing. Heike P. Schuchmann danke ich für ihr Interesse an der Arbeit und die freundliche Übernahme des Korreferats.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. Karin Schleisiek für die vielen wertvollen Diskussionen und Anregungen danken. Herrn Dominik Fischer danke ich für die Vorarbeit bei die Walzenanlage, für die Kryo-Transelektronenmikroskopischen Bilder der Liposomen und für die Freundschaft.

Ich danke Raluca Popa für die Zusammenarbeit im Labor, insbesondere bei der Durchführung der FRET-Experimente und der Experimente mit der Walzen-Anlage. Ein besonderer Dank auch für Ihr Verständnis, Ihre Geduld und Liebe.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an die ehemaligen Zivildienstleistenden Dirk und Sven Nestl, Walter Oswald und Ralf Augenstein für die selbständige und ausgezeichnete Mitarbeit im Labor, insbesondere bei der Mitarbeit in der Durchführung der Tropfenaufrall-Experimente. Nicoleta Terinte möchte ich für ihre Mitarbeit in der Durchführung von Experimenten zum Tropfenaufrall und zur Bishichtasymmetrie danken.

Herrn Gero Leneweit, Frau Christine Samstag, Herrn Dominic Scheider, Herrn Alican Sahan und Herrn Aljoscha Birkenberg danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei meinem Kampf mit der deutschen Rechtschreibung.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) Stefan Nikolaus und Herrn Peter Wandrés danke ich sehr für die Hilfe bei Aufbau, Fertigung und Beschaffung mechanischer Teile.

Für das angenehme Arbeitsklima danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Carl Gustav Carus-Instituts. Meinen Kollegen am MVM danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, insbesondere während der Wanderseminare im Allgäu.

Herrn Dr. habil. Reinhard Miller, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenwissenschaften (D-Golm) und Herrn Dr. Alexander V. Makievski, Sinterface Technologies (D-Berlin), danke ich für die wertvollen Diskussionen zu theoretischen Grundlagen der Tropfenprofil-Messmethode.

Für die großzügige Überlassung von Phospholipiden danke ich der Firma Lipoid GmbH, Ludwigshafen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, LE 1119/3-1,2 und LE 1119/6-1) für die Finanzierung meiner Arbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir in allen Situationen eine stete Unterstützung waren und dadurch entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Alexandrina Samson möchte ich für die beidseitige moralische Unterstützung und Ermutigung während der Jahre der Studien- und Doktorarbeit ein ganz herzliches Dankeschön sagen.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Roselies Gehlig, Dr. Sebastian Jäger, Familie Nikolaus und Familie Samstag, die stets freundlich und hilfsbereit waren, ebenso meinen lieben Vermietern, Kunigunde und Martin Hausmann, die mir eine zweite Familie in Deutschland geschenkt haben.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Peer-review Veröffentlichungen:

1. **Vrânceanu M**, Winkler K, Nirschl H, Leneweit G. **2007**. Surface rheology of monolayers of phospholipids and cholesterol measured with axisymmetric drop shape analysis. *Colloids and Surfaces A* 311: 140-153.
2. **Vrânceanu M**, Winkler K, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Surface Rheology and Phase Transitions of Monolayers of Phospholipid/Cholesterol Mixtures. *Biophysical Journal* 94 (10): 3924-3934.
3. **Vrânceanu M**, Winkler K, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Influence of the monolayers composition on bilayer formation during oblique drop impact on liquids. *Progress in Colloid and Polymer Science* 134: 80–89.
4. Popa R, **Vrânceanu M**, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Entrance Effects at Nanopores of Nanocapsules Functionalized with Poly(ethylene glycol) and Their Flow through Nanochannels. *Langmuir* 24 (22): 13030-13036.
5. **Vrânceanu M**, Winkler K, Köhler R, Leneweit G. **2009**. Kolloidale Strukturbildung beim Tropfenaufrall in einem pharmazeutischen Strömungsverfahren. In: *Die Mistel in der Tumorthherapie 2. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*, Editor R. Scheer, KVC-Verlag, Essen.
6. **Vrânceanu M**, Terinte N, Nirschl H, Leneweit G. **2011**. Asymmetric or symmetric bilayer formation during oblique drop impact depends on rheological properties of saturated and unsaturated lipid monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 354: 45-54.
7. **Vrânceanu M**, Popa R, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2011**, Effect of PEG-2000 on the phase transitions of phospholipid/cholesterol bilayers. A fluorescence resonance energy transfer study. **In Vorbereitung**.

Tagungspublikationen, Präsentationen und Posterbeiträge:

1. **Vrânceanu, M**, Leneweit G, Winkler K, Nirschl H. **2006**. Surface Rheology of Membrane Lipids Measured with Axisymmetric Drop Shape Analysis. In: *Workshop der Deutschen Rheologischen Gesellschaft: "Microrheology and Rheological Phenomena in Microfluidics"*, Karlsruhe, 4-5 Oktober 2006. (Präsentation)
2. **Vrânceanu M**, Leneweit G, Winkler K, Nirschl H. **2007**. Dynamics of monolayers and bilayer formation during drop impact on fluids. *The International Congress on Particle Technology: PARTEC 2007*, Nürnberg, 26-29 März 2007. (Poster)
3. **Vrânceanu M**, Leneweit G, Winkler K, Nirschl H. **2007**. Dynamics of monolayers and bilayer formation during drop impact on fluids. *Proceedings of the International Congress on Particle Technology: PARTEC 2007*, Nürnberg. (Tagungspublikation)

4. Fischer D, **Vrânceanu M**, Leneweit G, Winkler K, Nikolaus S, Nirschl H. **2007**. Fluorescence Methods for Characterization of Liposomes. *The International Congress on Particle Technology: PARTEC 2007*, Nürnberg, 26-29 März 2007. (Präsentation)
5. Fischer D, **Vrânceanu M**, Leneweit G, Winkler K, Nikolaus S, Nirschl H. **2007**. Fluorescence Methods for Characterization of Liposomes. *Proceedings of the the International Congress on Particle Technology: PARTEC 2007*, Nürnberg. (Tagungspublikation)
6. **Vrânceanu M**, Winkler K, Nirschl H, Leneweit G. **2007**. Influence of the monolayers composition on bilayer formation during oblique drop impact on liquids. *43rd Biennial Meeting of the German Colloid Society*, Mainz, 8-10 October 2007. (Präsentation)
7. **Vrânceanu M**, Winkler K, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Surface Rheology and Phase Transitions of Monolayers of Phospholipid/cholesterol Mixtures. *16th International Biophysics Congress (IUPAB) and 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society*, Long Beach, California, USA, 2-6 Februar 2008; *Biophysical Journal*, **94**, 317. (Poster)
8. **Vrânceanu M**, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Rheologie von Lipidmonoschichten und ihr Einfluss auf die dynamische Bildung von Bilschichten. *DECHEMA Fachausschuss*, TU München, Freising, 10-12 März 2008. (Präsentation)
9. Popa R, **Vrânceanu M**, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Tensile strength of nanocapsules functionalized with poly(ethylene glycol) and wall interactions during flow through nanochannels. *μ Flu08 - The 1st European Conference on Microfluidics*, Bologna, Italy, 10-12 December 2008. (Poster)
10. Popa R, **Vrânceanu M**, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2008**. Tensile strength of nanocapsules functionalized with poly(ethylene glycol) and wall interactions during flow through nanochannels. In: *Proceedings of the 1st European Conference on Microfluidics (μ Flu08)*, Bologna, Italy. (Tagungspublikation)
11. **Vrânceanu M**, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2009**. Bilayer and multilayer formation during drop impact on lipid monolayers. KIT PhD Symposium, Karlsruhe, 18.03.2009 (Präsentation)
12. Badarau N, **Vrânceanu M**, Nikolaus S, Nirschl H, Leneweit G. **2009**. Leaflet asymmetry and lipid phase transitions in liposomes using fluorescence techniques. *EBSA 2009 European Biophysics Congress*, Genoa, Italy, 11-15 July 2009. (Poster)

Symbolverzeichnis

Lateinische Buchstaben

A	Fläche
A_{mol}	Molekulare Fläche
a	dimensionslose Amplitude der harmonische Flächen-Oszillation
A_0	Initiale Tropfenoberfläche
a_1	Amplitude der Haupt Frequenz f
a_2, a_3, \dots, a_n	Amplitude der Swingungen höherer Ordnungen der Fourier-Serien.
b	Ordinatenabschnitt
c_x, c_z	Umwandlungsfaktoren der Pixel der Digitalkamera in die horizontale und vertikale Richtung
D	Tropfendurchmesser
E	komplexwertiger Elastizität-Modulus
EE	Einkapselungseffizienz des Calceins
Ei	Elastizitätsmodul (Schubmodul) jeder Feder i
F	Fouriertransformations-Operator
f	Frequenz der harmonische Oszillation
H_0	Null-Hypothese (Nicht-Existenz einer Korrelation)
k, k_1 und k_2	Relaxationszeit-Konstante, Frequenzkonstanten
K_b	Bischoicht-Biegemodul
l	Länge der Feder
m	Steigung einer linearen Regression
n	Nummer der unabhängigen Messdaten
p	Anpressdruck zwischen zwei Walzen
p	Wahrscheinlichkeit der Hypothese H_0 (t-Test)
R	Radius einer planaren kreisförmigen Bischoicht
R_0	Förster-Radius
R^2	Korrelationskoeffizient der zugehörige (meist linearen) Regression
T	Temperatur
t	Zeit
THD	Summe der harmonischen Störungen (Total Harmonic Distortion)
T_m	Gel/flüssigkristalliner Haupt-Phasenübergang eines Lipids
$t_{p,n}$	Distributionsfunktion des t-Test
W_a	Fluoreszenzintensität des Calceins im Außenraum der Liposomen
W_i	Fluoreszenzintensität des in Liposomen eingekapselten Calceins
x_C	Cholesterolgehalt
u	Tropfenaufprallgeschwindigkeit

Griechische Buchstaben

Π	Filmdruck
σ	Oberflächenspannung
σ_0	Oberflächenspannung der reinen Subphase (Wasser)
η	Oberflächen-Dehnungviskosität
ε	Dynamische Oberflächenelastizität

ω	Kreisfrequenz
β	Partitionsfaktor zwischen k_1 und k_2
α	Tropfenaufprallwinkel
ρ	Dichte
ν	kinematische Zähigkeit
τ	Schubspannung
τ_0	Fliessgrenze
ε_i	Elastizitäts-Modul
τ_i	Relaxationszeit eines Feder/Stoßdämpfer-Paares
σ_L	Oberflächenspannung einer Lipid-Monoschicht
λ_p	Linienspannung am Umfang der planaren Bilschicht
x	Federdeformation
γ	Deformation
$\dot{\gamma}$	Deformationsgeschwindigkeit
φ	Phasenwinkel zwischen der harmonischen Flächenoszillation und der Reaktion der Oberflächenspannung

Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskopie („atomic force microscopy“)
A	Akzeptor (bei FRET)
ADSA	Achsensymmetrische Tropfenform-Analyse („axisymmetric drop shape analysis“)
CC	kondensierte Komplexe (condensed complexes)
D	Donor (bei FRET)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
F_D^D, F_{D+A}^D F_A^A, F_{D+A}^A $F_A^{FRET}, F_{D+A}^{FRET}$	Abkürzungen für FRET-Messungen. Siehe Tabelle 2.4 auf Seite 94
G	Gasanaloger Zustand
<i>Gel</i>	Gel-Phase
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
Indizes:	Indizes für: DPPC, DOPC, DOPM, Cholesterol
<i>P, O, M, C</i>	Indizes für: Zweikomponentenmischungen:
<i>PC, OC, MC</i>	DPPC:Cholesterol, DOPC:Cholesterol und DMPC:Cholesterol
LC	Flüssigkondensierter Zustand
LE	Flüssigexpandierter Zustand
l_d	Flüssig-ungeordnete Phase
l_o	Flüssig-geordnete Phase
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PAT	Profilanalyse-Tensiometer („Profile Analysis Tensiometer“)
PCS	Photonen-Korrelationsspektroskopie
PCTE	Polycarbonat
S	fester Zustand
S.D.	Standardabweichung

Substanzen:

Chol.	Cholesterol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin 1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DiC15 PC	1,2-Dipentadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
LRH-PE	[Lissamine™ rhodamin B 1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3- Phosphoethanolamin Triethylammonium-Salz]
Na-Dithionit	Natrium-Dithionit
NaN ₃	Natriumazid
NBD-PE	[N- (7-Nitrobenz-2-oxa, 1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3- Phosphoethanolamin Triethylammonium-Salz]
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
SPC	L- α -Phosphatidylcholine (Soja)

Dimensionslose Kennzahlen

We Weber-Zahl

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Motivation der Arbeit	1
1.2	Die tierische Zelle	2
1.3	Phospholipide	3
1.4	Lipid-Monoschichten	4
1.5	Lipid-Bischichten: Liposomen	5
1.6	Bischichtbildung durch Zusammenfügen zweier Monoschichten	6
1.7	Charakterisierung von Monoschichten und Bischichten	8
1.7.1	Oberflächenrheologie von Lipiden	8
1.7.2	Phasentrennungen in Lipid-Bischichten und biologischen Membranen	9
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	13
2.1	Oberflächenrheologie der Monoschichten - gemessen mit einem Tropfenprofil-Tensiometer	13
2.1.1	Theorie	16
2.1.2	Oberflächenrheologische Messungen	20
2.1.2.1	Kalibrierung des Tensiometers	22
2.1.2.2	Auftrag von Lipid-Monoschichten	23
2.1.2.3	Messbedingungen	24
2.1.3	Abhängigkeit von η und ε von der Frequenz und Amplitude der Oszillation	24
2.1.4	Abhängigkeit von η und ε vom Filmdruck	31
2.1.5	Diskussion	37
2.1.6	Zusammenfassung	43
2.2	Oberflächenrheologie und Phasenübergänge der Phospholipide / Cholesterol Monoschichten	45
2.2.1	DPPC/Cholesterol Mischungen	45
2.2.2	DMPC/Cholesterol Mischungen	51
2.2.3	DOPC/Cholesterol Mischungen	57
2.2.4	Zusammenfassung	60
2.3	Asymmetrische und symmetrische Bischichtbildung beim Aufprall eines Tropfens	62
2.3.1	Materialien und Methoden	62
2.3.1.1	Materialien	62
2.3.1.2	Methode	64
2.3.2	Ergebnisse	68
2.3.2.1	Die Ausbreitung des aufprallenden Tropfens auf der Zielflüssigkeitsoberfläche	68
2.3.2.2	Nachweis der Bischicht- oder Multischichtbildung unter der Tropfenflüssigkeit	69
2.3.2.3	Tropfenaufprall auf Monoschichten aus verschiedenen Zweikomponentenmischungen mit entweder gesättigten (DPPC) oder ungesättigten (DOPC) Phospholipiden mit Cholesterol	72
	Tropfenaufprall auf gesättigte Monoschichten	72
	A. Monoschichten aus DPPC mit 60 Mol% Cholesterol	72
	B. Monoschichten aus DPPC mit 33 Mol% Cholesterol	74

	C. DPPC-Monoschichten ohne Cholesterol	74
	Tropfenaufprall auf ungesättigte Monoschichten	76
	A. Monoschichten aus DOPC mit 60 Mol% Cholesterol	76
	B. DOPC-Monoschichten ohne Cholesterol	77
2.3.3	Diskussion	79
2.3.3.1	Rheologische Eigenschaften der Monoschichten	79
2.3.3.2	Besonders helle Areale	82
2.3.3.3	Bischichtbildung	83
2.3.3.3.1	Symmetrische Bischichtbildung	83
2.3.3.3.2	Asymmetrische Bischichtbildung	84
2.3.4	Zusammenfassung	86
2.4	Neuartige Erzeugung von Liposomen durch geschichtete dünne Filme	87
2.4.1	Technologisches Konzept	87
2.4.2	Ziele	88
2.4.3	Schichtdicken-Inhomogenitäten	88
2.4.4	Konventionelle Herstellung der Liposomen mit der Lipidfilm-Methode	90
2.4.5	Fluoreszenzmethoden zum Nachweis einer Bischicht-Asymmetrie	91
2.4.6	Größenverteilungen der Liposomen	94
2.4.7	Einkapselungseffizienz	96
2.4.8	Extrusionsbedingungen	99
2.4.9	Zusammenfassung	99
2.5	Bischichten Phasenübergänge mittels FRET	101
2.5.1	Materialien und Methoden	105
2.5.1.1	Proben-Komposition und -Herstellung	105
2.5.1.2	Fluoreszenz (oder Förster) Resonanz Energie Transfer (FRET)	105
2.5.2	Ergebnisse und Diskussion	106
2.5.2.1	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Temperatur	107
2.5.2.2	Ergebnisse	109
2.5.2.3	Diskussion	113
2.5.2.3.1	Phasendiagramm	113
2.5.2.3.2	Mischbarkeit von Donor und Akzeptor	114
2.5.2.3.3	Regionen	116
2.5.2.3.4	Phasendiagramm – Diskussion	122
2.5.2.3.5	Kondensierte Komplexe (CC)	123
2.5.3	Zusammenfassung	125
3	ZUSAMMENFASSUNG	126
4	AUSBLICK	132
5	LITERATUR	133
6	ANHANG	143
7	WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG	144

1 EINLEITUNG

1.1 Motivation der Arbeit

Nanokapseln und Nanopartikel finden zunehmenden Einsatz in der Biotechnologie, insbesondere für die kontrollierte, zielgerichtete und nebenwirkungsarme Verabreichung von Wirk- oder Markierungsstoffen in medizinischen Therapie- oder Diagnoseverfahren.

In vielen modernen medizinischen Diagnose- oder Therapieverfahren werden Markierungs- bzw. Wirksubstanzen in partikulären Systemen eingeschlossen und in die menschliche Blutzirkulation eingeführt. Dadurch sollen eine Akkumulation im Zielgewebe (z.B. Tumoren, entzündetes Gewebe, Lymphknoten, etc.), eine kontrollierte Freisetzung aus den Partikeln mit länger anhaltender Wirkung („controlled release“) und in bestimmten Fällen eine selektive Aufnahme in bestimmte Zellen (z.B. Tumorzellen, dendritische Zellen, etc.) erreicht werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Herstellung von Liposomen, die im Vergleich mit anderen verfügbaren Techniken eine effizientere Wirkstoffeinkapselung haben. Um deren funktionelle Eigenschaften spezifisch einstellen zu können, sollte die Liposomen-Bischoicht asymmetrisch sein. Das bedeutet, dass die Lipidkomposition der beiden Monoschichten frei wählbar sein soll. Dafür wird die Bildung asymmetrischer Lipid-Bischoichten mit freigewählter Lipidkomposition der beiden Monoschichten untersucht. Zwei verschiedene Lipid-Monoschichten werden mit Hilfe zweier Flüssigkeitsoberflächen beim Aufprall eines Tropfens oder alternativ durch zwei rotierende Walzen in einem innovativen Verfahren in Kontakt gebracht. Asymmetrische Lipid-Bischoichten bilden Liposomen, deren Bischoicht (Membranschale) in ihrer Innen- und Außenseite aus zwei unterschiedlichen Komponenten bestehen.

Da für die Bischoicht-Bildung aus zwei Monoschichten die mechanischen Eigenschaften der Monoschichten sehr wichtig sind, wurden die Oberflächenelastizität und Viskosität der Monoschichten verschiedener Lipidmischungen mit Hilfe eines Tropfenkontur-Tensiometers gemessen. Die mechanischen und physikochemischen Eigenschaften ergeben sich aus der Lipid-Zusammensetzung der Kapselschale; sie sind insbesondere vom Cholesterolgehalt und vom Vorhandensein von Phospholipiden mit gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren abhängig. Mit zunehmendem Cholesterolgehalt nimmt die rasche Elimination der Kapseln durch Phagozytose in der Leber ab [Moghimi & Patel, 1998]. Die verlängerte Zirkulation von Nanokapseln mit hohem Gehalt an Cholesterolgehalt und gesättigten Fettsäuren wird auf die höhere mechanische und enzymatische Stabilität zurückgeführt [Moghimi & Patel, 1998]. Ungesättigte Fettsäuren führen zu einer stärkeren Aktivierung der Komplementproteine als gesättigte [Chonn et al., 1991].

Abhängig von Lipidmischung und Temperatur zeigen die Bishichten verschiedene Phasentrennungen, die mit einer Fluoreszenzmethode: Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) untersucht wurden.

1.2 Die tierische Zelle

Was sind Bishichten und woher kommen sie? Um diese Frage zu beantworten, wird eine tierische Zelle betrachtet.

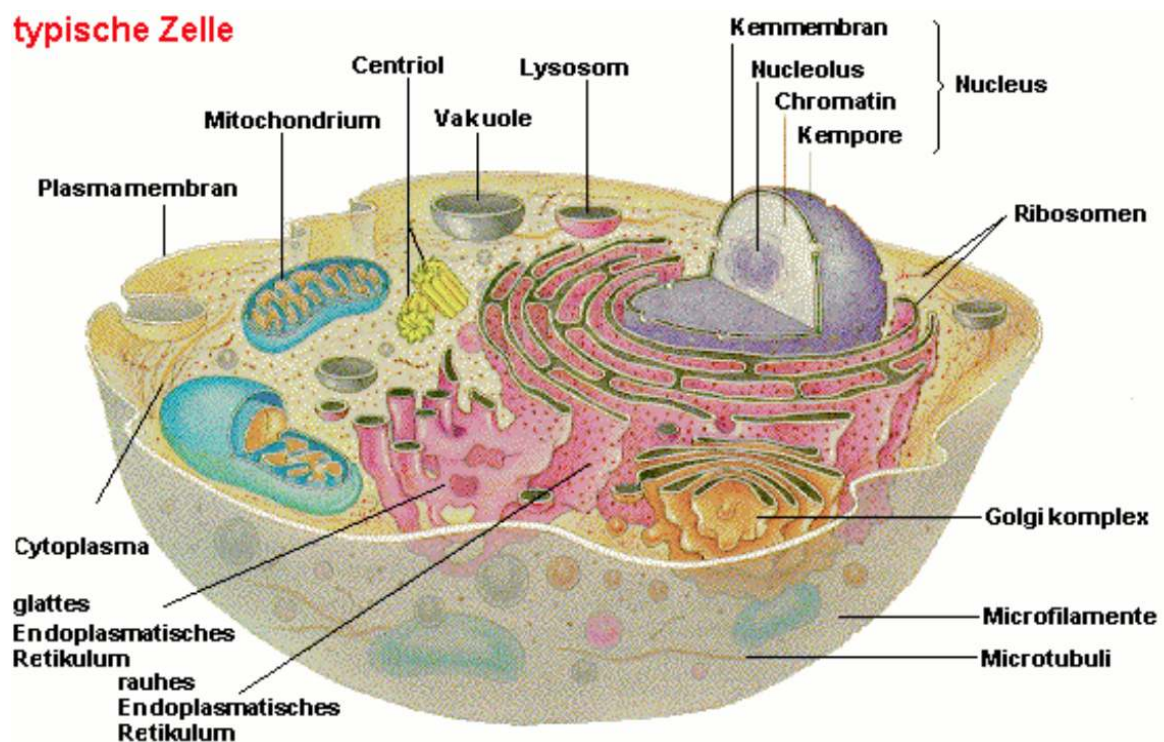


Abb. 1.1 Tierische Zelle [4, 2010, Woland, 2006]

Alle Membranen biologischer Zellen und ihrer Organellen sind Bishichten.

Das Innere einer tierischen Zelle ist durch Membranen in verschiedene Zwischenräume (Kompartimente) eingeteilt, siehe Abb. 1.1. Energie erzeugende Mitochondrien fallen auf, ebenso die gestapelten Membranen des glatten (Lipid erzeugenden) und rauhen (Protein erzeugenden) endoplasmatischen Reticulums. Der Golgi-Apparat verpackt Proteine in Vesikel, die durch die Plasmamembran geschleust werden sollen. Eine Kernhülle umschließt das Genmaterial der Zelle.

Biomembranen sind nur für kleine Moleküle wie Wasser, Kohlendioxid oder Sauerstoff durchlässig, die auf Grund von Unregelmäßigkeiten in der Lipid-Doppelschicht

durch die Membran diffundieren. Makromoleküle und größere Nahrungspartikel werden mit Hilfe eines Vesikelsystems transportiert.

1.3 Phospholipide

Die Bausteine einer Bilschicht sind die Phospholipid-Moleküle, die an der Wasser-Luft-Grenzfläche so genannte Monoschichten (monomolekulare Lipidschichten) bilden. Im Wasser schließen sich Phospholipidmoleküle zusammen und bilden Bilschichten oder Multischichten, aus denen sich uni- oder multilamellare Liposomen formen können. Phospholipid-Monoschichten (die Hälfte einer Bilschicht) sind ein vereinfachtes Modellsystem für die biologischen Membranen [Phillips, 1972], die bei der Untersuchung der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Lipiden und zwischen Lipiden und Proteinen [Möhwald, 1995] helfen.

Flüssiggrenzflächen mit Monoschichten sind für viele industrielle Prozesse sehr wichtig, weil diese kolloidale Dispersionen wie Emulsionen, Mizellen und Liposomen erzeugen können. Wenn zwei Monoschichten mit ihren hydrophoben Seiten in Kontakt kommen, kann sich aus den zwei Monoschichten eine Bilschicht bilden. Phospholipid-Bilschichten können sich in Liposomen umwandeln, welche als Arzneimittel-Vehikelsystem in Kosmetik und in der Krebs- und Genterapie eingesetzt werden [Torchilin & Weissig, 2003].

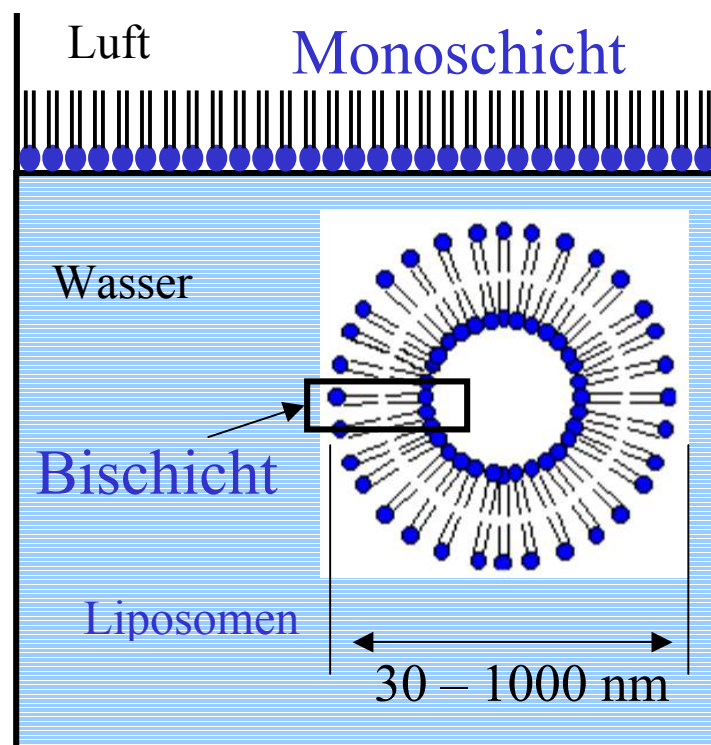


Abb. 1.2 Phospholipidmoleküle an der Wasser-Luft-Grenzfläche bilden Monoschichten und in Wasser Bi- oder Multischichten, die sich in Liposomen umwandeln können.

1.4 Lipid-Monoschichten

Wenn die Phospholipid Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche komprimiert ist, sinkt ihre Oberflächenspannung und steigt ihr Filmdruck. Der Filmdruck $\Pi = \sigma_0 - \sigma_L$ ist die Differenz zwischen der Oberflächenspannung σ_0 einer reinen Subphase (Wasser) und der mit einer Lipidmonoschicht σ_L . Die erste und einfachste Messmethode um Monoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche zu charakterisieren ist die Messung von Π , während die molekulare Fläche A_{mol} komprimiert wird. Die erzeugten Kurven sind so genannte Π/A_{mol} Isothermen. Klassisch werden Isothermen mit einer Langmuir Filmwaage gemessen. Hierbei wird die Oberflächenspannung der Monoschicht registriert, während die Oberfläche, die der Monoschicht zur Verfügung steht, durch eine bewegliche Barriere variiert wird. Eine verallgemeinerte Π/A_{mol} Isotherme ist in Abb. 1.3 dargestellt.

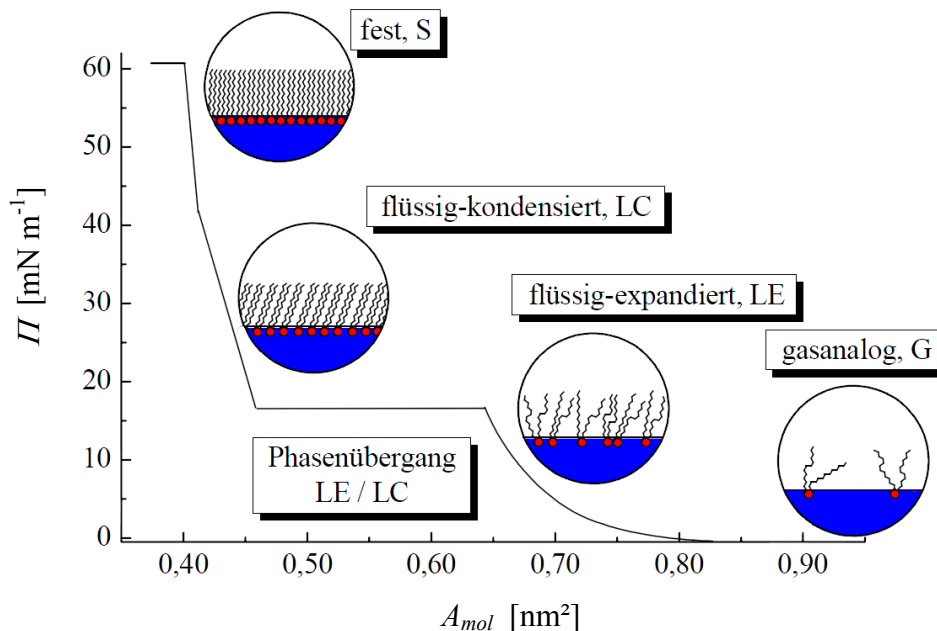


Abb. 1.3 Verallgemeinerte Π/A_{mol} Isotherme für Phospholipid Monoschichten [Kerth, 2003].

Die Π/A_{mol} Isothermen einer Monoschicht einer reinen Substanz sind ähnlich mit denen eines reinen Volumen-Stoffes. Die horizontalen Bereiche der Isothermen zeigen Zweiphasenregionen und somit die Phasenübergänge erster Ordnung; abrupte Änderungen der Steigungsraten zeigen Phasenübergänge zweiter Ordnung [Knobler, 1991]. Die allgemeinen physisch-thermodynamischen Zustände der Phospholipid Monoschichten, wie Gas (G), flüssigexpandiert (LE), flüssigkondensiert (LC) und fest (S) sind in Abb. 1.3 dargestellt.

Am Anfang der Kompression ist die Fläche pro Molekül groß und die Phospholipid-Moleküle liegen weit voneinander entfernt, so dass zwischen ihnen wenig Wechselwirkungen stattfinden. Das entspricht dem gasanalogen Zustand (G). Wenn die Fläche, die dem

einzelnen Molekül zur Verfügung steht, durch Kompression reduziert wird, wird der Abstand zwischen Molekülen kleiner und die intermolekularen Wechselwirkungen nehmen zu. Durch die Bildung der Monoschicht an der Wasseroberfläche wird eine Abnahme der Oberflächenspannung des Wassers und dadurch eine Zunahme des Filmdrucks der Monoschichten hervorgerufen, der aufgrund der Wechselwirkung zwischen Phospholipid-Molekülen und Molekülen der Wasseroberfläche entsteht.

Durch Kompression erfolgt der Übergang zur flüssig-expandierten (liquid expanded – LE) und flüssig-kondensierten Phase (liquid condensed - LC). Der Übergang zwischen den beiden flüssigen Phasen ereignet sich bei einem fast konstanten Filmdruck, d.h. einem Plateau der Isotherme. Dieses Plateau ist ein Nachweis für die Koexistenz zweier Phasen.

Wenn die LE-Phase vollständig in die LC-Phase umgewandelt ist, nimmt der Filmdruck stark zu und bei weiterer Abnahme der Fläche wird die Monoschicht in einen festen Zustand (S) umgewandelt. In diesem Zustand haben die Phospholipid-Moleküle eine starke Wechselwirkung miteinander und stehen mit den hydrophoben Ketten senkrecht auf der Flüssigkeitsoberfläche. Bei weiterer Kompression der S-Phase kollabiert die Monoschicht. Der Kollaps ist als ein Verschwinden der Zunahme des Filmdrucks bei weiterer Reduzierung der Fläche pro Molekül zu sehen.

Die Isothermen sind stark von der Temperatur abhängig, wobei die Temperatur nicht der einzige Faktor ist, der den Phasenübergang von LE zu LC beeinflusst. Die Anzahl der Kohlenstoffatome und der ungesättigten Doppelbindungen der hydrophoben Ketten haben einen starken Einfluss auf den Phasenübergang der Monoschichten. Phosphatidylcholine mit kleinen Fettsäureketten (≤ 12 Kohlenstoffatome) und viele mit ungesättigten Doppelbindungen haben eine kleine T_m (unterhalb von 0 °C) und zeigen deshalb bei physiologischen Temperaturen nur flüssig-expandierte Phasen, wogegen die mit längeren Ketten (mehr als 18-22 Kohlenstoffatome) eine hohe T_m haben und nur flüssig-kondensierte Phasen zeigen.

1.5 Lipid-Bischichten: Liposomen

Liposomen sind künstliche Vesikel, die die gleichen Bausteine wie die Zellmembranen haben, und zwar die Phospholipide.

Liposomen werden traditionell in der Pharmazie, Kosmetik und Lebensmittelindustrie eingesetzt und finden bereits heute in der Bio- und Nanotechnologie Verwendung und besitzen ein hohes Potential zukünftiger Anwendungen, was sich in vielfältigen Forschungsaktivitäten äußert [Torchilin & Weissig, 2003]. Der Einsatz von Liposomen ist jedoch bis heute hauptsächlich durch ineffiziente Herstellungstechniken limitiert. Bei nahezu allen Techniken werden Einkapselungseffizienzen von nur wenigen Prozent erreicht, die eine

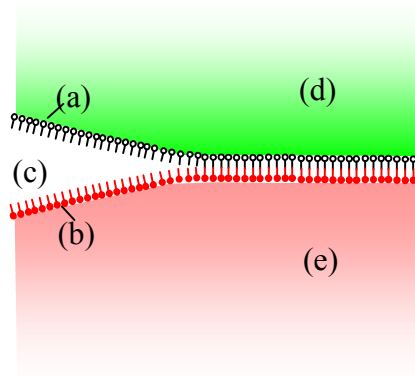


Abb. 1.5 Rekonstitution einer Bilschicht aus zwei Monoschichten auf Flüssigkeiten. (a), (b): Monoschichten; (c) Luft; (d), (e) getrennte Flüssigkeitsvolumina.

Zwei Phospholipid-Monoschichten werden mit Hilfe zweier Flüssigkeitsoberflächen beim Tropfenaufprall (siehe [Vrânceanu et al., 2007a, Vrânceanu et al., 2011]), oder mit Hilfe zweier rotierender Walzen bei einer kontinuierlichen Extrusionsanlage (siehe Abb. 1.6) in Kontakt gebracht.

Die neu gebildeten Bilschichten können asymmetrisch sein, wenn sie aus zwei verschiedenen Monoschichten entstehen. Mögliche Mechanismen für asymmetrische oder symmetrische Bilschichtbildung durch schrägen Tropfenaufprall auf Monoschichten sollen im Folgenden diskutiert werden. Wie in [Vrânceanu et al., 2008b] gezeigt ist, sind die rheologischen Eigenschaften der Monoschichten für die Bilschichtbildung sehr wichtig und bestimmen, ob sich symmetrische oder asymmetrische Bilschichten bilden. Deshalb wurden die rheologischen Eigenschaften der Monoschichten untersucht [Vrânceanu et al., 2007b, Vrânceanu et al., 2008a]. Rheologische Messungen zeigen den Einfluss von Filmdruck und Cholesterolgehalt auf die Oberflächendehnungselastizität und -viskosität der gesättigten und ungesättigten Phospholipid-Monoschichten.

Die Tropfenaufprall-Experimente zeigen unter welchen Bedingungen eine Bilschichtbildung zwischen zwei mit Lipid-Monoschichten bedeckten Flüssigkeiten beim schrägen Aufprall kleiner Tropfen auf eine Flüssigkeitsoberfläche möglich ist. Die gewonnenen Ergebnisse sind in einem nächsten Schritt auf einen Strömungsprozess in einem rotierenden System zu übertragen.

Bei der Walzenanlage wurde die Dicke und Homogenität aufgetragener dünner Flüssigkeitsfilme auf den Walzenoberflächen gemessen. Die Größenverteilungen der neu hergestellten Liposomen wurden mit Kryo-Transелектronenmikroskopie charakterisiert. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Bilschicht-Asymmetrie und die Wirkstoffeinkapselungseffizienz bestimmt.

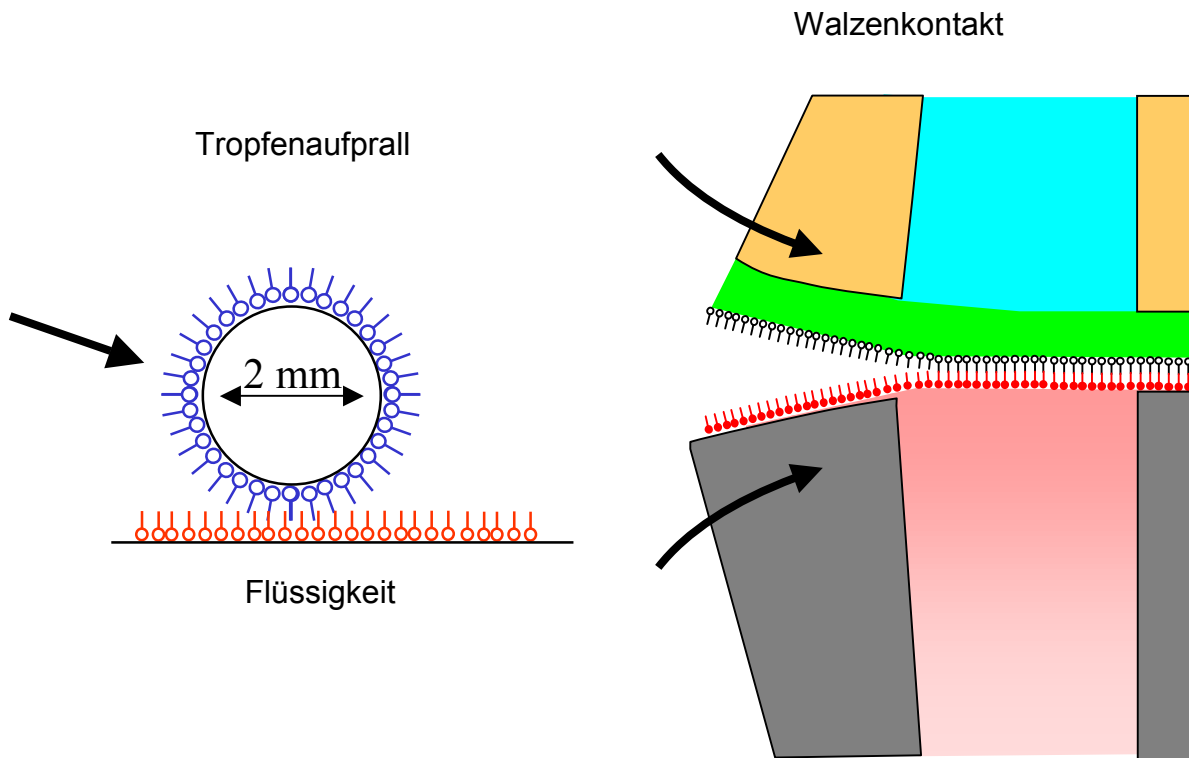


Abb. 1.6 Bilschichtbildung durch Zusammenfügen zweier Monoschichten mit Hilfe zweier Flüssigkeitsoberflächen beim Tropfenaufprall (links) beziehungsweise zweier rotierender Walzen (rechts).

1.7 Charakterisierung von Monoschichten und Bilschichten

1.7.1 Oberflächenrheologie von Lipiden

Aus den eigenen Untersuchungen zum Tropfenaufprall auf Flüssigkeiten mit monomolekularen Lipidschichten auf beiden Oberflächen wurde ersichtlich, dass die Oberflächenrheologie, d.h. Oberflächendehnungselastizität und -viskosität, einen sehr großen Einfluss sowohl auf den Strömungsprozess als auch die Formation von Bilschichten hat. Außerdem zeigten die eigenen Tropfenaufprall-Untersuchungen einen großen Unterschied zwischen gesättigten Phospholipiden, wie z.B. Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), und ungesättigten Phospholipiden, wie z.B. Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), und ihren jeweiligen Mischungen mit Cholesterol. Daher waren detailliertere Untersuchungen zur Oberflächenrheologie im Rahmen dieser Doktorarbeit notwendig. Mit Hilfe eines Tropfenkontur-Tensiometers sind die Dehnungselastizität und -viskosität der Monoschichten verschiedener Lipidmischungen untersucht und in zwei Publikationen [Vrânceanu et al., 2007b, Vrânceanu et al., 2008a] veröffentlicht worden.

Die rheologischen Eigenschaften, die Phasentrennung der nichtmischbaren Phasen und die Phasenübergänge der Phospholipide und deren Mischungen mit Cholesterol sind sehr

wichtig für das Verständnis der physiologischen Prozesse der Zellmembranen, wie z. B. die Membranfusion und -adsorption, die Endozytose, die Weitergabe von Signalen sowie den Lipid- und Protein-Transport (siehe [McIntosh et al., 2003] und deren Literaturhinweise). Außerhalb des Kontexts dieser Arbeit sind sie auch sehr wichtig für die Atmungsphysiologie, weil die flüssige Schicht auf der luftgefüllten Innenseite der Alveolen mit Monoschichten bedeckt ist, die zu ungefähr 90 % Phospholipide enthalten [Hamm et al., 1992]. In diesem Zusammenhang finden sich die bislang detailliertesten Untersuchungen zur Oberflächenrheologie von Phospholipiden und deren Auswirkungen für die Atmungseffizienz [Grigoriev et al., 2003, Wüstneck et al., 2001, Wüstneck et al., 1999a, Wüstneck et al., 1999b].

Zusätzlich beeinflusst die Oberflächenrheologie der Phospholipide die Eigenschaften von vielen Emulsionen wie die Emulsionsstabilität [Fillery-Travis et al., 1995], die Tropfendeformation und die Rheologie der Suspensionen [Li & Pozrikidis, 1997].

1.7.2 Phasentrennungen in Lipid-Bischichten und biologischen Membranen

Die Zellmembran ist nicht homogen, sondern zeigt Verdickungen, die in der englischen Literatur als „lipid rafts“ bezeichnet werden, und die sich durch eine veränderte Lipid- und Protein-Zusammensetzung von der restlichen Membran unterscheiden. Genauer über die Funktion der „lipid rafts“ weiß man noch nicht, es wird aber intensiv daran geforscht.

Durch Rasterkraftmikroskopie („atomic force microscopy“, AFM) wurden diese „lipid rafts“ entdeckt, da sie dicker als die Lipid Matrix in einer Bischicht sind, siehe Abb. 1.7. Die orangefarbenen Gipfel sind Proteine, die nur mit „lipid rafts“ assoziiert sind. Die „lipid rafts“ haben einen großen Cholesterol-Gehalt, der sie steifer macht.

Weil die physiko-chemischen Eigenschaften der Monoschichten und Bischichten ähnlich sind, sind Monoschichten und Bischichten aus Phospholipiden und Cholesterol viel im Kontext von Fragen der Zellphysiologie [McIntosh et al., 2003, Veatch et al., 2004] und künstlichen Bischichten [Veatch & Keller, 2002], wie Liposomen, untersucht worden. Analog zu den „lipid rafts“ der Zellmembranen, zeigen die künstlichen Bischichten – die Liposomen – so genannte „Domänen“, wie in den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen von [Veatch & Keller, 2003a] zu sehen ist (siehe Abb. 1.8). Die Domänen sind abhängig von der Lipidkomposition und der Temperatur und wurden im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe einer Fluoreszenzmethode (FRET) untersucht.

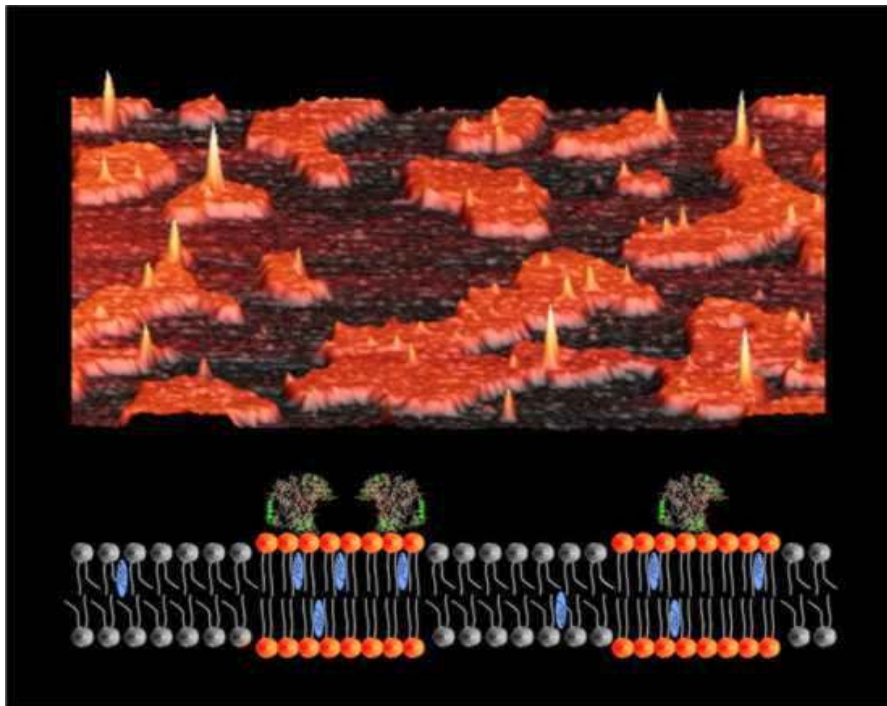


Abb. 1.7 Oben: Mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) gewonnene Bilder von [Saslowky et al., 2002], die so genannte „lipid rafts“ in einem künstlichen Modell einer Zellmembran visualisieren. Die orangefarbenen Inseln sind Sphingomyelin-„Rafts“ in einer Umgebung aus Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), die in der Konturdarstellung nahezu schwarz erscheint. Die Bilschicht wurde auf einer Glimmerplatte aufgebaut. Die gelben Gipfel zeigen ein Protein, das nur mit den Rafts assoziiert ist. Unten: eine Interpretation des oberen Bildes. DOPC ist durch graue, Sphingomyelin durch orangefarbige Kopfgruppen dargestellt. Cholesterol ist in beiden Lipiddomains integriert und durch blaue Einschlüsse zwischen den Fettsäureketten dargestellt.

Die Benutzung der Phospholipid/Cholesterol-Mischungen bei der Liposomenherstellung hat das Interesse für verschiedene Anwendungen in der Medizin geweckt. Es ist schon gezeigt worden, dass sowohl Bilschichten als auch Monoschichten Phasentrennungen mit nichtmischbaren Phasen aus unterschiedlichen Lipidmischungen aufweisen, die als mikrometrische, isolierte Domänen erscheinen. Viele Studien befassen sich mit Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche, da diese leicht mit Fluoreszenzmikroskopie und anderen Methoden (die Phasenübergänge visualisieren) beziehungsweise mit rheologischen Methoden zugänglich sind. Deren Korrelationen und Diskrepanzen zu Phasentrennungen in Bilschichten sind von einigen Autoren diskutiert worden [Stottrup et al., 2005, Veatch & Keller, 2002].

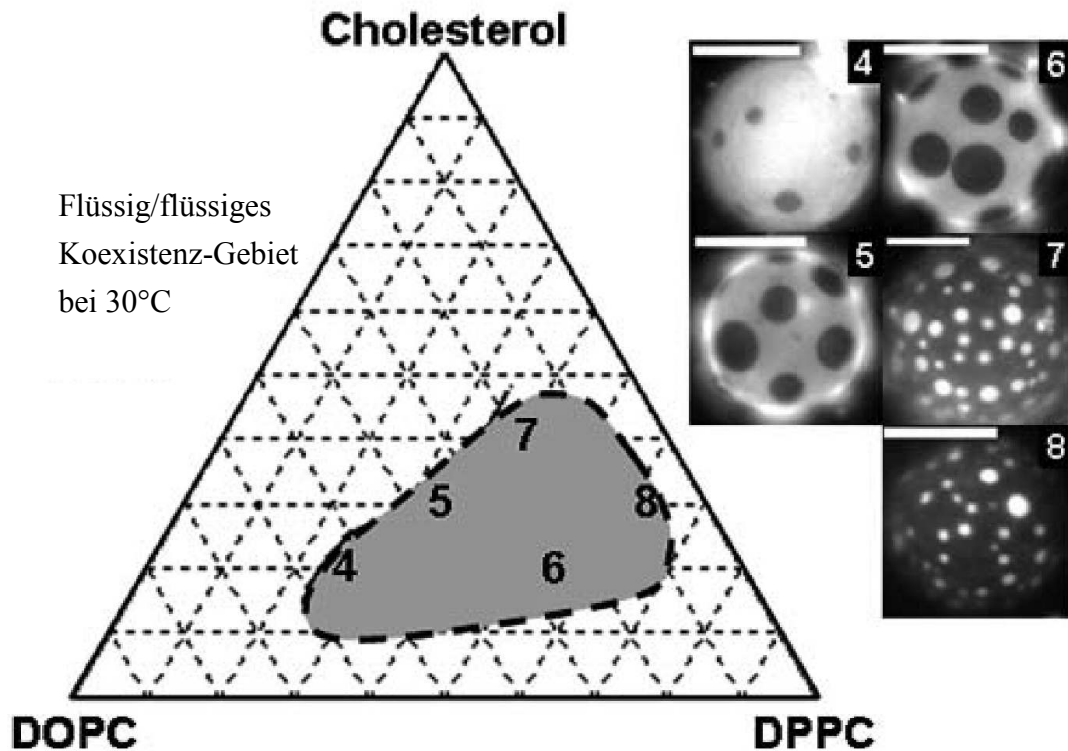


Abb. 1.8 Phasendiagramm und Fluoreszenz-mikroskopische Abbildungen von [Veatch & Keller, 2003a] von sehr großen Liposomen (sogenannte „giant unilamellar vesicles“, Größenmaßstab 20 μm), die flüssig-flüssig Domäne bei 30°C haben. Lipidmischungen: (4): 2:1 DOPC/DPPC 20 % Cholesterol; (5) 1:1 DOPC/DPPC 30 % Cholesterol; (6) 1:2 DOPC/DPPC 20 % Cholesterol; (7) 1:2 DOPC/DPPC 40 % Cholesterol; und (8) 1:9 DOPC/DPPC 30 % Cholesterol.

Phospholipid-Moleküle haben zwei Teile: einen hydrophilen polaren Kopfteil und einen hydrophoben Teil. Abhängig von der Größe ihrer polaren Kopfgruppe, der Sättigung der hydrophoben Ketten oder Abknickungen im Falle von ungesättigten Doppelbindungen, können membranbildende Phospholipide eine zylindrische oder kegelartige Raumstruktur haben.

Cholesterolemoleküle erhöhen die Dichte und die Stabilität der Bilschichten. Cholesterol und gesättigte Phosphatidylcholine haben eine hohe sterische, das heißt räumliche, Komplementarität (siehe Abb. 1.9) und kondensieren damit in so genannte flüssig-geordnete Phasen, die im Falle biologischer Membranen als „lipid rafts“ bezeichnet werden.

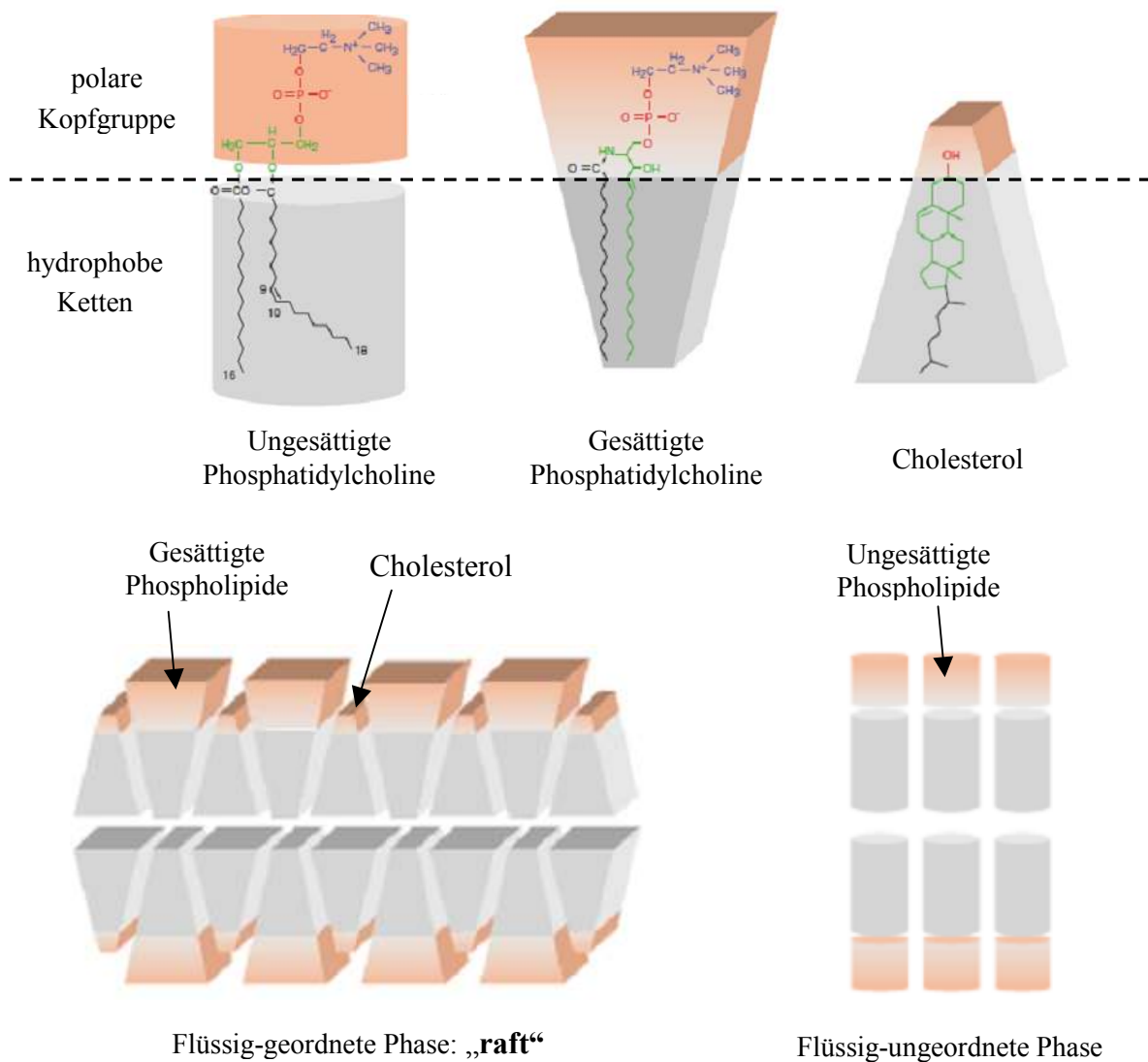


Abb. 1.9 Raumstruktur der gesättigten und ungesättigten Phosphatidylcholine und der Cholesterolmoleküle, siehe [Fantini et al., 2002].

Lipidbischichten sind in den letzten Jahre ausführlich untersucht worden, um die „lipid rafts“ der Zellmembranen zu verstehen und um die Eigenschaften der Liposomen für das so genannte “drug targeting“ zu optimieren. Die mechanischen und physiko-chemischen Eigenschaften der Liposomen werden von der Komposition der Bischicht, d.h. vom Verhältnis gesättigter und ungesättigter Lipide und am meisten vom Cholesterolgehalt, beeinflusst. Mit zunehmendem Cholesterolgehalt sinkt die Abscheidung der Liposomen durch Phagozytose in der Leber [Moghimi & Patel, 1998]. Die verlängerte Zirkulation der Liposomen mit höherem Cholesterolgehalt und gesättigten Lipiden könnte von gesteigerter mechanischer und enzymatischer Stabilität zeugen [Moghimi & Patel, 1998]. Ungesättigte Fettsäuren verursachen eine höhere Aktivität der Komplementproteine in Vergleich zu gesättigte Fettsäuren [Chonn et al., 1991].

2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.1 Oberflächenrheologie der Monoschichten - gemessen mit einem Tropfenprofil-Tensiometer

Die rheologischen Eigenschaften der Monoschichten können durch die Wahl von gesättigten oder ungesättigten Phospholipiden und ihrer Mischungen mit verschiedenen Cholesterol-Anteilen beeinflusst werden.

Es gibt fundamentale Unterschiede für die Rheologie und Phasentrennungen der Phospholipide mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren. Diese Unterschiede überwiegen in Zweikomponentenmischungen mit Cholesterol. Um diese besser charakterisieren zu können, wurden drei allgegenwärtige Phospholipide mit einer Phosphatidylcholin-Kopfgruppe und einer gesättigten Fettsäure (Dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC, 16 C-Atome, keine Doppelbindungen, also 16:0; 16:0; Dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC, 14:0; 14:0) oder einer einfach ungesättigten Fettsäuren (Dioleoylphosphatidylcholine, DOPC, 18:1; 18:1) gewählt.

Es sind verschiedene Methoden für die Charakterisierung der Rheologie, der Phasentrennungen und der Phasenübergänge der reinen Phospholipide und ihrer Mischungen mit Cholesterol benutzt worden.

Durch die Isothermen-Bestimmung des Filmdrucks Π von Lipidmonoschichten auf einer Langmuir-Filmwaage in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche A_{mol} (so genannte Π/A_{mol} -Isothermen) lässt sich die Oberflächenelastizität $\varepsilon = -A_{mol} \partial\Pi/\partial A_{mol}$ durch Differentiation berechnen. Die Messung der Π/A_{mol} -Isothermen verläuft quasi-statisch und wurde für DPPC [Albrecht et al., 1982, Ma & Allen, 2006, Pawelec & Sosnowski, , Pawelec & Sosnowski, , Wüstneck et al., 1999b, Yan et al., 2005], DMPC [Blume, 1979, Gaboriaud et al., 2005, Sardone, 2005], DOPC [Yan et al., 2005], die Zweikomponenten-Mischungen: DPPC/Cholesterol [Albrecht et al., 1982, Stottrup & Keller, 2006], DMPC/Cholesterol [Benvegnu & McConnell, 1993, Hirshfeld & Seul, 1990b, Ratajczak et al., 2007, Subramaniam & McConnell, 1987] und die Dreikomponenten-Mischungen: DOPC/DPPC/Cholesterol [Stottrup et al., 2005] durchgeführt.

Die statisch gemessene Oberflächenelastizität unterscheidet sich jedoch deutlich von der Oberflächenelastizität, die unter dynamischen Bedingungen, z.B. einer harmonischen Oszillation der Monoschichtfläche, gemessen wurde. Dies zeigen dynamische Untersuchungen von ε an einer Langmuir-Filmwaage mit einer oszillierenden Barriere für DPPC [Krägel et al., 1996a, Krägel et al., 1996b, Kretzschmar et al., 1996, Li et al., 1998b, Yun et al., 2003] und DOPC [Tournois et al., 1989]. Außerdem ist die Dehnungsviskosität - zur Definition nur dynamischen Messungen zugänglich. Die Oberflächen-Scherviskosität von

DPPC ist mit einem Scherrheometer untersucht worden [Krägel et al., 1996a, Krägel et al., 1996b, Miller et al., 1996].

Moderner als die Langmuir-Filmwaage ist die Profilanalyse-Tensiometrie („profile analysis tensiometry“, PAT) nach dem Prinzip der axialsymmetrischen Tropfenkonturanalyse („axisymmetric drop shape analysis“, ADSA), bei der die Monoschicht homogen komprimiert und expandiert wird. Diese Methode ist für die Untersuchung von DPPC [Li et al., 1996a, Li et al., 1996b, Vrânceanu et al., 2007b, Wüstneck et al., 1999b] und von anderen Phospholipid-Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche [Li et al., 1996a, Li et al., 1996b, Loglio et al., 2001, Ravera et al., 2005, Ravera et al., 2010, Vrânceanu et al., 2007b, Wüstneck et al., 1999a, Wüstneck et al., 1999b], Chloroform/Wasser-Grenzfläche [Li et al., 1996a, Li et al., 1996b, Li et al., 1998a], n-Dodecane/Wasser-Grenzfläche [Li et al., 1995, Li et al., 1996b] oder an der Dichlormethan/Wasser-Grenzfläche [Saulnier et al., 2001] benutzt worden. Alternativ zu einem hängenden Tropfen kann die Profilanalyse-Tensiometrie benutzt werden, um eine Luftblase in Flüssigkeit, unter vorgegebenen Oszillationen, zu untersuchen. Diese Messungen wurden für DPPC [Wüstneck et al., 2001, Yan et al., 2005], DMPC [Crane et al., 1999] und DOPC [Yan et al., 2005] durchgeführt.

Jedoch gibt es nicht sehr viele Daten über die Abhängigkeit der Oberflächen-Dehnungviskosität η und der Oberflächenelastizität ε von dynamischen Parametern, wie zum Beispiel der Frequenz und Amplitude bei einer harmonischen Oszillation. [Wüstneck et al., 1999a] benutzten ein Profilanalyse-Tensiometer um den Prozess der Stress-Relaxation einer Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) - Monoschicht und den Einfluss der Oszillations-Frequenz auf η und ε zu untersuchen. Jedoch ist der Einfluss der Amplitude der Oszillation bisher nicht systematisch untersucht worden. [Wüstneck et al., 1999a] haben festgestellt, dass die rheologischen Parameter, bei harmonischen Oszillationen von der Amplitude abhängig sein könnten.

Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Amplitude und Frequenz der Oszillation auf η und ε und auf die Störungen der Schwingungen höherer Ordnung systematisch untersucht. Die eigenen Ergebnisse, die mit dem Profilanalyse-Tensiometer ermittelt wurden, werden in Bezug auf die Oberflächenelastizität von DPPC, DOPC und Cholesterol mit Daten anderer Autoren, die dynamische oder statische Methoden benutzt haben, verglichen. Deshalb wurden Filmdruck/Fläche-Isothermen von DPPC, die mit PAT und einer Langmuir-Filmwaage gemessen wurden, verglichen, um zu sehen, ob die Unterschiede durch Oberflächengeometrie oder durch dynamische oder statische Messbedingungen erscheinen [Vrânceanu et al., 2007b] (siehe Abschnitt 2.1.4).

Neben rheologischen Messungen sind verschiedene Visualisierungsmethoden von Monoschichten auf Langmuir-Waagen untersucht worden, um die Phasentrennungen und Phasenübergänge von DPPC, DMPC, DOPC und ihrer Mischungen mit Cholesterol zu charakterisieren. Ein fluoreszenzmarkiertes Phospholipid wurde benutzt, um die Koexistenz

von getrennten nichtmischbaren Phasen und deren Übergänge mit Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Das ist für DPPC [Discher et al., 1999, Keller et al., 2000, Nag & Keough, 1993, Radhakrishnan & McConnell, 1999, Stottrup & Keller, 2006, Worthman et al., 1997, Yan et al., 2005], DOPC [Nag & Keough, 1993, Yan et al., 2005], DPPC/Cholesterol [Keller et al., 2000, Radhakrishnan & McConnell, 1999, Worthman et al., 1997], DMPC/Cholesterol [Hagen & McConnell, 1997, Hirshfeld & Seul, 1990b, Hu et al., 2006, Keller et al., 2000, Okonogi & McConnell, 2004], DOPC/Cholesterol [Hagen & McConnell, 1997, Okonogi & McConnell, 2004] und DPPC/DOPC/Cholesterol [Stottrup et al., 2005, Veatch & Keller, 2002] untersucht worden. Andere Visualisierungsmethoden, mit denen DPPC und DMPC untersucht wurden, sind Brewsterwinkelmikroskopie [Gaboriaud et al., 2005, Kretzschmar et al., 1996, Li et al., 1998a], [Gaboriaud et al., 2005, Kretzschmar et al., 1996, Li et al., 1998a], Ellipsometrie [Discher et al., 1999, Yun et al., 2003] und die optische Raster-Nahfeldmikroskopie [Hwang et al., 1995, Yuan & Johnston, 2002]. DPPC und DMPC sind auch mit AFM in Zweikomponentenmischungen mit Cholesterol [Sardone, 2005, Yuan & Johnston, 2002] als Langmuir-Blodgett-Filme auf Festkörper untersucht worden. Weiterhin ist die Fluoreszenzmikroskopie benutzt worden, um die Trennung der nichtmischbaren Phasen an großen Vesikeln [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003b, Veatch et al., 2004] zu visualisieren.

Die Bildung der kondensierten Komplexe (condensed complexes (*CC*)) mit einem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Phospholipiden und Cholesterol ist von [McConnell & Radhakrishnan, 2003] untersucht worden. Sie entwickelten die Hypothese, dass diese Komplexbildung der Grund für die Trennung zweier nichtmischbaren flüssigen Phasen ist, die zu einer Domänenbildung führt. Die Domänen sind kreisförmig und bis zu 30 μm groß. Die kondensierten Komplexe erscheinen als Domäne oder als eine kontinuierliche Phase, die abhängig ist vom Verhältnis zwischen beiden getrennten Phasen. Wenn die Phospholipid/Cholesterol-Mischungen der Komposition der stöchiometrischen Komplexe entspricht, gibt es nur eine Phase für alle *II*. Für Mischungsverhältnisse mit niedrigeren Cholesterol-Gehalten als dem stöchiometrischen Verhältnis, werden die *CC* von einer Phase, die reich an Phospholipiden ist, getrennt sein. Im Phasendiagramm wird dieser nichtmischbare Bereich α -Region genannt. Im Gegensatz dazu werden bei Mischungsverhältnissen, bei denen der Cholesterolgehalt höher ist als bei dem stöchiometrischen Verhältnis, die *CC* von einer Cholesterol-reichen Phase getrennt. Im Phasendiagramm ist diese Region als β -Region bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden η und ε von folgenden Phospholipiden DPPC, DMPC und DOPC in Zweikomponentenmischungen mit Cholesterol untersucht, für den ganzen Filmdruckbereich, der mit PAT zugänglich ist. Die Phasenübergänge aus den erzeugten rheologischen Daten wurden mit Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie und Π / A_{mol} Isothermen auf Langmuir-Filmwaagen verglichen.

Alle drei für diese Arbeit ausgewählten Phospholipide haben die gleiche polare Kopfgruppe (Phosphocholin) und unterscheiden sich nur in den hydrophoben Fettsäureketten. DMPC hat zwei Ketten mit 14, DPPC mit 16 und DOPC mit 18 Kohlenstoff-Atomen, wobei nur DOPC eine ungesättigte Doppelbindung pro Kette hat.

2.1.1 Theorie

Rheologische Grundlagen

Die Rheologie beschreibt die Verformung der Festkörper, Flüssigkeiten oder Gase bei Beanspruchung durch äußere Kräfte. Die Körper, die nur eine Eigenschaft haben: Elastizität, Viskosität oder Plastizität, zeigen ein idealisiertes Verhalten.




Der perfekte elastische Körper (HOOKEsche-Festkörper) besitzt nur Elastizität. Wenn die Deformationskraft entlastet ist, wird die Deformationsenergie vollständig zurückgewonnen.

Der reine visköse Körper (NEWTONSche Flüssigkeit) fließt unter einer Deformationskraft und wird irreversibel mit zunehmender Zeit verformt. Die Deformationsenergie wird in Wärme umgesetzt und nicht mechanisch zurückgewonnen.

Unter einer Schubspannung, die kleiner als ein kritischer Wert (τ_0) ist, verhält sich der ideale plastische Körper (ST-VENANT-Körper) wie ein Festkörper. Bei Spannungen größer als τ_0 verhält sich der ideale plastische Körper wie eine Flüssigkeit und fließt.

Um das rheologische Verhalten idealer Körper zu beschreiben, werden in der Rheologie gerne „mechanische Ersatzmodelle“ benutzt. Diese sind: Feder, Dämpfer und Reibungselement, die als Modell für das Verhalten von ideal elastischen, ideal viskösen und ideal plastischen Körper dienen. In Tabelle 2.1 werden die rheologischen Grundkörper und deren Gleichungen dargestellt.

Tabelle 2.1 Rheologische Grundkörper

Rheologischer Grundkörper	Eigenschaft	Rheologische Gleichung
Feder 	perfekt elastisch (HOOKEsche-Festkörper)	$\tau = E\gamma$
Dämpfer 	rein viskös (NEWTONSche Flüssigkeit)	$\tau = \eta \dot{\gamma}$
Reibelement 	viskös mit Fließgrenze	

	(ST-VENANT-Körper)	$\tau = \tau_0 + \eta \dot{\gamma}$
--	--------------------	-------------------------------------

Hierbei ist τ die Schubspannung, γ die Deformation, $\dot{\gamma}$ die Deformationsgeschwindigkeit, E das Schubmodul (Federkonstante), η die dynamische Viskosität und τ_0 die Fließgrenze.

Das ideale Verhalten eines Körpers ist von der Linearität der rheologischen Gleichungen geprägt, siehe Tabelle 2.1. Für Festkörper korrelieren die rheologischen Gleichungen die Spannung mit der Deformation, während sie für Flüssigkeiten die Spannung mit der Deformationsgeschwindigkeit korrelieren.

Reale Körper haben mehr als eine der oben genannten Eigenschaften. Zum Beispiel zeigen die meisten Flüssigkeiten ein rheologisches Verhalten, das sich zwischen Flüssigkeit und Festkörper befindet; sie sind sowohl elastisch als auch viskös und werden deshalb viskoelastisch genannt. Um deren mechanische Eigenschaften zu beschreiben, werden mehrere rheologische Grundkörper miteinander verbunden. Das Maxwell-Modell verbindet eine Feder und einen Dämpfer in einer Reihe, wobei es bei dem Kelvin-Voigt-Modell eine parallele Anordnung gibt, siehe Abb. 2.1.

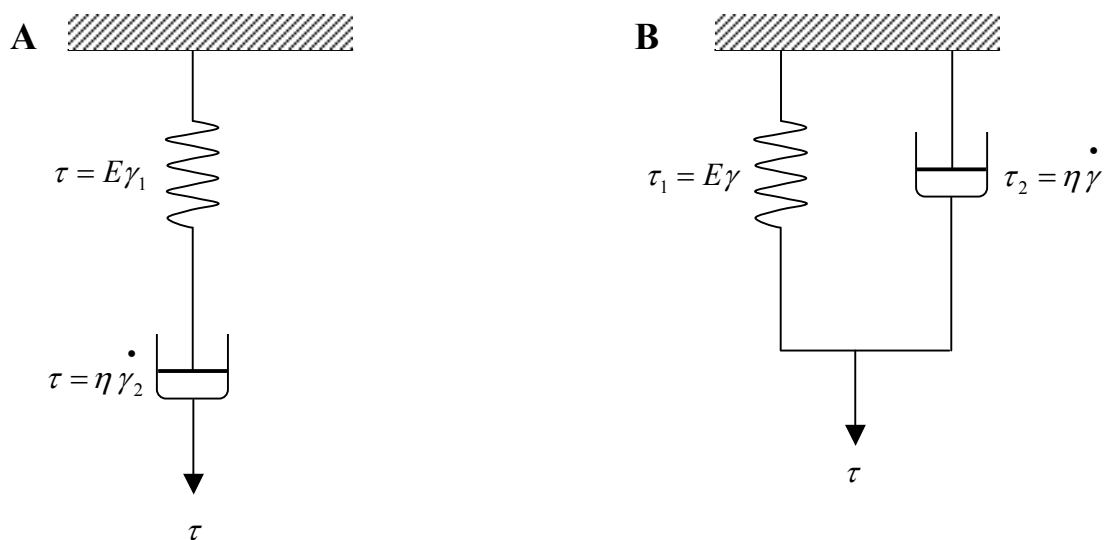


Abb. 2.1 **A:** Maxwell-Modell, bei dem die gesamte Deformation $\gamma = \gamma_1 + \gamma_2$ beträgt. **B:** Kelvin-Voigt-Modell, bei dem die gesamte Spannung $\tau = \tau_1 + \tau_2$ beträgt.

Weitere Grundlagen zur Rheologie können z.B. aus [Giesekus, 1994] entnommen werden.

Die rheologischen Eigenschaften der Grenzflächen können durch Deformationen der Grenzfläche gewonnen werden. Es gibt zwei Hauptarten von Deformationen einer Grenzfläche: Dehnung (Änderung der Fläche bei einer konstanten Form) und Scherung (Änderung der Form bei einer konstanten Fläche), siehe Abb. 2.2.

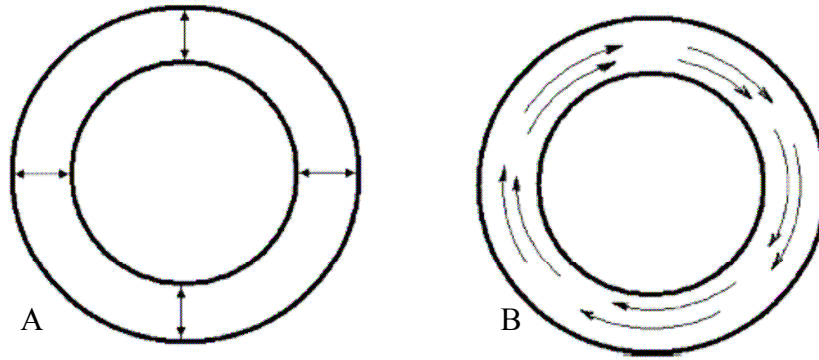


Abb. 2.2 Grenzflächendeformationen: **A**: Dehnung (Kompression/Expansion) und **B**: Scherung [Miller et al., 2010]

Für eine Variation der Fläche von A_0 zu $A(t)$ ändert sich die Oberflächenspannung mit $\Delta\sigma = \sigma(t) - \sigma_0$. Für ein rein elastisches Verhalten ist $\Delta\sigma$ mit der relativen Variation der Fläche: $(A(t) - A_0) / A_0 = \Delta A / A_0$ proportional [Ravera et al., 2005]:

$$\Delta\sigma = \varepsilon(\Delta A / A_0) \quad (2)$$

und hat die Dehnungselastizität ε als Proportionalitätskonstante.

Wenn Relaxationsphänomene vorhanden sind, kann das System ein viskoses Verhalten haben, d.h. dass der Oberflächenspannungs-Differenz zusätzlich auch zur Geschwindigkeit der Grenzflächendeformation proportional ist.

$$\Delta\sigma = \varepsilon(\Delta A / A_0) + \eta \frac{d(\Delta A / A_0)}{dt} \quad (3)$$

Hierbei ist η die Dehnungsviskosität [Ravera et al., 2005].

Das benutzte Profilanalyse-Tensiometer bietet die Möglichkeit einer harmonischen Oszillation der Fläche:

$$A(t) = A_0 + a_1 \sin(\omega t) \quad (4)$$

Hierbei steht A_0 für die ursprüngliche Tropfenoberfläche, $\omega = 2\pi f$ für die Kreisfrequenz, t für die Zeit und a_1 für die Amplitude der Hauptfrequenz f . Wir definieren eine dimensionslose Flächenamplitude a als prozentualer Anteil von A_0 : $a = a_1 / A_0 \times 100$ [%].

Eine kleine a_1 der harmonischen Flächen-Oszillation bewirkt eine lineare Antwort von σ in Form einer sinusförmigen Variation der Oberflächenspannung mit der gleichen Frequenz f und Periode $1/f$ [Babak et al., 2005]:

$$\sigma(t) = \sigma_0 + \Delta\sigma \sin(\omega t + \varphi) \quad (5)$$

Hierbei steht σ_0 für die Oberflächenspannung bei der ursprünglichen Tropfenoberfläche A_0 , $\Delta\sigma$ für die Amplitude der sinusförmigen Oberflächenspannungsvariation, die wegen der

visko-elastischen Eigenschaften mit einem Phasenwinkel φ verschoben ist, wie in Abb. 2.3 schematisch dargestellt.

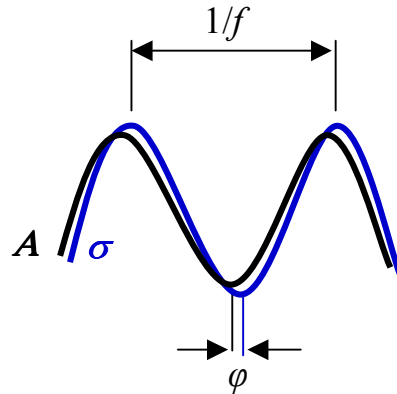


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der sinusförmigen Flächenoszillation der Tropfen und der Antwort der Oberflächenspannung.

Für eine kleine Amplitude der Flächenoszillation (linearer Bereich: $a < 5\%$) wird die Oberflächendehnungs-Viskoelastizität (oder Viskoelastizitätsmodul) definiert:

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta A/A_0} = \frac{d\sigma}{d \ln A}, \quad (6)$$

[Loglio et al., 1979] haben gezeigt, dass für eine sinusoidale Variation der Fläche der komplexe Elastizitätsmodul E durch folgende Gleichung berechnet werden kann:

$$E(i\omega) = \frac{F\{\Delta\sigma(t)\}}{F\{\Delta \ln A(t)\}}, \quad (7)$$

wobei F der Fourier-Transformation-Operator, $\Delta \ln A(t)$ die Variation der relativen Oberflächengröße, $\Delta\sigma(t)$ die Reaktion der Oberflächenspannung und $i = \sqrt{-1}$ ist.

Der komplexe Elastizitätsmodul kann wie folgt dargestellt werden:

$$E(i\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega) = |E| \exp(i\varphi), \quad (8)$$

mit $|E| = \sqrt{E'^2 + E''^2}$ und $\tan \varphi = E''/E'$.

ε und η können aus Gleichung (8) folgendermaßen berechnet werden:

$$\varepsilon(\omega) = E'(\omega); \quad \eta(\omega) = \frac{E''(\omega)}{\omega} = \frac{\varepsilon \tan \varphi}{\omega}. \quad (9)$$

Das Profilanalyse-Tensiometer ermöglicht die Bestimmung der Oberflächenspannung σ , des Filmdrucks Π , der Oberflächen-Dehnungviskosität η und der -Dehnungselastizität ε einer Monoschicht, die sich an der Flüssig/Flüssig- oder Flüssig/Gas-Grenzfläche befindet. Das Hauptprinzip dieses Geräts besteht darin, die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit anhand des rotationssymmetrischen Profils eines hängenden Tropfens zu bestimmen.

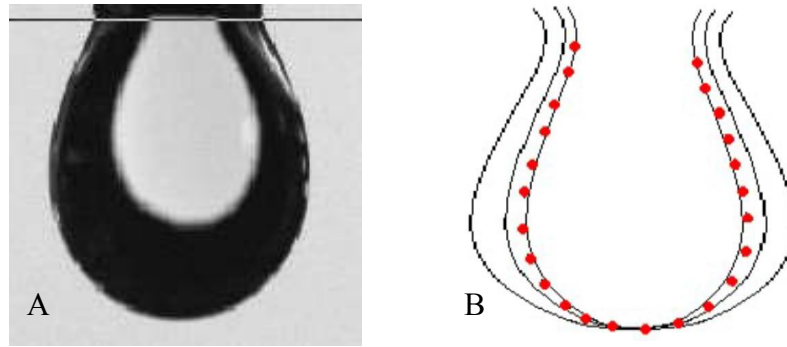


Abb. 2.4 **A**: Bild des hängenden Tropfens; **B**: Die roten Punkte zeigen experimentelle Messpunkte von Abb. A und die schwarzen Kurven sind theoretische Kurven, die durch iterative Variation des Oberflächenspannungswertes in der Gauss-Laplace-Gleichung, Gl. (1), erzeugt werden [6, 2011].

Das Profil wird durch die Gauss-Laplace Gleichung beschrieben:

$$\sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P_0 + \Delta \rho g z \quad (1)$$

Hierbei steht σ für die Grenzflächenspannung, R_1 und R_2 für die Hauptkrümmungsradien des Krümmungskreises, ΔP_0 für die Druckdifferenz zwischen der Innen- und Außenseite der Tropfengrenzfläche, $\Delta \rho$ für die Dichtedifferenz, g für die Erdbeschleunigung und z für die vertikale Höhe der Wassersäule.

Durch iterative Variation des Oberflächenspannungswertes in dieser Gleichung bekommt man eine Familie von theoretischen Kurven (siehe Abb. 2.4 B). Aus der Kurve, die am besten zu den experimentellen Messpunkten passt (die roten Punkte in Abb. 2.4 B), erhält man den Wert der Oberflächenspannung.

Grundlagen zur Profilanalyse-Tensiometrie und Rheologie der Grenzflächen können zum Beispiel aus [Miller et al., 2010, Derkach et al., 2009, Loglio et al., 2001] entnommen werden.

2.1.2 Oberflächenrheologische Messungen

Die dynamischen Oberflächeneigenschaften der Monoschichten sind mit einem Tropfen-Profilanalyse-Tensiometer PAT1 von Sinterface (Berlin, Deutschland) gemessen worden. Die Messmethode wurde von [Loglio et al., 2001] beschrieben. Eine schematische Zeichnung in der Aufsicht des Tensiometers ist in Abb. 2.5 gezeigt. Eine digitale Kamera (a) nimmt das Profil des hängenden Tropfens (b) auf, der mit einer Lichtquelle (c) beleuchtet ist. Die selbstgebaute Messkammer (d) hat ein optisches Glas (e) auf der Seite der digitalen Kamera und ein kleines Loch für die Nadel der Mikroliter-Spritze (f). Die Spritze ist an einer

Halterung festgeschraubt, die in alle Richtungen bewegt werden kann und einen mikrometerjustierbaren Endpunkt hat.

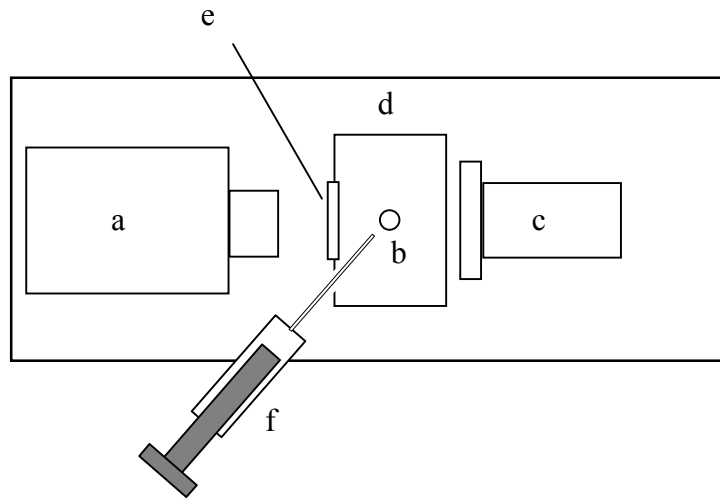


Abb. 2.5 Versuchsstand: (a) Digitalkamera; (b) hängender Tropfen; (c) Lichtquelle; (d) Messkammer; (e) optisches Glas; (f) 0,5 µl Spritze.

Der Tropfen hängt am Ende einer Stahl-Kapillare mit einem Durchmesser von 0,7 mm. Eine Monoschicht wird mit Hilfe einer Mikroliter-Spritze auf die Tropfenoberfläche aufgetragen. Dieser Vorgang wird in Kapitel 2.1.2.2 ausführlich beschrieben. Nach dem Einspritzen wird der Filmdruck Π der Monoschicht an einer konstanten Tropfenoberfläche A beobachtet. Wenn das Gleichgewicht erreicht ist, d.h. $\Delta\Pi \leq 0,1 \text{ mN m}^{-1}$ für 5 Minuten, wird die Messung von ε und η gestartet, was bedeutet, dass die Profiländerung und der sich daraus ableitende Filmdruck Π des oszillierenden Tropfens aufgenommen wird.

Die Messdaten wurden normalerweise für 5 Perioden durch eine Fourier-Transformation analysiert. Das automatische Dosierungssystem des Tensiometers dosiert das Tropfenvolumen, so dass die gemessene Tropfenoberfläche A einer vorprogrammierten Oszillation folgt. Diese besteht aus einer Sinusfunktion mit vorgegebener Amplitude und Frequenz, siehe Gleichung (4).

Das Tropfenvolumen variiert zwischen 5 und 13 µl. Das Dosierungssystem ist beliebig in 3000er Schritte unterteilbar. Um das kleinste Volumen pro Schritt zu erreichen, wurde die kleinstmögliche Dosierungsspritze (25 µl) benutzt, die pro Schritt ein Volumen von 0,0083 µl ermöglicht. So wird eine feine Sinusvariation der Tropfenfläche erzeugt.

Ungenauigkeiten bei der Dosierung und Störungen sind durch die gesamte harmonische Verzerrung, im englischen Total Harmonic Distortion (THD), als Prozente von a_1 angegeben [Loglio et al., 2004, Loglio et al., 2005]:

$$THD = \frac{\sqrt{a_2^2 + a_3^2 \dots a_n^2}}{a_1} \cdot 100 \text{ [%]}, \quad (10)$$

hierbei sind a_2, a_3, \dots, a_n Amplitude der Schwingungen höherer Ordnungen der Fourier-Serien, siehe Abb. 2.6.

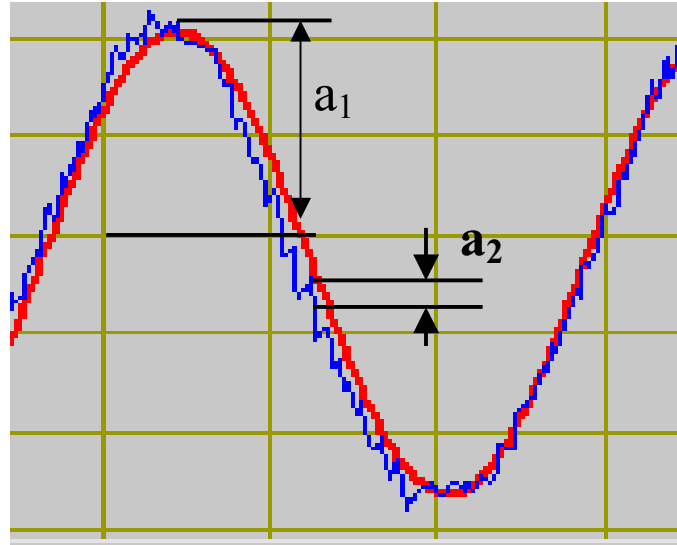


Abb. 2.6 Die blaue Kurve zeigt die Messdaten einer harmonischen Oszillation; a_1 ist die Amplitude der Hauptfrequenz f ; a_2 zeigt die Amplitude einer Schwingung höherer Ordnung. Die rote Kurve zeigt die Fourier-Transformation-Funktion, die von der Tensiometersoftware automatisch berechnet wird.

Da das Umgebungslicht die Messungen der Oberflächenspannung beeinträchtigt hat, wurde das Tensiometer an einen unbeleuchteten Platz gestellt und somit wurde der Tropfen nur von der Lichtquelle (c) des Tensiometers beleuchtet (siehe Abb. 2.5).

2.1.2.1 Kalibrierung des Tensiometers

Eine aus Edelstahl bestehende hochpräzise Kugel von Martin&Co. (USA und Italien) [1, 2010] wurde für die Kalibrierung des Tensiometers benutzt. Der Kugeldurchmesser betrug: $3,0 \pm 0,000125$ mm und die Abweichung von der sphärischen Form: $0,13 \mu\text{m}$. Zuerst wurde eine externe Längenskala benutzt, entweder die Kapillare oder der Durchmesser der Kalibrierkugel. Nach der Anwendung des Kalibrierprogramms soll die maximale Abweichung der Kontur des Sphärenbildes, im Vergleich zu einer idealen Sphäre, kleiner sein als $5 \mu\text{m}$. Das ist durch eine richtige Reinigung der Kalibrierungskugel und eine guten Justierung der Beleuchtung und Fokussierung möglich.

In einem zweiten Kalibrierungsschritt müssen die Umwandlungsfaktoren der Pixel der Digitalkamera in SI Einheiten (Millimeter) in die horizontale und vertikale Richtung, c_x und c_z , wie von [Loglio et al., 2003] beschrieben, angepasst werden. Eine sehr kleine Veränderung bei c_x und/oder c_z beeinflusst den absoluten Wert des σ , was mit einer Kalibrierflüssigkeit und ihrem Literaturwert nachgeprüft wird. Ein Fehler im c_x/c_z - Verhältnis verursacht eine falsche Abhängigkeit von σ vom Tropfenvolumen. Die Kalibrierung wird iterativ durchgeführt, zuerst durch Änderung des c_x/c_z -Verhältnisses, um die Volumenabhängigkeit von σ zu minimieren und dann werden die c_x - und c_z -Werte bei einem

konstanten Verhältnis variiert, bis der Literaturwert von σ erreicht ist. Die Oberflächenspannungswerte eines kleinen Tropfens sind ungenau (z.B. für Tropfenflächen von 9,3; 11,0; 14,3; 17,5; 20,7 mm², die einem Tropfenvolumen von 3,0; 3,8; 5,5; 7,3; 9,2 mm³ entsprechen, betragen die Oberflächenspannungswerte von Wasser: 79,9; 82,4; 74,1; 71,5; 71,3 mN m⁻¹ bei 20°C). Der Tropfen muss also groß genug sein, damit die Schwerkraft seine sphärische Form deutlich deformieren kann [Woodward, 2011]. Nach der Kalibrierung ist der zulässige Messbereich der Tropfengrößen mit konstanten Werten von σ bestimmt. Für reines Wasser ist die minimale Fläche der Tropfen 20 mm² und das entsprechende Volumen 8,8 mm³, bei einem Kapillarendurchmesser von 0,7 mm, der hier benutzt wurde.

2.1.2.2 Auftrag von Lipid-Monoschichten

Für das Auftragen von in Chloroform gelösten Lipiden auf die hängende Tropfenoberfläche wurde eine 0,5 µl Hamilton-Spritze mit einem schräg geschnittenen Ende (12°) benutzt. Das eingespritzte Volumen war in der Regel 0,2 µl, und variierte maximal zwischen 0,1 und 0,4 µl. Ungefähr das gleiche Volumen wurde von [Wüstneck et al., 1999a] benutzt. Die Lipid-Konzentration war normalerweise 0,2 mM.

Ein typischer Einspritzungsprozess ist in Abb. 2.7 dargestellt. Ein Wassertropfen wurde gebildet (Abb. 2.7 (a)) und die Mikroliter-Spritze in Richtung eines Mikrometer-Justierendespunktes (b) bewegt. Die Lipidlösung wurde auf die Tropfenoberfläche aufgetragen (c) und die Mikrometer-Spritze wurde langsam zurückgezogen (d). Durch Variation des eingespritzten Volumens der Lipidlösung wurde der gewünschte Filmdruck erreicht (e).

Eine stumpfe Spritzennadel (90°) hat beim Zurückziehen Schwankungen bewirkt, was dann den Tropfen zum Herunterfallen gezwungen hat. Deshalb wurden nur Spritzen mit schräg geschnittenen Enden benutzt.

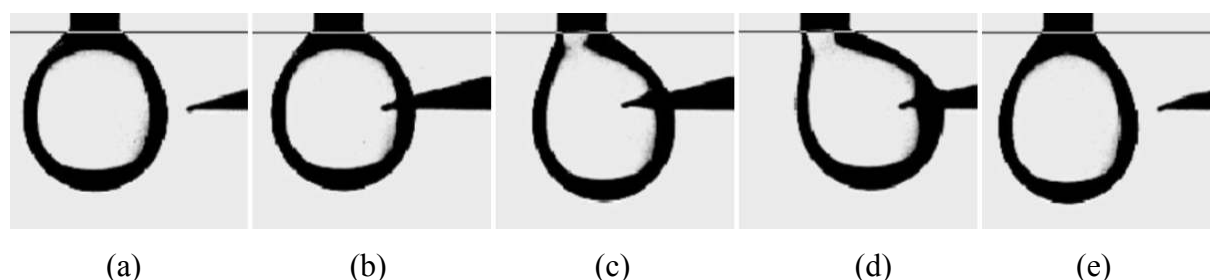


Abb. 2.7 Auftrag der Lipid-Monoschicht auf die Tropfenoberfläche: (a) frisch erzeugter Tropfen aus reinem Wasser; (b) die Mikroliter-Spritze wird in Richtung eines Endpunktes bewegt; (c) die chloroformische Lipidlösung wird auf die Tropfenoberfläche aufgetragen; (d); Zurückziehen der Mikroliter-Spritze; (e) Tropfen mit einer Lipid-Monoschicht nach Verdunsten des Lösungsmittels.

2.1.2.3 Messbedingungen

DPPC und DOPC wurden bei Raumtemperatur gemessen. Die genaue Temperatur ist in der Legende der jeweiligen Diagramme angedeutet. Da der Gel/flüssigkristalline Haupt-Phasenübergang von DMPC bei Raumtemperatur liegt ($T_m = 23,5 \text{ °C}$), wurden alle Messungen mit DMPC in einer Thermostat-Messkamera bei 20,0; 25,0 und 30,0 °C ($\pm 0,1 \text{ °C}$) durchgeführt.

Um die Oxidation der Lipide zu vermeiden, floss kontinuierlich Argon durch die Messkammer. Der Argonstrom wurde dabei zuerst durch eine Flasche mit Wasser geleitet, um durch das kurzzeitiges Dispergieren des Argonstroms in Gasbläschen das Gas mit Wasserdampf zu sättigen. Die Verdunstung des hängenden Tropfens während der Tropfenprofil-Messung wurde mit Hilfe des Dosierungssystems des Tensiometers kompensiert.

2.1.3 Abhängigkeit von η und ε von der Frequenz und Amplitude der Oszillation

Die Werte von THD , ε und η , in Abhängigkeit von a und f , sind für reine DPPC- bzw. DOPC- und Cholesterol-Monoschichten jeweils in den Abb. 2.8 bis Abb. 2.10 dargestellt. Zur Vereinfachung wurden die für DPPC, DOPC und Cholesterol bestimmten Messwert durch die Indizes P , O und C an den Parametern THD , ε , η und Π abgekürzt.

Der Filmdruck wurde bei $\Pi_P = 17,5 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 2.8), $\Pi_O = 21,7 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 2.9) und $\Pi_C = 16,0 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 2.10) konstant gehalten. Die Abhängigkeit von a ist in der linken Spalte dargestellt (Diagramme A, C und E). Die gleichen Daten wurden für ihre Abhängigkeit von f in der rechten Spalte, (Diagrame B, D und F) untersucht.

Die Frequenz f variierte in allen Messungen zwischen 8 und 25 mHz. Verschiedene Amplituden a wurden für DPPC und DOPC im Bereich $2,5 \leq a \leq 20,0 \text{ %}$ und für Cholesterol im Bereich $1,5 \leq a \leq 5,0 \text{ %}$ getestet. Bei den Cholesterol-Messungen hätte infolge ihrer erhöhten Oberflächenelastizität (für $\Pi = 16 \text{ mN m}^{-1}$) eine größere Amplitude den hängenden Tropfen zum Herunterfallen gezwungen, wenn A den Minimumwert erreicht. Im Falle von größeren Amplituden könnte die Monoschicht zerstört werden, wodurch die Reproduzierbarkeit der rheologischen Parameter nicht mehr gegeben ist [Wüstneck et al., 1999a].

Das Zeitintervall für die Fourier-Serien-Analysen kann beliebig gewählt werden. Normalerweise wird ein Zeitintervall von vier bis sechs Perioden analysiert. Allerdings sind die THD -Werte vom Zeitintervall abhängig, d.h. sie sind von der Anzahl der Perioden und ihrer Phase abhängig. Beispielsweise wurde durch die Wahl einer verschiedenen Anzahl an

Perioden und ihrer Phasen für die Fourier-Analyse ein Intervall mit 30 Perioden berechnet (Ergebnisse nicht dargestellt). Die relative Abweichung der THD ist 5 bis 10 %, für η 3,5 bis 14 % und für ε 2,5 bis 6,6 %. Die Tatsache, dass die Messwerte von η eine geringere Präzision zeigen, wurde auch von [Wüstneck et al., 2001] festgestellt. Dies ist daraus begründet, dass sich die Bestimmung von η aus ε ableitet, unter Berücksichtigung des Phasenwinkels φ , siehe Gleichung (9). Wüstneck et al. fanden die Vertrauensbereiche (95 % Vertrauensniveau) von ε bei ungefähr 1 – 4 %, wobei die für η zwischen 10 und 15 % liegen. [Decesari et al., 2003] erhielten bei der Benutzung des gleichen Messgeräts eine Unsicherheit bei der ε Messung von 10 % für $IT > 3 \text{ mN m}^{-1}$.

Es zeigte sich, dass die höchste Anzahl der für die THD -Bestimmung berücksichtigten Perioden gewöhnlich nicht den kleinsten THD -Wert ergibt. Demzufolge sind die Ergebnisse in Abb. 2.8 und Abb. 2.9 nur für den minimalen Wert von THD dargestellt. In den Abb. 2.10 und Abb. 2.11 sind zwei bis fünf Ergebnisse von THD , ε und η für die gleichen Messdaten zum Vergleich dargestellt.

Zuerst wird der Einfluss von a auf die THD -Werte in Abb. 2.8 A bis Abb. 2.10 A analysiert. Im Allgemeinen gilt: $1,7 \leq THD \leq 19 \%$. Wie erwartet, verursachen größere Amplituden a meistens nichtlineare Effekte und deshalb bewirken sie höhere THD -Werte. Allerdings zeigen nicht alle Kurven deutliche Abhängigkeiten und deshalb wurden statistische Bewertungen durchgeführt, um herauszufinden, für welche Parameter Korrelationen existieren. Der Studentsche t-Test [Bronstein & Semendjajew, 1991] beschreibt die Distributionsfunktion $t_{p,n}$ durch die folgende Gleichung:

$$t_{p,n} = \frac{R}{\sqrt{1-R^2}} \sqrt{n-2} .$$

R^2 ist hierbei der Korrelationskoeffizient der entsprechenden (meist linearen) Regression, n die Nummer der unabhängigen Messdaten und p die Wahrscheinlichkeit der Hypothese H_0 , wobei H_0 bedeutet, dass es keine Korrelation gibt.

Wie schon in Abb. 2.8 A dargestellt, steigt THD_p für DPPC mit a ($p < 0,05$) für vier Frequenzen (8; 18; 20; 25 mHz) signifikant, während für die restlichen drei Frequenzen (10; 12,5 und 15 mHz) keine erhebliche Tendenz ($p > 0,05$) gefunden wurde. Die linearen Trendlinien sind in den Abb. 2.8 bis Abb. 2.10 als durchgezogene Linien für $p < 0,05$ und als gestrichelte Linien für $p > 0,05$ ausgewiesen. Die THD -Werte sind bei DPPC bei Fällen mit $p > 0,05$, d.h. $1,8 \leq THD_p \leq 7 \%$ für $a \geq 10 \%$ außergewöhnlich gering. Der THD_O -Wert steigt mit steigendem a für alle f ($p < 0,001$) hoch signifikant und THD_C steigt signifikant mit a für drei f , wobei bei den anderen drei f keine Tendenz zu sehen ist. Wie in den Abb. 2.8 B, Abb. 2.9 B und Abb. 2.10 B zu sehen ist, sind die THD -Werte von f nicht systematisch beeinflusst.

In der Literatur [Loglio et al., 2004, Loglio et al., 2005] wurde der THD -Parameter benutzt, um die Ungenauigkeiten des Dosierungssystems und Störungen zu quantifizieren. Es soll gezeigt werden, dass THD von a essentiell, aber von f nicht beeinflusst wird.

Grundsätzlich erscheint bei höherem a eine Nichtlinearität. [Saulnier et al., 2001] entdeckten, dass nichtlineare Ereignisse für DPPC-Monoschichten erscheinen, wenn $a > 10$ %.

Die Abhängigkeit von η von a für DPPC, DOPC und Cholesterol ist jeweils in den Abb. 2.8 C bis Abb. 2.10 C dargestellt. In Abb. 2.8 C kann man feststellen, dass lediglich für $f = 8$ mHz η_P signifikant mit a von 90 bis 68 mN s m⁻¹ sinkt. Für $f > 8$ mHz gibt es keine Tendenz zu sehen und $27 \leq \eta_P \leq 54$ mN s m⁻¹. Für DOPC steigt η_O ($p < 0,05$) mit a für drei f (10; 18; und 25 mHz) signifikant, wohingegen für die restlichen drei Frequenzen (8; 15; und 20 mHz) keine signifikante Tendenz gefunden wird.

Wie man von der Abb. 2.10 C ablesen kann, zeigt Cholesterol sehr hohe Werte für η , die hoch signifikant ($p < 0,01$) mit a für alle Frequenzen sinken. Bei gleicher Frequenz beträgt die maximale Abweichung, abhängig von der Amplitude, 32 % für η_P , 33 % für η_O und 105 % für η_C .

Die Diagramme D der Abb. 2.8 bis Abb. 2.10 zeigen die Abhängigkeit der η -Werte von f . Die Abb. 2.8 D beinhaltet einen Kasten mit einer Vergrößerung für eine bessere Datenunterscheidung. Die Viskosität sinkt mit steigendem f signifikant: $p < 0,025$ für DPPC und $p < 0,02$ für DOPC und Cholesterol. Der starke Abfall von η mit steigendem f zeigt, dass das oberflächenrheologische Verhalten strukturell viskos ist, d.h. hohe Viskosität bei niedrigen Frequenzen, die bei schnellen Deformationen sinkt, wie schon von [Wüstneck et al., 1999a] beschrieben. Infolge ihrer starken Frequenzabhängigkeit sind maximale η_P 230 %, η_O 470 % und η_C 550 % höher als deren Minimum für den gemessenen Frequenzbereich. Die Viskosität der zwei Phospholipide, η_P und η_O , sind ungefähr gleich ($\eta_P, \eta_O < 100$ mN s m⁻¹), wobei η_C viel höher ist, d.h. $180 < \eta_C < 1200$ mN s m⁻¹.

Abb. 2.8 bis Abb. 2.10 E zeigen die Variation der ε mit a . Für DPPC sinkt ε_P allein für $f = 8$ mHz signifikant, wie in Abb. 2.8 gezeigt. Für kleinere f (10; 12,5 und 15 mHz) gibt es keine signifikante Tendenz ($p > 0,05$), während für höhere f (18; 20 und 25 mHz) ε_P signifikant ($p < 0,05$) mit a steigt. Die maximale ε_P ist 13 % höher als die minimale ε_P für den gemessenen a -Bereich bei gleichen f .

ε_O steigt signifikant ($p < 0,02$) mit a für alle benutzte f . Das Maximum ist 7 % höher als das Minimum in dem benutzten Messbereich für gleiche f . Im Gegenteil, ε_C sinkt signifikant ($p < 0,01$) mit a . In diesem Fall ist die Abhängigkeit der ε_C von f vermindert bei hoher a . Das Maximum der ε_C ist 30 % höher als das Minimum in dem Messbereich für gleiche f .

Abb. 2.8, Abb. 2.9 und Abb. 2.10 F zeigen die Variation der ε mit f . Für DPPC hat ε_P ein Minimum bei $f = 12,5$ mHz, während ε_O und ε_C monoton steigen mit steigendem f . Die maximale Variation von ε_P abhängig von f bei gleichem a ist 25 %, für ε_O ist es 4 % und für ε_C 13 %.

Die in Abb. 2.8 bis Abb. 2.10 dargestellten Ergebnisse über den Einfluss von a und f auf η und ε sollen nun mit den Ergebnissen von anderen Autoren verglichen werden. [Wüstneck et al., 1999a] zeigten auch, dass η für DPPG stark sinkt bei einer schnellen Störung der Monoschicht, d.h. mit steigendem f . In diesen Fällen wird das allgemeine Oberflächen-Dehnungsverhalten elastischer [Wüstneck et al., 1999a]. Dies stimmt mit den hier präsentierten Ergebnissen überein: Wenn η sinkt, steigt ε . Eine Abhängigkeit der ε von f wird von [Caseli et al., 2005] auch gezeigt. [Wüstneck et al., 2001] studierte die rheologischen Eigenschaften der DPPC-Monoschichten durch sinusförmige Oszillationen einer Blase mit axialsymmetrischen Blasenform-Analysen. Sie haben herausgefunden, dass f η_p und ε_p beeinflusst, ihre Ergebnisse haben die gleiche Größenordnung wie die hier dargestellten. Leider ist ein quantitativer Vergleich mit deren Daten nicht möglich, weil ihre Ergebnisse als 3D Diagramme dargestellt sind.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die *THD*-Werte nur von a und nicht von f beeinflusst sind. η sinkt stark mit steigendem f , und zwar mit einem Faktor von 2 bis 5. Nur bei Cholesterol wird eine sinkende Beeinflussung bei steigendem a bemerkt, die η mit einem Faktor 2 bei konstantem f reduziert. Eine klare Beeinflussung kann für DPPC und DOPC nicht festgestellt werden, die Werte schwanken in diesem Fall nur im Bereich von einigen Prozenten. Die Beeinflussung auf ε ist kleiner als auf η , ε_p variiert maximal um 24 %, ε_o um 9 % und ε_c um 34 %. Normalerweise beeinflussen sowohl a als auch f die Elastizität, mit Ausnahme von ε_p , welches mit a nur bei höheren f steigt. Allgemein steigt ε mit steigendem a oder f , allein ε_c sinkt mit steigendem a .

Als Konsequenz der Ergebnisse, die in Abb. 2.8 bis Abb. 2.10 dargestellt sind, werden die Parameterfestlegungen $f = 18$ MHz und $a = 2,5$ % benutzt, um die Abhängigkeit von η und ε von Γ für reine DPPC-, DOPC- und Cholesterol-Monoschichten zu zeigen. Die Frequenz f ist gewählt worden, weil η für $f \geq 18$ MHz fast konstant ist und es noch nahe der Frequenz ist, bei ε_p ein Minimum zeigt. Weil DPPC und Cholesterol bei hohem Γ mit $a = 2,5$ % schwierig zu messen sind, ist in diesem Fall $a = 1,5$ % benutzt worden.

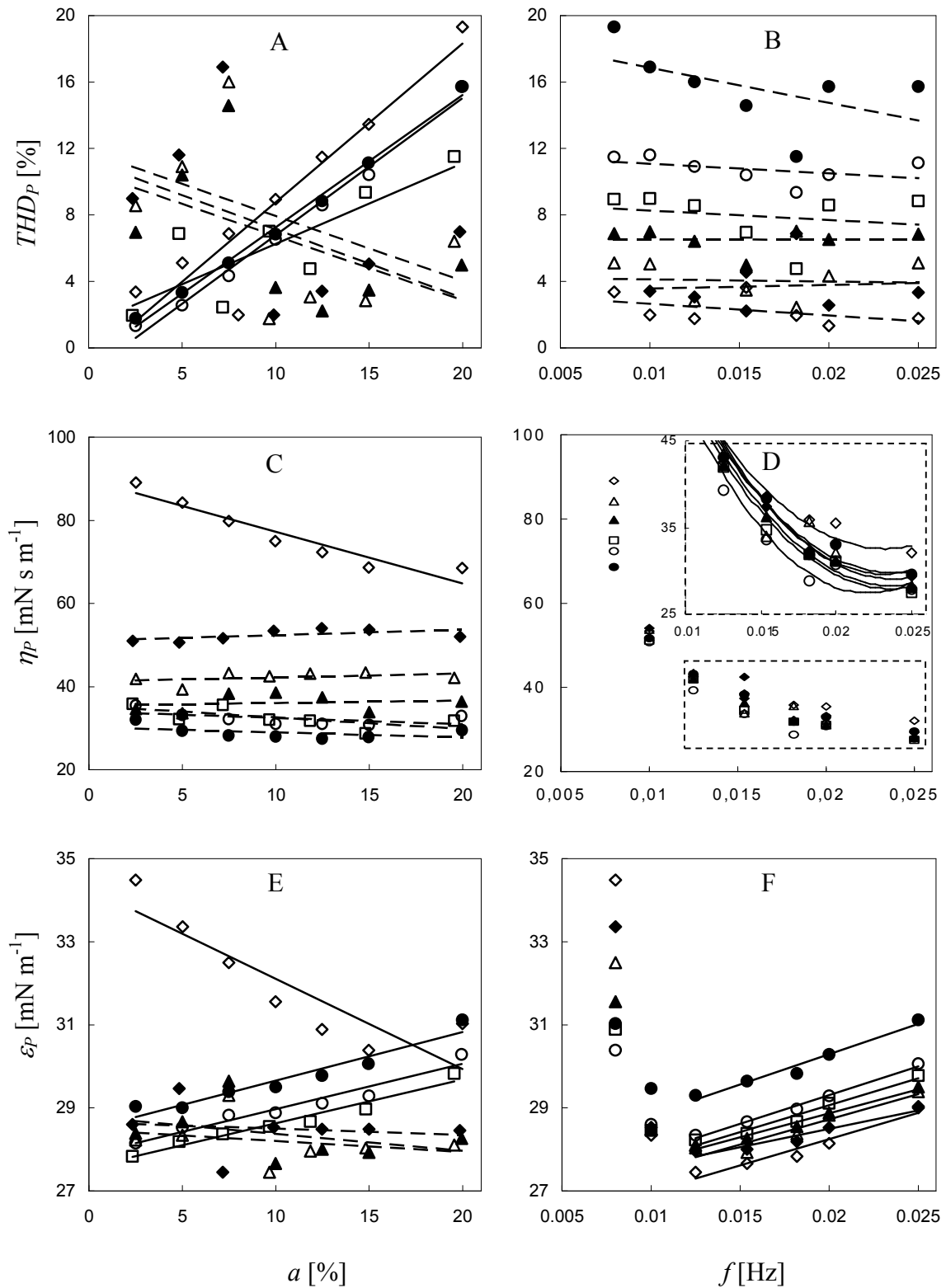


Abb. 2.8 DPPC-Monoschicht bei $\Pi = 17,7 \text{ mN m}^{-1}$ und $25,3 \text{ }^\circ\text{C}$. A, C, E: THD_P , η_P und ϵ_P abhängig von a bei verschiedenen f : (\diamond) 8 mHz; (\blacklozenge) 10 mHz; (\triangle) 12,5 mHz; (\blacktriangle) 15,4 mHz; (\square) 18 mHz; (\circ) 20 mHz; (\bullet) 25 mHz. B, D, F: THD_P , η_P und ϵ_P abhängig von f bei verschiedenen a : (\diamond) 2,5 %; (\blacklozenge) 5,0 %; (\triangle) 7,4 %; (\blacktriangle) 9,9 %; (\square) 12,4 %; (\circ) 15,0 %; (\bullet) 19,9 %.

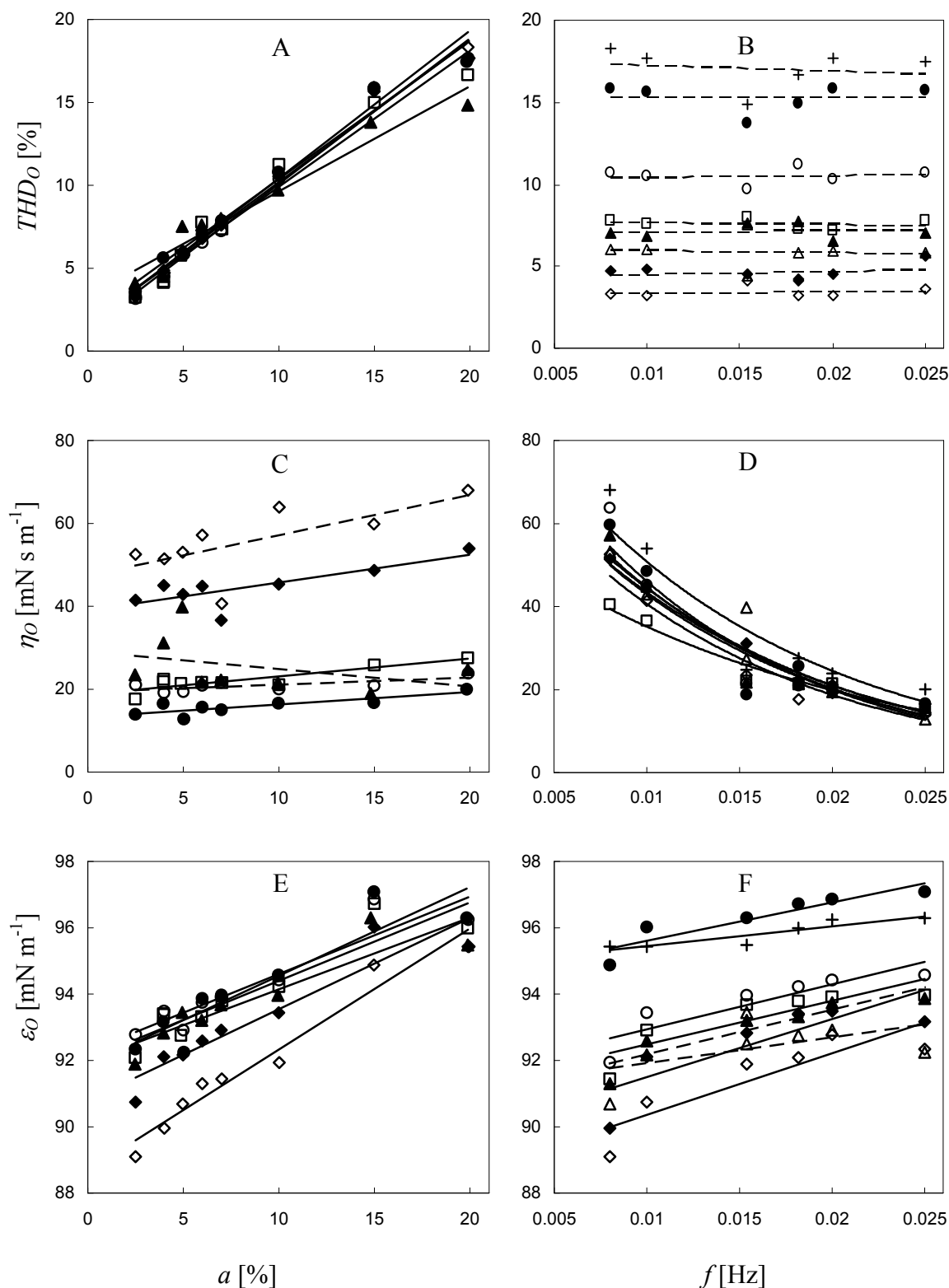


Abb. 2.9 DOPC-Monoschicht bei $\Pi = 21,0 \text{ mN m}^{-1}$ und $21,2 \text{ }^\circ\text{C}$. A, C, E: THD_0 , η_0 und ε_0 abhängig von a bei verschiedenen f : (\diamond) 8 mHz; (\blacklozenge) 10 mHz; (\blacktriangle) 15,4 mHz; (\square) 18 mHz; (\circ) 20 mHz; (\bullet) 25 mHz. B, D, F: THD_0 , η_0 und ε_0 abhängig von f bei verschiedenen a : (\diamond) 2,5 %; (\blacklozenge) 4,0 %; (\triangle) 5,0 %; (\blacktriangle) 6,0 %; (\square) 7,0 %; (\circ) 10,0 %; (\bullet) 15,0 %; ($+$) 20,0 %.

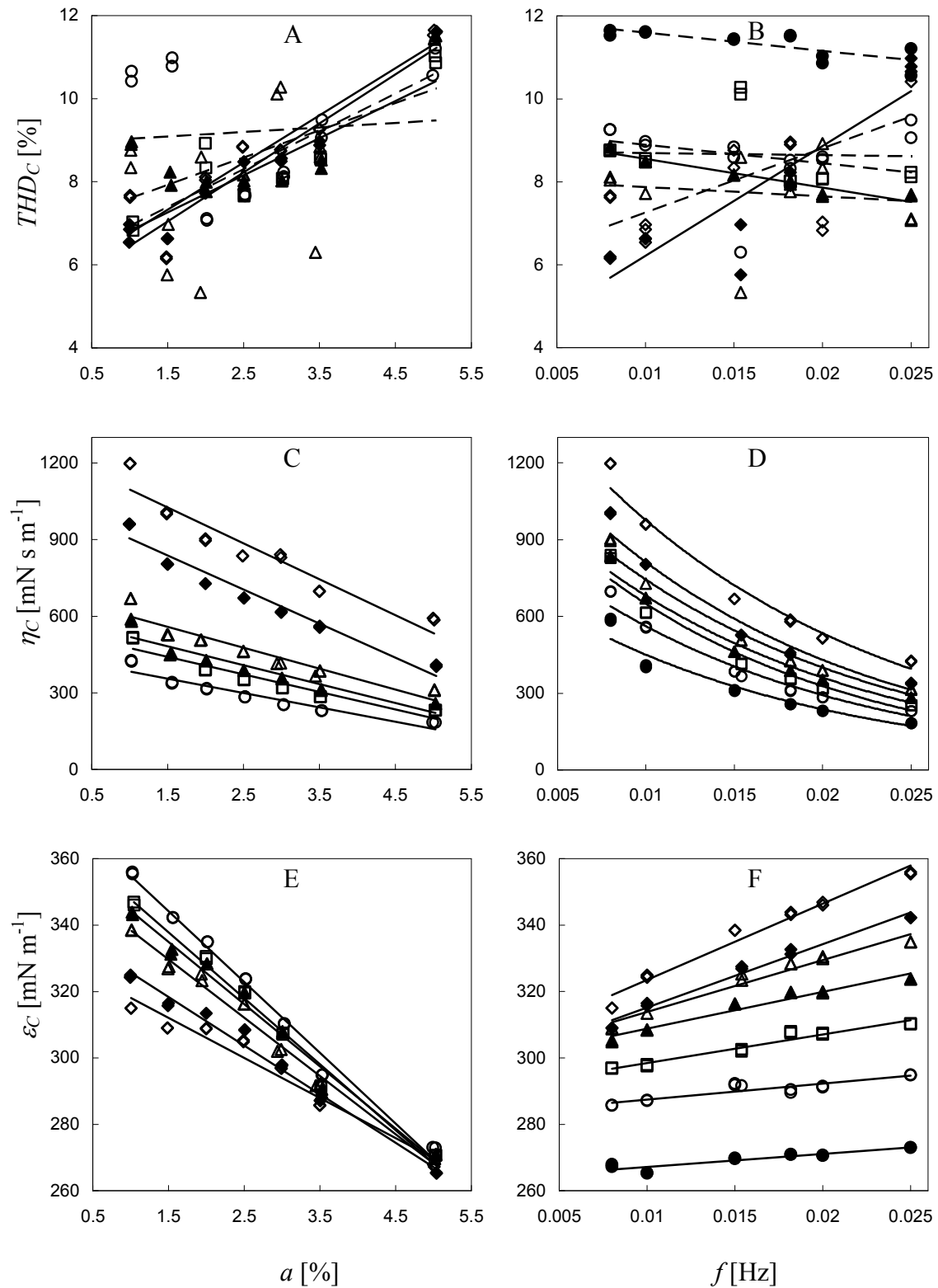


Abb. 2.10 Cholesterol-Monoschichten bei $\Pi = 16,0 \text{ mN m}^{-1}$ und $27,2 \text{ }^\circ\text{C}$. A, C, E: THD_C , η_C und ϵ_C abhängig von a bei verschiedenen f : (\diamond) 8 mHz; (\blacklozenge) 10 mHz; (\triangle) 15 mHz; (\blacktriangle) 18 mHz; (\square) 20 mHz; (\circ) 25 mHz. B, D, F: THD_C , η_C und ϵ_C abhängig von f bei verschiedenen a : (\diamond) 1,0 %; (\blacklozenge) 1,5 %; (\triangle) 2,0 %; (\blacktriangle) 2,5 %; (\square) 3,0 %; (\circ) 3,5 %; (\bullet) 5,0 %.

2.1.4 Abhängigkeit von η und ε vom Filmdruck

Abb. 2.11 zeigt η und ε abhängig von Π für DPPC, DOPC und Cholesterol. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse mit $a = 1,5$ und $2,5$ % für DPPC (A und B) und für Cholesterol (E und F) und nur mit $a = 2,5$ % für DOPC (C und D) gemessen.

In Abbildungen A-D zeigen die gefüllten und ungefüllten Kreise die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen, um deren Wiederholbarkeit nachzuweisen.

Wie man in Abb. 2.11 sehen kann, steigt η_P normalerweise monoton, jedoch zeigt η_P für $a = 1,5$ % ein Plateau im Bereich $17 < \Pi < 25 \text{ mN m}^{-1}$. Aber für $a = 2,5$ % ist kein Plateau zu sehen, sondern es ist ähnlich wie DOPC. η_O steigt mit Π monoton und ohne deutliche Knicke (Abb. 2.11 C). Die Viskosität des gesättigten PC (DPPC) ist immer höher als die des ungesättigten PC (DOPC), d.h. $\eta_P \geq \eta_O$ für alle Π . Für $\Pi > 30 \text{ mN m}^{-1}$, ist η_P (das mit $a = 1,5$ % gemessen wurden) ungefähr doppelt so hoch wie η_O .

In Abb. 2.11 B kann man sehen, dass es bis zu $\Pi \leq 18 \text{ mN m}^{-1}$ keinen Unterschied gibt zwischen ε_P , das mit den beiden Amplituden gemessen wurden, wobei für hohes Π die ε_P Kurven für die beiden Amplituden voneinander getrennt sind, aber noch parallel bleiben. Das Plateau für ε_P mit $a = 2,5$ % ist bei $13,5 < \Pi_P < 18 \text{ mN m}^{-1}$, wohingegen das für $a = 1,5$ % bei $13,5 < \Pi_P < 27 \text{ mN m}^{-1}$ ist. Es scheint, dass das Plateau von ε_P über einen leicht breiteren Filmdruckbereich als das von η_P verbreitet ist, wenn beide Kurven mit $a = 1,5$ % verglichen werden. Außerhalb des Plateaus steigt ε_P linear mit Π , die Steigung unterhalb des Plateaus ist 4,7 mal kleiner als die, die oberhalb des Plateaus ist. Ein ausführlicher Vergleich der ε_P Ergebnisse mit Ergebnissen, die in der Literatur publiziert sind und die mit statischen und dynamischen Messmethoden erreicht wurden, ist in Abb. 2.12 dargestellt.

Wie in Abb. 2.11 C und D für DOPC dargestellt, steigen η_O und ε_O fast linear mit Π ohne ein Plateau oder Knick wie bei η_P und ε_P . In diesem Fall gibt es keine Knicke, da DOPC keinen Phasenübergang in ihren Π/A_{mol} Isothermen zeigt [Dyнарowicz-Latka & Hac-Wydro, 2004, Lis et al., 1982, Nag & Keough, 1993, Okonogi & McConnell, 2004, Smaby et al., 1997, Tournois et al., 1989, Yan et al., 2005]. Bei Raumtemperatur ist DOPC bis zu dem Punkt des Monoschicht-Kollaps in der flüssigexpandierten Phase [Möhwald, 1995, Nag & Keough, 1993, Worthman et al., 1997, Yan et al., 2005]. Es ist bekannt, dass ungesättigte Doppel-Bindungen dazu tendieren, Unordnung in der hydrophoben Region zu erzeugen und damit die Bildung der flüssigkondensierten Phasen [Möhwald, 1995] zu verhindern.

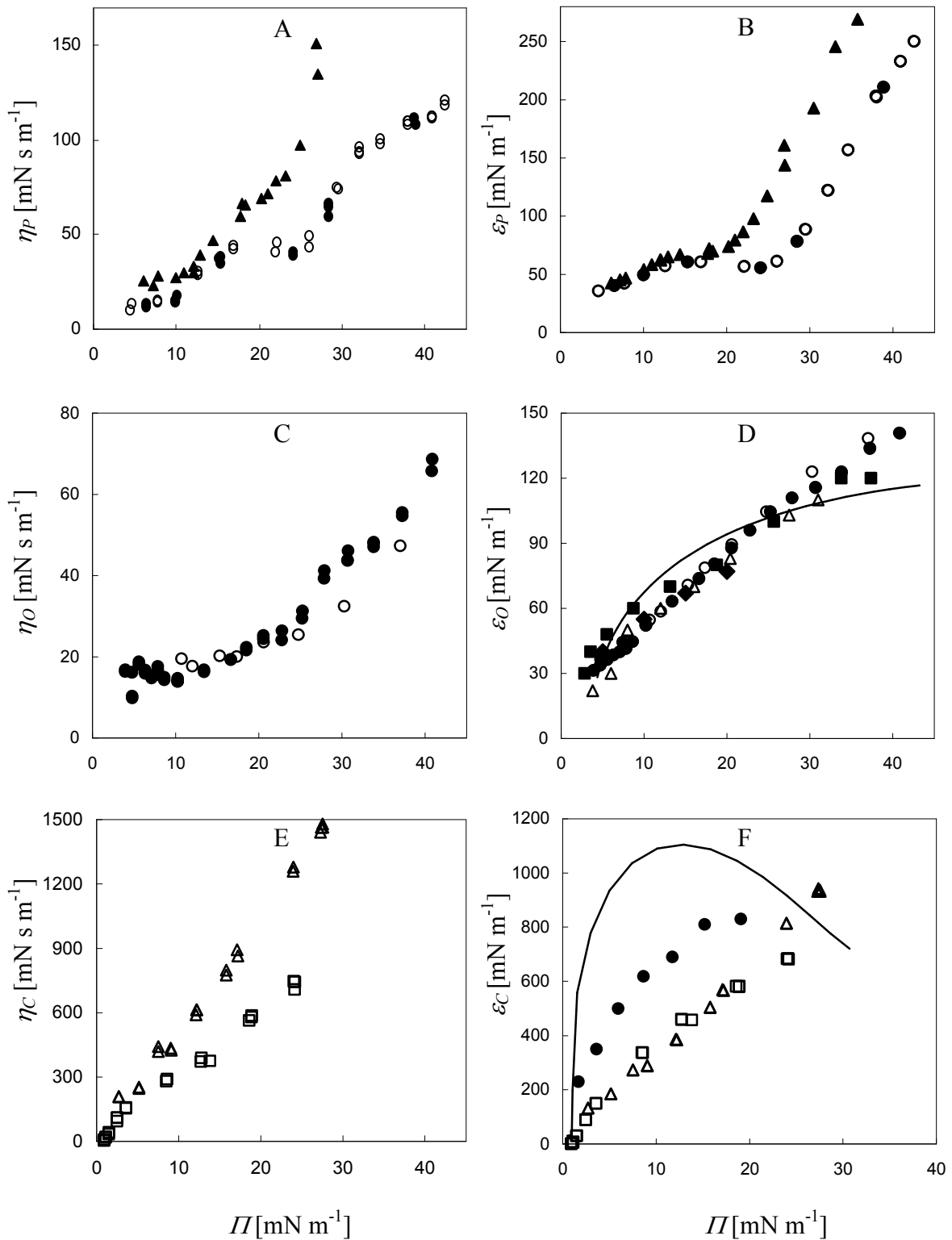


Abb. 2.11 Viskosität η und Elastizität ϵ von DPPC, DOPC und Cholesterol abhängig von Π für $f = 18$ mHz. A, B: η_P und ϵ_P , jeweils, bei $a = 1,5\%$ (\circ $25,2^\circ\text{C}$; \bullet $25,5^\circ\text{C}$), und bei $a = 2,5\%$ (\blacktriangle $24,0^\circ\text{C}$). C, D: η_0 und ϵ_0 , jeweils von zwei unabhängigen Messungen mit $a = 2,5\%$ (\circ , \bullet $22,3^\circ\text{C}$). Zum Vergleich enthält Diagramm D ϵ_0 Messdaten anderer Autoren, die durch statische Messungen an einer Langmuir-Filmwaage erzeugt sind: (\blacksquare 20°C) [Dynarowicz-Latka & Hac-Wydro, 2004]; (\triangle 24°C) [Smaby et al., 1997]; (— 22°C) [Yan et al., 2005]

(ε_0 berechnet durch Differenzierung einer passenden Kurve zu deren Π/A_{mol} Isotherme); (\blacklozenge 20 °C) [Tournois et al., 1989], Messdaten, erzeugt mit einer Langmuir-Filmwaage, die eine schwingende Barriere hat. E, F: η_C und ε_C , jeweils bei 26,2 °C ($\triangle a = 1,5 \%$; $\square a = 2,5 \%$). Zum Vergleich enthält Diagramm F ε_C berechnet von Π/A_{mol} Isothermen, die mit einer Langmuir-Filmwaage von [Albrecht, 1979] (— 24,9 °C) und von [Dynarowicz-Latka & Hac-Wydro, 2004] (\bullet 20 °C) gemessen und publiziert wurden.

Die gefüllten Symbole der Abb. 2.11 D zeigen ε_0 -Daten, die mit statischen und dynamischen Messungen gewonnen wurden. Statische Messungen haben [Dynarowicz-Latka & Hac-Wydro, 2004] mit einer Langmuir-Filmwaage (gefüllte Rechtecke) und [Smaby et al., 1997] (gefüllte Kreise) gemessen. Die gefüllten Rhomben zeigen dynamische Messungen von [Tournois et al., 1989], die eine Langmuir-Filmwaage mit einer oszillierten Barriere bei 0,5Hz benutzt haben. ε_0 ist aus einer Π/A_{mol} Isotherme entnommen, die von [Yan et al., 2005] publiziert wurde, und als schwarze Linie in Abb. 2.11 D dargestellt. Wie man sehen kann, stimmen die dynamischen Messungen sehr gut mit den statischen und dynamischen Ergebnissen der zitierten Autoren überein. Die leichte Abweichung der ε_0 -Kurve, die durch Differenzieren der Π/A_{mol} Isotherme von [Yan et al., 2005] berechnet wurde, könnte durch die unabwendbaren Ungenauigkeiten beim Ablesen der Isothermen-Kurven von gedruckten Diagrammen zu erklären sein. Dieses Verfahren kann nur Ergebnisse mit limitierter Genauigkeit erzeugen, hauptsächlich bei hohem Filmdruck wegen starken Steigung der Isothermen. Weil die Abweichung der Ergebnisse von Abb. 2.11 D immer kleiner als 20 % ist, kann man sagen, dass die ε_0 Kurven sehr gut übereinstimmen. Diese Limitierung der Genauigkeit betrifft alle statischen Elastizitätskurven, die nicht ε zeigen, sondern ε musste von Π/A_{mol} -Isothermen abgeleitet werden, wie unten dargestellt.

Abb. 2.11 E und F zeigen η_C und ε_C , die mit jeweils $a = 1,5 \%$ und $2,5 \%$ gemessen wurden. Man kann eine steile lineare Steigung beider η_C und ε_C mit steigender Π ohne ein Plateau sehen. Es gibt eine starke Abhängigkeit der η_C -Werte von a , wobei keine klare Abhängigkeit zwischen ε_C und a zu sehen ist. Für $\Pi \geq 10 \text{ mN m}^{-1}$ sind die Werte von η_C , die mit $a = 1,5 \%$ erzielt wurden, höher als diejenigen, die mit $a = 2,5 \%$ entstanden sind, in Übereinstimmung mit Abb. 2.10, wo nur für $\Pi = 16,0 \text{ mN m}^{-1}$ dargestellt ist. Zum Vergleich ist ε_C aus einem ε_C/A_{mol} Diagramm von [Dynarowicz-Latka & Hac-Wydro, 2004] (gefüllte Kreise) eingefügt. Sie haben ε_C durch Differenzieren der Π/A_{mol} Isotherme berechnet, die mit einer Filmwaage erstellt wurde. Die Linie in Abb. 2.11 F zeigt ε_C , die aus der Π/A_{mol} Isotherme von [Albrecht, 1979] berechnet wurde. In diesem Fall weichen die statischen Werte der ε_C von den hier dargestellten dynamischen Ergebnissen deutlich ab.

Die Isotherme von Cholesterol zeigt eine einzige Phase mit einem Kollaps-Filmdruck von ungefähr 45 mN m^{-1} , wo die Molekularfläche $\sim 39 \text{ \AA}^2$ ist [Albrecht et al., 1982, Worthman et al., 1997, Yuan & Johnston, 2002]. Es bleibt in der kondensierten Phase bis zum

Kollaps der Monoschicht [Worthman et al., 1997]. Wie in der Abb. 2.11 zu sehen ist, sind η_C und ε_C ungefähr zehn Mal höher als die Werte von DPPC und DOPC.

Abb. 2.12 zeigt einen Vergleich der ε_P mit Daten anderer Autoren, die sowohl mit der statischen als auch mit der dynamischen Methode erzeugt sind, und die durch Ableitung der Π/A_{mol} -Isothermen erlangt wurden, welche in thermodynamischem Gleichgewicht sein sollten. Außerdem werden in Abb. 2.12 Ergebnisse verglichen, die mit Hilfe zweier unterschiedlicher Messgeräte gewonnen wurden: Tropfenkontur-Tensiometer und Langmuir Filmwaage.

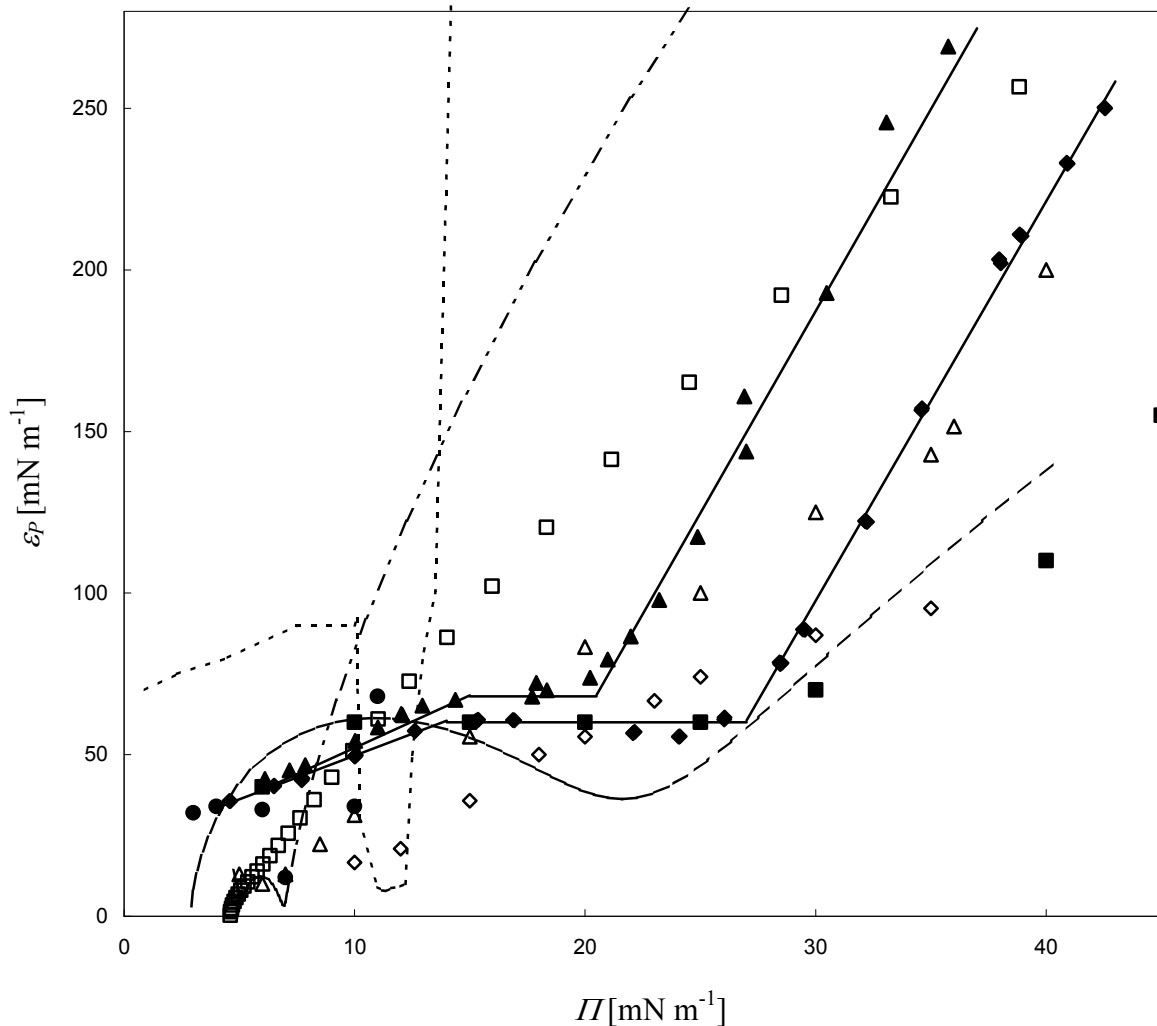


Abb. 2.12 DPPC-Elastizität gemessen mit dynamischen Methoden und berechnet aus Isothermen, die in thermodynamischem Gleichgewicht gemessen sind. Dynamische Ergebnisse in dieser Arbeit mit PAT erzeugt (\blacklozenge 25,2 °C und 25,5 °C, $a = 1,5\%$; \blacktriangle 24,0 °C, $a = 2,5\%$), von [Wüstneck et al., 1999b] mit PAT (\blacksquare 20 °C) und von [Krägel et al., 1996a, Krägel et al., 1996b] mit eine Langmuir Filmwaage, die eine oszillierende Barriere hat (\bullet 20 °C). ε_P berechnet aus Π/A_{mol} -Isothermen, die in dieser Arbeit mit PAT ($- - -$ 22,4 °C) und von [Wüstneck et al., 1999b] (\square 20 °C, $- - -$ 30 °C), oder mit eine Langmuir Filmwaage von [Albrecht et al., 1982] ($- - - -$ 24,9 °C) und von [Pawelec & Sosnowski] (\triangle 20 °C; \diamond 25 °C) erzielt wurden.

Zuerst werden die ε_p Werte, die mit dynamischen Methoden erzielt wurden, verglichen. Lineare Regressionen der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sind als durchgezogene Linien dargestellt. Für $\Pi \leq 27 \text{ mN m}^{-1}$ stimmen die ε_p Werte für $a = 1,5 \%$ sehr gut mit denen von [Wüstneck et al., 1999b] überein. Sie haben die Monoschicht mit einem Tropfenkontur-Tensiometer, wie in [Wüstneck et al., 1997] beschrieben, schrittweise komprimiert. Für $\Pi > 27 \text{ mN m}^{-1}$ ist das Plateau von ε_p zu Ende und in dem Bereich steigt deren ε_p Kurve weniger stark an. Zusätzlich haben sie für $\Pi > 25 \text{ mN m}^{-1}$ brüchige Monoschichtenstrukturen und Abbrüche festgestellt. Weiterhin sind die hier dargestellten Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit denen von [Krägel et al., 1996a, Krägel et al., 1996b], die eine modifizierte Langmuir-Waage mit einer oszillierenden Barriere benutzt haben.

Bei der Betrachtung der statischen Elastizitätswerte, die von Π / A_{mol} Isothermen berechnet wurden, kann man sehen, dass diese die gleiche Größenordnung und ungefähr die gleiche Tendenz haben, wie die mit dynamischen Methoden erzielten Werte. Um die statischen ε_p Kurven von Abb. 2.12 zu diskutieren, müssen zuerst die DPPC Π / A_{mol} Isothermen von Abb. 2.13 eingefügt werden. Diese sind mit beiden: PAT- und Langmuir-Waage-Messungen von verschiedenen Autoren erstellt worden. Die Isothermen, die mit PAT bei $22,4 \text{ }^\circ\text{C}$ erstellt wurden, nähert sich der Isotherme von [Wüstneck et al., 1999b] an, die auch mit PAT bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen haben. Die erste Isotherme hat das Plateau bei $\sim 6 \text{ mN m}^{-1}$ (für $22,4 \text{ }^\circ\text{C}$), wobei die letzte bei $\sim 4 \text{ mN m}^{-1}$ (für $20 \text{ }^\circ\text{C}$) lag.

Die Isotherme, die mit einer Langmuir Filmwaage bei $24,9 \text{ }^\circ\text{C}$ von [Albrecht et al., 1982] erstellt wurde, hat bei $\sim 11 \text{ mN m}^{-1}$ ein Plateau. Für statische PAT Messungen [Wüstneck et al., 1999b] gibt es bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ kein Plateau mehr. Bei hohen Temperaturen ist das Plateau durch eine gerade Steigung ersetzt worden (siehe Abbildungen 3 und 4 von [Wüstneck et al., 1999b]), welche einer konstanten ε_p für diesen Bereich entspricht. Wie man in der Abb. 2.13 sehen kann, sind die Isothermen stark temperaturabhängig, wobei alle fast die gleiche Form zeigen. Aufgrund von unterschiedlichen Temperaturen können die Unterschiede zwischen den beiden Messmethoden (PAT und Langmuir Filmwaage) nicht festgestellt werden. Allerdings ist gezeigt worden [Wüstneck et al., 1999b], dass beide Methoden identische Messwerte unter optimierten Ausbreitungsbedingungen liefern, wobei nicht-optimierte Ausbreitungsbedingungen die PAT Messungen stark beeinflussen können.

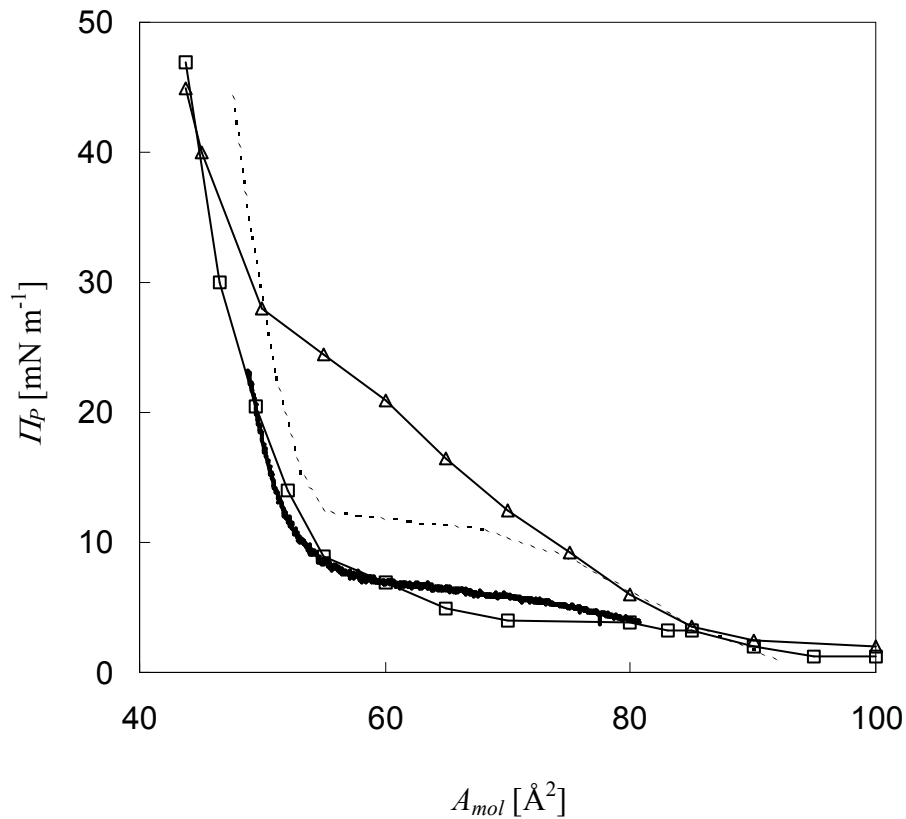


Abb. 2.13 DPPC-Isotherme in dieser Arbeit mit PAT statisch gemessen (— 22,4 °C) im Vergleich mit Ergebnissen von [Wüstneck et al., 1999b] mit PAT ($\text{--}\square\text{--}$ 20 °C, $\text{--}\triangle\text{--}$ 30 °C) und von [Albrecht et al., 1982] mit eine Langmuir Filmwaage (- - - 24,9 °C).

Zurück zu Abb. 2.12 kann man sehen, dass die Elastizitätskurven, die von Π/A_{mol} Isothermen berechnet sind, stark abweichen. Für Π/A_{mol} Isothermen, die ein Plateau haben, was einen Übergang zwischen einer flüssigexpandierten (LE) und einer flüssigkondensierten (LC) Phase bedeutet, haben die Elastizitätskurven ein Minimum. Das sieht man für die berechnete ε_p anhand von Π/A_{mol} Isothermen, die mit PAT bei 22,4 °C erzielt wurden (die gestrichelte, zweipunktierte Linie in Abb. 2.12). Das Gleiche kann man für die ε_p Werte sehen, die aus Isothermen (Filmwaage, 24,9 °C) von [Albrecht et al., 1982] berechnet sind (die kurz-gestrichelte Linie in Abb. 2.12).

Das Minimum der ε_p liegt bei $\Pi = 7 \text{ mN m}^{-1}$, wobei das Minimum von [Albrecht et al., 1982] berechneten Kurven bei $11 < \Pi < 12 \text{ mN m}^{-1}$ liegt. ε_p berechnet von einer Isotherme, die mit PAT bei 20 °C von [Wüstneck et al., 1999b] erzeugt wurde, steigt monoton mit Π (leere Quadrate), wobei sie bei 30 °C ein Minimum bei $\Pi = 22 \text{ mN m}^{-1}$ (lang-gestrichelte Linie) zeigt. ε_p berechnet von Isothermen der [Pawelec & Sosnowski] bei zwei unterschiedlichen Temperaturen, monoton steigend (leere Dreiecke und Rhomben).

Mit steigendem T sinkt die Dehnungselastizität, die von der Isotherme berechnet wurde. Das kann man anhand der beiden Datenreihen bei unterschiedlichen Temperaturen

sehen, die mit PAT von [Wüstneck et al., 1999b] und mit einer Langmuir-Filmwaage von [Pawelec & Sosnowski] erzeugt wurden.

Dynamische Methoden zeigen ein Plateau von ungefähr konstanten Elastizitätswerten für einen bestimmten Π -Bereich. Statische (Gleichgewicht) Methoden zeigen ein Minimum der Elastizität für den Bereich des Plateaus der Π/A_{mol} Isothermen, außerdem gibt es eine monotone Steigung. Also sind die Unterschiede der Oberflächenelastizität der DPPC hauptsächlich von dynamischen und statischen Messbedingungen beeinflusst, wobei es für Π/A_{mol} Isothermen bei thermodynamischem Gleichgewicht eine gute Übereinstimmung zwischen PAT- und Langmuir-Filmwaage-Messungen, wie in Abb. 2.13 gezeigt, gibt.

2.1.5 Diskussion

Die Frequenzabhängigkeit von η und ε für beide Phospholipide und Cholesterol ist ein klarer Beweis einer spezifischen Zeitskala für die Reorganisationsprozesse bei Monoschichten.

Wenn eine Monoschicht unendlich schnell komprimiert wird, wie in Abb. 2.14 (a) durch die dicke schwarze Linie schematisch dargestellt, steigt ihr Filmdruck vom Gleichgewichtswert Π_∞ auf Π_0 (siehe Abb. 2.14 (b)). Bei einer sehr schnellen Flächenkompression ist Π_0 höher als der Filmdruck des Gleichgewichtszustandes bei der entsprechenden neuen Fläche A_0 . Den neuen Gleichgewichtswert Π_e kann man aus der Π/A_{mol} Isotherme ablesen, siehe Abb. 2.13.

Wenn die Monoschicht langsam komprimiert wird, ist sie während der Kompression immer in dem Gleichgewichtszustand $\Pi_e(t)=f(A)$ (ähnlich wie die Messung einer Π/A_{mol} Isotherme). Dies ist in Abb. 2.14 (a) und (b) durch schwarze Punkte schematisch dargestellt, jeweils für A und Π . Weil am Zeitpunkt t_0 der Druck Π_0 größer als der Gleichgewichtswert ist, konform mit dem Prinzip von Braun-Le Châtelier, sinkt der Filmdruck in der Zeit bis zum Gleichgewichtswert Π_e [Joos et al., 1992]. Die benötigte Zeit für das Erreichen des Gleichgewichts ist die Relaxationszeit $\tau = t_e - t_0$. Neben τ benutzt man gerne für die Relaxationsprozesse die Relaxationszeit-Konstante: $k = 1/\tau$ [s^{-1}] oder [Hz].

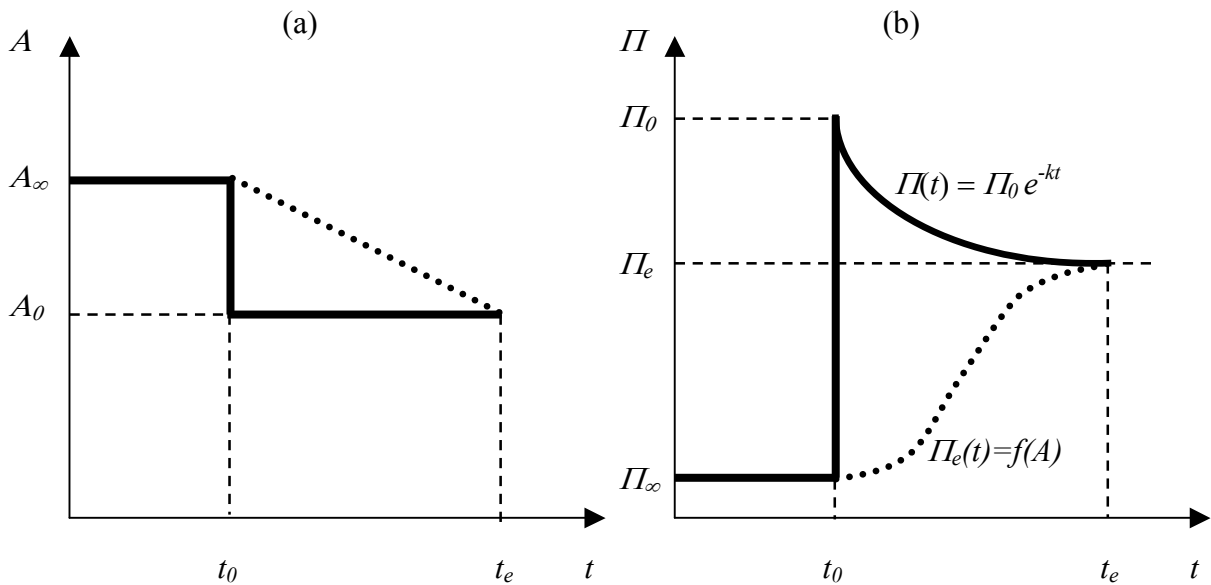


Abb. 2.14 Schematische Darstellung der Kompression der Fläche (a) und der Antwort des Filmdrucks (b) einer Monoschicht. Die dicke schwarze Linie stellt eine unendlich schnelle, die gepunktete Linie eine langsame Kompression in der Relaxationszeit $t_e - t_0$ dar.

Entsprechend dem generalisierten Maxwell-Modell der Viskoelastizität (auch Maxwell-Weichert-Modell genannt) kann man die Relaxation mit einer parallelen Darstellung von einer elastischen Feder und einiger Paare elastischer Federn (mit elastischem Modul E_i) vergleichen, verbunden in Serie mit einem viskosen Dämpfer (mit Viskosität η_i), wie in Abb. 2.15 schematisch dargestellt.

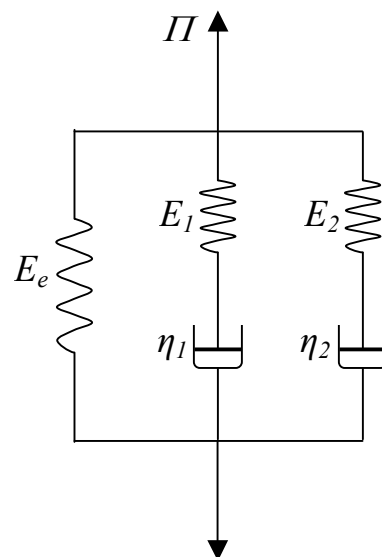


Abb. 2.15 Schema des generalisierten Maxwell-Modells der Viskoelastizität mit zwei Feder/Dämpfer-Paaren für die Darstellung des Relaxationsverhaltens der DPPC Monoschicht.

Jedes Feder/Dämpfer-Paar hat seine eigene konstante Relaxationszeit $\tau_i = \eta_i/E_i$ ($i = 1, 2$), welche die Verteilung der Relaxationszeit des gesamten Systems beeinflussen. Für Oszillationen mit einer Periode $t < \tau_i$ wirkt das Feder/Dämpfer-Paar mehr zu den elastischen Eigenschaften mit, für $t > \tau_i$ mehr zu den viskosen Eigenschaften.

Anhand von Stress-Relaxation-Experimenten hat [Joos et al., 1992] den Abfall des Filmdrucks mit der Zeit und seine Annäherung an den Gleichgewichtswert nach einer schrittweisen Kompression durch ein rheologisches Modell mit zwei unabhängigen Frequenzkonstanten k_1 und k_2 erklärt:

$$\Delta\Pi(t) = \Pi_0 [\beta \exp(-k_1 t) + (1-\beta)\exp(-k_2 t)] \quad \text{mit} \quad 0 \leq \beta \leq 1.$$

Obwohl deren Werte für DPPC und Cholesterol stark streuen, ermöglichen sie es doch, die Größenordnung des Relaxationsprozesses zu bewerten. Für DPPC ist $k_1 = 13,0 \pm 6,1$ mHz (Mittelwert \pm Standardabweichung), $k_2 = 0,46 \pm 0,24$ mHz mit dem Partitionsfaktor $\beta = 0,25 \pm 0,09$. Beide k_1 und k_2 sind nicht signifikant mit Π für den gesamten Messbereich $3 \leq \Pi \leq 25$ mN m⁻¹ ($p > 0,1$) korreliert. Bei der Abschätzung der Stressrelaxation mit einer einzigen Konstante hat [Wüstneck et al., 1999b] gefunden, dass die Frequenzkonstante bei ~ 16 mHz für Kompression und bei ~ 18 mHz für Expansion liegt, für eine breite Variation der spezifischen Oberfläche A ($45 \leq A \leq 65$ Å² was $5 \leq \Pi \leq 30$ mN m⁻¹ entspricht). Nur für den höchsten Filmdruck ($\Pi \approx 47$ mN m⁻¹) haben sie die Konstante bei ~ 14 mHz für Kompression und Expansion gefunden.

Die Frequenzkonstante k_1 und die Konstanten, die von [Wüstneck et al., 1999b] publiziert sind, stimmen sehr gut mit dem Minimum von ε_p überein, das bei 12,5 mHz gefunden wurde.

Man kann die Zufälligkeit des ε_p Minimums mit der Relaxationsfrequenz von [Joos et al., 1992] und [Wüstneck et al., 1999b] wie folgt interpretieren: Wenn die harmonischen Oszillationen für ε_p Messungen in den Bereich der k_1 ankommen, dann ist die elastische Antwort minimiert.

Es bleibt die Frage: warum steigt ε_p für $f < 12,5$ mHz? Nach [Joos et al., 1992] muss eine zweite Relaxationszeit-Konstante $k_2 = 0,46 \pm 0,24$ mHz beachtet werden, da ihr Einfluss auf den Relaxationsprozess durch $\beta = 0,25 \pm 0,09$ viel größer als der von k_1 ist.

Leider kann man keine ähnlichen Ergebnisse von theoretischen oder experimentellen Studien in der Literatur finden, die ein lokales Minimum der Elastizität einer viskoelastischen Substanz beschreiben. Deshalb kann man nur schätzen, in Begriffen des Maxwell-Modells gesprochen, dass ein Kopplungseffekt verschiedener Elastizitätsmodule (ε_i) für Oszillationsperioden kleiner als τ_i entstehen kann, was die totale Systemelastizität für einige Frequenzbereiche verstärken kann. Die Kopplung verschiedener Faktoren, die zur Molekularrelaxation beitragen, kann dann der Grund für eine lokale Steigung der scheinbaren

Elastizität der Monoschichten bei Erniedrigung von f sein. Allerdings würde eine Erweiterung des Frequenzbereichs für zukünftige Messungen weit unter k_2 notwendig sein, um einen stabilen Hintergrund für die Interpretation dieses Effekts zu erzeugen. Für Cholesterol fand [Joos et al., 1992]: $k_1 = 538 \pm 268$ mHz, $k_2 = 40,7 \pm 26,7$ mHz mit dem Partitionsfaktor $\beta = 0,27 \pm 0,30$. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigt ε_C eine leicht monotone Steigung von 14 % (für die kleinste Amplitude $a = 1$ %) bei steigendem f für den untersuchten Bereich ($8 \leq f \leq 25$ mHz). Das Ausbleiben eines Minimums in diesem Fall kann als eine Konsequenz des gewählten Frequenzbereichs der durchgeführten Messungen interpretiert werden, dessen Frequenzen kleiner als die oben genannten Relaxationsfrequenzen k_1 und k_2 sein sollten. Das bedeutet, dass die Cholesterol-Monoschicht genug Zeit hat, um sich in der Zeit eines Oszillationszyklus komplett einzustellen.

Da keine Stress-Relaxationsmessungen für DOPC oder andere ungesättigte Phospholipide gefunden wurden, gibt es keine sichere Grundlage, um die ε_0 Frequenzabhängigkeit zu interpretieren.

Jetzt wird die Frequenzabhängigkeit der Viskosität diskutiert. Ein starker Abfall von η mit steigendem f ist auch von [Wüstneck et al., 1999a] für DPPG veröffentlicht worden. Sie interpretieren das in Analogie zu den „shear thinning“ Eigenschaften einiger Flüssigkeiten, wie „strukturierte Viskosität“. Während [Wüstneck et al., 1999a] für DPPG ein lokales Minimum der η bei ~ 18 mHz und ein Anstieg von η bei höheren f gefunden haben, ließ sich für DPPC, DOPC und Cholesterol kein Minimum im gewählten Messbereich finden. Es scheint im Gegenteil, dass die ermittelten Dehnungviskositätskurven ein Minimum bei höheren f haben. Diese Fakten kann man dahingehend interpretieren, dass die Dehnungviskosität höher ist, wenn die Monoschicht einen Relaxationszustand erreicht hat und kleiner ist, wenn die Monoschicht in einem gestressten oder unrelaxierten Zustand ist, was in guter Übereinstimmung mit dem oben genannten generalisierten Maxwell-Modell ist. Weil die Viskosität eine Diffusion des Impulses durch molekulare Interaktion ist, bedeutet das, dass Wechselwirkungen in den entspannten stärker als in unentspannten (gestressten) Zuständen vorhanden sind.

Diese Zusammenfassung kann auch für die Amplitudenabhängigkeit von η benutzt werden, siehe Diagramme C von Abb. 2.8 bis Abb. 2.10. Wie in Abb. 2.10 D für Cholesterol zu sehen ist, ist η_C am höchsten für die kleinste Amplitude $a = 1,0$ % und sinkt bis 49 % von seinem maximalen Wert, wenn a bis 5 % steigt. Das zeigt, dass eine Cholesterol-Monoschicht bei $\Pi_C = 16,0$ mN m⁻¹ sehr empfindlich gegenüber Flächenvariationen ist. Sie ist gleich in einen Spannungszustand transferiert, und es entsteht somit eine Senkung der Molekularwechselwirkung. Für DPPC entsteht eine Amplitudenabhängigkeit von η_P nur bei der kleinsten Frequenz $f = 8$ mHz, wobei η_P für alle anderen Frequenzen von a nicht beeinflusst ist. Das bedeutet, dass nur für $f = 8$ mHz eine DPPC Monoschicht genug entspannt

ist, um empfindlich für den Anstrengungseffekt von einer steigenden Oszillationsamplitude zu sein. Da Amplitudeneffekte für η_0 nicht systematisch sind, werden sie nicht interpretiert.

Es folgt nun eine Besprechung der Amplitudeneffekte der Oberflächenelastizität. Mit steigendem a sinkt ε_C für alle f für Cholesterol, wobei ε_0 für DOPC ansteigt. Für DPPC sinkt und steigt ε_P : für $f = 8$ mHz sinkt es mit steigendem a , für $10 \leq f \leq 15$ mHz ist es unabhängig von a , und für $f \geq 18$ mHz steigt ε_P mit steigendem a . Das bedeutet, dass unterhalb der Relaxationsfrequenz $f \approx 12,5$ mHz, DPPC die gleiche Amplitudenabhängigkeit wie Cholesterol und oberhalb dieser Relaxationsfrequenz die Amplitudenabhängigkeit wie DOPC hat.

Wie oben erwähnt, ist die Cholesterol-Monoschicht in einem (fast) entspannten Zustand in dem hier untersuchten Frequenzbereich, der kleiner als die zwei Relaxationsfrequenzen k_1 und k_2 ist. Man interpretiert diesen Effekt mit Hilfe des allgemeinen Maxwell-Modells der Viskoelastizität, das einige elastische Federn und viskose Dämpfer enthält. Die elastische potentielle Energie E jeder Feder i ist von $E_i = \varepsilon_i x^2 / (2l)$ gegeben, wo x die Deformation darstellt und l die Länge der Feder. Da größere Oszillationsamplituden a des Tropfens größeren Federdeformationen x entsprechen, sinkt die totale Elastizität und steigt die elastische Potenzialenergie der Monoschicht weniger als mit a^2 . Das bedeutet, dass weniger elastische potentielle Energie in der Monoschicht verbraucht wird, als man von einer linearen Spannungs-/Deformations-Antwort bei konstanten ε erwarten würde. Deshalb muss die Änderung von ε mit steigendem a als ein nichtlinearer Effekt gedeutet werden. Da sich die Cholesterol-Monoschicht in einem geordneten, festen Zustand befindet, senken die hohen Amplituden den Ordnungsgrad und damit auch die Möglichkeit, die elastische potentielle Energie zu konservieren. Im Gegensatz zu Cholesterol befindet sich DOPC für den gesamten Filmdruckbereich in einem flüssigexpandierten Zustand, der eine niedrige Ordnung hat. In diesem Fall steigt bei hohen Amplituden anscheinend die Menge der elastischen potentiellen Energie an, die in der Monoschicht konservierbar ist, was möglicherweise von einer leichten Zunahme der Ordnung begleitet wird.

Es scheint so, dass die Relaxationsfrequenz k_1 für DPPC ein kritischer Parameter für die Oszillationsfrequenzen $f < k_1$ ist, wo der erste Schritt des Relaxationsprozesses fertig sein sollte. Hohe Amplituden senken ε_P und möglicherweise induzieren sie auch eine Senkung der Ordnung. Für die Oszillationsfrequenzen $f > k_1$ hoher Amplituden steigen ε_P und induzieren voraussichtlich auch eine Steigerung der Ordnung. Es ist beachtenswert, dass THD_P -Abhängigkeit von a bei der Relaxationsfrequenz $f \approx 12,5$ mHz empfindlich ist, weil für $f = 10$; 12,5 und 15,4 mHz, THD_P nicht mit a steigt und sehr kleine THD_P -Werte zeigt. Außerhalb dieses Frequenzbereichs ($f = 8$; 18; 20 und 25 mHz) steigt THD_P mit steigendem a .

Wie können ein entspannter und ein gespannter Zustand in deren Strukturen unterschiedlich sein? Wie unten für DPPC im Detail diskutiert wird, ist diese Monoschicht in einem Koexistenz-Zustand von flüssigkristallinen, Mikrometer großen Domänen, die als

Umgebung eine flüssige Monoschichtphase in flüssigexpandiertem Zustand [Kretzschmar et al., 1996] bei $\Pi_p = 17,5 \text{ mN m}^{-1}$ (siehe Abb. 2.8) haben. Die Kompression und Expansion der Monoschicht durch harmonische Oberflächenänderungen verändern die Größe und die Form der Domänen. Es ist gezeigt worden, dass schnellere Kompressions-/Expansions-Raten zu kleineren Domänen [Nag & Keough, 1993] führen. Einige zyklische Änderungen zwischen kleinem und großem Filmdruck führen zu „snowstorm“ Schneesturm-Muster – viele ähnliche und kleine Domänen [Okonogi & McConnell, 2004]. Im Gegensatz dazu ist Cholesterol in einer flüssigkristallinen Phase [Albrecht et al., 1982] bei $\Pi_c = 16,0 \text{ mN m}^{-1}$ (wie für Abb. 2.10 benutzt), wobei DOPC in einem flüssigexpandierten Zustand bei $\Pi_o = 21,7 \text{ mN m}^{-1}$ ist (wie bei Abb. 2.9). Für die letzten zwei sind keine Domänen gefunden worden. Das sollte für die oben diskutierten Relaxationsprozesse berücksichtigt werden.

Nun soll die Abhängigkeit der η und ε vom Filmdruck Π diskutiert werden. Schaut man erst ε_p an, kann man ein Plateau bei $13,5 \leq \Pi \leq 27 \text{ mN m}^{-1}$ (für $a = 1,5 \%$) sehen, das einigermaßen gut mit den Phasenübergängen für $\Pi = 12$ und 25 mN m^{-1} von [Albrecht et al., 1982] übereinstimmt. Der erste Phasenübergang, der bei $\Pi = 12 \text{ mN m}^{-1}$ liegt, beschreibt [Albrecht et al., 1982] als „die flüssige Linie, was die Phasen mit flüssigem DPPC von den Phasen mit kristallinen Lecithin trennt“. [Albrecht et al., 1982] beschreiben nicht ihren zweiten Phasenübergang, wobei man diese deutlich von ihren Kompressionsdaten (Abbildung 4) ablesen kann. Wie für viele Isothermen beschrieben ist, z.B. für DMPE (siehe [Helm et al., 1991]), ist der Knick der Isothermen bei einem Filmdruckbereich von $25 - 30 \text{ mN m}^{-1}$ als ein Übergang zwischen einer Koexistenzregion und einer homogenen Festphase beschrieben. Deshalb kann zusammenfassend, durch die dynamischen Oberflächenelastizitätsmessungen von ε_p , festgestellt werden, dass in der Koexistenzregion kristalline DPPC-Domänen in eine flüssiger Monoschichtphase eingebettet bleiben. Im Gegensatz dazu, weisen die im Gleichgewicht gemessenen Π/A_{mol} -Isothermen ein Plateau in Π nur im unteren Bereich der Koexistenzregion auf.

Warum weichen die beiden ε_p Kurven, die mit $a = 1,5$ oder $2,5 \%$ gemessen sind, bei Filmdruck $\Pi > 18 \text{ mN m}^{-1}$ ab? Unter Berücksichtigung der Π/A_{mol} -Isothermen von Abb. 2.13 kann man sehen, dass wenn die Fläche A mit $2,5 \%$ bei $\Pi = 18 \text{ mN m}^{-1}$ reduziert ist, diese Kompression einen Filmdruck von $\Pi = 23 \text{ mN m}^{-1}$ erzeugt. Das bedeutet, dass während jedem Kompressionszyklus ein Phasenübergang zum Festzustand für $\Pi > 18 \text{ mN m}^{-1}$ vorkommt, wenn $a = 2,5 \%$ benutzt wird. Folglich sollten wegen der hohen Steigung von Π bei kleinen Flächen A nur kleine Oszillationsamplituden a benutzt werden. Deshalb berücksichtigt man für $\Pi > 18 \text{ mN m}^{-1}$ nicht mehr die η_p und ε_p Kurven, die mit $a = 2,5 \%$ gemessen wurden.

2.1.6 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung des Einflusses von Amplitude a und Frequenz f der harmonischen Oszillation der Fläche auf die totalen harmonischen Störungen (THD), konnte gezeigt werden, dass f die THD -Werte nicht beeinflusst, wobei die THD -Werte mit steigendem a in viele, aber nicht in allen Fällen ansteigen. Die Frequenz f beeinflusst deutlich beide ε und η . Für DPPC konnte man zeigen, dass ε_p ein Minimum bei $f = 12,5$ mHz hat. Das Minimum stimmt sehr gut mit der ersten Relaxationsfrequenz $k_1 = 13,0 \pm 6,1$ mHz von [Joos et al., 1992] überein. [Wüstneck et al., 1999b] haben diese Relaxationsfrequenz bei $14 \leq k \leq 18$ mHz gefunden. Das generalisierte Maxwell-Modell kann benutzt werden, um diese Koinzidenz so zu interpretieren, dass die Elastizität neben der Relaxationsfrequenz minimiert wird.

Die Viskosität η sinkt mit steigendem f mit einem Faktor zwischen 2 und 5 für alle gemessenen Monoschichten, d.h. für schnellere Kompressions/Expansions-Raten ist η stark reduziert und es scheint ein Minimum außerhalb des gemessenen Bereiches zu existieren. Eine starke Senkung von η mit steigendem f wurde auch von [Wüstneck et al., 1999a] für DPPG gefunden. Zusammenfassend lässt sich feststellen: Je größer η ist, desto mehr nähert sich die Monoschicht einem entspannten Zustand an und ist klein, wenn die Monoschicht sich in einem nicht entspannten Zustand befindet. Das bedeutet, dass die molekularen Wechselwirkungen höher in den entspannten als in den angespannten Zuständen sind.

Wenn man die dynamische Beeinflussung von ε und η vergleichend betrachtet, kann man sagen, dass ε weniger vom dynamischen Parameter als η beeinflusst ist. ε variiert mit einem Maximum von 24 % für DPPC, mit 9 % für DOPC und mit 34 % für Cholesterol im gemessenen Parameterbereich.

Gute Wiederholbarkeit der ε und η Messungen kann man mit PAT über den ganzen Filmdruckbereich bekommen, wobei die Genauigkeit bei ε höher als bei η Messungen ist. η der gesättigten Phospholipide (DPPC) ist höher als die der ungesättigten Phospholipide (DOPC) für alle Π , wobei ε und η von Cholesterol ungefähr zehn Mal höher sind als die von DPPC und DOPC.

ε_p zeigt ein Plateau bei $13,5 \leq \Pi \leq 27$ mN m⁻¹, das gut übereinstimmt mit den Phasenübergängen bei 12 und 25 mN m⁻¹, die von [Albrecht et al., 1982] durch Isothermen (statische) Messungen gewonnen wurden. Diese Phasenübergänge sind die unteren und oberen Grenzen von Koexistenzregionen der Mikrometer großen flüssigkristallinen Domänen, die von einer flüssigen Monoschichtphase umgeben sind. Deshalb kann man zusammenfassend sagen, dass in dynamischen Oberflächenelastizitätsmessungen ε_p über die ganze Koexistenzregion konstant ist, wobei für Gleichgewichtsmessungen (Π / A_{mol} - Isotherme) ein Plateau in Π nur bei dem Unterbereich der Koexistenzregion zu sehen ist. Das Plateau, das dabei für ε_p beschreiben wurde, ist quantitativ durch dynamische Messungen von

[Wüstneck et al., 1999b] nachgewiesen. Für η und ε von DOPC und Cholesterol ist kein Plateau gefunden worden.

Für den komplett gemessenen Π -Bereich gibt es eine sehr große Übereinstimmung zwischen den dynamischen Ergebnissen der ε_0 und denen, die von Isothermen (statische ε_0) gewonnen und mit zwei unterschiedlichen Messmethoden gemessen (PAT und Langmuir Filmwaage) wurden.

Wie von [Wüstneck et al., 1999b] und auch durch diese Arbeit nachgewiesen, sind die Π/A_{mol} Isothermen von DPPC, die mit PAT oder Langmuir Filmwaage gewonnen wurden, sehr ähnlich. Das führt zu vergleichbaren statischen Oberflächenelastizitäten bei gleicher Temperatur, die von Isothermen-Messungen abgeleitet wurden. Statische und dynamische Ergebnisse der Elastizität von DPPC und Cholesterol weichen stark ab. Die statisch gemessenen Elastizitäten sind größer als die dynamischen Werte bei gleicher Temperatur.

Wegen dieser Ergebnisse, die auch in [Vrânceanu et al., 2007b] publiziert sind, wurden alle rheologischen Messungen bei einer konstanten Frequenz $f = 18,2$ mHz durchgeführt. Die Amplitude a ist so gewählt worden, um optimierte Messbedingungen zu erzeugen, d.h. $a = 1,5$ % für DPPC/Cholesterol und DMPC/Cholesterol Mischungen und $a = 2,5$ % für DOPC/Cholesterol Mischungen. Es war unmöglich $a > 1,5$ % für DPPC/Cholesterol Mischungen zu verwenden, da die hohen Amplituden den hängenden Tropfen gezwungen haben, bei minimaler Fläche bzw. minimalem σ herunterzufallen. Andererseits ändern sich weder ε_0 noch ε_c , wenn a von $a = 2,5$ % zu $a = 1,5$ % reduziert ist, wie schon oben und im Vergleich mit den Ergebnissen von [Tournois et al., 1989], das $a \approx 1$ % für DOPC benutzt haben, gezeigt. Deshalb sind die Ergebnisse für DOPC/Cholesterol Mischungen vergleichbar mit denen mit gesättigten Phospholipiden mit Cholesterol anhand der dynamischen Messbedingungen.

2.2 Oberflächenrheologie und Phasenübergänge der Phospholipide / Cholesterol Monoschichten

2.2.1 DPPC/Cholesterol Mischungen

Abb. 2.16 zeigt die Oberflächenrheologie der DPPC/Cholesterol Monoschichten mit verschiedenen Cholesterol-Gehalten und ein Phasendiagramm, welches die Phasenübergänge (die Knicke der ε - und η -Kurven) zusammenfasst. Für die DPPC/Cholesterol-Mischungen ist der Cholesterol-Gehalt x_C zwischen 0 und 100 Mol% in sieben Schritten variiert, d.h. $x_C = 0$; 20; 40; 50; 60; 80 oder 100 Mol%. Um die Bezeichnung beim Text und bei den Abbildungen zu vereinfachen, sollen im Folgenden die tiefgestellten Buchstaben $_{PC}$, $_{MC}$ und $_{OC}$ für DPPC/Cholesterol, DMPC/Cholesterol und DOPC/Cholesterol Mischungen benutzt werden. Der höchste Filmdruck jeder Messung entspricht der Grenze zum der Monoschichtkollaps, d.h. der Multischichtbildung, oder dem Abfall des hängenden Tropfens wegen geringer Oberflächenspannung.

Die rheologischen Eigenschaften der DPPC/Cholesterol-Mischungen sind in Abb. 2.16 A und C für ε_{PC} und η_{PC} jeweils dargestellt. Abb. 2.16 B, die Vergrößerung der ε_{PC} von Abb. 2.16 A, zeigt die Details bei kleinem ε_{PC} . Um die Wiederholbarkeit der ε_{PC} und η_{PC} nachzuweisen, sind die Messdaten von zwei unterschiedlichen Tropfen in Abb. 2.16 A, B und C für die ganze x_C dargestellt. Dafür sind ähnliche Symbole benutzt worden, wie in der Abbildungsbeschreibung dargestellt. Wie man sehen kann, kann man die ε_{PC} - und η_{PC} -Kurven in drei lineare Segmente mit unterschiedlichen Steigungen teilen. Das mittlere Segment ist nur für $x_C \leq 40$ Mol% anwesend und es scheint ein intermediäres Plateau zu sein. Die Steigung m , der Ordinatenachsenabschnitt b und der Korrelationskoeffizient R^2 der linearen Regression der Segmente I und III sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Das Zwischenplateau ist durch den Mittelwert der η_{PC} oder ε_{PC} und ihre jeweiligen Standardabweichungen (S.D.) charakterisiert. Für beide Segmente I und III steigen die Steigungsraten mit zunehmendem x_C . Für Segment III sind die Steigungen viel höher als die entsprechenden Steigungen des Segments I. Die Steigungen des Segments III haben die gleiche Größenordnung wie die Steigungen der reinen Cholesterolkurve. Die Länge des Segments I sinkt mit steigendem Cholesterol Gehalt und Segment III fängt bei niedrigem Π an. Die Schnittpunkte des Plateaus mit den Segmenten I und III sind als Übergangspunkte I und II, und die zwischen den Segmenten I und III sind als Übergangspunkte II jeweils bezeichnet. Die Letzteren sind auch in Tabelle 2.2 mit deren jeweiligen Π dargestellt. Abb. 2.16 D zeigt die Phasenübergänge (d.h. Übergangspunkte I und II von Tabelle 2.2) der Monoschichten von DPPC/Cholesterol Mischungen, welche in einem Π gegen x_C Diagramm dargestellt sind.

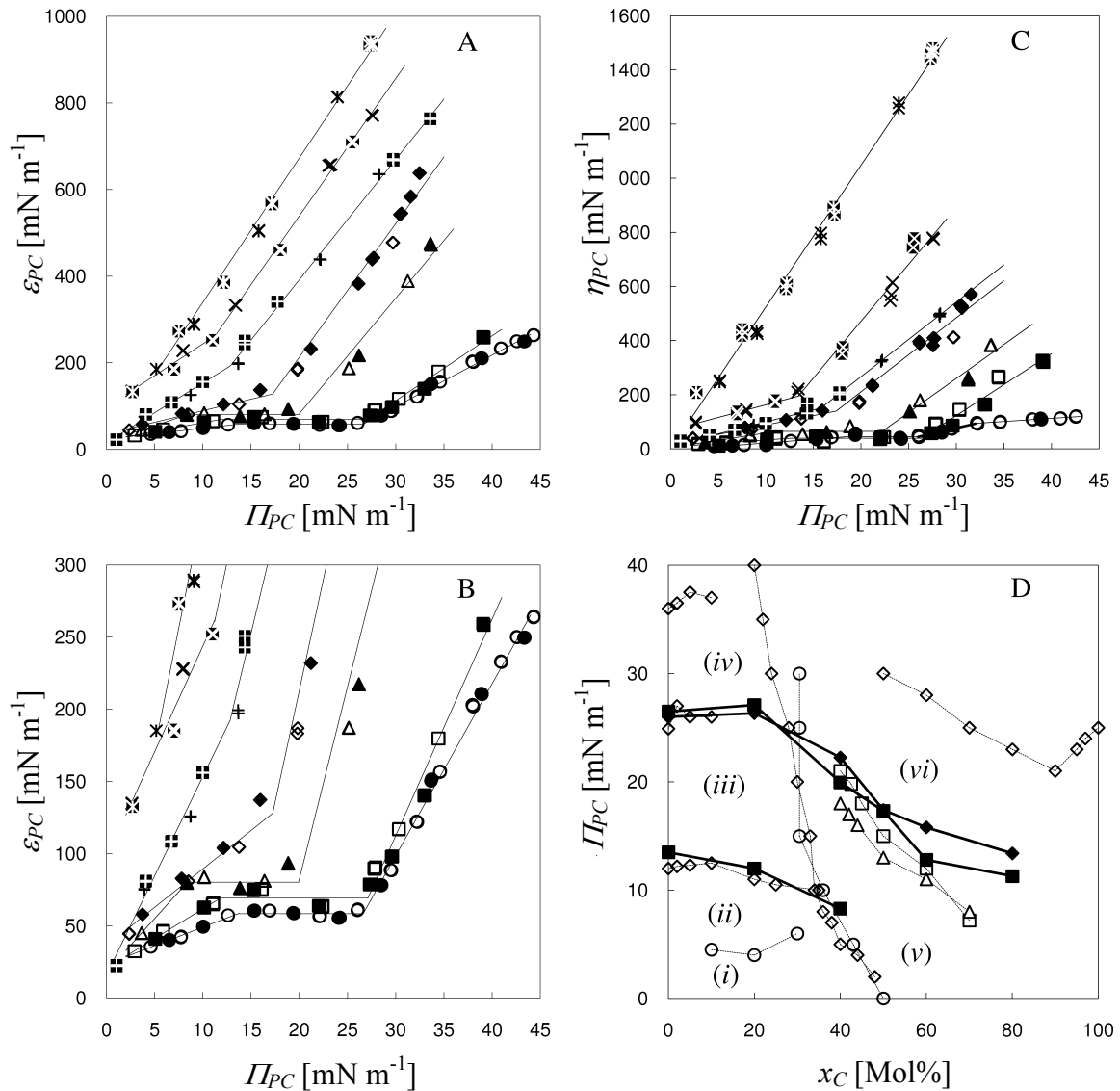


Abb. 2.16 ε_{PC} , η_{PC} und Phasendiagramm von DPPC/Cholesterol-Mischungen. A: ε_{PC} gegen Π ; zwei Messungen mit verschiedenen Tropfen sind gezeigt worden, um die Wiederholbarkeit darzustellen; Cholesterolgehalt x_C : •, ○ 0 Mol% ($25,3 \pm 0,2$ °C); ■, □ 20 Mol% ($26,4 \pm 0,3$ °C); ▲, △ 40 Mol% ($27,1 \pm 0,1$ °C); ◆, ◇ 50 Mol% ($28,8 \pm 0,4$ °C); +, ■ 60 Mol% ($28,1 \pm 0,1$ °C); ×, ⊠ 80 Mol% ($27,3 \pm 0,1$ °C); *, ⊠ 100 Mol% ($26,2 \pm 0,2$ °C). B: Vergrößerung von ε_{PC} Messdaten von Abb. 2.16 A. Alle durchgezogenen schrägen Linien sind lineare Regressionen bei jeweiligen Π Bereiche, die Plateaulinien sind Mittelwerte der Messpunkte für den jeweiligen Π Bereich. Die Knicke der durchgezogenen Kurven sind durch die Schnittpunkte zwischen Plateaus und lineare Regressionen definiert. Schnittpunkte und lineare Regressionen sind in Tabelle 2.2 dargestellt. C: η_{PC} die zu ε_{PC} von Abb. 2.16A entspricht. D: Phasendiagramm, das Phasenübergänge in der Π_{PC} gegen x_C Ebene darstellt. ■ Knicke der ε_{PC} Kurven von Abb. 2.16 A und B. ◆ Knicke der η_{PC} Kurven von Abb. 2.16 C. Phasenübergänge anderer Autoren, einige nicht mit DPPC, sondern mit ähnlicher Fettsäure: ◇

Langmuir Filmwaagemessungen [Albrecht et al., 1982], DPPC/Cholesterol, 24,9 °C; ○
Langmuir Filmwaagemessungen [Worthman et al., 1997], DPPC/Cholesterol, 21 ± 2 °C; □
Fluoreszenzmikroskopie [Okonogi & McConnell, 2004], DMPC/Cholesterol 24,5 ± 0,5 °C; Δ
Fluoreszenzmikroskopie [Okonogi & McConnell, 2004], DiC15PC/Cholesterol, 24,5 ± 0,5 °C.

Tabelle 2.2: Regressionslinien von $\varepsilon_{PC}(II)$ und $\eta_{PC}(II)$ für Segmente I bis III, Mittelwerte von Plateauwerte und Übergangspunkte (= Kurvenknicke) I und II; Messdaten und Regressionslinien von Abb. 2.16 A – C.

x_c	Segment I			Segment II (Plateau)	Segment III			Übergangspunkte		
	Mol%	m	b	R^2	η_{PC} oder ε_{PC} (\pm S.D.)	m	b	R^2	I: II	II: II
$\eta_{PC}(II)$ Messdaten und Regressionslinien von Abb. 2.16 C.										
0	2,73	-5,4	0,916	45,0 ± 6,5	8,15	-167,6	0,973	18,2	26,0	
20	2,57	7,3	0,692	39,5 ± 8,7	22,92	-564,4	0,929	12,5	26,3	
40	5,43	4,4	0,989	64,6 ± 12,1	25,10	-493,1	0,931	11,0	22,3	
50	6,99	18,3	0,971	-	27,31	-334,8	0,944	-	17,4	
60	8,84	11,4	0,947	-	27,57	-284,4	0,999	-	15,8	
80	9,36	69,4	0,972	-	41,98	-367,7	0,971	-	13,4	
100	-	-	-	-	52,42	0	0,993	-	-	
$\varepsilon_{PC}(II)$ Messdaten und Regressionslinien von Abb. 2.16 A und B.										
0	2,56	23,6	0,989	58,5 ± 2,1	11,91	-258,4	0,994	13,5	26,5	
20	4,10	20,9	0,997	69,4 ± 6,1	14,98	-336,7	0,973	12,0	27,1	
40	7,43	18,0	0,999	80,3 ± 2,9	26,66	-450,6	0,953	8,3	20,0	
50	5,33	36,3	0,973	-	30,84	-403,7	0,976	-	17,3	
60	13,75	16,1	0,977	-	27,95	-165,9	0,997	-	12,8	
80	14,63	97,6	0,931	-	31,70	-94,3	0,994	-	11,3	
100	-	-	-	-	33,32	6,7	0,995	-	-	

Die gewonnenen Ergebnisse von Abb. 2.16 A and B wurden mit Daten anderer Autoren verglichen, die durch Ableitung der Isothermen der Langmuir Filmwaage (mit Monoschichten in thermodynamischem Gleichgewicht) [Albrecht et al., 1982, Worthman et al., 1997], oder durch Fluoreszenzmikroskopie [Okonogi & McConnell, 2004] erhalten wurden. Die Phasenübergangsdaten, die in dieser Arbeit gefunden wurden, sind in Abb. 2.16 D durch gefüllte Quadrate für ε_{PC} (von Abb. 2.16 A (und B)) und durch gefüllte Rhomben für η_{PC} (von Abb. 2.16 C) dargestellt. Daten anderer Autoren sind mit leeren Symbolen dargestellt. Alle Linien, die in Abb. 2.16 D Phasenübergänge zeigen, haben nur den Zweck

der Visualisierung. Die durch die Phasenübergänge getrennten Regionen sind mit (i) bis (vi) gekennzeichnet.

Zuerst soll über die Region (i) und über den Übergang zur Region (ii) in Abb. 2.16 D gesprochen werden. Gemäß der Abbildungen von [Worthman et al., 1997] bilden sich dunklere Domänen in Region (i), welche als Umgebung eine kontinuierliche helle Monoschichtphase für $0 \leq \Pi \leq 4 \text{ mN m}^{-1}$ und $10 \leq x_C \leq 30 \text{ Mol\%}$ haben. Diese Beschreibung der Region (i), welche üblicherweise als “ α -Region” zweier getrennter Phasen bezeichnet ist, ist qualitativ in [Stottrup et al., 2005] nachgewiesen, wo eine α -Region für $15 \leq x_C \leq 35 \text{ Mol\%}$ bis $\Pi \approx 4 \text{ mN m}^{-1}$ gefunden wurde. Leider kann man von deren ternären DPPC/DOPC/Cholesterol Phasendiagramm die Phasenübergang zwischen Region (i) und (ii) nicht ablesen. Es scheint so, als würde die Region (i) sich nicht bis $x_C \rightarrow 0 \text{ Mol\%}$ ausbreiten, da die Fluoreszenzmikroskopie keine Domäne für DPPC unten $\Pi = 7,3 \text{ mN m}^{-1}$ zeigt. Weiterhin kann der Übergang zwischen Region (i) und (ii) mit statischen oder dynamischen Oberflächenelastizitätsmessungen nicht gefunden werden, weil die hier dargestellten Ergebnisse und auch die von [Albrecht et al., 1982] keinen Nachweis über diesen Übergang zeigen. Das Verschwinden der dunkleren Domänen und das Erscheinen der homogenen flüssigen Phase beim Übergang von (i) zu (ii) scheint keine mechanische Konsequenz zu haben.

Der Übergang von einer homogenen flüssigen Phase in Region (ii) zu einer neuen Zweiphasenregion (iii) ist sowohl durch dynamische als auch durch statische Elastizitätsmessungen nachweisbar. In Abb. 2.16 A – C ist dieser Phasenübergang als eine Änderung von einer linearen Steigung von ε_{PC} und η_{PC} mit steigendem Π zu einem Plateau zu sehen. Dieser Phasenübergang zwischen (ii) und (iii) stimmt sehr gut mit einem Phasenübergang von [Albrecht et al., 1982] überein, welcher als “eine Linie, die flüssige DPPC Phasen von Phasen mit kristallinem DPPC trennt“, beschrieben ist. Dieser Phasenübergang zwischen Region (ii) und (iii) kann man auch durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisen: in [Worthman et al., 1997] sind für DPPC/NBD-PC 99:1 Mol% dunklere, fast kreisförmige Domäne bei $\Pi = 7,3 \text{ mN m}^{-1}$ und „S-förmige“ Domäne bei $10,1 \text{ mN m}^{-1}$ gezeigt worden. In [Stottrup & Keller, 2006] haben die dunkleren Domänen eine geordnete Form (wie ein “gekrümmtes Dreibein”) und ist für DPPC/Texas Red-DPPE 99,5:0,5 Mol% bei $\Pi \approx 9 \text{ mN m}^{-1}$ gezeigt. Die Autoren beschreiben diese Phasentrennung als „feste Domäne in einer flüssigen Phase“. Man kann dann zusammenfassen, dass in Region (iii) eine kontinuierliche flüssige Phase und freistehende feste Aggregate koexistieren. Leider zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Studien keine genaueren Phasenübergänge. Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von [Nag & Keough, 1993] zeigen, dass die Phasentrennung nicht nur bei reinem DPPC, sondern auch bei DPPC/Cholesterol Mischungen oberhalb der α -Region auftreten. Für DPPC/Cholesterol Zweikomponenten-Mischungen haben [Worthman et al., 1997] Phasentrennungen bei ($x_C = 10 \text{ Mol\%}$; $\Pi = 12,4 \text{ mN m}^{-1}$) und

($x_C = 20$ Mol%; $\Pi = 19,1$ mN m⁻¹) gezeigt. Es gibt eine Diskrepanz bei der Feststellung des unteren Phasenüberganges der Region (iii) für $x_C = 0$ Mol% zwischen Fluoreszenzmikroskopie ($\Pi \approx 7,3$ mN m⁻¹) und statischer oder dynamischer Elastizität ($\Pi \approx 12$ mN m⁻¹). Diese Diskrepanz scheint ein spezifischer Effekt des benutzten Fluoreszenzfarbstoffes zu sein. In der Fluoreszenzmikroskopie ist es unmöglich idealerweise die Phasen des „reinen“ DPPCs zu untersuchen, wegen den Fluoreszenzmarkern, die man für diese Methode braucht. Es ist gezeigt worden [von Tschärner & McConnell, 1981], dass nur 1 Mol% NBD-PE die isothermischen Eigenschaften der DPPC Monoschichten an einer Filmwaage stark beeinflusst.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in Region (i) die segregierten, stöchiometrischen CC aus DPPC und Cholesterol von einer zweiten flüssigen Phase, die reich an DPPC ist und eine höhere Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes hat, getrennt ist. In Region (ii) werden die CC wieder gelöst und nur eine homogene flüssige Phase erscheint. Es wird behauptet, dass es in Region (iii) „eine Koexistenz zwischen einer DPPC/Cholesterol Mischphase und dem kristallinen DPPC mit 2-5 Mol% Cholesterol“ gibt [Albrecht et al., 1982]. Π/A_{mol} Isothermen zeigen ein Plateau in Π bei der unteren Grenze der (iii) und einen Knick in ε bei der oberen Grenze, siehe [Albrecht et al., 1982]. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen ein Plateau bei beiden η und ε für die ganze Region (iii). Das bedeutet, dass der Übergang von einer flüssigen Phase zu der festen DPPC-Domäne bei den Messungen in thermodynamischem Gleichgewicht als eine Senkung der molekularen Oberfläche, bei konstantem Π erscheint. Das ist hauptsächlich der Fall bei der unteren Grenze der Region (iii), wobei für dynamische Messungen ε_{PC} und η_{PC} über die ganze Region (iii) konstant bleibt.

Ein Phasenübergang zwischen Region (iii) und (iv) ist in [Albrecht et al., 1982] nicht beschrieben, kann aber mit den „K“ Punkt von deren Abbildung 3 und mit charakteristischen Knicken der ε_{PC} in deren Abbildung 4 assoziiert sein. Da in Region (iv) ε_{PC} und η_{PC} linear mit Π steigen, wie in Abb. 2.16 A – C und Tabelle 2.2 dargestellt, scheint es, dass (iv) eine feste Phase ist, wo die Kompression zu einer linearen Steigung von ε_{PC} und η_{PC} mit steigender Π führt. Die Obergrenze von (iv) ist nur von [Albrecht et al., 1982] beschrieben als die Grenze, über der ε_{PC} fast konstant bleibt, und ist als ein Fest-Fest Übergang von diesen Autoren charakterisiert.

Der fast senkrechte Phasenübergang zwischen Regionen (i) – (iv) an der linken Seite und (v) – (vi) an der rechten Seite ist nur von [Albrecht et al., 1982] und [Worthman et al., 1997] beschrieben, wobei das sehr gut mit dem stöchiometrischen Verhältnis 2:1, d.h. 33 Mol% Cholesterol übereinstimmt, wie in [McConnell & Radhakrishnan, 2003, Yuan & Johnston, 2002] beschrieben. Für $\Pi \leq 10$ mN m⁻¹ ist der Phasenübergang zwischen Region (i) und (v) bei $x_C > 33$ Mol% verschoben. Dieser Phasenübergang zeigt den Übergang von Filmen, die von dem DPPC Gehalt dominiert sind, zu Filmen, die von dem Cholesterol-

Gehalt dominiert sind, wie von [Albrecht et al., 1982] interpretiert. Region (v) ist allgemein als " β -Region" genannt, siehe [McConnell & Radhakrishnan, 2003].

Für den Übergang zwischen den Regionen (v) und (vi) kann man keine exakten Messdaten finden, die für DPPC/Cholesterol Mischungen mit Visualisierungsmethoden erzeugt sind, um einen Vergleich mit den hier präsentierten Ergebnissen zu ermöglichen. Leider haben [Worthman et al., 1997] und [Stottrup et al., 2005] keine quantitativen Messdaten über das Oberlimit der β -Region publiziert. [Stottrup et al., 2005] haben nur in der Beschreibung deren Abbildung 4 geschrieben: "Der Übergangsfilmdruck in der β -Region ist größer als in der α -Region, oft mehr als 15 mN m^{-1} ". Sie haben Messungen für DPPC/Cholesterol Mischungen für $x_C = 40$ und 45 Mol\% in ihr Dreikomponenten-Phasendiagramm eingefügt. Mikroskopische Aufnahmen [Worthman et al., 1997] zeigen, dass die Obergrenze der β -Region $> 12,0 \text{ mN m}^{-1}$ für $x_C = 50 \text{ Mol\%}$ und $< 15,1 \text{ mN m}^{-1}$ für $x_C = 80 \text{ Mol\%}$ ist. Somit sind sowohl [Stottrup et al., 2005] als auch [Stottrup & Keller, 2006] mit dem Phasenübergang zwischen Region (v) und (vi) in qualitativer Übereinstimmung, obwohl sie es nicht quantitativ bestätigen können. Deshalb werden in das Phasendiagramm Phasenübergänge für Zweikomponenten-Mischungen für den Vergleich eingefügt: Dihydrocholesterol mit entweder DMPC (bestehend aus zwei gesättigten Fettsäuren mit 14 Kohlenatomen, d.h. 14:0;14:0) oder DiC15 PC (15:0;15:0), der Letzte ist dem DPPC (16:0; 16:0) ähnlich. Dihydrocholesterol zeigt das gleiche Phasendiagramm wie Cholesterol [Okonogi & McConnell, 2004]. Wie in der Abb. 2.16 D zu sehen ist, sind die Phasenübergänge von [Okonogi & McConnell, 2004] für DMPC/Cholesterol und DiC15 PC/Cholesterol in der Nähe der Phasenübergänge, zwischen (v) und (vi), die in dieser Arbeit für η_{PC} und ε_{PC} gemessen wurden. Deshalb kann man vermuten, dass man einen ähnlichen Phasenübergang auch für DPPC/Cholesterol Mischungen durch Fluoreszenzmikroskopie erstellen könnte. Es ist interessant, dass [Okonogi & McConnell, 2004] das Phänomen der „Kontrast-Inversion“ bei diesem Phasenübergang entdeckt haben, der nur für geladene Fluoreszenzmarker und nicht für ungeladene auftritt. Laut [Okonogi & McConnell, 2004] reichern sich die Fluoreszenzmarker in den „kondensierten Komplexe“ der β -Region (= Region (v)) an, wobei die Löslichkeit des Markers invertiert wird, wenn Π über dem Phasenübergang erhöht wird. Der Fluoreszenzmarker reichert sich in der Cholesterol-reichen Phase von Region (vi) an, wobei sich die Geometrie und die Stelle der CC nicht verändert. Bei hohen Π können die CC in kleine Domänen zerkleinert werden [Okonogi & McConnell, 2004].

[Okonogi & McConnell, 2004] postulieren, dass beide (v) und (vi) Zweiphasenregionen sind. Wie in Abb. 2.16 A – C gezeigt, erscheint der Übergang zwischen (v) und (vi) als Knick der η_{PC} und ε_{PC} Kurven, wobei in Region (vi) die η_{PC} und ε_{PC} Kurven fast die gleiche Steigung wie die reinen Cholesterol-Kurven haben. Es ist statistisch [Worthman et al., 1997] und bildgebend [Okonogi & McConnell, 2004] gezeigt worden, dass

das Verhältnis zwischen der Domänenfläche und deren Umgebungsfläche für $x_C > 30$ Mol% für alle H konstant bleibt. Deshalb kann man feststellen, dass in Region (v) die CC mit 66 Mol% DPPC, die rheologischen Eigenschaften bestimmen, wobei in (vi) die Rheologie der CC der Cholesterol-reichen Phase ähnelt, welche die Rheologie dominiert. Mit anderen Worten, in (v) sind die molekularen Wechselwirkungen innerhalb der CC ähnlich denen dem reinen DPPC, wobei in (vi) sind sie ähnlicher mit dem reinen Cholesterol. Es scheint, dass diese Wechselwirkungs-Differenz mit einer Inversion der Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes Texas-Red-DHPE zusammenhängt [Okonogi & McConnell, 2004]. Es ist interessant, dass man den Phasenübergang zwischen (v) und (vi) nicht durch statische Elastizitätsmessungen detektieren kann, da keine deutlichen Knicke in der H/A_{mol} -Isotherme von [Albrecht et al., 1982] zu finden sind. Dagegen kann man durch dynamische Elastizitätsmessungen einen deutlichen Effekt feststellen.

Da keine genaueren Messdaten über den Phasenübergang zwischen Region (v) und (vi) für DPPC/Cholesterol Mischungen vorliegen, wurden die DMPC/Cholesterol Mischungen untersucht, was im Folgenden dargestellt ist.

2.2.2 DMPC/Cholesterol Mischungen

Da der *Gel*/flüssigkristalline Haupt-Phasenübergang von DMPC im Bischicht-Zustand bei Raumtemperatur, d.h. $T_m = 23,5$ °C liegt, wurden alle Messungen mit DMPC in einer Thermostat-Messkammer durchgeführt. In Abb. 2.17 A ist ε_{MC} gegen H bei $T = 20 \pm 0,1$ °C aufgetragen, wobei eine Vergrößerung bezogen auf ε_{MC} in Abb. 2.17 B dargestellt ist. Um eine gute Auflösung für das Phasendiagramm von Abb. 2.18 zu bekommen, wurde der Cholesterol-Gehalt für DMPC/Cholesterol Messungen in 10 Mol% Schritten variiert, insgesamt 8 Schritte ($x_C = 0$ bis 70 Mol% und dazu reines Cholesterol, d.h. $x_C = 100$ Mol%). Um die Temperatureffekte zu berücksichtigen, wurde T in drei Schritten variiert, d.h. $T = 20$; 25 und 30°C. Eine typische Auswahl der Mischungen ist in Abb. 2.17 C für alle drei Temperaturen und Mischungen mit $x_C = 0$; 40; 50; 60 und 100 Mol% dargestellt. Eine Vergrößerung der Abb. 2.17 C bezogen auf ε_{MC} ist in Abb. 2.17 D dargestellt. Da η_{MC} keine zusätzlichen Kenntnisse über die Phasentrennungen und -übergänge liefert, wird hier nur ε_{MC} und nicht η_{MC} gezeigt und diskutiert. Ähnlich zu dem DPPC/Cholesterol System sind alle Kurven in linearen Segmente geteilt. Die Steigungen m , die Ordinatenabschnitte b und die Korrelationskoeffizienten R^2 der lineare Regressionen von Segment I - III sind in Tabelle 2.4 für alle Kurven von Abb. 2.17 dargestellt. In allen Fällen wo ein horizontales Zwischenplateau erscheint, ist das durch den Mittelwert der $\varepsilon_{MC} \pm$ Standardabweichung (S.D.) charakterisiert.

Weiter werden die qualitativen Unterschiede zwischen den DMPC Kurven von Abb. 2.17 im Vergleich mit den DPPC Kurven von Abb. 2.16 besprochen. Wie in Abb. 2.17 B und D zu sehen ist, sind die Knicke zwischen Segmente II und III bei einigen Kurven „geglättet“,

d.h. die Messpunkte beschreiben eine Rundung statt einem idealen Knick. In diesen Fällen, meistens für 20 und 30 Mol% in Abb. 2.17 B und für 40 Mol%, 25 und 30 °C in Abb. 2.17 D einige Messpunkte (maximal $\pm 5 \text{ mN m}^{-1}$ jeder Seite einen Interpolationsknick) sind für die Evaluation von Trendlinien oder horizontalen Plateaus ignoriert worden.

Es ist anzunehmen, dass die Phasenübergänge von DMPC glatter als die von DPPC sind, da die Messtemperatur näher an der T_m von DMPC (23,5 °C) ist als an der T_m von DPPC (41 °C). Eine andere Diskrepanz im Vergleich zu DPPC ist, dass es zwei Kurven gibt, bei denen die Messpunkte mit steigendem Π sinken, und zwar für reines DMPC bei 20 und 25 °C. Für die 20°C Kurve scheint das durchschnittliche horizontale Plateau ein leichtes lokales Maximum und Minimum anzuzeigen; die 25°C Kurve scheint oberhalb von 33 mN m^{-1} zu sinken, wobei das ein Hinweis auf z.B. Multischicht-Bildung sein könnte.

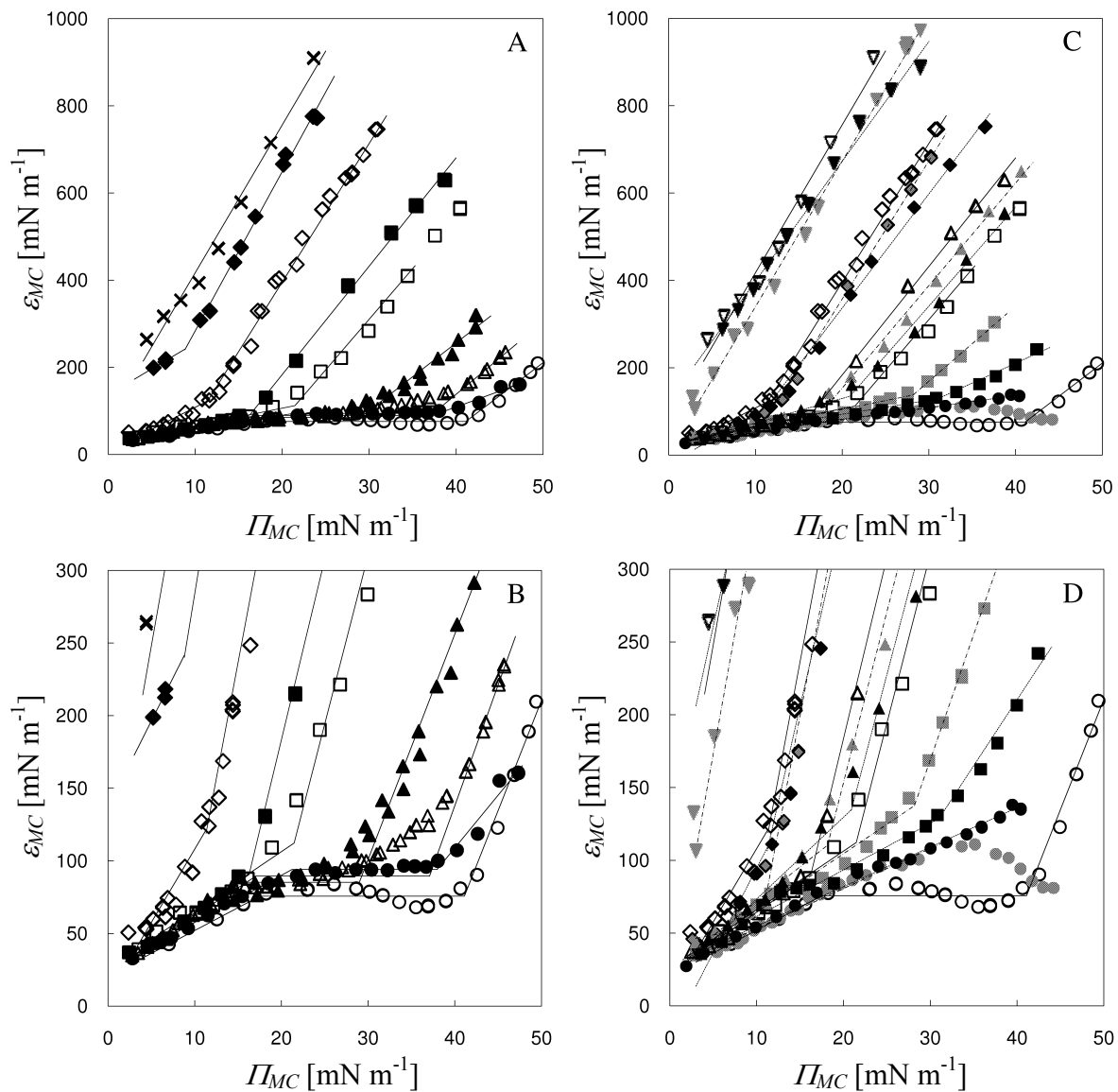


Abb. 2.17 ϵ_{MC} von DMPC/Cholesterol-Mischungen. A: ϵ_{MC} gegen Π bei $20 \pm 0,1$ °C, Cholesterol Gehalt x_C : \circ 0 Mol%; \bullet 10 Mol%; \triangle 20 Mol%; \blacktriangle 30 Mol%; \square 40 Mol%; \blacksquare 50

Mol%; \diamond 60 Mol%; \blacklozenge 70 Mol%; \times 100 Mol%. B: Vergrößerung bezogen auf ε_{MC} von Messdaten von Abbildung A. Die Linien zeigen lineare Regressionen, siehe Legende der Abb. 2.16. C: ε_{MC} gegen II bei drei Temperaturen: 20 °C (leere Symbole $\circ\triangle\lozenge\nabla$), 25 °C (graue Symbole $\bullet\blacktriangle\blacklozenge\blacktriangledown$) und 30 °C (schwarze Symbole $\bullet\blacktriangle\blacklozenge\blacktriangledown$) für einige DMPC/Cholesterol Mischungen: $\circ\bullet$ 0 Mol%; $\square\blacksquare$ 40 Mol%; $\triangle\blacktriangle$ 50 Mol%; $\lozenge\blacklozenge$ 60 Mol%; $\nabla\blacktriangledown$ 100 Mol%; D: Vergrößerung bezogen auf ε_{MC} von Messdaten von Abbildung C.

Tabelle 2.4: Lineare Regressionen der $\varepsilon_{MC}(II)$, in Segment I – III, Mittelwerte des Plateaus und Übergangspunkte (= Kurvenknicke) I und II; Messdaten und Regressionslinien von Abb. 2.17 A – D.

x_c	T	Segment I			Segment II	Segment III			Übergangs-Punkte		
		Mol%	[°C]	m	b	R^2	$\varepsilon_{MC} (\pm \text{S.D.})$	m	b	R^2	I: II
0	20		3,14	20,6	0,999	$75,7 \pm 5,5$	15,15	-547,1	0,970	17,5	41,1
0	25		2,74	25,8	0,972	-	-	-	-	-	-
0	30		2,71	27,7	0,992	-	-	-	-	-	-
10	20		3,24	25,3	0,993	$91,6 \pm 2,5$	7,26	-181,4	0,933	21,2	37,9
20	20		3,84	23,9	0,994	$89,6 \pm 6,7$	16,64	-527,3	0,993	17,0	37,1
20	25		1,53	37,2	0,997	-	10,25	-298,4	0,999	-	38,5
20	30		-	-	-	-	2,48	26,6	0,995	-	-
30	20		4,30	20,5	0,980	$85,2 \pm 7,7$	15,52	-364,6	0,951	15,1	29,0
30	25		2,35	28,7	0,951	-	14,97	-415,7	0,985	-	35,2
30	30		2,83	26,9	0,916	-	-	-	-	-	-
40	20		4,03	25,7	0,954	-	23,21	-385,8	0,986	-	21,5
40	25		4,03	23,9	0,975	-	17,23	-347,8	0,994	-	28,2
40	30		3,20	29,3	0,974	-	9,08	-152,9	0,968	-	31,0
50	20		4,19	22,5	0,976	-	24,86	-313,7	0,995	-	16,2
50	25		4,71	24,9	0,941	-	23,48	-316,0	0,993	-	18,1
50	30		5,61	17,4	0,972	-	22,70	-339,9	0,985	-	20,9
60	20		10,09	7,3	0,910	-	31,81	-240,4	0,989	-	11,3
60	25		1,11	43,2	0,999	-	31,64	-275,2	0,997	-	10,3
60	30		11,60	-21,2	0,984	-	26,16	-186,5	0,992	-	11,2
70	20		11,88	137,0	0,947	-	36,52	-81,2	0,994	-	8,8
100	20		-	-	-	-	33,88	78,7	0,983	-	-
100	25		-	-	-	-	33,32	6,7	0,995	-	-
100	30		-	-	-	-	27,46	123,7	0,993	-	-

Wenn man das Phasendiagramm für DMPC/Cholesterol Mischungen von Abb. 2.18 anschaut, kann man sechs Regionen sehen, ähnlich wie bei Abb. 2.16 D. Allerdings sind die Phasenübergänge bei $0 \leq x_C \leq 40$ Mol%, im Vergleich zu Abb. 2.16 D, bei höherem Π verschoben. Ähnlich wie für die DPPC/Cholesterol Mischungen, kann die Obergrenze der Region (i) (was identisch mit der α -Region ist) nur durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Für $15 \leq x_C \leq 35$ Mol% Formübergänge und Auftreten von Streifenphasen sind als die Obergrenze der Region (i) interpretiert, siehe [Benvegnu & McConnell, 1993, Keller et al., 2000]. Region (ii) wird als eine homogene flüssige Phase angesehen. Leider sind sehr wenige quantitative Messdaten für den Übergang von Region (ii) zu (iii) von anderen Autoren publiziert worden, weil die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse bei Raumtemperatur gemessen sind, d.h. $23 \pm 0,5$ °C [Keller et al., 2000]. Bei dieser Temperatur ist keine fest/flüssig Phasenkoexistenz und auch kein Phasenübergang zu einer singulären festen Phase mehr zu sehen. Es gibt allerdings sehr wertvolle Daten für reines DMPC, die quantitativ mit der unteren und oberen Grenze der Region (iii) übereinstimmen. Bei Isobaren-Messungen an einer Langmuir Filmwaage in thermodynamischem Gleichgewicht hat [Blume, 1979] entdeckt (siehe seine Abbildung 2), dass die DMPC Monoschichten bei $15 \leq \Pi \leq 35$ mN m⁻¹ (in 5 mN m⁻¹ Schritte gemessen) drei unterschiedliche Phasen zwischen 5 und 35 °C zeigen. Bei niedrigen Temperaturen der Phase A ist die Molekularfläche A_{mol} nicht temperaturenabhängig, bei moderaten Temperaturen der Phase B steigt sie stark, wobei sie in Phase C bei hohen Temperaturen leicht steigt. Bei 20 °C und 15 mN m⁻¹ ist die Monoschicht in Phase C und für $20 \leq \Pi \leq 35$ mN m⁻¹ in Phase B. Der Übergang zu Phase A kann mit Hilfe der Messdaten von [Blume, 1979] extrapoliert werden. Es zeigt sich, dass dieser Übergang zwischen 35 und 40 mN m⁻¹ stattfindet. Es scheint, dass die Phase C der Region (ii), Phase B der Region (iii) und Phase A der Region (iv) entspricht. Das bedeutet, dass es eine gute, quantitative Übereinstimmung zwischen statischen Isobaren und dynamischen Elastizitätsergebnissen gibt. Die untere und obere Grenze der Region (iii) sind jeweils 17,5 und 41,1 mN m⁻¹ für $x_C = 0$ Mol%, in guter Übereinstimmung mit den Grenzen der Phase B von [Blume, 1979]. Weiterhin sind die hier dargestellten Ergebnisse qualitativ von AFM Mikrobildern bestätigt, wie von [Sardone, 2005] gezeigt, der homogene Phasen bei kleinen und hohen Π und inzwischen Domänebildung zeigt. Allerdings publiziert [Sardone, 2005] keine Messdaten über Phasenübergängen.

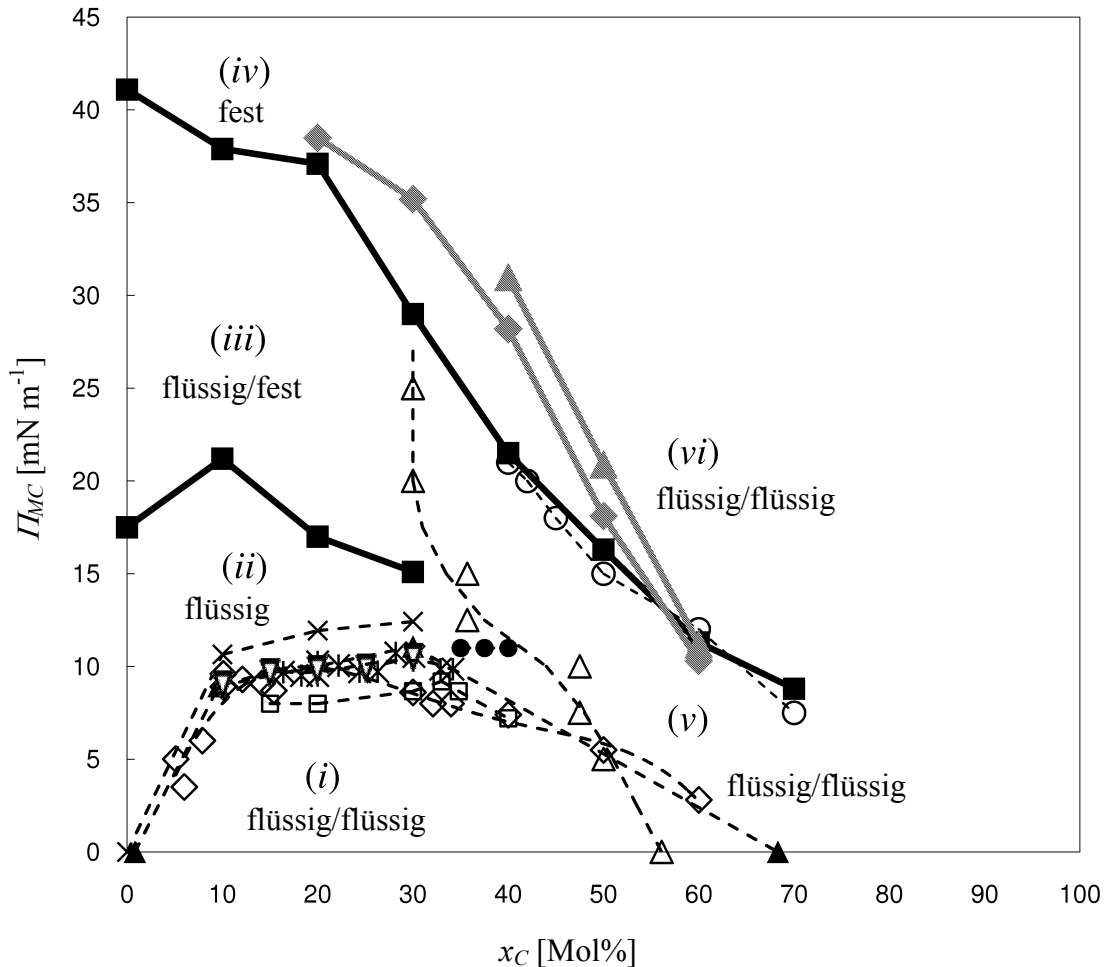


Abb. 2.18 Phasendiagramm von DMPC/Cholesterol Mischungen. ■ Knick der ε_{MC} Kurven von Abb. 2.17 A und B bei 20 °C; ◆, ▲ Knick der ε_{MC} Kurven bei 25 °C und 30 °C, jeweils. Phasenübergänge von anderen Autoren gemessen mit Epifluoreszenzmikroskopie: ◇, * [Keller et al., 2000], $23 \pm 0,5$ °C; ○, ●, ▽ [Okonogi & McConnell, 2004], $24,5 \pm 0,5$ °C; △ [Hirshfeld & Seul, 1990a], $23,5$ °C; × [Subramaniam & McConnell, 1987], 25 ± 1 °C; □, ▲ [Benvegnu & McConnell, 1993], Raumtemperatur.

Die Phasenübergänge des reinen DMPC betreffend wird festgestellt, dass beide dynamischen Elastizitätsergebnisse und statischen Langmuir-Isobaren im Vergleich mit den statischen Langmuir-Isothermen, besser geeignet sind. DMPC-Isothermen zeigen ein Plateau nur bei niedrigen T (wie in [Sardone, 2005] gezeigt), aus dem die Untergrenze der Region (iii) abgelesen werden kann, wobei die Obergrenze als ein Knick der Isotherme zu sehen ist. Bei hohen T ist das Plateau immer kleiner, was das Ablesen der Phasenübergänge behindert. Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse für DMPC, der Messdaten aus der Literatur und durch einen Vergleich der oben diskutierten DPPC Ergebnissen, kann man Folgendes zusammenfassen: Region (ii) ist eine homogene flüssige Phase, wo ε_{MC} linear mit Π steigt und wo A_{mol} leicht mit T steigt. In Region (iii) gibt es eine Koexistenz von einer flüssigen und einer festen Phase, wo ε_{MC} unabhängig von Π ist und A_{mol} stark mit T steigt. Region (iv) ist

eine homogene feste Phase, in der ε_{MC} linear und stark mit Π und A_{mol} steigt und unabhängig von T ist.

Ein Phasenübergang, der die Regionen (i) – (iv) (Bereich kleiner x_C) von Regionen (v) – (vi) (Bereich hoher x_C) trennt, ist von [Hirshfeld & Seul, 1990b] beschrieben worden. Sie haben die Phasenübergänge von statischen Langmuir-Isobaren in einen x_C vs. ε_{MC} Diagramm dargestellt. Deren Kurve koinzidiert qualitativ mit einem ähnlichen Phasenübergang von DPPC [Albrecht et al., 1982, Worthman et al., 1997]. Bei einem hohen Π Bereich ist dieser Phasenübergang vertikal bei $x_C \approx 33$ Mol%, wobei es bei einem niedrigen Π die Obergrenze der α -Region, die schon bekannt ist, schneidet [Benvegnu & McConnell, 1993, Keller et al., 2000]. Die Existenz einer β -Region für DMPC ist nur nach Publikation von [Hirshfeld & Seul, 1990a] und [Radhakrishnan & McConnell, 1999] von [Okonogi & McConnell, 2004] beschrieben worden. Diese Autoren sagen, dass eine β -Region in früheren Studien übersehen wurde und gleichzeitig korrigieren sie die Ausdehnung der α -Region bei $x_C \leq 40$ Mol%, was nicht mehr in Widerspruch mit dem Phasenübergang von [Hirshfeld & Seul, 1990b] ist.

Der Phasenübergang zwischen Regionen (v) und (vi), der hier für $T = 20$ °C gefunden ist, stimmt sehr gut mit den Werten für Kontrast-Inversion (schon für DPPC diskutiert) bei $T = 24,5 \pm 0,5$ °C und $x_C = 40 - 70$ Mol% von [Okonogi & McConnell, 2004] überein. Es soll zuerst über die Art dieses Phasenüberganges und dann über die Temperatureffekte diskutiert werden. Welchen physischen Zustand der Monoschicht gibt es in Region (vi)? Wie schon oben für DPPC/Cholesterol Mischungen beschrieben, haben [Okonogi & McConnell, 2004] die Persistenz der Domänen nach dem Übergang von Region (v) zu (vi) nachgewiesen. Für geladene Fluoreszenzfarbstoffe haben sie das Phänomen der Kontrast-Inversion entdeckt: helle Domänen mit einem dunklen Hintergrund in (v) werden dunkler mit einem hellen Hintergrund nach dem Übergang zu (vi). Sie interpretieren die hellen Domänen in (v) als Cholesterol-arme Domänen. Nichtgeladene Fluoreszenzfarbstoffe haben den Kontrast der Domäne nie invertiert, wobei in einigen Fällen die Domäne nach dem Übergang von (v) zu (vi) verschwunden sind und in der Region (vi) bei höherem Π wieder erscheinen. Aufgrund der oben genannten Fakten haben die Autoren [Okonogi & McConnell, 2004] zusammengefasst, dass beide Regionen (v) und (vi) Zweiphasenregionen sind, aber sie konnten nicht erkennen, ob diese Phasen flüssig oder fest sind. Wie in Kapitel 2.3.3.1 erklärt, konnte durch Tropfenaufprallexperimente gezeigt werden, dass in Region (vi) zumindest die kontinuierliche Phase flüssig ist. Cholesterol senkt die Scherviskosität gesättigter Phospholipid-Monoschichten [Evans et al., 1980], wobei, wie in Abb. 2.16 und Abb. 2.17 gezeigt, die Dehnungsviskosität η und -elastizität ε gesteigert wird. Weil reine Cholesterol-Monoschichten flüssig sind [Shah & Schulman, 1967], kann davon ausgegangen werden, dass die Zweiphasenregionen (v) und (vi) flüssig/flüssig sind.

Die Temperatureinflüsse von Abb. 2.18 werden im Folgenden diskutiert. Der auffällige Effekt ist, dass kein Phasenübergang zwischen Regionen (ii) und (iii) und zwischen

Regionen (iii) und (iv) für $T = 25$ und 30 °C, außer für $x_C = 20$ und 30 Mol% bei $T = 25$ °C existiert. Das bedeutet, dass ein Übergang zu einer Koexistenz von flüssigen und festen Phasen (wie in Region (iii) bei niedriger T) für $T \geq 25$ °C nicht stattfinden. Auch ein Übergang zu einer festen Phase (wie dies in Region (iv) bei niedrigem T der Fall ist) findet für $T \geq 30$ °C nicht statt, sondern nur für $x_C = 20$ und 30 Mol% bei $T = 25$ °C. Das bedeutet, dass der Hauptübergang $T_m = 23,5$ °C wegen der Cholesterol-Anwesenheit zu einem höheren T hochgestiegen ist. Für $x_C = 20 - 50$ Mol% sind die Phasenübergänge von $T = 25$ und 30 °C höher als die von $T = 20$ °C, wobei es für $x_C = 60$ Mol% keinen T -Unterschied bei dem Phasenübergang zwischen Region (v) und (vi) gibt. Das scheint mit der Tatsache verbunden zu sein, dass die dynamische Elastizität von reinem Cholesterol T -unabhängig ist (siehe Abb. 2.17 C).

2.2.3 DOPC/Cholesterol Mischungen

Die rheologischen Messdaten von DOPC sind in Abb. 2.19 dargestellt. Normalerweise können alle ε_{OC} und η_{OC} Kurven durch singuläre lineare Regressionen grob charakterisiert werden, wie in Abb. 2.19 A und C dargestellt. In diesem Fall sind die Phasenübergänge weniger eindeutig als für ε_{PC} , ε_{MC} , und η_{PC} . Die Steigungen der ε_{OC} und η_{OC} Kurven für $0 \leq x_C \leq 60$ Mol% steigen nur leicht mit x_C , wobei sie den Steigungen von reinem DOPC ähnlicher sind als denen von reinem Cholesterol. Für $x_C = 80$ Mol% ist die Steigung deutlich vergrößert im Vergleich zu $x_C \leq 60$ Mol%, wobei sie noch deutlich kleiner ist als die von reinem Cholesterol.

Um die Details in Abb. 2.19 A besser zu zeigen, werden die Kurven in aufsteigender Reihenfolge von x_C in Abb. 2.19 B versetzt dargestellt, indem jede nachfolgende Kurve (von $x_C = 0$ bis 100 Mol%) um $+ 30 \text{ mN m}^{-1}$ verschoben wird.

Diese Darstellung zeigt Knicke bei einigen Kurven, welche Phasenübergänge andeuten. Die Knicke zwischen linearen Segmenten der ε_{OC} Kurven sind mit I bis IV notiert, wie in der schematischen Darstellung von Abb. 2.19 D gezeigt. Für $x_C = 50$ und 60 Mol% gibt es ein Plateau zwischen den Knicken I und II. Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit gewonnenen rheologischen Daten (Knicke I – IV) sind mit gefüllten Symbolen in Abb. 2.19 D dargestellt, wie in der Abbildungsbeschreibung erklärt. Für den Vergleich sind die Obergrenzen zweier nichtmischbaren flüssigen Phasen, wie mit Fluoreszenzmikroskopie entdeckt, als leere Kreise (von [Okonogi & McConnell, 2004] übernommen) oder leere Dreiecke (von [Hagen & McConnell, 1997] übernommen) dargestellt. Leere Quadrate zeigen einen Phasenübergang an, wo Kontrast-Inversion der Fluoreszenzfarbstoff nur für 70 und 80 Mol% Cholesterol erscheint [Okonogi & McConnell, 2004]. Diese Autoren haben auch herausgefunden, dass die Kontrast-Inversion nur in der β -Region zu sehen ist, wobei es in der Region oberhalb der α -Region (bei höherem T) eine homogene Phase gibt. Man kann deshalb

feststellen, dass die stöchiometrische Mischung der kondensierten DOPC/Cholesterol Komplexen bei $x_C \sim 60-70$ Mol% liegt.

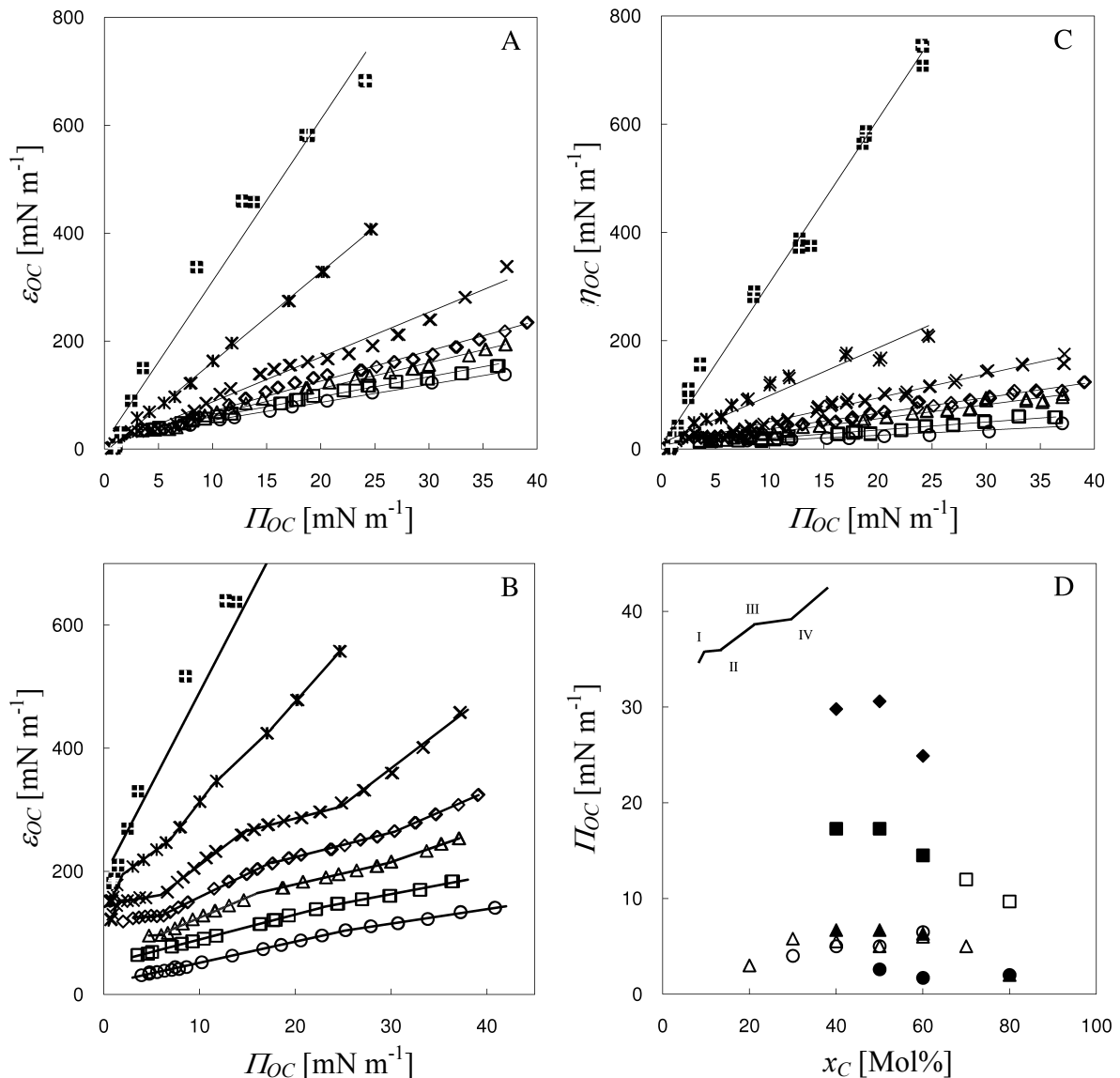


Abb. 2.19 ϵ_{OC} , η_{OC} und Phasendiagramm von DOPC/Cholesterol-Mischungen. A: ϵ_{OC} gegen Π für verschiedene x_C : \circ 0 Mol% (22,3 °C); \square 20 Mol% (26,0 °C); \triangle 40 Mol% (27,5 °C); \diamond 50 Mol% (27,5 °C); \times 60 Mol% (26,8 °C); \ast 80 Mol% (26,0 °C); \blacksquare 100 Mol% (26,2 °C). Die Linien zeigen lineare Regressionen, siehe Legende der Abb. 2.16. B: Vergrößerung bezogen am ϵ_{OC} von Abbildung A. Die Kurven sind getrennt worden durch Addition von $n \times (+ 30 \text{ mN m}^{-1})$, $n = 1, 2, 3, \dots$, um eine höhere Klarheit der Daten zu erzeugen. C: η_{OC} gegen Π , die Symbole für verschiedene x_C sind wie in Abbildung A und B. D: Phasendiagramm, das Phasenübergänge in die Π_{OC} gegen x_C Ebene zeigt. Knicke der Kurven sind mit I, II, III, und IV beschriftet, wie in der schematischen Zeichnung dargestellt. \bullet Knick I; \blacktriangle Knick II; \blacksquare Knick III; \blacklozenge Knick IV. Phasenübergänge anderer Autoren für DOPC/Cholesterol Mischungen, die Fluoreszenzmikroskopie benutzt haben: \circ und \square [Okonogi & McConnell, 2004], $24,5 \pm 0,5$ °C; \triangle [Hagen & McConnell, 1997], 21 ± 1 °C.

Es gibt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Knick II und der Obergrenze der α -Region für $x_C = 40$; 50 und 60 Mol%. Wie in Abb. 2.19 B zu sehen ist, gibt es ein (kleines) Plateau zwischen Knick I und II für $x_C = 50$ und 60 Mol%, die eine Koexistenz zweier Phasen nachweisen. Die Obergrenze der α -Region ist in [Okonogi & McConnell, 2004] beschrieben als die Grenze, wo alle Domänen verschwinden. Das Plateau, das in dynamischen Messungen der ε_{OC} erscheint, kann also eine Koexistenz-Region zweier nichtmischbaren Phasen bedeuten (wie Fluoreszenzmikroskopie für die α -Region beschreibt). Oberhalb der α -Region ist nur eine singuläre Phase mit Fluoreszenzmikroskopie zu sehen, wie in [Okonogi & McConnell, 2004] beschrieben. Es scheint so, als würde die Obergrenze der α -Region für die DOPC/Cholesterol Mischungen durch beide Fluoreszenzmikroskopie und dynamische Elastizitätsmessungen detektiert. Für die Mischungen von DPPC und DMPC mit Cholesterol wurde sie nur mit Visualisierungsmethoden detektiert.

Der Knick III markiert eine Senkung der Steigungsrate für $x_C = 40 - 60$ Mol%. In [Okonogi & McConnell, 2004] ist die Grenze der Kontrast-Inversion in dem gleichen Bereich gefunden, allerdings nur für $x_C = 70$ und 80 Mol%. Deshalb ist nicht klar, ob diese Senkung der Steigungsrate der ε_{OC} dem Phänomen der Kontrast-Inversion entspricht. Wie schon diskutiert, stimmt die Kontrast-Inversion für DMPC/Cholesterol Mischungen mit der starken Erhöhung der Steigungsrate der ε_{MC} sehr gut überein. Der Knick IV, der den Übergang zu einer größeren Steigungsrate der ε_{OC} Kurven zeigt, ist nur bei wenigen Mischungen aufgetreten; er ist für $x_C = 60$ Mol% am deutlichsten. Da die Visualisierungsmethoden keinen Phasenübergang in diesem Bereich zeigen, gibt es zurzeit keine Grundlage für eine physikalische Interpretation.

Obwohl der Phasenübergang für die Kontrast-Inversion nicht durch Knicke der ε_{OC} Kurven unterstützt ist, zeigt die Abb. 2.19 A und B deutlich, dass die Steigungsraten der ε_{OC} und η_{OC} Kurven für $x_C \geq 80$ Mol% viel höher, als die Steigungsraten für $x_C \leq 60$ Mol% sind. Vermutlich gibt es für $x_C \leq 60$ Mol% eine α -Region bei kleiner II , wo die CC von einer Phase reich an DOPC getrennt ist, wobei für $x_C > 60$ Mol% die CC von einer Phase reich an Cholesterol getrennt sind. Da die molare Komposition der CC für alle Mischungen konstant ist, sind die lokalen rheologischen Eigenschaften der Komplexe gleich für alle Mischungen. Deshalb sollte die zweite Phase, die nicht mischbar mit der CC ist, die gesamte Rheologie der Monoschichten bestimmen, was zu einer Erhöhung der Steigungsrate für ε_{OC} zwischen $x_C = 60$ und 80 Mol% führt. So unterstützen qualitativ die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten rheologischen Daten den Unterschied einer α - und β -Region in DOPC/Cholesterol Mischungen, wie in [Okonogi & McConnell, 2004] beschrieben.

2.2.4 Zusammenfassung

Es ist gezeigt worden, dass die Steigung von η mit steigendem Π parallel zu der von ε mit steigendem Π für DPPC/Cholesterol- und DOPC/Cholesterol-Mischungen ist.

Für Zweikomponenten-Mischungen von gesättigten Lipiden: DPPC und DMPC mit Cholesterol können sechs unterschiedliche Regionen in einer Π gegen x_C Phasendiagramm gefunden werden. Die Phasenübergänge, die in dieser Arbeit gefunden wurden, sind in guter Übereinstimmung mit den Phasenübergängen in der Literatur für statische rheologische Messungen (d.h. Isothermen und Isobaren an eine Langmuir-Filmwaage) und Visualisierungsmethoden (Fluoreszenzmikroskopie und AFM). Die Abbildungen zeigen die Trennung zweier flüssigen Phasen mit kreisförmigen Domänen bei kleinem x_C , die so genannte α -Region. Diese Domänen verschwinden bei hohem Π und eine singuläre flüssige Phase bleibt. Die Bildung und das Verschwinden der getrennten flüssigen Phasen in der α -Region haben keine Konsequenz für die mechanischen Eigenschaften der Monoschichten. Bei hoher Π und kleiner x_C , für DPPC bei $\Pi \approx 10 \text{ mN m}^{-1}$, für DMPC bei $\Pi = 15 - 20 \text{ mN m}^{-1}$, zeigen alle Methoden eine Koexistenz einer flüssigen und einer festen Phase, wie in [Albrecht et al., 1982] bis zu $\Pi \approx 25 \text{ mN m}^{-1}$ (für DPPC) oder $\Pi \approx 35 \text{ mN m}^{-1}$ (für DMPC) beschrieben. Oberhalb dieser Region ist die Monoschicht in einem festen Zustand, für den eine lineare Steigungsrate der ε_{PC} , ε_{MC} und η_{PC} gefunden wurde. Ein Fest/fest-Phasenübergang ist bei $\Pi \approx 38 \text{ mN m}^{-1}$ gefunden [Albrecht et al., 1982] worden.

Für $x_C \geq 40 \text{ Mol\%}$ zeigen die ε_{PC} , ε_{MC} und η_{PC} Kurven nur einen Knick. Oberhalb dieses Phasenüberganges haben die Steigungsraten die gleiche Größenordnung wie die des reinen Cholesterols. Visualisierungsmethoden zeigen bei diesem Phasenübergang eine Inversion des Kontrastes für die Domänen und deren Umgebungsphase. Es wird vermutet, dass unterhalb dieses Phasenüberganges die Wechselwirkungen zwischen den CC ähnlich den Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden sind, wobei diese oberhalb des Phasenüberganges ähnlicher zu reinem Cholesterol sind. Dieser Phasenübergang kann nicht durch statische Oberflächenrheologie, sondern nur durch Visualisierungsmethoden und dynamische Oberflächenrheologie detektiert werden. Dieser Phasenübergang ist die Obergrenze der sogenannten β -Region.

DOPC/Cholesterol Mischungen haben allgemein viel niedrigere Steigungsraten bei der η_{OC} und ε_{OC} mit steigender Π , die fast linear sind. Nur durch eine ausführlichere Analyse kann man Knicke der Kurven, hauptsächlich für $x_C = 40 - 80 \text{ Mol\%}$ sehen. Bei kleinem Π ist ein kleines Plateau für den x_C -Bereich zu sehen, welches übereinstimmt mit der sogenannten α -Region der stöchiometrischen CC , die getrennt ist von einer Phase, die reich an DOPC ist. Es ist interessant, dass die dynamischen Elastizitätsmessungen in der Lage sind, die α -Region der ungesättigten Lipide zu detektieren. Dies ist nicht der Fall für die gesättigten Lipide DPPC und DMPC in deren Mischungen mit Cholesterol. Der einzige klare Beweis einer β -

Region, wo die CC von einer Phase, reich an Cholesterol, getrennt sind, ist der Fakt, dass die Steigungsrate der ε_{OC} und η_{OC} für $x_C \geq 80$ Mol% im Vergleich zu $x_C \leq 60$ Mol% deutlich erhöht ist.

2.3 Asymmetrische und symmetrische Bischichtbildung beim Aufprall eines Tropfens

Die physikochemische Grundfrage ist, ob sich beim schrägen Aufprall von Tropfen auf Flüssigkeiten (siehe Abb. 2.19) durch das Aufeinanderlagern von Monoschichten Bischichten bilden oder ob die Monoschichten auf den Oberflächen durch die Dynamik des Aufpralls verdrängt werden?

Symmetrische Bischichtbildung folgt nach dem Kollaps von Monoschichten mit Faltenbildung und einem Gleichgewichtszustand von Monoschichten und Bischichten. Dies wurde bereits eingehend in der Literatur [Baoukina et al., 2008, Gopal & Lee, 2001, Lee, 2008, Lipp et al., 1998, Nikomarov, 1990, Ridsdale et al., 2001, Sibug-Aga & Dunn, 2004] untersucht. Man kann davon ausgehen, dass die asymmetrische Bischichtbildung beim Tropfenaufprall demselben Mechanismus folgt wie bei statischen Experimenten [Mueller et al., 1962, Pohl et al., 1998, Schindler, 1980].

Der Aufprall der Flüssigkeitstropfen auf verschiedenen Oberflächen ist für den Aufprall in senkrechter Richtung auf feste Oberflächen [Mock et al., 2005, Rein, 1993, Wang et al., 2009, Yarin, 2006] oder Flüssigkeitsoberflächen [Berberovic et al., 2009, Manzello & Yang, 2002, Rein, 1993, Wang et al., 2009, Weiss & Yarin, 1999, Yarin, 2006] sehr eingehend untersucht worden, wozu auch numerische Simulationen durchgeführt wurden (für den Aufprall von Tropfen auf Festkörper [Haller et al., 2002] oder auf Flüssigkeiten [Berberovic et al., 2009]). Nur wenige Autoren haben den schrägen Tropfenaufprall auf feste [Afkhami & Bussmann, 2006, Mock et al., 2005, Sikalo et al., 2005] und flüssige Oberflächen [Lenewit et al., 2001, Lenewit et al., 2005, Okawa et al., 2008, Rein, 1993] untersucht.

Der Tropfenaufprall auf Flüssigkeitsoberflächen, die mit oberflächenaktiven Substanzen bedeckt sind, wurde nur für den senkrechten Aufprall [Lampe et al., 2005, Saylor & Grizzard, 2004, Saylor & Grizzard, 2003, Saylor, 2004] untersucht. Bis jetzt gibt es keine Studien zum Tropfenaufprall auf Flüssigkeiten, die mit Phospholipid-Monoschichten bedeckt sind, mit Ausnahme einer Publikation, bei der der Tropfen Lecithin enthält und auf verschiedenen festen Oberflächen [Werner et al., 2009] senkrecht aufprallt.

2.3.1 Materialien und Methoden

2.3.1.1 Materialien

Sowohl die Flüssigkeit des Tropfens als auch die der Flüssigkeitsschicht, auf die der Tropfen aufprallt, im Folgenden "Zielflüssigkeit" genannt, bestanden aus einer Mischung von 61 % Glycerin (w/w) mit bidestilliertem Wasser. Damit kann der Aufprall von ca. 20 μm großen Tröpfchen in einem rotierenden System durch ca. 2 mm große Einzeltropfen nach den strömungsmechanischen Ähnlichkeitsgesetzen dynamisch simuliert werden. Durch eine leichte Senkung des Wassergehalts des Tropfens wurde die Dichte bei 1161,2 kg/m^3 eingestellt, welche größer als die Dichte der Zielflüssigkeit (1158,6 kg/m^3) ist. Die

Tropfenflüssigkeit sinkt nach dem flächigen Ausbreiten auf der Zielflüssigkeit langsam ein und nimmt die möglicherweise unter ihr eingeschlossenen fluoreszenzmarkierten Lipide mit in die Tiefe. Die Oberflächenspannung des Glycerin-Wasser-Gemischs beträgt 69 mN m^{-1} und die Volumenviskosität $11,68 \text{ mPa s}$.

Es wurden mehrere Lipidmischungen von reinen gesättigten und ungesättigten Phospholipiden und einige von deren Mischungen mit Cholesterol gewählt. In Abb. 2.34 ist das Phasendiagramm für gesättigte DPPC Monoschichten und deren Mischungen mit Cholesterol gezeigt, das mit eigenen rheologischen Messungen und mit den Daten anderer Autoren erzeugt wurde. Wie die in diesem Phasendiagramm eingefügten fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen von [Worthman et al., 1997] zeigen, können diese Monoschichten sehr unterschiedliche Phasen bilden. Weil der Filmdruck der Lipide in einer Bilschicht ungefähr 30 mN m^{-1} beträgt, müssen die beiden Monoschichten, die zusammengefügt werden, um eine Bilschicht zu bilden, auch 30 mN m^{-1} haben. Bei diesem Filmdruck wurden drei Mischungen von DPPC und Cholesterol gewählt: bei einem Cholesterolanteil $x_C = 0 \text{ Mol\%}$ sind die Monoschichten in einem festen Zustand, bei $x_C = 33 \text{ Mol\%}$ gibt es eine singuläre flüssige Phase, und bei $x_C = 60 \text{ Mol\%}$ tritt ein Zustand zweier nicht mischbarer flüssiger Phasen auf. Zum Vergleich wurden ungesättigte Lipide (DOPC) und ihre Mischungen mit $x_C = 0$ und 60 Mol\% untersucht. Die rheologischen Eigenschaften, d.h. ε und η , wurden ausführlich charakterisiert, siehe oben Kapitel 2.1, 2.2 und [Vrânceanu et al., 2007b, Vrânceanu et al., 2008a]. NBD-PE wurde als Fluoreszenz-Marker für die Monoschichten verwendet. Bei 3 Mol\% NBD-PE ist die stärkere Fluoreszenzintensität der Zielmonoschicht gefunden. Um die mechanischen Eigenschaften des Fluoreszenzmarkers NBD-PE zu simulieren, wurden 3 Mol\% 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) in der Monoschicht ohne NBD-PE dazugegeben. Calcein, ein wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff, ist nur für die Visualisierung der Tropfenvolumenflüssigkeit benutzt worden. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe wurden nicht gleichzeitig verwendet. Die Monoschichten wurden durch eine Chloroformlösung ($0,2 \text{ }\mu\text{mol/ml}$) erstellt. Chloroform verdunstet in 5 Minuten und sein völliges Verschwinden wurde durch Filmdruckmessungen an beiden Flüssigkeiten überprüft.

2.3.1.2 Methode

Abb. 2.19 zeigt ein vereinfachtes Schema des Versuchsaufbaus. Ein hängender Tropfen wird mit einem kurzen Gasdruckstoß horizontal beschleunigt und landet auf einer Flüssigkeitsoberfläche. Der Tropfen und die Zielflüssigkeit haben Lipidmonoschichten auf ihren Oberflächen.

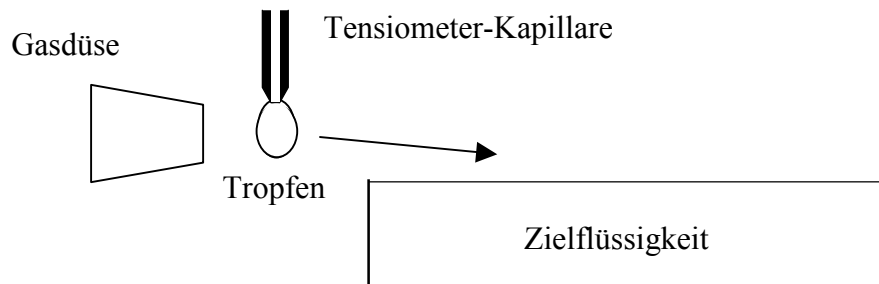


Abb. 2.19 : Vereinfachtes Schema des Versuchsaufbaus

Die Versuchsdurchführung läuft in folgenden Schritten ab:

Die Küvette wird mit der Versuchsflüssigkeit befüllt (Wasser/Glycerin-Gemisch, kinematische Zähigkeit: $\nu = 10 \text{ mm}^2/\text{s}$), die Lipid-Monoschicht wird in organischem Lösemittel (Chloroform) gelöst, mit einer ml-Spritze auf die Oberfläche aufgetragen. Die Abnahme der Oberflächenspannung, d.h. Zunahme des Filmdrucks Π , wird in situ mit dem in Abb. 2.20 gezeigten Sensor (PS4 von Nima, Coventry, UK) mit der Wilhelmy-Plattenmethode bestimmt. Vor Durchführung des Tropfenaufpralls muss das Lösemittel vollständig verdampft sein und die Monoschicht auf der Küvettenoberfläche im thermodynamischen Gleichgewicht stehen.

Mit dem Dosiersystem des Profilanalyse-Tensiometers (PAT) wird das gewünschte Volumen des hängenden Tropfens ($4 \mu\text{l}$, d.h. $D \sim 2 \text{ mm}$) an einer Kapillare exakt dosiert. Zur Bildung einer Monoschicht auf der Tropfenoberfläche werden die in Chloroform gelösten Lipide mit einer $0,5 \mu\text{L}$ -Hamilton-Spritze aufgetragen. Normalerweise werden $0,2 \mu\text{l}$ eingespritzt, um damit den gewünschten $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ zu erreichen. Sobald die Monoschicht im thermodynamischen Gleichgewicht steht, wird der hängende Tropfen durch einen Gasstoß horizontal beschleunigt.

Mit einem schnellöffnenden Ventil (Öffnungsintervall $< 10 \text{ ms}$) wird ein Gasstoß durch eine Düse erzeugt, der den hängenden Tropfen von der Kapillare abreißt und auf die gewünschte Geschwindigkeit (u) beschleunigt. Der Tropfen fliegt durch einen Luftkanal, in dem er wahlweise von unten mit Überdruck und Unterdruck von oben auf den gewünschten Aufprallwinkel (α) eingestellt werden kann; durch Unterdruck von hinten kann er gebremst werden. Die Ober- und Unterseite des Luftkanals sind mit porösen Platten bedeckt, die eine homogene Luftströmung ermöglichen.

Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 2.20 schematisch gezeigt:

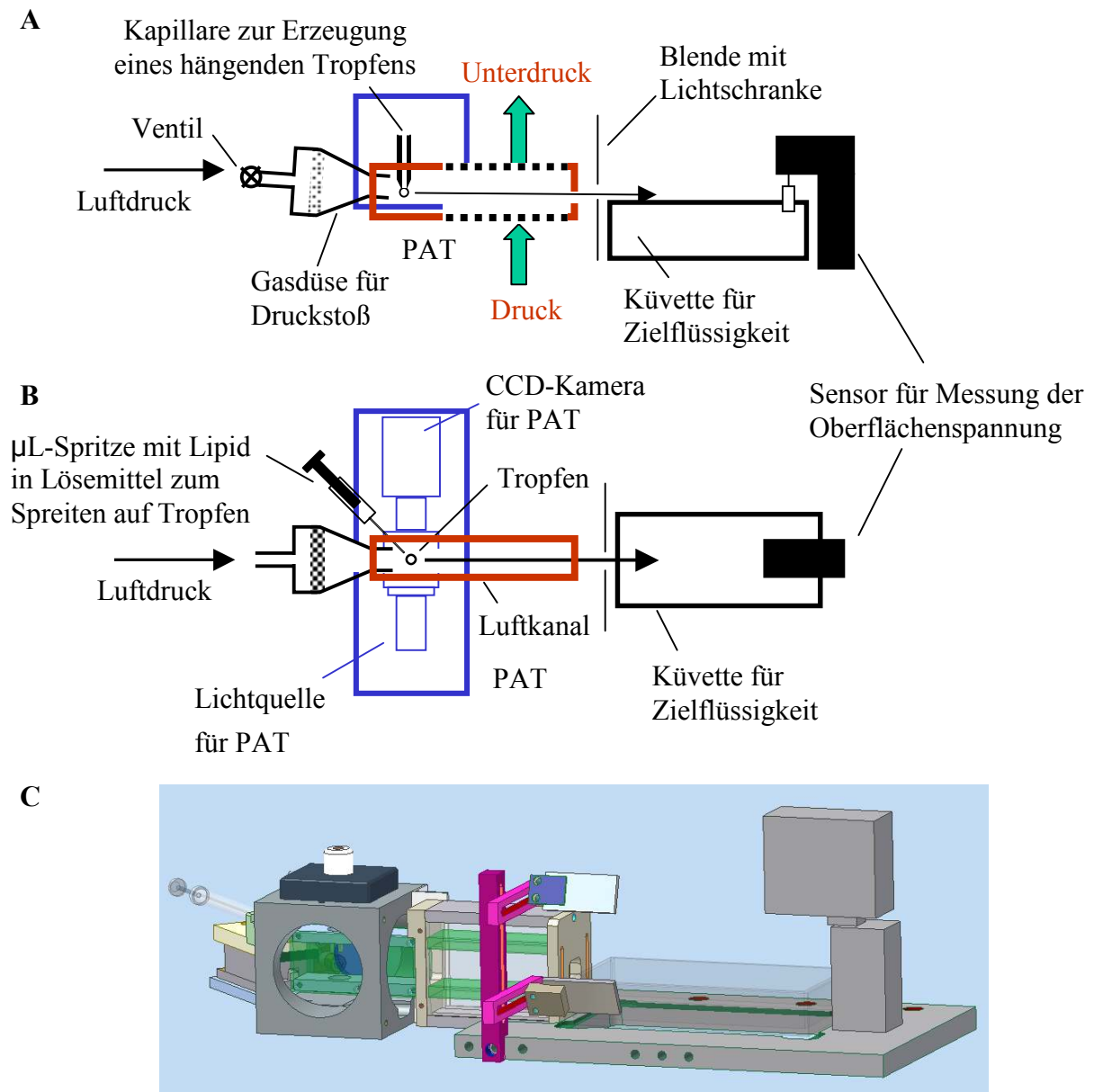


Abb. 2.20 Versuchsaufbau, A: Seitenansicht, B: Aufsicht, C: dreidimensionale Konstruktionsskizze der Tropfenhalterung, des Luftkanals (zur Steuerung von u und α) und der Küvette, Erklärung siehe Text.

Vor der Küvette ist eine Blende angebracht, die die Zielflüssigkeit vor dem Gasstoß weitgehend schützt. Fliegt der Tropfen durch die Blende, löst er an der Lichtschranke ein Signal aus, das eine Aufnahmesequenz startet. Fehlgelenkte Tröpfchen werden an der Blende abgefangen.

Der Ablauf des Tropfenaufpralls wird mit einem optischen Messverfahren registriert, das in Abb. 2.21 beschrieben ist.

Visualisierung des Tropfenaufpralls und Bestimmung der fluiddynamischen Parameter

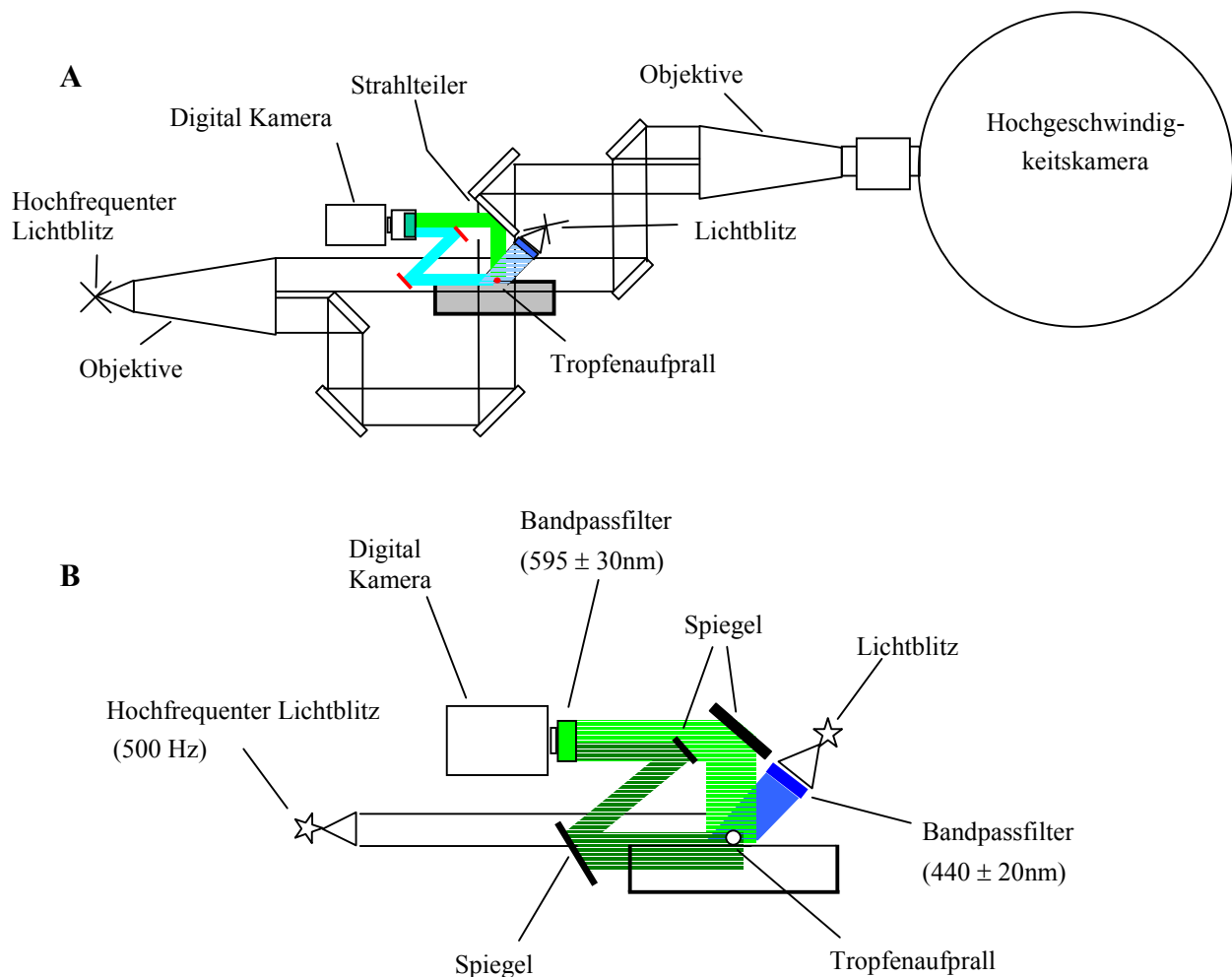


Abb. 2.21: Strahlengang für optisches Messverfahren, Tropfenflugrichtung senkrecht zur Zeichenebene. Die zwei Lichtblitze mit ihrem jeweiligen doppelten Strahlengang ermöglichen die simultane Aufnahme der Tropfenbewegung mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (Aufnahmefrequenz 1666 Hz; Aufnahmezeit ca. 60 ms) und der Bewegungen der Monoschichten mit einer Digitalkamera (10 bis 40 Hz; Aufnahmezeit unlimitiert) in vertikaler und lateraler Ansicht. Messung von Tropfenaufprallwinkel und -geschwindigkeit mit Hilfe der Hochgeschwindigkeitskamera in Abb. A (der erste Versuchsaufbau) und Abb. B veranschaulicht die Bestimmung der Aufprallgeschwindigkeit mittels Digitalkamera.

Der Tropfenaufprall und die Grenzflächendynamik nach Koaleszenz des Tropfens sollen mit einem optischen Messverfahren registriert und ausgewertet werden; der Strahlengang ist in Abb. 2.21 skizziert. Wesentliche Bestandteile der Aufnahmetechnik sind eine hochfrequente Blitzlampe mit kurzer Leuchtdauer (Nanolite KL-L: max. Blitzfrequenz: 10 kHz, Leuchtdauer $< 18\text{ ns}$, Energie pro Blitz 25 mJ) sowie eine Trommelkamera mit einem

Kleinbildfilm (max. Filmgeschwindigkeit: 90 m/s, d.h. max. Bildfrequenz: 10 kHz bei Bildbreite: 9 mm, Trommelumfang: 1,50 m).

Durch den in Abb. 2.21 dargestellten Strahlengang kann der Tropfenaufprall simultan in vertikaler und lateraler Perspektive registriert werden. Die Trommelkamera bietet die Möglichkeit, 86 Bildpaare des Aufpralls zu erfassen.

Die Tropfenflüssigkeit wurde angefärbt, um ihre Verteilung auf der Zielflüssigkeit nachweisen zu können. Zur Untersuchung der Grenzflächendynamik wurden fluoreszenzmarkierte Phospholipide (bei Monoschichten) auf der Oberfläche des Tropfens bzw. der Zielflüssigkeit verteilt.

Der Tropfenaufprall wird simultan in vertikaler und horizontaler Perspektive durch eine Digitalkamera mit 14 Bildern/s erfasst. Deren Objektiv ist mit einem Lichtfilter ausgestattet und erfasst die Fluoreszenz bei 595 ± 30 nm. Eine Xenon-Blitzlampe ist mit einem Bandpassfilter um 440 ± 20 nm ausgestattet. Es wird entweder die Monoschicht des Tropfens, die der Zielflüssigkeit oder der Tropfenvolumenflüssigkeit fluoreszenzmarkiert. Das Absinken der wasserunlöslichen Monoschichten des Tropfens oder der Zielflüssigkeit in die Tiefe der Zielflüssigkeit wurde in seitlicher Perspektive registriert. Dieses Absinken bildet einen Nachweis für eine vorangegangene Bischichtbildung, da Phospholipide nur in der Konformation einer Bischicht in wässrigen Lösungen dispergierbar sind [Gopal & Lee, 2001, Lipp et al., 1998, Marrink & Mark, 2003, Ridsdale et al., 2001].

Um den Winkel und die Geschwindigkeit des aufprallenden Tropfens zu bestimmen, benutzte ich zuerst eine Hochgeschwindigkeits-Trommelkamera, welche zwei Perspektiven des Tropfenaufpralls auf einen 35-mm-Schwarzweißfilm aufnimmt. Diese Kamera nimmt die ersten 66 ms des Tropfenaufpralls mit 1666 Bilder pro Sekunde auf. Dann wurden mit Hilfe eines zusätzlichen Spiegels Geschwindigkeit und Aufprallwinkel ausgehend von der seitlichen Perspektive der Digitalkamera berechnet, was eine gewaltige Zeitersparnis mit sich brachte. Die Hochfrequenzblitzlampe ist bei 500Hz eingestellt und wurde benutzt, um den aufprallenden Tropfen vor dem Aufprall mit ungefähr 5 – 6 Blitzen zu beleuchten. Die Tropfenbilder erscheinen auf einem Bild in der seitlichen Perspektive der Digitalkamera. Aus dieser Abbildung wurden Aufprallgeschwindigkeit u und -winkel α berechnet.

Der Aufprallwinkel α betrug zwischen $9,5^\circ$ und 15° und die Aufprallgeschwindigkeit u ließ sich zwischen 1,2 und 2,0 m/s variieren. Aus diesen Werten wurde die Weberzahl: $We = \rho Du^2 / \sigma$ bestimmt. Sie lag zwischen 80 und 230, wobei ρ die Dichte der Tropfenflüssigkeit ist, D der Tropfendurchmesser, u die Tropfenaufprallgeschwindigkeit und σ die Oberflächenspannung. Alle Versuche sind bei $21,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$ durchgeführt worden.

2.3.2 Ergebnisse

2.3.2.1 Die Ausbreitung des aufprallenden Tropfens auf der Zielflüssigkeitsoberfläche

[Lenewit et al., 2005] haben den schiefen Tropfenaufprall ohne Monoschichten untersucht und gefunden, dass der aufprallende Tropfen sich, wie in Abb. 2.22 schematisch dargestellt, ausbreitet. Bei kleinen Aufprallwinkeln ($\alpha < 23^\circ$) und kleiner Relativgeschwindigkeit ($We < 140$) breitet sich der Tropfen auf der Zielflüssigkeit ohne Durchmischung aus und bildet eine dünne Schicht [Lenewit et al., 2005].



Abb. 2.22: Schematische Darstellung des sich auf der Zielflüssigkeitsoberfläche ausbreitenden Tropfens in seitlicher Perspektive.

Abb. 2.23 wurde von [Lenewit et al., 2005] übernommen und ist eine schematische Darstellung der Tropfenausbreitungsform in vertikaler Perspektive. Der aufprallende Tropfen induziert ein Geschwindigkeits-Feld auf der Zielflüssigkeit, welches den vorderen Teil der sich ausbreitenden Tropfenflüssigkeit zu einer ankerähnlichen Form expandiert und den hinteren Teil komprimiert.

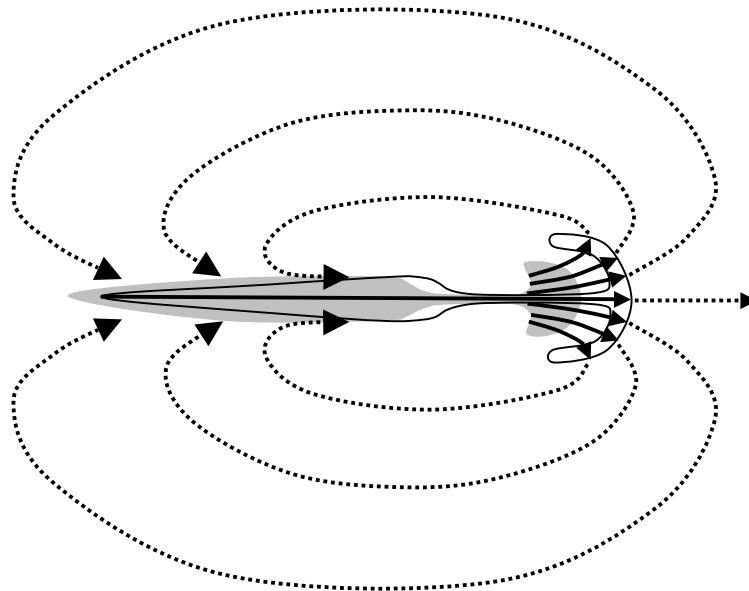


Abb. 2.23: Schematische Darstellung des sich ausbreitenden Tropfens auf der Zielflüssigkeitsoberfläche in vertikaler Perspektive [Lenewit et al., 2005]. Der aufprallende Tropfen kommt von der linken Seite und bildet die graue Fläche, die sich weiter ausbreitet und ein Ankermuster – die Fläche innerhalb der durchgezogenen schwarzen Linie – bildet. Die Konturen der Tropfenmuster sind von Versuchsbildern abgelesen, wobei das induzierte Geschwindigkeitsfeld durch gepunktete Pfeile dargestellt ist, um seinen Verlauf qualitativ darzustellen.

Wenn Tropfen und Zielflüssigkeit mit Lipid-Monoschichten bedeckt sind, wird das Tropfenaufprallmuster durch die rheologischen Eigenschaften der Monoschichten beeinflusst.

2.3.2.2 Nachweis der Bischicht- oder Multischichtbildung unter der Tropfenflüssigkeit

Es wurde untersucht, ob Bischichtbildung mit Lipiden sowohl der Tropfen- als auch der Zielmonoschicht möglich ist. Der Ort, wo Lipide der Tropfenmonoschicht mit Lipiden der Zielmonoschicht im Kontakt kommen können, ist unter der dünnen Flüssigkeitsschicht des Tropfenaufprallmusters. Wenn die in Wasser nicht löslichen Lipide unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen sind, befinden sie sich in einem wässrigen Medium und bilden spontan Bischichten- und/oder Multischichten-Phasen in Form von Vesikeln und Liposomen, wie in der Literatur [Amrein et al., 1997, Gopal & Lee, 2001, Lipp et al., 1998, Marrink & Mark, 2003, Piknova et al., 2002, Ridsdale et al., 2001] gezeigt wird. Da die neu gebildeten Bischichtstrukturen aus Lipiden von Tropfen- und Zielmonoschicht gebildet sind, sind sie asymmetrisch.

Man braucht nun einen experimentellen Nachweis, dass Lipide aus Tropfen- und/oder Zielmonoschicht, wie in Abb. 2.24 A schematisch dargestellt, nach dem Aufprall unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen sind. Der aufprallende Tropfen kann die Lipide beider Monoschichten vor sich her schieben und damit verdrängen, sodass die beiden Flüssigkeiten in Kontakt kommen. In diesem Fall sollten keine Lipide an der Kontaktfläche beider wässrigen Phasen sein, was eine asymmetrische Bischichtbildung unter der Tropfenflüssigkeit verhindert, wie in Abb. 2.24 B schematisch dargestellt ist.

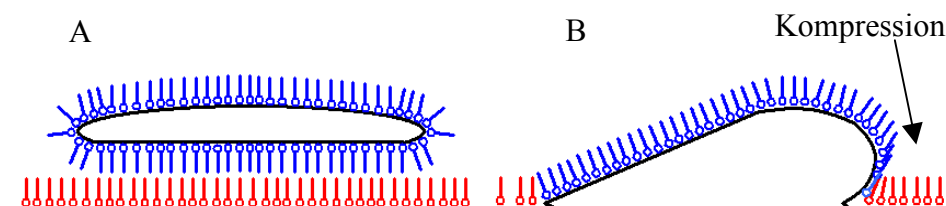


Abb. 2.24: Zwei Hypothesen zur Monoschicht-Dynamik während des streifenden Tropfenaufpralls. Erläuterung siehe Text.

Um die Präsenz der Lipide von Tropfen- und/oder Zielmonoschicht unter der Tropfenflüssigkeit nachzuweisen, wurde die Tropfenflüssigkeit so eingestellt, dass sie nach dem Aufprall in die Zielflüssigkeit einsinkt. Dafür wurde ihre Dichte im Vergleich zur Dichte der Zielflüssigkeit um ca. 1 % erhöht. Nachdem der aufprallende Tropfen in der Ankerform zur Ruhe kommt, beginnt die Tropfenflüssigkeit aufgrund ihrer erhöhten Dichte in der Zielflüssigkeit abzusinken, wie in Abb. 2.25 schematisch dargestellt.

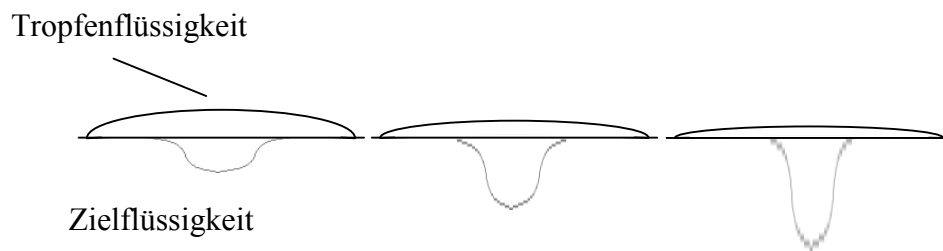


Abb. 2.25: Schematische Darstellung zum Nachweis der Bilschichtbildung zwischen Tropfen- und Ziel Flüssigkeit durch Erhöhung der Dichte des Tropfenfluids, sodass die nach dem Aufprall auf der Oberfläche ausgebreitete und zur Ruhe gekommene Tropfenflüssigkeit langsam einsinkt.

Um das Verhalten der Tropfenflüssigkeit während und nach dem Aufprall zu verstehen, wurde sie mit Calcein fluoreszenzmarkiert. Die Aufnahmen in vertikaler und seitlicher Perspektive sind in Abb. 2.26 dargestellt.

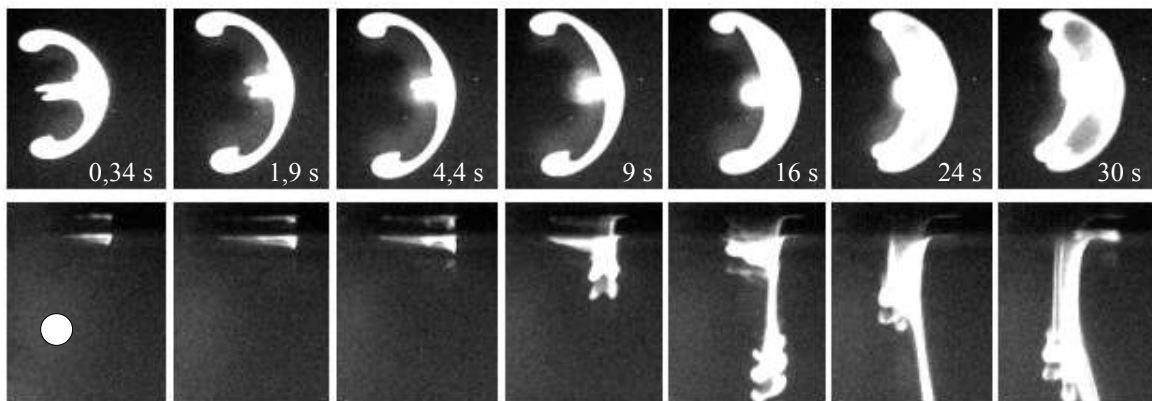


Abb. 2.26: Tropfenaufprall in vertikaler (obere Abbildungen) und seitlicher (untere Abbildungen) Perspektive, wenn die Tropfenflüssigkeit mit Calcein fluoreszenzmarkiert ist. Tropfen- und Zielmonoschichten: DOPC/Cholesterol/DPPE = 64/33/3 (molar), $\varepsilon = 145 \text{ mN m}^{-1}$; $\eta = 65 \text{ mN s m}^{-1}$. Der weiße Kreis (untere Zeile erste Abbildung) zeigt die Größe des Tropfens vor dem Aufprall als Maßstab, $D = 1,8 \text{ mm}$.

Die Abbildungen in vertikaler Perspektive zeigen die Bildung des Ankerformmusters wie in Abb. 2.23 von [Lenewit et al., 2005] beschrieben. Nach dem Aufprall breitet sich die Tropfenflüssigkeit in einem ankerförmigen Muster aus und bildet eine dünne Flüssigkeitsschicht auf der Oberfläche der Ziel Flüssigkeit [Lenewit et al., 2005]. Wenn die horizontale Bewegung zur Ruhe kommt, fängt die Tropfenflüssigkeit an, wegen der Dichtedifferenz in der Ziel Flüssigkeit abzusinken, wie in der unteren Zeile der Abb. 2.26 zu sehen ist und wie in Abb. 2.25 schematisch dargestellt. Auf den letzten drei Bildern der vertikalen Perspektive von Abb. 2.26 kann man das Ankerformmuster wegen der Fluoreszenz der absinkenden Flüssigkeit nicht mehr klar erkennen.

Man kann in Abb. 2.26 sehen, dass die Tropfenflüssigkeit fast vollständig absinkt, und es soll festgestellt werden, ob es unter ihr eingeschlossene Lipide gibt. Dafür wurde die Tropfen- oder Zielmonoschicht fluoreszenzmarkiert.

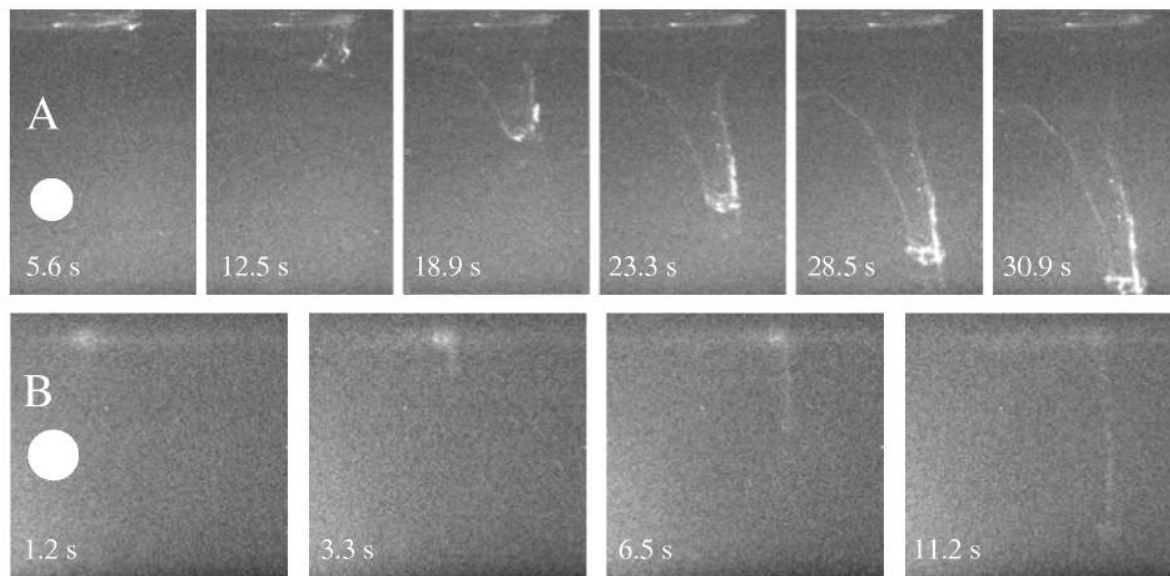


Abb. 2.27: Seitliche Ansicht der Zielflüssigkeit nach dem Tropfenaufprall mit $D = 2$ mm, $\alpha = 11^\circ$, $u = 2,2$ m/s, $\Pi_{\text{Tropfen}} = 36$ mN m⁻¹, $\Pi_{\text{Zielfl.}} = 29$ mN m⁻¹, $We = 310$. Die seit dem Aufprall vergangene Zeit ist in jedem Bild unten links angegeben. Monoschichten: A: Tropfen – DOPC/DPPE = 97/3 (molar), Zielflüssigkeit – DOPC/NBD-PE = 97/3 (molar) (Zielmonoschicht - fluoreszenzmarkiert); B: Tropfen – DOPC/Cholesterol/NBD-PE = 64/33/3 (molar), Zielflüssigkeit – DOPC/Cholesterol/DPPE = 64/33/3 (molar) (Tropfenmonoschicht - fluoreszenzmarkiert).

Durch das langsame Absinken der Tropfenflüssigkeit nach dem Aufprall wird die zwischen Tropfen- und Zielflüssigkeit liegende Kontaktgrenzfläche in die Tiefe mitgeführt. Abb. 2.27 zeigt das Absinken der Tropfenflüssigkeit in seitlicher Perspektive. Die mitgeführte fluoreszenzmarkierte Ziel- (Abb. 2.27 A) oder Tropfenmonoschicht (Abb. 2.27 B) muss unter der Tropfenflüssigkeit liegen, um mitgerissen zu werden. Aufgrund dieser Tatsache und weil Phospholipide in wässrigen Lösungen nur als Bischichten dispergierbar sind, kann gefolgert werden, dass in Abb. 2.24 zumindest partiell Bischichtbildung entsprechend Hypothese A stattgefunden hat.

Die Menge an Lipiden der Tropfenmonoschicht, die unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen ist, scheint deutlich geringer zu sein als die Menge an Lipiden der Zielmonoschicht. Das wird in Kapitel 2.3.3 erörtert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Bischichtenstrukturen durch einen schiefen Tropfenaufprall auf Monoschichten gebildet werden können. Die Details der Bischichtbildung werden auf den nächsten Seiten diskutiert.

Die dargestellte Methode zum Nachweis der Bischichtbildung wurde entwickelt, da die ursprünglich geplante Methode durch den sogenannten FRET-Effekt (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) aufgrund zu geringen Kontrasts keinen eindeutigen Nachweis erbringen konnte. Die für den FRET-Effekt notwendigen Exzitations- und Emissionsfilter zeigten eine zu hohe Durchlässigkeit in dem Spektralbereich, in dem sie eigentlich undurchlässig sein sollten.

2.3.2.3 Tropfenaufprall auf Monoschichten aus verschiedenen Zweikomponentenmischungen mit entweder gesättigten (DPPC) oder ungesättigten (DOPC) Phospholipiden mit Cholesterol

Die Tropfenaufprallmuster und die gebildeten Bilschichtstrukturen sind stark von den rheologischen Eigenschaften der Tropfen- und Zielmonoschicht beeinflusst. Die rheologischen Eigenschaften der Monoschichten können durch die Wahl verschiedener Lipide (gesättigt oder ungesättigt) und deren Mischungen mit verschiedenen x_C beeinflusst werden, wie oben schon ausführlich dargestellt. Die Verwendung von Cholesterol ist vorteilhaft, da es die Bilschichtstrukturen stabilisiert [Shah & Schulman, 1967] und bei hohem Gehalt die Multischichtbildung verhindert [Malcharek et al., 2005].

Tropfenaufprall auf gesättigte Monoschichten

A. Monoschichten aus DPPC mit 60 Mol% Cholesterol

Tropfenaufprallbilder mit Monoschichten aus DPPC und Cholesterol ($x_C = 60$ Mol%) sind in Abb. 2.28 A und B dargestellt, wobei in A die Zielmonoschicht und in B die Tropfenmonoschicht fluoreszenzmarkiert ist.

Das Ankerformmuster der sich ausbreitenden Tropfenflüssigkeit ist dunkel für die unmarkierte Tropfenmonoschicht in Abb. 2.28 A und hell in Abb. 2.28 B, wenn die Tropfenmonoschicht fluoreszenzmarkiert ist. Die Ankerform wird, wie in Abb. 2.23 und Abb. 2.26 dargestellt, von der Tropfenflüssigkeit gebildet. Der Fakt, dass das Ankerformmuster in Abb. 2.28 A dunkel und in Abb. 2.28 B hell erscheint, bedeutet, dass das Tropfenflüssigkeitsmuster an seiner Luft-Wasser-Grenzfläche mit Lipiden der Tropfenmonoschicht bedeckt ist. Diese Monoschicht, die sich auf der Oberseite des Ankerformmusters befindet, bleibt über lange Zeit stabil; ihre Lipide werden von der sinkenden Tropfenflüssigkeit nicht in die Tiefe mitgerissen.

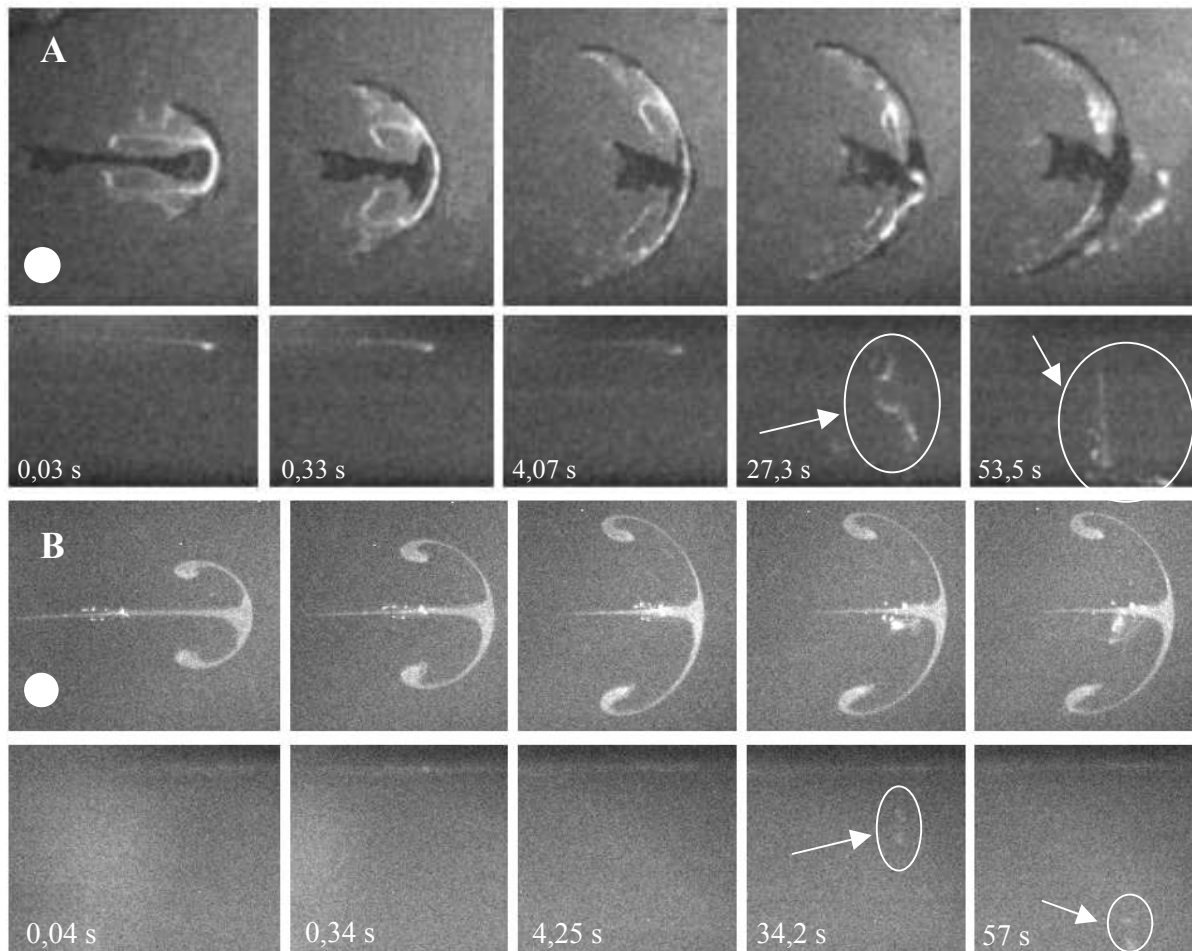


Abb. 2.28 Tropfenaufprall in vertikaler (obere Abb.) und seitlicher (untere Abb.) Perspektive für DPPC/Cholesterol/(NBD-PE oder DPPE) = (37/60/3 Molar); $\varepsilon_{PC} = 670 \text{ mN m}^{-1}$; $\eta_{PC} = 530 \text{ mN s m}^{-1}$. A: NBD-PE auf Zielmonoschicht, $u = 1,6 \text{ m/s}$; $\alpha = 11,4^\circ$; $We = 82$; B: NBD-PE auf Tropfenmonoschicht, $u = 1,5 \text{ m/s}$; $\alpha = 10,6^\circ$; $We = 153$.

Sowohl in vertikaler als auch in seitlicher Perspektive kann man sehen, dass ein Teil der Lipide der Tropfen- und der Zielmonoschicht unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen sind und in die Zielflüssigkeit einsinken, siehe dazu die Pfeile in Abb. 2.28 A und B.

B. Monoschichten aus DPPC mit 33 Mol% Cholesterol

Tropfenaufprallbilder mit Monoschichten aus DPPC mit 33 Mol% Cholesterol, bei denen die Zielmonoschicht fluoreszenzmarkiert ist, sind in Abb. 2.29 dargestellt.

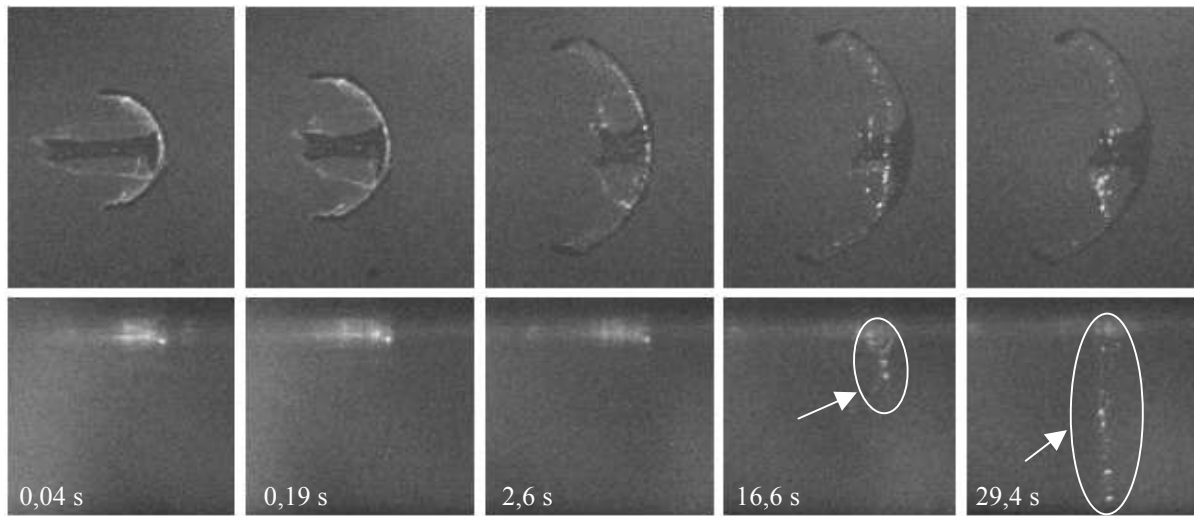


Abb. 2.29 Tropfenaufprall in vertikaler (obere Abb.) und seitlicher (untere Abb.) Perspektive für DPPC/Cholesterol/(NBD-PE oder DPPE) = (64/33/3 Molar); $\varepsilon_{PC} = 210 \text{ mN m}^{-1}$; $\eta_{PC} = 200 \text{ mN s m}^{-1}$. NBD-PE auf Zielmonoschicht, $u = 1,42 \text{ m/s}$; $\alpha = 10,9^\circ$; $We = 130$.

C. DPPC-Monoschichten ohne Cholesterol

Tropfenaufprallbilder mit Monoschichten aus reinem DPPC sind in Abb. 2.30 A und B dargestellt, wobei in A die Zielmonoschicht und in B die Tropfenmonoschicht fluoreszenzmarkiert ist.

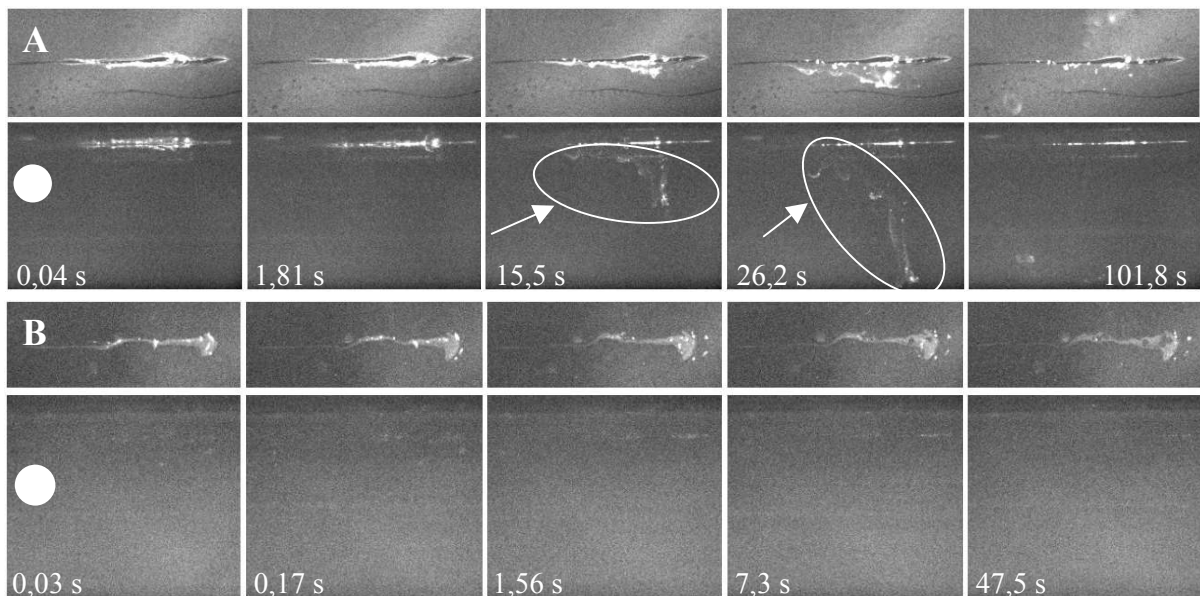


Abb. 2.30: Tropfenaufprall in vertikaler (obere Abb.) und seitlicher (untere Abb.) Perspektive für DPPC/(NBD-PE oder DPPE) = (97/3 Molar); $\varepsilon_P = 80 \text{ mN m}^{-1}$; $\eta_P = 95 \text{ mN s m}^{-1}$. A: NBD-PE auf Zielmonoschicht, $u = 1,9 \text{ m/s}$; $\alpha = 9,7^\circ$; $We = 226$; B: NBD-PE auf Tropfenmonoschicht, $u = 1,9 \text{ m/s}$; $\alpha = 9,7^\circ$; $We = 226$.

Der „Schwanz“ der ausgebreiteten Tropfenflüssigkeit ist sehr lang und es bildet sich keine „Ankerform“, wie es Monoschichten DPPC mit $x_C = 33$ und 60 Mol% in Abb. 2.28 und Abb. 2.29 tun. Die Zielmonoschicht bleibt einfach unbewegt, das erste Bild (nach 0,03s) ist dem letzten (nach 100s) ähnlich. Nach dem Aufprall kommt die Tropfenflüssigkeit rasch auf der Zielflüssigkeit zur Ruhe, ohne Oberflächenstörungen zu erzeugen. Die Ausbreitung der Tropfenflüssigkeit zeigt starke Ähnlichkeit mit der auf einer festen Unterlage. Anders als die flüssigen DPPC/Cholesterol-Monoschichten hat eine DPPC-Monoschicht den Zustand eines Festkörpers [Vrânceanu et al., 2008a].

In seitlicher Ansicht kann das Absinken der fluoreszenzmarkierten Monoschicht beobachtet werden. Im vorderen Bereich der Tropfenaufprallmuster, wo der Großteil der Tropfenmasse zur Ruhe kommt, gibt die stabile DPPC-Monoschicht nach und die Tropfenflüssigkeit sinkt wegen ihrer erhöhten Dichte in die Zielflüssigkeit ein. Die absinkende Tropfenflüssigkeit nimmt die unter sich eingeschlossenen Lipide in die Tiefe mit.

In Abb. 2.30 B ist das Absinken der Tropfenflüssigkeit auf statischen Bildern in seitlicher Perspektive schlecht zu sehen, was bei dem schnell laufenden Film nicht der Fall ist. In diesem Fall wurden wenige Lipide aus der Tropfenmonoschicht in die Tiefe mit der Tropfenflüssigkeit mitgenommen.

Tropfenaufprall auf ungesättigte Monoschichten

A. Monoschichten aus DOPC mit 60 Mol% Cholesterol

Tropfenaufprallbilder mit Monoschichten aus DOPC mit Cholesterol ($x_C = 60$ Mol%) sind in Abb. 2.31 A und B dargestellt, wobei in A die Zielmonoschicht und in B die Tropfenmonoschicht fluoreszenzmarkiert ist.

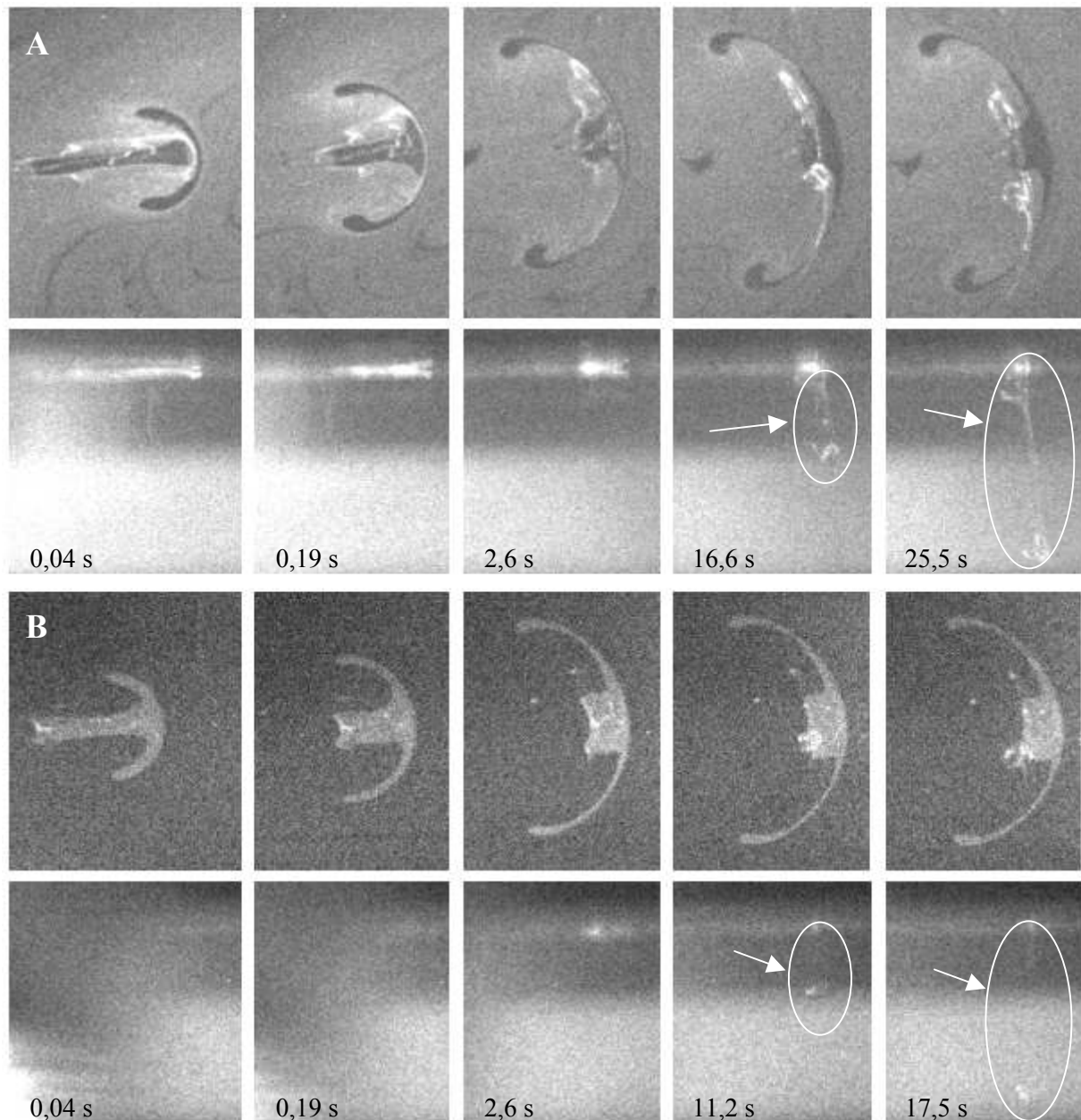


Abb. 2.31 Tropfenaufprall in vertikaler (obere Abb.) und seitlicher (untere Abb.) Perspektive für DOPC/Cholesterol/(NBD-PE oder DPPE) = (37/60/3 Molar); $\epsilon_{OC} = 250$ mN m^{-1} ; $\eta_{OC} = 140$ mN s m^{-1} . A: NBD-PE auf Zielmonoschicht, $u = 1,45$ m/s; $\alpha = 10,4^\circ$; $We = 128$; B: NBD-PE auf Tropfenmonoschicht, $u = 1,33$ m/s; $\alpha = 15,0^\circ$; $We = 113$.

Diese Monoschichten sind in einer flüssigen Phase und das Tropfenaufprallmuster hat eine Ankerform. In der Vertikalansicht in Abb. 2.31 kann man erkennen, wie sich im Vorderteil des Schwanzes und im zentralen Bereich der „Ankerform“ der Tropfenflüssigkeit helle Areale bilden. Da alle hellen Areale mit der Tropfenflüssigkeit absinken (siehe Pfeile), wird gefolgert, dass sie sich unter der Tropfenflüssigkeit befinden.

B. DOPC-Monoschichten ohne Cholesterol

Tropfenaufprallbilder mit Monoschichten aus reinem DOPC sind in Abb. 2.32 A und B dargestellt, wobei in A die Zielmonoschicht und in B die Tropfenmonoschicht fluoreszenzmarkiert ist. Lipide der Ziel- und Tropfenmonoschicht sind unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen und sinken mit ihr ab, wie die Bilder in seitlicher Perspektive zeigen.

Bei Markierung der Monoschicht der Zielflüssigkeit erscheinen auffallend helle Areale zunächst seitlich entlang der sich ausbreitenden Tropfenflüssigkeit, siehe dazu die vertikale Ansicht in Abb. 2.32 A (0,04 s nach dem Aufprall). Diese hellen Areale sind vermutlich durch Kompression und Multischichtbildung entstanden und verbleiben auch nach über 100 s an der Oberfläche. Nur die unter der Tropfenflüssigkeit befindlichen Monoschichten sinken langsam ab, vgl. dazu die auf die als „Schlierenmuster“ absinkenden Bilschichten weisenden Pfeile und die seitliche Perspektive in Abb. 2.32. Die an der Oberfläche verbleibenden hellen Areale werden nur mit Lipiden der Zielmonoschicht und nicht mit Lipiden der Tropfenmonoschicht gebildet, wie in Abb. 2.32 B zu sehen ist.

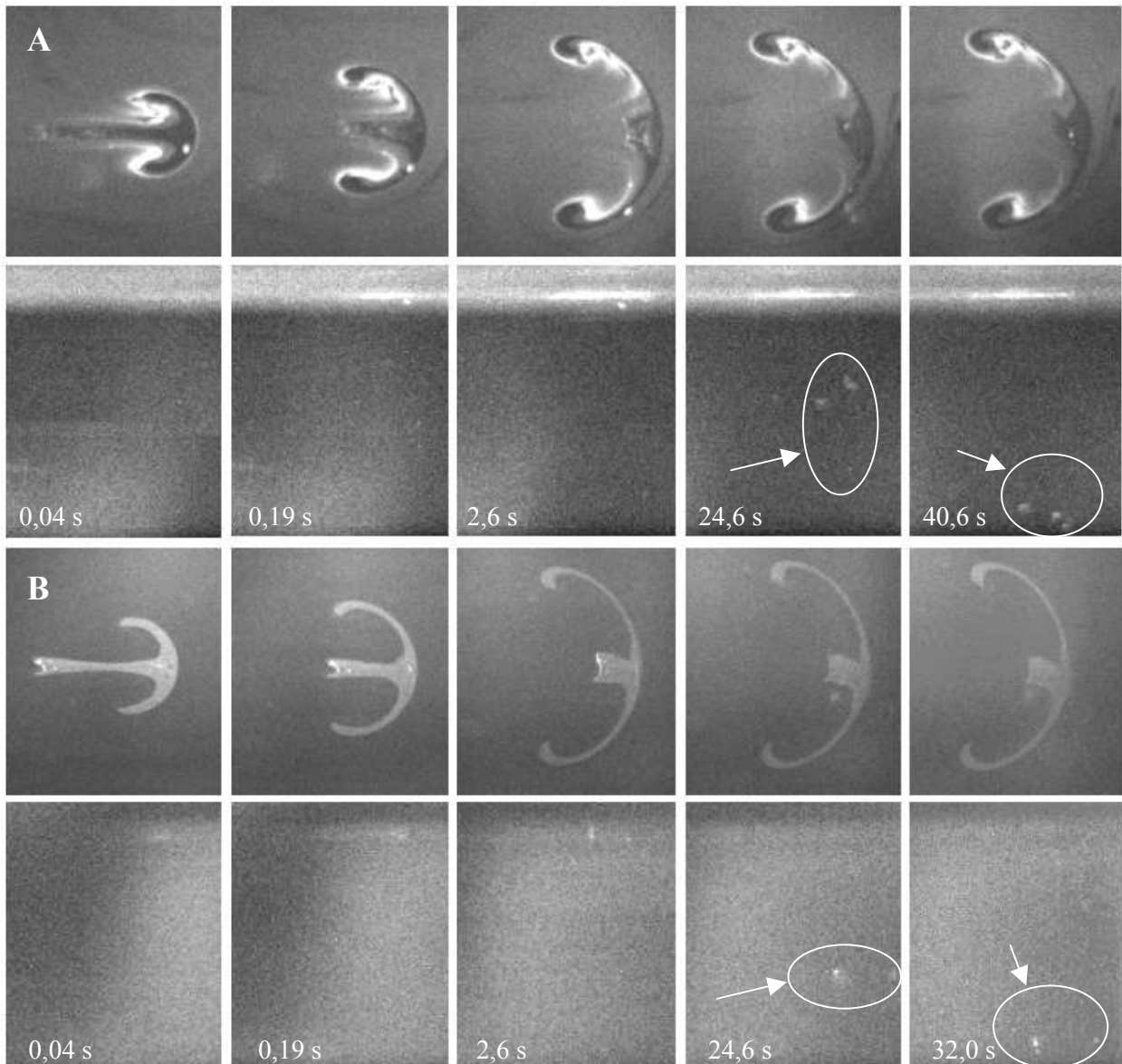


Abb. 2.32 Tropfenaufprall in vertikaler (obere Abb.) und seitlicher (untere Abb.) Perspektive für DOPC/(NBD-PE oder DPPE) = (97/3 Molar); $\varepsilon_0 = 120 \text{ mN m}^{-1}$; $\eta_0 = 40 \text{ mN s m}^{-1}$. A: NBD-PE auf Zielmonoschicht, $u = 1,3 \text{ m/s}$; $\alpha = 10,0^\circ$; $We = 118$; B: NBD-PE auf Tropfenmonoschicht, $u = 1,2 \text{ m/s}$; $\alpha = 12,0^\circ$; $We = 91$.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beim Tropfenaufprall auf reine DOPC-Monoschichten ohne Cholesterol Lipide aus Tropfen- und Zielmonoschicht unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen werden und sich besonders helle Areale neben der Tropfenankerform nur aus Lipiden der Zielmonoschicht bilden.

2.3.3 Diskussion

2.3.3.1 Rheologische Eigenschaften der Monoschichten

Vor der Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Bilschichtbildung durch Tropfenaufprall auf verschiedene Monoschichten soll zuerst der Unterschied zwischen gesättigten und ungesättigten Monoschichten und der Effekt des Cholesterols auf die Rheologie der Monoschichten betrachtet werden. Für eine klare Darstellung wurden nur die Kurven mit $x_C = 0$ und 60 Mol% aus Abb. 2.15 und Abb. 2.18 in Abb. 2.33 A und B gezeigt.

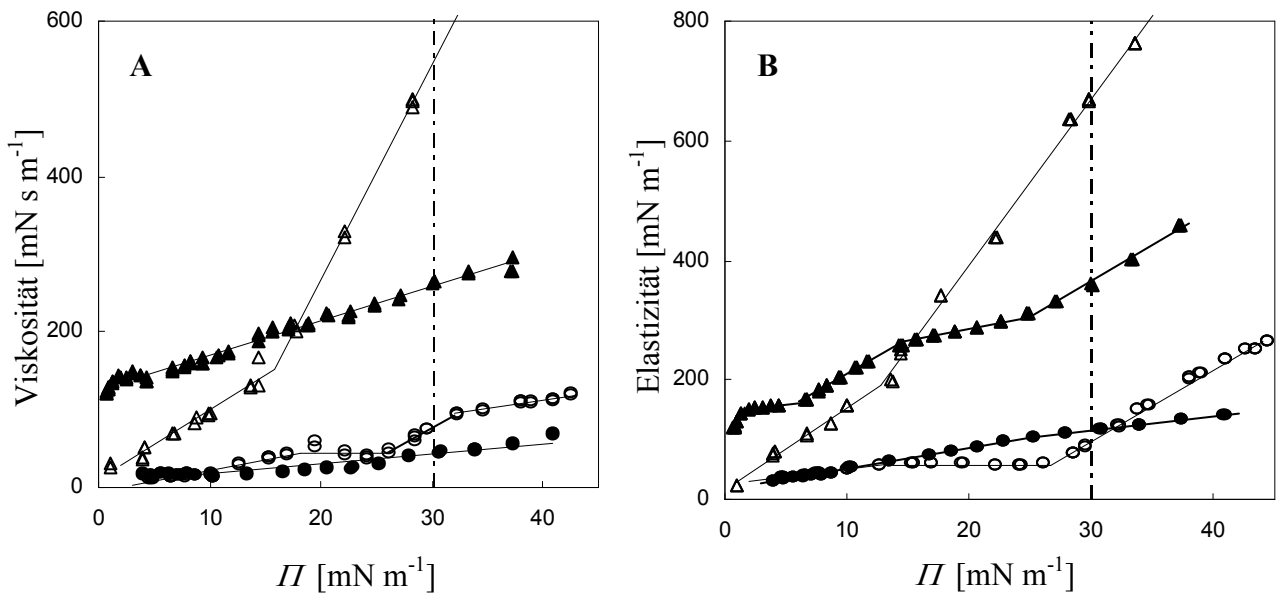


Abb. 2.33 **A**: η und **B**: ε abhängig von II für reines DPPC (\circ), reines DOPC (\bullet) und deren Mischungen mit $x_C = 60$ Mol%: DPPC/Cholesterol (Δ) und DOPC/Cholesterol (\blacktriangle). Alle durchgezogenen Linien sind lineare Regressionen und die Plateaulinien Mittelwerte für dementsprechende Bereiche von II . Die Knickstellen der durchgezogenen Kurven sind durch Schnittpunkte zwischen Plateaus und linearen Segmenten definiert.

Für reine Phospholipid-Monoschichten steigen η und ε leicht mit II . Bei 30 mN m^{-1} weisen DOPC- und DPPC-Monoschichten gleiche Werte von ε auf, wohingegen η für DPPC 1,8 Mal größer als bei DOPC ist. Bei $x_C = 60$ Mol% sind η und ε für beide Lipidmischungen wesentlich höher. Die Werte für DPPC-Cholesterol-Mischungen sind ungefähr 2,1 Mal (Viskosität) und 1,8 Mal (Elastizität) höher als die von DOPC-Cholesterol-Mischungen.

Mit steigendem II ist die Steigung der η - und ε -Kurven nicht konstant, sondern weist Knickstellen und Plateaus auf, welche Phasenübergänge indizieren. Abb. 2.34 zeigt ein Phasendiagramm, das Phasenübergänge für DPPC-Cholesterol-Mischungen mit epifluoreszenz-mikroskopischen Abbildungen von [Worthman et al., 1997] darstellt. Hier kann man erkennen, dass DPPC-Cholesterol-Monoschichten abhängig von II und x_C entweder in festem Zustand, in einer fest-flüssigen Koexistenz oder in flüssigem Zustand [Nag & Keough, 1993, Vrănceanu et al., 2008a] vorliegen. In diesem Phasendiagramm sind die

Lipidmischungen, die für den Tropfenaufrall benutzt wurden, durch leere, große Kreise eingezeichnet.

Bei $T = 21^\circ\text{C}$ und $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ sind reine DPPC-Monoschichten in einem festen Zustand [Albrecht et al., 1978, Shah & Schulman, 1967, Vrânceanu et al., 2008a], welcher kondensiert und inkompressibel ist [Albrecht et al., 1978, Shah & Schulman, 1967]. Sie sind fest, steif und haben eine hohe Scherviskosität [Evans et al., 1980], wobei sie, wie in Abb. 2.33 und in [Vrânceanu et al., 2008a, Vrânceanu et al., 2008b] dargestellt, niedrige η und ε zeigen. Die Tropfenaufrallmuster auf diesen Monoschichten haben einen langen Schwanz und keine Ankerform (Abb. 2.30). Die Zielmonoschicht ist sehr stabil und wird durch den aufrallenden Tropfen nicht bewegt.

Wie oben besprochen bildet Cholesterol mit gesättigten Phospholipiden die sogenannten kondensierten Komplexe (CC), welche die feste DPPC-Monoschicht verflüssigen und Phasenübergänge induzieren [Evans et al., 1980, Malcharek et al., 2005, Shah & Schulman, 1967]. Cholesterol verkleinert die Scherviskosität [Evans et al., 1980], wobei, wie in Abb. 2.33 gezeigt, es die Oberflächendehnungsviskosität η und -elastizität ε steigert. Reine Cholesterol-Monoschichten sind flüssig [Shah & Schulman, 1967] und haben sehr kleine Oberflächenscherviskositäten, welche fast nicht messbar sind [Evans et al., 1980]. Die verflüssigenden Eigenschaften des Cholesterols in einer gesättigten Monoschicht können mit Hilfe der hier dargestellten Ergebnisse durch Vergleich von Tropfenaufrallabbildungen auf reinen DPPC-Monoschichten (Abb. 2.30) mit denen von DPPC/Cholesterol-Mischungen mit $x_C = 33$ und 60 Mol\% (siehe Abb. 2.29 und Abb. 2.28) bestätigt werden. Beide Zweikomponentenmischungen mit Cholesterol zeigen ein Ankerformmuster, das dem Muster des Tropfenaufralls auf DOPC- und DOPC-Cholesterol-Monoschichten (Abb. 2.31 und Abb. 2.32) ähnlich ist. Diese ungesättigten Monoschichten liegen bei beliebigem Π stets in einer flüssigen Phase vor [Nag & Keough, 1993, Shah & Schulman, 1967, Vrânceanu et al., 2008a].

[Okonogi & McConnell, 2004] postulieren, dass DPPC-Cholesterol-Monoschichten bei $x_C > 30 \text{ Mol\%}$ zwei Phasen aufweisen. Wie man in Abb. 2.34 sehen kann, gibt es bei kleinen Π zwei nichtmischbare flüssige Phasen. Bei höheren Π liegen auch zwei nichtmischbare Phasen vor, aber die Autoren [Okonogi & McConnell, 2004] konnten nicht erkennen, ob diese Phasen flüssig oder fest sind. Durch Tropfenaufrallexperimente kann man zeigen, dass die unbekannte Zweiphasenregion des Phasendiagramms eine Region ist, in der mindestens die kontinuierliche Phase flüssig ist. Der Tropfenaufrall auf diesen Monoschichten weist, wie auf flüssigen Monoschichten, eine Ankerform auf.

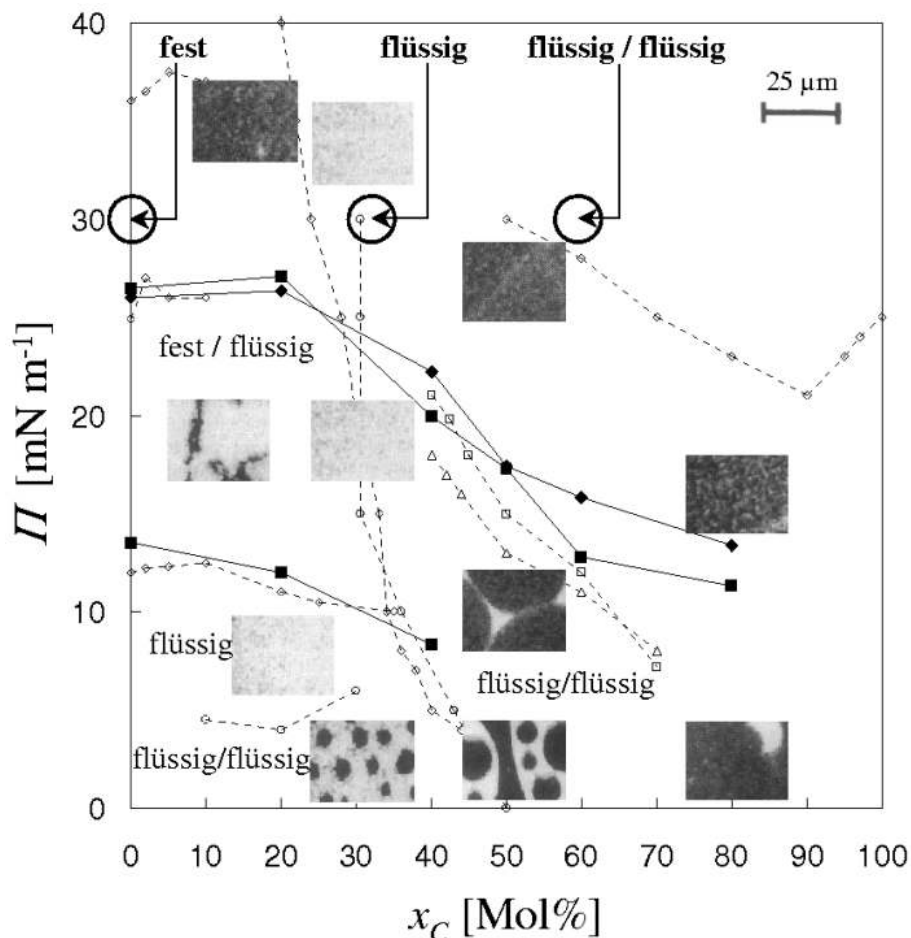


Abb. 2.34 Phasendiagramm mit Phasenübergängen für DPPC/Cholesterol-Zweikomponentenmischungen. ■ Knicke der Elastizitätskurven, ◆ Knicke der Viskositätskurven. Phasenübergänge anderer Autoren: ◇, ○: Langmuir-Filmwaage-Messungen [Albrecht et al., 1982, Worthman et al., 1997]; □, Δ: Fluoreszenzmikroskopie mit ähnlichen Fettsäuren: DMPC/Cholesterol (□) und DiC15PC/Cholesterol (Δ) [Okonogi & McConnell, 2004]. Die eingefügten epifluoreszenzmikroskopischen Abbildungen zeigen DPPC/Cholesterol-Monoschichten, die 1 Mol% NBD-PC enthalten [Worthman et al., 1997]. Der Maßstab ist 25 μm. Die großen, leeren Kreise markieren die Lipidmischungen, die in dieser Arbeit beim Tropfenaufprall benutzt wurden.

Der Tropfenaufprall auf DPPC-Cholesterol-Monoschichten mit $x_C = 33$ Mol%, siehe Abb. 2.29, zeigt, dass diese Monoschichten in einer flüssigen Phase vorliegen. Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von [Worthman et al., 1997] (siehe Abb. 2.34) belegen, dass diese Monoschichten bei $\gamma = 30 \text{ mN m}^{-1}$ eine homogene Phase darstellen.

Bei ungesättigten Phospholipid-Monoschichten erhöht das Cholesterol die Werte von η und ε (siehe Abb. 2.33) und auch die Scherviskosität [Crane & Tamm, 2004, Malcharek et al., 2005, Shah & Schulman, 1967]. DOPC-Cholesterol-Monoschichten mit $x_C = 60$ Mol% sind auch flüssig, wobei sie jedoch stabiler als die reinen DOPC Monoschichten sind. Um die Tropfenflüssigkeitsmuster bilden sich keine auffallend hellen Areale, (Abb. 2.31A), wie es für reine DOPC-Monoschichten geschieht (Abb. 2.32A). Die Zielmonoschicht scheint stabil genug zu sein, um von dem aufprallenden Tropfen nicht weggeschoben oder komprimiert zu werden; er rollt sich statt dessen auf ihr und breitet sich aus.

Mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ und ihrer Plugins (“Multi Cell Outliner”) wurden die Flächen der Tropfenaufprallmuster bestimmt. Diese sind von der Monoschichten-Lipid-Zusammensetzung folgendermaßen abhängig: Sie sind größer als die Fläche des aufprallenden Tropfens vor dem Aufprall, und zwar für reine DPPC-Monoschichten um ungefähr 140-160 % und für die anderen benutzten Monoschichten um ungefähr 220-250 %.

2.3.3.2 Besonders helle Areale

Einige auffallend helle Strukturen, die als diskrete Flächen oder helle Punkte erscheinen, bilden sich während des Tropfenaufpralls und erweisen sich als temporär stabil. Sie sind in Abb. 2.28 und Abb. 2.30 am besten zu sehen. In der ersten Publikation über den Tropfenaufprall [Vrânceanu et al., 2008b] wurden diese hellen Strukturen als planare Lipid-Bischichten bzw. -Multischichten interpretiert, die auf die Oberfläche der Zielflüssigkeit zurückkehren und durch Reintegration der Lipide in die Zielmonoschicht nach kurzer Zeit verschwinden.

Zusätzliche Experimente haben nachgewiesen, dass diese besonders hellen Punkte eigentlich kleine Luftblasen sind, die während des Tropfenaufpralls unter der Tropfenflüssigkeit eingeschlossen werden. In deren Innenraum befinden sich, an der Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche Lipide von Tropfen- sowie Zielmonoschicht. Die Luftblasen steigen zur Flüssigkeitsoberfläche auf, wo sie die Monoschicht innerhalb und außerhalb des Tropfenaufprallmusters zerstören. Sie bringen Lipide der Tropfen- und Zielmonoschicht, die an der Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche eingeschlossen waren, zurück an die Flüssigkeitsoberfläche. Wenn eine Luftblase auf der Oberfläche einer fluoreszenzmarkierten Monoschicht auftritt, bilden diese Lipide eine dunklere Fläche und umgekehrt. Die Oberfläche, die mit Lipiden von der Monoschicht der Luftblasen bedeckt ist, ist ungefähr vier Mal breiter als die Oberfläche der besonders hellen Punkte. Das ist in guter Übereinstimmung mit dem Fakt, dass die Projektionsfläche einer Kugel vier Mal kleiner als ihre Oberfläche ist. Einige Luftblasen sind für längere Zeit (> 10 Minuten) unter der Zielmonoschicht stabil.

Die Luftblasen können von Lipid-Bischichten unterschieden werden. Sie erscheinen als relativ große helle Punkte und steigen nach dem Tropfenaufprall auf die Zielflüssigkeitsoberfläche, wo sie spontan verschwinden, wie oben erklärt. Die Lipid-Bischichten erscheinen dagegen als helle Schleier, die mit der Tropfenflüssigkeit einsinken.

2.3.3.3 Bischichtbildung

Jetzt wird die Bildung und das Verhalten der Bischicht-Strukturen diskutiert. Während des Tropfenaufpralls können, abhängig von der Lipid-Zusammensetzung der Monoschichten, zwei Arten von Bischichtstrukturen gebildet werden: symmetrische und asymmetrische Bischichten.

Symmetrische Bischichtbildung

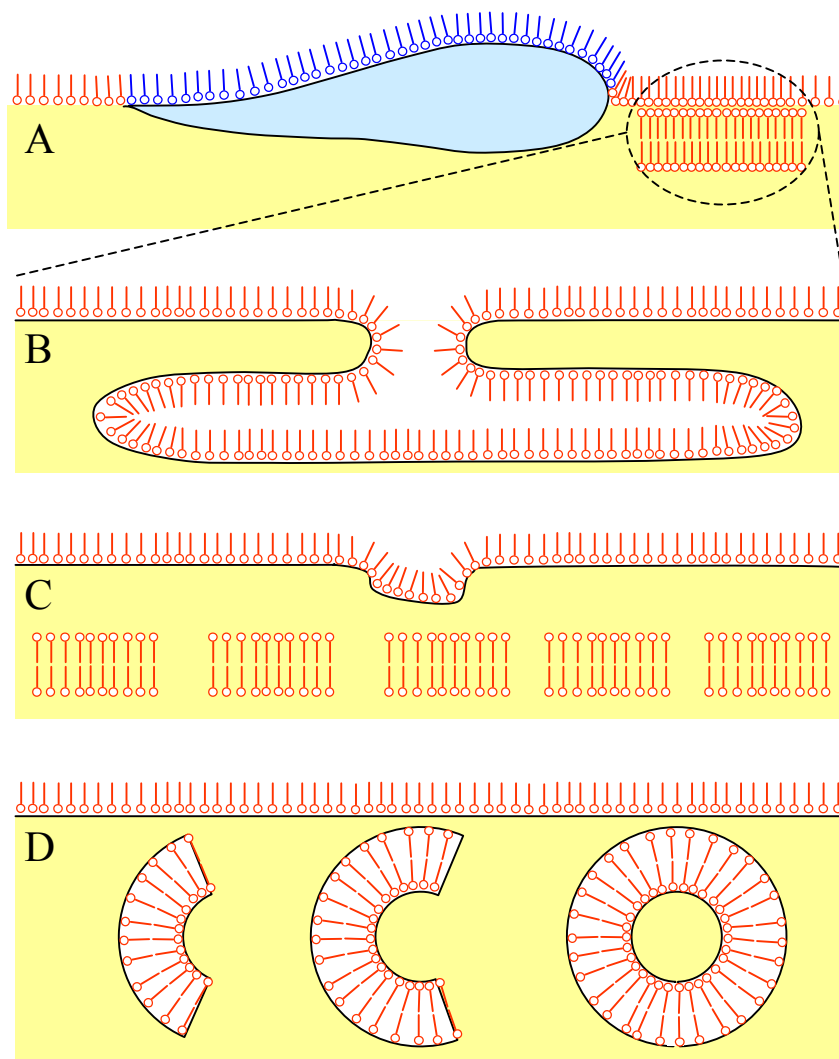


Abb. 2.35: Modell für die Bildung symmetrischer Bischicht-Strukturen durch Faltung der ungesättigten Zielmonoschicht. A, B: die Zielmonoschicht kollabiert und ist am Vorderteil des Tropfenaufprallmusters gefaltet; C: die Falten aus ungesättigten Phospholipiden sind instabil und zerbrechen in kleinere Bischichtfragmente [Gopal & Lee, 2001]; D: die Bischichtfragmente bilden spontan vesikelähnliche Strukturen.

Reine DOPC-Monoschichten sind flüssig [Nag & Keough, 1993, Shah & Schulman, 1967, Vrănceanu et al., 2008a] und haben niedrige Werte für Scherviskosität,

Oberflächendehnungsviskosität und -elastizität [Vrânceanu et al., 2008a], siehe Abb. 2.33. Die auffallend hellen Areale um die Tropfenankerform (Abb. 2.32 A) bestehen nur aus Lipiden der Zielmonoschicht. Aufgrund ihrer nicht ausreichenden Steifigkeit und wegen der Komprimierung durch den aufprallenden Tropfen kollabiert die Zielmonoschicht und wird gefaltet [Baoukina et al., 2008]. Während der Bewegung des aufprallenden Tropfens bildet die gefaltete Zielmonoschicht die Umhüllung des Tropfenmusters, was als besonders helles Areal in Abb. 2.32 A zu sehen ist. Die Faltung der Zielmonoschicht ist in Abb. 2.35 A und B schematisch dargestellt und kann als eine dreidimensionale Bischichtstruktur gesehen werden [Amrein et al., 1997, Gopal & Lee, 2001, Piknova et al., 2002]. [Gopal & Lee, 2001] konnten zeigen, dass Monoschichten in einer flüssig-expandierten Phase, wie DOPC-Monoschichten, keine stabilen, großen Falten bilden können, sondern spontan in liposomale Strukturen [Gopal & Lee, 2001, Lipp et al., 1998] zerfallen. [Baoukina et al., 2008] zeigten, dass bei einer kollabierten ungesättigten Lipid-Monoschicht die Bildung von Vesikeln aus Falten, die in Kontakt mit der Monoschicht sind, stattfindet. Abb. 2.35 C und D zeigen die Umwandlung einer planaren Bischicht in ein stabileres Vesikel.

Diese neu gebildeten Vesikel sind symmetrisch, da sie nur aus Lipiden der Zielflüssigkeit bestehen. Sie bleiben auf der Zielflüssigkeitsoberfläche unterhalb der Zielmonoschicht, weil sie thermodynamisch stabil sind.

Ein Bestätigung dieses Modells ist die Tatsache, dass man durch Steigerung des Filmdrucks hellere Monoschichten als die besonders hellen Areale von Abb. 2.32 A nicht erhalten kann. Das bedeutet, dass diese auffallend hellen Areale dreidimensionale und keine zweidimensionalen Strukturen sind.

Asymmetrische Bischichtbildung

Auf den Aufnahmen in seitlicher Perspektive in Abb. 2.27 bis Abb. 2.32 kann man erkennen, dass fluoreszenzmarkierte Lipide sowohl der Ziel- als auch der Tropfenmonoschicht von der Tropfenflüssigkeit in die Tiefe mitgerissen werden. Wie unten ausführlich besprochen wird, nimmt man an, dass die markierte Tropfenmonoschicht nun Teil der asymmetrischen Bischichtstrukturen ist, die aus Lipiden der Tropfen- und der Zielmonoschicht gebildet sind. Ein Modell zu deren Entstehung ist in Abb. 2.36 dargestellt.

Abb. 2.36 A zeigt den aufprallenden Tropfen, der sich auf der Zielflüssigkeit aufrollt und die beiden Monoschichten in Kontakt bringt. Asymmetrische planare Bischichten werden unterhalb der Tropfenflüssigkeit an ihrer Grenzfläche mit der Zielflüssigkeit gebildet. Aufgrund der Dynamik der Tropfenflüssigkeit zerbrechen die neu gebildeten planaren Bischichten in Fragmente. Diese planaren Bischichtfragmente haben hydrophobe und damit thermodynamisch instabile Ränder. Um die Grenzflächenenergie des Umfangs zu reduzieren, wandeln sich die Bischicht-Fragmente in stabilere Strukturen, das heißt in Liposomen, um, wie [Baoukina et al., 2008] annehmen. Eine planare kreisförmige Bischicht mit Radius R wird sich in Vesikel umwandeln wenn: $R > 4K_b/\lambda_p$, wobei K_b das Bischicht-Biegemodul und λ_p die Linienspannung am Umfang der planaren Bischicht [Baoukina et al., 2008] ist. Das bedeutet, dass die Umwandlung der planaren Bischicht in Vesikel oder andere geschlossene Strukturen

(z. B. Bilschicht-Röhre) [Baoukina et al., 2008] energetisch umso günstiger ist, je größer ihre Fläche, je größer ihre Linienspannung und je kleiner ihr Biegemodul ist. Das wurde auch von [Ridsdale et al., 2001] bestimmt, die zeigen konnten, dass sich große planare DPPC-Bilschicht-Strukturen, wie Falten, in stabilere Vesikel-Strukturen umwandeln.

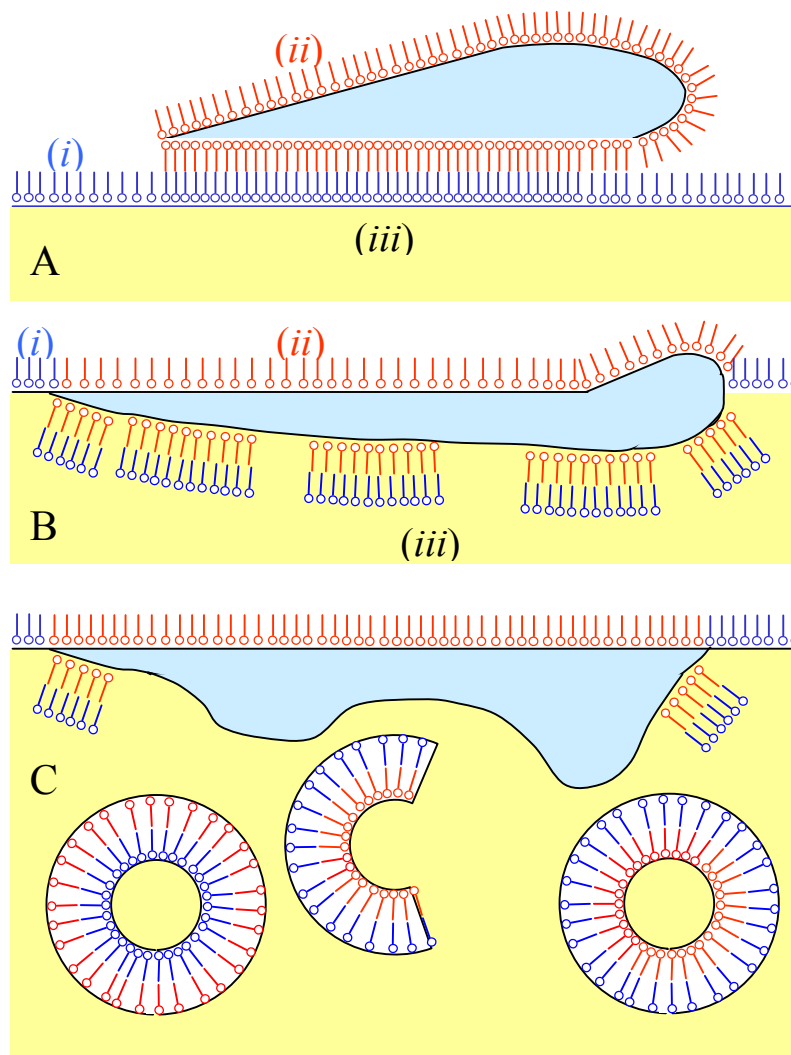


Abb. 2.36: Modell für die Bildung asymmetrischer Bilschicht-Strukturen unterhalb der Tropfenflüssigkeit; (i) Zielmonoschicht, (ii) fluoreszenzmarkierte Tropfenmonoschicht, (iii) asymmetrische Planarbilschicht; A: asymmetrische Bilschichtbildung; B: Die Grenzfläche zwischen Tropfen- und Zielflüssigkeit krümmt sich, wenn die Tropfenflüssigkeit einsinkt, und die planare Bilschicht zerfällt in kleine Fragmente; C: Die planaren Bilschichtfragmente können Vesikel bilden, die mit der Tropfenflüssigkeit einsinken.

Entsprechend den Betrachtungen von [Baoukina et al., 2008] soll jetzt die Tendenz jeder benutzten Lipidmischung zur Bildung von stabilen, kreisförmigen, planaren Bilschicht-Strukturen und/oder Vesikeln diskutiert werden.

Ungesättigte DOPC-Lipide bilden vorzugsweise Vesikel, da sie sich durch eine hohe Linienspannung am planaren Bilschichttrand und einen kleinen Biegemodul auszeichnen. Der Biegemodul ist klein aufgrund der negativen spontanen Krümmung (die Fläche der polaren

Kopfgruppen ist kleiner als die der ungesättigten hydrophoben Ketten) [Baoukina et al., 2008].

Durch Umwandlung in Vesikel sinkt die Energie des Faltenrands; der Vorgang wird zudem begünstigt durch einen hohen Anteil an ungesättigten Lipiden in der Bilschicht oder durch hohe Temperaturen [Baoukina et al., 2008].

Gesättigte DPPC-Lipide haben eine positive spontane Krümmung (die Fläche der polaren Kopfgruppen ist größer als die der gesättigten hydrophoben Ketten), was die Energie der planaren Bilschichten reduziert und diese stabilisiert. Der Biegemodul dieser Bilschichten ist normalerweise groß. In diesem Fall sind die kleinen kreisförmigen Bilschichtfragmente stabil, wohingegen sich die großen spontan in stabilere Strukturen wie Vesikel umwandeln [Baoukina et al., 2008, Ridsdale et al., 2001].

Ungesättigtes DOPC und gesättigtes DPPC mit Cholesterol gemischt bilden nur Vesikel. Bei Anwesenheit von Cholesterol sinkt der Biegemodul der gesättigten Bilschichten, was diese weniger steif macht. Diese Vesikelstrukturen sind vornehmlich unilamellar, weil der hohe Cholesterolgehalt die Multischichtbildung hemmt, wie [Malcharek et al., 2005] gezeigt haben.

Es wird angenommen, dass man die Größe der Vesikel durch Änderung der Lipid-Zusammensetzung der Monoschichten beliebig einstellen kann. Mit Erhöhung des Anteils gesättigter Lipide sollten die Vesikel größer sein, während eine Erhöhung des Anteils ungesättigter Lipide zu kleineren Vesikeln führen sollte.

2.3.4 Zusammenfassung

Die Bildung von Bilschichtstrukturen ist durch Annäherung zweier Phospholipid-Monoschichten untersucht worden. Die Monoschichten wurden auf die Oberflächen zweier Flüssigkeiten aufgetragen, die durch schrägen Tropfenaufprall auf eine Flüssigkeitsoberfläche in Kontakt gebracht wurden. In dieser Arbeit wurde gefunden, dass asymmetrische Bilschichten sich an der flüssig-flüssigen Kontaktfläche zwischen Tropfen- und Zielflüssigkeit durch Annäherung von deren Monoschichten bilden. Ungesättigte Phospholipid-Monoschichten ohne Cholesterol bilden zusätzlich symmetrische Bilschichten durch Faltung der Zielmonoschicht. Monoschichten aus ungesättigten Phospholipiden, die Cholesterol enthalten, werden von aufprallenden Tropfen nicht gefaltet und bilden nur asymmetrische Bilschichten. Die Lipidkomposition beeinflusst die rheologischen Eigenschaften und Phasenübergänge der Monoschichten, welche die Tropfenaufprallmuster und die Symmetrie oder Asymmetrie der Bilschichtbildung determinieren. Es wurden zwei Mechanismen für asymmetrische und symmetrische Bilschichtbildung vorgeschlagen. Schräger Tropfenaufprall auf Phospholipid-Monoschichten liefert auch Informationen über die Festigkeit und Stabilität dieser Monoschichten. Für DPPC/Cholesterol-Monoschichten wurde durch Tropfenaufprall-Experimente gefunden, dass der bisher noch nicht determinierte Zustand dieser Monoschichten als ein flüssiger identifiziert werden konnte.

2.4 Neuartige Erzeugung von Liposomen durch geschichtete dünne Filme

2.4.1 Technologisches Konzept

In Abb. 2.37 ist das technologische Konzept schematisch dargestellt. Im ersten Schritt, siehe Abb. 2.37 A, werden zwei monomolekulare Lipidschichten, (c) und (d), auf die Oberflächen einer PCTE-Membran mit exakter Porengröße (b) bzw. auf eine Filtermembran mit hoher Porosität (f) aufgebracht. Unter den Monoschichten sind dünne Flüssigkeitsfilme ((a) = Medium mit Substanzen für Kapsel-Außenseite; (e) = Wirkstoffmedium). Durch die Annäherung bilden die beiden Monoschichten eine Bilschicht aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Fettsäureketten. In Abb. 2.37 B ist gezeigt, wie durch einen Überdruck (h) im Puffermedium (g), das hinter dem Wirkstofffilm geschichtet ist, die Bilschicht deformiert wird. Abb. 2.37 C illustriert das Bersten und Zusammenschnüren der Bilschicht zu einer kugelförmigen Kapsel unter Minimierung der Grenzflächenenergie. Der Überdruck im Puffermedium spült die Liposomen (i) durch die PCTE-Membran.

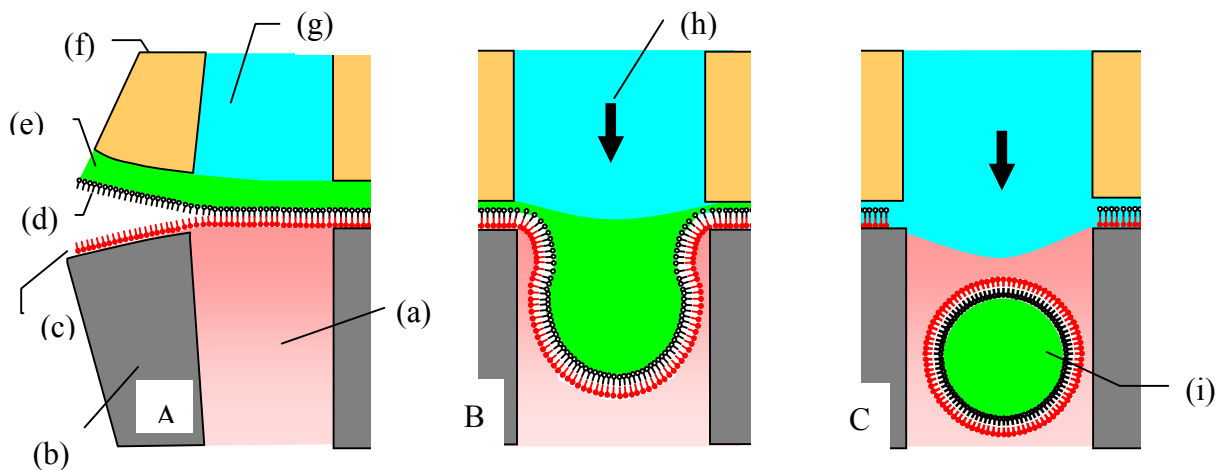


Abb. 2.37: Schema der Erzeugung von Liposomen mit frei einstellbarer Komposition der inneren und äußeren Seite der Bilschicht. A, B und C stellen drei aufeinanderfolgende Prozessschritte dar. (a) Lösung für Kapselaußenraum; (b) PCTE-Membran mit durchgängigen Poren; (c) Monoschicht; bildet die äußere Seite der Kapselbilschicht; (d) Monoschicht, bildet die innere Seite der Kapselbilschicht; (e) Wirkstofflösung für Kapselinnenraum; (f) kompressible Membran; (g) Pufferlösung; (h) Überdruck; (i) neugebildetes Liposom durch Abschnürung der aus den Monoschichten (c) und (d) synthetisierten Bilschicht.

Abb. 2.38 zeigt eine schematische Übersicht der technischen Realisierung.

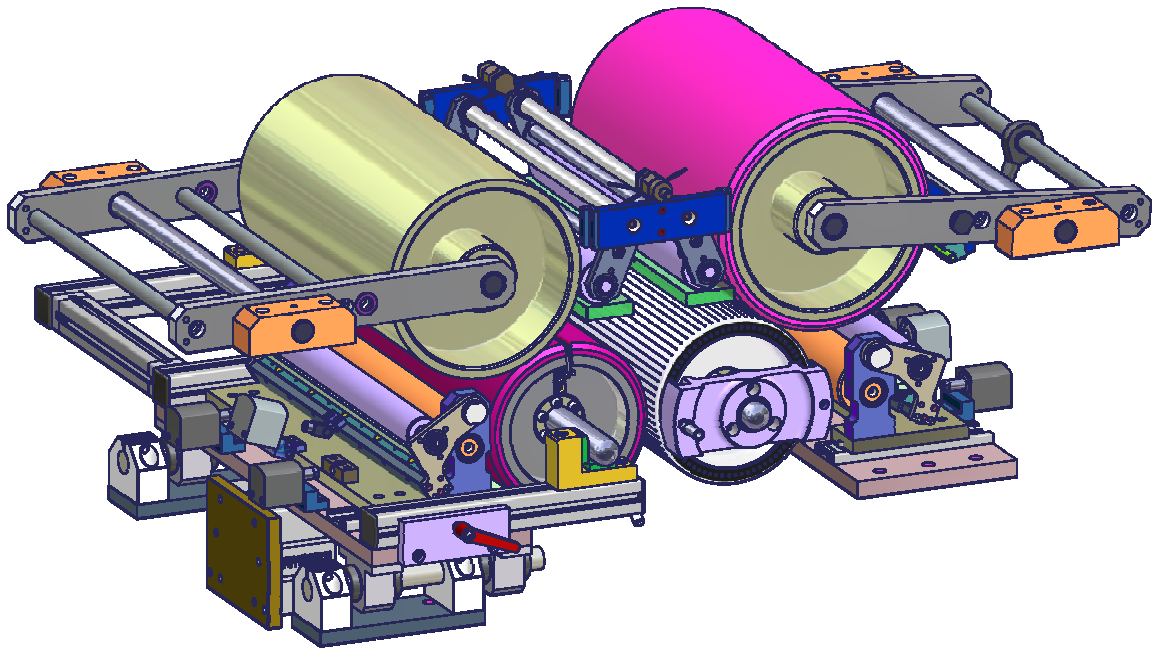


Abb. 2.38: Technische Realisierung des in Abb. 2.37 dargestellten Verfahrens. Schematische Skizze des Gesamtaufbaus

2.4.2 Ziele

Durch diese wissenschaftliche Arbeit wurden vier konkrete wissenschaftliche Ziele angestrebt:

1. Charakterisierung der Bildung Nanometer-dünner Fluidfilme und homogener Monoschichten auf festen Oberflächen in einem kontinuierlichen Prozess.
2. Übertragung von Fluid- und Monoschichten durch Kontakt auf andere Oberflächen, Bildung von Bilschichten und Extrusion von Liposomen durch nanoskalige Poren.
3. Generierung von Liposomen mit frei einstellbarem Aufbau der Bilschicht und definierter Größe.
4. Optimierung der Einkapselungseffizienz von Wirkstoffen in Liposomen.

2.4.3 Schichtdicken-Inhomogenitäten

Bei der beabsichtigten Beschichtung von Walzen mit Fluidfilmen um $1\ \mu\text{m}$ traten sehr hohe Schichtdicken-Inhomogenitäten auf. Daher wurde ein Messsystem etabliert, um die Schichtdicke lokal exakt zu bestimmen. Abb. 2.39 (a) zeigt den Messaufbau an der Anlage zur kontinuierlichen Extrusion von Liposomen, die durch dünne Fluidfilme generiert werden. Abb. 2.39 (d) zeigt den Fluoreszenz-Sensor, mit dem die Signal-Intensität des Fluid-Films mit gelöstem Fluoreszenz-Farbstoff lokal aufgenommen und mit einem kalibrierten Signal zur Bestimmung der Schichtdicke verglichen wurde. In Abb. 2.39 (e) sind die lokalen Schichtdicken eines Fluid-Films über eine Umdrehung in einem 360° -Kreisdiagramm

dargestellt. Bei einem Anpressdruck p der Walzen A und B (siehe Abb. 2.39 (c)) von 2,5 bar beträgt die mittlere Schichtdicke $1,94 \pm 0,12 \mu\text{m}$ (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung); bei $p = 5,0$ bar dagegen nur $0,60 \pm 0,086 \mu\text{m}$. Wird zusätzlich noch eine Rakel an Walze B angepresst, so lassen sich Schichtdicken von ca. $0,07 \pm 0,08 \mu\text{m}$ bilden. Die hohe Standardabweichung bei Verwendung einer Rakel zeigt, dass die mittlere Filmdicke zu dünn ist für eine verlässliche Dickenbestimmung. Zugleich wird aus diesen beispielhaften Ergebnissen ersichtlich, dass die etablierte Messmethode mittlere Schichtdicken von ca. 600 nm mit einem Variationskoeffizienten von 14 % ermittelt sowie Schichtdicken um 2 μm mit einem Variationskoeffizienten von nur 6 %.

Mit Hilfe des etablierten Messverfahrens konnten verschiedene Beschichtungsverfahren zur Erzeugung dünner, homogener Fluid-Filme erprobt und optimiert werden.

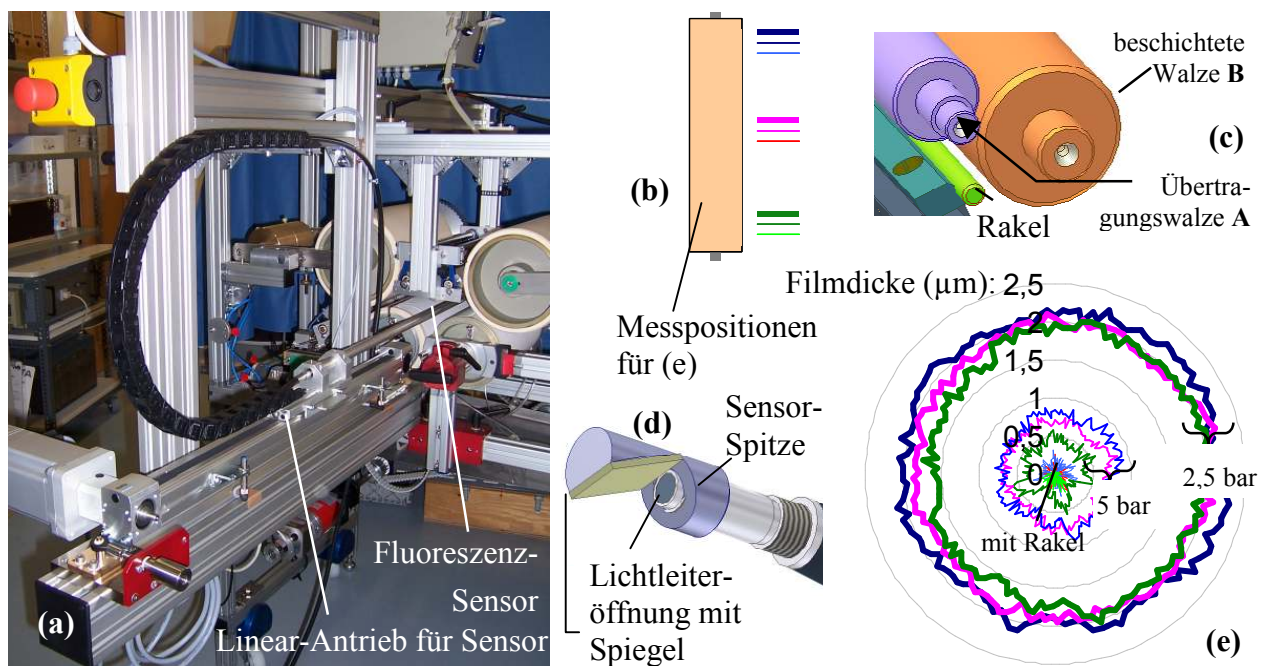


Abb. 2.39: Messaufbau zur Bestimmung der Schichtdicke auf Walzenoberflächen. (a) Fotografische Ansicht der Anlage zur kontinuierlichen Extrusion von Liposomen. Im Vordergrund Linear-Antrieb zur Verschiebung des Fluoreszenz-Sensors über die axiale Länge der zu beschichtenden Walzen. (b) Messpositionen für die in (e) dargestellten Schichtdicken. (c) Prinzip der Übertragung des Fluid-Films: aus einer Wanne (nicht eingezeichnet), in die die Übertragungswalze A eintaucht, wird ein Film auf die zu beschichtende Walze B übertragen. Der Anpressdruck zwischen A und B ist einstellbar, optional kann eine Rakel zur Reduktion der Schichtdicke eingesetzt werden. (d) Detaildarstellung der Sensor-Spitze (schematisch). (e) Messergebnis der lokalen Schichtdicke an drei Messpositionen (rot, grün, blau: siehe (b)) über eine Walzenumdrehung (360°) bei drei unterschiedlichen Einstellungen (siehe (c)): 1. Anpressdruck zwischen A und B: $p = 2, 5$ bar ohne Verwendung der Rakel; 2. $p = 5$ bar ohne Rakel; 3. $p = 5$ bar mit Rakel. Es ist zu beachten, dass die radiale Skala nur die Schichtdicke des Fluid-Films von 0 bis 2,5 μm abbildet und nicht in Relation zum Umfang der beschichteten Walze zu setzen ist.

2.4.4 Konventionelle Herstellung der Liposomen mit der Lipidfilm-Methode.

Diese Methode wurde zum ersten Mal von [Bangham et al., 1965] beschrieben und ist in Abb. 2.40 schematisch dargestellt. Stammlösungen wurden durch Lösen der Lipide und Fluoreszenzproben in Ethanol hergestellt und die berechneten Mengen wurden in einem Rundkolben gemischt. Der Rundkolben enthielt Argon, um eine Oxidation der Lipide zu vermeiden. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer bei $T \sim 45 \text{ }^\circ\text{C}$ entfernt. Wenn im Rundkolben keine Lösungsmitteltropfen mehr vorhanden waren, wurde der Unterdruck für mindestens 30 Minuten bei etwa 50 mbar eingestellt, um eine vollständige Lösungsmittelentfernung sicherzustellen.

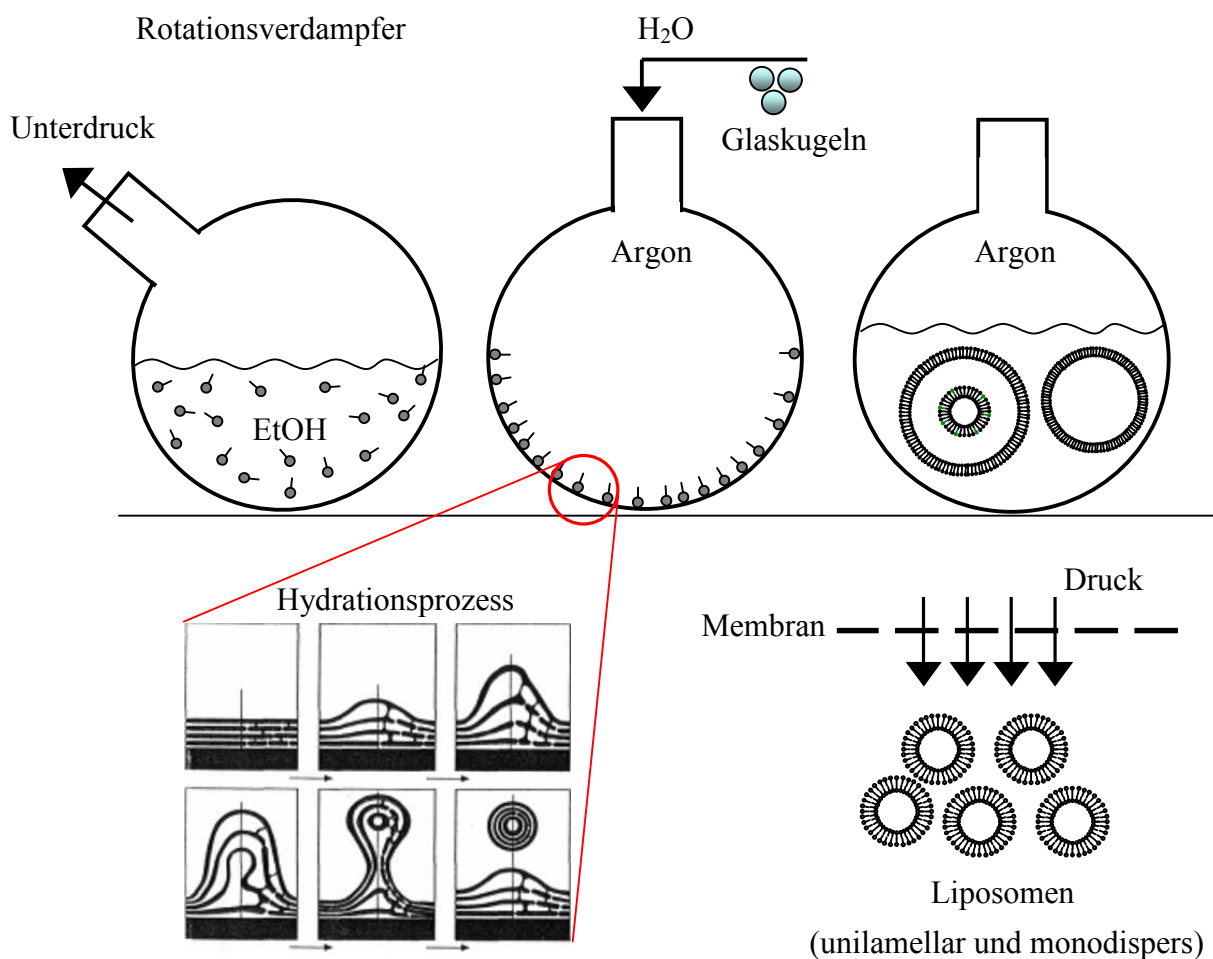


Abb. 2.40 Schematische Darstellung der Liposomen-Herstellung durch konventionelle Lipidfilm-Methode. Erklärung siehe Text. Hydrationsprozess aus [Nothelle und Hamann, 1996].

Der Rundkolben mit dem trockenen Lipidfilm wurde daraufhin wieder mit Argon gefüllt und bidestilliertes Wasser wurde bis zu einer Lipidkonzentration von 20 mM zugegeben. Dieses Wasser enthielt 0,5 mg/ml NaN_3 , um die Liposomen mikrobiologisch für längere Zeit stabil zu halten. Vier bis sechs Glaskugeln wurden zugefügt und der Rundkolben wurde bis auf ungefähr $45 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Wasserbad erwärmt. Schließlich wurde die

Lipidsuspension für einige Minuten mit einem Schüttler gemischt und dann wieder erwärmt. Dieser Hydrationsprozess dauerte etwa 30 Minuten.

Um unilamellare Liposomen zu bekommen, wurden die entstehenden multilamellaren Liposomen durch zwei 200 nm-Polycarbonat-Membranen (Whatman, Maidstone, UK) extrudiert. Die Liposomen-Suspension wurde bei 40 – 50 °C mittels eines Handextruders (Avestin, Ottawa, Canada) einundzwanzig Mal durch die Membranen extrudiert.

2.4.5 Fluoreszenzmethoden zum Nachweis einer Bischicht-Asymmetrie

In der Literatur sind zwei verschiedene Fluoreszenz-Methoden zum Nachweis einer Asymmetrie der aufgebauten Bischichten beschrieben [John et al., 2002, Pautot et al., 2003, Roy et al., 1997, Udenfriend et al., 1972], die beide erprobt wurden. Die entsprechenden Assays arbeiten auf Basis von Fluorescamin bzw. NBD-PE mit Na-Dithionit.

Die beiden genannten Assays wurden zuerst daraufhin geprüft, ob sie symmetrisch hergestellte Bischichten auch als solche detektieren können, um fehlerhaft positive Asymmetrie-Nachweise auszuschließen. Da in umfangreichen Versuchsreihen mit dem Fluorescamin-Assay keine reproduzierbaren Versuchsergebnisse erzielbar waren, wurde der Einsatz dieser Methode abgebrochen. Mit dem NBD-PE/Dithionit-Assay konnten gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Um die Asymmetrie der symmetrisch hergestellten Liposomen zu bestimmen, wurden Liposomen, mit verschiedenen Prozenten eines fluoresziermarkierten Lipids (NBD-PE) hergestellt.

Die Fluoreszenzintensität der Liposomen-Suspension ist als 100 %- Wert angenommen, wie in Abb. 2.41 schematisch dargestellt. Natrium-Dithionit Lösung wird dazugegeben, welche die Fluoreszenz der NBD-PE auslöscht, siehe auch Punkt A in Abb. 2.42. Weil Natrium-Dithionit durch die Liposomen-Membran nur sehr langsam diffundiert, wird nur die Fluoreszenz der NBD-PE von der Außenseite der Liposomen spontan ausgelöscht. Wenn die Fluoreszenzintensität einen konstanten Wert erreicht, Punkt B in Abb. 2.42, wird ein Detergenz (Triton X-100, 1/20 verdünnt) eingesetzt, um die liposomale Struktur zu zerstören und Mizellen zu erzeugen. Jetzt sind alle NBD-PE Moleküle dem Natrium-Dithionit zugänglich und die Fluoreszenzintensität sinkt auf den Nullwert. Die NBD-PE Asymmetrie (innen/außen) wird auf der Basis des Verhältnisses zwischen der Fluoreszenzintensität vor und nach Dithionit-Zugabe berechnet.

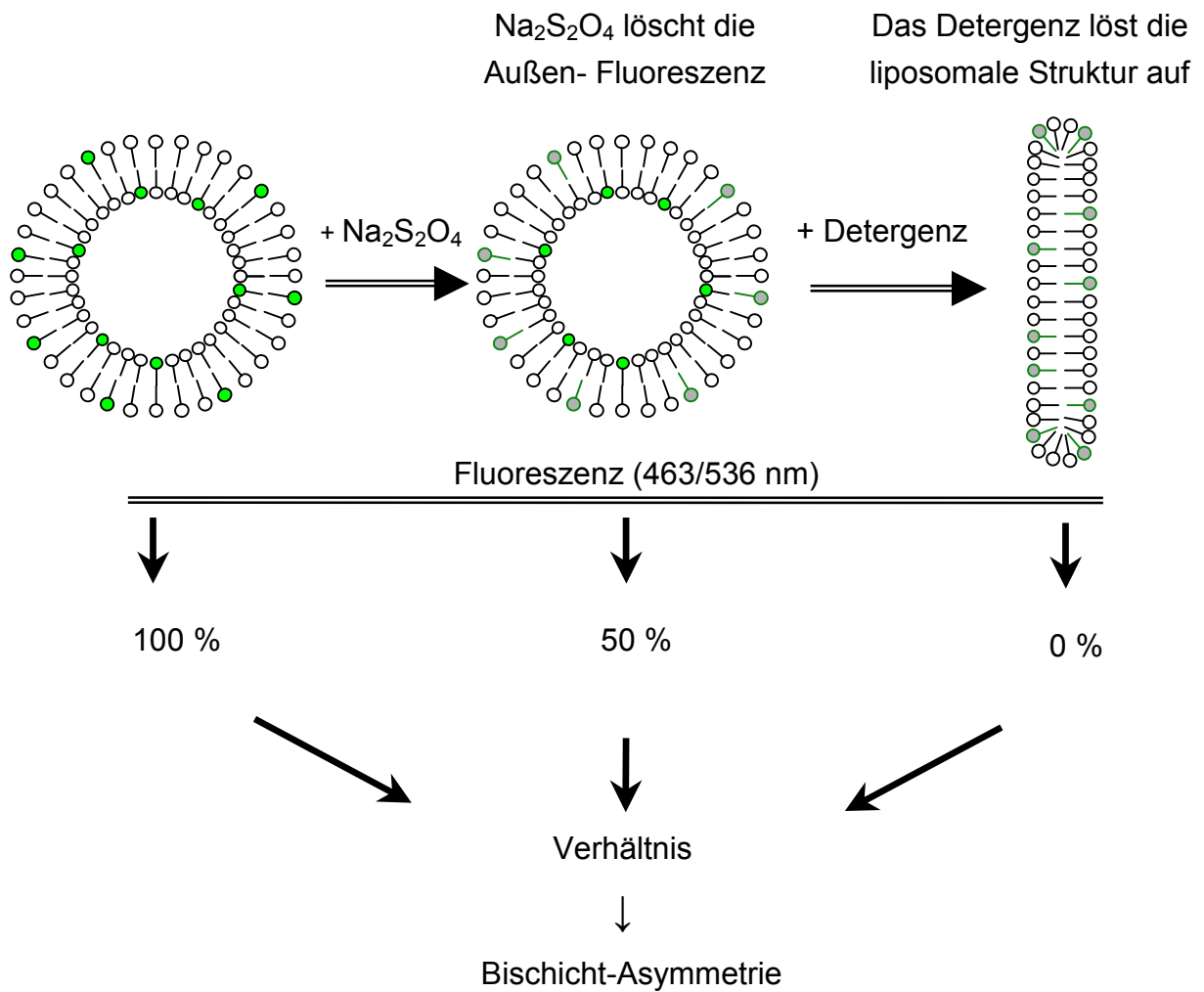


Abb. 2.41 Schematische Darstellung des Verlaufs des NBD-PE/Dithionit-Assay. Erklärung siehe Text.

Typische Verläufe des Natrium-Dithionit-Assay für POPC Liposomen mit verschiedenen Verhältnissen an Fluoreszenzmarkern (NBD-PE) sind in Abb. 2.42 dargestellt.

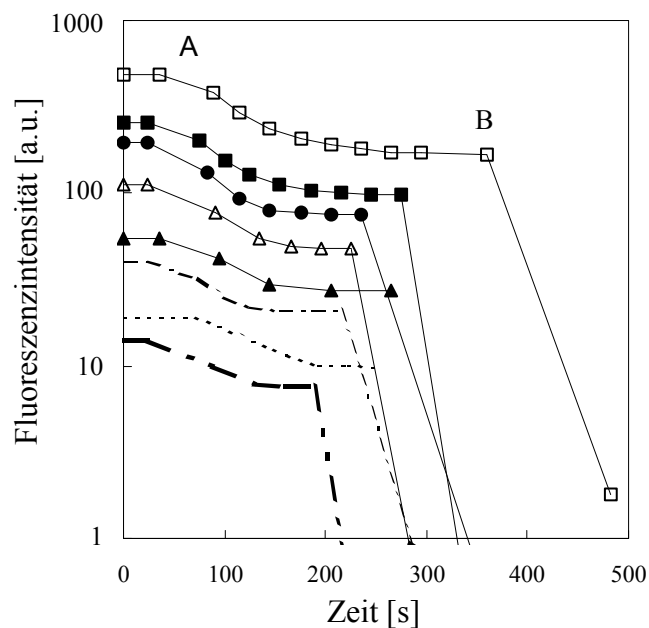


Abb. 2.42: Dithionit-Assay für Liposomen aus POPC mit verschiedenen Anteile NBD-PE, die durch 80 nm Polykarbonat-Membranen extrudiert wurden. Die NBD-PE Anteile sind: (\square) 1,5 Mol%; (\blacksquare) 0,75 Mol%; (\bullet) 0,5 Mol%; (\triangle) 0,3 Mol%; (\blacktriangle) 0,15 Mol%; (---) 0,0685 Mol%; (-----) 0,05 Mol%; (- - -) 0,03 Mol%.

Nachdem konstante Werte der Fluoreszenzintensitäten erreicht wurden (Punkt A), wurde Dithionit dazugegeben, was eine Senkung der relativen Fluoreszenzintensität bewirkt. Sobald diese wieder einen konstanten Wert erreicht hat, wurde Triton-X hinzugefügt, welcher die liposomale Strukturen zerstört (Punkt B) und die Fluoreszenzintensität vollständig absenkt.

Es stellte sich jedoch heraus, dass Liposomen mit symmetrisch hergestellten Bischichten eine asymmetrische Verteilung des Fluoreszenz-Indikators, abhängig von dessen Konzentration, aufwiesen, wie in Abb. 2.43 dargestellt.

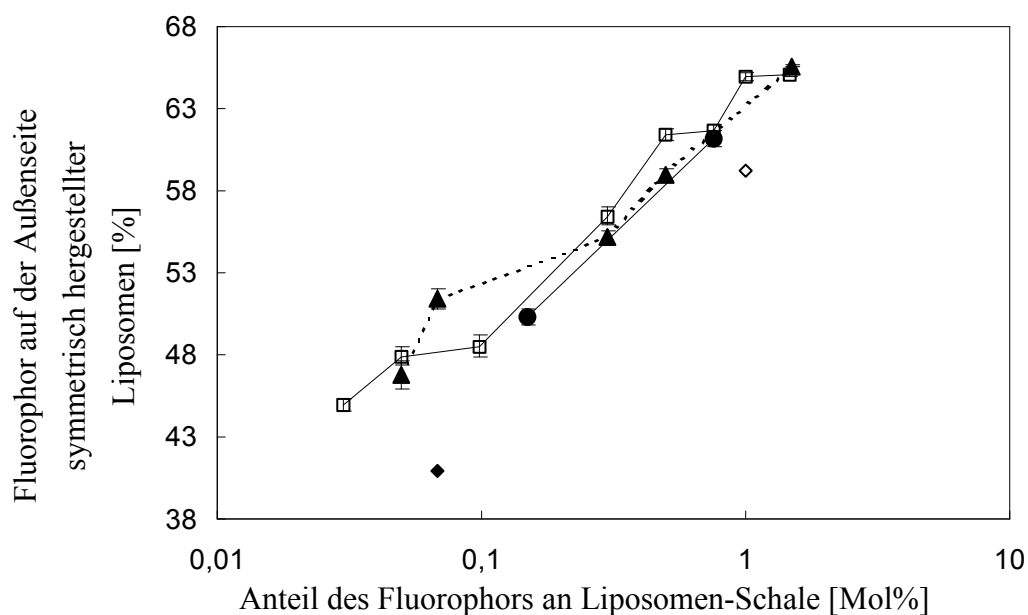


Abb. 2.43: Fluoreszenz-Methode auf Basis des Fluorophors NBD-PE, das symmetrisch der inneren und äußeren Monoschicht der Liposomen zugefügt wurde. Es wurden folgende Lipid-Kompositionen und Liposomen-Größen erprobt: (▲) SPC/Chol, 50 nm; (□) POPC, 50 nm; (●) SPC/Chol, 80 nm; (◆) SPC/Chol, 200 nm; (◇) POPC, 200 nm.

Durch Auslöschung der Fluoreszenz der äußeren Monoschicht mit Natrium-Dithionit kann die Verteilung des Fluorophors auf der Innen- und Außenseite bestimmt werden. Aufgrund der starken Abhängigkeit von der Fluorophor-Konzentration zwischen 45 und 65 % (Erwartungswert: 50 % auf der Außenseite) konnten keine gesicherten Ergebnisse zur Bilschicht-Asymmetrie von Liposomen gemessen werden, die mit dem in Abb. 2.37 dargestellten Verfahren generiert wurden.

Liposomen, die mit dem in Abb. 2.37 dargestellten Verfahren unter asymmetrischen Bedingungen hergestellt wurden, zeigten in dem NBD-PE/Dithionit-Assay – unter Einbeziehung der Ergebnisse von Abb. 2.43 – eine partielle Asymmetrie.

Aufgrund der starken Konzentrationsabhängigkeit wurden die gewonnenen Ergebnisse zur Bilschicht-Asymmetrie jedoch selbst angezweifelt, da sie durch Aufkonzentrierungs- oder Verdünnungseffekte auch lediglich Artefakte darstellen könnten. Für weitergehende Untersuchungen zur Bilschicht-Asymmetrie ist daher ein robustes Messsystem zu finden oder zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Fragestellung keine größere Priorität eingeräumt werden, da die anderen Fragestellungen innerhalb des Zeitlimits eine höhere Aussicht auf Erfolg zeigten.

2.4.6 Größenverteilungen der Liposomen

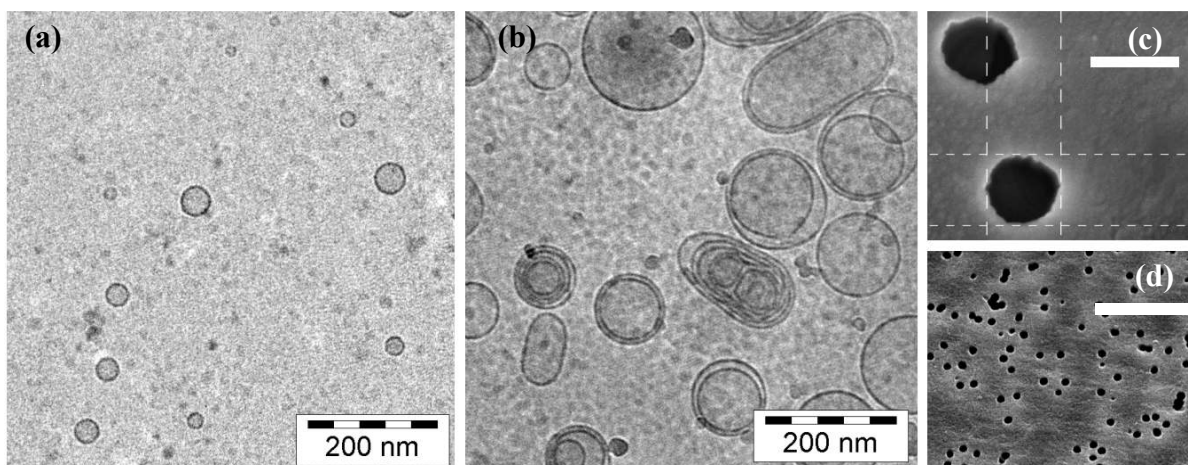


Abb. 2.44: Kryo-Transektronenmikroskopische Darstellung von Liposomen. (a) Herstellung der Liposomen gemäß dem in Abb. 2.37 dargestellten Verfahren, dabei einmalige Extrusion durch PCTE-Membranen, siehe Abb. 2.44 (c) und (d). (b) Konventionelle Herstellung von Liposomen aus einem getrockneten Lipidfilm, nach Entstehung multilamellarer Liposomen 21-fache Extrusion durch PCTE-Membranen. (c) und (d) Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Polycarbonat-Track-etch (PCTE)-Membranen; Maßstab in (c): 200 nm; Maßstab in (d): 2 μ m.

Abb. 2.44 zeigt einen Vergleich von Liposomen, die entweder mit dem neu entwickelten Verfahren (Abb. 2.44 (a)) oder mit einem konventionellen Verfahren [Bangham et al., 1965] (Abb. 2.44 (b)) hergestellt wurden. Die in Abb. 2.44 (a) gezeigten Liposomen sind nach nur einmaliger Extrusion durch eine PCTE-Membran (Porendurchmesser 200 nm, siehe Abb. 2.44 (c) und (d)) fast vollständig unilamellar. Die konventionell hergestellten dagegen zeigen selbst nach 21-facher Extrusion durch eine PCTE-Membran (Porendurchmesser 80 nm) einen hohen Anteil an bi- oder multilamellaren Liposomen. Mit Photonen-Korrelationsspektroskopie (PCS), Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK) lässt sich eine Aussage über die Größenverteilung der Liposomen gewinnen, die mit dem neu entwickelten Verfahren hergestellt wurden. Die Messergebnisse zeigen eine bimodale Verteilung sowohl bei einer Intensitäts- als auch bei Volumen- oder Anzahl-Gewichtung, siehe Tabelle 2.3:

Tabelle 2.3: Exemplarische Größenverteilung von neuartig hergestellten Liposomen (Verfahren entsprechend Abb. 2.37), bestimmt mit Photonen-Korrelationsspektroskopie (PCS). Für Messparameter siehe Anhang.

Gewichtung	Verteilungsmaximum	Anteil	Mittlere Größe
Anzahl-	Nr. 1	99 %	41 nm
Anzahl-	Nr. 2	1 %	132 nm
Volumen-	Nr. 1	74 %	45 nm
Volumen-	Nr. 2	26 %	169 nm
Intensität-	Nr. 1	6 %	49 nm
Intensität-	Nr. 2	94 %	193

Beeindruckend ist der hohe Anteil sehr kleiner Liposomen (40-50 nm) nach nur einmaliger Extrusion durch Poren mit ca. 200 nm Durchmesser. Dieses Phänomen wird anhand von Abb. 2.45 und Abb. 2.46 so interpretiert, dass die neugebildete Bilschicht während des Extrudierens in Bruchstücke zerfällt, die die Größe des Porenquerschnitts besitzen. Bei Umformung in einer Kugel mit gleicher Fläche ist der Kugeldurchmesser nur halb so groß wie der des Kreisdurchmessers, wie in Abb. 2.46 schematisch dargestellt.

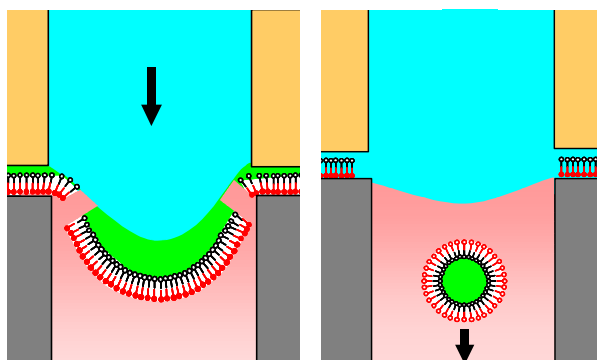


Abb. 2.45: Neuartiges Herstellungsverfahren für Liposomen, Ergänzung zu Abb. 2.37 B und C zur Interpretation der Bildung von Liposomen, die kleiner als der Porendurchmesser sind.

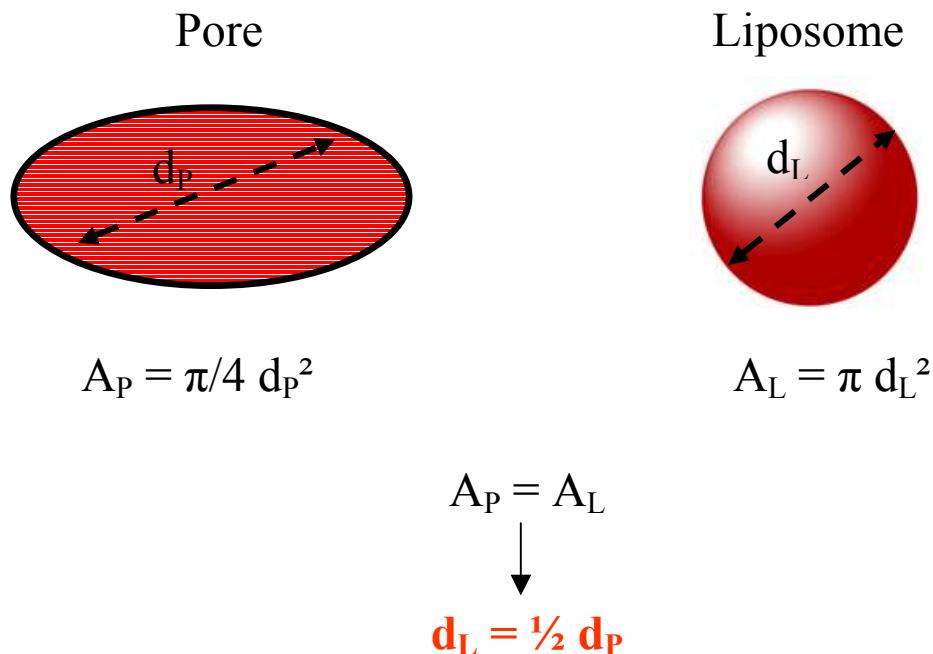


Abb. 2.46 Poren- und Liposomendurchmesser der gleichen Fläche.

Die zweite, größere Liposomenfraktion entsteht vermutlich aus den Bilschicht-Bruchstücken in der Umgebung der Poren. Um die Herstellung kleiner, monomodaler Liposomen mit dem neu entwickelten Verfahren zu optimieren, wären daher Extrusionsmembranen mit einer höheren Porosität als die in Abb. 2.44 (c) und (d) gezeigten erforderlich.

2.4.7 Einkapselungseffizienz

Um die Effizienz der Wirkstoff-Einkapselung in die Liposomen zu bestimmen, muss man die Liposomen von freigelöstem Wirkstoff trennen. Dafür bietet sich die Gel-Permeations-Chromatographie an. Die Trennsäulen enthalten Polymere mit Hohlräumen bzw. Poren bekannter Größe.

Ein schematisches Modell einer GPC-Trennung ist in Abb. 2.47 dargestellt. Eine Liposomen-Suspension wird auf einer GPC-Säule aufgetragen. Die kleinen freigelösten Wirkstoffmoleküle diffundieren tiefer in die Poren und legen damit einen längeren Weg durch engere Kapillaren zurück als die größeren Liposomen, die um die Säulenpartikel herumfließen. Die Liposomen fließen daher schneller durch die Säule und werden zuerst detektiert. Zu einem späteren Zeitpunkt fließen die frei gelösten Wirkstoffe durch die Säule.

Um eine Analytik durch Fluoreszenz-Photometrie zu ermöglichen, wurde mit wasser- und lipidlöslichen Fluorophoren gearbeitet: Calcein (wasserlöslich) und Lissamine™ rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-Phosphoethanolamine, triethylammonium-Salz (LRH-PE, integriert in die Liposomen-Bilschicht).

Die neu hergestellte Liposomen-Suspension mit eingekapseltem und freiem Calcein wird auf eine Gel-Permeation-Chromatographie-Säule gegeben und fraktioniert. Die Fraktionen werden mit einem Fluorimeter gemessen. Lichtstreuung (Anregung bei 400 nm und Detektor bei 400 nm) und fluoreszierende Lipide zeigen die Fraktionen, in denen die Liposomen sind. Die Fluoreszenzintensität des Calceins, des wasserlöslichen Fluorophors, hilft, die Einkapselung von wasserlöslichen Substanzen in Liposomen zu bestimmen.

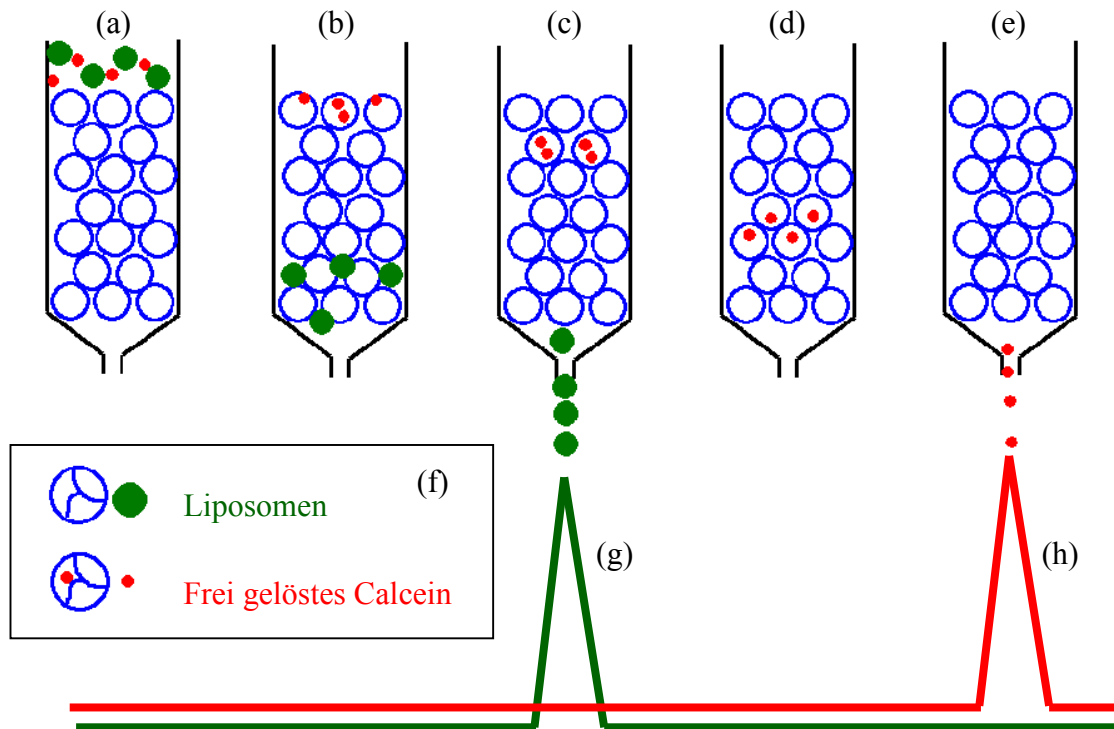


Abb. 2.47: Modell für Trennung der Liposomen (grüne Kreise) von frei gelöstem Calcein (kleine rote Kreise) auf einer Gel-Permeation-Chromatographie-Säule: (a) bis (e) zeigen den Fluss der Liposomen und frei gelösten Calceins durch die Säule, (f) ist eine schematische Darstellung des Flusses der Liposomen um die Säulenpartikel, wobei die kleinen frei gelösten Calceinmoleküle tiefer in die Poren der Säulenpartikel diffundieren. Fluoreszenzintensitäten der fluoreszenzmarkierten Lipide und des frei gelösten Calceins sind mit (g) und (h) schematisch dargestellt.

Niedermolekulare Stoffe (Calcein) diffundieren in die poröse Struktur des Gels und werden daher verzögert eluiert. Durch die parallele Detektion der mit dem Fluorophor markierten Liposomen kann die eingekapselte, fluoreszierende Calceinmenge W_i eindeutig von dem frei gelösten Calcein im Außenraum der Liposomen W_a separiert werden. Hieraus wird die Einkapselungseffizienz $EE = W_i/(W_i+W_a)*100$ [%] bestimmt. Abb. 2.48 zeigt exemplarisch die Trennung einer Liposomen-Suspension, die mit dem neu entwickelten Verfahren (Abb. 2.37) hergestellt wurde, und für die eine EE von 35 % bestimmt wurde.

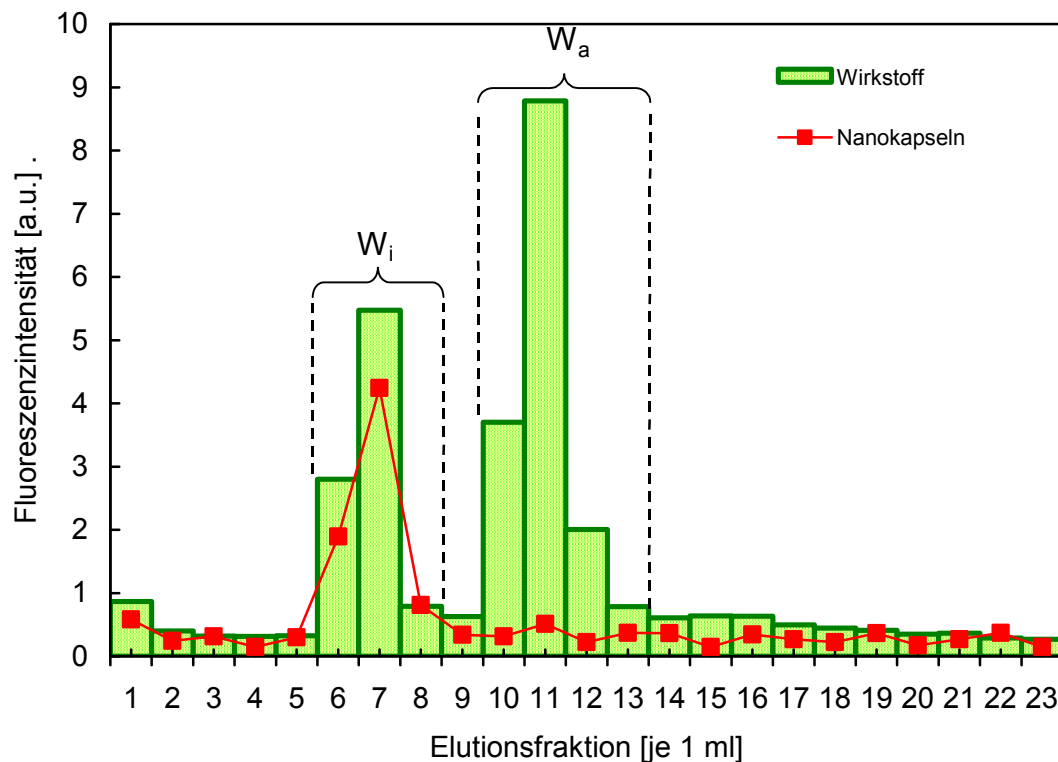


Abb. 2.48: Trennung von Liposomen-Suspensionen durch Gel-Permeations-Chromatographie. Die Liposomen wurden mit einem Fluorophor markiert, sie durchlaufen die Gel-Matrix in den Volumenfraktionen 6 – 8, der in ihnen eingekapselte fluoreszierende Wirkstoff (Calcein) ergibt das massenproportionale Fluoreszenzsignal W_i . In den Volumenfraktionen 10 – 13 wird der nicht eingekapselte Wirkstoff mit dem Gesamtsignal W_a eluiert. Hieraus wird die Einkapselungseffizienz $EE = W_i/(W_i+W_a)*100$ [%] bestimmt. Die hier dargestellte Liposomen-Suspension, die mit dem neu entwickelten Verfahren hergestellt wurde, zeigt eine EE von 35 %.

Trennungen mit Calcein-Beaufschlagung weisen nach, dass das zweite Calcein-Maximum aus freigelöstem Calcein besteht und dass das erste Maximum kein freigelöstes Calcein enthält.

Bei identischen Wirkstoff- und Lipidkonzentrationen und gleicher Extrusionsmembran (200 nm) zeigten mit konventionellem Verfahren (Film- und Extrusionsmethode nach [New, 1990]) hergestellte Liposomen-Suspensionen eine EE von 3,7 %.

Bei geringeren Wirkstoff-Beladungen konnten auch EE bis über 90 % mit dem neu entwickelten Verfahren erzielt werden, allerdings können hierbei Oberflächen-Adsorptionseffekte nicht ausgeschlossen werden.

In den bisher durchgeführten Messreihen zeigte sich eine starke Beeinflussbarkeit der Merkmale von Liposomen durch die Extrusionsbedingungen und die gewählte Lipid-Mischung in Abstimmung mit dem Wirkstoff (niedermolekulare Fluorophore). Daher wurden diese Herstellungsbedingungen detailliert untersucht, was in den folgenden Abschnitten zusammengefasst ist.

2.4.8 Extrusionsbedingungen

Zum Einfluss der Lipid-Mischungen wurde in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe festgestellt, dass mit zunehmendem Anteil gesättigter Fettsäuren die Bruchfestigkeit der Liposomen proportional zunimmt [Manojlovic et al., 2008]. Für eine Mischung mit konstantem $x_C = 30$ Mol% ändert sich der Mindestdruck für die Extrusion durch 80-nm-Poren von 5,5 bar bei nur 10 Mol% gesättigten Fettsäuren (DPPC) auf 6,0 bar bei 30 Mol% DPPC und 6,6 bar bei 50 Mol% DPPC.

Diese Ergebnisse sind sowohl für die Generierung als auch für die Applikation von Liposomen relevant: medizinische Forschungsergebnisse zeigen, dass Liposomen mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren eine längere Verweilzeit im Blut und damit ein besseres „Targeting“ zeigen.

Ebenfalls relevant für Herstellung und Anwendung ist die Frage einer Polymer-Beschichtung von Liposomen. Es wurden vergleichende Untersuchungen zur Extrusion von Liposomen mit und ohne Polymerschichten (bei gleicher Lipidmischung) durchgeführt [Popa, Vrânceanu et al., 2008]. Es konnte gezeigt werden, dass durch Polyethylenglykol mit zunehmender Polymerkonzentration die Bruchfestigkeit linear um bis zu 30 % abnimmt. Zugleich reduzieren hydrophile Polymerschichten auf der Liposomen-Oberfläche den Reibungswiderstand von Liposomen in Poren, die enger sind als der Liposomendurchmesser, um das Vierfache [Popa, Vrânceanu et al., 2008].

2.4.9 Zusammenfassung

Es wurde ein neues Verfahren zur Herstellung von Liposomen entwickelt, das dünne Lipid- und Wirkstoff-Filme auf Walzenoberflächen in geordneter Weise zusammenführt. Dabei entstehen Lipid-Bischichten, die durch den Anpressdruck der Walzen durch definierte Poren einer Membran extrudiert und abgesaugt werden. Liposomen, die mit konventionellen Verfahren erzeugt werden, zeigen selbst nach 21- bis 51-facher Extrusion durch definierte Poren immer noch einen gewissen Anteil multilamellarer Kapseln und sind im Mittel etwa 20 % größer als der Porendurchmesser. Die mit dem neu entwickelten Verfahren generierten Liposomen sind dagegen nach nur einmaliger Extrusion nahezu ausschließlich unilamellar. Die mit den bislang eingesetzten Extrusionsmembranen generierten Liposomen zeigen eine bimodale Verteilung: ca. 75 Vol-% der Liposomen haben im Mittel eine Größe von etwa $\frac{1}{2}$ des Porendurchmessers, die übrigen sind im Mittel gleich groß wie der Porendurchmesser.

Für die Bestimmung der Einkapselungseffizienz (EE) wurde ein hydrophiler Fluoreszenzmarker (Calcein) verwendet. Nach der Herstellung der Liposomen werden diese mittels Gel-Permeations-Chromatographie von ihrer wässrigen Umgebung und dem nicht eingekapselten Wirkstoff (Calcein) getrennt und anschließend mit Fluorimetrie quantifiziert. Für Liposomen-Suspensionen, die mit dem neu entwickelten Verfahren hergestellt wurden, konnten bei hohen Calcein-Konzentrationen eine EE bis 35 % bestimmt werden. Bei identischen Wirkstoff- und Lipidkonzentrationen und gleicher Extrusionsmembran (200 nm)

zeigten mit konventionellem Verfahren (Filmmethode nach [Bangham et al., 1965]) mit anschließender Extrusion hergestellte Liposomen-Suspensionen eine EE von 3,7 %. Bei geringeren Wirkstoff-Beladungen konnten auch EE bis über 90 % mit dem neu entwickelten Verfahren erzielt werden, hierbei sind wahrscheinlich auch Oberflächen-Adsorptionseffekte beteiligt. In der Literatur sind bisher keine für beliebige Wirkstoffe einsetzbaren Einkapselungsverfahren mit Kapselgrößen < 200 nm mit vergleichbarer EE ohne Adsorptionseffekte oder wirkstoffspezifische Beladungstechniken beschrieben.

Für die Charakterisierung von Liposomen wurden eine Reihe von Methoden neu entwickelt bzw. weiterentwickelt. Auf Basis standardisierter Extrusionsbedingungen konnte die Bruchfestigkeit der Kapselschalen für unterschiedliche Lipid-Mischungen bestimmt werden, die von den relativen Anteilen von Cholesterol sowie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren abhängt. Auch Polymer-Beschichtungen beeinflussen die Bruchfestigkeit, außerdem verändern sie die Hydrophilie der Kapselschale, was sich in einer etwa vierfach reduzierten Wandreibung der Nanokapseln bei der Bewegung durch Nanoporen äußert, deren Querschnitt enger ist als der einer undeformierten Nanokapsel.

2.5 Bischichten Phasenübergänge mittels FRET

Das Phasenverhalten in Lipidbischichten ist mit verschiedenen Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie [Garcia-Saez et al., 2007, Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a, Veatch & Keller, 2005a], Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) [Clarke et al., 2009, Davis et al., 2009, McConnell & Radhakrishnan, 2006, Orädd et al., 2005, Veatch et al., 2006, Veatch et al., 2007], Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) [Brown et al., 2007, Buboltz et al., 2007, de Almeida et al., 2005, Halling & Slotte, 2004, Heberle et al., 2005, Loura et al., 2001, Loura et al., 2009, Pedersen et al., 1996, Silvius, 2003, Stillwell et al., 2000], X-ray Diffraktion [Chen et al., 2007], Zeitauflösender Fluoreszenz [de Almeida et al., 2007], Dynamischer Differenzkalorimetrie [Halling & Slotte, 2004] und Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy) (AFM) [Garcia-Saez et al., 2007] untersucht worden. Es gibt auch theoretischen Studien [McConnell, 2005], numerische Simulationen [Pandit et al., 2004] und Review-Artikel, in welchen die Ergebnisse, die mit verschiedenen Methoden ermittelt wurden, diskutiert werden [Almeida et al., 2005, Almeida, 2009, de Almeida et al., 2009, Goñi et al., 2008, Kiessling et al., 2009, Loura et al., 2009, Veatch & Keller, 2005a].

Um die Phasenübergänge der Lipidbischichten zu untersuchen, wurde FRET gewählt, weil diese Methode einfach ist und man sehr kleine Domänen (~ 10 nm) detektieren kann [Loura et al., 2001].

FRET ist ein Fluoreszenzphänomen, das als Messmethode eingesetzt werden kann. Hierfür werden zwei Fluorophore benötigt, wobei die Emissionswellenlänge des ersten Fluorophors der Anregungswellenlänge des zweiten entsprechen muss, sodass die Energie des angeregten Donor-Fluorophors ohne Emission eines Photons auf den zweiten Fluoreszenzfarbstoff, also das Akzeptor-Fluorophor übertragen werden kann. Das ist in Abb. 2.49 schematisch dargestellt.

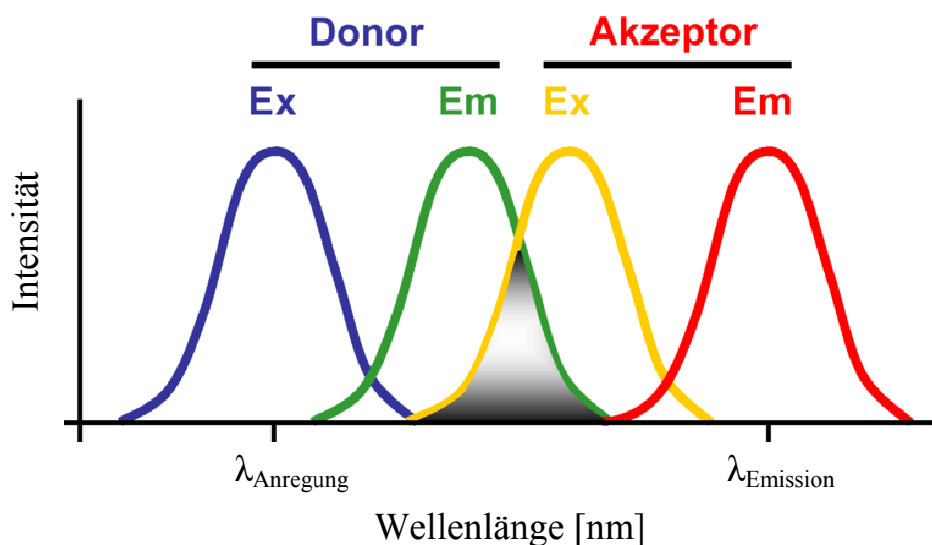


Abb. 2.49 Voraussetzungen für einen Förster-Resonanzenergietransfer. Überlappung der Spektren von Donoremission und Akzeptorabsorption.

Abb. 2.50 zeigt eine schematische Darstellung des FRET-Prinzips. Der Donor wird durch blaues Licht (mit einer Wellenlänge $\lambda = 463 \text{ nm}$) angeregt und emittiert grünes Licht ($\lambda = 536 \text{ nm}$). Der Akzeptor wird durch das blaue Licht (mit $\lambda = 463 \text{ nm}$) nicht angeregt. Wenn der Akzeptor in die Nähe des Donors kommt, wird er durch einen Resonanz-Effekt mit dem Donor bei dessen Emissionswellenlänge ($\lambda = 536 \text{ nm}$) zu einem Resonanz-Energietransfer angeregt und emittiert gelbes Licht ($\lambda = 593 \text{ nm}$). FRET reduziert die Emissionsintensität des Donors und erhöht entsprechend die Emissionsintensität des Akzeptors.

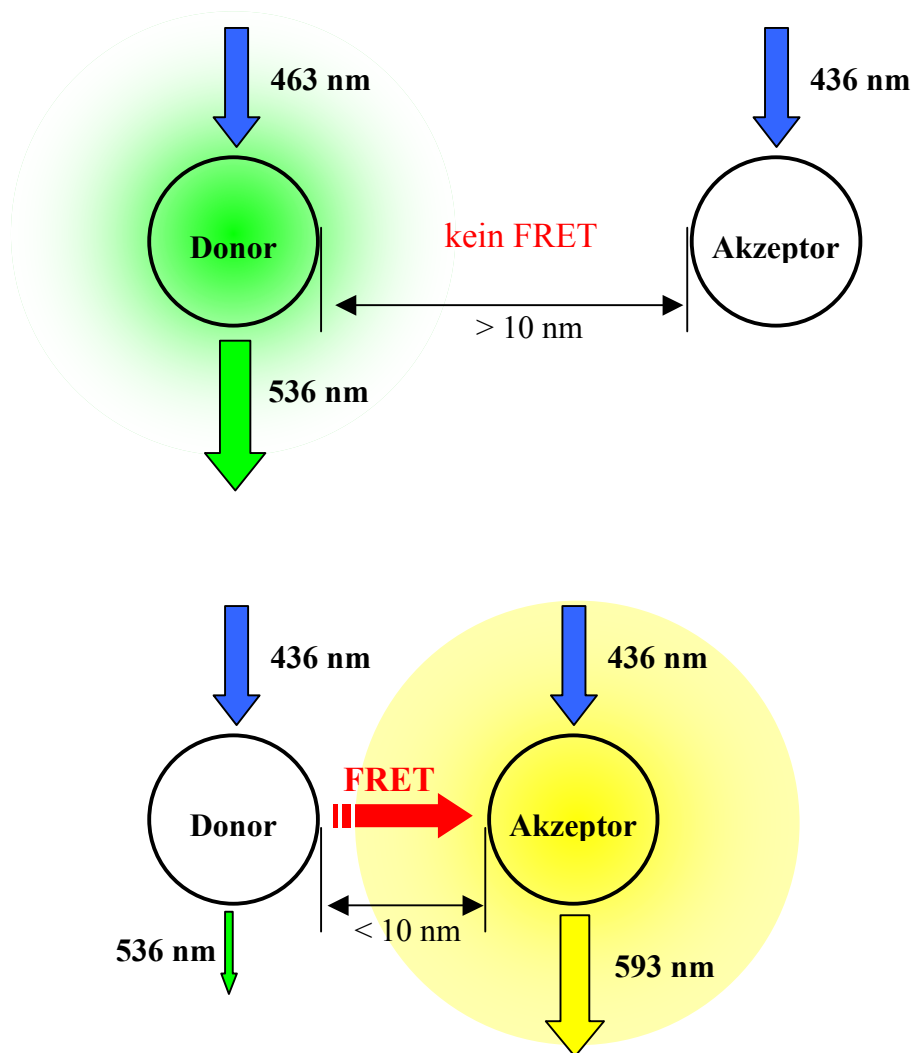


Abb. 2.50 Schematische Darstellung des FRET-Prinzips

Donor und Akzeptor sollten nur wenige Nanometer voneinander entfernt sein, da die Intensität des FRET-Signals ($E = \text{FRET-Effizienz}$) mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore abnimmt [Lakowicz, 2006]:

$$E (\%) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} 100$$

Hierbei steht R_0 für den Förster-Radius des Donor-Akzeptor-Paars. R_0 entspricht dem Abstand zwischen D und A, bei dem $E = 50\%$, siehe Abb. 2.51.

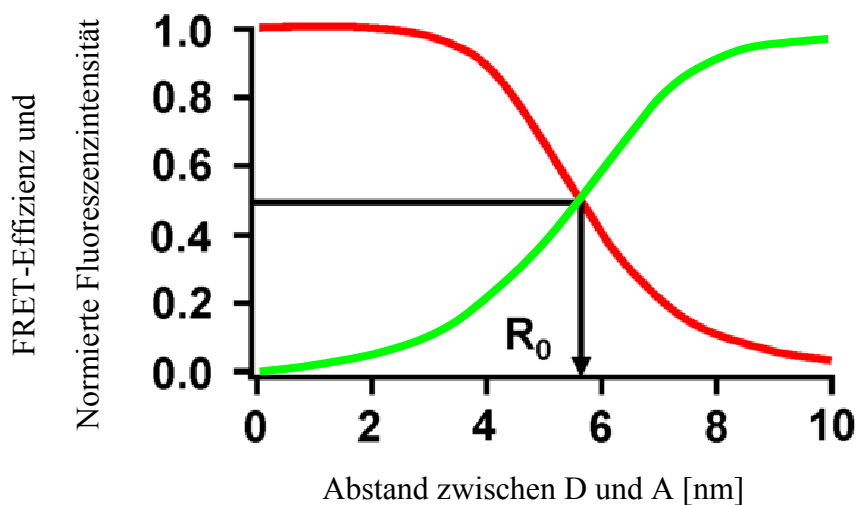


Abb. 2.51 Voraussetzungen für einen Förster-Resonanzenergietransfer. Abstand unter 10 nm. Die rote Linie zeigt die FRET-Effizienz und die grüne Linie die Donor-Fluoreszenzintensität.

Grundlagen zur Fluoreszenz und FRET können zum Beispiel aus [Lakowicz, 2006] entnommen werden.

Aufgrund der starken Abstandsabhängigkeit des Energietransfers, mit steigendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, sinkt die FRET-Effizienz und entsprechend steigt die Fluoreszenzintensität des Donors. Die Nutzung von FRET hat sich als „optisches Nanometermaß“ insbesondere in der Biochemie und der Zellbiologie etabliert.

Die Variation der Fluoreszenzintensität des Donors und des Akzeptors liefert Informationen über Lipid-Domänen-Bildung und Phasenkoexistenzregionen der Lipidmischungen [Pedersen et al., 1996]. Das einfachste Modell für Rafts ist eine Mischung eines Lipids mit hoher Übergangstemperatur (T_m) (normalerweise ein gesättigtes Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin) mit einem Lipid, das ein kleines T_m hat, und mit Cholesterol. In diesem Modell sind die Rafts die flüssig-geordnete (l_o) Domäne mit hohem T_m und angereichert mit Cholesterol, die von einer flüssig-ungeordneten (l_d) Phase mit kleinem T_m getrennt sind [de Almeida et al., 2009]. Da FRET weder eine Visualisierung noch einen direkten Nachweis der Phasentrennung liefert, um so die gewonnenen Ergebnisse interpretieren zu können, wurde eine Lipidmischung gewählt, die in der Literatur mit verschiedenen Methoden eingehend untersucht wurde. Deshalb wurde eine Dreikomponentenmischung aus Cholesterol, monounsättigtem Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) als Lipid mit niedrigem T_m und gesättigtem Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) als Lipid mit hohem T_m verwendet. Der Cholesterolgehalt (x_c) dieser Mischung liegt zwischen 10 und 45 Mol%, außerdem beträgt das Verhältnis der beiden Phospholipide DOPC:DPPC = 1:1. Die Phasenübergänge wurden durch eine kontinuierliche Variation der Temperatur zwischen 60 und 0 °C bestimmt. In einem Phasendiagramm wurden die mit FRET detektierten Phasenübergänge mit Ergebnissen, die mit Fluoreszenzmikroskopie und NMR ermittelt wurden, verglichen, wobei eine sehr gute Übereinstimmung zu finden war.

Eine FRET-Methode wurde verwendet [Buboltz et al., 2007], um die Phasentrennung von ungefähr 1300 verschiedenen DOPC/DPPC/Cholesterol-Mischungen bei drei Temperaturen (25, 35 und 45 °C) zu untersuchen. Die folgende Frage bleibt dabei jedoch noch unbeantwortet: Bei welchen Übergangstemperaturen erscheinen oder verschwinden die Phasentrennungen?

Das hier benutzte FRET-Paar ist: NBD-PE als Donor (D) und LRH-PE als Akzeptor (A), was oft in der Literatur für Untersuchungen der Bilschichten-Phasenübergänge zitiert wird [de Almeida et al., 2005, Leidy et al., 2001, Pedersen et al., 1996, Stillwell et al., 2000]. Beide Fluorophore sind Kopfgruppen markierte Phospholipide und verursachen deshalb nur eine minimale Störung der Bilschicht [de Almeida et al., 2007]. Der NBD-Marker liegt an der Grenzfläche der Membran zum Wasser, wohingegen sich der Rhodamin-Marker oberhalb der Lipid-Phosphate befindet und deshalb weiter entfernt von der Membran in der wässrigen Lösung ist [Stillwell et al., 2000].

In dem Temperaturbereich, wo nur eine Phase vorliegt, bleiben Donor und Akzeptor gut gemischt, was einem hohen FRET und deshalb einer niedrigen Fluoreszenzintensität für den Donor entspricht. Für Temperaturen, bei denen verschiedene Phasen koexistieren, trennen sich die Fluoreszenzmarker wegen deren unterschiedlich guter Löslichkeit in diesen Phasen voneinander, sodass die gesamte Entfernung zwischen Donor und Akzeptor steigt.

Es gibt zwei limitierende Randbedingungen für die verwendete Methode: die erste betrifft den Fall sehr großer Domänen bei denen Donor und Akzeptor, die dazu neigen, sich in unterschiedlichen Phasen zu mischen, zu weit voneinander entfernt und damit FRET zu schwach ist, was im so genannten infiniten Phasentrennungslimit im Verhältnis zum Förster-Radius R_0 zum Ausdruck kommt. Im zweiten limitierenden Fall lässt sich, wenn die Domänen sehr klein sind, keine Senkung der FRET-Effizienz feststellen – die Verteilung der Fluoreszenzmarker ist fast willkürlich, als ob es nur eine Phase und nicht zwei getrennten Phasen gäbe. Zwischen diesen zwei Extremfällen sind die biologisch bedeutsamen Domänen, die zwischen 10 und 100 nm groß sind [Goñi et al., 2008]. Für das gleiche D-A-Paar, wurde $R_0 \sim 56 \text{ \AA}$ in DOPC-Vesikeln [Silvius, 2003] gefunden, was diese Methode für Domänen in der Größenordnung von 10 nm empfindlich macht [Heberle et al., 2005, Leidy et al., 2001]. R_0 steigt leicht mit zunehmendem Cholesterolgehalt [Brown et al., 2007].

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Korrelation zwischen der komplexen temperaturabhängigen Variation der Fluoreszenzintensität und den Bilschichten-Phasentrennungen zu finden. Wenn sich eine solche Korrelation finden lässt, dann können verschiedene Lipidmischungen mit FRET untersucht werden, ohne dass die Notwendigkeit bestünde, die FRET Ergebnisse zusätzlich mit anderen Methoden zu vergleichen.

2.5.1 Materialien und Methoden

2.5.1.1 Proben-Komposition und -Herstellung

Liposomen wurden, wie oben geschildert, aus der Dreikomponentenmischung DOPC-DPPC-Cholesterol hergestellt; x_C lag dabei in Schritten von 5 Mol% zwischen 10 Mol% und 45 Mol%, die anderen Lipide waren unabhängig davon im Verhältnis zueinander 1:1 Mol/Mol. Die fluoreszenzmarkierten Lipide NBD-PE und LRH-PE, die als Donor und Akzeptor ein FRET-Paar darstellen, wurden jeweils mit einer Konzentration von 1 Mol% beigefügt. Die Herstellung der Liposomen ist oben in Kapitel 2.4.4 ausführlich beschrieben.

2.5.1.2 Fluoreszenz (oder Förster) Resonanz Energie Transfer (FRET)

Die Fluoreszenzintensität der Liposomenproben, die auf eine Konzentration von 1,0 mM Lipid verdünnt sind, wurde in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Die Messungen wurden mit einem „Varian Cary Eclipse“-Fluoreszenzspektrometer (Varian, Victoria, Australia), das vier thermostatisierte Messzellen besitzt, durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei mittels eines externen Wasserbades variiert. Um die Temperaturgradienten innerhalb der Probe zu minimieren, wurden semi-micro Plastibrand-Polymethylmethacrylat-Küvetten (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) benutzt, die nur 800 μ l Probe enthielten. Die Temperatur jeder Probe wurde mit einem Voltcraft K204 4-Kanal-Thermometer (Conrad, Hirschau, Deutschland), das mit dem Computer verbunden ist, bestimmt. Die Thermometersensoren wurden in der Liposomensuspension, in möglichst gleich großem Abstand zu allen Küvettenwänden, und oberhalb der Messposition des Fluorimeters eingefügt. Die Messküvetten wurden mit Deckeln abgedeckt und mit Parafilm abgedichtet, um Wasserverdunstung zu vermeiden. Vier Proben wurden gleichzeitig gemessen. Die Messkammer wurde mit Tesafilm abgedichtet und mit wasserdampffreiem Argon gefüllt, um eine Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenwänden bei niedrigen Temperaturen zu vermeiden.

Die Fluoreszenzintensität wurde mit 5 nm Bandbreite sowohl für Emission als auch für Anregung des Monochromators und mit 450 mV für den Strom des Photomultiplier-Detektors gemessen. Die Wellenlängen der Anregung und Emission wurden bei 463 nm und 536 nm für der Donor (NBD-PE) und bei 560 nm und 593 nm für der Akzeptor (LRH-PE) jeweils eingestellt. Um FRET zu messen, wurde eine dritte Messung mit den Wellenlängen 463 nm – der Anregungswellenlänge des Donors – und 593 nm – der Emissionswellenlänge des Akzeptors – durchgeführt.

Während der Messung wurde die Proben temperatur mit einer Geschwindigkeit von 0,01°C/s kontinuierlich erhöht oder abgesenkt. Die Fluoreszenzintensität wurde alle 30 Sekunden gemessen. Das gleiche Zeitintervall wurde für die Messung der Proben temperatur benutzt.

2.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Zur Vereinfachung werden die Abkürzungen von Tabelle 2.4 eingefügt:

Tabelle 2.4 Abkürzungen für Fluoreszenz-Messungen

Abkürzungen	Benutzte Fluorophore	Anregungswellenlänge von	Emissionswellenlänge von
F_D^D	Donor	Donor	Donor
F_A^A	Akzeptor	Akzeptor	Akzeptor
F_A^{FRET}	Akzeptor	Donor	Akzeptor
F_{D+A}^D	Donor + Akzeptor	Donor	Donor
F_{D+A}^A	Donor + Akzeptor	Akzeptor	Akzeptor
F_{D+A}^{FRET}	Donor + Akzeptor	Donor	Akzeptor

Um den Einfluss der Temperatur auf die Fluoreszenzintensität der Fluorophore zu untersuchen, wurden Liposomen mit nur einem Fluorophor, Donor *oder* Akzeptor, hergestellt und deren Fluoreszenzintensität gemessen (siehe Kapitel 2.5.2.1). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden Liposomen mit beiden Fluorophoren, Donor *und* Akzeptor, zwischen 0 °C und 60 °C gemessen. Bei Messungen unter Abkühlung und unter Erwärmung wurden fast identische Ergebnisse ermittelt, wobei bei niedrigen Temperaturen die Erwärmungskurven leicht tiefer als die Abkühlungskurven lagen. Der Temperaturbereich dieser Abweichung und ihre absoluten Werte steigen mit steigender Erwärmungsrate. Die Abkühlungskurven sind von den Kühlungsdaten nicht beeinflusst, wie auch [Halling & Slotte, 2004] beobachtet hat. Diese Kurven sind auch dann noch konstant, wenn die Temperatur für mehr als 30 Minuten konstant gehalten wurde. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden für jede Quantifizierung nur die Abkühlungskurven benutzt.

Die Proben wurden bei über 60 °C erwärmt. Daraufhin wurde die Fluoreszenzintensität während einer kontinuierlichen Abkühlung auf 0°C aufgenommen. Da die Messungen während der Abkühlung vorgenommen wurden und die Phasenübergänge sich leichter erklären lassen, wenn man mit der l_d Phase beginnt und mit der *Gel*-Phase schließt, werden die Ergebnisse Schritt für Schritt ausgehend von den hohen bis hin zu den niedrigen Temperaturen diskutiert und dargestellt.

Ergebnisse, die mit multilamellaren Liposomen (also mit nicht extrudierten Liposomen) ermittelt wurden, sind identisch mit Ergebnissen für Liposomen, die durch 200 nm-Polycarbonat-Membranen extrudiert wurden (nicht hier dargestellt), wie auch andere Autoren [de Almeida et al., 2005, de Almeida et al., 2007] zeigen. Deshalb wurden die FRET-Messungen nur mit nicht-extrudierten multilamellaren Liposomen durchgeführt.

2.5.2.1 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Temperatur

Für Liposomen, die nur ein Fluorophor, D oder A, enthalten, steigen sowohl F_D^D als auch F_A^A linear, wenn T absinkt. Um sicher zu stellen, dass diese Temperaturabhängigkeit von der Konformation des Fluorophors in der Bilschichtstruktur nicht beeinflusst wird, wurden Messungen der Fluoreszenzintensität beider Fluorophore in Ethanol und in Chloroform durchgeführt. Diese Lösungen haben die gleiche Fluorophor-Konzentration wie die Proben mit Liposomen.

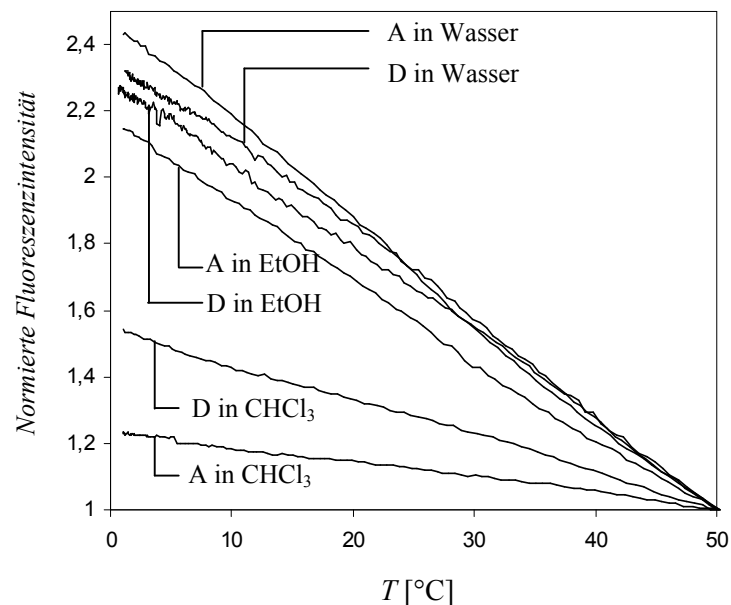


Abb. 2.52 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur für NBD-PE (D) und LRH-PE (A) in drei Medien. Wegen der niedrigen Siedetemperatur des Chloroforms wurden alle Kurven mit ihren jeweiligen Werten für $T = 50\text{ °C}$ normiert.

Wie in Abb. 2.52 dargestellt steigt die Fluoreszenzintensität bei fallendem T linear für alle Lösungsmittel. Die Steigungsraten der Fluoreszenzintensitätskurven für Ethanol und Wasser sind fast identisch, wohingegen sie für Chloroform viel kleiner sind.

Die Fluoreszenzintensität von Donor und Akzeptor steigt linear mit sinkendem T , wie in Abb. 2.52 dargestellt. Die Abschwächung der Emissionsfluoreszenz von NBD-PE und LRH-PE mit steigendem T wurde schon erörtert und ist in der Literatur [Leidy et al., 2001] bekannt. Der genaue Mechanismus wurde jedoch bisher noch nicht aufgeklärt.

Es soll geklärt werden, welche Faktoren die lineare Variation der Fluoreszenzintensität mit T beeinflussen, weil nach aktuellem Kenntnisstand viele Faktoren die Emission jedes Fluorophors beeinflussen können [Lakowicz, 2006]. Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors in einer Lipid-Bilschicht zeigt ein komplexes Verhalten [de Almeida et al., 2007, de Almeida et al., 2009].

Es ist bekannt, dass die Emissionsspektren vieler Fluorophore mit T variieren [Lakowicz, 2006]. Deshalb wurden die Emissionsspektren beider Fluorophore bei

verschiedenen Temperaturen gemessen. Form und Position der Spektren variieren mit T nicht; Ergebnisse dazu sind hier nicht dargestellt.

Normalerweise hängt die Fluoreszenzintensität in hohem Maße von der Lösungsmittelpolarität ab [Lakowicz, 2006]. Die Polarität des Wassers (ausgedrückt in der dielektrischen Konstante) sinkt mit steigendem T [Pawliszyn, 2002]. Um zu prüfen, ob sich diese Variation der Wasserpolarität mit T auf die Variation der Fluoreszenzintensität auswirkt, wurden die beiden Fluorophore in zwei weiteren Lösungsmitteln gelöst und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von T gemessen, siehe Abb. 2.52. Chloroform – ein nicht polares Lösungsmittel – und Ethanol – ein polares protisches Lösungsmittel wie Wasser – wurden ausgewählt. In Ethanol befinden sich die Fluorophore in einer molekularen Lösung und sind nicht in einer Lipidbischicht wie in Wasser fixiert. Der Polaritätsindex, das Dipolmoment und die dielektrische Konstante sind für diese beiden Lösungsmittel und für Wasser in Tabelle 2.5 dargestellt. Die absolute Fluoreszenzintensität von Donor und Akzeptor bei 50°C sind ebenfalls in Tabelle 2.5 eingefügt.

Tabelle 2.5. Fluoreszenzintensität und Eigenschaften des Lösungsmittels

Lösungs- mittel	F_D^D bei 50°C [a.u.]	F_A^A bei 50°C [a.u.]	F_A^A / F_D^D bei 50°C [a.u.]	Polaritäts- Index (Snyder) [2, 2010]	Dipolmoment [D] [2, 2010]	Dielektrische Konstante [2, 2010]	Polarität
Chloroform	99	355	3,58	4,1	1,15	4,8	unpolar
Ethanol	60	220	3,66	5,2	1,69	30,0	protisch polar
Wasser	50	140	2,80	9,0	1,85	80,0	protisch polar

Wie in Tabelle 2.5 dargestellt, sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten beider Fluorophore in Wasser und Ethanol kleiner als in Chloroform. Offensichtlich sinkt die Fluoreszenzintensität bei zunehmender der Lösungsmittelpolarität; wahrscheinlich bilden sich Wasserstoffbindungen zwischen Lösungsmittel und Fluorophoren aus. Da die Polarität von Wasser und Ethanol mit sinkendem T steigen [Hawthorne & Kubátová, 2002, Lu et al., 2002], wäre zu erwarten, dass die Fluoreszenzintensität der Fluorophore in diesen Lösungsmitteln bei Verringerung der Temperatur sinkt. Allerdings, wie in Abb. 2.52 dargestellt, steigt die Fluoreszenzintensität mit sinkendem T . Das bedeutet, dass die Polarität zwar die Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten zwischen Lösungsmitteln bewirkt, hingegen nicht der Grund für die Variation der Intensität mit T ist.

Es wird vermutet, dass nicht-radiative Prozesse [Lakowicz, 2006] hier eine Schlüsselrolle spielen. Diese können „collisional quenching“ und andere nicht-radiative Prozesse wie Vibrationen und Rotationen sein [Lakowicz, 2006].

In Abb. 2.52 kann man erkennen, dass die Steigungsraten der Fluoreszenzintensitätskurven vom Lösungsmittel abhängig sind. Für Liposomensuspensionen

in Wasser und für Ethanollösungen sind die Steigungsraten fast ähnlich, wohingegen sie für Chloroformlösungen viel kleiner sind. Offenbar ist die Temperaturabhängigkeit der nicht-radiativen Prozesse höher bei polaren als bei unpolaren Lösungsmitteln.

2.5.2.2 Ergebnisse

F_{D+A}^A , F_{D+A}^D und F_{D+A}^{FRET} für Liposomen bestehend aus Dreikomponentenmischungen von DOPC:DPPC = 1:1 mit 10 bis 45 Mol% Cholesterol sind in Abb. 2.53 bis Abb. 2.55 jeweils dargestellt.

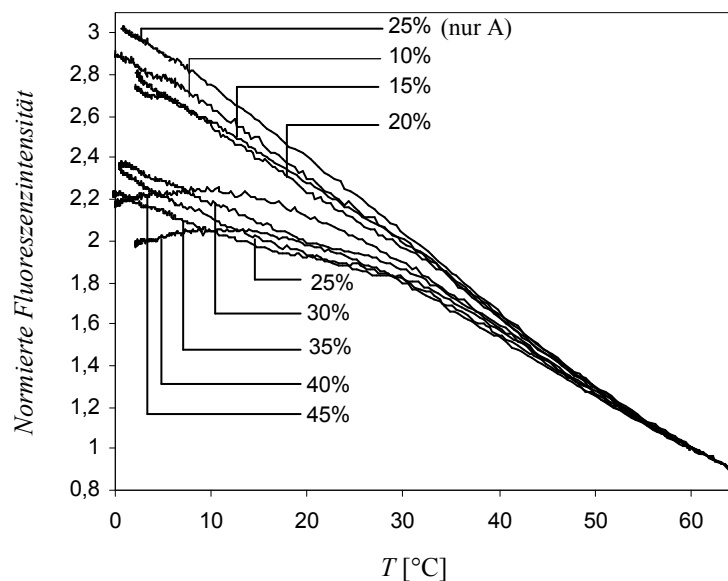


Abb. 2.53 F_{D+A}^A in Abhängigkeit von T für DOPC:DPPC = 1:1 mit $10 \leq x_C \leq 45$ Mol% und F_A^A für $x_C = 25$ Mol%. Alle Kurven sind auf deren jeweiligen Wert bei $T = 60$ °C normiert.

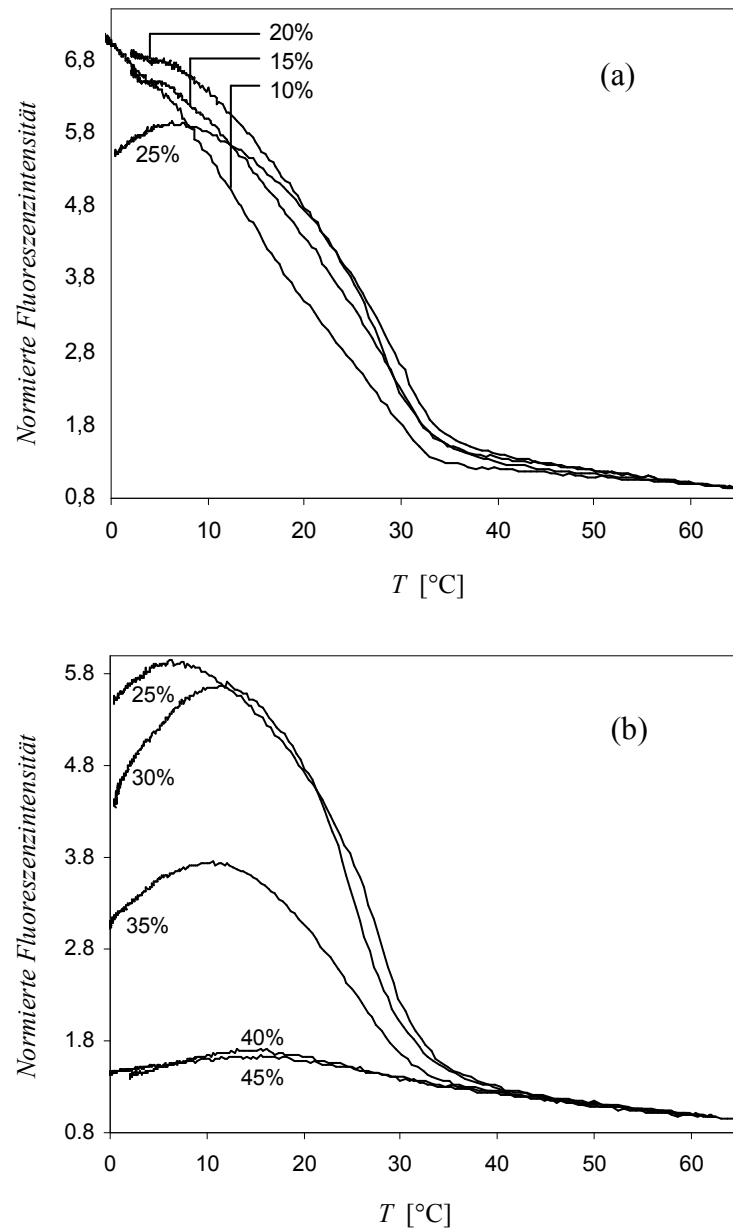


Abb. 2.54 F_{D+A}^D in Abhängigkeit von T für DOPC:DPPC = 1:1 mit: (a): $10 \leq x_C \leq 25$ Mol% und (b): $25 \leq x_C \leq 45$ Mol%. Die F_{D+A}^D -Kurve für $x_C = 25\%$ ist in beiden Diagrammen (a) und (b) als Vergleich dargestellt. Alle Kurven sind auf deren jeweiligen Wert bei $T = 60$ °C normiert.

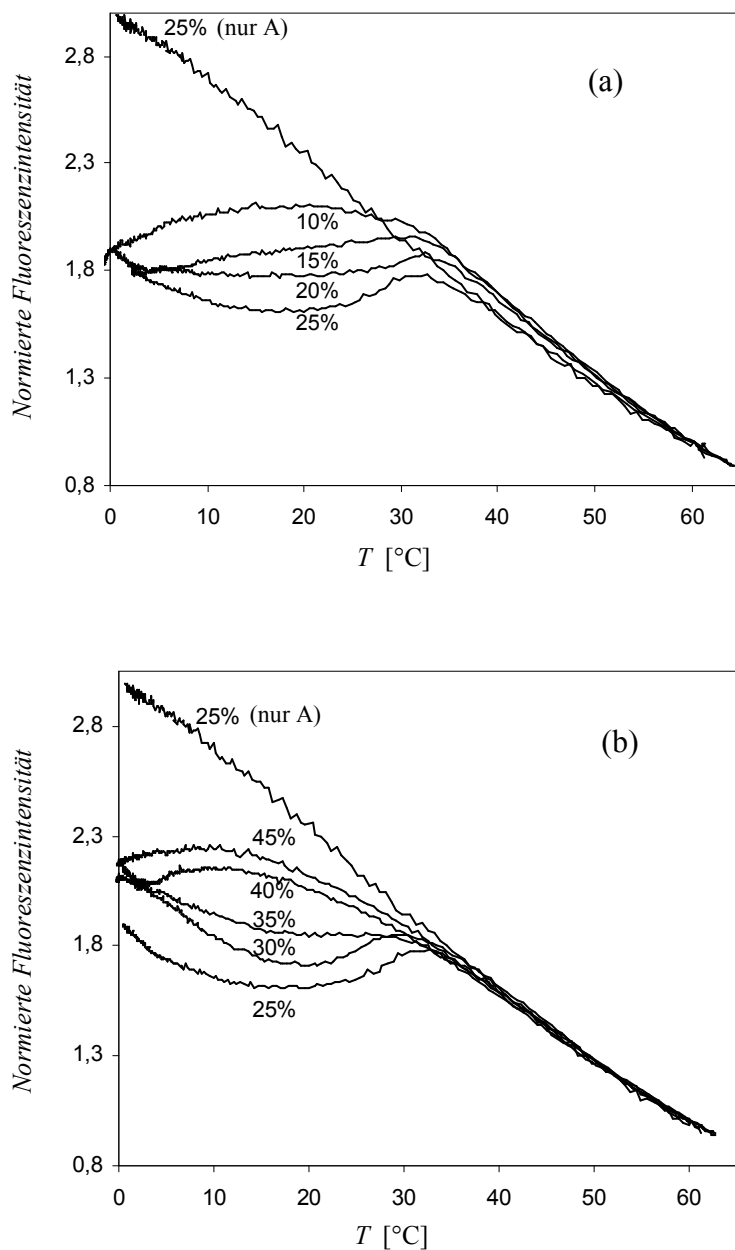


Abb. 2.55 F_{D+A}^{FRET} in Abhängigkeit von T für DOPC:DPPC = 1:1 mit: (a): $10 \leq x_C \leq 25$ Mol% und (b): $25 \leq x_C \leq 45$ Mol%. Die F_A^{FRET} -Kurve für $x_C = 25$ % ist in beiden Diagrammen (a) und (b) als Vergleich dargestellt. Alle Kurven sind auf deren jeweiligen Wert bei $T = 60$ °C normiert.

Die Fluoreszenzintensitätskurven für Liposomen mit beiden Fluorophoren, Donor und Akzeptor, steigen nicht mehr linear mit sinkendem T wie im Fall der Anwesenheit nur eines Fluorophors, sondern zeigen Steigungsratenvariationen und lokale Maxima oder Minima, welche Phasenübergänge andeuten. Diese werden in Unterkapitel 2.5.2.3 ausführlich diskutiert.

Am Anfang der Abkühlung (60 °C) hat F_{D+A}^A den gleichen Wert wie F_A^A , während aufgrund der Gegenwart des Akzeptors und wegen des FRET-Effekts F_{D+A}^D nur etwa 17 % von F_D^D beträgt. Die Akzeptor-Fluoreszenzintensität F_A^{FRET} beträgt nur $\sim 1,6$ % von F_A^A , wohingegen wegen der Anwesenheit des Donors F_{D+A}^{FRET} rund 24 % von F_A^A beträgt.

Mit F_{D+A}^D und F_D^D wird die FRET-Effizienz berechnet:

$$FRET_{\text{Effizienz}} = 1 - \frac{F_{D+A}^D}{F_D^D}$$

Die FRET-Effizienz ist die relative Verringerung der Fluoreszenz des Donors in Gegenwart des Akzeptors. Die FRET-Effizienzkurven sind in Abb. 2.56 dargestellt.

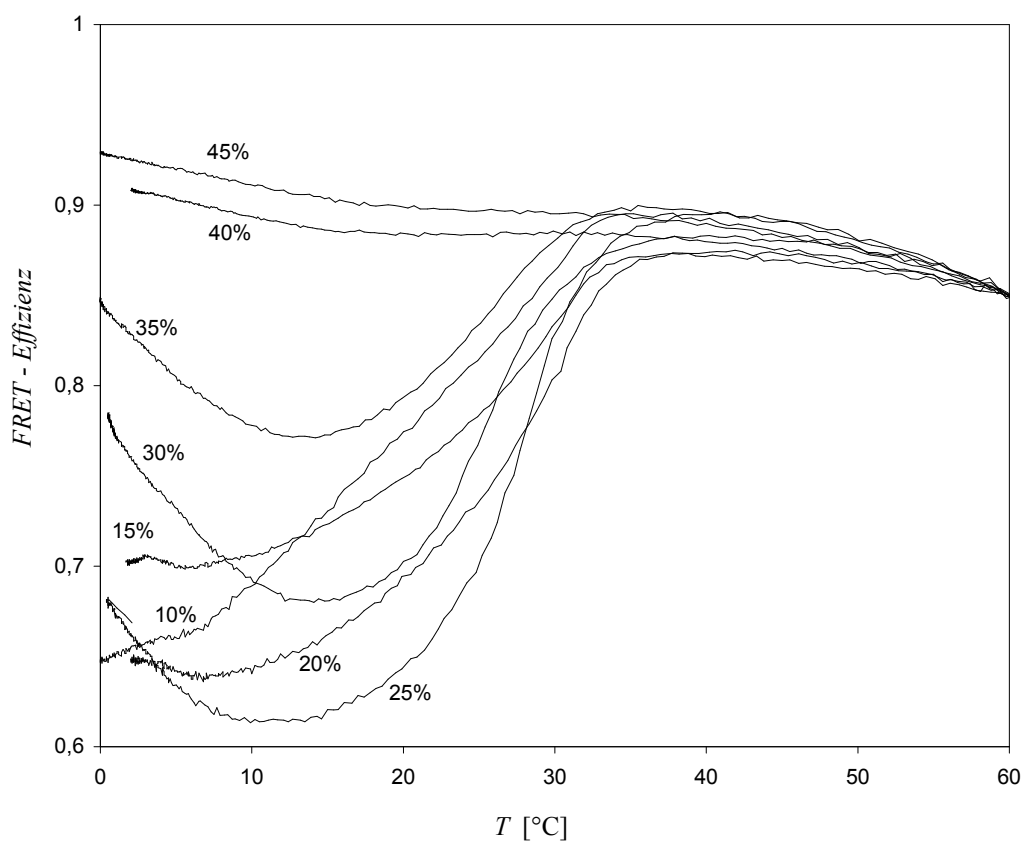


Abb. 2.56. FRET-Effizienz-Kurven für DOPC:DPPC = 1:1 mit $10 \leq x_C \leq 45$ Mol%. Jede Kurve ist mit einem Korrekturfaktor multipliziert, sodass bei der Starttemperatur (60°C) alle Kurven die gleiche FRET-Effizienz wie die Kurve für $x_C = 10$ Mol% haben, welche für die Normierung beliebig ausgewählt wurde. Die FRET-Effizienz variiert bei 60°C leicht, möglicherweise wegen Schwankungen der Fluorophor-Konzentration.

2.5.2.3 Diskussion

2.5.2.3.1 Phasendiagramm

Die lokalen Maxima, Minima und Knicke der Kurven von Abb. 2.53 bis Abb. 2.56 können mit Lipid-Phasenübergängen korreliert werden. Diese sind in Abb. 2.57 in einem Phasendiagramm dargestellt. Als Vergleich wurden Phasenübergänge, die mit NMR von [Davis et al., 2009] und mit Fluoreszenzmikroskopie von [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] entdeckt wurden, auch eingefügt.

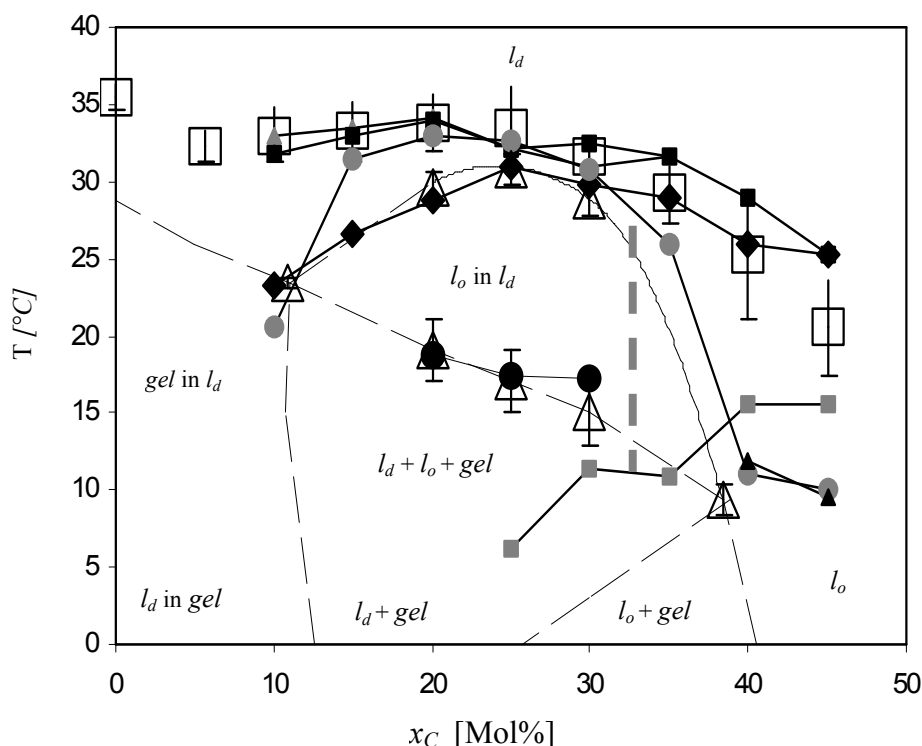


Abb. 2.57 Phasendiagramm von DOPC:DPPC = 1:1 mit verschiedenen Cholesterolgehalten. Nicht ausgefüllte Symbole zeigen Messdaten von (Δ) [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] und (\square) [Davis et al., 2009]. Ausgefüllte Symbole stellen die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse dar. Das Auftreten der l_o -Phase ist durch eine Abnahme der Steigungsrate bei F_{D+A}^A -Kurven für $x_C > 20$ Mol% (\blacklozenge), durch eine abrupte Zunahme der F_{D+A}^D -Kurven (graue Dreiecke), eine Abweichung von der linearen Steigung (\blacksquare) oder durch ein Maximum der F_{D+A}^{FRET} -Kurven (graue Kreise) zu sehen. Die Ausbildung der Gel-Phase bewirkt ein Minimum der F_{D+A}^{FRET} -Kurven (\bullet). Andere mögliche Phasenübergänge sind aus Maxima der F_{D+A}^D -Kurven (graue Quadrate) und Maxima der F_{D+A}^A -Kurven (\blacktriangle) abgelesen.

Abhängig von x_C und T können die Lipid-Mischungen von Cholesterol mit DOPC:DPPC = 1:1 einige Regionen in einem Phasendiagramm zeigen. Jede dieser Regionen besteht jeweils aus einer, zwei oder drei der folgenden Phasen:

- eine flüssig-ungeordnete Phase (l_d);
- eine flüssig-geordnete Phase (l_o);
- eine *Gel*-Phase.

2.5.2.3.2 Mischbarkeit von Donor und Akzeptor

Im Folgenden wird die Distribution der beiden Fluorophore, D und A, in den verschiedenen Phasen der Lipid-Membranen diskutiert und es soll die Frage erörtert werden, wie diese FRET beeinflussen können. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 2.58 gezeigt. Anhand publizierter Ergebnisse [de Almeida et al., 2009, Goñi et al., 2008, Kiessling et al., 2009, Loura et al., 2001, Loura et al., 2009, Pedersen et al., 1996] und unter Einbeziehung der in dieser Arbeit präsentierten Beobachtungen wird in Abb. 2.59 eine Interpretation zur Mischbarkeit von D und A schematisch gezeigt.

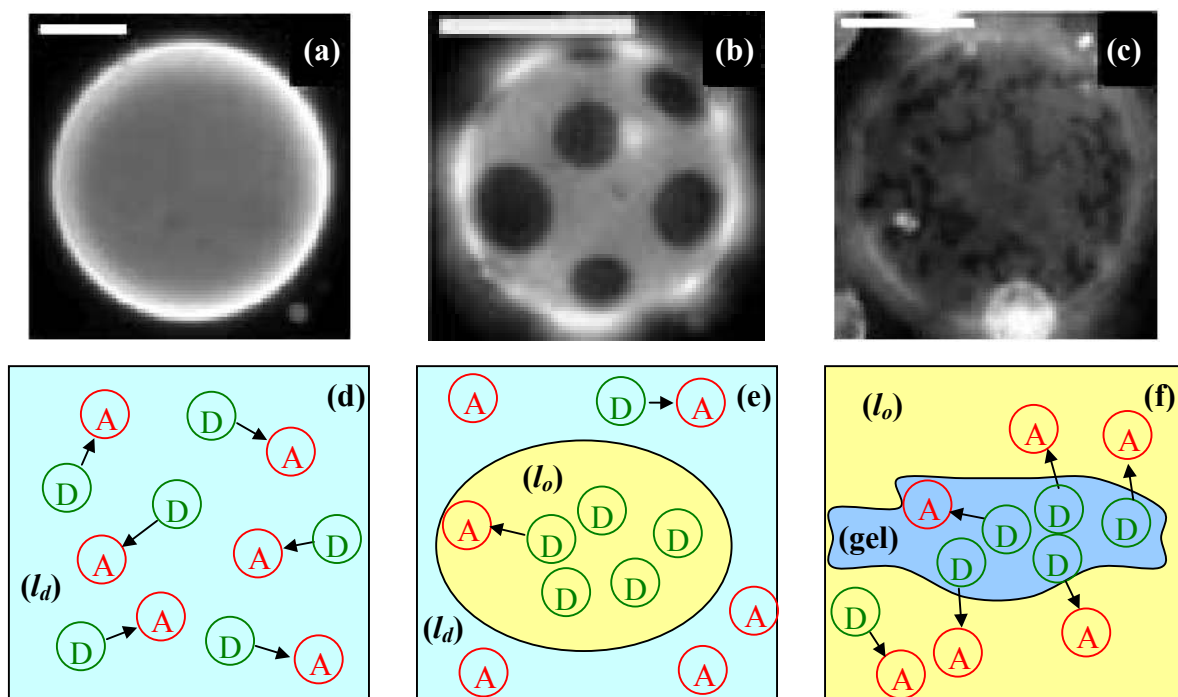


Abb. 2.58 (a)-(c): Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von großen unilamellaren Vesikeln aus DPPC:DOPC mit verschiedenen x_C (Skala: $20\mu\text{m}$) von [Veatch & Keller, 2003a]. (d)-(f): schematische Darstellung der Mischbarkeit von D und A in verschiedenen Phasen. Die schwarzen Pfeile zeigen den nicht-radiativen Energietransfer von D zu A. In (a) liegt eine homogene Phase vor (l_d), was bedeutet, dass D und A willkürlich verteilt sind und eine hohe FRET-Effizienz zu erwarten ist, wie in (d) schematisch dargestellt. In (b) sind zwei Phasen zu erkennen: große und kreisförmige l_o -Domänen in einer sie umgebenden l_d -Phase. In (e) ist eine schematische Darstellung dieser Domänen gezeigt, bei der die räumliche Trennung zwischen D und A, die in den beiden getrennten Phasen verschieden gut löslich sind, groß ist, weshalb die FRET-Effizienz sehr klein ist. In (c) gibt es zwei Phasen (*Gel* + l_o),

die Domänen sind fest, klein und unregelmäßig, wie in (f) schematisch dargestellt. Hier liegt nur eine partielle Trennung zwischen D und A vor; deshalb ist eine intermediäre FRET-Effizienz festzustellen.

Wenn die Lipide in der homogenen l_d Phase sind (Abb. 2.58 (a)), sind sie willkürlich verteilt, D und A sind gut gemischt (Abb. 2.58 (d)), was zu einem hohen FRET führt [Loura et al., 2001, Pedersen et al., 1996, Stillwell et al., 2000]. Wenn l_o oder *Gel*-Phasen vorliegen (Abb. 2.58 (b) und (c)), reichert sich D in diesen Phasen an und entfernt sich von A, welches in der l_d Phase bleibt (Abb. 2.58 (e) und (f)) [de Almeida et al., 2009, Goñi et al., 2008, Kiessling et al., 2009, Loura et al., 2001, Loura et al., 2009]. Die Effizienz von FRET sinkt mit steigender Distanz zwischen D und A, was zugleich eine steigende Domänengröße bedeutet. Die Löslichkeit des Donors ist in l_o - und *Gel*-Phasen fast gleich [Leidy et al., 2001].

Eine Interpretation über die Mischbarkeit von D und A ist in Abb. 2.59 dargestellt und wird im folgenden Absatz auf der Grundlage von Abb. 2.53 bis Abb. 2.57 diskutiert.

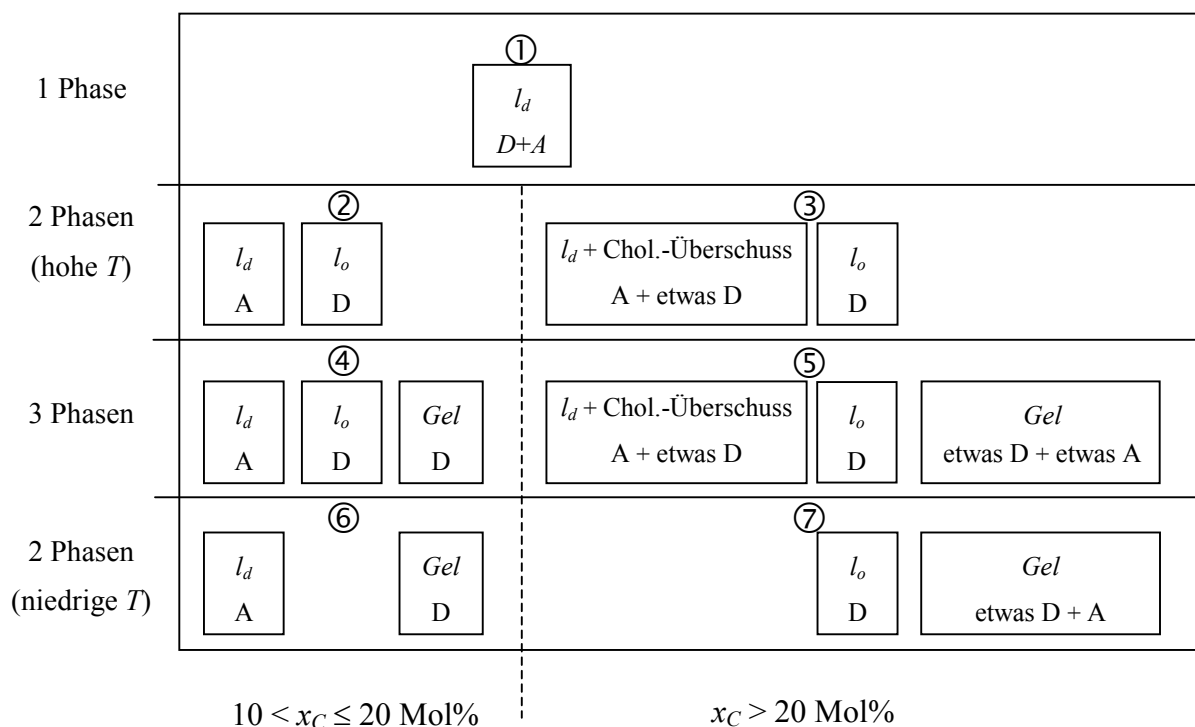


Abb. 2.59 Interpretation der Fluorophor-Mischbarkeit auf der Basis der in Abb. 3.40 bis 3.42 gezeigten Messergebnisse, Erklärung siehe Text.

Im Folgenden werden die Fluoreszenzintensitätskurven von Abb. 2.53 bis Abb. 2.55 und die FRET-Effizienz-Kurven von Abb. 2.56 unter Beachtung der Regionen des Phasendiagramms von Abb. 2.57 und der Interpretation der Mischbarkeit der beiden Fluorophore von Abb. 2.59 diskutiert. Die Verteilung von Abb. 2.59 ermöglicht eine Unterscheidung von sieben Regionen, die in den folgenden Unterkapiteln diskutiert werden.

2.5.2.3.3 Regionen

Einphasen-Region: ①

Bei hohem T sind fast alle Kurven in Abb. 2.53 bis Abb. 2.56, unabhängig von x_C , ungefähr identisch. Aufgrund von FRET ist bei 60 °C F_{D+A}^D auf nur 17 % von F_D^D reduziert und steigt leicht mit sinkendem T wegen nicht-radiativer Prozesse (siehe oben). Die Fluoreszenzintensitäten des Akzeptors F_{D+A}^A und F_{D+A}^{FRET} steigen auch mit sinkendem T , wobei diese, anders als bei der Donorkurve, den F_A^A - und F_A^{FRET} -Kurven ähnlich sind. Die FRET-Effizienz ist sehr hoch und steigt, ähnlich wie die Fluoreszenzintensität, mit sinkendem T . Sie steigt von 0,85 bis zu 0,9 bei einer Abnahme des T von 60 bis auf etwa 40 °C (siehe Abb. 2.56). In diesem Bereich wird FRET nicht durch eine Trennung von D und A gestört, was eine gute Durchmischung beider Fluorophore andeutet. Man stellt fest, dass Region ①, wie in Abb. 2.58 (a) schematisch dargestellt, eine Einphasenregion im l_q -Zustand ist.

Die in dieser Arbeit ermittelten experimentellen Befunde stimmen sehr gut mit den Ergebnissen in der Literatur [Davis et al., 2009, Veatch & Keller, 2003a, Veatch & Keller, 2005a, Veatch et al., 2006] überein. Diese Autoren haben diese Region ebenfalls als eine homogene l_q -Phase interpretiert, wie im Phasendiagramm der Abb. 2.57 dargestellt. In dieser Phase sollten alle Membrankomponenten den gleichen Diffusionskoeffizienten haben [Goñi et al., 2008].

Zweiphasen-Region (hohes T): ② und ③

Wenn T verringert wird, findet ein Übergang von der Einphasenregion ① zu einer der Zweiphasenregionen (② und ③) zwischen 25 und 34 °C, abhängig von x_C , statt. Beim Absenken von T innerhalb der Zweiphasenkoexistenzregion steigt der Anteil der l_o -Phase und sinkt der der l_q -Phase [Davis et al., 2009]. Der Phasenübergang, der aus Abb. 2.53 bis Abb. 2.56 abzulesen ist, ist im Phasendiagramm der Abb. 2.57 dargestellt. Die Regionen ② und ③ werden separat diskutiert.

A.1 Region ②: Niedriger Cholesterolgehalt ($10 \leq x_C < 25$ Mol%)

Wie in Abb. 2.53 zu sehen ist, steigen alle F_{D+A}^A -Kurven für $x_C < 25$ Mol% linear in dem gesamten Bereich von T und sind fast identisch mit F_A^A . Für alle x_C in diesem Bereich ist die Akzeptorfluoreszenz nicht vom Donor beeinflusst, was eine Trennung beider Fluorophore andeutet.

In Abb. 2.54 kann man erkennen, dass die F_{D+A}^D -Kurve für $x_C = 10$ Mol% mit sinkenden T unterhalb von etwa 33 °C - linear zu steigen beginnt. Die F_{D+A}^D -Kurven für $x_C = 15$ und 20 Mol% zeigen bereits bei einem leicht höheren T ein lineares Steigungsverhalten und haben bei ungefähr 0 °C den gleichen Absolutwert wie die 10 Mol%-Kurve. Das bedeutet, dass für $10 \leq x_C < 25$ Mol% in der Nähe von 0 °C die durchschnittliche Entfernung

zwischen D und A ähnlich ist. Der Knick der F_{D+A}^D -Kurven bei ca. 33 °C wird als Anfang der Trennung zwischen D und A interpretiert.

In Abb. 2.55 entfernt sich die F_{D+A}^{FRET} -Kurve für $x_C = 10$ Mol% von der F_A^{FRET} -Kurve bei ca. 31 °C. Für $10 < x_C \leq 30$ Mol% ist die Abweichung der F_{D+A}^{FRET} - von der F_A^{FRET} -Kurve durch ein lokales Maximum markiert. Die FRET-Effizienz-Kurven in Abb. 2.56 zeigen eine abrupte Abnahme der FRET-Effizienz bei diesem T . Das ist, wie oben beschrieben, durch eine Steigung der F_{D+A}^D -Kurve kompensiert.

Mit Zunahme der durchschnittlichen Entfernung zwischen D und A nimmt die FRET-Effizienz ab (siehe Abb. 2.55 und Abb. 2.56) und F_{D+A}^D steigt (siehe Abb. 2.54) wegen des reduzierten Energietransfers zwischen den beiden Fluorophoren. Diese Trennung von D und A deutet die Bildung einer l_o -Phase, in der D mischbar ist, und einer l_d -Phase, die reich an DOPC und A ist, an.

In Abb. 2.54 kann man auch sehen, dass die Steigung der F_{D+A}^D -Graphen mit sinkendem T für höhere x_C größer wird. Die Vermutung liegt nahe, dass Cholesterol diese Phasentrennung begünstigt.

Mit steigendem x_C bis hin zu $x_C = 25$ Mol% fallen die FRET-Kurven stärker und zeigen ein Minimum bei $x_C = 25$ Mol% (siehe Abb. 2.55 und Abb. 2.56). Das weist darauf hin, dass die maximale Menge der l_o -Phase bei $x_C = 25$ Mol% gebildet wurde.

A.2 Region ③: Höherer Cholesterolgehalt ($x_C \geq 25$ Mol%)

Wie in Abb. 2.53 bis Abb. 2.56 zu sehen, kann man Region ③ bei $x_C \approx 35$ Mol% in zwei Teilregionen trennen: Für $25 \leq x_C \leq 35$ Mol% steigt F_{D+A}^A linear mit abnehmendem T in dem Temperaturbereich, wo sich F_{D+A}^A von F_A^A entfernt; F_{D+A}^D zeigt ein Maximum mit einer relativ hohen Fluoreszenzintensität, wobei F_{D+A}^{FRET} und die FRET-Effizienz ein Minimum zeigen. Andererseits zeigen F_{D+A}^A und F_{D+A}^{FRET} für $x_C > 35$ Mol% ein leichtes Maximum, wobei die Maxima von F_{D+A}^D und von der FRET-Effizienz stark reduziert sind.

Um der Übersichtlichkeit willen werden die Phasenübergänge von Region ① zu Region ③ getrennt diskutiert, zuerst für $x_C \leq 35$ und dann für $x_C > 35$ Mol%.

25 ≤ x_C ≤ 35 Mol%

In Region ③ steigen die F_{D+A}^A -Kurven für $x_C \geq 25$ Mol% nicht mehr linear mit sinkendem T , wie sie es in Region ② für $x_C < 25$ Mol% tun und wie es bei der F_A^A -Kurve der Fall ist. Sie weisen hingegen einen Knick auf, sodass sie mit einer kleineren Steigungsrate mit sinkenden T steigen. Anscheinend ist die Fluoreszenzintensität des Akzeptors reduziert, was auf den Einfluss der Donormoleküle zurückzuführen sein kann, also genau das umgekehrte Geschehen wie in Region ②.

Die F_{D+A}^D -Kurven in Abb. 2.54 (b) zeigen, dass für $x_C \geq 25$ Mol% der relative Wert von F_{D+A}^D mit steigendem x_C sinkt. Das weist auf einen Rückgang der Phase, in der D von A getrennt ist, und eine Zunahme solcher D-Molekülen, die mit A in gleicher Phase mischbar bleiben, hin, wie in Abb. 2.59 schematisch dargestellt.

Bei Eintritt in Region ③ fallen die F_{D+A}^{FRET} -Kurven abrupt mit sinkendem T , wobei sie für das gleiche T bei größerem x_C höher liegen. Das bedeutet, dass mit steigendem x_C die Trennung zwischen D und A zurückgeht. Zu demselben Schluss führen die FRET-Effizienz-Kurven in Abb. 2.56, welche mit x_C steigen.

Die Interpretation einer unvollständigen Trennung zwischen D und A lässt sich durch eine partielle Mischbarkeit von D außerhalb von l_o in der l_d -Phase erklären, welche mit steigendem x_C mehr Cholesterol enthält, wie in Abb. 2.59 für Region ③ schematisch dargestellt.

Andere Autoren sind der Meinung, dass die physikalische Ursache der Phasentrennung im Dickenunterschied zwischen der dünneren l_d - und der dickeren l_o -Phase zu suchen ist [Almeida et al., 2005]. Eine bessere Löslichkeit von D in einer mit Cholesterol angereicherten l_d -Phase aus DOPC kann eine Konsequenz des in der Literatur beschriebenen Faktums sein: Mit steigendem x_C nimmt die Dicke der l_d -Phase zu, wohingegen die Dicke der l_o -Phase abnimmt [Clarke et al., 2009]. Mit anderen Worten, der Dickenunterschied verringert sich mit steigendem x_C und anscheinend geht dabei auch die Trennung der Fluorophore zurück.

Abgesehen von kleinen Unterschieden stimmen die von verschiedenen Autoren ermittelten Phasenübergänge sehr gut überein, wie in Abb. 2.57 ersichtlich ist. Aus dem Phasendiagramm (siehe Abb. 2.57) geht hervor, dass die l_o -Phase bis zur Höchsttemperatur für $20 \leq x_C \leq 25$ Mol% existiert. Wie oben erläutert, ist für $x_C = 25$ Mol% die maximale Menge der l_o -Phase gebildet. Für $x_C > 25$ Mol% sinken offensichtlich sowohl der Anteil der l_o -Phase als auch der Dickenunterschied zwischen l_o und l_d .

$x_C > 35$ Mol%

In Abb. 2.54 (b) sind die Werte der F_{D+A}^D -Kurven für $x_C = 40$ und 45 Mol% stark reduziert. Außerdem ereignet sich das Auftreten der l_o -Phase, das, wie oben diskutiert, als leichter Knick der F_{D+A}^D -Kurve erkennbar ist, bei einem kleineren T , d.h. jeweils bei 30 und 25 °C. Die F_{D+A}^A - und F_{D+A}^{FRET} -Kurven sehen ähnlich aus. Wenn sie sich von den F_A^A - und F_A^{FRET} -Kurven jeweils trennen, verhalten sie sich anders als die Kurven für $15 < x_C < 35$ Mol%. Beide weisen, wie die F_{D+A}^{FRET} -Kurve für $x_C = 10$ Mol%, ein Maximum auf, jedoch bei einem kleineren T . Die F_{D+A}^{FRET} -Kurven fallen nicht, sondern es reduzieren sich lediglich deren Steigungsraten in Region ③, wobei die F_{D+A}^A -Kurven im Gegensatz zu den anderen Kurven nicht mehr linear steigen. Die FRET-Effizienz-Kurven besitzen bei Eintritt in Region ③ ein Plateau.

Es stellt sich die Frage, warum für $x_C = 40$ und 45 Mol% die Werte von F_{D+A}^D so klein und die von F_{D+A}^{FRET} so hoch sind. Der Antwort lässt sich in den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen von [Veatch & Keller, 2002] finden. Wie aus deren Abbildungen 2-4 hervorgeht, bilden Lipidmischungen mit $10 < x_C < 30$ Mol% bei sinkendem T unterhalb von $31-34$ °C große kreisförmige l_o -Domänen in einer kontinuierlichen l_d -Umgebungsphase. Für $x_C \geq 35$ Mol% würden sich l_d -Domänen in einer kontinuierlichen l_o -Umgebungsphase bilden. Also findet zwischen $x_C = 30$ und 40 Mol% eine "Kontrast-Inversion" der in der l_d -Phase mischbaren Fluorophore statt. Für $x_C = 35$ Mol% entstehen relativ große l_d -Domänen in einer kontinuierlichen l_o -Umgebungsphase. Bei $x_C = 40$ Mol% gibt es zahlreiche sehr kleine l_d -Domänen, deren Größe mit steigendem x_C weiter abnimmt, wobei es für $x_C > 50$ Mol% keine Domänen mehr gibt, die sich mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen lassen [Veatch & Keller, 2002].

Bei der Analyse der Kurven für $x_C = 40$ und 45 Mol% ist zu beachten, dass bei diesen Mischungen l_d -Domänen in einer kontinuierlichen l_o -Umgebungsphase vorliegen und dass diese Domänen sehr klein sind. Je kleiner die Domänen sind, desto länger ist deren Kontaktlinie mit der kontinuierlichen Phase und laut [de Almeida et al., 2009] sind die Moleküle von D und A umso chaotischer verteilt. Der Akzeptor, der in den kleinen l_d -Domänen mischbar ist, ist weniger weit von D getrennt, da Donor-Moleküle die kleinen Domänen einkreisen und FRET begünstigen [de Almeida et al., 2009]. Wie man Abb. 2.55(b) und Abb. 2.56 entnehmen kann, ist FRET hoch und aufgrund der Phasentrennung steigt F_{D+A}^D nur minimal an (siehe Abb. 2.54 (b)). Für $x_C = 45$ Mol% ist FRET noch höher und das Maximum der Fluoreszenz des Donors noch kleiner als für $x_C = 40$ Mol%. Das bedeutet, dass die l_d -Domänen für die Mischung mit $x_C = 45$ Mol% kleiner sind. Das ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie [Veatch & Keller, 2002], welche besagen, dass mit steigendem x_C Größe und Anzahl der l_d -Domänen abnehmen und schließlich verschwinden. Im Phasendiagramm der Abb. 2.57 veranschaulicht die senkrechte gepunktete Linie bei $x_C \approx 33$ Mol% die "Kontrast-Inversion", die von [Veatch & Keller, 2002] eingefügt wurde.

Die Phasentrennung wird interpretiert als ein Effekt des Dickenunterschieds zwischen verschiedenen Phasen [Almeida et al., 2005, Garcia-Saez et al., 2007], welcher einen bestimmten Energiebedarf per Längeneinheit hat [Garcia-Saez et al., 2007]. Diese Grenzflächenenergie am Domainrand wird auch Linienspannung genannt [Garcia-Saez et al., 2007]. Die Linienspannung tendiert dazu, die Domänengröße durch Koaleszenz zu steigern, wodurch die gesamte Länge der Grenzlinie reduziert wird, wohingegen Entropie und elektrostatische Abstoßung der Domänen-Koaleszenz entgegenwirken [Garcia-Saez et al., 2007]. Der Fakt, dass für $x_C = 33$ Mol% die l_o -Domänen zu einer einzigen großen Domäne koaleszieren [de Almeida et al., 2007], lässt sich als die Mischung mit dem größten Dickenunterschied und mit der höchsten Linienspannung interpretieren. Wie oben diskutiert, reduziert die Linienspannung den energetischen Bedarf durch Verkürzung des totalen Domänenrandes, was die Bildung größerer Domänen durch Koaleszenz kleiner Domänen zur Folge hat. Es wurde gezeigt, dass die Linienspannung durch Cholesterol reduziert wird [Loura

et al., 2009] und deshalb Lipidmischungen mit hohen x_C kleine Domänen bilden. In der l_d -Phase nimmt die Bilschichtdicke mit wachsendem x_C zu [Loura et al., 2001] und mit sinkendem T werden die Kohlenwasserstoffketten dichter gepackt, sodass sich die Fläche pro Lipid verringert [Davis et al., 2009].

Warum aber sind die l_d -Domänen von einer kontinuierlichen l_o -Phase umgeben? Mit sinkendem T trennt sich, wie oben diskutiert, die l_o -Phase von der homogenen l_d -Phase. Für hohe x_C erscheinen multiple Nukleierungszentren, von wo aus die kleinen neugebildeten Domänen wachsen. Diese Kompositionen enthalten nur eine kleine Menge DOPC. Die Menge der l_o -Phase nimmt mit sinkendem T zu, wodurch die l_d -Phase als Domäne in einer kontinuierlichen l_o -Phase erscheint. Die l_d -Domänen koaleszieren nicht in ausreichendem Maße, um große Domänen zu bilden, weil in der l_o -Umgebungsphase die Diffusion der Lipide etwa fünf Mal langsamer vonstatten geht als in den l_d -Domänen [Orädd et al., 2005]. Das erklärt die Größe der (eher kleinen) l_d -Domänen.

Dreiphasenregion: ④ und ⑤

In Abb. 2.55 und Abb. 2.56 ist ersichtlich, dass die F_{D+A}^{FRET} - und FRET-Effizienz-Kurven ein Minimum bei $20 \leq x_C \leq 35$ Mol% aufweisen. Man interpretiert dieses Minimum als den Übergang zwischen den Regionen ③ und ⑤. In Region ③ fällt F_{D+A}^{FRET} wie oben beschrieben, wohingegen die Werte in Region ⑤ steigen.

Es wird angenommen, dass die Steigerung der FRET-Effizienz durch das Auftreten der *Gel*-Phase und durch den Eingang in eine Dreiphasenregion verursacht wird. Mit abnehmendem T wandeln sich die l_o -Domänen der l_o/l_d -Koexistenz von Region ③ in die *Gel*-Domänen von Region ⑤ [Veatch & Keller, 2005b] um. Diese *Gel*-Domänen sind vorzugsweise von l_o -angereicherten Flächen umgeben, welche ihrerseits die hauptsächliche Grenzfläche zur l_d -Phase darstellen [de Almeida et al., 2007]. Die l_o -Phase hat intermediäre Eigenschaften zwischen l_d - und *Gel*-Phasen [de Almeida et al., 2009, Loura et al., 2001]. In dieser Dreiphasenkoexistenz sind die Formen der *Gel*- und l_o -Domänen anders als in einer Zweiphasenkoexistenz. Der progressive Dickenunterschied der Bilschicht von *Gel* zu l_o zu l_d bewirkt, dass die Phase mit intermediären Eigenschaften, die l_o -Phase, als eine Benetzungsschicht fungiert und die Grenzfläche zwischen *Gel*- und l_d -Phase stabilisiert [de Almeida et al., 2007]. Deshalb sind die *Gel*- (und l_d -) Domänen fast kreisförmig und kleiner als die l_o/l_d -Domänen. Weil diese Domänen kleiner sind, sinkt die absolute Trennung von D und A und FRET nimmt zu.

Wie aus verschiedenen fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen hervorgeht, sind die *Gel*-Domänen normalerweise nicht kreisförmig, sondern sie haben unregelmäßige Ränder und bewegen sich als feste Körper in den flüssigen Phasen [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a]. Im Gegensatz dazu sind die flüssigen Domänen kreisförmig und fusionieren durch Kollision kontinuierlich [Veatch & Keller, 2003a]. In den kreisförmigen l_o -Domänen besitzt der Donor die kleinstmögliche Grenzfläche mit der kontinuierlichen Phase, in der sich der Akzeptor anreichert. Ein Minimum der FRET-Effizienz bedeutet zugleich ein Maximum der Trennung zwischen D und A und kann als Bildung der größten Menge an l_o -Domänen

interpretiert werden. Bei einer weiteren Senkung von T wird die kreisförmige Form der l_o -Domänen wegen ihrer Umwandlung in die Gel-Phase unregelmäßig, was den relativen Abstand zwischen D und A verringert und infolgedessen FRET steigen lässt. Wie man in Abb. 2.57 erkennen kann, befindet sich dieser Phasenübergang in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnisse von [Davis et al., 2009].

Für $10 \leq x_C < 20$ Mol% kann man das Auftreten der Gel-Phase in Region ④ nicht klar detektieren, wahrscheinlich weil die Domänen sehr klein sind.

In Region ⑤ existiert für $x_C > 35$ Mol% kein Minimum der F_{D+A}^{FRET} -Kurven; stattdessen besitzen diese Kurven ein Maximum. Dieses Maximum ist dem Maximum der F_{D+A}^A -Kurven ähnlich. Dieser Fakt kann als ein Nachweis des vollständigen Übergangs von der l_d - zu der l_o -Phase, des Übergangs also, der in Region ③ anfängt, betrachtet werden. Eine Zunahme der FRET-Effizienz in Region ⑤ kann mit einer Abnahme der F_{D+A}^D -Kurven korrelieren, deren Steigerungsraten sich bei der Übergangstemperatur ein wenig verändern.

Zweiphasenregion (niedriges T): ⑥ und ⑦

Wie man Abb. 2.54 (b) (für $25 \leq x_C \leq 45$ Mol%) entnehmen kann, führt ein weiteres Absinken von T zu einem Maximum der F_{D+A}^D -Kurven zwischen 6 und 15 °C. Dieses Maximum wird als der Übergang von Region ⑤ zu Region ⑦ interpretiert. Man identifiziert Region ⑦ als die von [Davis et al., 2009] auf theoretischer Grundlage postulierte $l_o + Gel$ -Zweiphasenregion. Wenn die l_d -Phase vollständig verschwindet, mischt sich der Akzeptor in die Gel-Phase, wo D teilweise auch mischbar ist. Der relative Abstand zwischen D und A nimmt daher ab und FRET wird begünstigt (siehe Abb. 2.55 (b) und Abb. 2.56), was zu einer Verringerung der F_{D+A}^D -Werte führt (siehe Abb. 2.54 (b)).

Der Übergang zur Region ⑥ kann mit der hier dargestellten Methode nicht detektiert werden. Für kleine x_C gibt es einen großen Anteil DOPC und es wurde nachgewiesen, dass die l_d -Phase bis zu $T \approx -20$ °C vorliegt [Davis et al., 2009]. Für hohe x_C hat Cholesterol einen Kondensierungseffekt auf DOPC [Vrânceanu et al., 2008a], und das Verschwinden der l_d -Phase bei kleinen T führt zu der Vermutung, dass die Gel-Phase in Region ⑤ überwiegend aus der l_d -Phase gebildet wurde, die sich vor der l_o -Phase in eine Gel-Phase umwandelt. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass l_d - und Gel-Phase ungefähr den gleichen Cholesterolgehalt haben [Goñi et al., 2008, Orädd et al., 2005]. Es scheint, dass die l_o -Phase weder mit der Gel- noch mit der l_d -Phase mischbar wird. Die molekulare Fläche der Lipide in der hoch kondensierten l_o -Phase ist nicht nur kleiner als in der l_d -Phase, sondern auch als in der Gel-Phase [de Almeida et al., 2007].

2.5.2.3.4 Phasendiagramm – Diskussion

In Abb. 2.57 werden die Ergebnisse in einem Phasendiagramm mit denen anderer Autoren verglichen, die die Phasenübergänge mit NMR [Davis et al., 2009] und Fluoreszenzmikroskopie [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] ermittelt haben.

Das Auftreten der l_o -Phase mit abnehmendem T ist durch einen Anstieg der F_{D+A}^D -Kurven (graue Dreiecke bei $10 < x_C < 35$ Mol%), eine Änderung der Steigung der F_{D+A}^{FRET} -Kurven (ausgefüllte Quadrate bei $10 < x_C < 45$ Mol%) gekennzeichnet. Das ist in guter Übereinstimmung mit dem Auftreten der l_o -Domänen, die mittels Fluoreszenzmikroskopie von [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] detektiert wurden.

Für $x_C \leq 30$ Mol% ist die Änderung der Steigungsrate der F_{D+A}^A -Kurven (ausgefüllte Rhomben) in guter Übereinstimmung mit dem Phasenübergang, der mit NMR [Davis et al., 2009] gemessen wurde; für $x_C \geq 35$ Mol% hingegen liegt eine Übereinstimmung mit den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen vor [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a].

Das Minimum der F_{D+A}^{FRET} -Kurven (gefüllte Kreise) ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem Auftreten der Gel -Phase und der Entstehung der Dreiphasenregion, detektiert von [Davis et al., 2009].

Den Übergang von der Dreiphasenregion ($l_d + l_o + Gel$) zur Zweiphasenregion ($l_o + Gel$) konnten [Davis et al., 2009] nur theoretisch, ohne experimentellen Nachweis abschätzen (punktierte Linie). Die hier dargestellten Messergebnisse zeigen ein Maximum der F_{D+A}^D -Kurven (graue Quadrate bei $25 \leq x_C \leq 45$ Mol%), welches ca. 5 °C höher liegt als der von [Davis et al., 2009] vorgeschlagene Phasenübergang zwischen der Dreiphasen- und Zweiphasenkoexistenzregion. Trotz dieses Unterschieds werden die experimentellen Ergebnisse als dieser Phasenübergang interpretiert, weil das Verschwinden der l_d -Phase erwartungsgemäß FRET steigert und dadurch F_{D+A}^D senkt.

[Davis et al., 2009] behaupten, dass die von ihnen ermittelten Phasenübergänge ein wenig unterhalb der realen Grenze zwischen der Einphasenregion (l_d) und der Zweiphasenregion (l_d und l_o) liegen, was den Regionen ① und ② oder ① und ③ jeweils entspricht. Das Auftreten der Gel -Phase jeweils zwischen den Regionen ② und ④ oder ③ und ⑤ könnte auch zu kleineren T hin verschoben sein, da kleine Mengen an Gel -Phasen von größeren Mengen an l_o -Phasen in den NMR-Spektren nicht auflösbar sein können [Davis et al., 2009]. Der Übergang kann bei niedrigen Temperaturen erscheinen, bei denen die Menge an Gel -Phase groß genug ist, um detektierbar zu sein. Im Phasendiagramm der Abb. 2.57 kann man erkennen, dass sowohl die im Zusammenhang mit dieser Arbeit ermittelten Phasenübergänge wie auch die von [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] leicht oberhalb derer von [Davis et al., 2009] liegen. Das ist in guter Übereinstimmung mit der Annahme, dass die Phasenübergänge von [Davis et al., 2009] bei kleineren T erscheinen, weil zu ihrer Bestimmung perdeutrieretes DPPC benutzt wurde, dessen Hauptübergangstemperatur T_m um ca. 5 °C niedriger liegt als bei nicht-deutrierem DPPC.

FRET kann die Bildung der *Gel*-Phase detektieren, was mit Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich ist. Diese Methode kann zwischen *Gel*- und *l_o*-Phasen nicht unterscheiden [Brown et al., 2007, Veatch & Keller, 2005a], da entweder die Fluorophore in beiden Phasen in gleichem Maß mischbar oder die Domänen kleiner als 1 μm sind [Veatch & Keller, 2005b].

Wie man im Phasendiagramm der Abb. 2.57 sehen kann, ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Phasenübergängen, die mit FRET ermittelt wurden, und denen, die mit NMR [Davis et al., 2009] und Fluoreszenzmikroskopie [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] ermittelt wurden.

2.5.2.3.5 Kondensierte Komplexe (CC)

Der Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitätskurven von Abb. 2.53 bis Abb. 2.56 kann auch unter Einbeziehung des Modells der „kondensierten Komplexe“ (CC) interpretiert werden [Almeida, 2009, Chen et al., 2007, McConnell, 2005, McConnell & Radhakrishnan, 2006, Pandit et al., 2004, Radhakrishnan & McConnell, 2005]. Diese Komplexe bestehen aus gesättigten Lipiden und Cholesterol. Theoretische Studien [Anderson & McConnell, 2001] und molekularer Modellierung [McConnell, 2005, McConnell & Radhakrishnan, 2006, Pandit et al., 2004, Radhakrishnan & McConnell, 2005] zeigen, dass sich CC mit verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen wie Cholesterol:DPPC = 1:1; 1:2 und 1:3 zugleich bilden. Wenn als gesättigtes Phospholipid DPPC benutzt wird, dominiert der 1:2-Komplex [Pandit et al., 2004]. Die Interpretation der Ergebnisse soll auf der Grundlage der stöchiometrischen Verhältnisse, die [Pandit et al., 2004] mittels molekularer Modellierung ermittelt haben, durchgeführt werden. Diese haben die Zweikomponentenmischung Cholesterol – DPPC mit $x_C = 40$ Mol% bei $T = 50$ °C untersucht und gezeigt, dass CC sich mit einer stöchiometrischen Verteilung bilden. Es ist anzunehmen, dass bei den Dreikomponentenmischungen die Distribution der stöchiometrischen Verhältnisse der, die [Pandit et al., 2004] gefunden haben, gleicht. In Abb. 2.60 ist die Lipidkomposition und die Menge der CC mit verschiedenen Stöchiometrien abhängig von x_C dargestellt. Weiterhin wird angenommen, dass DOPC die Cholesterol-DPPC-Wechselwirkung nicht beeinflusst und dass die Distribution der CC-Stöchiometrie für alle untersuchten x_C und alle T konstant bleibt. Mit abnehmendem T , so wird ferner angenommen, sind alle CC in die *l_o*-Phase eingebettet und die DOPC-reiche Phase bildet die *l_d*-Phase, also vernachlässigt man die Diffusion der CC in die *l_d*-Phase.

bilden, könnte der Grund der Phasentrennung und des beobachteten Minimums der FRET-Effizienz sein.

2.5.3 Zusammenfassung

Phasenübergänge in Lipidbischichten aus folgenden Lipidmischungen wurden mit FRET untersucht: DOPC:DPPC 1:1 mit 10 bis 45 Mol% Cholesterol. Für eine bestimmte Lipidmischung lassen sich das Auftreten und Verschwinden der unterschiedlichen Phasen durch eine kontinuierlichen Senkung der Temperatur und durch Messung der Fluoreszenzintensität detektieren. Knicke sowie lokale Maxima und Minima der Fluoreszenzintensitäts-Kurven zeigen Phasenübergänge, die in einem Phasendiagramm mit Ergebnissen, die mit anderen Messmethoden gewonnen wurden, verglichen wurden. Die ermittelten Phasenübergänge sind in sehr guter Übereinstimmung mit fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen von [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003a] und mit NMR-Ergebnissen von [Davis et al., 2009]. Die hier präsentierten Ergebnisse sind auch im Einklang mit Ergebnissen numerischer Studien über Komplexierung des Cholesterols mit DPPC mit einem (im Vergleich zu 1:1 und 1:3) überwiegenden stöchiometrischen Verhältnis von 1:2. Die Ergebnisse weisen nach, dass FRET eine vielfältige und im Hinblick auf Kosten wie auch Zeit effektive Methode ist. FRET ist in der Lage, mehr Phasenübergänge als alle anderen jeweils einzeln angewandten Methoden zu detektieren, und ermittelt sogar Übergänge, die anderen Methoden nicht zugänglich sind. Das Hauptproblem bei FRET ist, dass keine Möglichkeit zur Visualisierung der Phasen bei einer vorgegebenen Temperatur besteht. Deshalb muss eine Aufnahme der Fluoreszenzintensität über einen breiten Bereich von T und x_C durchgeführt und interpretiert werden. Die hier dargestellten Ergebnisse bei der Interpretation der FRET-Messdaten können für alle Lipidmischungen übernommen und angepasst werden.

3 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung von Lipid-Bischichten durch Zusammenfügen zweier Lipid-Monoschichten untersucht. Die Lipid-Monoschichten werden mit Hilfe zweier Flüssigkeitsoberflächen beim Aufprall eines Tropfens oder alternativ durch zwei rotierende Walzen in einem innovativen Verfahren in Kontakt gebracht. Die entstehenden Bischichten können asymmetrisch sein, d.h. die beiden Monoschichten der Liposomen können frei gewählte Lipidkompositionen haben. Die Asymmetrie ist wichtig für die Anwendung von Bischichten in Form von Liposomen, um deren funktionelle Eigenschaften gezielt einstellen zu können, z.B. die Liposomen-Außenseite kann verschiedene Stoffe für die Tumorerkennung und den Schutz gegenüber dem Immunsystem enthalten.

Aus den Untersuchungen zum Tropfenaufprall auf Flüssigkeiten mit monomolekularen Lipidschichten auf beiden Oberflächen wurde ersichtlich, dass die Oberflächenrheologie, d.h. Oberflächenelastizität ε und Dehnungsviskosität η , einen sehr großen Einfluss sowohl auf den Strömungsprozess als auch auf die Formation von Bischichten hat. Die rheologischen Eigenschaften der Monoschichten bestimmen ob, sich symmetrische oder asymmetrische Bischichten bilden. Eigene Tropfenaufprall-Untersuchungen zeigen einen großen Unterschied zwischen gesättigten Phospholipiden, wie z.B. Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), und ungesättigten Phospholipiden, wie z.B. Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), und ihren jeweiligen Mischungen mit Cholesterol. Deshalb wurden detailliertere Untersuchungen zur Oberflächenrheologie der Lipid-Monoschichten im Rahmen dieser Arbeit notwendig.

In der Literatur sind verschiedene Methoden für die Charakterisierung der Rheologie, der Phasentrennungen und der Phasenübergänge der reinen Phospholipide und ihrer Mischungen mit Cholesterol benutzt worden. Die statisch gemessene Oberflächenelastizität unterscheidet sich jedoch deutlich von der Oberflächenelastizität, die unter dynamischen Bedingungen, z.B. einer harmonischen Oszillation der Monoschichtfläche, gemessen wurde. Außerdem ist die Dehnungsviskosität definitionsgemäß nur dynamischen Messungen zugänglich. Mit Hilfe eines Tropfenkontur-Tensiometers (PAT) werden die Werte von ε und η der Monoschichten verschiedener Lipidmischungen unter dynamischen Bedingungen untersucht worden.

Es gab nicht sehr viele Daten über die Abhängigkeit von ε und η von dynamischen Parametern, wie z.B. der Frequenz f und Amplitude a bei einer harmonischen Oszillation. Deshalb werden in dieser Arbeit der Einfluss der Amplitude und Frequenz der Oszillation auf ε und η und auf die Störungen der Schwingungen höherer Ordnung systematisch untersucht. Die eigenen Ergebnisse, die mit PAT ermittelt werden, werden in Bezug auf die Oberflächenelastizität von DPPC, DOPC und Cholesterol mit Daten anderer Autoren, die dynamische oder statische Methoden benutzt haben, verglichen. Dafür werden die Filmdruck/Flächen-Isothermen von DPPC von PAT- und Langmuir-Filmwaage-Messungen

verglichen, um zu sehen, ob die Unterschiede durch die Oberflächengeometrie oder durch dynamischen bzw. statische Messbedingungen erscheinen.

Die Frequenz f beeinflusst deutlich sowohl ε als auch η . Bei DPPC-Monoschichten gibt es ein Minimum von ε bei $f = 12,5$ mHz, wobei diese erzwungene Oszillationsfrequenz der mit der Relaxationsfrequenz anderer Autoren [Joos et al., 1992, Wüstneck et al., 1999] übereinstimmt. Auf der Basis des rheologischen Modells von Maxwell kann man wie folgt interpretieren: Wenn erzwungene harmonische Oszillationen für die Bestimmung von ε_p im Bereich der Relaxationsfrequenz k_i eines Feder/Stoßdämpfer-Paares angeregt werden, dann ist die elastische Antwort des Gesamtsystems minimiert.

Der Vergleich der dynamische Beeinflussung von ε und η zeigt, dass ε weniger von den dynamischen Parametern beeinflusst wird als η . Für schnellere Kompressions/Expansions-Raten wird η stark reduziert. Je größer η ist, desto mehr nähert sich die Monoschicht einem entspannten Zustand an und ist klein, wenn die Monoschicht sich in einem nicht entspannten Zustand befindet. Das bedeutet, dass die molekularen Wechselwirkungen höher in den entspannten als in den angespannten Zuständen sind.

Für den komplett gemessenen Π -Bereich gibt es eine sehr große Übereinstimmung zwischen den dynamischen Ergebnissen von ε für DOPC und denen, die aus Isothermen (statisch) gewonnen und mit zwei unterschiedlichen Messmethoden (PAT und Langmuir-Filmwaage) bestimmt werden.

Die Π/A -Isothermen von DPPC, die mit PAT oder Langmuir-Filmwaage gewonnen wurden, sind sehr ähnlich. Das führt zu vergleichbaren statischen Oberflächenelastizitäten bei gleicher Temperatur, die von Isothermen-Messungen abgeleitet wurden. Statische und dynamische Ergebnisse der Elastizität von DPPC und Cholesterol weichen stark ab. Die statisch gemessenen Elastizitäten sind größer als die dynamischen Werte bei gleicher Temperatur.

Da bei $f \geq 18$ mHz, η fast konstant und es noch nahe der Frequenz ist, bei der ε_p ein Minimum zeigt, wurden alle rheologischen Messungen bei einer konstanten Frequenz $f = 18,2$ mHz durchgeführt. Die Amplitude a ist so gewählt, um optimierte Messbedingungen zu erzeugen, d.h. $a = 1,5$ % für DPPC/Cholesterol und DMPC/Cholesterol Mischungen und $a = 2,5$ % für DOPC/Cholesterol Mischungen.

Die Messungen von ε und η mit PAT zeigen über den gesamten geprüften Filmdruckbereich $0 \leq \Pi \leq 50$ mN m⁻¹ Wiederholbarkeit, wobei die Genauigkeit bei ε höher als bei η Messungen ist. Die Dehnungviskosität η der gesättigten Phospholipide (DPPC) ist höher als die der ungesättigten Phospholipide (DOPC) für alle Π , wobei ε und η von Cholesterol ungefähr zehn Mal höher sind als die von DPPC und DOPC. Die rheologischen Eigenschaften von Lipid-Monoschichten können also durch die Wahl von gesättigten oder ungesättigten Phospholipiden und ihrer Mischungen durch Variation des Cholesterol-Anteil beeinflusst werden.

Es gibt fundamentale Unterschiede für die Rheologie und Phasentrennungen der Phospholipide mit gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren. Diese Unterschiede überwiegen in Zweikomponentenmischungen mit Cholesterol. Um diese besser charakterisieren zu

können, wurden drei ubiquitäre Phospholipide mit einer Phosphatidylcholin-Kopfgruppe und einer gesättigten Fettsäure DPPC; DMPC, oder einer einfach ungesättigten Fettsäuren DOPC gewählt. Alle drei Phospholipide unterscheiden sich nur in den hydrophoben Fettsäureketten. DMPC hat zwei Ketten mit 14, DPPC mit 16 und DOPC mit 18 Kohlenstoff-Atomen, wobei nur DOPC eine ungesättigte Doppelbindung pro Kette hat. Es wurden ε und η für diese Phospholipide in Zweikomponentenmischungen mit Cholesterol untersucht, für den ganzen Filmdruckbereich, der mit PAT zugänglich ist.

Aus rheologischen Ergebnissen wurden Phasenübergänge der Monoschichten entdeckt, die sehr gut mit Phasenübergängen, die mit anderen Methoden detektiert wurden, übereinstimmen. Für Zweikomponenten-Mischungen von gesättigten Lipiden: DPPC und DMPC mit Cholesterol können sechs unterschiedliche Regionen in einem von Π und dem Cholesterolgehalt x_C abhängigen Phasendiagramm gefunden werden. Diese Phasenübergänge sind in guter Übereinstimmung mit den Phasenübergängen für statische rheologische Messungen (d.h. Isothermen und Isobaren an eine Langmuir-Filmwaage) und Visualisierungsmethoden (Fluoreszenzmikroskopie und AFM).

Für $x_C \geq 40$ Mol% zeigen die ε_{PC} , ε_{MC} und η_{PC} Kurven nur einen Knick. Oberhalb dieses Phasenüberganges haben die Steigungen die gleiche Größenordnung wie die reinen Cholesterols. Visualisierungsmethoden zeigen bei diesem Phasenübergang eine Inversion des Kontrastes für die Domänen und deren Umgebungsphase. Es wird vermutet, dass unterhalb dieses Phasenüberganges die Wechselwirkungen zwischen den CC ähnlich den Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden sind, wobei diese oberhalb des Phasenüberganges ähnlicher zu reinem Cholesterol sind. Dieser Phasenübergang kann nicht durch statische Oberflächenrheologie, sondern nur durch Visualisierungsmethoden und dynamische Oberflächenrheologie detektiert werden. Dieser Phasenübergang ist die Obergrenze der sogenannten β -Region.

Um die Phasenübergänge der binären Lipid-Mischungen mit Cholesterol zu erklären, haben [McConnell & Radhakrishnan, 2003a] das Modell der kondensierten Komplexe (CC) mit einem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Phospholipiden und Cholesterol eingeführt. Die CC erscheinen als Domänen oder als eine kontinuierliche Phase, die abhängig ist vom Verhältnis zwischen beiden getrennten Phasen. Wenn die Phospholipid/Cholesterol-Mischungen der Komposition der stöchiometrischen Komplexe entspricht, gibt es nur eine Phase für alle Π . Für Mischungsverhältnisse mit niedrigeren Cholesterol-Gehalten als dem stöchiometrischen Verhältnis sind die CC von einer Phase, die reich an Phospholipiden ist, getrennt. Im Phasendiagramm wird dieser nicht mischbare Bereich α -Region genannt. Im Gegensatz dazu werden bei Mischungsverhältnissen, bei denen der Cholesterolgehalt höher ist als bei dem stöchiometrischen Verhältnis, die CC von einer Cholesterol reichen Phase getrennt. Im Phasendiagramm ist diese Region als β -Region bezeichnet.

DOPC/Cholesterol Mischungen haben allgemein viel niedrigere Steigungen für η_{OC} und ε_{OC} mit steigendem Π , und steigen nahezu linear ohne Änderungen der Steigung an. Nur durch eine genauere Analyse kann man Knicke der Kurven, hauptsächlich für $x_C = 40 - 80$ Mol% sehen. Es ist interessant, dass die dynamischen Elastizitätsmessungen in der Lage sind,

die α -Region der ungesättigten Lipide zu detektieren. Dies ist nicht der Fall für die gesättigten Lipide DPPC und DMPC in deren Mischungen mit Cholesterol.

Neben der Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Monoschichten wird die Bildung von Bilschichtstrukturen durch Annäherung zweier Phospholipid-Monoschichten untersucht. Die Monoschichten werden auf die Oberflächen zweier Flüssigkeiten aufgetragen, die durch schrägen Tropfenaufprall auf eine Flüssigkeitsoberfläche in Kontakt gebracht wurden. Asymmetrische Bilschichten bilden sich an der flüssig/flüssigen Kontaktfläche zwischen Tropfen- und Zielflüssigkeit aus durch die Annäherung der Monoschichten. Ungesättigte Phospholipid-Monoschichten ohne Cholesterol bilden zusätzlich symmetrische Bilschichten durch Faltung und Kollaps der Zielmonoschicht. Monoschichten aus ungesättigten Phospholipiden, die Cholesterol enthalten, werden von aufprallenden Tropfen nicht gefaltet und bilden nur asymmetrische Bilschichten. Die Lipidkomposition beeinflusst die rheologischen Eigenschaften und Phasenübergänge der Monoschichten, welche die Tropfenaufprallmuster und die Symmetrie oder Asymmetrie der Bilschichtbildung determinieren. Es wurden zwei Mechanismen für asymmetrische und symmetrische Bilschichtbildung vorgeschlagen. Schräger Tropfenaufprall auf Phospholipid-Monoschichten liefert auch Informationen über die Festigkeit und Stabilität dieser Monoschichten. Für DPPC/Cholesterol-Monoschichten wurde durch Tropfenaufprall-Experimente herausgefunden, dass ein bisher noch nicht determinierter Zustand dieser Monoschichten als ein flüssiger identifiziert werden konnte.

Das zweite Verfahren zur Herstellung von asymmetrischen Bilschichten benutzt Walzenoberflächen, auf denen dünne Lipid- und Wirkstoff-Filme in geordneter Weise zusammengeführt werden. Dabei entstehen Lipid-Bilschichten, die durch den Anpressdruck der Walzen durch definierte Poren einer Membran extrudiert und abgesaugt werden. Liposomen, die mit konventionellen Verfahren erzeugt werden, zeigen selbst nach 21- bis 51-facher Extrusion durch definierte Poren immer noch einen gewissen Anteil multilamellarer Kapseln und sind im Mittel etwa 20 % größer als der Porendurchmesser. Die mit dem neu entwickelten Verfahren generierten Liposomen sind dagegen nach nur einmaliger Extrusion nahezu ausschließlich unilamellar. Die mit den bislang eingesetzten Extrusionsmembranen generierten Liposomen zeigen eine bimodale Verteilung: ca. 75 Vol-% der Liposomen haben im Mittel eine Größe von etwa $\frac{1}{2}$ des Porendurchmessers, die übrigen sind im Mittel gleich groß wie der Porendurchmesser.

Bei dieser Walzenanlage wurde die Dicke und Homogenität aufgetragener dünner Flüssigkeitsfilme auf den Walzenoberflächen gemessen. Die Größenverteilungen und die Uni- oder Multilamellarität der neu hergestellten Liposomen wurden mit Kryo-Translektronenmikroskopie charakterisiert. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Bilschicht-Asymmetrie und die Wirkstoffeinkapselungseffizienz bestimmt.

Für die Bestimmung der Einkapselungseffizienz (EE) wurde ein hydrophiler Fluoreszenzmarker (Calcein) verwendet. Nach der Herstellung der Liposomen werden diese mittels Gel-Permeations-Chromatographie von ihrer wässrigen Umgebung und dem nicht eingekapselten Wirkstoff (Calcein) getrennt und anschließend mit Fluorimetrie quantifiziert. Für Liposomen-Suspensionen, die mit dem neu entwickelten Verfahren hergestellt wurden,

konnten bei hohen Calcein-Konzentrationen eine EE bis 35 % bestimmt werden. Bei identischen Wirkstoff- und Lipidkonzentrationen und gleicher Extrusionsmembran (200 nm) zeigten mit konventionellem Verfahren (Filmmethode nach [Bangham et al., 1965]) mit anschließender Extrusion hergestellte Liposomen-Suspensionen eine EE von 3,7 %. Bei geringeren Wirkstoff-Beladungen konnten auch EE bis über 90 % mit dem neu entwickelten Verfahren erzielt werden, hierbei sind wahrscheinlich auch Oberflächen-Adsorptionseffekte beteiligt. In der Literatur sind bisher keine für beliebige Wirkstoffe einsetzbaren Einkapselungsverfahren mit Kapselgrößen < 200 nm mit vergleichbarer EE ohne Adsorptionseffekte oder wirkstoffspezifische Beladungstechniken beschrieben.

Für die Charakterisierung von Liposomen wurden eine Reihe von Methoden neu entwickelt bzw. weiterentwickelt. Auf Basis standardisierter Extrusionsbedingungen konnte die Bruchfestigkeit der Kapselschalen für unterschiedliche Lipid-Mischungen bestimmt werden, die von den relativen Anteilen von Cholesterol sowie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren abhängt. Auch Polymer-Beschichtungen beeinflussen die Bruchfestigkeit, außerdem verändern sie die Hydrophilie der Kapselschale, was sich in einer etwa vierfach reduzierten Wandreibung der Nanokapseln bei der Bewegung durch Nanoporen äußert, deren Querschnitt enger ist als der einer undeformierten Nanokapsel [Popa, Vrănceanu et al., 2008].

Die Lager-Stabilität von Liposomen, ihre Stabilität und Wirkstoff-Permeabilität in humanem Serum sowie ihre Bruchfestigkeit und Hydrophilie bei der Extrusion hängen von den komplexen Aggregatzuständen ihrer konstituierenden Lipid-Mischungen ab. Die mechanischen und physikochemischen Eigenschaften der Liposomen werden von der Komposition der Bilschicht, d.h. vom Verhältnis gesättigter und ungesättigter Lipide und am meisten vom Cholesterolgehalt, beeinflusst. Abhängig von Lipidmischung und Temperatur zeigen die Bilschichten, analog zu den „lipid rafts“ der Zellmembranen – so genannte „Domänen“.

Es wurde eine Fluoreszenz-Methode entwickelt, um die Phasenzustände und -übergänge der Liposomenschale von einem Gel-Zustand in einen phasenseparierten flüssig-geordneten und flüssig-ungeordneten Zustand zu charakterisieren. Abhängig von der Lipidmischung können ein, zwei oder drei Phasen koexistieren. Diese Phasentrennungen wurden in der vorliegenden Arbeit mit Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) untersucht. Die FRET-Methode wurde gewählt, weil sie einfach ist und sehr kleine Domänen (~ 10 nm) detektieren kann [Loura et al., 2001].

Da FRET weder eine Visualisierung noch einen direkten Nachweis der Phasentrennung liefert, um so die gewonnenen Ergebnisse interpretieren zu können, wurde eine Lipidmischung gewählt, die in der Literatur mit verschiedenen Methoden eingehend untersucht wurde. Deshalb wurden Dreikomponentenmischungen aus Cholesterol, monounsättigtem DOPC als Lipid mit niedrigem T_m und gesättigtem DPPC als Lipid mit hohem T_m verwendet. Der Cholesterolgehalt dieser Mischung liegt zwischen 10 und 45 Mol%, außerdem beträgt das Verhältnis der beiden Phospholipide DOPC:DPPC = 1:1.

Durch eine kontinuierliche Senkung der Temperatur zwischen 60 und 0 °C zeigen die Knicke sowie die lokalen Maxima und Minima der Fluoreszenzintensitäts-Kurven Phasenübergänge, die in einem Phasendiagramm mit Ergebnissen anderer Autoren verglichen

werden. Die ermittelten Phasenübergänge sind in sehr guter Übereinstimmung mit fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen von [Veatch & Keller, 2002, Veatch & Keller, 2003] und mit NMR-Ergebnissen von [Davis et al., 2009]. Diese sind auch im Einklang mit Ergebnissen numerischer Studien über Komplexierung des Cholesterols mit DPPC mit einem (im Vergleich zu 1:1 und 1:3) überwiegenden stöchiometrischen Verhältnis von 1:2. Die Ergebnisse weisen nach, dass FRET eine vielfältige und im Hinblick auf Kosten und Zeit effektive Methode ist. Die selbst entwickelte FRET-Methode ist in der Lage, mehr Phasenübergänge als alle anderen jeweils einzeln angewandten Methoden zu detektieren und ermittelt sogar Übergänge, die anderen Methoden nicht zugänglich sind und bislang nur theoretisch prognostiziert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Korrelation zwischen der komplexen temperaturabhängigen Variation der Fluoreszenzintensität und den Bishichten-Phasentrennungen gefunden. Die hier dargestellten Ergebnisse zur Interpretation der FRET-Messdaten können zukünftig für andere Lipidmischungen übernommen und angepasst werden, ohne die FRET Ergebnisse zusätzlich mit anderen Methoden vergleichen zu müssen.

4 AUSBLICK

Die Tropfenaufprall-Experimente haben gezeigt, unter welchen Bedingungen eine Bischichtbildung durch den Kontakt zweier Flüssigkeiten mit Monoschichten möglich ist. Die gewonnenen Ergebnisse werden in einem nächsten Schritt auf einen Strömungsprozess in einem rotierenden System übertragen.

Das in Entwicklung befindliche Strömungsverfahren zur asymmetrischen Bischichtbildung sieht wie eine große Zentrifuge aus. Kleine Tropfen mit ca. 20 μm Durchmesser prallen auf eine rotierende Flüssigkeitsoberfläche in einem zentrifugalen System. An der Kontaktfläche sollen asymmetrische Bischichten gebildet werden.

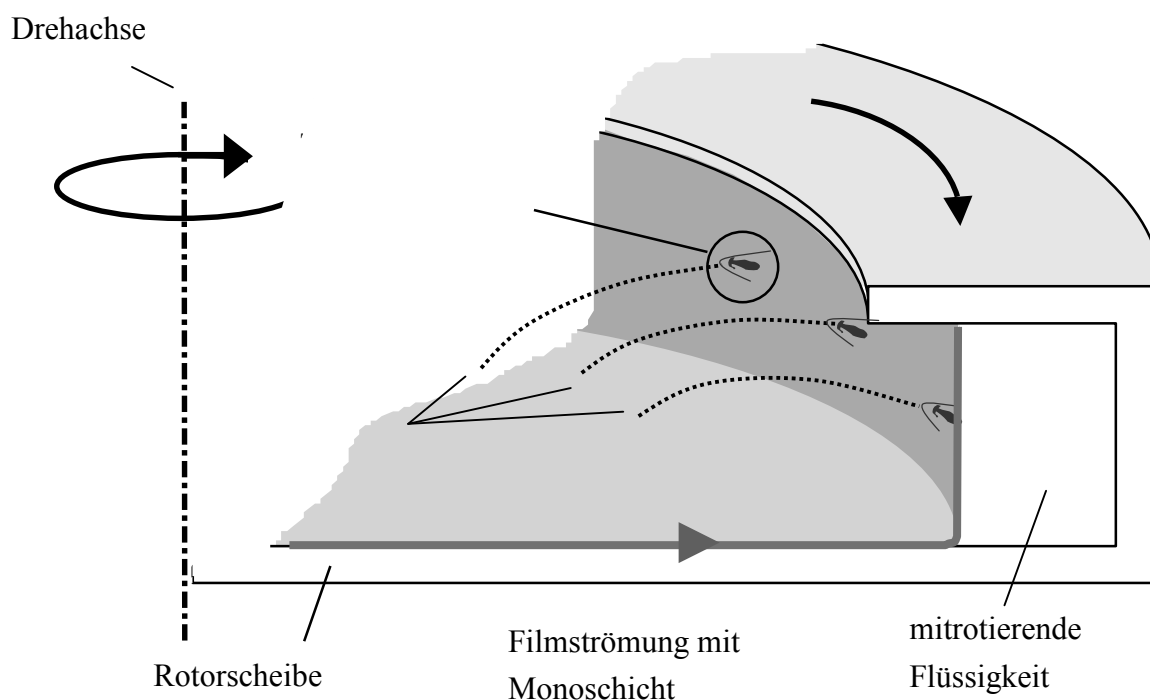


Abb. 4.1 Das in Entwicklung befindliche Strömungsverfahren zur asymmetrischen Bischichtbildung.

Für die Charakterisierung der Bischicht-Asymmetrie ist ein robustes Messsystem zu finden oder zu entwickeln, welches keine Konzentrationsabhängigkeit zeigt, weil diese durch Aufkonzentrierungs- oder Verdünnungseffekte Artefakte erzeugen könnten.

Die Bildung von Liposomen aus dünnen Schichten durch Zusammenführen von Walzenoberflächen ermöglicht die Herstellung asymmetrischer Liposomen mit einer effizienten Wirkstoffeinkapselung. Die gewonnenen Ergebnisse stellen einen wichtigen Schritt in der Grundlagenforschung zu rationellen und effektiven Verfahren zur Herstellung von Liposomen für verschiedenste Anwendungsgebiete dar. Obwohl die bisher erzielten Resultate zur Einkapselungseffizienz bezogen auf kleine Liposomen ($< 200 \text{ nm}$) über den Stand etablierter Technologien deutlich hinausgehen, zeigt sich in den gegenwärtigen Untersuchungen ein noch nicht ausgeschöpftes Steigerungspotenzial in der Verfahrenstechnik und Qualitätscharakteristik der hergestellten Liposomen. Seine Möglichkeiten und Begrenzungen sind noch nicht abschließend ermittelt worden. Vielmehr ist geplant, die Untersuchungen in einem geeigneten Kontext fortzusetzen, um das Verfahren zu optimieren und seine qualitativen Grenzen bewerten zu können. Die dann gewonnenen Ergebnisse sollen in wissenschaftlichen Publikationen detailliert dargestellt werden.

Literatur

1. (2010): <http://www.vds.it/martin/eng/dati.htm>
 2. (2010): http://usm.maine.edu/~newton/Chy251_253/Lectures/Solvents/Solvents.html
 3. (2010): <http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm>
 4. (2010): <http://www.biokurs.de/skripten/11n/bs11-4n.htm>
 - 6 (2011) www.sinterface.com.
- Afkhami, S., M. Bussmann (2006) A Three-Dimensional Model of Droplet Impact Onto an Incline, *Euromech Colloquium 479: Numerical Simulation of Multiphase Flow with Deformable Interfaces*, The Pier, Scheveningen, The Netherlands.
- Albrecht, O., H. Gruler, E. Sackmann (1978) Polymorphism of Phospholipid Monolayers, *Le Journal de Physique* 39, 301-313.
- Albrecht, O. (1979) Polymorphismus in reinen und gemischten Lipid-Monoschichten, PhD Thesis, University of Ulm
- Albrecht, O., H. Gruler, E. Sackmann (1982) Pressure-Composition Phase Diagrams of Cholesterol/Lecithin, Cholesterol/Phosphatidic Acid, and Lecithin/Phosphatidic Acid Mixed Monolayers: A Langmuir Film Balance Study, *J. Colloid Interface Sci.* 79, 319-338.
- Almeida, P.F.F., A. Pokorny, A. Hinderliter (2005) Thermodynamics of membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta* 1720, 1–13.
- Almeida, P.F.F. (2009) Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 72–85.
- Amrein, M., A.v. Nahmen, M. Sieber (1997) A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and function of a model pulmonary surfactant, *Eur Biophys J* 26, 349–357.
- Anderson, T.G., H.M. McConnell (2001) Condensed Complexes and the Calorimetry of Cholesterol-Phospholipid Bilayers, *Biophys. J.* 81, 2774–2785.
- Babak, V.G., J. Desbrieres, V.E. Tikhonov (2005) Dynamic surface tension and dilational viscoelasticity of adsorption layers of a hydrophobically modified chitosan, *Colloids Surf., A* 255, 119–130.
- Bangham, A.D., M.M. Standish, J.C. Watkins (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13, 238-252.
- Baoukina, S., L. Monticelli, H.J. Risselada, S.J. Marrink, D.P. Tieleman (2008) The molecular mechanism of lipid monolayer collapse, *PNAS* 105, 10803-10808.
- Benvegnu, D.J., H.M. McConnell (1993) Surface dipole densities in lipid monolayers, *J. Phys. Chem.* 97, 6686-6691.
- Berberovic, E., N.P. van Hinsberg, S. Jakirlic, I.V. Roisman, C. Tropea (2009) Drop impact onto a liquid layer of finite thickness: Dynamics of the cavity evolution, *Phys. Rev. E* 79, 036306.
- Blume, A. (1979) A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 557, 32-44.
- Bronstein, I.N., K.A. Semendjajew (1991) Taschenbuch der Mathematik, Verlag Nauka Moskau, Moskau.
- Brown, A.C., K.B. Towles, S.P. Wrenn (2007) Measuring Raft Size as a Function of Membrane Composition in PC-Based Systems: Part II s Ternary Systems, *Langmuir* 23, 11188-11196.

- Buboltz, J.T., C. Bwalya, K. Williams, M. Schutzer (2007) High-Resolution Mapping of Phase Behavior in a Ternary Lipid Mixture: Do Lipid-Raft Phase Boundaries Depend on the Sample Preparation Procedure?, *Langmuir* 23, 11968-11971.
- Caseli, L., D.C. Masui, R.P.M. Furriel, F.A. Leone, M.E.D. Zaniquelli (2005) Adsorption Kinetics and Dilatational Rheological Studies for the Soluble and Anchored Forms of Alkaline Phosphatase at the Air/Water Interface, *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 969-977.
- Chen, L., Z. Yu, P.J. Quinn (2007) The partition of cholesterol between ordered and fluid bilayers of phosphatidylcholine: A synchrotron X-ray diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2873–2881.
- Chonn, A., P.R. Cullis, D.V. Devine (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes, *J. Immunol.* 146, 4234-4241.
- Clarke, J.A., J.M. Seddon, R.V. Law (2009) Cholesterol containing model membranes studied by multinuclear solid state NMR spectroscopy, *Soft Matter* 5, 369–378.
- Crane, J.M., G. Putz, S.B. Hall (1999) Persistence of Phase Coexistence in Disaturated Phosphatidylcholine Monolayers at High Surface Pressures, *Biophys. J.* 77, 3134-3143.
- Crane, J.M., L.K. Tamm (2004) Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes, *Biophys. J.* 86, 2965-2979.
- Davis, J.H., J.J. Clair, J. Juhasz (2009) Phase Require in DOPC/DPPC-d₆₂/Cholesterol Mixtures, *Biophys. J.* 96, 521-539.
- de Almeida, R.F.M., L.M.S. Loura, A. Fedorov, M. Prieto (2005) Lipid Rafts have Different Sizes Depending on Membrane Composition: A Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Study, *J. Mol. Biol.* 346, 1109–1120.
- de Almeida, R.F.M., J. Borst, A. Fedorov, M. Prieto, A.J.W.G. Visser (2007) Complexity of Lipid Domains and Rafts in Giant Unilamellar Vesicles Revealed by Combining Imaging and Microscopic and Macroscopic Time-Resolved Fluorescence, *Biophys. J.* 93, 539–553.
- de Almeida, R.F.M., L.M.S. Loura, M. Prieto (2009) Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging, *Chemistry and Physics of Lipids* 157, 61–77.
- Decesari, S., M.C. Facchini, M. Mircea, F. Cavalli, S. Fuzzi (2003) Solubility properties of surfactants in atmospheric aerosol and cloud/fog water samples, *J. Geophys. Res.* 108, 4685-4693.
- Derkach, S.R., J. Krägel, R. Miller (2009) Methods of Measuring Rheological Properties of Interfacial Layers (Experimental Methods of 2D Rheology), *Colloid J.* 71, 1–17.
- Discher, B.M., W.R. Schief, V. Vogel, S.B. Hall (1999) Phase Separation in Monolayers of Pulmonary Surfactant Phospholipids at the Air-Water Interface: Composition and Structure, *Biophys. J.* 77, 2051-2061.
- Dynarowicz-Latka, P., K. Hac-Wydro (2004) Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface, *Colloids & Surfaces B* 37, 21-25.
- Evans, R.W., M.A. Williams, J. Tinoco (1980) Surface viscosities of phospholipids alone and with cholesterol in monolayers at the air-water interface, *Lipids* 15, 524-533.
- Fantini, J., N. Garmy, R. Mahfoud, N. Yahi (2002) Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases, *Expert Rev Mol Med.* 4, 1-22.

- Fillery-Travis, A., L.H. Foster, M.M. Robins (1995) Stability of emulsions stabilized by two physiological surfactants: L-alpha-phosphatidylcholine and sodium taurocholate, *Biophys. Chem.* 54, 253-260.
- Gaboriaud, F., R. Volinsky, A. Bermana, R. Jelineka (2005) Temperature dependence of the organization and molecular interactions within phospholipid/diacetylene Langmuir films, *Journal of Colloid and Interface Science* 287, 191–197.
- Garcia-Saez, A.J., S. Chiantia, P. Schwille (2007) Effect of Line Tension on the Lateral Organization of Lipid Membranes, *J. Biol. Chem.* 282, 33537-33544.
- Giesekus, H. (1994) *Phänomenologische Rheologie: Eine Einführung*, Springer, New York.
- Goñi, F.M., A. Alonso, L.A. Bagatolli, R.E. Brown, D. Marsh, M. Prieto, J.L. Thewalt (2008) Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts, *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 665–684.
- Gopal, A., K.Y.C. Lee (2001) Morphology and Collapse Transitions in Binary Phospholipid Monolayers, *J. Phys. Chem. B* 105, 10348-10354.
- Grigoriev, D.O., J. Kragel, A.V. Akentiev, B.A. Noskov, R. Miller, U. Pison (2003) Relation between rheological properties and structural changes in monolayers of model lung surfactant under compression, *Biophys Chem.* 104, 633-642.
- Hagen, J.P., H.M. McConnell (1997) Liquid-liquid immiscibility in lipid monolayers, *Biochim Biophys Acta* 1329, 7-11.
- Haller, K.K., Y. Ventikos, D. Poulikakos (2002) Computational study of high-speed liquid droplet impact, *J. Appl. Phys.* 92, 2821-2828.
- Halling, K.K., J.P. Slotte (2004) Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization, *Biochim. Biophys. Acta* 1664, 161-171.
- Hamm, H., H. Fabel, W. Bartsch (1992) The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives, *Clin. Investig.* 70, 637-657.
- Hawthorne, S.B., A. Kubátová (2002), Hot (Subcritical) Water Extraction, in: J. Pawliszyn (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry, Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*, Vol. 37, Elsevier, Amsterdam, pp. 587-607.
- Heberle, F.A., J.T. Buboltz, D. Stringer, G.W. Feigenson (2005) Fluorescence methods to detect phase boundaries in lipid bilayer mixtures, *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 186-192.
- Helm, C.A., P. Tippmann-Krayer, H. Möhwald, J. Als-Nielsen, K. Kjaer (1991) Phases of phosphatidyl ethanolamine monolayers studied by synchrotron x-ray scattering, *Biophys. J.* 60, 1457-1476.
- Hirshfeld, C.L., M. Seul (1990) Critical mixing in monomolecular films : pressure-composition phase diagram of a two-dimensional binary mixture, *J. Phys. France* 51, 1537 - 1552.
- Hu, Y., K. Meleson, J. Israelachvili (2006) Thermodynamic equilibrium of domains in a two-component Langmuir monolayer, *Biophys. J.* biophysj.106.081000.
- Hwang, J., L.K. Tamm, C. Böhm, T.S. Ramalingam, E. Betzig, M. Edidin (1995) Nanoscale Complexity of Phospholipid Monolayers Investigated by Near-Field Scanning Optical Microscopy, *Science* 270, 610-614.
- John, K., S. Schreiber, J. Kubelt, A. Herrmann, P. Müller (2002) Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: Implications for flip-flop in biological membranes, *Biophys. J.* 83, 3315-3323.

- Joos, P., M.v. Uffelen, G. Serrin (1992) Surface relaxation in spread insoluble monolayers of cholesterol and dipalmitoyl lecithin, *J. Colloid Interface Sci* 152, 521-533.
- Keller, S.L., A. Radhakrishnan, H.M. McConnell (2000) Saturated Phospholipids with High Melting Temperatures Form Complexes with Cholesterol in Monolayers, *J. Phys. Chem. B* 104, 7522-7527.
- Kerth, A.M. (2003) Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen an der Luft Wasser Grenzfläche, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kiessling, V., C. Wan, L.K. Tamm (2009) Domain coupling in asymmetric lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 64-71.
- Knobler, C.M. (1991) Condensed monolayer phases at the air/water interface: phase transitions and structures, *J. Phys.: Condens. Matter* 3, S17-S22.
- Krägel, J., G. Kretzschmar, J.B. Li, G. Loglio, R. Miller, H. Möhwald (1996a) Surface rheology of monolayers, *Thin Solid Films* 284-285, 361-364.
- Krägel, J., J.B. Li, R. Miller, M. Bree, G. Kretzschmar, H. Möhwald (1996b) Surface viscoelasticity of phospholipid monolayers at the air/water interface, *Colloid Polym Sci.* 274, 1183-1187.
- Kretzschmar, G., J. Li, R. Miller, H. Motschmann, H. Möhwald (1996) Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces. 3. Relaxation of spreading phospholipid monolayers under harmonic area changes, *Colloids Surf., A* 114, 277-285.
- Lakowicz, J.R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, Springer, New York.
- Lampe, J., R. DiLalla, J. Grimaldi, J.P. Rothstein (2005) Impact dynamics of drops on thin films of viscoelastic wormlike micelle solutions, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 125, 11-23.
- Lee, K.Y.C. (2008) Collapse Mechanisms of Langmuir Monolayers, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59, 771-791.
- Leidy, C., W.F. Wolkers, K. Jørgensen, O.G. Mouritsen, J.H. Crowe (2001) Lateral Organization and Domain Formation in a Two-Component Lipid Membrane System, *Biophys. J.* 80, 1819-1828.
- Leneweit, G., R. Koehler, K.G. Roesner (2001) Oblique drop impact and surface spreading on deep fluids, *Proc. 17th Ann. Conf. Liquid Atom. Spray Systems* 712-717.
- Leneweit, G., R. Koehler, K.G. Roesner, G. Schäfer (2005) Regimes of drop morphology in oblique impact on deep fluids, *J. Fluid Mech.* 543, 303-331.
- Li, J., R. Miller, R. Wüstneck, H. Möhwald, A.W. Neumann (1995) Use of pendent drop technique as a film balance at liquid/liquid interfaces, *Colloids & Surfaces A* 96, 295-299.
- Li, J., R. Miller, H. Möhwald (1996a) Phospholipid monolayers and their dynamic interfacial behaviour studied by axisymmetric drop shape analysis, *Thin Solid Films* 284-285, 357-360.
- Li, J., R. Miller, H. Möhwald (1996b) Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces. 2. Comparison of isotherms of insoluble and soluble films of phospholipids at different fluid/water interfaces, *Colloids & Surfaces A* 114, 123-130.
- Li, J., R. Miller, D. Vollhardt, H. Möhwald (1998a) Spreading concentration effect on the morphology of phospholipid monolayers, *Thin Solid Films* 327-329, 84-86.

- Li, J.B., J. Krägel, A.V. Makievski, V.B. Fainermann, R. Miller, H. Möhwald (1998b) A study of mixed phospholipid/ β -casein monolayers at the water/air surface, *Colloids Surf. A* 142, 355-360.
- Li, X., C. Pozrikidis (1997) The effect of surfactants on drop deformation and on the rheology of dilute emulsions in Stokes flow, *J. Fluid Mech.* 341, 165-194.
- Lipp, M.M., K.Y.C. Lee, D.Y. Takamoto, J.A. Zasadzinski, A.J. Waring (1998) Coexistence of Buckled and Flat Monolayers, *Phys. Rev. Lett.* 81, 1650-1653.
- Lis, L., M. McAlister, N. Fuller, R. Rand, V. Parsegian (1982) Measurement of the lateral compressibility of several phospholipid bilayers, *Biophys. J.* 37, 667-672.
- Loglio, G., U. Tesei, R. Cini (1979) Spectral Data of Surface Viscoelastic Modulus Acquired Via Digital Fourier Transformation, *J. Colloid Interface Sci.* 71, 316-320.
- Loglio, G., P. Pandolfini, R. Miller, A.V. Makievski, R. Ravera, M. Ferrari, L. Liggieri (2001), Drop and bubble shape analysis as a tool for dilational rheological studies of interfacial layers, in: D. Möbius & R. Miller (Eds.), *Novel Methods to Study Interfacial Layers*, in *Studies in Interface Science*, Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, pp. 439-485.
- Loglio, G., P. Pandolfini, A.V. Makievski, R. Miller (2003) Calibration parameters of the pendant drop tensiometer: assessment of accuracy, *J. Colloid Interface Sci.* 265, 161-165.
- Loglio, G., P. Pandolfini, R. Miller, A. Makievski, J. Krägel, F. Ravera (2004) Oscillation of interfacial properties in liquid systems: assessment of harmonic distortion, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 1375-1379.
- Loglio, G., P. Pandolfini, R. Miller, A.V. Makievski, J. Krägel, F. Ravera, B.A. Noskov (2005) Perturbation-response relationship in liquid interfacial systems: non-linearity assessment by frequency-domain analysis, *Colloids & Surfaces A* 261, 57-63.
- Loura, L.M.S., A. Fedorov, M. Prieto (2001) Fluid-Fluid Membrane Microheterogeneity: A Fluorescence Resonance Energy Transfer Study, *Biophys. J.* 80, 776-788.
- Loura, L.M.S., R.F.M. de Almeida, L.C. Silva, M. Prieto (2009) FRET analysis of domain formation and properties in complex membrane systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 209-224.
- Lu, J., E.C. Boughner, C.L. Liotta, C.A. Eckert (2002) Nearcritical and supercritical ethanol as a benign solvent: polarity and hydrogen-bonding, *Fluid Phase Equilib.* 198, 37-49.
- Ma, G., H.C. Allen (2006) DPPC Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy, *Langmuir* 22, 5341-5349.
- Malcharek, S., A. Hinz, L. Hilterhaus, H.-J. Galla (2005) Multilayer Structures in Lipid Monolayer Films Containing Surfactant Protein C: Effects of Cholesterol and POPE, *Biophys. J.* 88, 2638-2649.
- Manojlovic, V., K. Winkler, V. Bunjes, A. Neub, R. Schubert, B. Bugarski, G. Lenewit (2008) Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein, *Colloids Surfaces B* 64, 284-296.
- Manzello, S.L., J.C. Yang (2002) An experimental study of a water droplet impinging on a liquid surface, *Exp. Fluids* 32, 580-589.
- Marrink, S.J., A.E. Mark (2003) Molecular Dynamics Simulation of the Formation, Structure, and Dynamics of Small Phospholipid Vesicles, *J. AM. CHEM. SOC.* 125, 15233-15242.
- McConnell, H., A. Radhakrishnan (2003) Condensed complexes of cholesterol and phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 159-173.

- McConnell, H. (2005) Complexes in Ternary Cholesterol-Phospholipid Mixtures, *Biophys. J.* 88, L23-L25.
- McConnell, H., A. Radhakrishnan (2006) Theory of the deuterium NMR of sterol-phospholipid membranes, *PNAS* 103, 1184–1189.
- McIntosh, T.J., A. Vidal, S.A. Simon (2003) Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts, *Biophys. J.* 85, 1656-1666.
- Miller, R., N. Wüstneck, J. Krägel, G. Kretzschmar (1996) Dilational and shear rheology of adsorption layers at liquid interfaces, *Colloids Surf., A* 111, 75-118.
- Miller, R., J.K. Ferri, A. Javadi, J. Krägel, N. Mucic, R. Wüstneck (2010) Rheology of interfacial layers, *Colloid Polym Sci.* 288, 937–950.
- Mock, U., T. Michel, C. Tropea, I. Roisman, J. Rühle (2005) Drop impact on chemically structured arrays, *J. Phys.: Condens. Matter* 17, S595–S605.
- Moghimi, S.M., H.M. Patel (1998) Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity, *Adv. Drug Delivery Rev.* 32, 45-60.
- Möhwald, H. (1995), Phospholipid Monolayers, in: R. Lipowski & E. Sackmann (Eds.), *Structure and Dynamics of Membranes. From Cells to Vesicles*, Vol. 1A, Elsevier, Amsterdam, pp. 161-211.
- Mozafari, M.R. (2005) Liposomes: An overview of manufacturing techniques, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 711-719.
- Mueller, P., D.O. Rudin, H. Ti Tien, W.C. Wescott (1962) Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System, *Nature* 194, 979-980.
- Nag, K., K.M.W. Keough (1993) Epifluorescence microscopic studies of monolayers containing mixtures of dioleoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines, *Biophys. J.* 65, 1019-1026.
- New, R. (1990) *Liposomes - A practical approach*, Oxford University Press, New York.
- Nikomarov, E.S. (1990) A Slow Collapse of a Monolayer Spread on an Aqueous Surface, *Langmuir* 6, 410-414.
- Nothelle, R., H.-J. Hamann (1996) Liposomen – Strukturen und Herstellung, *Chem. Ing. Tech.* 68, 1537–1545.
- Okawa, T., T. Shiraishi, T. Mori (2008) Effect of impingement angle on the outcome of single water drop impact onto a plane water surface, *Exp Fluids* 44, 331–339.
- Okonogi, T.M., H.M. McConnell (2004) Contrast Inversion in the Epifluorescence of Cholesterol-Phospholipid Monolayers, *Biophys. J.* 86, 880-890.
- Orädd, G., P.W. Westerman, G. Lindblom (2005) Lateral Diffusion Coefficients of Separate Lipid Species in a Ternary Raft-Forming Bilayer: A Pfg-NMR Multinuclear Study, *Biophys. J.* 89, 315–320.
- Pandit, S.A., D. Bostick, M.L. Berkowitz (2004) Complexation of Phosphatidylcholine Lipids with Cholesterol, *Biophys. J.* 86, 1345–1356.
- Pautot, S., B.J. Frisken, D.A. Weitz (2003) Engineering asymmetric vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10718-10721.
- Pawelec, M.K., T.R. Sosnowski (2003a), Langmuir-Wilhelmy balance studies of DPPC and CTAB films, in: K.A. Wilk (Eds.), *Surfactants and dispersed systems in theory and practice*, Vol. Oficyna Wyd. Polit. Wroc., Wroclaw, pp. 267-270.

- Pawelec, M.K., T.R. Sosnowski (2003b) Relaxation phenomena at the air-water interface with surfactants, *Int. J. Appl. Mech. Eng.* 8, 295-300.
- Pawliszyn, J. (2002), Hot (subcritical) water extraction, in: D. Barcelo (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 37, Elsevier, Amsterdam, pp.
- Pedersen, S., K. Jorgensen, T.R. Baekmark, O.G. Mouritsen (1996) Indirect Evidence for Lipid-Domain Formation in the Transition Region of Phospholipid Bilayers by Two-Probe Fluorescence Energy Transfer, *Biophys. J.* 71, 554-560.
- Phillips, M.C. (1972) The physical state of phospholipids and cholesterol in monolayers, bilayers and membranes, *Progr. Surf Membr. Sci.* 5, 139-221.
- Piknova, B., V. Schram, S.B. Hall (2002) Pulmonary surfactant: phase behavior and function, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 487-494.
- Pohl, P., Y.N. Antonenko, V.Y. Evtodienko, E.E. Pohl, S.M. Saparov, I.I. Agapov, A.G. Tonevitsky (1998) Membrane fusion mediated by ricin and viscumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1371, 11-16.
- Popa, R., M. Vrânceanu, S. Nikolaus, H. Nirschl, G. Lenewit (2008) Entrance Effects at Nanopores of Nanocapsules Functionalized with Poly(ethylene glycol) and Their Flow through Nanochannels, *Langmuir* 24, 13030-13036.
- Radhakrishnan, A., H.M. McConnell (1999) Condensed Complexes of Cholesterol and Phospholipids, *Biophys. J.* 77, 1507-1517.
- Radhakrishnan, A., H. McConnell (2005) Condensed complexes in vesicles containing cholesterol and phospholipids, *PNAS* 102, 12662-12666.
- Ratajczak, M.K., Y.T.C. Ko, Y. Lange, T.L. Steck, K.Y.C. Lee (2007) Cholesterol Displacement from Membrane Phospholipids by Hexadecanol, *Biophys. J.* 93, 2038-2047.
- Ravera, F., M. Ferrari, E. Santini, L. Liggieri (2005) Influence of surface processes on the dilational visco-elasticity of surfactant solutions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 117, 75 - 100.
- Ravera, F., G. Loglio, V.I. Kovalchuk (2010) Interfacial dilational rheology by oscillating bubble/drop methods, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 217-228.
- Rein, M. (1993) Phenomena of liquid drop impact on solid and liquid surfaces, *Fluid Dynamics Research* 12, 61-93.
- Ridsdale, R.A., N. Palaniyar, F. Possmayer, G. Harauz (2001) Formation of folds and vesicles by dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers spread in excess, *J. Membr. Biol.* 180, 21-32.
- Roy, M.T., M. Gallardo, J. Estelrich (1997) Bilayer distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in lipid vesicles, *Biconjugate Chem.* 8, 941-945.
- Sardone, L. (2005) Nanostructured molecular films with functional applications for supramolecular electronics, Thesis University Louis Pasteur of Strasbourg (France).
- Saslowsky, D.E., J. Lawrence, X. Ren, D.A. Brown, R.M. Henderson, J.M. Edwardson (2002) Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers, *J. Biol. Chem.* 277, 26966-26970.
- Saulnier, P., F. Boury, A. Malzert, B. Heurtault, T. Ivanova, A. Cagna, I. Panaiotov, J. Proust (2001) Rheological model for the study of dilational properties of monolayers. Compartment of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the dichloromethane (DCM)/water interface under ramp type or sinusoidal perturbations, *Langmuir* 17, 8104-8111.

- Saylor, J., N. Grizzard (2004) The optimal drop shape for vortices generated by drop impacts: the effect of surfactants on the drop surface, *Exp Fluids* 36, 783-790.
- Saylor, J.R., N.K. Grizzard (2003) The effect of surfactant monolayers on vortex rings formed from an impacting water drop, *Phys. Fluids* 15, 2852-2863.
- Saylor, J.R. (2004) The fate of soluble and insoluble surfactant monolayers subjected to drop impacts, *Exp Fluids* 34, 540-547.
- Schindler, H. (1980) Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles, *FEBS Letters* 122, 77-79.
- Shah, D., J.H. Schulman (1967) Influence of calcium, cholesterol, and unsaturation on lecithin monolayers, *J. Lipid Res.* 8, 215-226.
- Sibug-Aga, R., R.C. Dunn (2004) High-resolution Studies of Lung Surfactant Collapse, *J. Photochem. Photobiol.* 80, 471-476.
- Sikalo, S., C. Tropea, E.N. Ganic (2005) Impact of droplets onto inclined surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 286, 661-669.
- Silvius, J.R. (2003) Fluorescence Energy Transfer Reveals Microdomain Formation at Physiological Temperatures in Lipid Mixtures Modeling the Outer Leaflet of the Plasma Membrane, *Biophys. J.* 85, 1034-1045.
- Smaby, J.M., M.M. Momsen, H.L. Brockman, R.E. Brown (1997) Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol, *Biophys. J.* 73, 1492-1505.
- Stillwell, W., L.J. Janski, M. Zerouga, A.C. Dumaul (2000) Detection of lipid domains in docosahexaenoic acid-rich bilayers by acyl chain-specific FRET probes, *Chemistry and Physics of Lipids* 104, 113-132.
- Stottrup, B.L., D.S. Stevens, S.L. Keller (2005) Miscibility of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol in Monolayers, and Application to Bilayer Systems, *Biophys. J.* 88, 269-276.
- Stottrup, B.L., S.L. Keller (2006) Phase Behavior of Lipid Monolayers Containing DPPC and Cholesterol Analogs, *Biophys. J.* 90, 3176-3183.
- Subramaniam, S., H.M. McConnell (1987) Critical mixing in monolayer mixtures of phospholipid and cholesterol, *J. Phys. Chem.* 91, 1715-1718.
- Torchilin, V.P., V. Weissig (2003) *Liposomes - A Practical Approach*, Second, Oxford University Press, USA.
- Torchilin, V.P. (2006) Multifunctional nanocarriers, *Adv Drug Deliv Rev.* 58, 1532-1555.
- Tournois, H., P. Gieles, R. Demel, J. de Gier, B. de Kruijff (1989) Interfacial properties of gramicidin and gramicidin-lipid mixtures measured with static and dynamic monolayer techniques, *Biophys. J.* 55, 557-569.
- Udenfriend, S., S. Stein, P. Böhlen (1972) Fluorescamin: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range, *Science* 178, 871-872.
- Veatch, S.L., S.L. Keller (2002) Organization in Lipid Membranes Containing Cholesterol, *Phys. Rev. Lett.* 89, 2681011-2681014.
- Veatch, S.L., S.L. Keller (2003a) Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol, *Biophys. J.* 85, 3074-3083.
- Veatch, S.L., S.L. Keller (2003b) A Closer Look at the Canonical 'Raft Mixture' in Model Membrane Studies, *Biophys. J.* 84, 725-726.
- Veatch, S.L., I.V. Polozov, K. Gawrisch, S.L. Keller (2004) Liquid Domains in Vesicles Investigated by NMR and Fluorescence Microscopy, *Biophys. J.* 86, 2910-2922.

- Veatch, S.L., S.L. Keller (2005a) Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 172 – 185.
- Veatch, S.L., S.L. Keller (2005b) Miscibility Phase Diagrams of Giant Vesicles Containing Sphingomyelin, *PhysRevLett.* 94, 148101.
- Veatch, S.L., K. Gawrisch, S.L. Keller (2006) Closed-Loop Miscibility Gap and Quantitative Tie-Lines in Ternary Membranes Containing Diphytanoyl PC, *Biophys. J.* 90, 4428–4436.
- Veatch, S.L., O. Soubias, S.L. Keller, K. Gawrisch (2007) Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures, *PNAS* 104, 17650-17655.
- von Tscharner, V., H.M. McConnell (1981) Physical properties of lipid monolayers on alkylated planar glass surfaces, *Biophys. J.* 36, 421-427.
- Vrânceanu, M., G. Leneweit, K. Winkler, H. Nirschl (2007a) Dynamics of monolayers and bilayer formation during drop impact on fluids, *Proceedings of the International Congress on Particle Technology Nürnberg*, 26. - 29.23.2007.
- Vrânceanu, M., K. Winkler, H. Nirschl, G. Leneweit (2007b) Surface rheology of monolayers of phospholipids and cholesterol measured with axisymmetric drop shape analysis, *Colloids Surf., A* 311, 140-153.
- Vrânceanu, M., K. Winkler, H. Nirschl, G. Leneweit (2008a) Surface Rheology and Phase Transitions of Monolayers of Phospholipid/cholesterol Mixtures, *Biophys. J.* 94, 317.
- Vrânceanu, M., K. Winkler, H. Nirschl, G. Leneweit (2008b) Influence of the monolayers composition on bilayer formation during oblique drop impact on liquids, *Progr Colloid Polym Sci* 134, 80–89.
- Vrânceanu, M., N. Terinte, H. Nirschl, G. Leneweit (2011) Asymmetric or symmetric bilayer formation during oblique drop impact depends on rheological properties of saturated and unsaturated lipid monolayers, *J. Colloid Interface Sci.* 354, 45–54.
- Wang, M.-J., F.-H. Lin, J.Y. Ong, S.-Y. Lin (2009) Dynamic behaviors of droplet impact and spreading—Water on glass and paraffin, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 339, 224–231.
- Weiss, D.A., A.L. Yarin (1999) Single drop impact onto liquid films: neck distortion, jetting, tiny bubble entrainment, and crown formation, *J. Fluid Mech.* 385, 229-254.
- Werner, S.R.L., J.R. Jones, A.H.J. Paterson, R.H. Archer, D.L. Pearce (2009) Droplet impact and spreading on lecithinated anhydrous milkfat surfaces, *J. Food Eng.* 90, 525-530.
- Woland, M. (2006): *Enzyklopädie Wikipedia*
- Woodward, R.P. (2011) Dynamic Surface Tension and Dilational Stress Measurements Using the Drop Shape Method, <http://www.firsttenangstroms.com/>.
- Worthman, L.A.D., K. Nag, P.J. Davis, K.M.W. Keough (1997) Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy, *Biophys. J.* 72, 2569-2580.
- Wüstneck, N., R. Wüstneck, V.B. Fainerman, R. Miller, U. Pison (2001) Interfacial behaviour and mechanical properties of spread lung surfactant protein/lipid layers, *Colloids Surf., B* 21, 191-205.
- Wüstneck, R., P. Enders, T. Ebisch, R. Miller (1997) Axialsymmetric stress relaxation and surface dilation rheology of docosanic acid monolayers spread at the interface of pendant drops in the short time region, *Thin Solid Films* 298, 39-46.
- Wüstneck, R., P. Enders, N. Wüstneck, U. Pison, R. Miller, D. Vollhardt (1999a) Surface dilational behaviour of spread dipalmitoyl phosphatidyl glycerol monolayers, *PhysChemComm* 11, 9/06516D.

- Wüstneck, R., P. Enders, N. Wüstneck, U. Pison, R. Miller, D. Vollhardt (1999b) Surface dilational behaviour of spread dipalmitoyl phosphatidyl glycerol monolayers, *PhysChemComm* 11.
- Wüstneck, R., N. Wüstneck, D.O. Grigoriev, U. Pison, R. Miller (1999c) Stress relaxation behaviour of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers spread on the surface of a pendant drop, *Colloids Surf., B* 15, 275-288.
- Yan, W., B. Piknova, S.B. Hall (2005) The Collapse of Monolayers Containing Pulmonary Surfactant Phospholipids Is Kinetically Determined, *Biophys. J.* 89, 306-314.
- Yarin, A.L. (2006) DROP IMPACT DYNAMICS: Splashing, Spreading, Receding, Bouncing... *Annu. Rev. Fluid Mech.* 38, 159-192.
- Yuan, C., L.J. Johnston (2002) Phase evolution in cholesterol/DPPC monolayers: atomic force microscopy and near field scanning optical microscopy studies, *J. Microscopy* 205, 136-146.
- Yun, H., Y.-W. Choi, N.J. Kim, D. Sohn (2003) Physicochemical properties of phosphatidylcholine (PC) monolayers with different alkyl chains, at the air/water interface, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24, 377-383.

Anhang

Messparameter der PCS Messungen:

Parameter	Werte
Messwinkel	90°
Refraktionsindex	1,396
Absorption	0,00
Temperatur	25 °C
Analysenmodell	(Multiple narrow mode) Hochauflösend

Marcel Vrânceanu

Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Daten

Geburt: 09.08.1978, Iași / Rumänien
Familienstand: ledig

Studium

10/1997 – 06/2003 Diplom-Chemieingenieur: Technologie der organischen Stoffe
Fakultät für Industrielle Chemie der Technischen Universität Iași, Rumänien
10/2003 – 06/2004 Master: Ökologische Katalyse
Fakultät für Industrielle Chemie der Technischen Universität Iași, Rumänien
10/2003 – 07/2004 Master: Bio-Mechanik von Prothesen
Fakultät für Bioingenieurwesen der "Gr.T. Popa" Universität für Medizin und Pharmazie, Iași, Rumänien

Berufliche Tätigkeit

09/2003 – 04/2005 Lehrassistent in der Abteilung für Chemieingenieurwesen an der Fakultät für Industrielle Chemie der Technischen Universität Iași, Rumänien
05/2005 – 11/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Carl Gustav Carus-Institut der Gesellschaft zur Förderung der Krebstherapie e.V., Niefern-Öschelbronn, Deutschland
11/2008 – 04/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, Universität Karlsruhe (TH), Deutschland
seit 04/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Carl Gustav Carus-Institut der Gesellschaft zur Förderung der Krebstherapie e.V., Niefern-Öschelbronn, Deutschland

Promotion

seit 06/2005 Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Asymmetrische Bilschicht-Bildung durch Zusammenfügen zweier Monoschichten“ am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hermann Nirschl in Zusammenarbeit mit dem Carl Gustav Carus-Institut, Niefern-Öschelbronn, Deutschland