Wechselwirkungen reaktiverSauerstoffspezies mit Lipid-Modellmembranen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von
Andreas Gröning
geboren am 17. Juli1976
in Neubrandenburg

Greifswald, Mai 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Fesser

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christiane A. Helm

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hubert Motschmann

Tag der Promotion: 31.08.2015

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung **1**

II Theoretische Grundlagen **9**

2.1 Freie Radikale 9

2.1.1 Entstehung von Radikalen 9

2.1.2 Chemische Reaktivität von Radikalen 10

2.2 Sauerstoff als Radikal und seine Derivate 11

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies- ROS und seine Quellen 13

2.4 Haem Proteine, Fenton- und Haber- Weiss Reaktion 15

2.5 EDTA freie Radikale Reaktionen 17

2.6 Antioxidantien 18

2.7 Modellmembranen 21

2.8 Chemische Struktur von Phospholipiden 24

2.9 Langmuir- Monoschichten und deren Untersuchungsmethoden 29

2.9.1 Erzeugung monomolekularer Schichten 32

2.9.2 Aufbau und Funktion einer Filmwaage 33

2.9.2.1 Aufnahme der Isothermen 35

2.9.2.2 Charakterisierung der Isothermen 36

2.9.3 Optische Untersuchungsmethoden 39

2.9.3.1 Fluoreszenzmikroskpie von Lipidmonoschichten 42

2.9.3.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM) 46

2.9.4 Röntgentechniken 48

2.9.4.1 Röntgenreflexion 51

2.9.4.2 Röntgendiffraktion 61

2.9.5 IR Spektroskopie 68

2.9.5.1 Infrarot- Reflektions- Absorptions- Spektroskopie (IRAAS) 70

2.9.5.2 IRRAS Messprinzip 73

2.10 Liposomen und deren Untersuchungsmethoden 74

2.10.1 Einteilungen der Vesikel 75

2.10.2 Darstellung und Eigenschaften von Liposomen 75

2.10.3 Untersuchungsmethoden von Liposomen 78

2.10.3.1 dynamischen Differenzkalorimetrie 78

2.10.3.2 Konfokales Rasterkraftmikrokop 80

III Material & Methoden 81

3.1 Lipide 81

3.2 Fentonreaktion allgemein 81

3.3 Langmuir Filmwaage und Fenton Reaktion 82

3.4 Langmuir Filmwaage und Herstellung von Hydroxyl-Radikalen durch die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin 83

3.5 IRRAS 83

3.6 Fluoreszenzmikroskopie 85

3.7 Röntgendiffraktion bei streifendem Einfall (GID- Grazing incidence diffraction) 86

3.8 Röntgenreflektometer – MXR (Mainz X-ray Reflectometer) 90

3.9 Herstellung von Liposomen 91

3.9.1 Elektropräparation 91

3.9.2 Herstellung von Liposomen für DSC 92

3.10 Radikalangriff auf Liposomen mit der Fenton-Reaktion 93

3.11 Radikalangriff auf Liposomen durch die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin 93

IV Radikalangriffe auf zwitterionisch geladene Modellmembranen 94

4.1 Radikalangriffe auf DPPC-Monoschichten 94

4.1.2 Isothermen 94

4.1.2 Fluoreszenzmikroskopie 96

4.1.3 Brewsterwinkel-Mikroskopie 98

4.1.4 IRRAS 99

4.1.5 Röntgendiffraktion bei streifenden Einfall 102

4.1.6 Röntgenreflexion 106

4.1.7 Diskussion 110

4.1.8 Zusammenfassung 113

4.2 Radikalangriff auf eine DPPC Monoschicht mit EDTA im hohen Überschuss 114

4.2.1 Isothermen 114

4.2.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie 116

4.2.3 Diskussion 119

4.2.4 Zusammenfassung 121

4.3 Radikalangriff auf eine DPPC Monoschicht ohne EDTA 122
4.3.1 Isothermen 122
4.3.2 Diskussion 123
4.3.3 Zusammenfassung 124
4.4 Radikalangriffe auf DMPC Liposomen 125
4.4.1 Radikalangriffe auf DMPC Liposomen 125
4.4.1.1 DSC 125
4.4.1.2 Diskussion 129
4.4.1.3 Fluoreszenzmikroskopie 131
4.4.1.4 Diskussion 133
4.4.2 Radikalangriffe auf DMPC Liposomen mit EDTA im hohen Überschuss 135
4.4.2.1 DSC 135
4.4.2.2 Diskussion 137
4.4.3 Zusammenfassung 138

V Radikalangriffe auf negativ geladene Modellmembranen 139
5.1 Isotherme 139
5.2 Diskussion 141
5.3 Zusammenfassung 142

VI Einfluss von Eisen-Ionen auf eine negativ geladene Lipid-Monoschicht am Beispiel von TMCL 143
6.1 Isotherme und Brewsterwinkel-Mikroskopie 143
6.2 Einfluss des pH-Wertes auf den Phasenübergang von TMCL auf einer $Fe(II)SO_4$ Subphase 148
6.2.1 Isotherme und Brewsterwinkel-Mikroskopie 148
6.2.2 Röntgenreflexion 150
6.3 Diskussion 152
6.4 Zusammenfassung 158

VII Einfluss von unbehandeltem und zersetztem Wasserstoffperoxid auf die Phasenumwandlung einer negativ geladenen Monoschicht am Beispiel von TMCL 159
7.1 Isotherme 159
7.2 Röntgenreflexion 161
7.3 Diskussion 162
7.4 Zusammenfassung 164

VIII Radikalangriff auf eine DMPG Monoschicht mit adsorbiertem Polyethylenimin 165

8.1 Isotherme 165

8.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie 170

8.3 Röntgenreflexion 174

8.4 Röntgendiffraktion 182

8.5 Diskussion 189

8.6 Zusammenfassung 194

IX Zusammenfassung der gesamten Arbeit 196

Literaturverzeichnis 200

X Anhang 216

10.1 Radikalangriffe auf Lipidmonoschichten durch die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin 216

10.2 Radikalangriff auf eine DMPA Monoschicht IRRAS-Messungen 221

10.3 Brewsterwinkel-Mikroskopie von TMCL auf einer 1 mmol L^{-1} $CaCl_2$-Lösung 222

10.4 Röntgenreflexion von DMPG mit adsorbiertem PEI 223

Deklaration 224

Wissenschaftliche Beiträge 227

Danksagung 229

Symbolverzeichnis

Symbol	Beschreibung
α_c	kritischer Winkel
α_i	Einfallswinkel
α_f	Ausfallswinkel
α_t	Brechungswinkel
γ_{FL}	Oberflächenspannung Flüssigkeit/Luft
	Oberflächenspannung Wasser/Luft
γ_{WF}	Oberflächenspannung Flüssigkeit/Wasser
Γ	Belegungsdichte
2θ	Streuwinkel
θ	statischer Kontaktwinkel
λ	Wellenlänge
ζ_L	Korrelationslänge
π	Lateraldruck
π_c	Übergangsdruck von der flüssig-expandierten zu flüssig-kondensierten Phase
ρ_f	Elektronendichte des Films
ρ_h	Elektronendichte der Kopfgruppe
ρ_{H_2O}	Elektronendichte von Wasser
ρ_s	Elektronendichte des Substrates
ρ_t	Elektronendichte der Alkylkette
$\rho_{Plättchen}$	Dichte des Wilhelmy-Plättchens
σ	Rauhigkeit zweier Grenzflächen

σ_{RS}	Randspannung
υ_s	symmetrische Streckschwingung
υ_{as}	antisymmetrische Streckschwingung
υ_H	Heizrate
Ψ	Neigungsazimut
A	Gesamtfläche des Langmuir-Films
A_0	Querschnittsfläche von zwei Alkylketten
A_c	Anfang des Koexistenzbereichs beim Phasenübergang flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert
A_K	Fläche eines Keimes
A_m	molekulare Fläche
A_s	Ende des Koexistenzbereichs beim Phasenübergang flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert
b	Breite
c_m	molare Wärmekapazität
D	Durchmesser
d	Dicke
d_p	Eindringtiefe
d_f	Filmdicke
E^θ	Redoxpotential
E_{Ges}	Gesamtelektronenzahl eines Lipid-Moleküls mit Gegenionen und angelagerten Wassermolekülen
ΔF	Differenz der Kräfte F_{WL} und F_{FL}
F_{FL}	Kraft die auf das Wilhelmy-Plättchens wirkt mit Monoschicht
F_{WL}	Kraft die auf das Wilhelmy-Plättchens wirkt bei reinem Wasser
ΔG	freie Enthalpie

G_{hk}	reziproker Gittervektor
ΔH	Umwandlungsenthalpie
h	Eintauchtiefe
h_{beam}	Höhe des Röntgenstrahls
I	Intensität
J	Keimbildungsrate
k_f	ausfallender Wellenvektor
k_i	einfallender Wellenvektor
l	Länge
l_h	Länge der Kopfgruppe
l_t	Länge der Alkylketten
l_{spot}	Länge der bestrahlten Probe
n	Brechungsindex
n_{CH_2}	Anzahl der CH_2-Gruppen einer Alkylkette
N	Anzahl der gespreiteten Moleküle
N_K	Anzahl der Moleküle eines Keims
P	Heizleistung
P_P	Heizleistung der Probe
P_R	Heizleistung der Referenz
q_z	Wellenvektortransfer vertikaler Richtung
q_c	Wellenvektortransfer am kritischen Winkel
$\dot{Q}$	Wärmestrom
Q	Wärme
r	Radius
r^*	kritischer Keimradius
R	Reflektivität
R_p	p-polarisierte Reflektivität

R_s	s-polarisierte Reflektivität
R_F	Fresnel Reflektivität
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_a	Neigungswinkel der Alkylketten, engl.: *tilt angle*
T	Temperatur
T_p	Phasenübergangstemperatur für die Vorumwandlung
T_m	Phasenübergangstemperatur für die Hauptumwandlung
$T_{1/2}$	Halbwertsbreite
V	gespreitetes Volumen
V_{Ges}	Gesamtvolumen eines Lipid-Moleküls mit Gegenionen und Wasseranlagerung
w_{beam}	Breite des Röntgenstrahls
w_S	Breite des vom Detektor erfassten Streifens

Konstantenverzeichnis

D	$7{,}19 \times 10^{-10}$	m^2/s	Diffusionskoeffizient für ½ Fe^{2+} bei 25 °C
k_B	$1{,}381 \times 10^{-23}$	$J\ K^{-1}$	Boltzmann-Konstante
N_a	$6{,}022 \times 10^{23}$	mol^{-1}	Avogadro Konstante

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskop, engl.: *atomic force microscopy*
ATR	abgeschwächte Totalreflexion, engl.::a*ttenuated total reflectance*
BAM	Brewsterwinkel-Mikroskopie, engl.: *brewster angle microscopie*
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie, engl.: *differential scanning calorimetry*
DMPA	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)
DMPC	1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt)
DPPC	1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GID	Röntgendiffraktometrie mit streifendem Einfall, engl.: *grazing incidence diffraction*
GUV	riesige unilamellare Vesikel, engl.: *giant unilamellar vesicle*
IRRAS	Infrarot-Reflexion-Absorption-Spektroskopie
ITO	Indiumzinnoxid, engl.: *indium tin oxid*
LUV	große unilamellare Vesikel, engl.: *large unilamellar vesicle*
MXR	Mainz X-ray Reflectometer
NBD PC	1-palmitoyl-2-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-dodecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
NBD PE	1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-dodecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine
PA	Phosphatidylsäuren
PE	Phosphatidylethanolamine
PEEK	Polyetheretherketon
PC	Phosphatidylcholine

PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie, engl.: *photon correlation spectroscopy*
PM-IRRAS	Polarisation-Modulations (PM) Infrarot-Reflexion-Absorption-Spektroskopie
PSD	positionsempfindicher Detektor, engl.: *position sensitiv detector*
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage, engl.: *quartz crystal microbalance*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl.: *reactiv oxygen species*
SLB	gestützte Doppelschicht, engl.: *supported lipid bilayer*
SUV	kleine unilamellare Vesikel, engl.: *small unilamellar vesicle*
TMCL	tetramyristoyl cardiolipin (sodium salt)
UV	unilamellare Vesikel, engl.: *unilamellar vesicle*

I Einleitung

Vor etwa 3 Milliarden Jahren bildeten oxygen photosynthetisch aktive Cyanobakterien Tonnen von Sauerstoff. [Schirrmeister 2013] Die Sauerstoffkonzentration der Atmosphäre blieb anfangs jedoch gering, weil der gebildete Sauerstoff unmittelbar zur Oxidation von Eisen(II)-Ionen und Schwefelwasserstoff in den Ozeanen verbraucht wurde. [Hart 1978, Holland 2006] Der Sauerstoff konnte erst vor etwa 2 Milliarden Jahren in die Atmosphäre entweichen, als die mit Sauerstoff reagierenden Stoffe knapp wurden. [Junge 1981]

Seitdem konnten sich Organismen mit einem oxidativen Energiestoffwechsel entwickeln. Dieser Stoffwechsel, bei dem Sauerstoff als Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette fungiert, ist mit einer sehr hohen Energieeffizienz verbunden. Der Anstieg der O_2-Konzentration in der Atmosphäre ermöglichte ebenfalls die Entstehung einer Ozonschicht in einer Höhe zwischen 15 und 50 Kilometern. Ein großer Anteil der von der Sonne emittierten Strahlung wird in der Ozonschicht absorbiert und gestreut, bevor es die Erdoberfläche erreicht. Dazu gehören die Strahlung des UV-C Bereiches ($\lambda \leq$ 280 nm) sowie rund 90% des UV-B Anteils (λ = 280-320 nm). Ohne diese Schutzschicht wären viele heutige Lebensformen auf dem Land nicht möglich, da die UV-Strahlung in hohen Dosen zu Veränderungen der DNS führt. [Moriwaki 1996, de Gruijl 2001, Kanao 2015]

Umso paradoxer erscheint es, dass das Molekül des aeroben Lebens, der Sauerstoff, unter bestimmten Bedingungen dem Organismus Schaden zufügt. Es ist aber nicht der Sauerstoff selbst, sondern vielmehr Stoffwechselprodukte des Sauerstoffs, die durch biologische Oxidation im Intermediärstoffwechsel entstehen. Der molekulare Sauerstoff ist das eigentliche biologische Oxidationsmittel, der dabei zu Wasser reduziert wird. Bei diesem Prozess werden formal $4e^-$ auf O_2 übertragen. Da es unmöglich ist $4e^-$ auf einmal zu übertragen, vollzieht sich dieser Prozess über vier Einelektronen-Schritte. Die Zwischenprodukte dieses Prozesses werden als Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet. In der Literatur wird dafür häufig und fälschlicherweise der Begriff freie Sauerstoff-Radikale benutzt. (Nicht alle ROS sind Radikale.) Diese ROS besitzen oxidative Eigenschaften und sind sehr reaktiv, wodurch viele wichtige Biomoleküle wie z.B. Lipide, Proteine, Nukleotide beschädigt werden können. Dies kann zur Inaktivierung von Proteinen und Enzymen führen, zu Bruchstellen und Mutationen der

Desoxyribonukleinsäure (DNS), zur Induktion einer Lipidperoxidation der Lipoproteine oder der Zellmembran. [Halliwell 2007] Zum Schutz vor den Schadwirkungen der ROS verfügt der Organismus über eine Mehrzahl von Abwehrfunktionen, die die Bildung von ROS sowie deren Abbau regulieren. Dazu gehören z.B. Enzyme und Antioxidantien.

Im Gegensatz dazu, spielen die vom Organismus gebildeten ROS aber auch eine wichtige Rolle bei der natürlichen Immunabwehr und dienen als Signalmoleküle. [Barrett 1999, Knight 2000, McCord 2000]

Übersteigt die Bildung der ROS jedoch eine „gesunde“ Konzentration spricht man vom oxidativen Stress, der damit die Grundlage für die Sauerstofftoxizität bildet. Zahlreiche Studien zeigen eine enge Korrelation zwischen ROS und dem Auftreten von über 150 unterschiedlichen Krankheiten, angefangen von rheumatoide Arthritis [Sweeney 2004], Mukoviszidose [Domingues 2013], Atherosklerose [Harrison 2003] bis hin zu Diabetes mellitus [Oberley 1988, Wolff 1993], Aids [Pace 1995], Krebs [Pelicano 2004], Parkinson [Olanow 1990, Adams Jr 1991] und Multiple Sklerose [Gilgun-Sherki 2005, Lassmann 2007]. Es sei jedoch angemerkt, dass der oxidative Stress nur die Konsequenz und nicht die Ursache ist. Um den Zusammenhang von ROS und den Krankheiten besser zu verstehen, ist in den letzten Jahrzehnten ein großer Forschungsbereich entstanden. Viel Aufmerksamkeit wurde in der Biochemie der Sauerstoffaktivierung [Hamdane 2008] und den aktivierten Sauerstoffspezien, deren Quellen und Rollen in biochemischen Zyklen [Elstner 1982, Andreyev 2005] sowie den antioxidativen Mechanismen und Strategien geschenkt [Bilici 2001, Gosslau 2002]. Die Interaktionen von ROS mit Zellmembranen und die daraus entstehenden biophysikalischen Folgen sind teilweise unbekannt. Dabei ist die Zellmembran ein wesentliches Merkmal von Lebewesen. Diese trennen einzelne Zellbestandteile voneinander sowie die Zelle selbst von der Umgebung ab. Somit können die Unterschiede zwischen intra- und extrazellulärem Milieu aufrechterhalten werden.

Die Zellmembranen sind gekennzeichnet durch mechanische Eigenschaften, die einen gewissen Energieaufwand benötigen, um sie aus dem Gleichgewichtszustand zu bringen. Die Elastizität der Membran hängt stark von der Zusammensetzung der Membran und der Selbstorganisation der verschiedenen Bestandteile ab. Der Hauptbestandteil einer Zellmembran sind Lipide. Diese Moleküle bestehen aus hydrophoben Alkylketten und einer hydrophilen Kopfgruppe. Werden ROS erzeugt, ist die Membran oft das erste Hindernis mit dem sie wechselwirken bzw. reagieren.

Führt dies zu Veränderungen von chemischen und mechanischen Eigenschaften der Membran, so hat dies weitreichende Folgen für die Funktion einzelner Bestandteile sowie für die Zelle selbst. Wie diese Vorgänge im Detail ablaufen ist unbekannt. Daher ist es sehr interessant, die Auswirkungen von ROS auf die Membran zu studieren.
Der Einzige in der Literatur ausführlich beschriebene Prozess, der eine Reaktion von ROS mit den Lipiden einer Membran beschreibt ist die Lipidperoxidation von ungesättigten Alkylketten. Diese führt zu Abnahme der Membranfluidität, zur Zerstörung von Membranproteinen, Inaktivierung von Enzymen und Ionenkanälen sowie zur Zunahme der Durchlässigkeit für Substanzen, die normalerweise nicht die Membran durchqueren können. [Halliwell 2007] Aber auch in diesem gut verstandenen oxidativen zellulären Prozess sind noch viele Fragen offen. So gibt es keine Beweise dafür, was die Lipidperoxidation initiiert. In der Literatur wird meistens das Hydroxyl-Radikal genannt. Dagegen spricht jedoch, dass das Hydroxyl-Radikal den Allylwasserstoff selektiv abstrahieren muss. Aufgrund des hohen Oxidationspotential und der extrem kurzen Lebensdauer (10^{-9} s) ist dies nur möglich, wenn das Hydroxyl-Radikal direkt am Allylwasserstoff gebildet wird. Das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid und Metall-Ionen, die als Katalysator dienen ist Voraussetzung hierfür. Die unbeabsichtigte Zersetzung von Wasserstoffperoxid in transmembrane Metallenzyme (z.B. Cytochrom Oxidase) wäre eine Möglichkeit für die Entstehung. Das Vorhandensein von Lipidperoxiden und deren Zersetzung durch Eisen-Ionen wäre eine andere Möglichkeit die Kettenreaktion einzuleiten.
Wird das Hydroxyl-Radikal außerhalb der Membran gebildet, hat es aufgrund der extrem kurzen Lebensdauer keine Chance bis zur Allylgruppe zu diffundieren. Es wird höchstwahrscheinlich mit der Kopfgruppe bzw. mit dem Anfang der Alkylkette reagieren.

Welche Wechselwirkungen zwischen ROS mit dem Grundgerüst der Zellmembran, den Lipiden, auftreten wenn sie außerhalb der Membran gebildet werden und welche chemischen und damit physikalischen Eigenschaften der Membran sich dadurch verändern, sollen in dieser Arbeit mit biophysikalischen Untersuchungsmethoden erforscht werden.

Natürliche Zellmembranen sind hoch komplexe Systeme, in und an denen chemische und strukturelle Prozesse häufig gleichzeitig ablaufen. Daher ist es unabdingbar die Zellmembran auf das Notwendigste zu reduzieren, um bestimmte Wechselwirkungen bzw. Einflussfaktoren auf Zellmembraneigenschaften auf molekularen Level untersuchen zu können. Dafür haben sich Modellmembranen etabliert, wie Liposomen mit einer Lipiddoppelschicht, die den lebenden Zellen in Bezug auf ihre äußere Hülle der Zellmembran sehr nahe kommen, oder Lipidmonoschichten an einer Wasser/Luft-Grenzfläche, quasi die Hälfte einer Zellmembran.
Die Lipidmonoschichten werden oft genutzt um Anordnungen, Phasen und Phasenübergänge oder viskoelastische Eigenschaften von verschiedenen Membranen zu untersuchen. Die Anordnung der Lipide in der Membran wird durch die Geometrie der Moleküle bestimmt. Eine Veränderung der Molekülform ist besonders gut erkennbar in der flüssig-kondensierten Phase, wenn die Moleküle lateral komprimiert sind und die Alkylketten all-trans Konformation aufweisen. [Möhwald 1993, Kaganer 1999] Die kristallographische Struktur der Alkylketten hängt dann hauptsächlich von deren Länge und von der Kopfgruppe ab. [Baltes 1996]

Im ersten Teil dieser Arbeit dienen Lipidmonoschichten und unilamellare Liposomen als Modellmembranen. Die Modellmembran besteht aus den zwitterionisch geladenen Phosphatidylcholinen (PC), die ein Hauptbestandteil von biologischen Membranen ausmacht. [Christie 2010] Die gute Charakterisierung der flüssig-expandierten und flüssig-kondensierten Phase auf thermodynamischen und molekularen Level ist ein weiterer Grund für die Wahl von Phosphocholine. [Möhwald 1993]
Diese haben eine relativ große Kopfgruppe im Vergleich zu Phosphatidylethanolaminen (PE) oder Phosphatidylsäuren (PA). Die Auswirkungen der großen Kopfgruppe spiegeln sich in dem Neigungswinkel der Alkylketten in der flüssig-kondensierten Phase wieder. Der Neigungswinkel ergibt sich aus $\frac{A_0}{A} = \cos t_a$ unter der Annahme einer konstanten Dichte der hydrophoben Region. A_0 ist der Querschnitt von zwei Alkylketten in der flüssig-kondensierten Phase. Dieser beträgt 40,4 $Å^2$ bei einem Neigungswinkel von $t_a = 0$. A ist die molekulare Fläche aus der Isotherme. Der Neigungswinkel der Alkylketten von PC beträgt in der flüssig-kondensierten Phase ca. 30° hinsichtlich der Membran Normalen.

Die Alkylketten von PE und PA stehen hingegen senkrecht. [Cevc 1987] Chemisch betrachtet unterscheidet sich PC von PE durch drei Methylgruppen, die an das Stickstoffatom der Kopfgruppe gebunden sind. Eine Verkleinerung der Kopfgruppe, durch Abtrennen einer oder zwei Methylgruppen, ist durch Abnahme des Neigungswinkels in der flüssig-kondensierten Phase beweisbar. [Dyck 2005]
Auf thermodynamischer Ebene führt die große Kopfgruppe von PC zu lateralen intermolekularen sterischen Abstoßungen, die bei der Phasenumwandlung von flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert überwunden werden müssen. Daher müssen PC Monoschichten, im Vergleich zu PE- bzw. PA-Monoschichten, zu höheren Übergangsdrücken komprimiert werden, um einen Phasenübergang durch Kompression hervorzurufen (Voraussetzung: gleiche Anzahl an C-Atomen in der Alkylkette). [Cevc 1987] Im Fall von Vesikeln liegt die Phasenumwandlungstemperatur von PE und PA dementsprechend höher als von PC.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die Wechselwirkung von ROS mit negativ geladenen Phospholipiden untersucht werden. Eine Lipidmonoschicht dient als Modellmembran. Aufgrund der hohen biologischen Relevanz wird Phosphatidylglycerin (PG) und Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin, CL) sowie Phosphatidylsäuren (PA) verwendet. Der PG Anteil des Surfactant (alveolische Grenzflächensubstanz) ist mit 10-25 Gew.% relativ hoch und ist neben den Phosphocholinen der Hauptbestandteil. [Garidel 2005] Cardiolipine sind in der Zellmembran von vielen gram-negativen und gram-positiven Bakterien zu finden. Sie sind ebenfalls Hauptbestantteil der inneren Membran von Mitochondrien. [Daum 1985, O'leary 1988, Wilkinson 1988, Lewis 2007] Die Cardiolipine sind notwendig für die Stabilisierung und Aktivierung von verschiedenen Enzymen und gewährleisten somit eine optimale Funktion des mitochondrialen Energiestoffwechsels. Ebenfalls wird den Cardiolipinen eine wichtige regulatorische Rolle der Cytochrome C Freisetzung zugesprochen [Ostrander 2001, Ott 2002], wodurch die Apoptose eingeleitet wird. [McMillin 2002, Chicco 2007]
In der mitochondrialen Atmungskette wird eine Hauptmenge der ROS vor allem das Superoxid-Radikal $O_2^{-\bullet}$ und Wasserstoffperoxid H_2O_2 produziert. Bei Anwesenheit von Eisen wird das hochreaktive Hydroxyl-Radikal gebildet. Kommt es zu chemischen Wechselwirkungen zwischen den ROS und den Lipiden, die eine Veränderung der Molekülstruktur der Lipide bewirken, führt dies zu mitochchondrialen Fehlfunktionen. [Lewis 2009] Es ist deshalb von hohem Interesse, welche chemischen Veränderungen

bei den Lipiden auftreten und welche physikalischen Eigenschaften sich dadurch verändern. DMPG, DMPA und TMCL sind im Vergleich zu den zwitterionisch geladenen Phosphocholinen negativ geladen und haben eine kleinere Kopfgruppe. Aufgrund der kleineren Kopfgruppe beträgt der Neigungswinkel der Alkylketten von DMPG in der festen Phase ca. 10° hinsichtlich der Membran Normalen. Die Alkylketten von DMPA und TMCL stehen sogar senkrecht. Eine Verkleinerung der Kopfgruppe, wäre durch Abnahme des Neigungswinkels in der kondensierten Phase somit nur bei DMPG beweisbar.
Auf thermodynamischer Ebene führt die negative Ladung zu lateralen intermolekularen elektrostatischen Abstoßungen, die bei der Phasenumwandlung von flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert überwunden werden müssen. Eine Verringerung der Ladungsdichte der Monoschicht durch den Radikalangriff würde zur Verringerung der elektrostatischen Abstoßungen führen. Dies hätte einen kondensierenden Effekt der Monoschicht zu Folge.

Im dritten Teil dieser Arbeit wird die Wechselwirkung von TMCL mit Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen sind notwendig für die Erzeugung von Hydroxyl-Radikalen via. Fenton-Reaktion.
TMCL hat eine dissozierbare Kopfgruppe. Wird der pH-Wert oder die Konzentration der mono- und divalenten Kationen der Subphase verändert, ändern sich der Dissoziationgrad der Kopfgruppe und dadurch die Ladungsdichte der Monoschicht. [Lewis 2009] Dies hat wiederum Auswirkungen auf den Phasenübergang. Je höher die Ladung der Kationen, desto stärker ist die Bindung zwischen dem negativ geladenen Lipid und dem Kation. Bei zweiwertigen oder höherwertigen Kationen spricht man von einer spezifischen Bindung. Das Kation bindet an die negativ geladene Kopfgruppe. Dadurch wird die elektrostatische Abstoßung abgeschirmt und es kommt zu einem kondensierenden Effekt, d.h. der Phasenübergangsdruck nimmt ab. Bei Vesikeln nimmt die Phasenübergangstemperatur entsprechend zu. [Garidel 1999, Garidel 2005, Lewis 2009] Die Veränderung der Elektrostatik hat auch einen Einfluss auf die Domänenform. [Lösche 1985, Möhwald 1990] Es existieren zahlreiche Studien über die Wechselwirkung von negativ geladenen Monoschichten und Liposomen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen von mehrwertigen Kationen in der Subphase, vor allem mit Co^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ba^{2+}. [Rainier 1979, Lösche 1985, Bu 2008, Lewis 2009] Studien über den Einfluss von Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen auf negativ

geladene Lipide sind hingegen rar. Auf dem Gebiet der Biomineralisierung untersuchen einige Studien das Wachstum von Nanopartikeln und deren Wechselwirkung mit den Lipiden oder dem Wachstum von ultradünnen homogenen Fe-Schichten [Brugger 1999, Sarkar 2010]. Die verwendeten Fe-Konzentrationen sind jedoch relativ hoch und liegen im millimolaren Bereich. Informationen über die Wechselwirkung von TMCL mit Fe bei sehr geringen Konzentrationen sind kaum vorhanden. Um die chemischen und physikalischen Veränderungen und ihre Auswirkungen nach einem Radikal-Angriff zu charakterisieren, ist es notwendig mögliche Veränderungen durch die Wechselwirkung von Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen mit TMCL zu kennen.

Im vierten Teil dieser Arbeit, soll die Wechselwirkung von ROS mit einer negativ geladenen Monoschicht (DMPG) mit adsorbiertem Polymer (PEI) untersucht werden. Auf dem Gebiet der Drug-Delivery-Forschung werden an Liposomen Polymere adsorbiert. Dadurch kann die Zirkulationszeit in vivo verlängert werden. Viele Liposomen werden durch das mononukleär-phagozytierende System (MPS) aus dem Blutkreislauf abgefangen und durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zerstört. [Immordino 2006] Die chemischen und physikalischen Veränderungen der adsorbierten Polymerschicht sowie des Lipides aufgrund des Radikalangriffs soll untersucht werden. Als Polymer wurde PEI gewählt, da es sehr flach auf geladenen Oberflächen adsorbiert.[Pericet-Camara 2006] Die Modellmembran erhält somit eine hohe positiv geladene Ladungsdichte. Für die Gen-Therapie werden solche positiv geladene Systeme z.B. Liposomen aus Lipopolyamine für DNS und RNS „Delivery-Systeme“ untersucht. [Sugiyama 2004, Schäfer 2010]
Weiterhin sollen die herausgefundenen Ergebnisse mit denen von Berg et. all (2013) verglichen werden. Danach wird die Oberflächenladungsdichte als auch das Oberflächenpotential durch die Wechselwirkung mit ROS um einen Faktor von 0,5 reduziert. Dies weist auf eine Änderung der chemischen Zusammensetzung der PEI-Oberfläche hin. Die Abspaltung der positiv geladenen Gruppen wäre eine Erklärung. [Berg 2013]

Bei allen Experimenten werden die thermodynamischen Daten bei Lipidmonoschichten anhand von Isothermen, bei Liposomen mithilfe von Thermogrammen aufgezeichnet. Veränderungen von lateral periodischen Strukturen der Phospholipide, durch die Wechselwirkung von ROS, werden mit einer Filmwaage in Kombination mit

Röntgendiffraktion untersucht. Elektronendichteprofile senkrecht zur Wasseroberfläche werden mit Röntgenreflexion gemessen.
Der Koexistenzbereich der flüssig-expandierten und flüssig-kondensierten Phase wird mit Fluoreszenzmikroskopie bzw. Brewsterwinkel-Mikroskopie aufgenommen, um die Auswirkungen der ROS auf die Phasenumwandlung und damit auf das Domänenwachstum zu visualisieren. Mögliche Veränderungen der molekularen Zusammensetzung werden mit Infrarot-Reflexion-Absorption-Spektroskopie (IRRAS) untersucht.

Die Hydroxyl-Radikale werden mit der Fenton-Reaktion erzeugt. Dies hat zwei Gründe:
1. Die Fenton-Reaktion stellt eine Schlüsselreaktion der Sauerstofftoxizität dar, da die Hydroxyl-Radikale, die dabei entstehen, hochreaktiv sind und im biologischen System überall gebildet werden, wo Wasserstoffperoxid und Eisen vorhanden sind.
2. Die Fenton-Reaktion verläuft in der Lösung homogen ab und ist sehr gut reproduzierbar.

Um stabile Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Komplexe zu bilden und somit ein Ausfallen von Fe^{3+} zu verhindern wird EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) verwendet. Die Einflüsse und Auswirkungen von unterschiedlichen EDTA/Fe^{2+} -Verhältnissen bei der Erzeugung von Hydroxyl-Radikalen werden ebenfalls untersucht.

In allen Experimenten wird bewusst auf einen Puffer verzichtet. Dies hat zwei Gründe:

1. Einige Puffer sind oberflächenaktiv, wodurch sie einen Einfluss auf den Phasenübergang haben bzw. ihn völlig unterdrücken können.
2. Jede zusätzliche Substanz in der Flüssigkeit würde ein Radikalfänger für die Hydroxyl-Radikale darstellen und somit das Ergebnis beeinflussen.

II Theoretische Grundlagen

2.1 Freie Radikale

Elektronen besetzen so genannte Orbitale. Diese beschreiben geometrische Räume, in denen sich die Elektronen mit großer Wahrscheinlichkeit aufhalten. Ein Orbital kann mit zwei Elektronen mit entgegengesetztem Spin besetzt werden. Befindet sich nur ein Elektron in einem Orbital ist dies ein energetisch ungünstiger Zustand. Daher sind Atome und Moleküle bestrebt ihre Orbitale mit je zwei Elektronen zu füllen. Bleibt dennoch ein Elektron ungepaart, spricht man von einem Radikal. Borg (1993) S. 13 definiert freie Radikale folgenderweise: „a free radical is a distinct molecular species in which an unpaired valence electron of an atomic constituent does not contribute to the bonding within the molecule and is, in that sense free“. [Borg 1993] Das einfachste Radikal ist das Wasserstoffatom; ${}^{1}_{1}H$. Sind zwei ungepaarte Elektronen vorhanden werden diese als Biradikale, solche mit drei ungepaarten Elektronen als Triradikale bezeichnet.

2.1.1 Entstehung von Radikalen

Radikale können prinzipiell auf drei Arten entstehen:

a) durch Homolyse, d.h. dass die Bindung eines Moleküls z.B. durch Wärme oder durch Einwirkung von hochenergetischer Strahlung symmetrisch gespalten wird. Dabei entstehen aus einem Molekül zwei Radikale (Gleichung II-1).

$$A{:}B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet} \qquad \textbf{(II-1)}$$

b) Weiterhin können Radikale durch Ein-Elektronenübertragung entstehen, wenn ein Nicht- Radikal mit ausschließlich „gepaarten“ Elektronen ein Elektron verliert (Gleichung II-2) oder ein einzelnes Elektron aufnimmt (Gleichung II-3).

$$X \rightarrow e^- + X^{+\bullet} \quad \textbf{(II-2)}$$

$$X + e^- \rightarrow X^{-\bullet} \quad \textbf{(II-3)}$$

c) Außerdem können Radikale durch Reaktionen mit anderen Radikalen entstehen.

$$A^\bullet + B \rightarrow A + B^\bullet \quad \textbf{(II-4)}$$

2.1.2 Chemische Reaktivität von Radikalen

Aufgrund des ungepaarten Elektrons bzw. der ungepaarten Elektronen sind Radikale bestrebt ihren instabilen Zustand auszugleichen. Dadurch sind sie in den meisten Fällen sehr reaktiv wie z.B. das hochreaktive Hydroxyl-Radikal. Es existieren aber auch Radikale die relativ stabil sind und dadurch eine geringe Reaktivität aufweisen. Beispiele sind die Stickstoffoxide NO, NO_2 und der molekulare Sauerstoff O_2. Die Stabilität der Radikale wird durch elektronische sowie durch sterische Effekte bewirkt z.B. durch Hyperkonjugation und Mesomerie.

Wie reaktiv die Radikale sind, ob sie reduzierend oder oxidierend sind hängt immer vom Reaktionspartner ab und kann durch den Vergleich des Reduktions- bzw. des Oxidationspotentials siehe Tabelle II-1 bestimmt werden. Die Halbwertszeiten zeigen ebenfalls wie reaktiv die Radikale sind. Beispiele sind in Tabelle II-2 aufgeführt.

Tabelle II-1 Reduktionspotentiale von einigen relevanten ROS und Antioxidantien; entnommen aus [Cadenas 1995]

Radikale		E^θ/V
Hydroxyl-Radikal	$HO^\bullet$	+2,18
Alkoxyl-Radikal	$RO^\bullet$	+1,60
Hydroperoxyl-Radikal	$HO^\bullet_2$	+1,06
Peroxyl-Radikal	$ROO^\bullet$	+1,00
Glutathion-Radikal	$GS^\bullet$	+0,85
Harnsäure-Radikal	$U^\bullet$	+0,52
α-Tocopherol-Radikal	$\alpha\text{-}TO^\bullet$	+0,48
Ascorbate-Radikal	$A^{\bullet-}$	+0,28

Tabelle II-2 Geschätzte Halbwertszeit reaktiver Sauerstoffspezies [Pryor 1986]

Reaktive Sauerstoffspezies	$t_{1/2}$
Hydroxyl-Radikal ($HO^{\bullet}$)	10^{-9} s
Alkyl-Radikal ($L^{\bullet}$)	10^{-8} s
Alkoxyl-Radikal ($RO^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$)	10^{-6} s
Peroxyl-Radikal ($ROO^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$)	7 s
Singulett Sauerstoff ($^1O_2$)	10^{-8} s

2.2 Sauerstoff als Radikal und seine Derivate

Der molekulare Sauerstoff ist im Grundzustand (Triplett O_2) nach der oben genannten Definition ebenfalls ein Radikal, welches jedoch nicht so stark reaktionsfähig ist wie andere Radikale. Sauerstoff kann auch in anderen Formen vorliegen, die stärker reaktiv sind (siehe Abb. II-1). Dazu muss der Triplett-Sauerstoff so angeregt werden, dass ein Wechsel der Elektronenkonfiguration in der 2p-Schale stattfindet. Dies kann durch physikalische Prozesse – durch Energieübertragung in Form von Photonen erfolgen, wodurch der so genannte Singulett- Sauerstoff entsteht oder durch eine chemische bzw. enzymatische Aufnahme eines oder mehrerer zusätzlichen Elektronen in das antibindende π*- Molekülorbital, wobei das Superoxid-Radikal oder das Peroxidion entstehen kann.

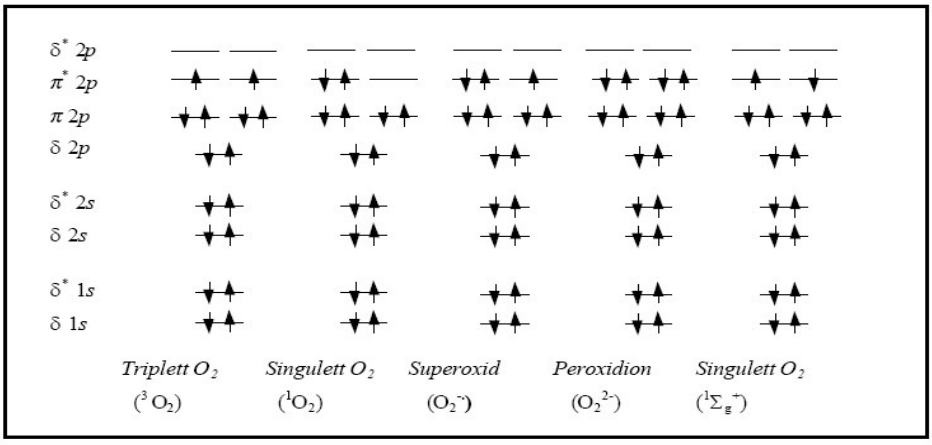


Abb. 2.1 Bindungszustände im Sauerstoffmolekül [Elstner 1990]

Das Superoxid-Radikal entsteht durch Aufnahme eines Elektrons (Gleichung II-4) und das Peroxidion durch Aufnahme zweier Elektronen (Gleichung II-5). Das Peroxidion ist durch die Aufnahme zweier Elektronen, wie man es auch in der Abb. 2.1 erkennen kann, kein Radikal.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{-\bullet}$ **(II-4)**

$O_2 + 2e^- \rightarrow O_2^{2-}$ **(II-5)**

In biologischen Systemen entsteht aus der Zwei-Elektronenreduktion des Sauerstoffs durch Protonierung Wasserstoffperoxid (Gleichung II-6). Wird auf Wasserstoffperoxid noch ein Elektron übertragen entsteht das hoch reaktive Hydroxyl-Radikal, welches wiederum durch Ein-Elektronenübertragung reduziert und weiter zu Wasser protoniert werden kann.

Daraus ergibt sich biochemisch gesehen die wichtigste Reaktion von Sauerstoff - die Reduktion zu Wasser durch die Aufnahme von vier Elektronen (Gleichung II-9 und Abbildung 2.2).

$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (protonierte Form von O_2^{2-}) **(II-6)**

$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO^\bullet + H_2O$ **(II-7)**

$HO^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$ **(II-8)**

$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ (protonierte Form von O^{2-}) **(II-9)**

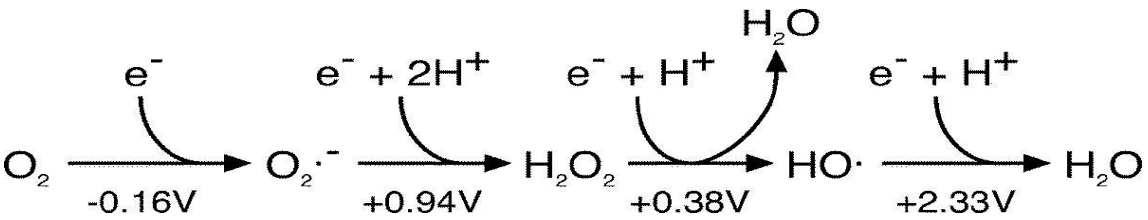


Abb. 2.2 Reduktion von molekularen Sauerstoff zu Wasser. [Imlay 2003]

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies- ROS und seine Quellen

Die oben genannten Sauerstoffderivate wie Singulett-Sauerstoff und die bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte: Superoxid-Radikal ($O_2^{-\bullet}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), und Hydroxyl-Radikale ($HO^{\bullet}$) gehören zu der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies – ROS[1].

Dieser Begriff umfasst alle reaktiven Sauerstoffabkömmlinge und wird daher häufig von Wissenschaftlern als Sammelbegriff benutzt. Dabei kann man zwischen radikalischen und nicht-radikalischen ROS unterscheiden (siehe Tabelle II-2).

Tabelle II-3 Reaktive Sauerstoff- Spezies [Halliwell 1999]

Radikalische Sauerstoff-Spezies	Nicht-radikalische Sauerstoff-Spezies
Superoxid-Radikal, $O_2^{-\bullet}$	Wasserstoffperoxid, H_2O_2
Hydroxyl-Radikal, $HO^{\bullet}$	Hyperchlorige Säure, HOCl
Peroxyl-Radikal $ROO^{\bullet}$	Ozon, O_3
Alkoxyl-Radikal $RO^{\bullet}$	Singulett-Sauerstoff, $^1O_2$
Hydroperoxyl-Radikal $HO^{\bullet}_2$	Peroxynitrit, $ONNOO^-$

Die ROS können durch physikalische und chemische Vorgänge in der Umwelt, aber auch bei allen physiologischen und pathophysiologischen Stoffwechselprozessen im Organismus bei denen Sauerstoff beteiligt ist, gebildet werden. Dadurch ergeben sich zahlreiche Quellen für die Entstehung der ROS in aeroben Organismen, welche im folgenden Teil kurz dargestellt werden.

Die Hauptmenge der ROS, vor allem das Superoxid-Radikal $O_2^{-\bullet}$ und Wasserstoffperoxid H_2O_2, werden im menschlichen Körper durch die mitochondriale Atmungskette und durch das Immunsystem produziert.

[1]Neben der Bezeichnung ROS (engl. reactive oxygen species) existieren auch noch andere Bezeichnungen wie z.B. ROM (engl. reactive oxygen metabolites) oder AO aktivierter Sauerstoff (AO, engl. activated oxygen) bzw. oxygen- derived species und oxidants. (Halliwell and Gutteridge 1999)

In den Mitochondrien werden normalerweise $4e^-$ auf ein Sauerstoffmolekül über die Elektronentransportkette übertragen (siehe Gleichung II-9) wobei zwei Wassermoleküle entstehen. Man hat jedoch herausgefunden, dass innerhalb der Atmungskette einige Elektronen entweichen und direkt auf O_2 übertragen werden. Dieser Vorgang findet vor allem im Komplex I (NADH Dehydrogenase) und im Komplex III (Cytochrom c Reduktase) statt. [Chen 2003] Man nimmt an, dass so etwa 1-3 Prozent des in den Mitochondrien verbrauchten Sauerstoffs mit nur einem Elektron reduziert werden. [Wei 1998, Halliwell 1999] Das Immunsystem produziert ebenfalls eine große Menge an ROS. Dies geschieht vor allem durch die Phagocyten[2] die reaktive Sauerstoffspezies ($O_2^{-\bullet}$, H_2O_2, aber auch $HO^\bullet$, und $^1O_2$) produzieren. Die radikalischen Reaktionen mit den bakteriellen Proteinen führen zusammen mit der Einwirkung anderer toxischer Substanzen und Enzyme, wie Proteasen zum Absterben der eingedrungenen Mikroorganismen.

Weitere bekannte interne Quellen bei denen die ROS entstehen sind:

- der Cytochrom P450- Metabolismus,
- Autooxidationsreaktionen,
- Fenton- Haber-Weiss Reaktion,
- Enzyme (Oxidasen wie z.B. Monoaminooxidase, Xanthinoxidase, L-Aminooxidase, Tyrosinhydrolase, Flavinoxidase und
- der Arachidonsäure-Metabolismus (Cyclooxygenasen).

Die Fenton- und Haber- Weiss Reaktion wird in dieser Arbeit hauptsächlich genutzt, um Radikale in vito zu erzeugen. Daher wird an dieser Stelle darauf näher eingegangen.

[2] Dazu zählen neutrophile und eosinophile Leukozyten und die mononuclearen Phagocyten

2.4 Haem Proteine, Fenton- und Haber- Weiss Reaktion

Die Übergangsmetalle, vor allem die Eisen- und Kupferionen spielen bei der Radikalentstehung eine bedeutende Rolle. So ist das Fe^{2+}-Ion für die Bindung von O_2 im Hämoglobin und Myoglobin essentiell. Durch Elektronen- Delokalisation entsteht eine intermediäre Bindung - zum einen zwischen Fe^{2+} und O_2 zum anderen zwischen Fe^{3+} und $O_2^{-\bullet}$ (Gleichung II-13). Gelegentlich zerfällt das Sauerstoffhämoglobin und $O_2^{-\bullet}$ wird abgegeben, wodurch Metahämoglobin (ein Fe^{3+}-Protein) entsteht, welches O_2 nicht mehr binden kann und damit biologisch inaktiv ist. Es wird geschätzt, dass 3% des Hämoglobins in den menschlichen Erythrocyten auf diese Art zerfällt und somit ständig $O_2^{-\bullet}$ produziert wird. [Halliwell 1999]

$$\text{haem-}Fe^{2+}\text{-}O_2 \longleftrightarrow \text{haem-}Fe^{3+}\text{-}O_2^{-\bullet} \qquad \textbf{(II-13)}$$

$$\text{haem-}Fe^{2+}\text{-}O_2 \longleftrightarrow \text{haem-}Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \qquad \textbf{(II-14)}$$

Weiterhin können Metallproteine die Produktion von $HO^{\bullet}$ aus H_2O_2 beschleunigen. Ist Fe^{2+} an einer solchen Reaktion beteiligt wird sie als Fenton-Reaktion bezeichnet. Aber auch mit anderen Metallionen wie z.B. Cr^{4+}, V^{5+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} und Mn^{2+} konnte die Produktion von ROS über eine Fenton-analoge Reaktion und den Haber-Weiss-Zyklus in Zellsystemen gut beschrieben werden. [Wang 2001, Jiménez Del Río 2004]

Die Fentonreaktion stellt eine Schlüsselreaktion der Sauerstofftoxizität dar, da die Hydroxyl-Radikale, die dabei entstehen, hochreaktiv sind und im biologischen System unspezifisch mit fast jeder Art von Molekülen bzw. Molekülstrukturen reagieren. Der Reaktionszyklus der Fenton-Reaktion in vivo ist nach Imlay, J. in den Gleichungen (II-15) bis (II-17) wiedergegeben.

$$O_2^{-\bullet} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2^{-} \qquad \textbf{(II-15)}$$

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \textbf{(II-16)}$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{-} + HO^{\bullet} + Fe^{3+} \qquad \text{Fenton- Reaktion} \qquad \textbf{(II-17)}$$

Wasserstoffperoxid und Superoxid könne wiederum Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren (Gleichung II-15 und II-18). Damit ist das Redoxpaar Fe^{2+} / Fe^{3+} der entscheidende Katalysator bei diesen Reaktionen.

$$H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \quad \textbf{(II-18)}$$

Im sauren Milieu entsteht aus dem Superoxidradikal das Hydroperoxylradikal ($HO_2^{\bullet}$)

$$H^+ + O_2^{\bullet -} \rightarrow HO_2^{\bullet} \quad \textbf{(II-19)}$$

Sind keine weiteren Reaktionspartner vorhanden reagieren die Radikale miteinander (II-20, II-21) und/oder oxidieren bzw. reduzieren Fe^{2+}/Fe^{3+} (II-15, II-22) und H_2O_2.

$$OH^{\bullet} + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 \quad \textbf{(II-20)}$$

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + 2O_2 \quad \textbf{(II-21)}$$

$$OH^{\bullet} + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- \quad \textbf{(II-22)}$$

$$OH^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow H_2O + H^+ + O_2^{\bullet -} \quad \textbf{(II-23)}$$

Eisen kann auch als Katalysator direkt die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und dem Superoxidradikal beschleunigen und somit Hydroxyl-Radikale bilden. Diese Reaktion wird als Haber-Weiss-Reaktion bezeichnet.

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{Fe^{2+}} OH^- + HO^{\bullet} + O_2 \quad \text{Haber-Weiss-Reaktion} \quad \textbf{(II-24)}$$

2.5 EDTA freie Radikale Reaktionen

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) wird häufig in der Fenton-Chemie benutzt, um stabile Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Komplexe zu bilden. Ohne EDTA müsste bei einem sehr niedrigen pH-Wert (pH = 1-2) gearbeitet werden, um das Ausfallen von Fe^{3+}-Ionen als Hydroxid zu verhindern. Denn unter aeroben Bedingungen und einem pH-Wert von 7 wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert. Hydratisiertes Fe^{3+} ist eine starke Kationensäure. Abhängig vom pH-Wert hat dies folgende Protolysereaktionen zufolge:

$$[Fe(H_2O)_6]^{3+} + H_2O \leftrightarrows [Fe(H_2O)_5OH]^{2+} + H_3O^+ \qquad pK_{S1} = 2,2 \qquad \textbf{(II-25)}$$

$$[Fe(H_2O)_5(OH)]^{2+} + H_2O \leftrightarrows [Fe(H_2O)_4(OH)_2]^{+} + H_3O^+ \qquad pK_{S2} = 3,5 \qquad \textbf{(II-26)}$$

$$[Fe(H_2O)_4(OH)_2]^{+} + H_2O \leftrightarrows [Fe(H_2O)_3(OH)_3] = Fe(OH)_3 \cdot aq) + H_3O^+ \qquad pK_{S3} = 6,0 \qquad \textbf{(II-27)}$$

Ebenfalls folgen Kondensationsreaktionen, bei denen Oxo- und Hydroxo- verbrückte Aggregate sowie Kolloide entstehen. (Abb. 2.3).

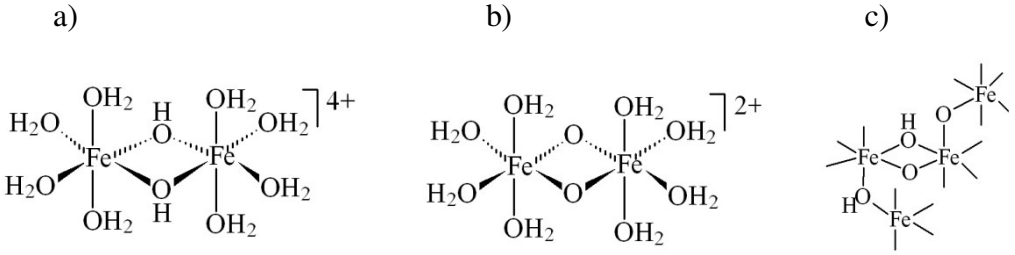


Abb. 2.3 a) Hydroxo- und b) Oxo-Agregate sowie c) Strukturausschnitt von Fe-Kolloiden [Rehder 2007]

Wie in Gleichung II-15 bis II-18 zu erkennen ist, ist das Redoxpaar Fe^{2+}/ Fe^{3+} ein Katalysator bei der Entstehung von Radikalen. Dennoch ist die Effektivität der Zersetzung von Wasserstoffperoxid abhängig von den Ausgangsprodukten. So wirken Fe^{2+}-EDTA-Komplexe effektiver bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxid als Fe^{3+}-EDTA-Komplexe. Die durch Autooxidation gebildeten EDTA-Fe^{3+}-Komplexe aus Fe^{2+}-EDTA-Komplexe wirken wiederum besser als die direkt aus Eisen(III)salz hergestellte Fe^{3+}-EDTA-Komplexe. [M. C. R. Symons 1998]

Wird EDTA in der Fenton-Chemie benutzt, so werden die entstehenden Hydroxyl-Radikale aufgrund der hohen Reaktivität als erstes mit dem EDTA reagieren, wodurch EDTA-Radikale entstehen. Dadurch ist EDTA ein Hydroxyl-Radikalfänger. Diese sind ebenfalls reaktiv und sollten bei den Untersuchungen nicht vernachlässigt werden. [M. C. R. Symons 1998]

Dennoch werden freie Hydroxyl-Radikale in Lösung gefunden. [Gutteridge 1987] Eine mögliche Erklärung gibt Graf et all. 1984. EDTA ist ein sechszähniger Komplexbildner der reaktive Eisenkomplexe bildet. Fe^{2+} und Fe^{3+} sind siebenfach im EDTA- Komplex gebunden. [Lind 1964, Dunford 1987] Die siebente Koordinationsstelle wird durch Wasser besetzt und kann leicht durch Wasserstoffperoxid ersetzt werden, was die Fenton-Chemie ermöglicht. [Graf 1984] Alle Experimente sollten mit EDTA im Überschuss durchgeführt werden. Das Vorhandensein „freier“ Eisen-Ionen in der Lösung sowie das Ausfällen von Eisenhydroxid werden dadurch verhindert.

2.6 Antioxidantien

Aufgrund der Tatsache, dass ständig ROS in vivo gebildet werden, die oxidative Schäden verursachen können, hat der Körper ein komplexes antioxidatives System entwickelt. Dieses System hemmt bzw. blockiert die Entstehung potentieller Sauerstoffspezies auf verschiedenen Stufen und vermindert bzw. verhindert somit Reaktionen mit Biomolekülen. Die Substanzen, die diese Aufgabe haben, werden als Radikalfänger bzw. als Antioxidantien bezeichnet. Dabei kann man zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien unterscheiden. Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören z.B. die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase und die Katalase (siehe Abb. 2.4). Glutathion (GSH) selbst kann auch direkt ROS inaktivieren und gehört somit zur Gruppe der nicht-enzymatischen Antioxidantien.

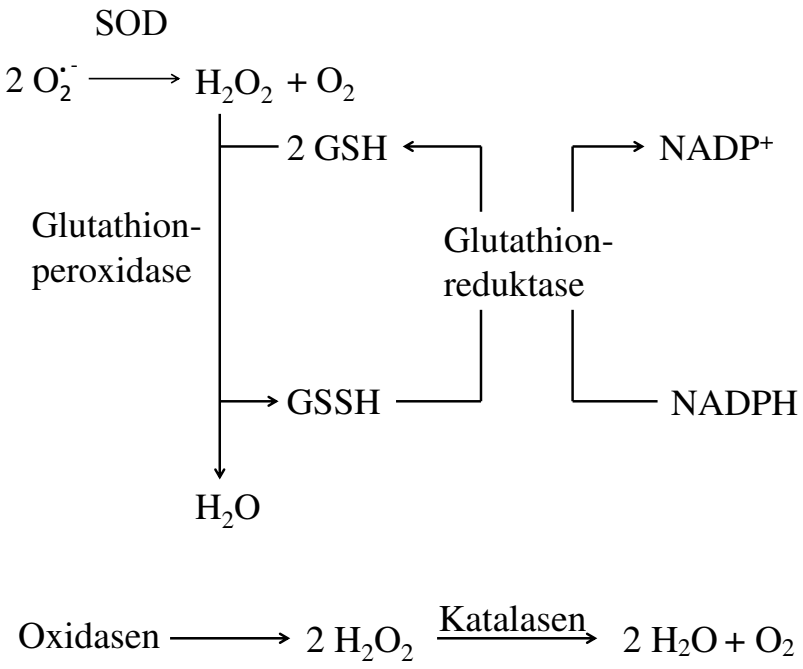


Abb. 2.4 „Neutralisierung“ der ROS durch enzymatische Antioxidantien [Nohl 1994]

Die nicht-enzymtischen Antioxidantien werden wiederum in endogene und exogene Antioxidantien unterschieden. Die exogenen Antioxidantien müssen über die Nahrung zugeführt werden.

Tabelle II-4 Beispiele für endogene und exogene Antioxidantien

endogene Antioxidantien	exogene Antioxidantien
Harnsäure	L-Ascorbinsäure (Vitamin C)
Coenzym Q	α-Tocopherol
Bilirubin	Karotinoide
Glutathion	Polyphenole
Carnosin	Flavonoide

Allgemein kann man sagen, dass nicht-enzymatische Antioxidantien mit Radikalen reagieren und somit deren aggressives Potential verringern. Dabei entsteht ein stabileres, weniger aggressiveres derivatisiertes Antioxidantradikal (siehe Gleichung II-28). Die unterschiedlichen Reduktionspotentiale freier Radikale sind in Tabelle II-1 dargestellt. So hat z.B. das α-Tocopherol-Radikal ein kleineres Reduktionspotential und ist somit reaktionsträger als das hochreaktive Hydroxyl-Radikal. Der Grund dafür liegt in der Struktur des α-Tocopherol. Das aufgenommene e^- ist delokalisiert, wodurch das α-Tocopherol-Radikal durch Mesomerie stabilisiert ist (Abb.2.5).

$$AH + X^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + XH \qquad \textbf{(II-28)}$$

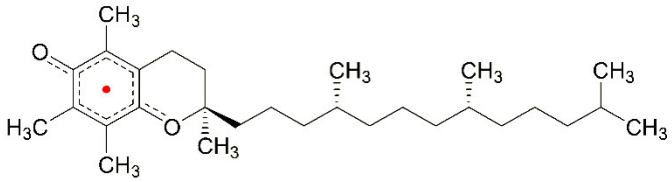


Abb. 2.5 Mesomeriestabilisierung des α-Tocopherol-Radikals [Greifenberg 2014]

Obwohl die Lebensdauer der derivatisierten Antioxidantradikale länger und das Reduktionspotential und die chemische Reaktivität geringer ist als die der „neutralisierten“ Radikale, so bleiben sie dennoch Radikale, die zelluläre Schäden verursachen können.

2.7 Modellmembranen

Modellmembranen sind biomimetische Systeme von Zellmembranen. Natürliche Zellmembranen sind hoch komplexe Systeme. Chemische und strukturelle Prozesse laufen häufig gleichzeitig ab. Daher ist es unabdingbar die Zellmembran auf das Notwendigste zu reduzieren, um bestimmte Wechselwirkungen bzw. Einflussfaktoren auf Zellmembraneigenschaften auf molekularen Level zu untersuchen. In der Grundlagenforschung ist der Einsatz von Modellmembranen unverzichtbar. Das Motto ist: vom Einfachen zum Schwierigen und vom Einzelnen zum Zusammengesetzten. Der Hauptbestandteil einer Zellmembran sind Lipide. Auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Lipide wird im nächsten Kapitel näher eingegangen. Diese bilden das Grundgerüst der Modellmembran. Im Laufe der Geschichte wurden unterschiedliche Modellmembranen entwickelt. Das einfachste Modell ist eine Monoschicht, die man auf zwei Wegen herstellen kann. Entweder durch spontane Selbstorganisation auf festen Oberflächen, sogenannte SAMs (Self-assembled monolayers), oder mit Hilfe eines von Irving Langmuir weiterentwickelten Pockels Trog den Langmuir Trog (1917). Dabei befindet sich die Monoschicht auf einer Wasser/Luft-Grenzfläche. Diese Monoschicht kann mit Hilfe eines Langmuir Blodgett Transfer (1934) oder durch Schäfer Transfer auf einen festen Träger übertragen werden. Als Modellmembran wird in dieser Arbeit hauptsächlich die Monoschicht benutzt. In Kapitel 2.9 wird dieses Modell und dessen möglichen Untersuchungsmethoden mit seinen Vor- und Nachteilen ausführlich beschrieben. Die Zellmembran ist in der Regel eine Doppelschicht. Je nachdem welche Substrat-eigenschaften und Wechselwirkungen untersucht werden sollen, kann man zwischen gestützter Doppelschicht (SLB- supported lipid bilayer) oder planarer Doppelschicht in Lösung als Modellmembran wählen. Beide Formen haben ihre Vor- und Nachteile. Um diese herzustellen gibt es unterschiedliche Methoden auf diese hier kurz eingegangen wird.

Die SLB können mit der oben erwähnten Langmuir-Blodgett Methode (siehe Abb. 2.6, links) oder mit einer Kombination von Langmuir-Blodgett und der Schäfer Methode hergestellt werden (siehe Abb. 2.6, unten rechts).

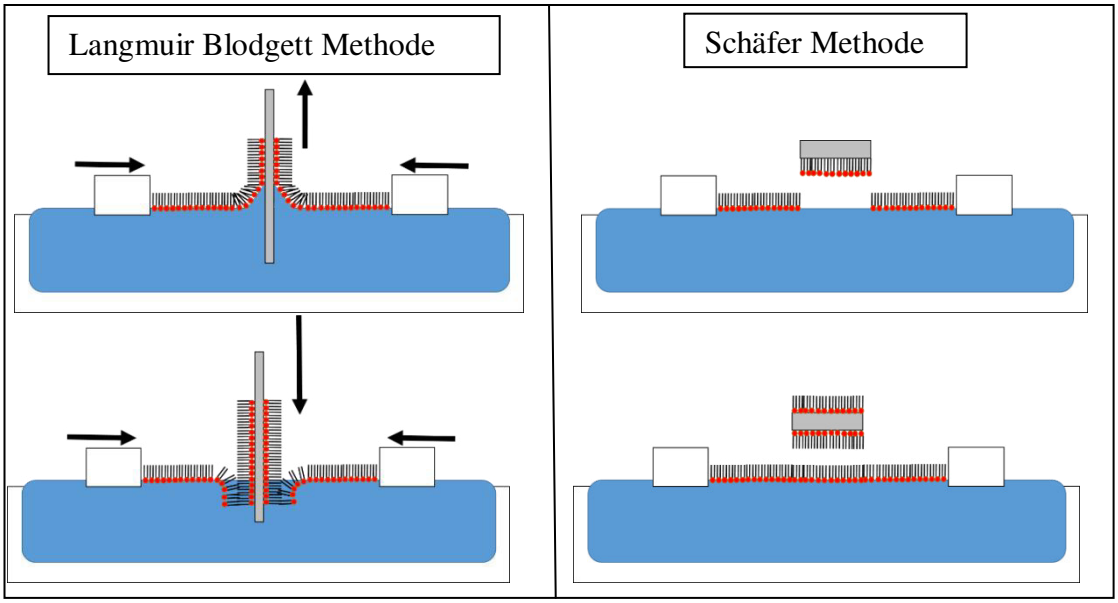


Abbildung 2.6 Oben: Übertragung einer Monoschicht auf einen festen Träger mit der Langmuir-Blodgett- (oben links) und der Schäfer Methode (oben rechts). Unten: Herstellung einer Doppelschicht (SLB) mit der Langmuir-Blodgett Methode (unten links) und einer Kombination aus Langmuir-Blodgett- und der Schäfer Methode (unten rechts).

Eine andere weitverbreitete Methode um SL- Bilayer herzustellen ist die Vesikelfusion. Hierfür werden unilamellare Vesikel hergestellt (siehe Kapitel 2.10.2), die dann durch die Wechselwirkung mit dem Substrat deformiert und schließlich geöffnet werden (siehe Abb. 2.7). Weitere Methoden zur Herstellung von SLB sind Spin Coating [Mennicke 2002], solvent exchange deposition [Hohner 2010], bubble collapse deposition [Mager 2007] und lipid dip-pen nanolithography [Lenhert 2010]. Die Langmuir-Blodgett/Schäfer Methode und die Vesikelfusion sind vielleicht die meist genutzten Methoden um SLB herzustellen.

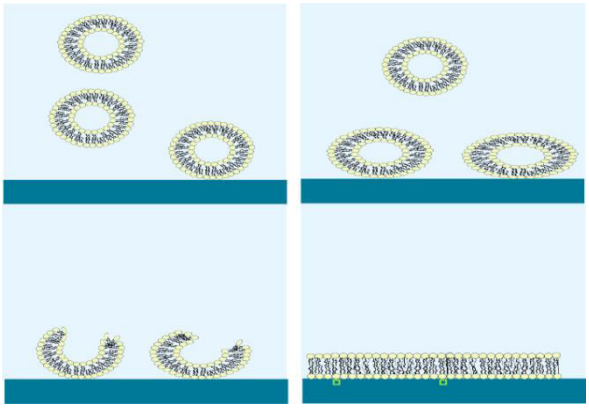


Abb. 2.7 Ausbildung einer Lipiddoppelschicht auf einer hydrophilen Oberfläche durch Vesikel-Fusion

In den letzten 30 Jahren wurde eine Vielzahl von unterschiedlich gestützten Membranmodellen entwickelt. Der Hauptvorteil gegenüber den freien planaren Membranen ist, dass viele oberflächensensitive Techniken wie QCM, ATR, AFM und Röntgenreflexion benutzt werden können. Ein anderer Vorteil ist die lange Lebensdauer dieser Doppelschichten. Ein Nachteil dieser Technik war lange der kurze Abstand der Membran zum Substrat. Dies erschwerte häufig den Einbau von Proteinen, da diese aufgrund der Wechselwirkung mit dem Substrat häufig ihre Struktur veränderten und damit auch ihre Funktionalität verloren. Alternative SL-Modellmembranen wurden entwickelt, wie z.B. Doppelschichten auf „Polymerkissen“ (polymer cuhsion) [Wong 1999, Knoll 2000], angebundene Lipid-Doppelschichten (t-BLM; tethered bilayer membrane) durch funktionalisierte Lipide [Lang 1994] oder Proteine [Giess 2004]. [Rossi 2007]

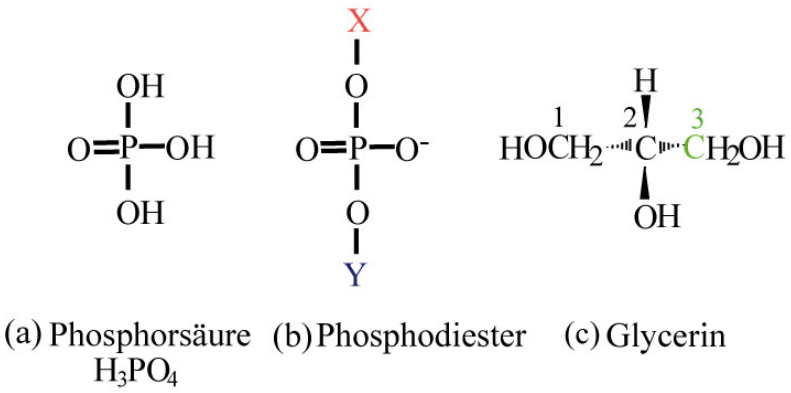
Nicht gestützte Modellmembranen sind nicht gebundene Liposomen oder planare Modellmembranen wie die Black Lipid Membran, hergestellt nach der Müller-Rudin Methode [Mueller 1962] oder die Montal-Müller Membran [Montal 1972]. Die planaren Modellmembranen haben den Vorteil, dass man sehr leicht Membrankapazitäten und –dicken bestimmen kann. Der Nachteil ist die geringe Lebensdauer.

2.8 Chemische Struktur von Phospholipiden

Phospholipide sind Hauptbestandteile von Biomembranen, die als „Begrenzung und zur Aufrechterhaltung der Unterschiede zwischen intra- und extrazellulärem Milieu“ [Sachse 2003] dienen und damit einen essentiellen Teil von lebenden Zellen ausmachen. Besonders reichlich sind Phospholipide in der Hirnsubstanz und im Myelin vorhanden. [Kolter 2007]

Phospholipide sind amphiphil. Vereinfacht bedeutet das, dass diese Verbindungen aus einer polaren „Kopfgruppe“ und einer langen, unpolaren „Schwanzgruppe“ (Kohlenwasserstoffrest) aufgebaut sind.

Charakteristisch für sie ist ein Phosphorsäurerest (Abb. 2.8 a), der in Form eines Diesters, seltener eines Monoesters vorliegt. Dabei ist X ein polarer Alkoholteil und Y der nichtpolare Teil (Abb. 2.8 b). „Der übrigbleibende dritte acide Wasserstoff des Phosphorsäurerests ist bei physiologischem pH ionisiert.“ [Kolter 2007]



(a) Phosphorsäure H_3PO_4 (b) Phosphodiester (c) Glycerin

Abb. 2.8 Struktur der Grundbausteine von Phospholipiden.

Die Phospholipide kann man in zwei Klassen unterteilen:

1. den Glycerophospholipide
2. und den Sphingophospholipide

An dieser Stelle wird vertieft auf die Glycerophospholipide eingegangen, da sie Hauptbestandteil der Untersuchungen waren.

Bei den Glycerophospholipiden ist der nichtpolare Rest (Y) ein Glycerinderivat (Abb. 2.8 c) wobei die sn-3-Hydroxylgruppe des Glycerinteils mit der Phosphorsäure verestert ist. Bei den von uns verwendeten Lipiden ist das Glycerinderivat ein 1,2-Diacyl-sn-glycerin. Der polare Alkohol der mit dem Phosphorsäureteil (als Komponente X in Abb. 2.8 b bzw. 2.9) verestert ist, unterteilt die Glycerophospholipide (siehe Tab. II-5). Innerhalb jeder dieser Unterabteilungen ist eine Vielzahl an Molekülarten möglich, da viele verschiedene Fettsäuren mit dem Glycerinrest verestert sein können.

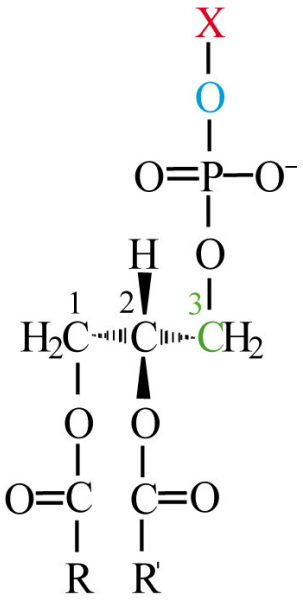
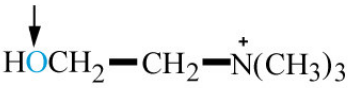
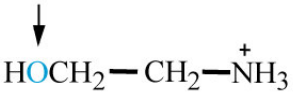
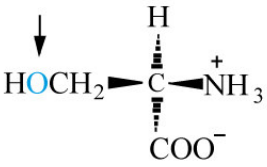
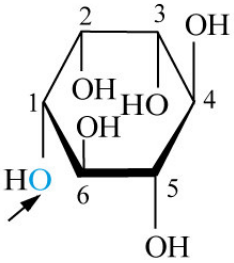
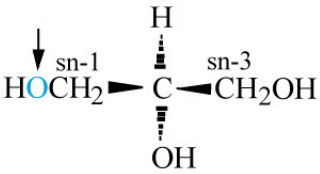
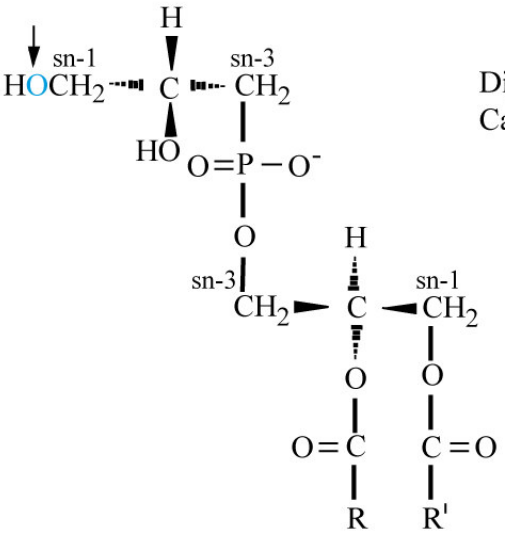


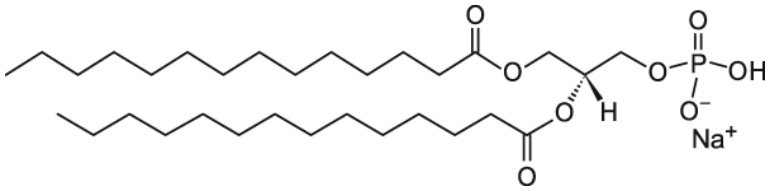
Abb. 2.9 Grundstruktur von Phosphatidylglycerolipiden (X ist ein polarer Alkoholrest) R = Kohlenwasserstoffketten.

Tabelle II-5 Struktur der polaren Alkohole, die mit dem Phosphorsäurerest von Glycerophospholipiden verestert sind. Entnommen aus [Kolter 2007] und verändert

polarer Alkohol	Formel bei physiologischen pH-Wert	Name des Glycerophopholipids
Cholin		Phosphatidylcholin
Ethanolamin		Phosphatidylethanolamin
L-Serin		Phosphatidylserin
myo Inositol (1,2,3,5/4,6 Hexa hydroxycyclohexan)		Phosphatidylinosit
Glycerin		Phosphatidylglycerin
Phosphatidylglycerin		Diphosphatidylglycerin Cardiolipin

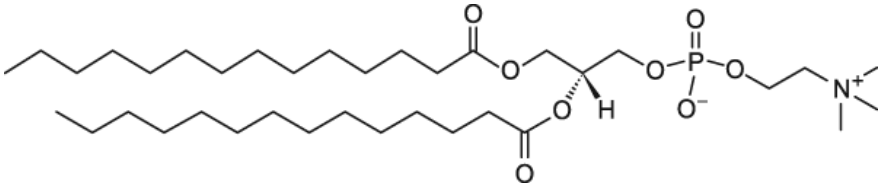
Die amphiphile Struktur der Lipid-Moleküle bestimmt die Eigenschaften wie Oberflächenaktivität und Aggregatbildung. Werden Lipide auf eine Wasser/Luft-Grenzfläche aufgebracht, orientiert sich die polare Kopfgruppe der Lipide dem Wasser zu. Die hydrophoben Alkylketten bleiben auf der Luftseite. Diese Eigenschaft wird bei der Präparation von Lipid-Monoschichten genutzt. Löst man hingegen Lipide im Wasser aggregieren diese aufgrund des hydrophoben Effektes, wenn die kritische Mizellenkonzentration (CMC) überschritten wird. Dies wird bei der Herstellung von Liposomen genutzt.
Die Phospholipide mit Ethanolamin und Cholin als Kopfgruppe sind zwitterionisch. Alle anderen Phospholipde sind elektrisch negativ geladen. Die in dieser Arbeit verwendeten Glycerophospholipide sind DMPA, DMPC, DPPC, DMPG und das Cardiolipin TMCL.

DMPA(1,2-ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphate oder 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate(sodium salt)



T_m = 50°C

DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)



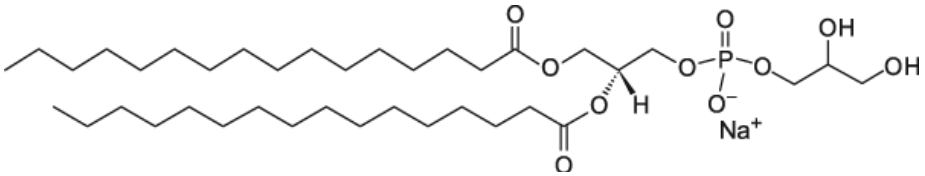
T_m= 24°C

DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bzw. 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)

Gleiche Struktur wie DMPC die Fettsäuren haben jedoch zwei zusätzlichen Methylengruppen (CH_2)

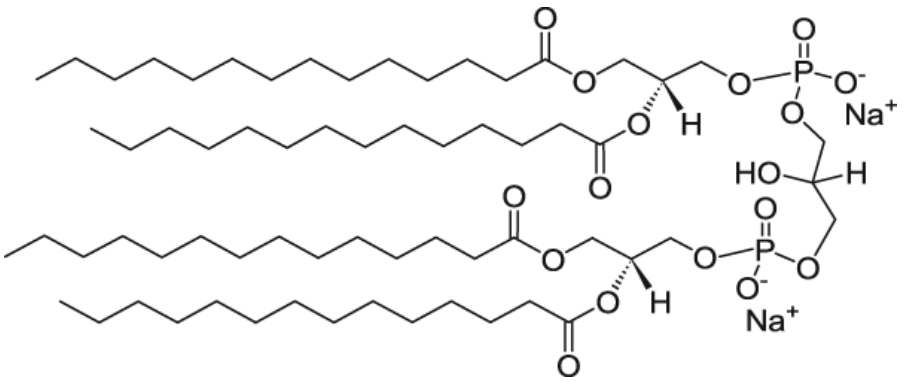
T_m = 41°C

DMPG (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) bzw. 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt)



T_m = 41°C

TMCL(1,1',2,2'-tetratetradecanoyl cardiolipin (sodium salt)



T_m = ca. 40°C

Die verwendeten Lipide haben gesättigte Fettsäuren. Dies hat den Vorteil, dass bei Kompression einer Monoschicht mit diesen Lipiden einen Phasenübergang von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase zu beobachten ist. Dies ist ein Phasenübergang 1. Ordnung und charakterisiert durch einen Koexistenzbereich. Dieser ist sehr gut geeignet, um Veränderungen von thermodynamischen Eigenschaften der Monoschicht durch die Radikale zu beobachten. Ungesättigte Fettsäuren lassen sich nicht durch Komprimierung in die flüssig-kondensierte Phase bringen. Somit sind sie für die geplanten Experimente in dieser Arbeit nicht geeignet.

2.9 Langmuir- Monoschichten und deren Untersuchungsmethoden

Lipidmonoschichten an einer Wasser/Luft-Grenzfläche, quasi die Hälfte einer Zellmembran, dienen als etablierte Modellmembranen. Lipidmonoschichten sind auch in biologischen Systemen und in verschiedenen biologischen Prozessen wie z.B. die Atmung involviert. Die Oberfläche der Alveolen ist mit einer vor allem aus Phosphocholine, Phosphoglycerol und Proteinen bestehende Monoschicht bedeckt. Viele Studien haben deshalb Lipidmonoschichten und deren Wechselwirkung mit oberflächenaktiven Proteinen (pulmonary surfactant) [Bangham 1979, Kramer 2000, Walters 2000] mit mono- und divalenten Ionen [Tocanne 1974, Lösche 1985, Helm 1986] oder den Einfluss von verschiedenen pH-Werten untersucht. [Garidel 2005]

Ein Vorteil des Langmuirfilms ist, dass sich der Film auf einer Wasseroberfläche befindet, welche biologisch relevant ist, im Gegensatz zu festen Oberflächen. Weiterhin kann man die Zusammensetzung der Lipide, deren Dichte (Molekulare Fläche pro Molekül) und damit die Phase (flüssig-expandiert, flüssig-kondensiert) sowie die Eigenschaften der Subphase wie z.B. Ionenkonzentration, pH-Wert und Temperatur variieren. [Garidel 2005] Bis in die frühen 1980er Jahren konnten Informationen mehr oder weniger nur aus der Druck-Fläche (π–A) Isotherme gewonnen werden. Es waren in erster Linie thermodynamische Studien. Aussagen über molekulare Strukturen konnten kaum gemacht werden. In den darauf folgenden Jahren wurden neue Techniken für thermische und strukturelle Untersuchung auf unterschiedlichen Längenskalen entwickelt.

Mit der optischen Mikroskopie ist es möglich Lipidmonoschichten auf einer µm Längenskala zu untersuchen. Es war anfangs (1980) vor allem Epifluoreszenz-mikroskopie, um die Struktur und Wachstum von Domänen also Phasenübergänge von flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen. [Lösche 1984, Lösche 1985, Florsheimer 1989, Chi 1991, Weis 1991] Ungefähr zehn Jahre später wurde fast zeitgleich die Brewsterwinkel-Mikroskopie von zwei Arbeitsgruppen in Göttingen [Hoenig 1991, Hönig 1992] und Paris [Hénon 1991] entwickelt. Ebenfalls wurden 1992 die ersten ellipsometrischen Mikroskopie Untersuchungen von Monoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche durchgeführt [Reiter 1992]. Mit beiden Techniken war es erstmals möglich Domänen auch ohne zusätzlichen Farbstoff abzubilden.

Mit Hilfe von Synchrotrons als Quelle für Röntgenstrahlung und der Entwicklung von Röntgendiffraktion von Monoschichten an einer Wasser/Luft-Grenzfläche ist es nun möglich Informationen über laterale periodische Strukturen auf molekulare Skala (im Ängströmbereich) zu erhalten. [Dutta 1987, Kjaer 1987] Dagegen kann man mit Röntgenreflexion Informationen über die vertikale Struktur der Monoschicht im Ängströmbereich erhalten. Elektronenmikroskopie erlaubt es die Struktur von Monoschichten mit molekularer Auflösung abzubilden. Dazu muss der Film jedoch auf ein festes Substrat übertragen werden und aufwendig präpariert werden. [Cornell 1983, Chiu 1997]

Diese Untersuchungsmethoden liefern viele wichtige strukturelle Informationen um die Monoschicht zu charakterisieren. Doch Aussagen über die chemische Zusammensetzung der Lipide und deren Veränderung durch Reaktionen über eine gewisse Zeit konnten bis zur Entwicklung der Infrarot-Reflexion-Absorption Spektroskopie (IRRAS) nur indirekt getroffen werden. Mit dieser Technik können auch Informationen über die Kettenkonformationen (trans-gauche), Wasserstoffbrückenbindungen und die Wechselwirkung von Ionen mit Lipiden sowie Sekundärstrukturen und Orientierungen von Proteinen gewonnen werden. [Chalmers 2002] Seit den letzten 5 Jahren ist es mit Hilfe der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TRFA bzw. TXRF) möglich, den Ionisationszustand von Molekülen an der Wasser/Luft-Grenzfläche, sowie die elementare Zusammensetzung der elektrochemischen Doppelschicht nahe der geladenen Monoschicht quantitativ zu bestimmen. [Antipina 2007, Shapovalov 2007, Shapovalov 2010, Stefaniu 2014] In Tabelle II-6 sind die wichtigsten Untersuchungsmethoden zusammengefasst.

Tabelle II-6 Untersuchungsmethoden und deren Informationsgewinn von Monoschichten

Untersuchungsmethode	Information
Langmuir Trog – Druck- Fläche Isotherme	Thermodynamische Größen: Phasenübergänge: 1. und 2. Ordnung Übergangsdruck π_c; Molekulare Flächen die den Anfang A_c und Ende A_s des Koexistenzbereich beim Phasenübergang flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert kennzeichnen; Umwandlungsenthalpie ΔH
Fluoreszenzmikroskopie	Form, Größe, Wachstum von Domänen mit Marker
Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM)	Laterale Struktur von Domänen; ähnlich Fluoreszenzmikroskopie ohne Marker
Rasterkraftmikroskop (AFM)	Morphologie der Monoschicht < 1µm
Röntgenreflexion	vertikale Struktur, Elektronendichteprofil, Bestimmung des Molekülvolumen und der Hydratation sowie Ein- bzw. Anlagerung von Gegenionen
Röntgendiffraktion	laterale periodische Strukturen: Art des Gitters, Abstände der Kristallebene, Korrelationlänge, Neigungswinkel
Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)	Chemische Zusammensetzung der Lipide, Kettenkonformationen, Neigungswinkel, Wechselwirkung von Ionen mit Lipiden sowie sekundär Strukturen und Orientierungen von Proteine
Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse(TXRF)	Ionisationszustand von Molekülen und die elementare Zusammensetzung der elektrochemischen Doppelschicht an der Monoschicht

Die in dieser Arbeit genutzten Untersuchungsmethoden werden in den folgenden Abschnitten ausführlicher beschrieben. Dabei wird auf die Erzeugung von Monoschichten, auf die Filmwaage und im Speziellen auf Kombinationen der Filmwaage mit Fluoreszensmikroskopie, BAM, Röntgenreflexion und –diffraktion sowie IRRAS eingegangen.

2.9.1 Erzeugung monomolekularer Schichten

Monomolekulare Schichten auf einer Wasser/Luft-Grenzfläche kann man durch „Spreiten“ erzeugen. Dabei wird eine flüssige Substanz auf eine Flüssigkeitsoberfläche aufgebracht. Die Spreitung der Substanz erfolgt, wenn die Oberflächenenergie Subphase z.B. Wasser/Luft (γ_{WL}) größer ist als die Summe von Oberflächenenergie Flüssigkeit/Wasser (γ_{WF}) und Flüssigkeit/Luft (γ_{FL}) zusammen (Abb. 2.10).

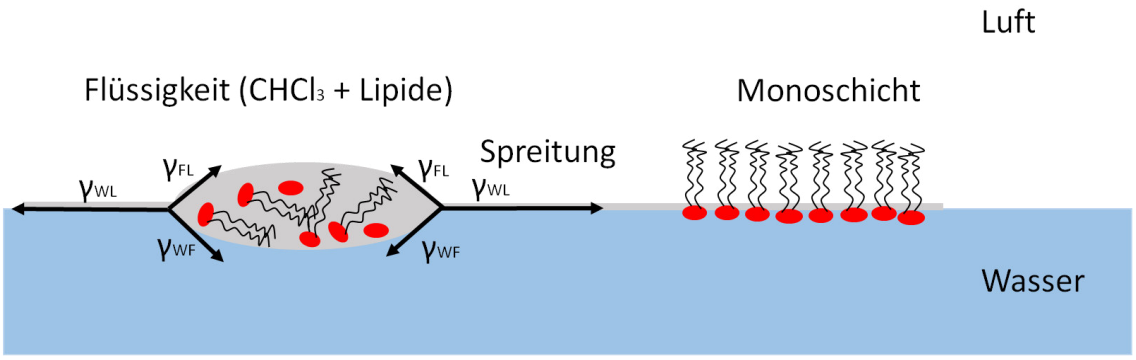


Abb. 2.10 Bildung einer Lipid-Monoschicht auf einer Wasser/Luft-Grenzfläche durch Spreiten.

Bei einer Substanz die nicht spontan spreitet verwendet man ein Spreithilfsmittel. Dazu wird die Substanz in einem Lösungsmittel gelöst und man tropft diese Spreitungslösung auf das Substrat. Es erfolgt die Spreitung der Lösung zu einer monomolekularen Schicht. Das Lösungsmittel verdampft und innerhalb weniger Minuten bleibt die gewollte Monoschicht (z.B. ein DPPC-Film) zurück. „Ein typisches Lösungsmittel ist Chloroform oder Mischungen aus überwiegend Chloroform mit polaren Molekülen (Ethanol, Methanol). Das Chloroform sorgt für das Spreiten, die polaren Beimischungen erhöhen die Löslichkeit der Amphiphile.“ [Ahrens 2001]

2.9.2 Aufbau und Funktion einer Filmwaage

Die Kompressionseigenschaften der Monoschichten können mittels der auf Langmuir und Pockels zurückgehenden Filmwaagetechnik untersucht werden.
Eine Filmwaage besteht im wesentlichem aus einem flachen temperierbaren Teflontrog[3] (Langmuir-Trog) der mit einer Subphase bis zum Rand gefüllt wird, einem Druckmesssystem und einer beweglichen Schubbarriere (siehe Abb. 2.11). Diese Barriere wird in einer Führung, angetrieben von einem Schrittmotor, direkt auf der Flüssigkeitsoberfläche verschoben, wodurch eine den Molekülen zur Verfügung stehende Fläche A mit definierter Geschwindigkeit variiert werden kann. Wird die Fläche A des Films verkleinert, so werden die Moleküle auf der Oberfläche zusammengeschoben. Die Oberflächenkonzentration der Monoschicht nimmt zu, die Oberflächenspannung nimmt ab und der Lateraldruck π nimmt zu.

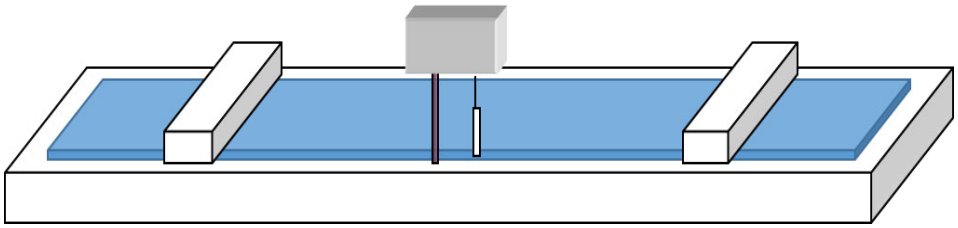


Abb. 2.11 Langmuir Filmwaage mit Wilhelmy-Messsystem und zwei beweglichen Barrieren.

Der Lateraldruck π wird als die Differenz zwischen der Oberflächenspannung der reinen Wasserphase (γ_{WL} = 72,5 mN/m bei T = 20 °C) und der filmbedeckten Wasserphase γ_{FL} definiert.

$$\pi = \gamma_{WL} - \gamma_{FL} \qquad \textbf{(II-29)}$$

Dieser hängt vom Phasenzustand der Schicht ab, der durch äußere Parameter, wie Temperatur, Ionenstärke der Subphase, Fläche pro Molekül beeinflusst werden kann.

[3] Teflon ist im gereinigtem Zustand hydrophob und gibt keine Lösungsmittel oder Ionen an die Subphase ab.

Die Bestimmung des Oberflächendruckes ist mit verschiedenen Messverfahren möglich. Die Vertikalplattenmethode nach Wilhelmy ist die meist benutzte Methode.

Dazu taucht ein ideal benetzbares Plättchen (Wilhelmy-Plättchen) mit der Dichte $\rho_{Plättchen}$, Länge *l*, Breite *b*, der Dicke *d* und Eintauchtiefe *h* (Abb. 2.13) in die mit der Monoschicht bedeckten Subphase eines Langmuir-Troges. Die auf das Wilhelmy-Plättchen wirkende Kraft *F*, die aus Gewichtskraft, Auftrieb und Oberflächenspannung resultiert, wird gemessen.

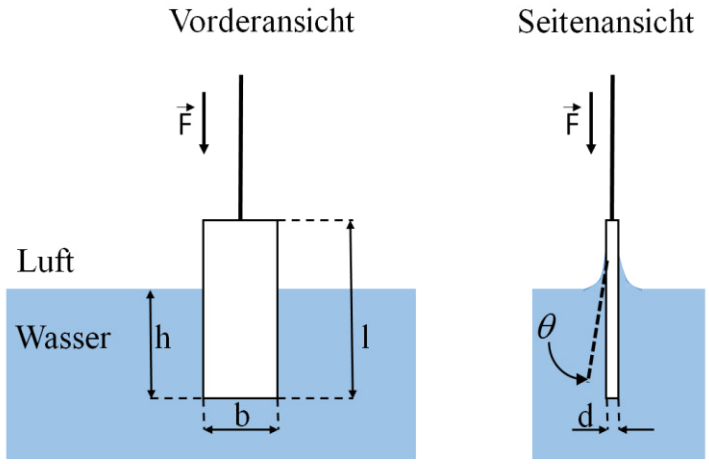


Abb. 2.13 Schematische Darstellung des Wilhelmy-Systems. Dabei bedeuten: *l*- Länge, *b*- Breite, *d*- Dicke, *h*- Eintauchtiefe des Wilhelmy- Plättchens, θ -statischer Kontaktwinkel; entnommen aus [Gebert 2000] und verändert

Die Kraft F_{WL} ist die Kraft die auf das Wilhelmy-Plättchens wirkt, bei reinem Wasser mit der Oberflächenspannung γ_{WL} .

$$F_{WL} = \rho_{Plätchen} glbd - \rho_{Wasser} ghbd + 2\gamma_{WL}(b+d)\cos\theta \qquad \textbf{(II-30)}$$

Befindet sich eine Monoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche, so verringert sich die Oberflächenspannung von γ_{WL} um den Oberflächendruck π auf γ_{FL} . Die Kraft F_{FL}, die dann auf das Wilhelmy-Plättchen wirkt, beträgt dann:

$$F_{FL} = \rho_{Plätchen} glbd - \rho_{Wasser} ghbd + 2\gamma_{FL}(b+d)\cos\theta \qquad \textbf{(II-31)}$$

Der erste Term ist nur von den Eigenschaften des Plättchens abhängig und dadurch invariant gegenüber der Änderung der Oberflächenschicht. Auch der zweite Term bleibt bei gleicher Eintauchtiefe h des Wilhelmy-Plättchens konstant. Die Menge der Lipidschicht ist im Vergleich zu der Menge der hier verdrängten Flüssigkeit vernachlässigbar klein und hat somit keinen nennenswerten Einfluss auf dessen Dichte. Unter der Annahme idealer Benetzbarkeit (Kontaktwinkel θ = 0°) ergibt sich die Differenz ΔF der Kräfte F_{WL} und F_{FL} zu:

$$\Delta F = F_{\mathrm{WL}} - F_{\mathrm{FL}} = 2(\gamma_{\mathrm{WL}} - \gamma_{\mathrm{FL}})(b+d) \qquad \textbf{(II-32)}$$

Mit der Definition des Oberflächendruckes $\pi = \gamma_{\mathrm{WL}} - \gamma_{\mathrm{FL}}$ folgt:

$$\pi = \frac{\Delta F}{2(b+d)} \qquad \textbf{(II-33)}$$

„Auf diese Weise wird der Oberflächendruck π durch eine Kraftmessung ΔF am Wilhelmy-Plättchen bestimmt.“ [Gebert 2000]

2.9.2.1 Aufnahme der Isothermen

Die Druck-Flächen-Isotherme (π/A-Isotherme) erhält man durch Messung des Filmdrucks π in Abhängigkeit von der Fläche pro Molekül A_{m} bei konstanter Temperatur.

A_{m} berechnet sich aus Gesamtfläche A des Langmuir-Films, der durch die Barriere eingeschlossen wird, dividiert durch die Anzahl N der gespreiteten Moleküle auf dem Langmuir-Trog. Durch Aufbringen einer definierten Menge der Monoschicht kann der Filmdruck in Abhängigkeit von der molekularen Fläche A_{m} gemessen werden.

$$A_m = \frac{A}{N} \qquad \textbf{(II-34)}$$

mit

$$N = N_a \times c \times V \qquad \textbf{(II-35)}$$

Dabei ist N_{a} die Avogadro Konstante, c die Konzentration der gespreiteten Lösung und V das gespreitete Volumen.

2.9.2.2 Charakterisierung der Isothermen

Die Druck-Flächen-Isothermen verschiedener Substanzen können sehr unterschiedlich aussehen. So können die verschiedenen Kurvenabschnitte unterschiedliche Krümmung und Steigung aufweisen. Durch charakteristische Änderungen des Anstiegs der π/A -Isotherme sind die verschiedenen Phasen sowie Phasenübergänge mit den je unterschiedlichen morphologischen Strukturen erkennbar.

Eine idealisierte π/A -Isotherme eines Langmuir-Films an der Wasser/Luft-Grenzfläche bei konstanter Temperatur ist in Abbildung 2.14 dargestellt. Dabei werden die Phasenzustände, die den jeweiligen π/A-Isothermenbereichen zugeordnet und schematisch veranschaulicht.

Den Durchlauf einer idealisierten Isotherme kann man in drei Hauptphasen einteilen. Dabei wird in Bezug auf Symmetrie und Ordnungsgrad zwischen: gasanaloge-, flüssiganaloge- und festanaloge Phase unterschieden.

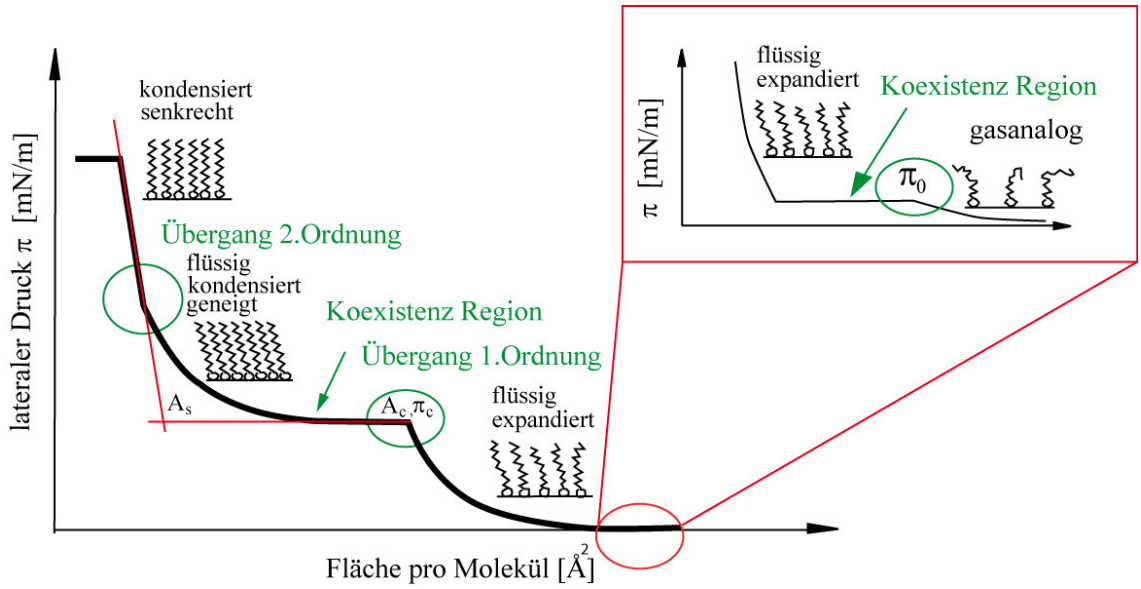


Abb. 2.14 Idealisierter Verlauf einer π/A–Isotherme mit den einzelnen Phasen und den dazugehörigen Phasenübergängen; entnommen aus [Kaganer 1999] und verändert

In der gasanalogen Phase ist der Film noch nicht richtig ausgeprägt. Der Oberflächendruck ist sehr klein. Jedem Molekül steht eine große Fläche zur Verfügung, so dass die Wechselwirkungen untereinander vernachlässigt werden können. Dies ähnelt einem idealen Gas im zweidimensionalen Raum. Die π/A-Isotherme in diesem

Bereich ist mit der *p-V* Isotherme des idealen dreidimensionalen Gases vergleichbar. „Das ideale zweidimensionale Gas gehorcht daher auch einer zur idealen dreidimensionalen Gasgleichung analogen Zustandsgleichung.“ [TU-München 2009]

$$\pi \times A_{\mathrm{m}} = k_{\mathrm{B}} \times T \qquad \textbf{(II-36)}$$

Wird der laterale Abstand der Moleküle des idealen zweidimensionalen Gases durch Kompression vermindert, kommt es zu intermolekularen Wechselwirkungen. Dadurch treten Abweichungen vom idealen Verhalten auf. Abweichungen von diesem idealen Verhalten lassen sich mit einer zur Van-der-Waals Gleichung analogen Gleichung beschreiben.

$$(\pi + \frac{x}{A_{\mathrm{m}}^2})(A_{\mathrm{m}} - y) = k_{\mathrm{B}} \times T \qquad \textbf{(II-37)}$$

Dabei sind x und y die zweidimensionalen Van-der-Waals-Konstanten. Der Oberflächendruck steigt bis zum Phasenübergangsdruck π_0. Der Druck bleibt trotz abnehmender Fläche je Molekül konstant. In diesem Gebiet koexistieren die gasanaloge und flüssig-expandierte Phase. Man spricht vom Phasenübergang 1. Ordnung. Nimmt der Oberflächendruck weiter zu, liegt nur die reine flüssig-expandierte Phase vor. Da übliche Filmwaagen keine bessere Auflösung als 0,1mN/m (Ende der gasanalogen Phase) haben, fangen ab hier die Untersuchungen der Monoschicht an. [TU-München 2009]

In der flüssig-expandierten Phase ist die freie Beweglichkeit der Moleküle aufgrund der kleineren zur Verfügung stehenden Flächen eingeschränkt. Die hydrophoben Ketten fangen an miteinander zu wechselwirken. Sie sind jedoch nur über einen kleinen Bereich geordnet. Die Korrelationslänge, die angibt über welchen Bereich die periodische Struktur erhalten bleibt, ist sehr klein. Dadurch sind keine Röntgendiffraktionsignale detektierbar. [Kaganer 1999]

Bei weiterer Kompression findet wieder eine Phasenumwandlung erster Ordnung statt. Es liegt erneut eine Koexistenzphase vor, indem der Übergang eines flüssig-expandierten Films zu einem dicht gepackten flüssig-kondensierten Film erfolgt. Es bilden sich „feste“ Domänen.

In dem reinen flüssig-kondensierten Film ist die Kompressibilität sehr gering, was auf eine relativ starre Anordnung der Moleküle hinweist. Die Moleküllängsachsen sind gegenüber der Flächennormale in einem bestimmten Winkel geneigt. Bei weiterer Kompression verringert sich der Neigungswinkel der Moleküle. Wird das Aufrichten der Moleküle nicht durch sterische oder elektrostatische Wechselwirkungen verhindert, so kann ein Übergang in die kondensierte Phase (Moleküle stehen senkrecht zur Oberfläche) erfolgen. Dieser ist durch einen Knickpunkt in der Isotherme gekennzeichnet und wird als Phasenübergang zweiter Ordnung beschrieben. In der flüssig-kondensierten Phase und der festen Phase sind die Alkylketten lateral hoch geordnet.
Eine weitere Erhöhung des Oberflächendrucks führt zu einem steilen Anstieg der Isotherme, der in einem Kollaps des Films endet. Hier geht der definierte Schichtaufbau der Monoschicht verloren, da sich die Moleküle von der Wasseroberfläche abheben und sich übereinander schieben. Dabei bilden sich unregelmäßig strukturierte Multischichten aus.

Aus den π/A-Isothermen können folgende Parameter bestimmt werden:

- Phasenübergangsdrücke π_c des Langmuir-Films
- Fläche pro Molekül innerhalb einer Phase
- Höhe des Kollapsdrucks

Aus den oben genannten Parametern kann die Umwandlungsenthalpie ΔH nach Clausius-Clapeyron bestimmt werden. ΔA_m ergibt sich aus dem Anfang A_c und Ende A_s des Koexistenzbereichs.

$$\frac{\mathrm{d}\pi_c}{\mathrm{d}T} = \frac{\Delta H}{\Delta A_m \times T} \qquad \textbf{(II-38)}$$

$$\Delta A_m = A_s - A_c \qquad \textbf{(II-39)}$$

Ebenfalls können Auswirkungen von Gegenionen in der Subphase und/oder von pH-Wert Variationen oder Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der Monoschicht auf die oben genannten Parameter beobachtet werden.

2.9.3 Optische Untersuchungsmethoden

Mit der optischen Mikroskopie ist es möglich die Struktur und das Wachstum von Domänen, also Phasenübergänge von flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert, unter unterschiedlichen Bedingungen zu visualisieren. Dabei verläuft die Bildung der Domänen bei konstanter Temperatur folgenderweise:
Durch die Kompression der Monoschicht nimmt der laterale Abstand der Moleküle ab und es kommt zu intermolekularen Wechselwirkungen und folglich zu molekularen Dichteschwankungen. Dadurch entstehen Nukleationskeime. Ob ein Keim weiterwächst oder wieder zerfällt, hängt von der freien Enthalpie $\Delta G(r)$ ab. $\Delta G(r)$ hängt zum einen von der Randenergie der Domänen ab, die aufgebracht werden muss. Diese ist proportional zur Randspannung σ_{RS} des Keimumfangs, $2\pi r$. Zum anderen kann bzw. muss das System bei einer Phasenumwandlung Energie aufnehmen bzw. abgeben. Diese Energie wird als latente Wärme oder Umwandlungsenthalpie ΔH bezeichnet und kann in Form von thermischer Energie (Änderung der Temperatur dT) oder in Form von Volumenarbeit (Änderung des Drucks $d\pi$) zu oder abgeführt werden.
Die Umwandlungsenthalpie kann mit Hilfe der Clausius-Clapeyronschen Gleichung abgeschätzt werden.

$$\frac{d\pi}{dT} = \frac{\Delta H}{\Delta A_m \times T} \qquad \textbf{(II-40)}$$

$$d\pi \Delta A_m = \frac{dT \Delta H}{T} \qquad \textbf{(II-41)}$$

Bezieht man die Umwandlungsenthalpie auf einen ideal runden Keim mit dem Radius r muss man diese mit der Anzahl der Moleküle in diesem Keim N_K multiplizieren. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis Fläche des Keims A_K zur Fläche eines Moleküls A_m.

$$N_K = \frac{A_K}{A_m} \qquad \textbf{(II-42)}$$

Die freie Enthalpie $\Delta G(r)$ ist somit:

$$\Delta G(r) = 2\pi r\sigma_{RS} - \Delta H \frac{dT}{T} \times N_K \quad \text{bei Temperaturänderung oder} \quad \textbf{(II-43)}$$

$$\Delta G(r) = 2\pi r\sigma_{RS} - \Delta A d\pi \times N_K \quad \text{bei Druckänderung.} \quad \textbf{(II-44)}$$

$$\Delta G(r) = 2\pi r\sigma_{RS} - \Delta \pi r^2 d\pi \times N_K$$

Wird eine Monoschicht bei konstanter Temperatur komprimiert so wird Volumenarbeit am System verrichtet. Ab einer bestimmten Keimgröße (kritischer Keimradius r^*) überwiegt der zweite Term, da der Radius des Keimes zum Quadrat eingeht. Im Gegensatz zum ersten Term bei dem r nur proportional zur Randspannung ist. Wurde eine Aktivierungsenergie, die der kritischen freien Enthalpie ($\Delta G(r^*)$) entspricht, aufgebracht um ein Keim mit dem Radius $r > r^*$ zu bilden, hat dies ein Wachstum der Domäne zufolge. Ist $r < r^*$ zerfällt der Keim wieder (siehe Abb. 2.15).

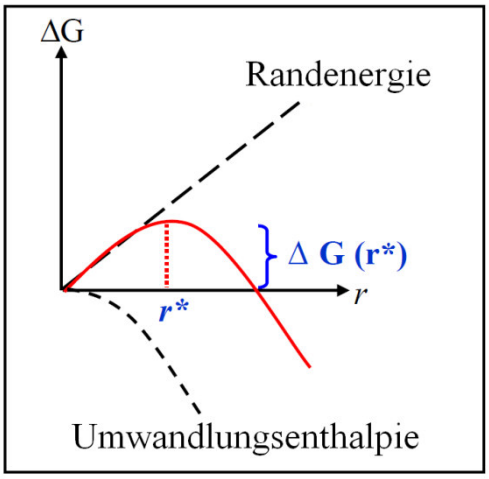


Abb. 2.15 freie Enthalpie eines Keims als Funktion des Keimradius; entnommen aus [Möhwald 2009] und verändert

Um die kritische freie Enthalpie zu bestimmen gilt quantitativ Gleichung II-45. [Helm 1988]

$$r^* = \frac{2\sigma_{RS} A_m T_C}{\Delta H dT} = \frac{2\sigma_{RS} A_m}{\Delta A_m d\pi_c} \quad \textbf{(II-45)}$$

T_c ist die kritische Temperatur und π_c ist der kritische Druck, bei denen die Phasenumwandlung bzw. Keimbildung beginnt.
Setzt man r^* in GleichungII-43 bzw. II-44 ein, für $\Delta G(r) = 0$ erhält man die kritische Energie eines Keims.

$$\Delta G(r^*) = \frac{4\pi\sigma_{RS}^2 A_m T_c}{\Delta H \mathrm{d}T} \text{ bzw. } \Delta G(r^*) = \frac{4\pi\sigma_{RS}^2 A_m}{\Delta A_m \mathrm{d}\pi_c} \qquad \textbf{(II-46)}$$

Die kritische Energie wächst somit proportional zum Quadrat der Randspannung σ und fällt umgekehrt proportional mit der Umwandlungsenthalpie ΔH bei $\mathrm{d}T$ = konstant bzw. mit der Flächenänderung ΔA bei $\mathrm{d}\pi_c$ = konstant. Dies bedeutet, dass mit zunehmenden Verunreinigungen z.B. durch Fluoreszenzfarbstoffe, Cholesterin oder Proteine die Randspannung und somit auch die kritische Energie abnehmen, wodurch die Anzahl der Domänen erhöht wird. Durch Temperatur-, Oberflächenladungsdichteerhöhung bzw. durch zu schnelles Komprimieren sinkt ebenfalls $\Delta G(r^*)$ wodurch ebenfalls die Anzahl der Domänen steigt.
Die Keimbildungsrate J kann nach einem Arrheniusansatz bestimmt werden.

$$J = J_0 e^{-\Delta G(r^*)/k_B T} \qquad \textbf{(II-47)}$$

Eine homogene Keimbildung ist jedoch Voraussetzung für diesen Ansatz.

Die Form und Größe der Domänen ist abhängig von der Randspannung an der Phasengrenze zwischen Domänen (flüssig-kondensiert) und der Bulkphase (flüssig-expandiert). Aufgrund der Minimierung der Randenergie erhalten die Domänen runde Formen. Finden jedoch elektrostatische Interaktionen (Dipol-Dipol) zwischen den Lipiden statt, treten verformte Domänen auf. Der Grund dafür ist, dass die Dipolmomente, die parallel zur Oberfläche sind, zu weitreichenden dipolaren Abstoßungen zwischen den Molekülen innerhalb einer Domäne führen. Die elektrostatische Energiedichte nimmt mit der Domänengröße zu. Um die Energiedichte zu minimieren ist es vorteilhaft langgestreckte bzw. verzweigte Domänen auf Kosten der Randenergie zu bilden. Das Zusammenspiel dieser beiden Energien ist unteranderem für die Formgebung der Domänen verantwortlich. [Möhwald 1990]

Andererseits hängt die Domänenform von der Struktur der Lipide ab. So wird z.B. die spiralförmige Form von Domänen mit der Chiralität der Lipidmoleküle erklärt. Weiterhin beeinflusst die Zusammensetzung der Monoschicht sowie die Wechselwirkung von Lipiden mit der Subphase, wodurch die intermolekulare Wechselwirkung zwischen den Lipidmolekülen verändert wird, die Domänenform. [Lösche 1985, Flörsheimer 1989, Möhwald 1990, Gröger 2012] Die weitreichenden dipolaren Abstoßungen bewirken auch die Abstoßung zwischen den Domänen, wodurch Domän-Fusion verhindert wird. Aufgrund der gleichen Domängrößen ist eine lamellare oder hexagonale Anordnung möglich.
In den folgenden Abschnitten wird erläutert, wie diese Domänen abgebildet werden können.

2.9.3.1 Fluoreszenzmikroskpie von Lipidmonoschichten

„Das Phänomen Fluoreszenz wurde bereits vor Tausenden von Jahren beobachtet. Erscheinungen, die wir heutemit den Begriffen Fluoreszenz und Phosphoreszenz bezeichnen, wurden schon 1500 Jahre vor Christus in chinesischen Büchern erwähnt.“ [Kunath-Fandrai 2004]
Der Name Fluoreszenz wurde im Jahre 1852 von George Gabriel Stokes nach dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Calciumfluorid) abgeleitet. Er erkannte die Gesetzmäßigkeit, dass das von fluoreszierenden Stoffen emittierte Licht eine höhere Wellenlänge besitzt, als das vom Stoff absorbierte Licht. Diese Gesetzmäßigkeit ist auch als Stokes`sches Gesetz, Stokes`sche Regel oder Stokes-Verschiebung bekannt. „Max Haitinger prägte 1911 den Begriff Fluorochrom und gilt als Begründer der modernen Fluoreszenzmikroskopie und der Fluorochromierungstechnik.“ [Kunath-Fandrai 2004] In Abbildung 2.16 ist die Verschiebung vom verwendeten Fluorchrom NBD dargestellt.
Grundsätzlich kann die Fluoreszenzmikroskopie sowohl im Auflicht als auch im Durchlicht betrieben werden. Bei einem Auflichtmikroskop wird das zu beobachtende Objekt nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet. Daher lautet die korrekte Bezeichnung Epifluoreszenzmikroskopie.

Die Auflichtfluoreszenzmikroskopie hat im Vergleich zur Durchlichtfluoreszenz den Vorteil, dass auch lichtundurchlässige oder sehr dicke Präparate verwendet werden können.

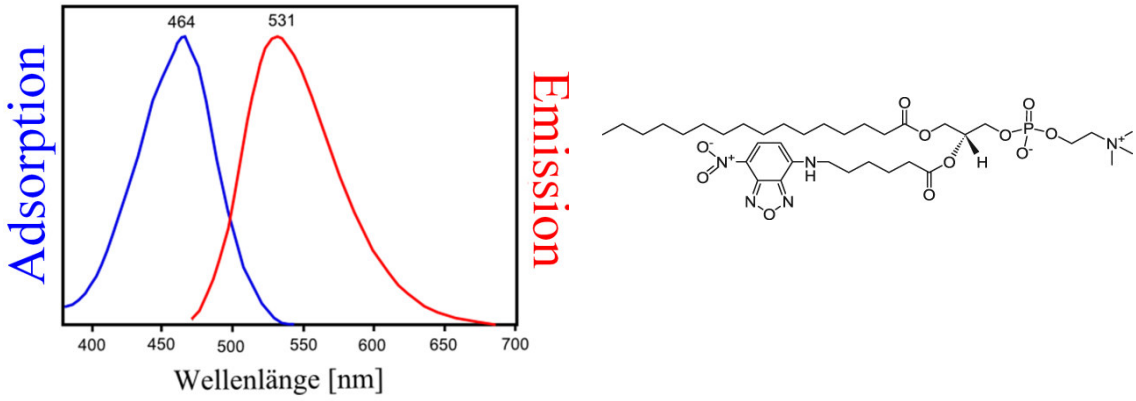


Abb. 2.16 Links: Absorption- Emissionspektrum von 16:0-06:0 NBD PC (1-palmitoyl-2-6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) Rechts: Strukturformel von 16:0-06:0 NBD PC; Quelle: Avanti Lipids

Typische Anregungslichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie sind Bogen- bzw. Gasentladungslampen (Xenon- o. Quecksilberlampe) sowie Laser. Die Wahl der Anregungslichtquelle hängt von der Anwendung und damit von der erforderlichen Anregungswellenlänge und Anregungsintensität ab. Während Gasentladungslampen ein breites Anregungsprofil vom ultravioletten bis zum nahen-infraroten Spektralbereich haben, bietet der Laser den Vorteil monochromatischen Lichts mit hohen Anregungsintensitäten. Wird als Lichtquelle eine Gasentladungslampe benutzt, ist ein optischer Anregungsfilter notwendig, der für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendigen Wellenlängenbereich isoliert. Ein dichromatischer Strahlenteiler reflektiert das kurzwellige Anregungslicht über das Objektiv zum Präparat. Das längerwellige Fluoreszenzlicht wird vom Präparat emittiert, durch das Objektiv gesammelt und passiert den Strahlenteiler. Noch vorhandene Teile des Anregungslichts werden zu Lichtquelle reflektiert. Ein Sperrfilter eliminiert die noch restlichen vorhandenen Anteile des Anregungslichts. Im Idealfall nimmt nur noch das Fluoreszenzlicht an der Bildentstehung teil.

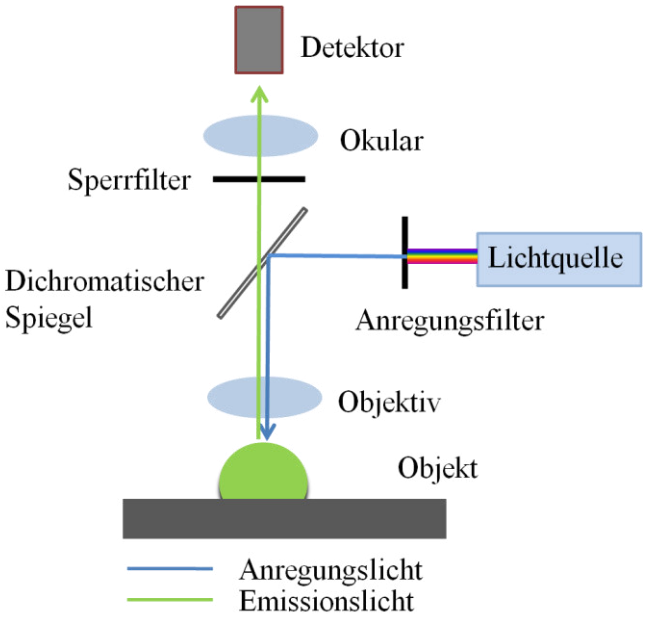


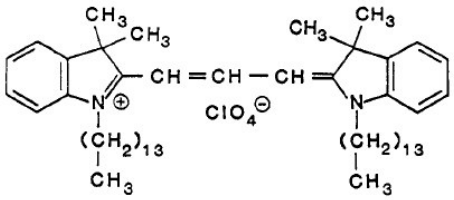
Abb. 2.17 Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops

Durch Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, ein direktes Bild unterschiedlicher Phasen von amphiphilen Molekülen an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu erhalten. Die Mikromorphologie der festen Domänen in der flüssigen Matrix konnte somit untersucht werden. Es gibt nun zahlreiche Studien über interne Einflüsse wie die Zusammensetzung der Monoschicht, oder externe Einflüsse wie z.B. pH-Wert, Art der Ionen und deren Konzentration in der Subphase [Lösche 1985, Helm 1986, Chi 1991], Temperatur [Heckl 1988] und Kompressionsgeschwindigkeit [Helm 1988], Reaktionen mit Phospholipasen [Grainger 1990] etc.

Der Monoschicht wird hierfür ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben wie z.B. 1,1-Ditetradecyl-3,3,3,3 tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI-C14-(3) oder Lipide die Farbstoff gelabelt sind. Diese Farbstoffe sind z.B. Lisamine, Rhodamine B, Pyrene, Fluorescein, Dansyl und NBD. Hierbei werden zwischen Kopfgruppen– oder Alkylketten markierte Lipide unterschieden. Sind die Lipide „fatty acid“ gelabelt bedeutet dies nicht unbedingt, dass der Farbstoff sich auf der Luftseite der Grenzfläche befindet.Valeria Tsukanova et. all haben gezeigt, dass sich die NBD-Gruppe von „fatty acid“ gelabelte Phospholipiden (DPPE-NBD und NBD(C12)-PC sich in der Kopfgruppenregion also in der Wasserphase aufhält. [Tsukanova 2002]

Der Kontrast des Bildes entsteht aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der Farbstoffe in den beiden Phasen des Lipids und durch die unterschiedliche molekulare Dichte im Koexistenzbereich.

Beim Phasenübergang flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert erscheinen die Domänen schwarz. Der Farbstoff ist in der flüssige-expandierten Phase besser löslich, die dadurch fluoresziert und hell erscheint. Die Menge des Farbstoffes sollte jedoch nicht mehr als 1 mol% betragen, damit der Einfluss dieses Fremdstoffes nicht zu groß wird.



DiI-C14-(3)

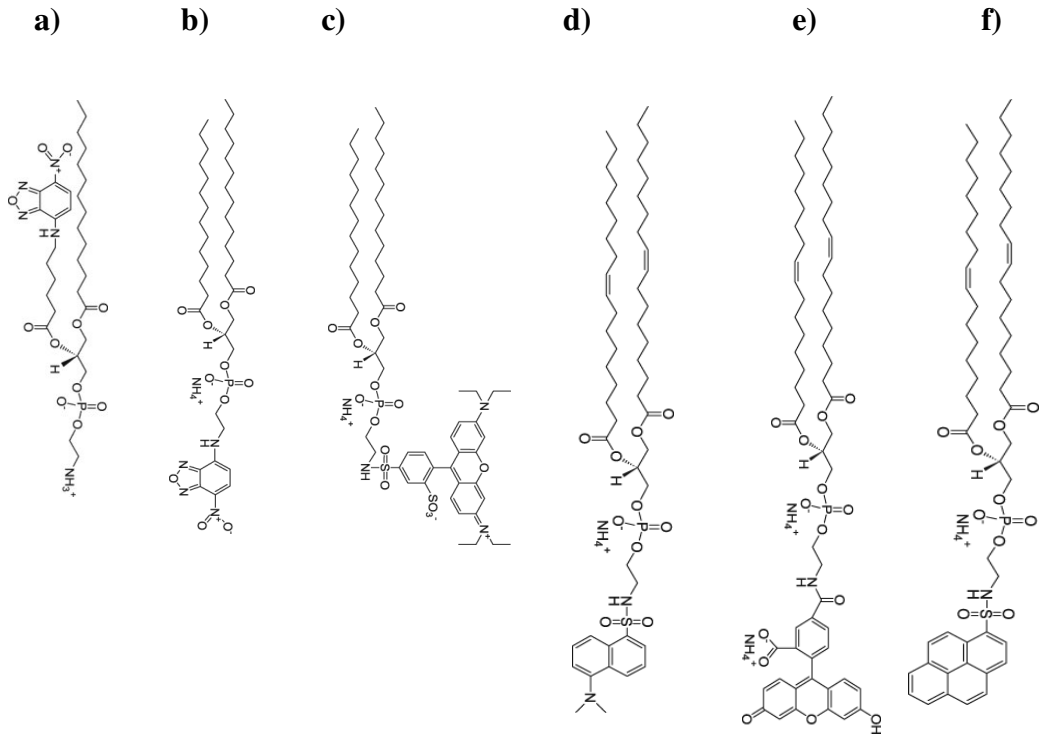


Abb. 2.18 Strukturformeln verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, a) 14:0-06:0 NBD PE, b) 14:0 NBD PE, c) 14:0 Liss Rhod PE, d) 18:1 Dansyl PE, e) 18:1 Pyrene PE, f) 18:1 PE CF, Quelle: Avanti Lipids

Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 2.19 dargestellt. Dieser Aufbau macht es möglich eine Isotherme aufzunehmenund gleichzeitig den Phasenübergang zu visualisieren. So können aufgenommene Bilder einem bestimmten π/A Datenpunkt zugeordnet werden.

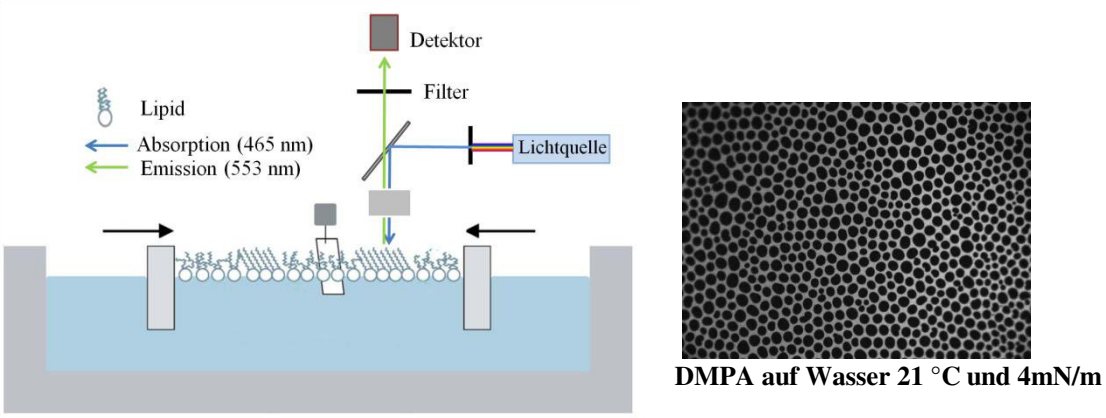


Abb. 2.19 Links: Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops in Kombination mit einem Langmuir-Trog. Rechts: Fluoreszenzbild einer DMPA Monoschicht im Koexistenzbereich bei 21 °C.

2.9.3.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM)

Mit dieser Methode können wie bei der Fluoreszenzmikroskopie morphologische Eigenschaften der Domänen von Monoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche, sowie Prozesse wie Adsorbtion aus der Subphase und Veränderungen durch Reaktionen beobachtet werden. Ein Vorteil vom BAM gegenüber Fluoreszenzmikroskopie ist, dass keine Marker benutzt werden müssen.

BAM macht sich die Gegebenheit zunutze, dass p-polarisiertes Licht am Brewsterwinkel nicht reflektiert wird. Der Brewsterwinkel ergibt sich aus dem Brewstergesetz (Gleichung II-48) und beträgt für die Grenzfläche Luft/Wasser 53,2°.

$$\tan \Theta_B = \frac{n_2}{n_1} \qquad \textbf{(II-48)}$$

Befindet sich eine Lipidmonoschicht auf der Wasseroberfläche so ändert sich der Brechungsindex und der einfallende Strahl wird nun reflektiert (siehe Abb. 2.20) Die Form der kondensierten Domänen sowie deren inneren Strukturen sind somit visualisierbar. [Vollhardt 2014]

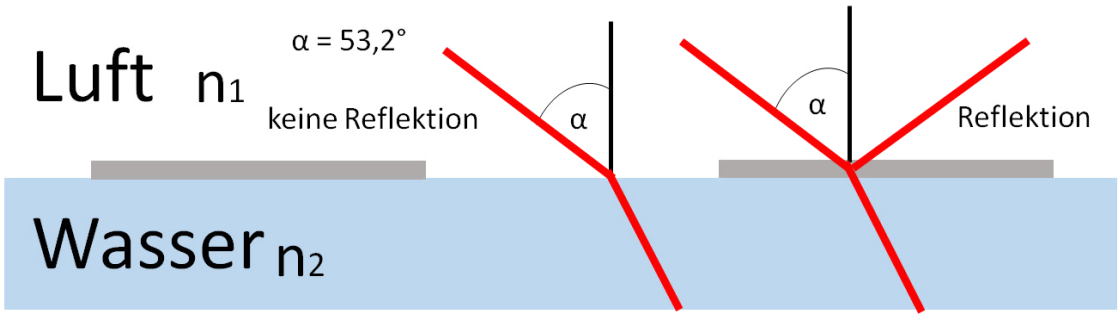


Abb. 2.20 Reflexion und Transmission an einer Wasser/Luft-Grenzfläche von p-polarisiertem Licht am Brewsterwinkel

Mit den älteren Brewsterwinkel-Mikroskopen muss das Bild zeilenweise abgerastert werden, um ein scharfes Bild zu erhalten. Bilder in Echtzeit aufzunehmen ist damit nicht möglich. Der Grund ist, dass durch die Detektion der Intensität im Brewsterwinkel die Schärfeebene (die Monoschichtebene), Objektivebene und Bildebene nicht mehr parallel zueinander liegen, wodurch nur ein kleiner Teil des Bildes scharf ist. Das UltraBAM mit seiner speziellen Optik macht es möglich scharfe Bilder in Echtzeit aufzunehmen. Dafür wird das Objektiv und der CCD Sensor der Kamera entsprechend der Scheimpflug Bedingungen geneigt. Das bedeutet sich die Bild-. Objektiv- und Schärfeebene sich in einer gemeinsamen Geraden schneiden (siehe Abb. 2.21). Das aufgenommene Bild ist dadurch scharf aber verzehrt. Darum wird eine softwareseitige Verzehrungskorrektur vorgenommen.

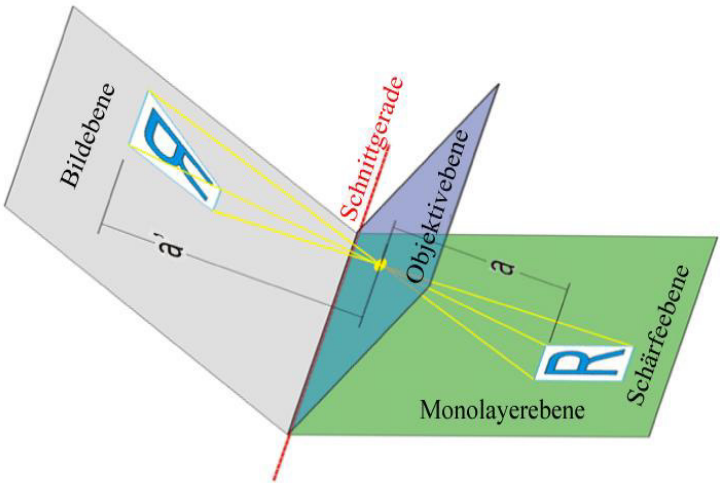


Abb. 2.21 Scharfe Abbildung unter der Scheimpflugbedingung; entnommen aus [Baecker 2006] und verändert

2.9.4 Röntgentechniken

Wilhelm Conrad Röntgen entdeckte 1895 die zu seinen Ehren benannte Röntgenstrahlung. „In anderen Sprachräumen wird sie häufig mit dem von Röntgen ursprünglich selbst verwendeten Begriff *X-Strahlen* (englisch *X-rays*) bezeichnet.“ [Bruns 2015] Für diese Entdeckung wurde der erste Nobelpreis für Physik verliehen. Viele weitere sollten im Gebiet der Röntgenstrahlung folgen. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen, deren Wellenlänge im Bereich von λ = 0,01 nm (10 pm) bis ca. 10 nm liegt (siehe Abb. 2.22).

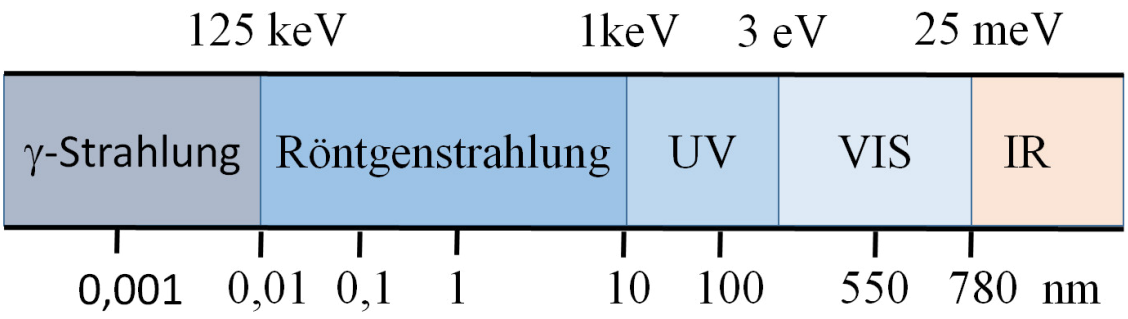


Abb. 2.22 Vereinfachtes Schema der verschiedenen Strahlungsarten und ihrer Wellenlängen- bzw. Energiebereiche.

Dieser Wellenlängenbereich entspricht auch dem Abstand der Atome in Kristallen, wodurch Beugung auftritt. Diese eignet sich zur Aufklärung molekularer Strukturen. Die Röntgenbeugung an Kristallgittern entdeckten Max von Laue, W. Friedrich und P. Knipping 1912 in München. Nur zwei Jahre später erhielt Laue den Nobelpreis. 1915 erhielten ebenfalls W.H. Bragg und sein Sohn W.L. Bragg den Nobelpreis für die Arbeiten zur Strukturaufklärung von Kristallen mit Röntgenstrahlung z.B. von Natriumchlorid, Calciumfluorit, Diamant etc. Heute ist die Röntgenbeugung auch Röntgendiffraktion genannt eine wichtige Methode der Strukturanalyse von harter sowie weicher Materie[4].

Mit der Entdeckung der charakteristischen Röntgenstrahlung, erhielt 1917 C.G. Barkla den Nobelpreis und legte den Grundstein für die Röntgenspektroskopie.

Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Methoden zur Strukturanalyse entwickelt (siehe Tabelle II-7). Es wird zwischen den Methoden der Röntgenspektroskopie und den Methoden der Röntgenstreuung unterschieden.

Tabelle II-7 Röntgenmethoden zur Strukturanalyse

Röntgenspektroskopie	Methoden der Röntgenstreuung
• Röntgenabsorptionsspektroskopie	Röntgenreflexion
• Röntgenemissionspektroskopie	Röntgendiffraktion
• Photoelektronenspektroskopie (XPS)	
• Röntgenfluoreszenzanalyse	
• Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	
• Wellenlängendispersive Röntgenspektroskopie (WDX)	

[4] „Als „harte kondensierte Materie“ werden Metalle, Halbleiter, Gläser etc. bezeichnet. Als „weiche kondensierte Materie“ werden Proteinkristalle (bis zu 80% Wasser), biologische Systeme (Membrane), Polymere etc. bezeichnet. Die englische Bezeichnung lautet *Hard and soft condensed*“ [Müller 2012]

Die bedeutendsten Röntgenstreumethoden für Monoschichten sind die Röntgenreflexion und Röntgendiffraktion. Bei diesen beiden Methoden werden monochromatische Röntgenstrahlen an den Elektronen eines Kristallgitters gebeugt. Mit Hilfe der auftretenden Interferenzbilder und der Reflexintensität kann die Struktur von Kristallen ausgewertet werden. Für die Röntgenstrahlung gelten die gleichen optischen Gesetze wie für das sichtbare Licht. Doch aufgrund der viel kürzeren Wellenlänge ergeben sich besondere Eigenschaften. So ist für Röntgenstrahlung der Brechungsindex für alle Materialien kleiner als eins. Daraus folgt, dass Röntgenstrahlung die aus Luft in eine Flüssigkeit oder einen Festkörper eintreten, vom Lot aus weggebrochen werden. Bei kleinem Einfallswinkel[5], unterhalb des kritischen Winkels wird der Strahl total reflektiert. An der Grenzfläche dringt dann nur eine exponentiell abnehmende evaneszente Welle ein, die mit der Probe wechselwirken kann. Die Eindringtiefe bei Evaneszenz beträgt für Wasser und Cu-K_α-Strahlung nur 46 Å, wodurch eine hohe Oberflächensensitivität erreicht werden kann. Die Streuung der evaneszenten Welle an den Elektronen der Moleküle wird bei Röntgendiffraktionsmessungen genutzt um Informationen über laterale periodische Strukturen in unserem Fall von Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu erhalten. Dagegen dient die Röntgenreflexion zur Bestimmung der vertikalen Struktur. Beide Methoden unterscheiden sich vor allem in der Geometrie der Streuexperimente.

[5] Im Gegensatz zu klassischen Optik werden hier die Ein- und Ausfallswinkel ($\alpha_i$bzw. α_f) der jeweiligen Strahlen zur Horizontalen und nicht zum Lot hin definiert. Das Koordinatensystem ist so gewählt, dass sich die Substratoberfläche in der *x, y*-Ebene erstreckt und die *z*-Achse parallel zur Oberflächennormalen liegt. Der einfallende Strahl wird mit $\vec{k}_i$, der gestreute mit $\vec{k}_f$ *b*ezeichnet.

2.9.4.1 Röntgenreflexion

Röntgenreflexionsmessungen haben eine planare Streugeometrie, d.h. dass der einfallende- und der reflektierte Strahl in einer Einfallsebene (x,z-Ebene) liegen (Abb. 2.23). Zur Untersuchung der vertikalen Struktur von dünnen Schichten, muss der Einfallswinkel α_i gleich dem Ausfallswinkel α_f sein. Dadurch besitzt der Wellenvektortransfer q, die Änderung des Wellenvektors $q = k_f - k_i$ mit $k_f = k_i = 2\pi/\lambda$, nur eine Komponente in vertikaler Richtung q_z (da q_x gleich null) mit

$$q_z = \frac{4\pi}{\lambda}\sin(\alpha_i) \quad \text{bzw.} \quad q_z = 2k_0 \sin\alpha_i \text{, da } k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \text{ ist.} \qquad \textbf{(II-48)}$$

Der Einfallswinkel wird variiert und der reflektierte Strahl bei gleichem Ausfallswinkel detektiert, $\alpha_i = \alpha_f$. Dies wird als spekulare Reflexion bezeichnet.

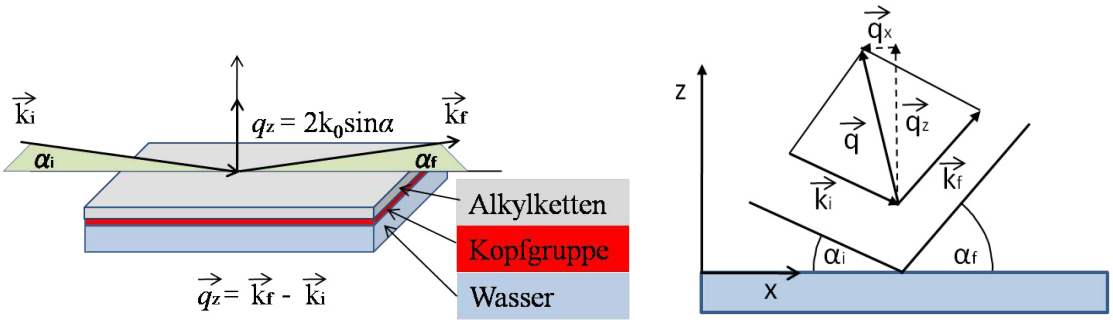


Abb. 2.23 Links: Röntgenreflexionsgeometrie mit vertikalem Impulsübertrag q_z zur Bestimmung des Elektronendichteprofils senkrecht zur Monoschicht. Rechts: Planare Streugeometrie, bei der einfallender und reflektierter Strahl in der Einfallsebene (x,z-Ebene) liegen. Wenn der Einfallswinkel gleich Ausfallswinkel ist, besitzt der Wellenvektor q nur die q_z Komponente, da q_x gleich null ist.

Die Reflexion und Beugung der Röntgenstrahlen kann nach den Gesetzen der klassischen Optik beschrieben werden.

Ein Röntgenstrahl mit dem Wellenvektor $\vec{k}_i = n_0 k_0(\cos\alpha_i, 0, \sin\alpha_i)$ wird an der Grenzfläche zweier Medien mit dem Brechungsindex n_0 und n_1 zum Teil unter dem Ausfallswinkel α_f reflektiert und zum Teil unter dem Winkel α_t gebrochen. Die Horizontalkomponente des Wellenvektors im reflektierten wie im gebrochenen Strahl bleibt erhalten. Der Grund dafür ist, dass sich das elektrische Feld des einfallenden

Strahles für beliebige Phasen divergenzfrei durch die Grenzfläche transmittiert. Daher gilt:

$$n_0 k_0 \cos(\alpha_i) = n_0 k_0 \cos(\alpha_f) = n_1 k_0 \cos(\alpha_t) \qquad \textbf{(II-49)}$$

und folglich ist $\alpha_i = \alpha_f$.

Für den gebrochenen Strahl gilt das Snellius`sches Brechungsgesetz.

$$\frac{n_1}{n_0} = \frac{\cos(\alpha_i)}{\cos(\alpha_t)} \qquad \textbf{(II-50)}$$

Trifft der Röntgenstrahl von der Luftseite $n_0 =$ 1 auf eine Probe z.B. einer Monoschicht mit einen Brechungsindex $n_1 = 1 - \delta_1 - i\beta_1$ kleiner eins, so tritt bei kleinem Einfallswinkel Totalreflexion auf. Der größte Einfallswinkel α_i bei dem Totalreflexion stattfindet, wird als kritischer Winkel α_c bezeichnet, mit: $\alpha_c = \arccos n_1$. Beim kritischen Winkel wird 50% des Lichtes reflektiert.

„Da δ_1 und β_1 sehr klein sind, kann man den Kosinus entwickeln und erhält für den kritischen Winkel“ Gleichung II-51. [Ahrens 2005]

$$\alpha_c = \sqrt{2(\delta_1 - i\beta_1)} \qquad \textbf{(II-51)}$$

oder auch:

$$\alpha_c = \lambda(\rho_s r_e / \pi)^{1/2} . \qquad \textbf{(II-52)}$$

ρ_s ist die Elektronendichte der Subphase bzw. des Substrates und r_e = 2,82x10^{-15} m entspricht dem klassischen Elektronenradius. Für Röntgenstrahlung λ = 1,54 Å und Wasser als Subphase beträgt der kritische Winkel α_c = 0,152°. ,

Aus Gleichung II-50 und II-51 lässt sich eine Näherungsformel für den Winkel des gebrochenen Strahls angeben:

$$\alpha_t = \sqrt{\alpha_i^2 - \alpha_c^2} \approx \alpha_i - \frac{\alpha_c^2}{2\alpha_i} \qquad \textbf{(II-53)}$$

Die spekulare Reflektion an einer idealen glatten Oberfläche kann mit der klassischen optischen Theorie von Augustin Jean Fresnel und seinen Fresnelschen Formeln beschrieben werden. Danach ist die Fresnel Reflektivität R_F einer idealen Oberfläche angenähert durch:

$$R_F = |r|^2 \approx \left| \frac{\alpha_i - \alpha_t}{\alpha_i + \alpha_t} \right|^2 \qquad \textbf{(II-54)}$$

Die Polarisationsrichtung wird bei dieser Gleichung für Röntgenstrahlung bei kleinem Einfallswinkel vernachlässigt, weil der Brechungsindex nahezu bei eins liegt.

Ist der Einfallswinkel größer als der kritische Winkel ($\alpha_i > \alpha_c$) nimmt die Fresnel Reflektivität stark ab. Für $\alpha_i > 3\alpha_c$ und bei Vernachlässigung der Absorption kann die Fresnel Reflektivität angenähert werden durch:

$$R_F \approx \left(\frac{\alpha_c}{2\alpha_i} \right)^4 = \left(\frac{q_c}{2q_z} \right)^4 \propto \frac{1}{q_z^4} \qquad \textbf{(II-55)}$$

q_c entspricht dem Wellenvektortransfer für Totalreflektion.

$$q_c \approx \frac{4\pi}{\lambda} \times \alpha_c \qquad \textbf{(II-56)}$$

Dies bedeutet, dass mit ansteigenden q_z also mit größeren Einfallswinkeln die reflektierte Intensität mit $\frac{1}{q_z^4}$ abnimmt. Der Verlauf der Reflektivität als Funktion vom Einfallswinkel α_i einer idealen Grenzfläche mit unterschiedlichen Absorptionen ist in Abbildung 2.24 dargestellt.

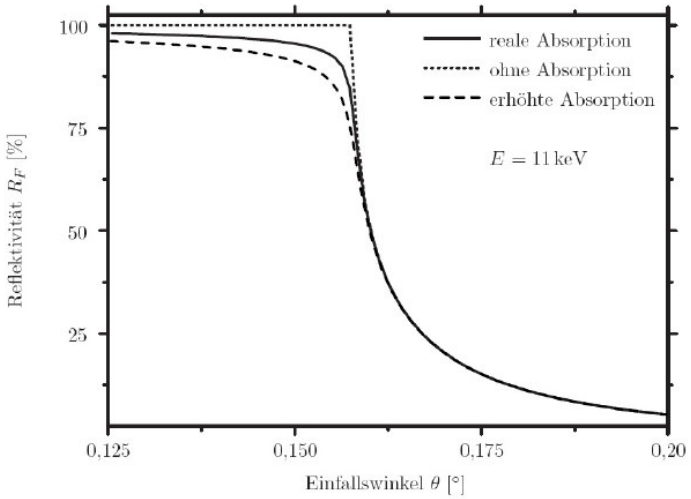


Abb. 2.24 Reflektivität einer idealen SiO_2-Oberfläche unter Vernachlässigung der Absorption (gepunktete Linie), für die reale Absorption (durchgehende Linie) und für die erhöhte Absorption (Faktor 2). [Müller]

Befindet sich auf dem Substrat ein dünner Film z.B. eine Lipidmonoschicht, so kommt es im einfachsten Fall zu Interferenzen zwischen der oberen und unteren Grenzfläche des Filmes, die vom einfallenden Winkel abhängen. Damit setzt sich die gemessene reflektierte Intensität aus der Fresnel Reflektivität einer idealen Grenzfläche und den Interferenzeffekten des dünnen Films zusammen. [Braslau 1985]

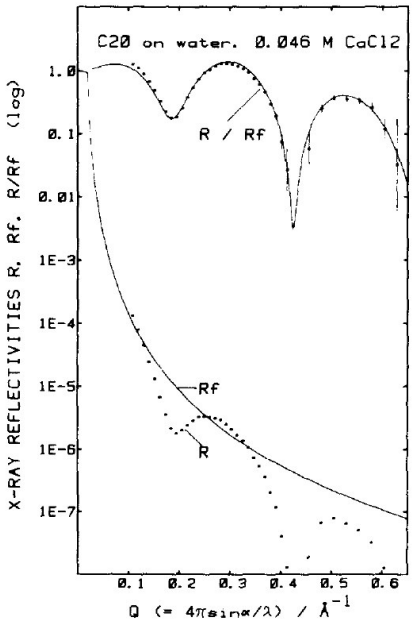


Abb.2.25 Geplottet wurden der Betrag des gestreuten Vektors q_z vs. Reflektivität R, die Fresnel Reflektivität R_F sowie die normierte Reflektivität R/R_F für eine C_{20} Lipid-Monoschicht bei π = 30 mN/m auf Wasser mit 4,6 x 10^{-2} mol L^{-1} $CaCl_2$. [Kjaer 1988]

Wird die gemessene Reflektivität R mit der Frensnel Reflektivität R_F normiert, erhält man Informationen über das Elektronendichteprofil senkrecht zur Oberfläche. In Abbildung 2.25 sind die gemessene Reflektivität R, die Fresnel Reflektivität R_F sowie die normierte Reflektivität R/R_F für eine Lipidmonoschicht dargestellt. Die Oszillationen entstehen aufgrund der Elektronendichteänderungen zwischen Luft/Film und Film/Subphase (Substrat). „Der Höhenunterschied zwischen Minima und Maxima ist umso größer, je größer der Kontrast der Elektronendichte von Kopf und Kette ist.“ [Tippmann-Krayer 1991] Die auffälligen Reflexionsminima entstehen durch die destruktive Interferenz an der Grenzfläche zwischen der Kopfgruppe mit der höheren Elektronendichte und den Alkylketten. Diese Intensitätsminima können zur genauen Bestimmung der Filmdicke genutzt werden. Befindet sich der Film mit konstanter Elektronendichte ρ_f auf einem festen Substrat mit der Elektronendichte ρ_s , so steht die Filmdicke d_f zur Position von $q_{z_{min}}$, dem ersten Minimum in nach Gleichung II-57 bzw. II-57 in Beziehung [Kjaer 1988, Kjaer 1994].

$$d_f = \frac{\pi}{q_{z_{min}}} \text{ für } \rho_f < \rho_s \qquad \textbf{(II-57)}$$

oder

$$d_f = \frac{2\pi}{q_{z_{min}}} \text{ für } \rho_f > \rho_s \qquad \textbf{(II-58)}$$

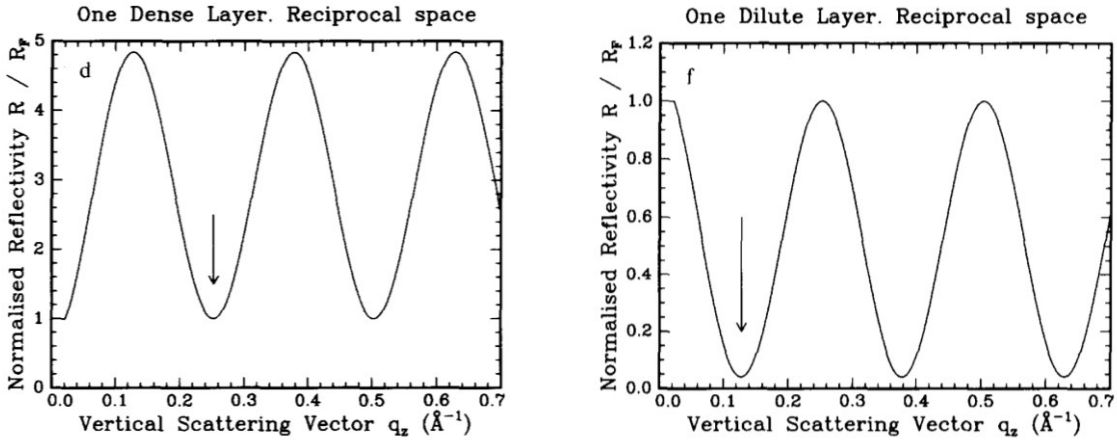


Abb. 2.26 Normierte Reflektivitäten, Links: Die Elektronendichte des Films ist größer als die des Substrates, das erste Minimum ergibt sich aus Gleichung II-58. Rechts: Die Elektronendichte des Films ist kleiner als die des Substrates, das erste Minimum ergibt sich aus Gleichung II-57, die Pfeile zeigen die Position des ersten Minimums. entnommen aus [Kjaer 1994]

Ist der Film jedoch auf einer Wasseroberfläche ist die Situation etwas komplexer. Die Elektronendichte der Alkylketten ist ähnlich der von Wasser. Der Kontrast kommt alleine durch die erhöhte Elektronendichte der Kopfgruppe zustande. Die Filmdicke d_f ergibt sich dann aus der Länge der Alkylketten l_t und des Kopfes l_h nach Gleichung II- 59 (vorausgesetzt $l_h < l_t$). [Kjaer 1994]

$$q_{z_{min}}(l_t + \frac{1}{2}l_h) = \frac{3}{2}\pi \qquad \textbf{(II-59)}$$

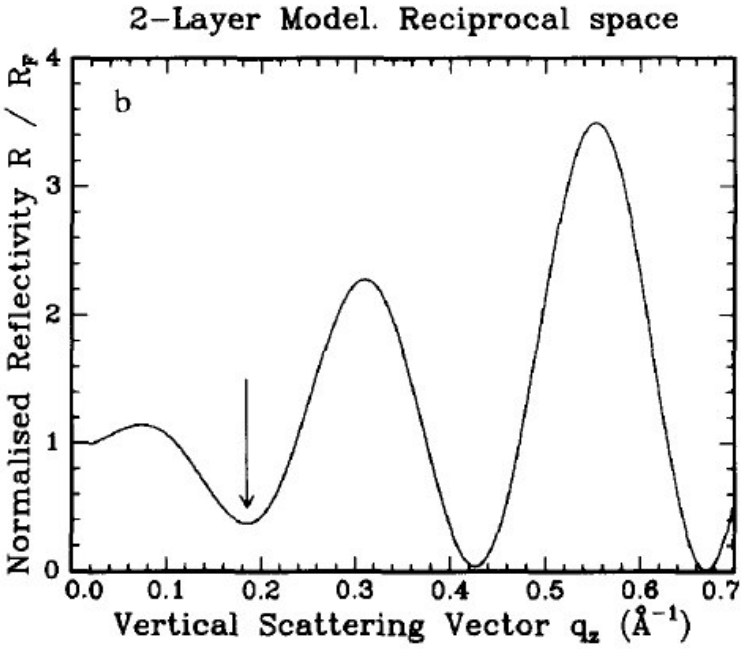


Abb. 2.27 Normierte Reflektivität, Die Elektronendichte des Films ist größer als die des Substrates, das erste Minimum ergibt sich aus Gleichung II-59; entnommen aus [Kjaer 1994]

Durch die Kompression der Monoschicht von der flüssig-expandierten Phase zur flüssig-kondensierten Phase nimmt die Filmdicke zu (aufrichten der Alkylketten). Dies ist durch die Verschiebung des $q_{z_{min}}$ Wertes zu kleineren Werten in Abbildung 2.28 gut sichtbar.

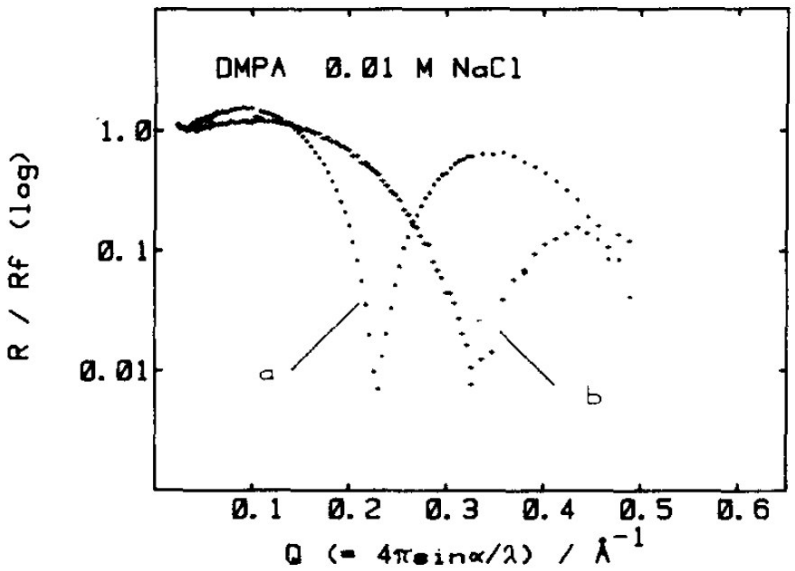


Abb. 2.28 Normierte Röntgenreflexionsdaten einer DMPA Monoschicht von der flüssig-kondensierten Phase (a) und von der flüssig-expandierten Phase (b). Entnommen aus [Kjaer 1988]

Um das vertikale Elektronendichteprofil ρ(z) unserer Lipidmonoschicht zu quantifizieren, wurde eine Näherungsformel, die sogenannte Masterformel verwendet. Die Masterformel für $q_z >> q_c$ in Abhängigkeit vom vertikalen Wellenvektortransfer $q_z = 2k\sin\alpha$ lautet:

$$R(q_z) = R_F(q_z) \times \left| \frac{iq_z}{\rho_\infty} \int \rho(z) \times e^{iq_z z} \mathrm{d}z \right|^2 = R_F(q_z) \times \left| \frac{1}{\rho_\infty} \int \rho'(z) \times e^{iq_z z} \mathrm{d}z \right|^2 \qquad \textbf{(II-60)}$$

$\rho'(z) = \mathrm{d}\rho(z)/\mathrm{d}z$ ist der Gradient der Elektronendichte in Normalenrichtung.

„Die Masterformel besagt, dass die Reflektivität eines Schichtsystems gleich der Intensität der ideal glatten Unterlage ist, mit einem Abfall proportional zu $(1/q_z)^4$ (Fresnel-Reflektivität), moduliert durch das Betragsquadrat der Fouriertransformierten

der Ableitung der Elektronendichte senkrecht zum Substrat.“ [Tippmann-Krayer 1991] Die Herleitung der Masterformel ist z.B. in [Tolan 1999] zu finden.

Um das Elektronendichteprofil einer Lipidmonoschicht zu beschreiben, müssen Modellannahmen für das Dichteprofil getroffen werden. Dafür nimmt man ein Zwei-Box-Modell. Eine Box entspricht der Alkylkette mit einer konstanten Elektronendichte ρ_t und einer Länge l_t. Die andere Box stellt die Kopfgruppe entsprechend mit ρ_h und l_h dar.

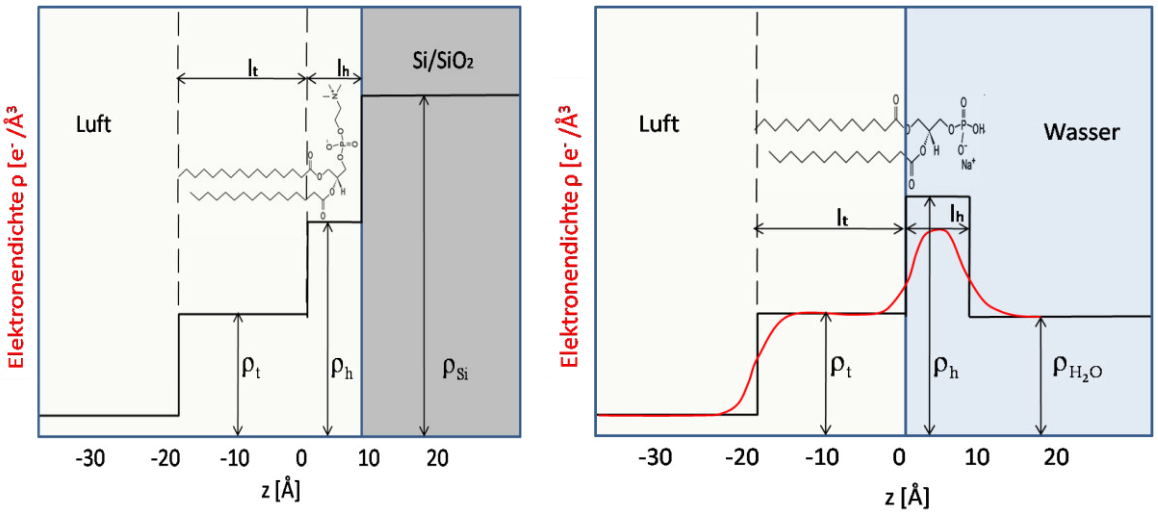


Abb. 2.29 Zwei-Box-Modell für die Elektronendichteverteilung $\rho(z)$ einer Lipidmonoschicht in vertikaler Richtung. Links: DPPC auf Si (SiO_2) $\rho_t < \rho_h < \rho_{Si}$. Rechts: DPPC auf Wasser (mit verschmierten Elektronendichteprofil) $\rho_t \sim \rho_{H_2O}$, $\rho_h >> \rho_{H_2O}$. Entnommen und verändert aus [Tippmann-Krayer 1991]

Der Übergang der Elektronendichte von Luft zu den Alkylketten, Alkylketten zu Kopf und Kopf zum Substrat (Wasser oder z.B. SiO_2) verläuft nicht sprunghaft, wie in Abb. 2.29 (links) dargestellt. Befindet sich die Monoschicht auf Wasser, entsteht aufgrund der Kapillarwellen (3Å) eine Verschmierung. Da dieser Beitrag größer ist, als die Verschmierung durch die Elektronen im Molekül, ist die Verschmierung überall die gleiche.

Man führt daher eine Verschmierung der Elektronendichte an der Grenzfläche entlang der z-Achse zwischen den einzelnen Boxen ein, die sogenannte statistische Grenzflächenrauigkeit (siehe Abb. 2.30). Dies wird häufig durch eine Gausssche-

Fehlerfunktion realisiert. Abbildung 2.30 zeigt die Grenzfläche zwischen den Elektronendichten ρ_j und ρ_{j+1} bei z_0 und die Höhe des Elektronensprunges $\rho_{j+1} - \rho_j$.

Die Rauigkeit zwischen den Boxen bzw. der Grenzfläche wird in Form einer gaussförmigen Verschmierung der Breite σ berücksichtigt.

$$\rho'(z) = \rho_\infty \times \frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}} \times e^{-z^2/(2\sigma^2)} \qquad \textbf{(II-61)}$$

Die Masterformel lautet dann

$$R(q_z) = R_F(q_z) \times e^{-q_z^2 \sigma^2} \qquad \textbf{(II-62)}$$

da die Fouriertransformierte einer Gaußfunktion wieder eine Gaußfunktion ist. Für große q_z wird die Intensität durch die Rauigkeit gegenüber dem idealisierten Modell verringert. Die Verwendung eines sehr glatten Substrats ist daher notwendig.

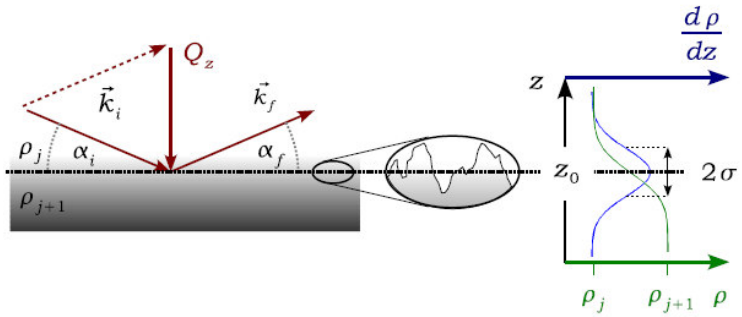


Abb. 2.30 Rauhe Oberfläche statistisch verteilt [Soltwedel 2011]

In dem verwendeten Zwei-Box-Modell besteht „der Elektronendichtegradient $\rho(z)$ aus einer Reihe von Gaußfunktionen, alle mit der gleichen Breite σ und den Maxima bei $z = +l_t$, 0 und $-l_h$. Die Höhe der Maxima ist gegeben über die Differenz der Elektronendichten zweier aufeinanderfolgender Boxen.“ [Tippmann-Krayer 1991]

Die reflektierte Intensität wird mit der aus der Masterformel berechneten Funktion angefittet:

$$\frac{R(q_z)}{R_F(q_z)} = e^{-q_z^2\sigma^2} \times \left| \frac{1}{\rho_\infty} \times \left[\rho_t \times e^{-iq_z l_t} + (\rho_h - \rho_t) + (\rho_\infty - \rho_h) \times e^{iq_z l_h} \right] \right|^2 \qquad \textbf{(II-63)}$$

Aus dem besten Fit erhält man zum einen die einzelnen Parameter der verschiedenen Boxen und zum anderen die Parameter der Grenzflächen. Diese Fitdaten können mit dem Molekülmodell verglichen werden. So ergibt sich z.B. die Länge der Alkylketten in all-trans Konfiguration aus dem mittleren Abstand zweier CH_2-Gruppen von 1,265 Å und der endständigen Bindungslänge die etwas größer ist, nach Gleichung II-64.

$$l_t = \left(n_{CH_2} + \frac{9}{8} \right) \times 1,265\,\text{Å} \qquad \textbf{(II-64)}$$

Veränderungen der Elektronendichte z.B. durch Adsorption von Gegenionen oder durch chemische Reaktionen sowie Veränderungen der Filmdicke sind somit beobachtbar. Weiterhin lassen sich aus den Box-Parametern das Volumen und die Zahl der Elektronen pro Fläche ausrechnen und mit den Werten der zu untersuchenden Molekülen vergleichen. Aus den Messungen mit dem Langmuir-Trog ist die Fläche A pro Molekül bekannt, damit ergeben sich Volumen V_{Ges} und Elektronenzahl E_{Ges} aus Gleichung II-65 und II-66.

$$V_{\text{Ges}} = A\sum l_{\text{j}} = V_{\text{Mol}} + n_{\text{I}}V_{\text{I}} + n_{H_2O}V_{H_2O} \qquad \textbf{(II-65)}$$

$$E_{\text{Ges}} = A\sum l_{\text{j}}\rho_{\text{j}} = E_{\text{Mol}} + n_{\text{I}}E_{\text{I}} + n_{H_2O}E_{H_2O} \qquad \textbf{(II-66)}$$

Für die Anzahl der eingelagerten Ionen bzw. Moleküle aus der Subphase steht n_{I} bzw. n_{H_2O}. Die Indizes Mol steht für das aufgebrachte Molekül, I für eingelagerte Ionen bzw. H_2O für Wasser. V_{I} und V_{H_2O} lassen sich aus der Dichte der Salzlösungen bzw. von Wasser bestimmen. Die Elektronenzahlen E_{I} und E_{H_2O} erhält man aus den Strukturformeln. V_{Mol} erhält man aus der Literatur bestimmt aus Molekülorbital-rechnungen oder aus der Dichte von Lösungen bzw. von Volumenphasen bzw. durch Extrapolation von Werten strukturell ähnlicher Moleküle. [Ahrens 2005] Aus Gleichung II-65 und II-66 lassen sich zwei Unbekannte errechnen. Befindet sich das Lipid auf einer reinen Wasseroberfläche ($n_{\text{I}} = 0$) so kann man das Molekülvolumen V_{Mol} und die Hydratation n_{H_2O} berechnen. Will man jedoch die Ein- bzw. Anlagerung der Gegenionen berechnen z.B. geladenes Lipid und Ca^{2+} Ionen, muss das Molekülvolumen bekannt sein.

2.9.4.2 Röntgendiffraktion

In der Röntgendiffraktion werden mithilfe des evaneszenten Strahls lateral periodische Strukturen von Oberflächen untersucht. Der gestreute Strahl wird jedoch im Vergleich zur Röntgenreflektion nicht in der Einfallsebene detektiert. Dies wird als Grazing Incidence Diffraction – GID bezeichnet. Die Streugeometrie ist in Abbildung 2.31 dargestellt.

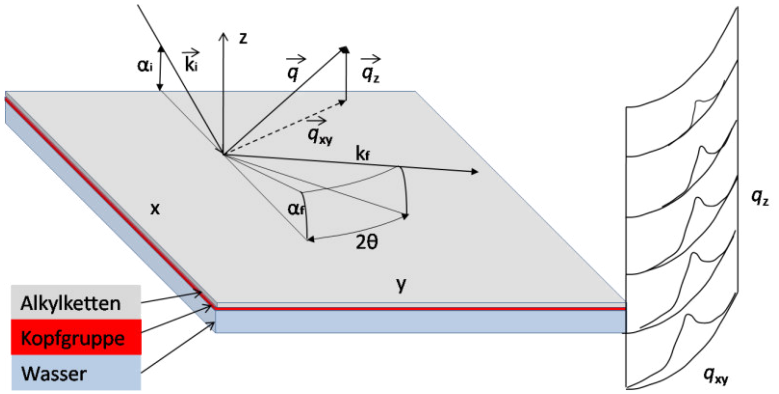


Abb. 2.31 Streugeometrie der Diffraktion bei streifendem Einfall

Der Einfallswinkel α_i bleibt konstant und liegt unterhalb des kritischen Winkels der Totalreflektion mit $\alpha_i = 0{,}85\alpha_c$. Dadurch kommt es zur Totalreflektion und nur eine evaneszente Welle dringt in das Substrat ein. Aufgrund der geringen Eindringtiefe wird ebenfalls die Hintergrundstreuung der Subphase reduziert. Der Winkel zwischen dem gebeugten Strahl und der Oberfläche ist α_f, der Winkel in der Horizontalen zwischen einfallendem und ausfallendem Strahl ist 2θ. Diese spezielle Streugeometrie macht die Röntgenstrahlung sehr oberflächensensitiv. Aufgrund der schwachen Wechselwirkung und der sehr geringen Menge an Lipidmolekülen (10^{16} Moleküle) und die damit verbundene niedrig reflektierte Intensität werden hohe Strahlungsintensitäten und eine ungefähr 100 mm^2 große Fläche benötigt. Die Primärstrahlintensität herkömmlicher Röntgenröhren ist zu niedrig, daher werden Röntgendiffraktionsmessungen auf Wasseroberflächen z.B. im **Ha**mburger **Sy**nchrotron **Lab**or (HASYLAB) am **D**eutschen **E**lektronen**sy**nchrotron (DESY) oder in Grenoble im **E**uropean **S**ynchrotron **R**adiation **F**acility (**ESRF**) durchgeführt. [Als-Nielsen 1989, Günther 2009]

Bilden diese Lipide an der Wasser/Luft-Grenzfläche geordnete Strukturen bzw. ein regelmäßiges Gitter aus, so können bei Erfüllung der entsprechenden Bragg Bedingung $\lambda=2d_{hk}\sin\Theta_{hk}$, Braggpeaks die um den Winkel 2θ außerhalb der von einfallendem und reflektiertem Strahl aufgespannte Ebene liegen ($\alpha_i = \alpha_f < \alpha_c$) beobachtet werden. Bei dieser Experimentieranordnung findet der entsprechende Impulsübertrag $q = k_f - k_i$ zwischen einfallenden und gebeugten Strahl hauptsächlich in horizontaler Richtung statt. Da es sich dabei um einen elastischen Stoß handelt, bleibt die Energie erhalten und $|k_i| = |k_f|$.

Eine Lipid-Monoschicht setzt sich aus vielen kleinen „Kristalliten" zusammen (siehe BAM oder Fluoreszenzmikroskopie), wobei die Alkylketten der einzelnen „Kristalliten" unterschiedliche Orientierungen aufweisen. Da diese auch noch sehr dünn sind (~3 nm), spricht man von einer zweidimensionalen Pulverprobe. Dies ist der Grund warum man nur die vertikale Komponente q_z des gestreuten Vektor q separat messen kann. Die in-plane Komponente q_x und q_y wird dagegen als Kombination q_{xy} gemessen, genauer gesagt der Betrag von q_{xy}.

Der gestreute Vektor q setzt sich dann aus einer horizontalen Komponente q_{xy} mit

$$q_{xy} = k_0\sqrt{\cos^2\alpha_i + \cos^2\alpha_f - 2\cos\alpha_i\cos\alpha_f\cos 2\theta} \approx 2k_0\sin(\theta) \qquad \textbf{(II-67)}$$

und einer vertikalen Komponente q_z

$$q_z = \frac{2\pi}{\lambda}\left(\sin\left(\alpha_i\right) + \sin\left(\alpha_f\right)\right) \approx k_0\left(\alpha_f + \alpha_i\right) \qquad \textbf{(II-68)}$$

zusammen.

Vereinfacht: $q = (q_{xy}, q_z) \sim (2k\sin\theta, k(\alpha_f + \alpha_i))$ **(II-69)**

Um Braggreflexe beobachten zu können muss der horizontale Impulstransfer q_{xy} mit einem zweidimensionalen reziproken Gittervektor ($G_{hk} = 2\pi/d$ (hk sind die Millerindices)) des 2D-Gitters übereinstimmen.

$$q_{xy} = G_{hk} \qquad \textbf{(II-70)}$$

Da die Lipidmonoschicht eine 2D-Pulverprobe ist, gibt es immer Kristallite bzw. Lipid-Domänen, die diese Bragg-Bedingungen erfüllen und ihren Anteil zur Diffraktion beitragen. Es ist die periodische Anordnung (meistens hexagonal) der Kohlenwasserstoffketten die für die Braggbeugung verantwortlich sind. Diese können als lang gestreckte Zylinder mit dem Durchmesser D und der Länge $2l$ als vereinfachtes Modell beschrieben werden (siehe Abb. 2.32). [Kjaer 1989, Helm 1991]

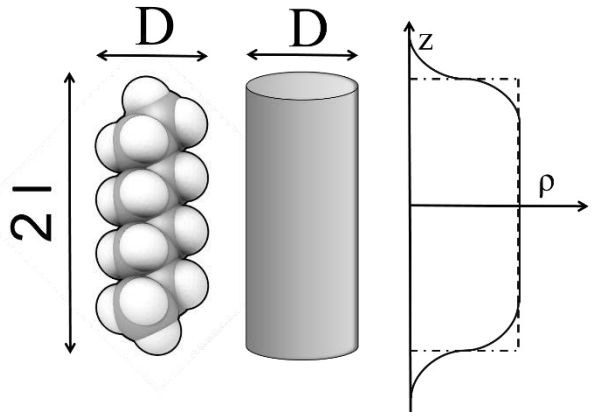


Abb. 2.32 Näherung von Alkylketten durch einen Zylinder der Länge 2*l*. Dichteprofil entlang der Zylinderachse.

Im reziproken Raum werden die Alkylketten als eine Scheibe, auch reziproke Scheibe genannt, mit der Dicke π/l und dem Durchmesser $2\pi/D$ dargestellt. Diese kann mathematisch auch als Formfaktor der Einheitszelle nach Gleichung II-71 beschrieben werden.

$$\left|F_{\mathrm{F}}(q)\right|^2 = \left|\int_{V_{\mathrm{E}}} d^3 r \rho(r) e^{-iqr}\right|^2 \propto \text{Funktion von } l \qquad \textbf{(II-71)}$$

$F_{\mathrm{F}}(q)$ ist die Fouriertransformierte der Ladungsdichtemodulation innerhalb einer Einheitszelle.

Die laterale Ordnung der Alkylketten wird durch den Strukturfaktor[6] beschrieben. „Der Strukturfaktor eines zweidimensionalen Gitters moduliert die Intensität nur in der Gitterebene. Der q_z-Bereich ist durch den Strukturfaktor nicht eingeschränkt, so dass die

[6] auch als Gittersumme bezeichnet, spiegelt die räumliche Anordnung der Streuzentren innerhalb des Kristalls wieder.

Braggbedingung für alle Punkte einer Geraden (Braggrod) senkrecht zur Gitterebene erfüllt wird. Eine Intensitätseinschränkung entlang des Braggrods kann sich demnach nur aus dem Formfaktor der Einheitszelle ergeben.“ [Günther 2009]

Misst man entlang einer Braggrod d.h. der Ausfallswinkel α_f wird bei konstanten Einfallswinkel α_i variiert, nimmt die Intensität mit zunehmendem Austrittswinkel ab, wodurch die Dicke der Monoschicht bestimmt werden kann. [Göbel 1989] Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Ketten senkrecht stehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verteilung der gestreuten Intensität im reziproken Raum abhängig ist vom Form- und Strukturfaktor.

$$I(q) \propto \left| \int d^3 r \rho(r) e^{-iqr} \right|^2 = \left| \sum_{R_m} e^{iqR_m} \int_{V_E} d^3 r \rho(r) e^{-iqr} \right|^2 = \left| S_F(q) \right|^2 \left| F_F(q) \right|^2 \qquad \textbf{(II-72)}$$

Das Beugungsbild einer Monoschicht setzt sich aufgrund der meist dichten hexagonalen Packung der Moleküle in erster Linie aus sechs erste- Ordnungspeaks zusammen, die dem Abstand zwischen den Nachbarketten entsprechen (siehe Abb. 2.33). Peaks höherer Ordnung sind bei Lipidmonoschichten die Ausnahme. Dies wird damit begründet, dass die Peakintensität mit zunehmendem Impulsübertrag aufgrund von Gitterfehlern stark abnimmt. [Kaganer 1995]

Die Schnittpunkte der Braggrods erster Ordnung mit der reziproken Scheibe ergeben drei Paare von Diffraktionmaxima mit dem Wellenvektor $\pm K_1$, $\pm K_2$, $\pm K_3$. Stehen die Alkylketten senkrecht zur Wasseroberfläche, liegt die reziproke Scheibe und alle Peakmaxima in einer Ebene der Monoschicht. Alle sechs Wellenvektoren haben die gleiche Länge und überlagern sich. Sie sind dreifach entartet. Es ist nur ein Peak erster Ordnung beobachtbar (Abb. 2.33A).

Die Entartung der Peaks wird auf zwei Wegen aufgehoben. Entweder durch Verzerrung des hexagonalen Gitters oder durch Neigung der Alkylketten. Durch die Verzerrung erhält man insgesamt zwei erste Ordnungspeaks (Abb. 2.33B). Der eine Peak setzt sich dann aus zwei nicht entarteten Wellenvektoren $\pm K_n$ und der andere aus 4 entartete Peaks $\pm K_d$ zusammen. Die Indices d und n stehen für degenerated (entartet) und nondegenerated (nicht entarted). Der q_z Wert beider Peaks ist Null.

Sind die Alkylketten geneigt, was eine Neigung der reziproken Scheibe aus der Monoschicht Ebene entspricht, wird die Entartung der 6 Wellenvektoren ebenfalls aufgehoben. Die Peaks bewegen sich aus der Ebene der Monoschicht mit einem

bestimmten Betrag von q_z heraus. q_z ist abhängig vom Neigungswinkel und seinem Azimuth bzw. der Richtung.

Sind die Alkylketten zum nächsten Nachbar geneigt (NN) sind zwei Peaks in der Ebene und die anderen vier außerhalb, zwei oberhalb und zwei unterhalb der Ebene. Die beiden unteren Peaks würden unterhalb der Wasseroberfläche liegen und sind somit nicht beobachtbar.

Die beiden oberen Peaks haben die gleiche q_z Komponente und sind damit entartet. Zwei Peakpaare sind beobachtbar bei $q_{nz} = 0$ und $q_{dz} \neq 0$. Die q_z –Werte der zwei Peaks liegen im Verhältnis q_{nz}:q_{dz} = 0:1 vor (Abb. 2.33 C) Der Neigungswinkel ergibt sich dann aus:

$$\tan t_a = \frac{q_z^d}{\sqrt{(q_{xy}^d)^2 - (q_{xy}^n / 2)^2}} \text{.[de Meijere 1997]} \qquad \textbf{(II-73)}$$

Sind dagegen die Alkylketten zum übernächsten Nachbarn geneigt (next-nearest-neighbor NNN) liegen alle Peaks außerhalb der Monoschichtebene (Abb. 2.33 D). Die q_z –Werte der zwei Peaks liegen im Verhältnis q_{nz}:q_{dz} = 2:1 vor. Damit ergibt sich der Neigungswinkel für $q_{nz} \neq 0$ aus

$$\tan t_a = \frac{q_z^n}{q_{xy}^n}. \qquad \textbf{(II-74)}$$

„Fällt der Neigungswinkel nicht in eine Symmetrieebene entsteht ein monoklines Gitter und es treten drei nichtentartete Diffraktionspeaks auf (Abb. 2.33 E).“ [Ahrens 2005] Der Neigungswinkel wird dann nach der allgemeineren Formel (Gleichung II-75) berechnet. [Kjaer 1994]

$$q_z^{(hk)} = q_{xy}^{(hk)} \times \cos(\Psi_{(hk)}^*) \times \tan t_a \qquad \textbf{(II-75)}$$

q_z und q_{xy} entsprechen den Peakpositionen und $\psi^*_{(hk)}$ ist der Neigungsazimut zwischen Neigungsrichtung und den reziproken Gittervektor (siehe Abb.2.34).

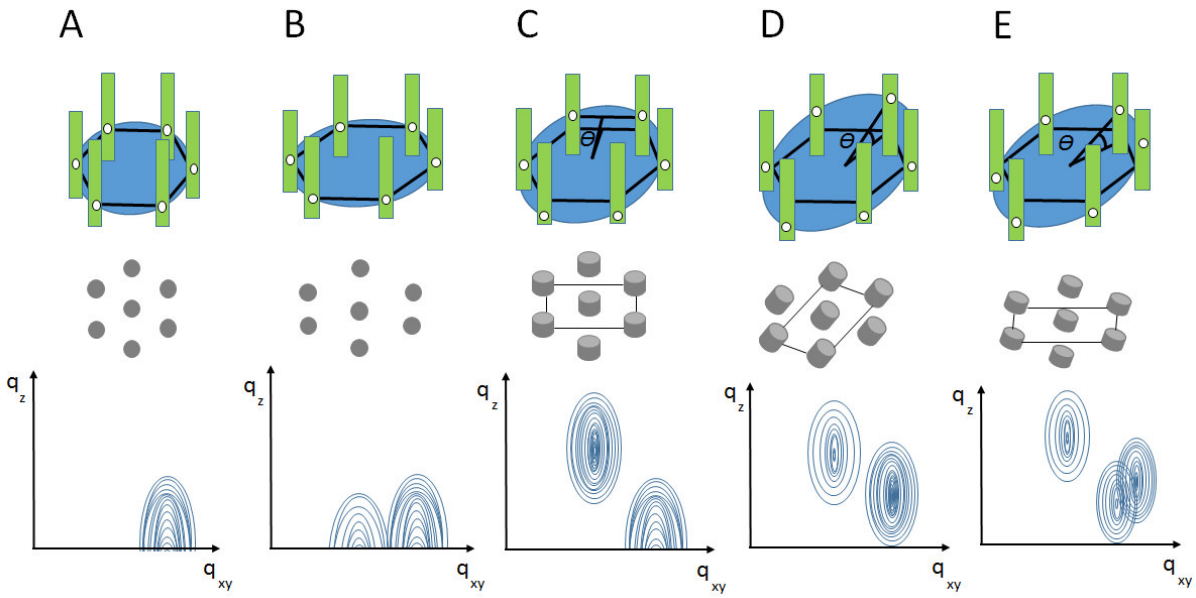


Abbildung 2.33: Darstellung von Alkylketten als angenäherte Zylinder im reziproken (oben) und realen (mitte) Raum. Die zugehörige Streuung in Höhenlinien-darstellung (unten). Abnehmende Symmetrie von links nach rechts. A: Hexagonales Gitter mit senkrechten Ketten; B: verzerrtes hexagonales Gitter mit senkrechten Ketten; C: Orthogonale Symmetrie bei Neigung in Richtung des nächsten Nachbarn (NN) und D: bei Neigung in Richtung des übernächsten Nachbarn; E: Monoklines Gitter bei asymmetrischem Neigungswinkel. Entnommen und verändert aus [Kaganer 1999]

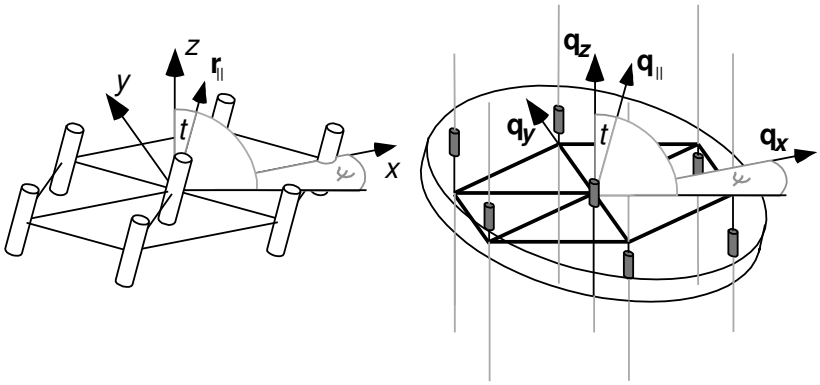


Abbildung 2.34: Hexagonal angeordnete, gekippte Zylinder. Links: Kippwinkel im Realraum. Rechts: Gitter, Braggrods und zentrales Maximum des Formfaktors im reziproken Raum. Die Scheibe entspricht dem Formfaktor. Die kleinen grauen Zylinder sind die Schnittpunkte der Braggrods mit der Scheibe. [Ahrens 2005]

Durch die quantitative Analyse der Peaks kann die laterale Struktur der Monoschicht identifiziert werden. Die Braggpeaks erhält man durch Integration der gebeugten Intensität über ein bestimmtes q_z Fenster. Um genaue Messwerte zu erhalten wird die gebeugte Intensität von einigen Forschern korrigiert in Bezug auf Polarisation, der effektiven Fläche und unter Berücksichtigung des Lorenzfaktors. [Stefaniu] Da der Einfluss dieser Größen jedoch sehr gering ist wird die Korrektur häufig nicht durchgeführt. Aus den Bragg Peaks können drei wesentliche Informationen bzw. drei Eigenschaften der Monoschicht quantifiziert werden:

1. Aus dem Peakmaximum $q_{xy_{max}}$ lässt sich die Gitterkonstante d_{hk} der lateralen kristallinen bzw. quasi-kristallinen Struktur der Monoschicht aus der Bragg-Bedingung ($q_{xy} = G_{hk}$) mit $q_{xy} = 2k\sin\theta$ berechnen.

$$q_{xy_{max}} = 2k\sin\theta = G_{hk} = 2\pi / d_{hk} \quad \textbf{(II-76)}$$

$$d_{hk} = \frac{2\pi}{q_{xy\max}} = \frac{\lambda}{2\sin\theta} \quad \textbf{(II-77)}$$

   Um das Peakmaximum $q_{xy_{max}}$ zu bestimmen wird der Bragg Peak mit einer Lorenzfunktion angefittet.

2. Die Breite des lorenzförmigen Peaks enthält Informationen über die lateral periodische Struktur der Monoschicht. Damit ist es möglich die Korrelationslänge, den Bereich über den die Struktur erhalten bleibt, zu bestimmen.

$$\zeta_L = \frac{2}{\Delta q_{FMHM}} \quad \textbf{(II-78)}$$

3. Aus $q_{z_{max}}$ kann der Neigungswinkel bestimmt werden (Gleichung II-73 bis II-75). Es sei angemerkt, das die Intensität entlang der Braggrods vom Neigungswinkel der Alkylketten abhängt. [Stefaniu 2014] $q_{z_{max}}$ erhält man indem man den Bragg Peak mit einer Gaussfunktion anfittet. Aus dem ermittelten Neigungswinkel und

der Fläche pro Molelül A_m (entnommen aus der Isotherme) kann die Querschnittsfläche des Moleküls A_0 nach Gleichung II-79 bestimmt werden.

$$A_0 = A_m \times \cos t_a \quad \textbf{(II-79)}$$

2.9.5 IR Spektroskopie

IR-Spektroskopie ist eine Messtechnik, die es unter anderem ermöglicht den Aufbau und das Verhalten verschiedener Lipidmodellmembranen, Peptiden und Proteine zu analysieren. [Casal 1984, Blume 1996, Mendelsohn 2010, Blume 2013]
Durch die Absorption von infraroter Strahlung durch IR-aktive Moleküle[7] werden diese zum Schwingen angeregt wodurch sich die Rotations- und Schwingungsenergien ändern. Die Absorptionspeaks entsprechen den Schwingungsfrequenzen zwischen den Atomen eines Moleküls aus dem die Substanz besteht. Aufgrund der Lage und Form der auftretenden charakteristischen Banden im IR-Spektrum ist es möglich die Struktur von unbekannten Substanzen und deren Wechselwirkung aufzuklären sowie quantitative Aussagen über diese zu treffen. Die wichtigsten IR-Absorptionsbanden für Lipide sind z.B. CH_2-Streckschwingungsbanden der Alkylketten oder die Carbonyl- bzw. Phosphatschwingungsbanden der Phospholipidkopfgruppen. In Tabelle II-8 sind die wichtigen IR-aktiven Schwingungsbanden von Lipiden zusammengefasst.

Tabelle II-8 IR-aktiven Schwingungsbanden von Lipiden, Peptiden und Proteine [Mendelsohn 1986, Lewis 1996]

Schwingungen	Wellenzahl in (cm^{-1})	Symbol
Symmetrische PO_2^- Streckschwingung	1085-1110	$\upsilon_s(PO_2^-)$
Antisymmetrische PO_2^- Streckschwingung	1200-1260	$\upsilon_{as}(PO_2^-)$
C=O Streckschwingung	1730-1740	υ (CO)
Symmetrische CH_2 Steckschwingung	2843-2863	$\upsilon_s(CH_2)$
AntisymmetrischeCH_2 Steckschwingung	2916-2936	$\upsilon_{as}(CH_2)$

[7]Das bedeutet, dass das Molekül entweder ein veränderbares oder ein induzierbares Dipolmoment aufweist. In Molekülen mit Schwingungen symmetrisch zum Symmetriezentrum treten keine Änderungen des Dipolmoments auf (IR-inaktiv). Solche „verbotenen“ Schwingungen sind allerdings oft ramman aktiv.

Die IR-Spektroskopie hat sich im Laufe der Zeit stark weiter entwickelt. Dies gilt vor allem für die Entwicklungen des Spektrometers, vom konventionellen dispersiven- bis hin zum fast Fourier-Transform-Spektrometer. Ein großer Schritt wurde auch bei der Entwicklung von thermischen- bis zu den hochempfindlichen photoelektrischen Detektoren getan. [Günzler 2012]
Neben den typischen Transmissionsmessungen existieren heute unter anderem auch Reflexionsmessungen. Die letztere unterteilt man in äußere- dazu gehört die Infrarot-Reflexion-Absorption-Spektroskopie (IRRAS) und die innere Reflexion z.B. die abgeschwächte Totalreflexion (ATR, attenuated total reflection).
Diese drei IR-Spektroskopie-Techniken ermöglichen es verschiedene Modell-membranen und deren Wechselwirkung z.B. mit Radikalen zu untersuchen. So werden mit der Transmissionsmessung vor allem Experimente mit Liposomen als Modellmembranen untersucht. Die IR-ATR Technik eignet sich ebenfalls um Liposomen aber auch Bilayer (durch Vesikelfusion hergestellt) zu spektroskopieren. [Chen 2008] Ob es zur Vesikelfusion kommt oder nicht hängt von der Oberfläche des Substrates ab. Mehrere Studien haben mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie [Nollert 1995, Cremer 1999], AFM [Reviakine 2000, Richter 2003, Jung 2006] und QCM [Keller 1998, Reimhult 2002] gezeigt, dass die Liposomen unbeschädigt bleiben, wenn sie auf TiO_2 oder Gold adsorbieren, während sie auf Silizium, Glas oder Mica (Glimmer) aufreißen und einen Bilayer bilden. [Reimhult 2002, Chen 2008]

Die abgeschwächte Totalreflexion (ATR, attenuated total reflection) ist ein Beispiel für die innere Reflexion, bei der die IR-Strahlung von einem Medium mit hohem Brechungsindex auf die Grenzfläche zu einen optisch dünneren Medium total reflektiert wird. Dies ist der Fall wenn der Einfallswinkel den Grenzwinkel der Totalreflexion übersteigt. [Günzler 2012]
Ein Teil der Strahlung tritt dennoch hinter der reflektierenden Grenzfläche ein und breitet sich als evaneszente Welle aus. Bildet die zu untersuchende Probe das dünnere Medium, so kann die evaneszente Welle mit dieser wechselwirken. Wird Energie dabei absorbiert ergeben sich ähnliche spektrale Abhängigkeiten wie bei Transmissions-spektren. [Kerth 2003] Die reflektierte Strahlung wird dabei abgeschwächt, woraus sich auch der Name ATR dieser Technik ableitet.
Die Intensität der Strahlung nimmt von der Oberfläche des internen Reflexionselements exponentiell ab und beträgt damit nur wenige Wellenlängen, womit das ATR-Spektrum

unabhängig von der Probendicke ist, sodass dicke und stark absorbierende Proben schnell und einfach spektroskopiert werden können.

$$I(z) = I_0 \times e^{-z/d_p} \qquad \textbf{(II-80)}$$

Die Eindringtiefe d_p ist abhängig von der Wellenlänge und vom Einfallswinkel der Strahlung sowie von den beiden Brechungsindices.

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \alpha_i - n_{21}^2)^{1/2}} \qquad \textbf{(II-81)}$$

Verwendung als ATR-Kristall finden hierbei bestimmte Materialien, wie z. B. Germanium oder Zinkselenid mit entsprechend hohen Brechungsindices von n = 4,0 bzw. n = 2,4.

2.9.5.1 Infrarot- Reflektions- Absorptions- Spektroskopie (IRAAS)

Mit IRRAS Messungen kann man dagegen Lipidmonoschichten untersuchen, quasi die Hälfte einer Zellmembran. IRRAS ist seit den 80iger Jahren eine etablierte Untersuchungsmethode von Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche, die Informationen über Zusammensetzung und Aufbau auf molekularer Ebene liefern kann. Es ist möglich die Konformationen (trans oder gauche) und Orientierung (Neigungswinkel) der Alkylketten zu bestimmen. Ebenfalls kann man Informationen über die Protonierung und Deprotonierung von Lipidkopfgruppen und die daraus resultierenden Veränderungen der Wasserstoffbrückenbindungen erhalten. Wechselwirkungen mit Stoffen in der Subphase wie z.B. Ionen oder wasserlöslichen Peptiden und Proteinen (keine Membranproteine) [Maget-Dana 1999] und die dabei auftretenden Sekundärstruktur- und Orientierungsänderungen von Proteinen und Lipiden können untersucht werden. [Mendelsohn 1995] Das gleichzeitige Aufnehmen der π/A-Isothermen und IRRA-Spektren ermöglicht es die Veränderungen auf molekularer Ebene bei unterschiedlichen Phasenzustanden zu analysieren. Die Spektren können auch zeitabhängig, entweder bei konstant gehaltener Fläche oder bei konstantem

Druck gemessen werden. Anwendungen findet dies bei Adsorptionsexperimenten z.B. von Peptiden, Proteinen oder von Ionen. Aber auch Experimente bei denen es zu chemischen Veränderungen der Lipide kommt wie z.B. die Interaktion mit Phospholipasen [Wagner 2007] oder in unserem Fall mit Radikalen [Gröning 2011] können zeitabhängig beobachtet werden.

Wie oben schon erwähnt sind die wichtigsten IR-Absorptionsbanden für Lipide die CH_2-Streckschwingungsbanden der Alkylketten, die Carbonyl- bzw. die symmetrische und asymmetrische Phosphatschwingungsbanden der Phospholipidkopfgruppen.

Tabelle II-9 IR-Absorptionsbanden für Lipide

CH_2 sym.	2849-2854 cm^{-1}	Qualitative Marker für Alkylkettenkonformation
CH_2 asym.	2916-2924 cm^{-1}	Qualitative Marker für Alkylkettenkonformation
C=O (ester)	1710-1740 cm^{-1}	Hydration und H-Brückenbindungensensitiv
PO_2^- asym	1220-1250 cm^{-1}	Ionenbindungen und Hydratationsensitiv
PO_2^- sym	1090 cm^{-1}	Ionenbindungen und Hydratationsensitiv

Die Intensität und Form der Reflexion/Absorptionsbande hängt unter anderem ab: vom Absorptionskoeffizenten, von der Orientierung der Übergangsdipole innerhalb des Moleküls, vom Neigungswinkel der Alkylketten, von der Polarisation und dem Einfallswinkel des einfallenden Strahls sowie von der Schichtdicke und von den Brechungsindices. [Stefaniu 2014]

Aufgrund dieser Gegebenheiten ist es möglich die Daten qualitativ und quantitativ auszuwerten und zu interpretieren. Dafür sollten nur die intensivsten Banden, z. B. die der CH_2 -Valenzschwingungen herangezogen werden.

Die Position der antisymmetrischen- und symmetrischen CH_2 Streckschwingungen ist konformationsabhängig. In der flüssig-kondensierten Phase befinden sich die Methylengruppen in der all-trans-Konformation und der Peak tritt bei ca. 2849 cm^{-1} auf.

Wird die Monoschicht expandiert oder die Temperatur erhöht nimmt die Anzahl der gauche Konformeren zu und die Wellenzahl verschiebt sich um ca. 2,5 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen. Weiterhin nimmt die Peak Intensität ab und die Peakbreite nimmt zu. Dadurch ist eine qualitative Abschätzung des trans/gauche Verhältnisses der Alkylketten bei einer Phasenumwandlung möglich. [Lewis 2013]

Der Neigungswinkel der Alkylketten kann quantitativ durch die Messungen der Intensität der CH_2-Streckschwingungsbanden mit s- und p-polarisierten IR-Strahl als Funktion des Einfallswinkels bestimmt werden. Hierfür müssen die Schichtdicke und der Brechungsindex bekannt sein. Diese Informationen können über die Analyse der OH-Streckschwingungsbande bei hohen Wellenzahlen (3800-3000 cm^{-1}) bestimmt werden. Diese Parameter werden als Konstanten angenommen, mit deren Hilfe man simulierte Spektren an die gemessenen Banden anfittet, um Informationen über die Orientierung der Moleküle zu erhalten. [Stefaniu 2014] In der Dissertation von Kerth, A. 2003 wird ausführlich auf die Bestimmung der Neigungswinkel von Molekülen an der Wasser/Luft-Grenzfläche eingegangen.

Die Ester Streckschwingung C=O besteht aus zwei überlappenden Peaks. Der eine Peak ist bei 1740 cm^{-1} und der andere bei 1726 cm^{-1}. Der hochfrequente Anteil der Bande entspricht eine Carbonyl- Gruppe die nicht mit Wasserstoff verbunden ist. Man spricht von einer freien Carbonylgruppe. Dagegen ist der Anteil mit der kleineren Frequenz einer Wasserstoff- gebundenen Carbonylgruppe zugeordnet. Je nach Neigungswinkel der Alkylketten nimmt der Anteil der freien Carbonylgruppen zu bzw. ab.

Die Lage der asymmetrischen Phosphat-Schwingungsbanden ist ein Indikator für Wasserstoffbrückenbindungen. Die Bindung von Ionen an Lipiden ist durch eine Verschiebung der asymmetrischen Phosphat-Schwingungsbande zu einer größeren Wellenzahl beobachtbar. [Estralda-Lopis 2001]

2.9.5.2 IRRAS Messprinzip

Trifft IR-Strahlung auf eine Monoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche wird aufgrund des sehr geringen Reflexionsvermögens von Wasser im IR-Bereich nur ein kleiner Anteil (6%) der Strahlung von den molekularen Bestandteilen der Oberfläche absorbiert, reflektiert und detektiert. Der größere Strahlenanteil wird in die Lösung hinein gebrochen und von den Wassermolekülen absorbiert. [Mendelsohn 2010] Die Eindringtiefe des einfallenden IR-Strahls in die Wasserphase ist einige 100 nm gering, so dass nur an der Oberfläche lokalisierte Moleküle detektierbar sind. [Blume 2013] Ein Problem von IRRAS Messungen sind die starken Absorptionsbanden des flüssigen Wassers sowie des Wasserdampfs, die wichtige Absorptionsbanden der Probe (N-H, C=O, C-N) überdecken können. [Flach 1994] Um dieses Problem zu überwinden wurden zwei Techniken entwickelt. Die erste Technik ist die sogenannte Trog-Shuttles-Technik (Abb. 3.1). Bei dieser Methode besteht der Langmuirtrog aus zwei Teilen, dem Referenz- und dem Probentrog zwischen denen innerhalb kürzester Zeit Referenz- und Probenspektrum abwechselnd gemessen werden können. Daraus erhält man schließlich ein Differenzspektrum ohne Wasserdampfabsorption. Das IRRA Spektrum wird als Absorbanz (Reflexionsgrad-Absorption (RA)) vs. Wellenzahl dargestellt. Wobei RA definiert ist als $-\lg(R/R_0)$. R ist der Reflexionsgrad der filmbedeckten Oberfläche und R_0 ist der Reflexionsgrad der filmfreien Subphase.

Die zweite Technik ist die Polarisation-Modulations (PM) -IRRA Spektroskopie. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass bei einer Reflexion an einem anisotropen Medium z.B. ein Lipid auf einer Wasser/Luft-Grenzfläche die Absorption polarisationsabhängig ist. P-polarisiertes Licht wird bevorzugt absorbiert und s-polarisiertes Licht stärker reflektiert. Bei einem isotropem Medium (Wasser, Wasserdampf etc.) ist die Absorption polarisationsunabhängig. Wird die Differenz zwischen den p- und s-polarisierten Spektren gebildet, wird das Hintergrundsignal, welches von Umgebungsbedingungen wie z.B. Wasserdampf und CO_2 oder von instrumentalen Drifts und Fluktuationen kommt, fast vollständig eliminiert. Dazu wird der einfallende IR-Strahl mit Hilfe eines photoelastischen Modulators mit sehr hoher Frequenz (kHz) polarisiert (s- und p-polarisiert). Der reflektierte IR-Strahl wird elektronisch gefiltert und mit einem Lock-In Verstärker demoduliert. Das Differenzspektrum wird nach Gleichung II-82 berechnet.

$$\Delta R / R = \frac{(R_P - R_S)}{(R_P + R_S)} \qquad \textbf{(II-82)}$$

Beide IRRAS Methoden haben Vor- und Nachteile. Die Shuttle-Trog Technik ist unkompliziert und benötigt nur minimale Veränderungen des optischen Weges des Spektrometers. Ein Nachteil ist, dass die Luftfeuchtigkeit über der Monoschichtoberfläche nicht die gleiche wie oberhalb des Referenztrogs sein muss. Dadurch ist es manchmal schwierig die Wasserdampfbanden vollständig zu eliminieren. Ein weiterer Nachteil soll das vergrößerte Volumen durch den Referenztrog sein, wodurch die Reinigungszeit wie auch die Einstellungszeit des Gleichgewichtszustandes vergrößert wird. Nachteile der PM-IRRAS Technik sind zum einen der zusätzliche Einbau von Elementen in das optische System, wodurch der „Durchfluss“ verringert wird. Jahrelang war es aus optisch-technischen Gründen problematisch, die molekulare Orientierung zu bestimmen. Hierfür muss man bei verschiedenen Einfallswinkeln messen. Die hierfür erforderliche neue Justierung der Optik schien nicht so einfach zu sein. Das Problem wurde in den letzten Jahren jedoch behoben, siehe KSV NIMA PM-IRRAS.
Ein großer Nachteil ist, dass die isotropen Absorptionsbanden nicht beobachtet werden können. Dies betrifft unter anderen auch die Amid I Bande von Proteinen mit Random-Coil Struktur. [Mendelsohn 1995, Chalmers 2002]

2.10 Liposomen und deren Untersuchungsmethoden

Liposomen sind in der heutigen Mimetik wichtige Modellmembranen, die den lebenden Zellen in Bezug auf ihre äußere Hülle der Zellmembran, sehr nahe kommen. Dadurch ist es möglich strukturelle Eigenschaften und Dynamiken von zellularen Prozessen wie Endocytose [Un 2012], Exocytose, Zellfusion [Ogawa 2002], Zellfission [Staneva 2004], Proteinanbindungen und –abgabe [Rytomaa 1995] oder auch Transport-mechanismen durch die Membran [Abuin 2012] zu studieren. Weiterhin werden Liposomen in medizinischen und biologischen Bereichen als Drug-Delivery Systeme studiert. [Gregoriadis 1995, Lian 2001, Needham 2001]

2.10.1 Einteilungen der Vesikel

Vesikel werden nach ihrer Größe (SUV, LUV, GUV) und der Anzahl an Doppelschichten (uni- oder multilamellar) unterschieden.

Tabelle II-10 Einteilungen der Vesikel nach Größe, Herstellungsmethoden und Eigenschaften

Unilamellare Vesikel Größe [μm]	Herstellungsmethode	Eigenschaften
SUV 0,02 – 0,1	• Quellmethode mit anschließender Ultraschallbehandlung oder Extrusion	• hoher Krümmungsradius → hohe Membranspannung → • geringe thermische Stabilität • neigen zur Vesikelsfusion • einfache und schnelle Herstellung
LUV 0,1 – 1,0	• Quellmethode mit anschließender Extrusion	• deutlich stabiler als SUVs, neigen dennoch zur Vesikelfusion • einfache und schnelle Herstellung
GUV > 1,0	• Vesikelfusion (Herstellen von SUVs oder LUVs anschließend Dehydrieren und Rehydrieren) • Elektropräparation (Nachteil: Ausbeute und Größe nehmen stark ab, wenn Ionen (Salz) in der Lösung sind) • Methode nach Moscho • microfluidic Jetting Methode • Emulsion Transfermethode	• Thermodynamisch stabil • zeitaufwendige Herstellung • mikroskopisch beobachtbar • detaillierte Aussagen über die Struktur sowie deren Änderung möglich

2.10.2 Darstellung und Eigenschaften von Liposomen

Das Herstellen von unilamellaren Liposomen kann nach unterschiedlichen Methoden wie z.B. die Quellmethode (lipid swelling), Elektropräparation (electroformation), Methode nach Moscho (rapid evaporation method) [Moscho 1996] erfolgen. Ein Nachteil dieser Methoden ist, dass nur symmetrische Liposomen (Lipide sind in der äußeren und innen Schicht gleich) hergestellt werden können. Mit der microfluidic Jetting Methode [Richmond 2011] oder der Emulsion Transfermethode [Pautot 2003,

Campbell 2004] ist es möglich auch asymmetrische (unterschiedliche Lipide in der äußeren und innen Schicht) Liposomen zu erzeugen. Der Nachteil dieser Methoden ist, dass es zur Kontaminierung der Vesikel durch organische Lösungsmittel kommen kann.
Bei den meisten Präparationsmethoden erhält man Vesikel mit unterschiedlichen Größen, sogenannte polydisperse Proben. Um eine monodisperse Probe zu erhalten, kann man entweder die Liposomen mit Ultraschall behandeln oder man benutzt einen Extruder. Damit ist es jedoch nur möglich SUVs und LUVs herzustellen. Eine Herstellungsmethode von monodispersen GUVs wurde 2003 von Taylor et. all publiziert. Diese Methode kombiniert Mikrokontakt-Drucken mit Elektropräparation. [Taylor 2003]
Für welche Methode man sich entscheidet, hängt in alle erste Linie von der Größe und der Symmetrie der Liposomen ab.

Der Bildungsmechanismus der Vesikel hängt von der Methode ab und kann bis dato nur postuliert werden. Bei der Quellmethode und der Elektropräparation sind dünne getrocknete Lipid-Multischichten der Ausgangspunkt. Durch auftretende Defekte innerhalb eines Films entstehen Domänen (Abb. 2.35 oben). Diese Domänen sind jedoch nicht mit den Domänen aus der Fluoreszenzmikroskopie bzw. BAM zu verwechseln. Das Verhältnis zwischen homogenen Film und Defekten ist entscheidend für die Bildung von Liposomen. Die getrockneten Lipidfilme bestehen meistens aus vielen kristallinen Multischichten in Form von Doppelschichten. Durch Hydratisierung quellen diese Schichten innerhalb von 10^{-4} s auf. Der Abstand zwischen den Doppelschichten steigt von 0 auf 10 Ångström. [Angelova 1986]
Um eine Doppelschicht abzulösen, müssen attraktive Kräfte, die hauptsächlich aufgrund induzierter Dipolmomente entstehen, überwunden werden. Solche Dipolverbindungen treten zwischen Doppelschicht – Doppelschicht, Doppelschicht - Substrat bzw. -Elektrode und zwischen den Liposomen auf. Dieser Prozess der Ablösung wird durch elektrostatische, osmotische und Hydratationskräfte bewirkt.
Es gibt nun mehrere Möglichkeiten wie und warum sich die planaren Doppelschichten krümmen um Liposomen zu bilden. Eine Erklärung ist, dass die Enden einer Domäne mit anderen Domänen bzw. mit dem Substrat wechselwirken, wodurch die Doppelschicht am Rand leicht gebunden wird. Durch den osmotischen Druck wölbt sich die Doppelschicht immer mehr. Zum Schluss verschmelzen die Enden und ein Liposom entsteht (Abb. 2.35 mitte) [Angelova 1986] Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich die

einzelnen Bilayer nacheinander ablösen und miteinander verschmelzen (Abb. 2.35 unten). [Angelova 1986]

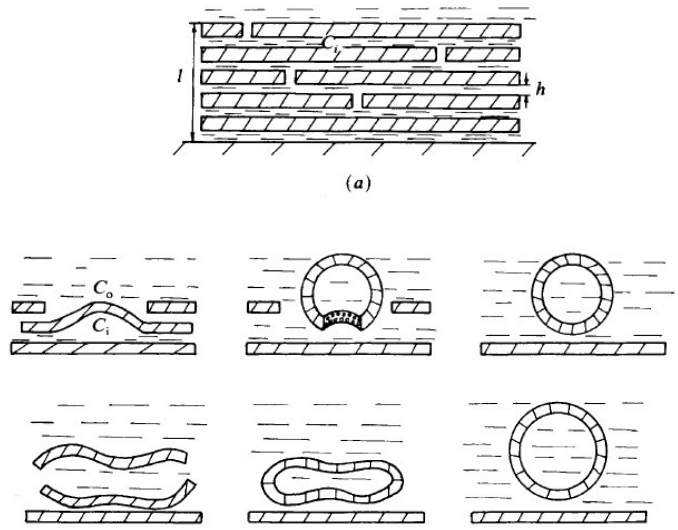


Abb. 2.35 Oben: Modell von hydratisierten planaren Doppelschichten, Mitte und unten: zwei mögliche Bildungsmechanismen von Liposomen. Entnommen aus [Angelova 1986]

Die Quellmethode wie auch die Elektroformation mit Salzkonzentrationen oberhalb 50 mmol L^{-1}, war mit zwitterionisch geladenen Lipiden lange Zeit nicht möglich. [Estes 2005] Aufgrund der hohen Salzkonzentration lagern sich die Salze zwischen den Doppelschichten ab und behindern deren Ablösung. [Bucher 1998] Die Zugabe von negativ geladenen Lipiden, wodurch die elektrostatische Abstoßung zwischen den Doppelschichten erhöht wird [Akashi 1998] oder durch Zugabe von Polyethylenglycolierte Lipide, die die sterische Abstoßung der Doppelschichten erhöhen [Yamashita 2002] kann dieses Problem lösen. Eine andere Möglichkeit bietet die Methode von Pott et. all. Bei dieser werden SUVs auf der Elektrode deponiert, getrocknet und anschließend mit erhöhter Wechselspannung und erhöhter Frequenz elektroformiert. [Pott 2008] Die Schichtdicke des getrockneten Films hat möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf das Ablösen der Doppelschichten. Denn untere Schichten sind stärker gebunden an das Substrat als obere Schichten die sich einfacher ablösen lassen. Eine optimale Schichtdicke scheint ausschlaggebend für die Bildung von UVs zu sein. Wird der getrocknete Lipidfilm durch Vesikelfusion von SUVs oder LUVs mit anschließender Dehydrierung und Rehydrierung hergestellt, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass sich vermehrt unilamellare Vesikel bilden. [Criado 1987]

Bei gleichzeitiger Ablösung der Doppelschichten ist die Bildung von multilamellaren Vesikeln wahrscheinlicher. Durch das Anlegen einer Spannung (Elektropräparation) können wohl einzelne Doppelschichten besser abgelöst werden, denn die Ausbeute an UVs ist größer als bei der Quellmethode.

2.10.3 Untersuchungsmethoden von Liposomen

2.10.3.1 dynamischen Differenzkalorimetrie

Bei der dynamischen Differenzkalorimetrie werden eine Probe in der Probenzelle und eine inerte Referenz (z.B. Wasser, Puffer etc.) in der Referenzzelle separat, mit gleicher Heizrate erwärmt. In unserem Fall ist die Probe eine Suspension von Liposomen in einer wässrigen Lösung. Die Referenzzelle beinhaltet nur die wässrige Lösung (ohne Liposomen). Durch das Heizen, steigt die Temperatur in der Proben- und Referenzzelle zunächst linear mit der Zeit und der Temperaturunterschied zwischen beiden Zellen ist Null. Treten in der Probe temperaturabhängige Umwandlungen auf, die zu einem Temperaturunterschied zwischen Probe und Referenz führen, wird dies durch ein Kontrollsystem erkannt und so gegengesteuert, dass zwischen Probe und Referenz keine Temperaturdifferenzen zugelassen werden. Dies geschieht dadurch, dass die entsprechend kältere Seite während einer entsprechenden Zeit mit einer zusätzlichen Heizleistung versorgt wird. Die Differenz der Heizleistungzur Probe P_P und der Heizleistung zur Referenz P_R, ist das Messsignal der leistungskompensierten DSC (Gleichung II-83).

$$\Delta P = P_P - P_R \qquad \textbf{(II-83)}$$

Da die Heizleistung dem Wärmestrom entspricht, ergibt sich Gleichung II-84.

$$P = \dot{Q} = \frac{dQ}{dt} \qquad \textbf{(II-84)}$$

Setzt man dies in Gleichung II-83 ein erhält man

$$\Delta P = \frac{dQ_{\mathrm{P}} - dQ_{\mathrm{R}}}{dt}. \qquad \textbf{(II-85)}$$

Die Differenz der Wärmeänderung der Probenzelle dQ_{P} und der Referenzzelle dQ_{R} ist die Wärmeaufnahme bzw. Abgabe in unserem Fall die des Lipides dQ_{L} (Gleichung II-86).

$$dQ_{\mathrm{L}} = dQ_{\mathrm{P}} - dQ_{\mathrm{R}} \qquad \textbf{(II-86)}$$

In den Thermogrammen (siehe Abb. IV-11) wird die molare Wärmekapazität über die Temperatur der Probe aufgetragen.
Die molare Wärmekapazität c_{m} wird nach Gleichung II-87 berechnet.

$$c_{\mathrm{m}} = \frac{1}{n}\frac{dQ_L}{dT} \qquad \textbf{(II-87)}$$

Aus Gleichung II-85 und Gleichung II-87 ergibt sich

$$c_{\mathrm{m}} = \frac{1}{n}\frac{\Delta P dt}{dT} \qquad \textbf{(II-88)}$$

Ist die Heizrate ν_{H} bekannt $\upsilon_{\mathrm{H}} = \frac{\Delta T}{dt}$ berechnet sich die molare Wärmekapazität nach Gleichung II-89.

$$c_{\mathrm{m}} = \frac{1}{n}\frac{1}{\upsilon_H}\Delta P \qquad \textbf{(II-89)}$$

Ist die Differenz der zwei Heizleistungn (Referenz und Probe) null, d.h. es findet keine temperaturabhängige Umwandlung der Probe statt, so ist auch die Wärmekapazität null und man erhält eine horizontale Basislinie. Je nachdem welche Zelle geheizt werden muss, also abhängig davon ob die Umwandlung der Probe exotherm oder endotherm verläuft, wird ΔP und damit auch c_{m} positiv oder negativ. Ist die Umwandlung der Probe beendet, geht ΔP und c_{m} wieder auf null zu. Die Veränderungen der molaren Wärmekapazität mit der Temperatur werden als Thermogramm bezeichnet und sind für einen endothermen Übergang erster Ordnung (gel zur flüssig-kritallinen Phase) am Beispiel von DMPC-Liposomen in Abbildung 4.15 dargestellt. Aus einen solchen Thermogramm können viele wichtige Parameter direkt bestimmt werden. Die

Phasenübergangstemperatur T_p für die Vorumwandlung und T_m für die Hauptumwandlung sind die Temperaturen bei der die Differenzheizleistung ΔP und damit c_m ein Maximum erreichen. Für eine symmetrische Kurve ist T_m die Temperatur bei der die Phasenumwandlung zur Hälfte vollzogen ist. Für asymetrische Peaks wird anstelle von T_m die Halbwertsbreite $T_{1/2}$ benutzt. Die Peakfläche entspricht der Umwandlungsenthalpie.

2.10.3.2 Konfokales Rasterkraftmikrokop

Die Konfokalmikroskopie ist eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie. Der Aufbau sowie die Funktionsweise des Mikroskops sind sehr ähnlich (siehe Kapitel 2.9.3.1) Der entscheidende Unterschied ist der Einsatz einer Lochblende (Pinhole) vor dem Detektor. Das Licht außerhalb der Fokusebene, welches oberhalb und unterhalb der Fokusebene entsteht, wird dadurch ausgeblendet (siehe Abb. 2.36). Um ein gesamtes Bild der Probe zu erhalten, muss die Probe abgerastert werden. Dies wird mit einem beweglichen Spiegelsystem realisiert. Das Bild wird anschließend am Computer konstruiert. Dies ermöglicht die Aufnahme von optischen Schnitten sowie eine 3D-Rekonstruktion der Probe.

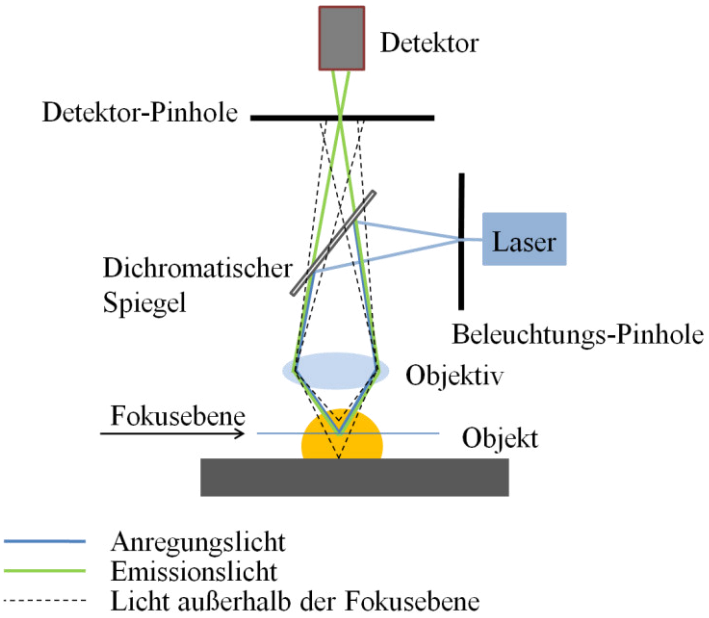


Abb. 2.36 Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Konfokalmikroskops

III Material & Methoden

3.1 Lipide

Alle Lipide sind von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) und wurden ohne weitere Aufreinigung benutzt. Dazu zählen:

- 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodiumsalt) (DMPA)
- 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)
- 1,2-Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)
- 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) (DMPG)
- 1,1',2,2'-tetratetradecanoyl cardiolipin (sodium salt) (TMCL)

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden 0,25 mol% von 16:0 – 12:0 NBD PC (1-palmitoyl-2-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) oder 16:0-12:0 NBD PE (1-palmitoyl-2-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) hinzugegeben.
Diese Fluoreszenzlipide sind an den Alkylketten gelabelt. Alle Phospholipide sind in Chloroform gelöst.

3.2 Fentonreaktion allgemein

Die Fenton-Reaktion wird genutzt um Hydroxyl-Radikale zu erzeugen. Als erstes löst man EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland) in Wasser und danach Ammoniumeisen(II)-sulfat oder Eisen(II)sulfat-Heptahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland). Diese Lösung wird in dieser Arbeit als Fenton-Lösung bezeichnet. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid entstehen die Sauerstoffradikale (siehe Kap. 2.4) Die Konzentrationen von EDTA, Fe^{2+} und H_2O_2 liegen immer in bestimmten Verhältnissen vor. Somit können aus einer Konzentrationsangabe die anderen Konzentrationen berechnet werden. Daher wird nur die Fe^{2+}-Konzentration angegeben und als Fenton-Konzentration bezeichnet. Bei den meisten Experimenten ist das Verhältnis EDTA/Fe^{2+} 5:4 oder 3:1. Das Verhältnis zwischen Fe^{2+} und H_2O_2 variiert je nach Experiment. Die Konzentration des gelösten

Eisensalzes variiert zwischen 0,5-5 $mmolL^{-1}$. Eine 1,5 bzw. 9,88 molare Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) wird in den Experimenten verwendet. In allen Experimenten wird bewusst auf einen Puffer verzichtet.

Dies hat zwei Gründe:

1. Einige Puffer sind oberflächenaktiv, wodurch sie einen Einfluss auf den Phasenübergang haben bzw. ihn völlig unterdrücken können.
2. Jede zusätzliche Substanz in der Flüssigkeit würde ein Radikalfänger für die Hydroxyl-Radikale darstellen und somit das Ergebnis beeinflussen.

3.3 Langmuir Filmwaage und Fenton Reaktion

Die π/A- Isothermen von DMPA, DPPC, DMPG und TMCL werden vor und nach dem Radikalangriff mit einer Filmwaage von Riegler & Kirsten (R&K, Potsdam, Deutschland) aufgenommen. Die Fläche des Trogs ist 3,5x30 cm^2. Die Temperatur wird entsprechend dem zu erwartenden Phasenübergang der einzelnen Lipide mit einem Thermostaten (DC-30 Thermo-Haake, Haake-Technik, Karlsruhe, Deutschland) eingestellt und der Oberflächendruck mit einen Wilhelmy-Messsystem gemessen. Ein Filterpapier dient als Wilhelmy-Plättchen. Die Subphase bestand wie oben beschrieben aus einer EDTA-Fe^{2+}-Lösung. Nach dem Spreiten der Lipidlösung wird 10 Minuten gewartet, damit das Chloroform sich verflüchtigen kann. Die Monoschicht wird dann mit einer Geschwindigkeit von 3-9 $Å^2$ $Molekül^{-1}$ min^{-1} komprimiert. Wenn der gewünschte Oberflächendruck für den Radikalangriff erreicht wird, wird die entsprechende Menge an H_2O_2 mit einer Pumpe (Reclo digital MS-4/8, ISMATEC, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) oder mit einer Nadel unter der Barriere in die Subphase injiziert und vorsichtig gerührt. Während der Reaktion wurde die Fläche pro Molekül konstant gehalten.

3.4 Langmuir Filmwaage und Herstellung von Hydroxyl-Radikalen durch die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin

Die π/A- Isothermen wurden mit demselben Aufbau wie im Kapitel 3.2 beschrieben aufgenommen. Der Unterschied zur Herstellung von Radikalen mithilfe der Fenton-Reaktion ist, dass die Subphase aus Reinstwasser bestand und das auf dem Boden der Filmwaage ein Platinnetz mit der Größe 3 x 5 x 0,1 cm^3 platziert wurde. Der Abstand vom Platinnetz bis zur Wasseroberfläche war 1-2 mm. Auch die Durchführung vom Spreiten der Lipide, Kompressionsgeschwindigkeiten und der Injektion von Wasserstoffperoxid waren identisch.

3.5 IRRAS

Die IRRAS- Messungen wurden in Golm, Potsdam mit einem IFS 66 FT-IR Spektrometer von Bruker (Ettlingen, Deutschland), ausgerüstet mit einer externen Reflexionseinheit (XA-511, Bruker) einschließlich eines Langmuir-Trogs von Riegler & Kirsten (Potsdam, Deutschland) und NIMA Technologie (Coventry, Groß Britannien) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode und Anwendungen sind in Kapitel 2.9.5 beschrieben.

Der IR-Strahl kommt vom FT-IR Spektrometer und wird über einen Spiegel in einen im Einfallswinkel verstellbaren Arm auf die Referenz- bzw. Wasseroberfläche gelenkt (siehe Abb. 3.1). Ein KRS-5 Polarisator befindet sich im optischen Weg hinter dem ersten Spiegel kurz bevor der IR-Strahl auf die Wasseroberfläche trifft. Ein zweiter Arm der sich im gleichen Winkel wie der Einfallswinkel befindet reflektiert das Licht über zwei weitere Spiegel zu einem mit Flüssigstickstoff gekühltem externen MCT (mercery-cadmium-telluride) Detektor. Der gesamte experimentelle Aufbau ist geschlossen, um Schwankungen der Luftfeuchtigkeit zu minimieren. Die Reflexionsspektren wurden mit der Opus Software (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) aufgenommen und ausgewertet.

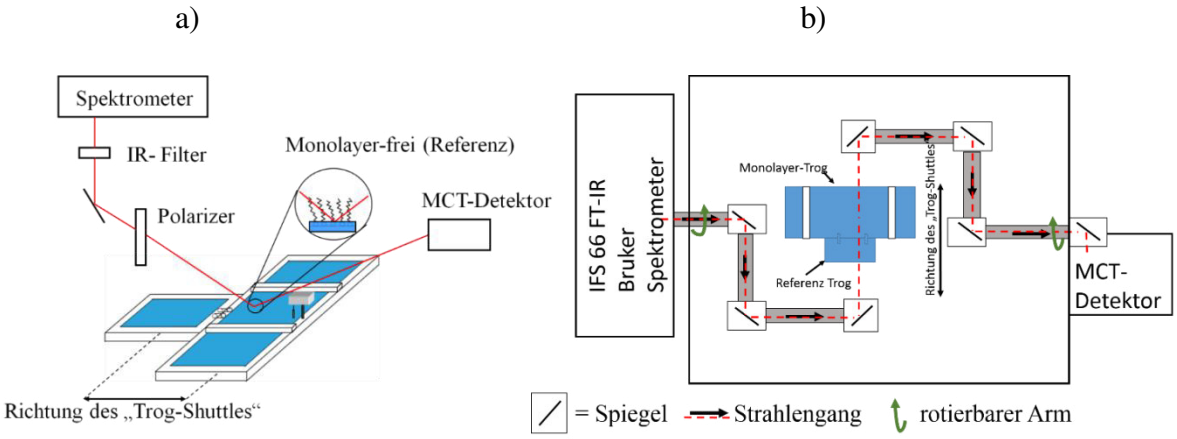


Abb. 3.1 a) IRRAS-Aufbau; b) Aufsicht IR-Strahlengang; entnommen aus [Mendelsohn 2010] und verändert

Die Trog-shuttle Technik hat wie oben schon beschrieben ein Referenz- (60 x 60 x 3 mm^3) und einen Probentrog (300 x 60 x 3 mm^3) aus Teflon (R & K). Beide Tröge sind mit 2 Teflon Röhrchen miteinander verbunden, um eine gleiche Füllstandshöhe zu gewährleisten. Der Probentrog ist eine Langmuir- Filmwaage. Dadurch ist es möglich die π/A-Isothermen und die IRRA-Spektren gleichzeitig aufzunehmen. Die IR-Spektren können dadurch direkt mit den Phasenübergängen verglichen werden. Ebenfalls können dadurch zeitabhängige Spektren, entweder bei konstantem Oberflächendruck oder bei konstanter Fläche aufgenommen werden.

Alle unsere IRRA-Spektren wurden mit s- und p-polarisiertem Licht mit einem Einfallswinkel von 40° aufgenommen. Pro Spektrum wurden 200 Scans mit einer Scan-Geschwindigkeit von 20 kHz und einer Auflösung von 8 cm^{-1} durchgeführt. Mit einer anschließenden methodentypischen Datenweiterverarbeitung konnte eine Auflösung von 4 cm^{-1} erreicht werden. Die resultierenden Spektren (-log R/R_0) sind nun analog IR-Transmissions-Messungen.

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie einer Lipidmonoschicht auf einer Wasser/Luft-Grenzfläche wird mit einem extra dafür modifizierten Zeiss Axiostar plus Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss (Jena, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde der Objektivrevolver entfernt und durch einen gefertigten Objektivhalter ersetzt (siehe Abb. 3.2, rechts) Der Mikroskopietisch wurde durch eine Filmwaage (R&K) ausgetauscht (siehe Abb. 3.2, links). Ein Stück Schwarzglas befindet sich auf dem Boden der Filmwaage direkt unter dem Objektiv, um Streulicht vom Boden zu eliminieren. Weiterhin befindet sich vor dem Objektiv ein IR-Filter im Strahlengang, um lokale Erwärmungen zu verhindern, welche sich z.B. in Auflösung der Domänen zeigt. Ein Plexiglaskasten umschließt das Mikroskop sowie die Filmwaage, um den Langmuir-Trog vor Schmutzeinträgen sowie vor Konvektionen durch die Luft zu schützen. Ebenfalls befindet sich in der Filmwaage ein kleiner flacher Zylinder mit zwei Öffnungen auf jeder Seite, durch die die Monoschicht hinein und hinaus fließen kann. Die Bewegung der Monoschicht kann durch Verschließen der Öffnungen minimiert bzw. gestoppt werden. Für die Objektive (EC Epiplan 20x/0.4 oder 50x/0.7 von Zeiss) befindet sich eine weitere Öffnung auf der Oberseite (Abb. 3.3). Auf dem Mikroskop ist eine CCD Kamera (Colorview II, Olympus, Münster, Deutschland) montiert, mit der die Fluoreszenzbilder aufgenommen werden. Die Bilder werden mit der Software Cell-F (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Hamburg, Deutschland) analysiert.

Abb. 3.2 Links: umgebautes Fluoreszenzmikroskop; Rechts: selbstgebauter Objektivhalter

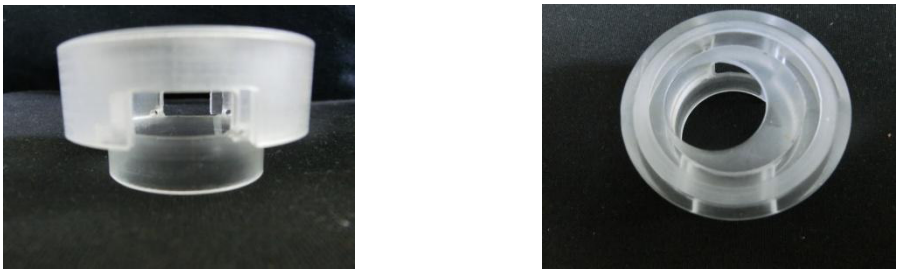


Abb. 3.3 Zylinder mit zwei Öffnungen auf jeder Seite durch die die Monoschicht hinein und hinaus fließen kann. Die Öffnungen sind verschließbar. Links: Seitenansicht; Rechts: Ansicht von oben

3.7 Röntgendiffraktion bei streifendem Einfall (GID- Grazing incidence diffraction)

Die in dieser Arbeit durchgeführten Diffraktionsmessungen wurden mit dem Diffraktometer für flüssige Oberflächen an der Beamline BW1 des **Ha**mburger **Sy**nchrotron **Lab**ors (HASYLAB) am **D**eutschen **E**lektronen**sy**nchrotron (DESY) vorgenommen. Der **Do**ppel-**Ri**ng**s**peicher (DORIS) wurde ursprünglich für Kollisionsexperimente gebaut. In seiner dritten Version diente DORIS III ausschließlich als eine mit Positronen betriebene Synchrotronstrahlquelle. Die Synchrotonstrahlung entsteht, wenn beschleunigte Ladungen in gekrümmten Abschnitten des Speicherrings elektromagnetische Strahlung erzeugen. Dafür kreisen die Positronen auf einer Umlaufbahn von 289 m mit einer Energie von 4,45 GeV und einer Stromstärke von bis zu 120 mA im Ultra-Hoch-Vakuum (ca. 10^{-8} Pa) des geschlossenen Rings. Unter einem sehr kleinen Öffnungswinkel wird die Synchrotronstrahlung in tangentialer Richtung linear polarisiert freigesetzt. Der Frequenzbereich dieser Strahlung erstreckt sich vom Infrarot- bis zum Röntgenbereich. Am Messplatz BW1 wird durch einen Undulator die Intensität der Strahlung verstärkt. Gegenüber herkömmlichen Röntgenröhren ist die Intensität um den Faktor 10^4 höher. Ebenfalls wird aus dem kontinuierlichen Spektrum ein Linienspektrum mit einem Energiebereich zwischen 5 keV und 19 keV. [Frahm 1995]

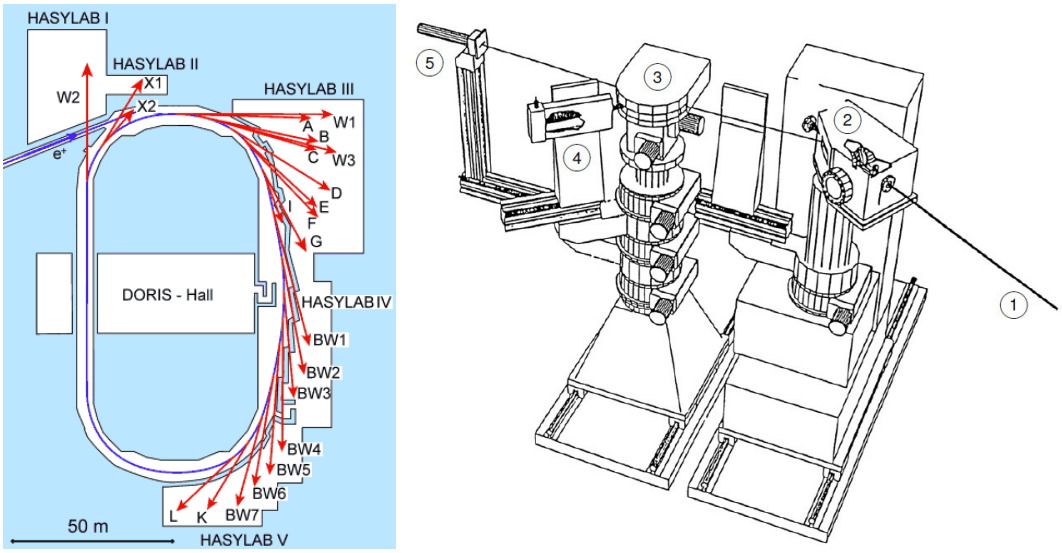


Abb. 3.4 Links: Doppelringspeicher (DORIS) mit seinen Messplätzen, entnommen aus [Hacker 1999]; Rechts: Diffraktometer für flüssige Oberflächen am Messplatz BW1: (1) weißer Synchrotron Strahl, (2) heliumgefüllte Box mit dem Be-Monochromator, (3) Probengehäuse mit zwei Kaptonfenster, (4) Detektor (PSD), (5) NaI-Detektor für Röntgenreflexion, entnommen aus [Baltes 1995]

Mithilfe eines Beryllium-Monochromator Kristalls ((002)-Reflex) wird aus dem Linienspektrum der Synchrotron Strahlung monochromatisches Röntgenlicht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1{,}30$ Å erzeugt. Dieser Röntgenstrahl tritt durch das Kaptonfenster des Filmwaagengehäuses und fällt mit einem Einfallswinkel $\alpha_i = 0{,}85\alpha_c$ auf die flüssige Oberfläche. $\alpha_c = 0{,}13°$ ist der kritische Winkel bei dem Totalreflektion auftritt. Das Filmwaagengehäuse ist völlig abgeschlossen und wird mit Helium gespült, um Röntgenstreuung an der Luft zu vermeiden. Um Wellen zu dämpfen, befindet sich ein Glasblock auf dem Boden des Troges, wodurch die Wasserhöhe unterhalb der bestrahlten Fläche auf ungefähr 500 µm reduziert wird. Da Strahlschäden an der Monoschicht auftreten können, ist der Trog horizontal verschiebbar. Dadurch ist es möglich, an noch nicht beschädigten Stellen zu messen.

Die gebeugte Strahlung verlässt das Filmwaagengehäuse durch ein zweites Kaptonfenster. Die Intensität wird von einem linearen positionsempfindichen Detektor (PSD) (Mythen, Paul-Scherrer Institut, Villingen, Schweiz), der aus über 1000 in Z-Richtung aufgereihten Messpunkten besteht, aufgezeichnet. Softwareseitig werden jedoch aus statistischen Auswertungsgründen mehrere Messpunkte zu einem Kanal zusammengefasst, so dass man 256 Kanäle erhält. Zur Abbildung der horizontalen Intensitätsverteilung wird der PSD mit Hilfe eines horizontal gelagerten Goniometers in

der Ebene um den Winkel 2θ variiert. Ein Soller Kollimator vor dem PSD unterdrückt die seitliche Streustrahlung und liefert eine horizontale Winkelauflösung von ≈ 0,085°. Wird bei kleinem Streuwinkel $2\theta < 5$ gemessen, kann die genutzte Breite des Soller w_s mit Hilfe eines weiteren Spaltes zwischen Soller Kollimator und PSD so reduziert werden, dass der reflektierte Primärstrahl nicht auf den PSD trifft. Die vertikale Auflösung $\Delta\alpha_r$ (siehe Gleichung III-1) hängt zum einem von der horizontalen Ausdehnung Δd_{PSD} ab, also dem Anteil der Monoschicht von welchem Strahlung in den PSD gestreut werden kann (Abb. 3.5, oben) und zum anderem von der Höhe des Sollers h_{PSD} und der Entfernung des PSD vom Zentrum der Probe (d_{PSD}).

$$\Delta\alpha_r \approx \frac{h_{PSD}}{d_{PSD} - \frac{1}{2}\Delta d_{PSD}} - \frac{h_{PSD}}{d_{PSD} + \frac{1}{2}\Delta d_{PSD}} \qquad \textbf{(III-1)}$$

$$\approx \frac{h_{PSD}}{d_{PSD}}\left[\left(1 + \frac{\Delta d_{PSD}}{2d_{PSD}}\right) - \left(1 - \frac{\Delta d_{PSD}}{2d_{PSD}}\right]\right.$$

$$= \frac{h_{PSD}}{d_{PSD}}\frac{\Delta d_{PSD}}{d_{PSD}} \approx \alpha_r \frac{\Delta d_{PSD}}{d_{PSD}}$$

Der vom Detektor registrierte Anteil der Monoschichtmit Δd_{PSD} wird durch die Schnittfläche des beleuchteten Flecks (hellblau eingefärbt) mit dem vom Detektor erfassten Streifen der Breite w_S (dunkel eingefärbt) gebildet (siehe Abb. 3.5). Dies wird auch als Footprint bezeichnet.

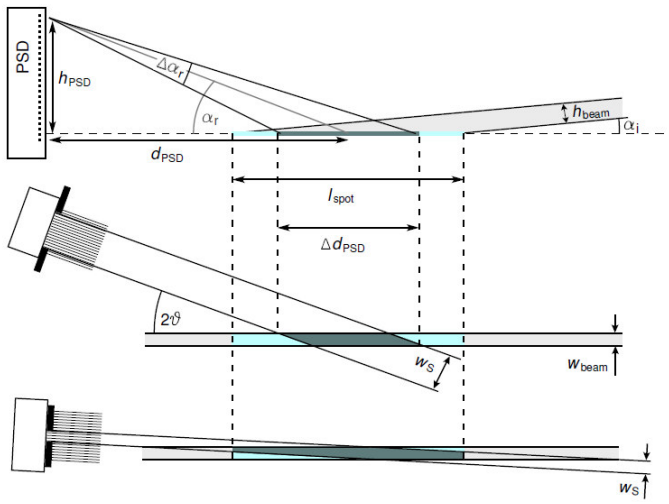


Abb. 3.5 Seitenansicht (oben) sowie Draufsicht der Streugeometrie für Diffraktionsmessungen bei streifendem Einfall für große (Mitte) und kleine (unten) Streuwinkel 2θ.; entnommen aus [Günther 2009]

Der beleuchtete Fleck ist abhängig vom Querschnitt und vom Einfallswinkel des einfallenden Strahls. Bei einem einfallenden Strahl mit einer Breite w_{beam} = 2 mm, einer Höhe h_{beam} = 0,1 mm und einem Einfallswinkel α_i = 0,11° (85% von α_c) ist dies eine Fläche von 2 mm x 50 mm. Der vom Detektor erfasste Streifen der Breite w_S ist abhängig vom horizontalen Winkel 2θ. Die Breite w_S wird durch den Soller Kollimator bestimmt. Bei großen 2θ Winkeln ist die Breite des Soller Kollimator möglichst groß (max. 10 mm) und der Footprint hat die Form eines Parallelogramms (Abb. 3.5 Mitte). Die Braggreflexe des Alkylkettengitters einer Lipidmonoschicht werden z.B. bei großem 2θ Winkel (17°, $q_z \approx 1{,}4$ Å^{-1}) und einer Breite des Soller Kollimators w_S = 10 mm gemessen. Δd_{PSD} kann dann nach Gleichung III-2 bestimmt werden.

$$\Delta d_{PSD} = \frac{w_{beam}}{\sin 2\theta} + \frac{w_S}{\tan 2\theta} \approx 40 \text{ mm} \qquad \textbf{(III-2)}$$

Setzt man dies in Gleichung III-1 ein, erhält man eine vertikale Auflösung von

$$\Delta\alpha_r \approx 0{,}07\alpha_r .$$

Da $\frac{\Delta\alpha_r}{\alpha_r} \approx \frac{\Delta q_z}{q_z}$ ist $\Delta q_z \approx 0{,}07 q_z$. Dies entspricht einer Winkelauflösung von 0,02°.

Wird bei kleinen 2θ- Winkel gemessen, um Systeme mit Gitterkonstanten größer als 20 Å zu charakterisieren, z.B. absorbierte PSS-Ketten (Polystyrol Sulfonat) an Lipidmonoschichten, wird die Breite des Soller Kollimators auf 2 mm reduziert. In dieser Anordnung ist die horizontale Ausdehnung Δd_{PSD} größer als l_{spot} (siehe Abb. 3.5). l_{spot} ist damit die limitierende Größe. Für die vertikale Auflösung bei kleinen Winkeln gilt deshalb:

$$\Delta q_z = \frac{l_{spot}}{d_{PSD}} q_z \approx 0{,}09 \, q_z \qquad \textbf{(III-3)}$$

3.8 Röntgenreflektometer – MXR (Mainz X-ray Reflectometer)

Das Röntgenreflektometer ist ein Selbstbau mit einem θ/θ Setup und Spaltkollimationssystem, um Messungen an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu ermöglichen. [Baltes 1995] Eine konventionelle Cu-Röhre (λ = 1,54 Å, 40 kV, 30 mA) dient als Röntgenquelle. Der einfallende und ausfallende Strahl wird durch je zwei Spalte S_1, S_2 bzw. S_3 und S_4 definiert (Abb. 3.6).

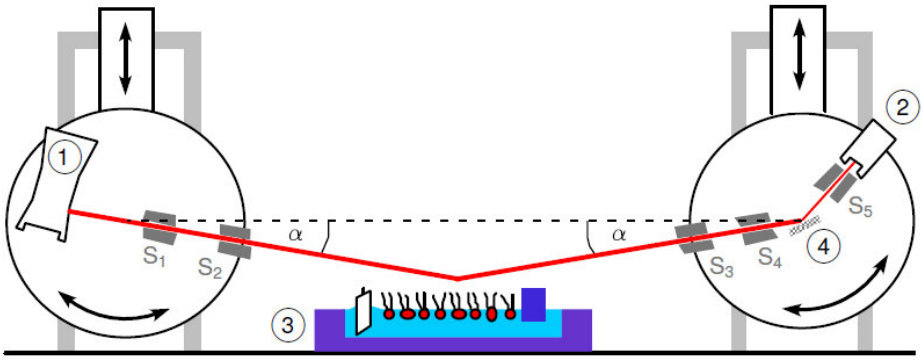


Abb. 3.6 MXR- Röntgenreflektometer, entnommen aus [Günther 2009]

Mit einem NaI- Detektor (Szintillation Zähler NIM C71249-A58-A19 Siemens/ Bruker AXS) wird die einfallende Intensität gemessen. Vor diesem befinden sich ein Graphitmonochromator und ein Detektoreintrittsspalt S_5, um zu gewährleisten, dass nur Photonen der Wellenlänge der Cu-K_α-Strahlung (λ = 1,54 Å) vom Detektor registriert werden. Mithilfe einer Diskriminatorelektronik werden die Wellenlängen eliminiert, die ein Vielfaches der Cu-K_α-Strahlung haben (Monochromator Reflexen höherer Ordnung) und damit den Monochromator ebenfalls passieren können, z.B. Teile der Bremsstrahlung, Fluoreszenz- und Streustrahlung. Röhre und Detektor sind auf je einem Goniometer befestigt, deren Zentren sich mit Hubspindeln vertikal bewegen lassen (Abb. 3.6). Die Filmwaage befindet sich zwischen den beiden Goniometern. Zur Unterdrückung der Oberflächenwellen, ist diese auf einen schwingungsgedämpften Tisch (MOD-2, Sandercok Affoltern a.A.) gelagert. Die Röhre und der Detektor werden mit einem Programm so gesteuert, dass sie stets auf derselben Probenfläche gerichtet sind. Eine hohe Winkelauflösung wird durch lange Strahlengänge bei gleichbleibender Strahlhöhe h_{beam} garantiert. Bei einem Abstand von 1,50 m zwischen den Zentren der Goniometer und einem Strahlhöhe von 200 µm, wie er für alle beschriebenen Experimente eingestellt ist, beträgt die Winkelauflösung etwa 8 Milligrad. [Baltes 1995]

3.9 Herstellung von Liposomen

3.9.1 Elektropräparation

Die an den Elektroden angelegte Spannung ist Wechselspannung, da es beim Anlegen von Gleichspannung zu strukturellen Veränderungen kommen kann. Dies kann zu Lipidperoxidation von ungesättigten Lipiden [Zhou 2007] sowie zu Elektrolyse-produkten führen. Die Zusammensetzung der Lipide wird dadurch verändert und damit auch die Eigenschaften der Membran.

Die Wechselspannung wird entweder an Platinelektroden oder an ITO- Platten (Indium tin oxid) angelegt. [Montes 2007, Wesołowska 2009, Herold 2012] In dieser Arbeit wurde die Elektropräparation mit ITO-Platten (pgo, Iserlohn, Deutschland) nach leichter Modifizierung des Protokolls von Manley und Gordon durchgeführt [Manley 2001]. Dazu wurden die Lipide in Chloroform gelöst und mit einer Hamilton-Spritze tropfenweise auf die leitenden Seiten der zwei ITO-Platten aufgebracht und mit der Spritze möglichst homogen breitgezogen. Danach wurde der Film mit Stickstoff für 2 Minuten und anschließend unter Vakuum und Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Einer der zwei ITO-Platten wird parallel auf einen selbstangefertigten Abstandshalter (siehe Abb. 3.7) aus Polyetheretherketon (PEEK) mit Klammern befestigt.

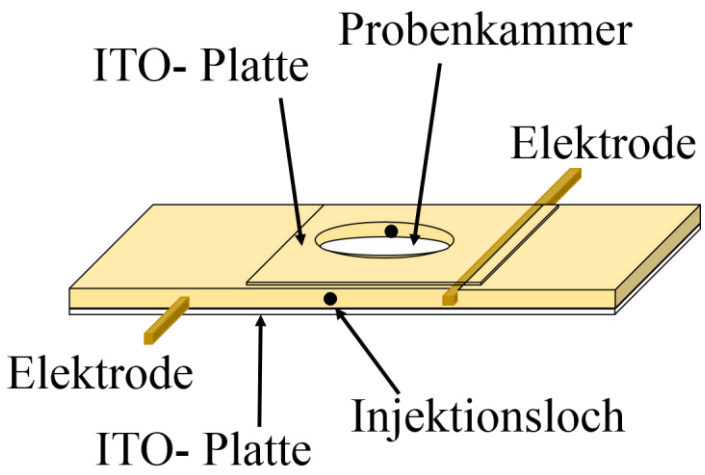


Abb. 3.7 Selbstbau der Elektropräparationskammer

Die Ränder des Abstandshalters wurden vorher mit einer kleinen Menge Vakuumfett bestrichen um die Probenkammer abzudichten. Die Probenkammer wird mit einer wässrigen Lösung gefüllt und anschließend durch die zweite ITO-Platte mit Klammern verschlossen. Mit Hilfe einer handelsüblichen Schreibtischlampe wurde eine Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m eingestellt. An den eingelassenen Elektroden im Abstandshalter, die den Kontakt zu den ITO-Platten herstellen, werden mit Hilfe eines Funktionsgenerators eine Wechselspannung von 2 V (Spitze-Spitze) und eine Frequenz von 10 Hz angelegt. Die Transparenz der ITO-Platten erlaubt die Visualisierung der entstehenden Liposomen. Der Nachteil dieser Methode ist das Sammeln der GUVs für andere Untersuchungsmethoden z.B. für die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC), da die zwei ITO-Platen durch das Vakuumfett fest zusammengeklebt sind und ohne die Probe zu verunreinigen schwer zu trennen sind.

3.9.2 Herstellung von Liposomen für DSC

Für die DSC Messungen wurden die Liposomen nach leichter Modifizierung des Protokolls von Moscho et. al (1996) hergestellt. Nach diesem werden GUVs nach 2 min und einer Größe bis zu 50 µm gebildet. Danach werden die Lipide in Chloroform und Methanol in einem Rundkolben gelöst. Für die Herstellung von DMPC Liposomen werden 15 mg Lipid in 11 ml $CHCl_3$ und 1,1 ml Methanol gelöst.

Am Rand des Rundkolbens werden 30 ml Wasser vorsichtig hinzugefügt. Die organischen Lösungsmittel wurden mit einem Rotationsverdampfer (Laborota 4000-efficient Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, Deutschland) und unter Verminderung des Druckes bis 3 kPa, bei einer Temperatur oberhalb des Phasenübergangs und einer Rotationsgeschwindigkeit von 40 rpm verdampft. Die Druckverminderung wurde mit einer Vakuumpumpe erreicht (Rotavac control Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) erreicht. Zwei Minuten nach der Verdampfung erhält man eine opaleszierende Flüssigkeit.

Nach vielen unterschiedlichen Untersuchungen mit Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) oder Konfokalmikroskopie konnten wir sehen, dass die Ausbeute an GUVs jedoch sehr gering ist. Um unilamellare Liposomen (SUVs oder LUVs) herzustellen, wurden die hergestellten Liposomen mit Ultraschall behandelt bzw. durch den Extruder gedrückt. Diese Methode wurde für alle DSC- Experimente angewandt, bei denen die Auswirkungen eines Radikalangriffs auf den Phasenübergang untersucht wurden sollen.

3.10 Radikalangriff auf Liposomen mit der Fenton-Reaktion

Die Liposomen wurden wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben hergestellt. Zu der Liposomen Suspension wurde entsprechend der gewünschten Fenton-Konzentration eine EDTA-Eisen-Lösung hinzugegeben und vorsichtig gerührt. Anschließend wurde Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Das Verhältnis Wasserstoffperoxid zu Eisen war 6:1.

3.11 Radikalangriff auf Liposomen durch die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin

Die Liposomen wurden ebenfalls wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben hergestellt. Die Liposomen Suspension wurde anschließend in einem Becherglass mit Magnetrührstäbchen gegeben und mit einem Magnetrührer vorsichtig gerührt. Die Hydroxyl-Radikale wurden durch die katalytische Zersetzung von 3% Wasserstoffperoxid-Lösung (ca. 1 mol L^{-1}) hergestellt. Als Katalysator wurden zwei Platinschwarz Plättchen (je 1 x 2 cm^2) genutzt.

IV Radikalangriffe auf zwitterionisch geladene Modellmembranen

4.1 Radikalangriffe auf DPPC-Monoschichten

4.1.2 Isothermen

Abbildung 4.1 (oben links) zeigt eine Druck/Flächen Isotherme einer DPPC Monoschicht auf eine mit EDTA- und Mohrschen Salz gelöste Subphase. Diese Isotherme ist vergleichbar mit einer typischen DPPC Isotherme auf Reinstwasser. Es ist ein Phasenübergang (1. Ordnung) von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase erkennbar, charakterisiert durch den Koexistenzbereich. Der Übergangsdruck π_c ist 4,6 mN m^{-1}. Um den Effekt der Radikalattacke zu quantifizieren, wird zum einen die Fenton-Konzentration variiert und zum anderen wird der Radikalangriff bei unterschiedlichen Phasenzuständen (im Koexistenzbereich bei 5,4 mN m^{-1} bzw. in der flüssig-kondensierten Phase bei 30 mN m^{-1}) durchgeführt. Während des Radikalangriffs wird die molekulare Fläche konstant gehalten und der Abfall des Oberflächendrucks gemessen (siehe Abb.4.1 oben rechts). In beiden Fällen ist der Druckabfall in der ersten halben Stunde unabhängig von der Fenton-Konzentration. Für höhere Fenton-Konzentrationen hält der Druckabfall länger an. Ein neuer Gleichgewichtswert wird nach zwei oder drei Stunden erreicht, womit der Radikalangriff als beendet angesehen wird. Eine zweite Isotherme wird anschließend aufgenommen. Alle Radikalangriffe werden nach diesem Vorgang durchgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass sich der Koexistenzbereich mit zunehmender Fenton-Konzentration zu einem niedrigen Oberflächendruck verschiebt. Bei einer Fenton-Konzentration von 2 mmol L^{-1} oder größer, ist der Koexistenzbereich vollständig verschwunden (Abb. 4.1 unten links). Der Druckanstieg, der für die flüssig-expandierte Phase typisch ist, verschiebt sich zu kleineren molekularen Flächen. Ebenfalls kann die Monoschicht zu kleineren molekularen Flächen komprimiert werden. Bei einem Oberflächendruck von 30 mN m^{-1} wird der Verlust der molekularen Fläche quantifiziert. Der Flächenverlust ist monoton ansteigend mit Zunahme der Fenton-Konzentration (Abb. 4.1 unten rechts).

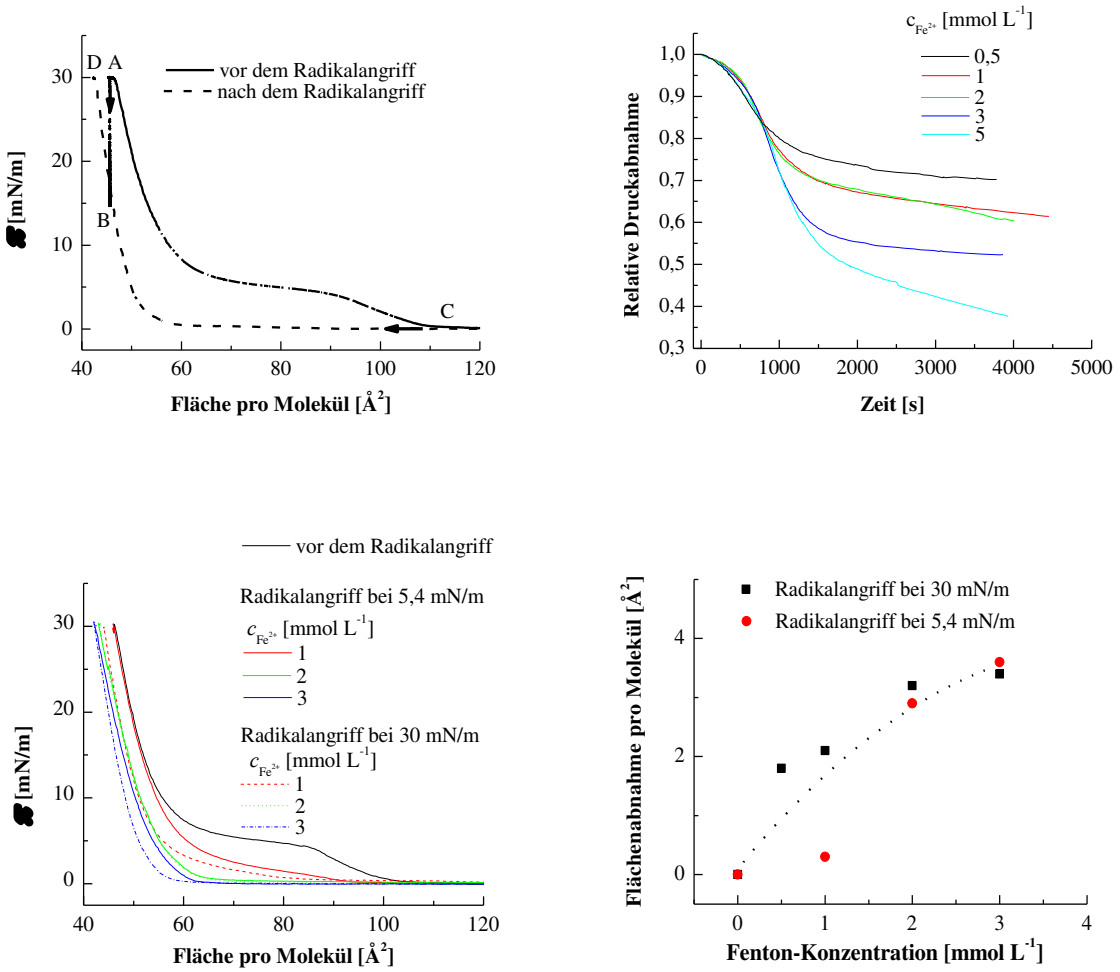


Abb. 4.1 Auswirkungen des Radikalangriffs auf DPPC Isothermen bei 21 °C. Das Konzentrationsverhältnis Fe^{2+} zu EDTA ist 4:5 und das von Fe^{2+} zu H_2O_2 ist 1:3. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Fe^{2+}-Konzentration und wird als Fenton-Konzentration bezeichnet (siehe Material & Methoden, Kapitel 3.2).
Oben links: die DPPC Monoschicht wird bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert (A). Bei diesem lateralen Druck wird die molekulare Fläche konstant gehalten und ein Radikalangriff mit 2 mmol L^{-1} Fenton-Konzentration durchgeführt. Der laterale Druck nimmt die nächsten 3 Stunden ab, bis sich ein neuer Gleichgewichtsdruck einstellt (B). Die anschließende Expansion und Kompression zeigt eine Abnahme der molekularen Fläche bei 30 mN m^{-1} (C → D). Oben rechts: Vergleich der relativen Druckabnahme über die Zeit bei verschiedenen Fenton-Konzentrationen (Radikalangriff bei 30 mN m^{-1}). Der Radikalangriff wird für beendet angesehen, wenn der laterale Druck einen neuen Gleichgewichtswert erreicht. Unten links: Kompressionsisothermen vor und nach dem Radikalangriff bei angegebenen Bedingungen. Unten rechts: Abnahme der molekularen Fläche bei 30 mN m^{-1} bei verschiedenen Fenton-Konzentrationen. Der Radikalangriff wurde (wie angegeben) im Koexistenzbereich wie auch in der flüssig-kondensierten Phase durchgeführt.

Qualitativ betrachtet erscheint ein Radikalangriff (bei gleichbleibender Fenton-Konzentration) in der flüssig-kondensierten Phase effektiver zu sein, als in der flüssig-expandierten Phase (Abb. 4.1 unten, rechts). Da für alle anderen Experimente (Fluoreszenzmikroskopie, Röntgendiffraktion, Röntgenreflexion, IRRAS) unterschiedliche Langmuir-Tröge mit unterschiedlichen Verhältnissen von Fläche/Volumen genutzt werden, können sich die Effizienz der Radikalangriffe sowie die Kinetik der Neuanordnung der Monoschicht je nach Trog ändern. Um die Stärke des Angriffs zu vergleichen, werden daher die absoluten Druckabfälle bestimmt.

4.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wird genutzt, um die Auswirkungen des Radikalangriffs auf makroskopischer Ebene zu untersuchen. Die DPPC-Monoschicht enthält 0,25 mol% fluoreszierendes NBD-DPPC. Dieses Lipid wird, aufgrund sterischer Ursachen, von der flüssig-kondensierten Phase ausgeschlossen und reichert sich bevorzugt in der flüssig-expandierten Phase an. Dadurch erscheinen die Domänen in schwarz. Abbildung 4.2 zeigt die Domänen am Ende des Koexistenzbereichs auf einer EDTA-Fe^{2+}-Subphase. Die DPPC Domänen sind chiral, aufgrund der Chiralität des L-α DPPC Moleküls. [Möhwald 1993] Die meisten Domänen haben eine sogenannte bean-shape Form (Form einer Bohne), aber auch multilobed Formen können beobachtet werden.

Die Injektion von Wasserstoffperoxid verursacht eine Strömung, die zu einer starken Drift der Monoschicht führt. Darum können die ersten Bilder erst 2 min nach dem Radikalangriff aufgenommen werden (Abb. 4.2, oben rechts). Nach dem Angriff erscheinen viele neue, kleine Domänen. Die Größenverteilung der Domänen ist bimodal, was auf eine plötzliche und homogene Nukleation der Domänen hinweist. Die laterale Verteilung der Domänen ist hingegen inhomogen. Große Domänen fusionieren zum Teil nach drei Minuten (Abb. 4.2, unten links) und umschließen ein Teil der flüssig-expandierten Phase. Diese zeigen aufgrund der lokal erhöhten Farbstoff-konzentration des Öfteren eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Offensichtlich verhindert die plötzliche Verschmelzung der Domänen ein Einstellen einer Gleichgewichts-konzentration der NBD-gelabelten DPPC-Lipide innerhalb der flüssig-expandierten Phase. Die Ursache für die Domänenfusion ist wahrscheinlich die Bewegung der Monoschicht in Kombination mit der Radikalattacke.

Nach vier Minuten erscheint es so, als ob die Domänen in alle Richtungen wachsen. Eventuell verbinden sich die kleinen mit den großen Domänen. Nach fünf Minuten ist nichts mehr zu erkennen, weil der Farbstoff von den Radikalen zerstört wurde. Obwohl die chromophore Gruppe an einer Alkylkette gebunden ist, befindet sie sich dennoch in der hydrophilen Region [Tsukanova 2002] und ist somit von den Radikalen angreifbar.

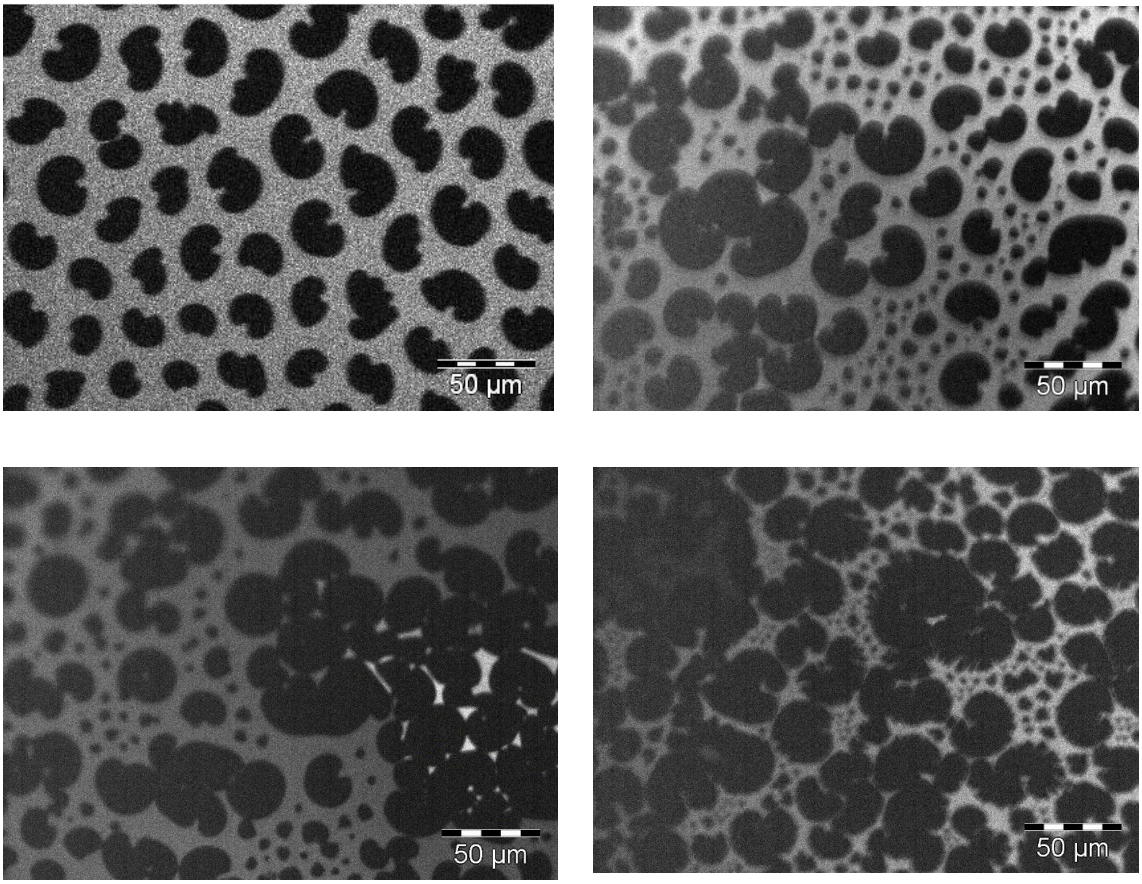


Abb. 4.2 Fluoreszenzmikroskopie einer DPPC Monoschicht auf einer 2 mmol L^{-1} Fenton-Lösung vor und nach dem Radikalangriff. Oben links: DPPC Monoschicht im Koexistenzbereich bei 9 mN m^{-1}. Die anderen Bilder sind nach zwei Minuten (oben rechts), drei (unten links) und vier Minuten (unten rechts) nach der Injektion von Wasserstoffperoxid aufgenommen. Während dieser Aufnahmen fiel der laterale Druck. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

4.1.3 Brewsterwinkel-Mikroskopie

Mithilfe der Brewsterwinkel-Mikroskopie konnten wir auch den Endzustand nach der Radikalattacke beobachten. Abbildung 4.3 zeigt neben einer irreversibil verfestigten Monoschicht, die reine Wasseroberfläche. Es existiert nur eine feste Phase. Diese ist nicht zu verwechseln mit der flüssig-kondensierten bzw. mit der kondensierten Phase. Phasenübergänge finden bei einer Kompression bzw. einer Expansion nicht mehr statt. Auch durch Temperaturerhöhung konnte die Monoschicht nicht verflüssigt werden. Auffallend ist, dass innerhalb der festen Monoschicht runde Flächen existieren, die wie Domänen aussehen. Das Bild wurde im vollständig expandierten Zustand nach dem Radikalangriff aufgenommen (Punkt A), wo man normalerweise nur die Gasphase erwartet.

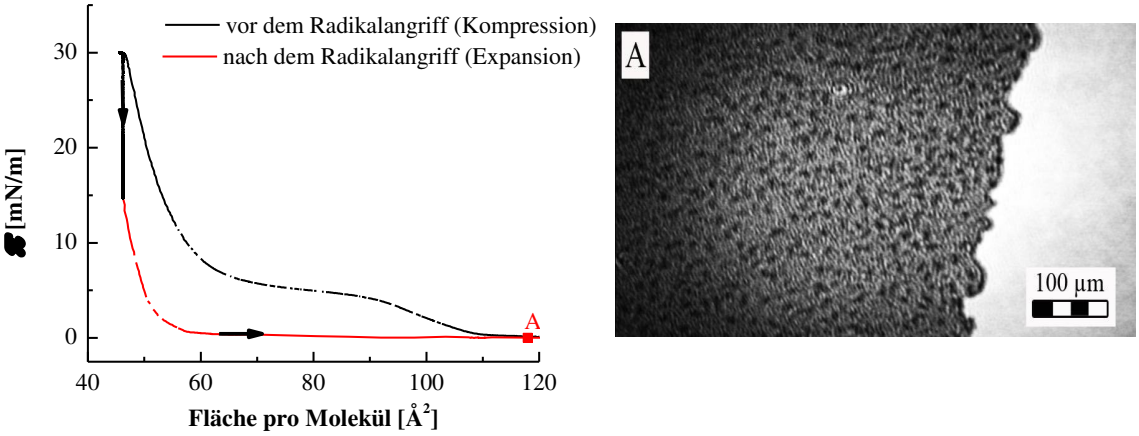


Abb. 4.3 Links: die DPPC Monoschicht wurde bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert. Bei konstanter molekularer Fläche wurde ein Radikalangriff mit einer Fenton-Konzentration von 2 mmol L^{-1} durchgeführt. Der laterale Druck nimmt ab, bis sich ein neuer Gleichgewichtsdruck einstellt. Anschließend wurde die Monoschicht vollständig expandiert und das Bild rechts (am Punkt A) aufgenommen. Es ist eine feste Phase und die reine Wasseroberfläche erkennbar.

4.1.4 IRRAS

Eine Erklärung für die Abnahme der molekularen Fläche im komprimierten Zustand ist eine mögliche Fragmentierung des DPPC Moleküls nach dem Radikalangriff. Um Erkenntnisse des Radikalangriffs auf molekulare Ebene zu gewinnen, wurden IRRAS Experimente durchgeführt.

Abbildung 4.4 zeigt ein IRRA-Spektrum einer DPPC Monoschicht bei 21 °C und einem lateralen Druck von 30 mN m^{-1} (schwarze Linie) vor dem Radikalangriff. Die Bereiche zwischen 900 bis 1800 cm^{-1} und 2800 bis 3000 cm^{-1} werden genutzt, um Informationen über Orientierung und Konformationsordnung der Kohlenwasserstoffketten ($\nu_s(CH_2)$ und $\nu_{as}(CH_2)$), der Hydratisierung ($\nu(CO)$), Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen ($\nu_{as}PO^{2-}$) sowie über die Konformation der Kopfgruppe zu erhalten. [Estralda-Lopis 2001] Ein weiteres Spektrum wurde nach der Radikalattacke bei gleicher molekularen Fläche, aber bei neuem Gleichgewichtsdruck (13 mN m^{-1}) aufgenommen (rot gepunktet). Danach wurde die Monoschicht komplett expandiert und wieder bis 30 mN m^{-1} komprimiert, um die IRRA Spektren bei gleichem Oberflächendruck vergleichen zu können (grüne gestrichelte Linie).

Abbildung 4.4 (unten links) zeigt das IRRA-Spektrum von DPPC im Bereich von 950 bis 1300 cm^{-1} vor und nach dem Radikalangriff. Die Vibrationsbanden von CN^+C bei 975 cm^{-1} und $R_1O\text{-}P\text{-}OR_2$ bei 1061 cm^{-1} sind charakteristisch für DPPC. [Estralda-Lopis 2001, Wagner 2007] Die CN^+C Bande bei 975 cm^{-1} kann jedoch für eine quantitative Analyse nicht genutzt werden, weil die Sensitivität des Detektors bei Wellenzahlen kleiner 970 cm^{-1} stark abnimmt. Weiterhin ist die Intensität der Bande sehr schwach und das Signal/Rausch Verhältnis nimmt in dieser Region aufgrund der Wasserverdampfung während der Reaktion ab. [Estralda-Lopis 2001]

DPPC hat bei 1088 cm^{-1} ($\nu_s(PO_2^-)$) und bei 1230 cm^{-1} ($\nu_{as}(PO_2^-)$) die typischen Phosphat-Schwingungsbanden (Abb. 4.4, unten links). Der Radikalangriff führt einerseits zu einem Intensitätsanstieg der symmetrischen $\nu_s(PO_2^-)$ Bande und andererseits zu einer Intensitätsabnahme der asymmetrischen Phosphat-Schwingungsbande $\nu_{as}(PO_2^-)$. Die Intensität der $R_1O\text{-}P\text{-}OR_2$ Bande bei 1061 cm^{-1} nimmt ebenfalls zu.

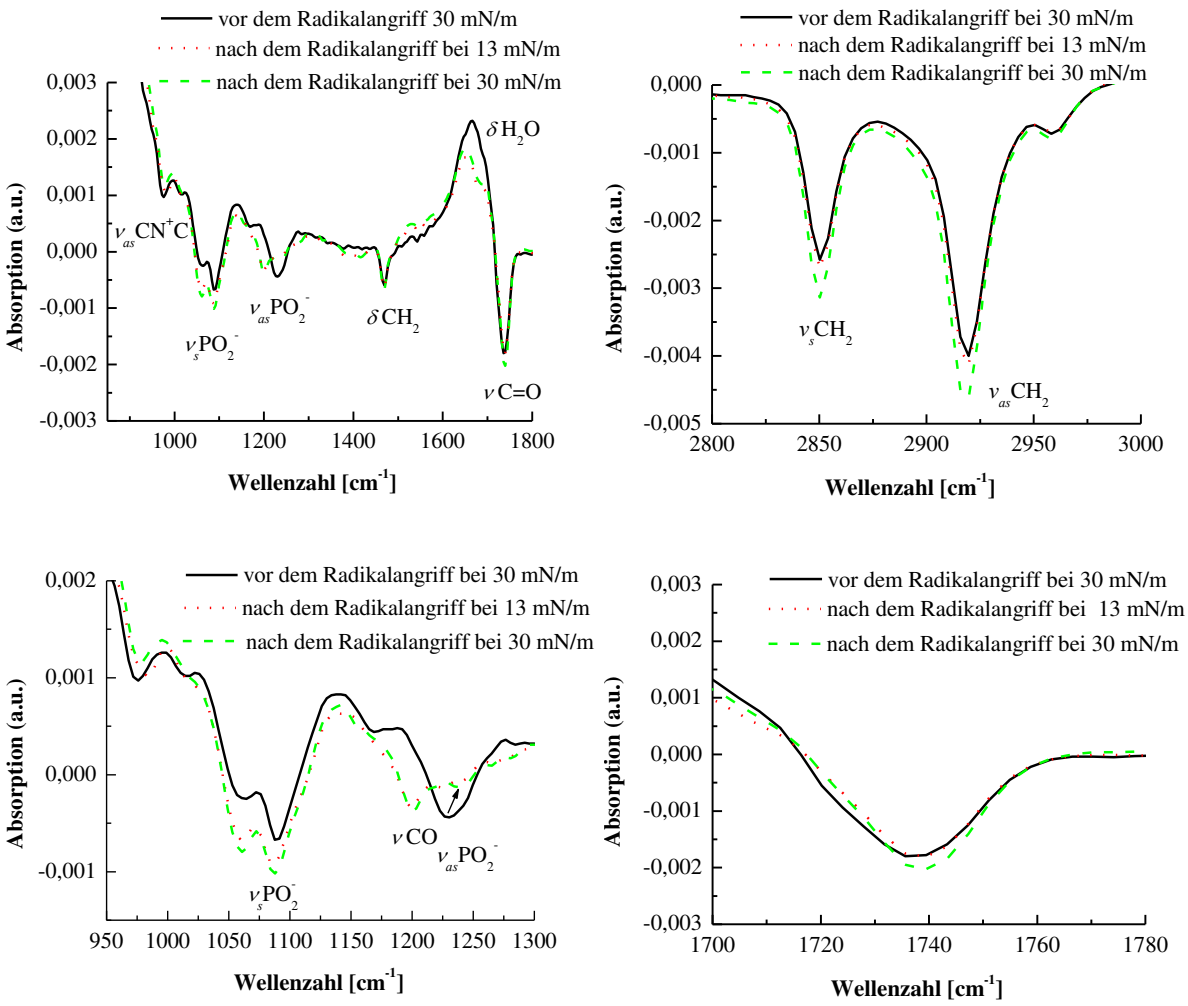


Abb. 4.4 s-polarisiertes IRRA Spektrum einer DPPC-Monoschicht bei 21 °C vor (30 mN m^{-1}, schwarze Linie) und nach dem Radikalangriff mit einer Fenton-Konzentration von 2 mmol L^{-1}. Nach dem Radikalangriff stellt sich nach 3 Stunden ein neuer Gleichgewichtsdruck von 13 mN m^{-1} ein. Anschließend wurde ein IRRA Spektrum aufgenommen (rote gepunktete Linie). Danach wurde die Monoschicht expandiert und wieder bis zu einem Oberflächendruck von 30 mN m^{-1} komprimiert. Das letzte Spektrum wurde aufgenommen (grüne gestrichelte Linie). Oben: typische IR-Banden von der Kopfgruppe (links) und den Alkylketten (rechts) vor und nach dem Radikalangriff. Unten: Vergrößerung der Phosphat- (links) und der Carbonyl-Schwingungsbanden (rechts).

Offensichtlich verändert sich die Orientierung und Ladung der DPPC Kopfgruppe. DPPC ist ein zwitterionisches Molekül und die Positionen der Vibrationsbanden sind unabhängig vom pH-Wert und der Ionenzusammensetzung der Subphase. [Estralda-Lopis 2001] Sollte die wasserlösliche Cholin- bzw. die Trimethylammonium Gruppe durch den Radikalangriff abgetrennt werden und in Lösung gehen, erhält die Kopfgruppe eine negative Ladung. In diesem Fall, können unterschiedliche pH-Werte und Ionenzusammensetzungen der Subphase den Ionisierungsgrad sowie die Orientation der Phosphatgruppe in Bezug zur Ebene der Monoschicht beeinflussen. [Estralda-Lopis 2001] Die Verschiebung der asymmetrischen Phosphat-Schwingungsbande kann mit der Bindung von Fe^{2+} Ionen bzw. Fe^{3+} Ionen begründet werden. Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-Ionen bilden mit EDTA Komplexe und sind nicht „frei“ in der Lösung vorhanden. Es kann jedoch sein, dass die Hydroxyl-Radikale den Komplex zerstören und die dadurch „freien“ Eisen-Ionen an die negativ geladenen Phosphatgruppen binden. [Estralda-Lopis 2001]

Sehr interessant ist das Entstehen einer neuen Bande nach dem Radikalangriff bei 1200 cm^{-1}. Diese Schwingungsbande kann einer CO Einfachbindung zugeordnet werden. Diese kann entstehen wenn ein Hydroxyl-Radikal die Trimethylammonium Gruppe abtrennt (Abb. 4.5). Dadurch wird ein $N(CH_3)_3$-Radikal gebildet, welches mit einem weiteren Hydroxyl-Radikal weiter zu Trimethylaminoxid reagiert. Trimethylaminoxide (TMAO) wurden z.B. als Marker für Herzkreislauf Erkrankungen nachgewiesen. [Wang 2011] Diese Reaktion würde das Vorkommen von TMAO erklären.

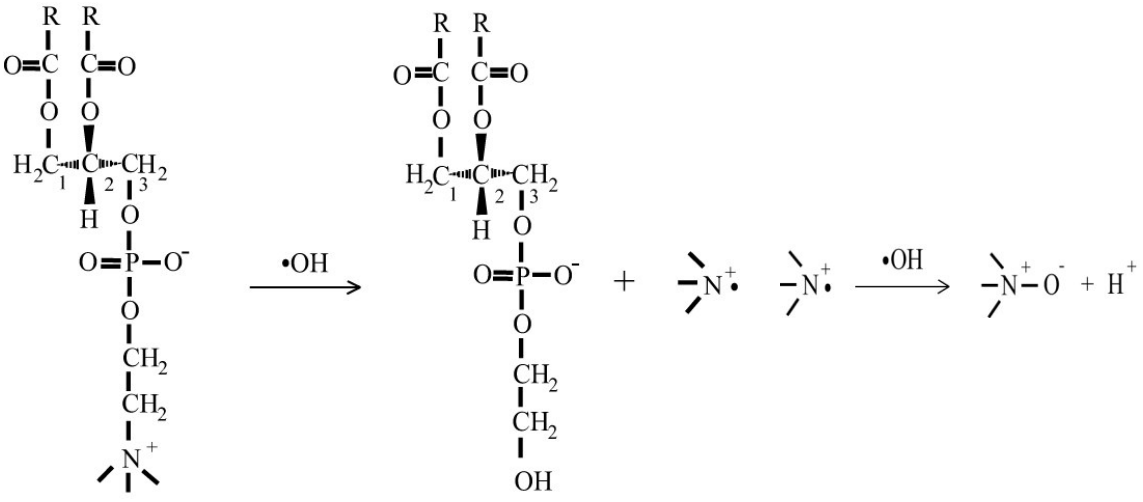


Abb. 4.5 Mögliche Reaktion der Hydroxyl-Radikale mit DPPC Moleküle einer Lipidmonoschicht

Abbildung 4.4 (unten rechts) zeigt die Region der Ester Streckschwingung ν(C=O). Diese Bande besteht aus zwei überlappenden Komponenten, eine bei 1740 cm^{-1} und die andere bei 1726 cm^{-1}. Die hochfrequente Komponente der Bande wird der freien (nicht Wasserstoff gebundenen) Carbonylgruppe zugeordnet. Dagegen ist die untere Frequenzkomponente der Wasserstoff gebundenen Carbonylgruppe zugehörig. Nach dem Radikalangriff ist die Bande mehr symmetrisch und eine kleine Verschiebung der hochfrequenten Komponente sowie ein Anstieg der Intensität der ganzen ν(C=O) Streckschwingung ist zu beobachten (Abb. 4.4 unten rechts). Dies kann mit einem dichter gepackteren Produkt sowie mit einem eventuellen Aufrichten der Alkylketten nach der Reaktion mit den Radikalen erklärt werden.

Die Position der symmetrischen CH_2 Streckschwingung bei 2850 cm^{-1} und der asymmetrischen Streckschwingung bei 2918 cm^{-1} in der flüssig-kondensierten Phase weisen auf gut gepackte Alkylketten mit all-trans Konformation hin (Abb. 4.4 rechts oben). Die Position bleibt nach der Radikalattacke unverändert. Auffällig ist jedoch der Intensitätsanstieg nach dem Radikalangriff in dieser Region. Dieser weist ebenfalls auf ein Aufrichten der Alkylketten und auf eine höhere Packungsdichte hin. [Mendelsohn 2010] Um dieses Ergebnis zu quantifizieren wurde Röntgendiffraktion durchgeführt.

4.1.5 Röntgendiffraktion bei streifenden Einfall

Die kristalline Struktur der Alkylketten wurde vor und nach der Radikalattacke aufgenommen. Die linke Spalte in Abbildung 4.6 zeigt die Diffraktionpeaks einer frisch präparierten DPPC Monoschicht am Ende des Koexistenzbereichs auf einer Subphase mit 2 mmol L^{-1} $NH_4Fe(II)SO_4$ und 2,5 mmol L^{-1} EDTA. Es können zwei Peaks beobachtet werden: der erste bei $q_{xy} \approx 1{,}45$ $Å^{-1}$ ($q_z = 0$) und der zweite (entartete) Peak bei $q_{xy} \approx 1{,}28$ $Å^{-1}$ und $q_z \approx 0{,}75$ $Å^{-1}$. Diese Peaks sind typisch für geneigte Alkylketten in Richtung des nächsten Nachbarn (NN). Die Struktur wurde mit 8 Parameter gefittet: zwei q_{xy} Positionen (bestimmen das 2-dimensionale Gitter), zwei verschiedene Peakbreiten in der q_{xy} Richtung (umgekehrt proportional zur Korrelationslänge), q_z Position (Bestimmung des Neigungswinkel der Alkylketten), eine Peakbreite in q_z Richtung (umgekehrt proportional zur Alkylkettenlänge) und zwei Peakintensitäten.

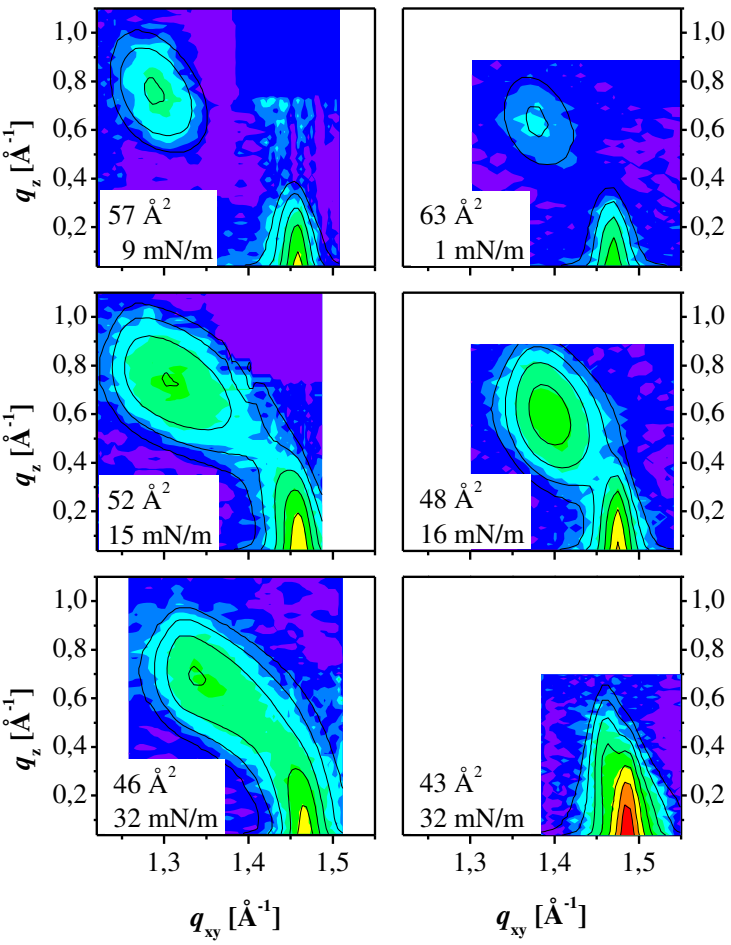


Abb. 4.6 Röntgendiffraktionsmessungen einer DPPC Monoschicht auf einer 2 mmolL^{-1} Fenton-Lösung, vor und nach einem Radikalangriff. Die Messungen sind entlang der Isotherme aufgenommen (von oben nach unten, der laterale Druck und molekulare Fläche sind jeweils angegeben). Links: vor dem Radikalangriff sind zwei Diffraktionspeaks erkennbar. Mit zunehmender Kompression verschiebt sich q_{xy} zu größeren Werten, was auf einen kleineren Gitterabstand hindeutet. Gleichzeitig verschiebt sich der Peak bei großen q_z zu kleineren Werten, ein Hinweis auf die Abnahme des Neigungswinkels. Rechts: Kompression der Monoschicht nach dem Radikalangriff: bei einem lateralen Druck von fast null sind zwei Peaks mit größeren q_{xy}- und kleineren q_z-Positionen erkennbar. Die Linien sind Fits, die Intensitäten sind logarithmisch farbcodiert

Wird die Monoschicht komprimiert, verschieben sich die q_{xy} -Positionen zu größeren Werten, was einer Abnahme der Gitterabstände gleich kommt. Gleichzeitig verschiebt sich der q_z-Wert zu kleineren Werten, was eine Abnahme des Neigungswinkels bedeutet. Man erkennt aber auch, dass die Hauptachse des q_z-Peaks geneigt zur q_z-Achse liegt und die Breite des q_z-Peaks mit der Komprimierung zunimmt, wodurch eine kontinuierliche Intensitätsverteilung in Form einer Banane (bei hohen Drücken) entsteht. Um die Verzerrung des Peaks zu modellieren, wird ein zusätzlicher Parameter eingeführt, der die Richtungsverteilungen des Neigungswinkels (Azimuth) $\Delta\psi$

beschreibt. Es wird davon ausgegangen, dass die gestreute Strahlung eine inkohärente Überlagerung von ähnlichen aber leicht verschiedenen 2-dimensionalen Kristallen ist. [Günther 2009] Nur wenige Kristalle bestehen aus Lipide deren Alkylketten eine exakte NN-Orientation (nächste Nachbarn) aufweisen. Die Azimuthrichtung ψ verändert sich leicht zwischen den einzelnen Kristallen, wodurch verschiedene Gitterparameter in der ebenen Fläche resultieren. Alle Diffraktionspeaks werden mit den neun Parametern gefittet (nach dem Radikalangriff bei 31,7 mN m^{-1} wird nur die Breite des q_{xy} Peaks genutzt).

Der Radikalangriff wurde auf zwei verschiedenen DPPC Monoschichten durchgeführt mit unterschiedlichen Verhältnissen von Wasserstoffperoxid zu Fe^{2+}-Ionen. Im ersten Fall war das Verhältnis 3:1. Hier kann nur eine kleine Veränderung der Isotherme festgestellt werden, ähnlich des Radikalangriffs mit 1 mmol L^{-1} bei 5,4 mN m^{-1} (siehe Abb.4.1, unten links). Dieser Radikalangriff wird daher als schwacher Angriff bezeichnet. Im zweiten Fall war das Verhältnis Wasserstoffperoxid zu Fe^{2+}-Ionen 5:1. Die Auswirkungen des Angriffs sind viel stärker. Deshalb wird dieser Angriff als starker Angriff bezeichnet. Zwei Diffraktionspeaks sind bei einem lateralen Druck von Null zu beobachten. Diese Peaks (siehe Abb. 4.6, rechts oben) ähneln, qualitativ betrachtet, denen von DPPC vor dem Radikalangriff mit einer NN-Orientation der Alkylketten am Ende des Koexistenzbereich bei 9 mN m^{-1}. Außerdemist die q_z -Position des zweiten (entarteten) Peaks kleiner, als die vor dem Radikalangriffs bei 9 mN m^{-1}, was eine Abnahme des Neigungswinkels zeigt. Wird die Monoschicht komprimiert, verschiebt sich der Peak zu kleineren q_z -Werten, bis die zwei Peaks miteinander verschmelzen. Weiterhin ist der erste Peak (bei $q_z = 0$) nach dem Angriff schmaler als vor dem Angriff (in q_{xy} -Richtung). Dies weist auf eine Zunahme der Korrelationslänge innerhalb der Oberflächenebene hin. Abbildung 4.7 zeigt strukturelle Informationen, die aus den Diffraktionsdaten abgeleitet wurden. Vor dem Radikalangriff nimmt der Neigungswinkel der DPPC Monoschicht bei Kompression von 35° auf 27° ab (siehe Abb. 4.7, oben), was mit früheren Untersuchungen übereinstimmt. [Dyck 2005] Der große Neigungswinkel des DPPC Moleküls resultiert aus der, fast nicht komprimierbaren, großen Kopfgruppe. Geht man von einer konstanten Alkylkettendichte aus, ändert sich der Neigungswinkel mit Abnahme der molekularen Fläche A mit $\cos t_a = 40{,}4/A$ (A in $Å^2$). [Kaganer 1999] Nach dem schwachen Radikalangriff hat sich die Isotherme wie auch der Neigungswinkel nur leicht verändert. Hingegen war der Neigungswinkel nach dem starken Angriff bereits

30° bei einem lateralen Druck von Null. Die Abnahme der molekularen Fläche bei hohem Druck (siehe Abb. 4.1) ist verbunden mit einem minimalen Neigungswinkel von 15°. Solche kleinen Neigungswinkel wurden für Phospholipide mit kleinen Kopfgruppen gefunden z.B. PE oder PA oder bei Mischungen des zwitterionischen DPPC mit anionischen PA. [Kaganer 1999, Estralda-Lopis 2001] Auffällig ist, dass nach dem Radikalangriff die Peakintensität bei 32 mN m^{-1} eine Größenordnung größer ist, als bei allen anderen Messungen (siehe Abb. 4.6, rechts unten). Dies weist auf eine Soldifikation der Monoschicht hin, die mit den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen und den BAM-Aufnahmen übereinstimmen.

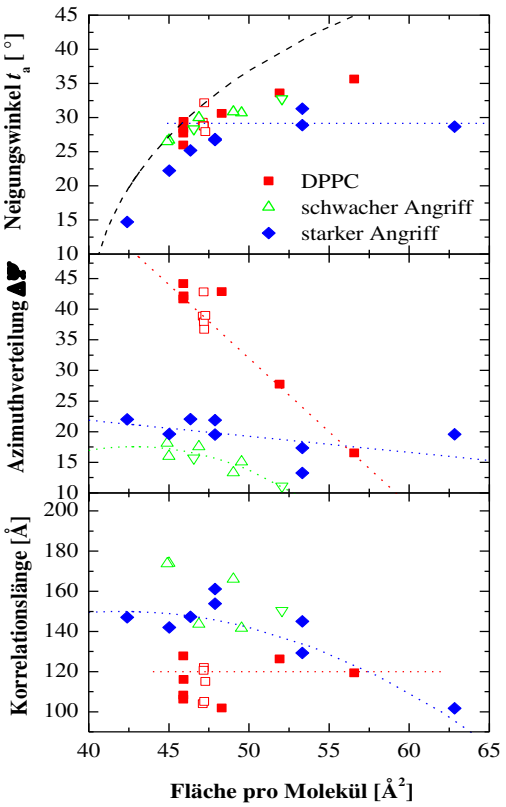


Abb. 4.7 Strukturelle Parameter entnommen aus den Röntgendiffraktionspeaks gemessen entlang der Isotherme. Zwei Monoschichten wurden vor dem Radikalangriff untersucht (rote offene und geschlossene Quadrate). Ebenfalls wurden zwei Monoschichten nach dem Radikalangriff untersucht (ein schwacher (grüne offene Dreiecke) und ein starker (geschlossene blaue Karos) Angriff). Oben: Neigungswinkel t_a bezüglich der Oberflächen Normalen. Nach dem starken Radikalangriff, können kleinere molekulare Flächen erreicht werden mit kleinerem Neigungswinkel. Gestrichelte Linie: Neigungswinkel berechnet nach cos t_a = 40,4/A (A in Å^2); gepunktete Linie: konstanter Neigungswinkel im Koexistenzbereich fest/gasförmig bei 0-5mN m^{-1}. Mitte: Azimuthverteilung $\Delta\psi$. Vor dem Radikalangriff nimmt $\Delta\psi$ mit der Komprimierung zu. Nach dem Radikalangriff ist die Azimuthverteilung kleiner. Unten: Korrelationslängen ξ wurde aus der Breite des Diffraktionspeaks q_{xy} mit q_z = 0 bestimmt. Vor dem Radikalangriff ist ξ konstant (ca. 120 Å, rote gestrichelte Linie). Nach dem Radikalangriff nimmt ξ mit der Kompression zu, dargestellt mit der blauen gepunkteten Linie.

Unerwartet sind die Ergebnisse der Azimuthverteilung $\Delta\psi$ (siehe Abb. 4.7 Mitte). Vor der Radikalattacke ist $\Delta\psi$ klein und nimmt mit zunehmender Kompression der DPPC-Monoschicht zu (von 15° auf 45°). Daher scheint es, als ob einige Moleküle aus der Subphase, höchstwahrscheinlich die Eisen-EDTA-Komplexe, an der Kopfgruppe adsorbieren und die lokale Konformation verändern. Nach dem schwachen wie auch nach dem starken Radikalangriff ist $\Delta\psi$ klein und verändert sich mit der Kompression der Monoschicht nur wenig (von 15° auf 20°), ähnlich einer DPPC-Monoschicht auf Wasser (Daten nicht gezeigt). Daraus ist zu schlussfolgern, dass die adsorbierten Moleküle während des Radikalangriffs zerstört bzw. so verändert werden, dass diese nicht mehr mit der Lipidmonoschicht wechselwirken können. Die Tatsache, dass die großen Azimuthverteilungen schon bei schwachen Radikalangriffen verschwinden, zeigt dass die laterale Wechselwirkung zwischen Monoschicht und adsorbierten Molekülen sehr schwach ist.

Die Abnahme der Peakbreite (q_{xy}) nach dem Radikalangriff, bedeutet eine Zunahme der Korrelationslänge. Abbildung 4.7 (unten) zeigt die Korrelationslängen in der Oberflächenebene senkrecht zur Azimuthrichtung. Vor dem Radikalangriff ist die Korrelationslänge über 110 Å und unabhängig von der Kompression. Dieser Wert ist kleiner als für DPPC auf Reinstwasser, der mit Kompression von 140 Å auf 180 Å zunimmt (Daten sind nicht gezeigt). Nach dem Radikalangriff nimmt die Korrelationslänge bis 140-160 Å mit der Kompression zu.

4.1.6 Röntgenreflexion

Für die Röntgenreflexionsmessungen befindet sich die DPPC-Monoschicht auf einer wässrigen Subphase bestehend aus 2 mmol L^{-1} Mohrsches Salz und 2,5 mmol L^{-1} EDTA. Die Monoschicht wird bis zu einem lateralen Druck von 23,1 mN m^{-1} komprimiert (siehe Abb. 4.8, Inset). Anschließend wird die Röntgenreflektivität gemessen. Danach wird der Radikalangriff durchgeführt. In diesem Trog fiel der Druck über 4 Stunden, bis sich der neue Gleichgewichtsdruck (8 mN m^{-1}) einstellte. Zwei Röntgenreflexionsmessungen wurden durchgeführt (je 4,5 Stunden). Die eine während und die andere nach dem Radikalangriff. Nach den Röntgenreflexions-messungen wurde die Monoschicht komplett expandiert und dann wieder komprimiert.

Der molekulare Flächenverlust war ungefähr 4-5 Å^2 pro Molekül. Dies spricht für einen starken Radikalangriff (siehe Abb. 4.1, unten rechts). Die Reflexionsmessungen sind typisch für Phospholipidmonoschichten. Die reflektierte Intensität steigt mit q_z, bis ein erstes Maximum erreicht ist. Danach folgt ein Minimum aus dessen Position die Dicke der Monoschicht bestimmt werden kann (siehe Kapitel 2.9.4.1).Weiterhin erkennt man ein zweites ausgeprägtes Maximum.

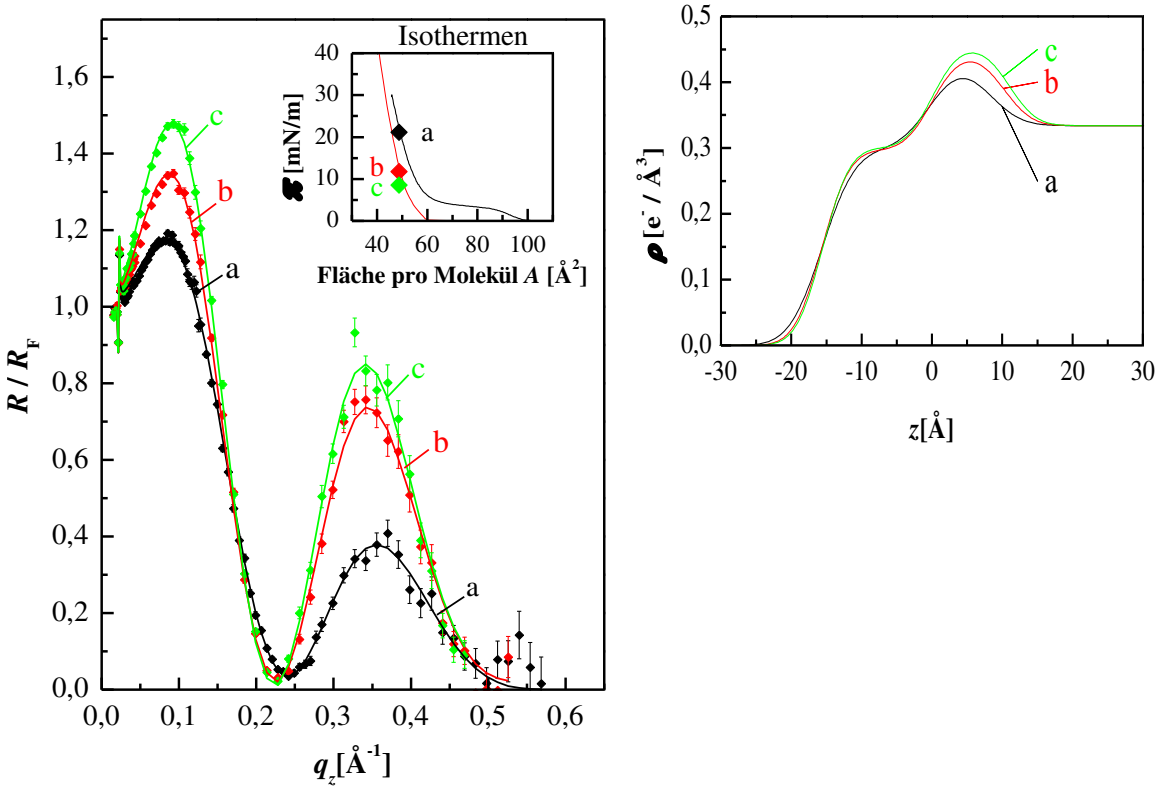


Abb. 4.8 Links: Normierte Röntgenreflektivität einer DPPC Monoschicht auf einer 2 mmol L^{-1} Fenton-Lösung, vor (Messung a bei 23 mN m^{-1}, schwarz), während (Messung b, rot) und nach (Messung c bei 8 mN m^{-1}, grün) dem Radikalangriff. Die molekulare Fläche wurde während den Messungen konstant gehalten. Die Isothermen sowie der laterale Druck, bei dem die Messungen durchgeführt wurden, sind im Inset abgebildet. Ebenfalls ist die Kompressionsisotherme nach dem Radikalangriff (rot) dargestellt. Rechts: Das Elektronendichteprofil zeigt die unveränderte hydrophobe Region sowie die Kopfgruppe die in Länge und Elektronendichte zunimmt. z = 0 wird an der Grenzfläche zwischen den hydrophoben Alkylketten und der hydrophilen Kopfgruppe gesetzt.

Nach dem Radikalangriff nimmt die Intensität der Maxima zu. Dieser Effekt ist schon nach zwei Stunden während des Druckabfalls messbar und ist nach Erreichen des Gleichgewichtsdrucks noch stärker ausgeprägt. Ebenfalls verschiebt sich die Position des Minimums und des zweiten Maximums zu kleineren q_z-Werten, was auf eine Schichtdickenzunahme hinweist.

Für die Datenanalyse wurde ein Einfaches zwei Box-Model für Phospholipid-monoschichten genutzt. Eine Box für den hydrophoben Teil mit einer geringen Elektronendichte und eine Box für die hydrophile Kopfgruppe mit hoher Elektronendichte. Die hohe Elektronendichte ist auf die Phosphatgruppe zurückzuführen. [Helm 1987, Dyck 2005]

Die gemessenen Reflektivitätsdaten zeigen leichte Unterschiede zwischen DPPC auf Wasser [Helm 1987, Baltes 1996] und DPPC auf einer Subphase mit Mohrschen Salz und EDTA. Das erste Maximum ist niedriger und das dritte Maximum kann nicht aufgelöst werden. Die Datenanalyse zeigt, dass die DPPC Kopfgruppe vor dem Fentonangriff (auf einer $NH_4Fe(II)SO_4$, EDTA-Lösung) kleiner ist als auf Wasser.

Die kleinere Kopfgruppe resultiert durch die Adsorption von hydratisierten Ionen des Mohrschen Salz bzw. durch den EDTA-Komplex. Es sei angemerkt, dass die Trimethylammonium Gruppe sowie die $-(CH_2)_2-$ Gruppe, die die Trimethylammonium Gruppe an die Elektronen reiche Phosphatgruppe bindet, die gleiche Elektronendichte wie Wasser haben und dadurch für die Röntgenreflektivität unsichtbar sind. Ebenso ist die Elektronendichte des adsorbierten Komplexes ähnlich wie die des Wassers. Dadurch ist die Adsorption nicht direkt sondern nur deren Auswirkungen beobachtbar. Die Adsorption von hydratisierten Ionen des Mohrschen Salz bzw. durch den EDTA-Komplexvor dem Angriff steht im Einklang mit dem Ergebnis, dass durch die Röntgendiffrakion gewonnen wurden.

Nach dem Radikalangriff sind die Dicke und die Elektronendichte der hydrophoben Ketten unverändert. Diese Beobachtung stimmt mit den IRRAS Untersuchungen überein. Diese haben gezeigt, dass die chemischen Veränderungen nur in der Kopfgruppe auftreten. Auch bei der Röntgenreflexion sind Veränderungen nur in der Kopfgruppe zu erkennen. Die Länge der Kopfgruppe und die Elektronendichte nehmen aufgrund der Anbindung von Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-Ionen zu. Normalerweise binden Eisen-Ionen nicht an einer DPPC-Monoschicht (Röntgenreflexionsmessungen von DPPC auf 2 mmol L^{-1} Mohrschen Salz mit und ohne 2,5 mmol L^{-1} EDTA sind identisch).

Um die Veränderungen der Kopfgruppe zu quantifizieren, müssen nicht nur die Elektronen der Kopfgruppe sondern auch die Elektronen der eingelagerten Wassermoleküle berücksichtigt werden. Mit dem Ziel, die Elektronen in der Kopfgruppe E_{head} vor und nach dem Radikalangriff zu vergleichen, geht man von einem konstanten Volumen V_{head} aus. Deshalb wird zu V_{head} ein bestimmtes Volumen an Wasser $\delta V_{\text{H}_2\text{O}}$ dazu addiert, bis die maximale Länge der Kopfgruppe l_{max} = 11 Å erreicht wird. Damit ist:

$$V_{\text{head}} = V_{\text{mol}} + n_{\text{H}_2\text{O}} \times V_{\text{H}_2\text{O}} = A \times l_{\text{max}} \qquad \textbf{(IV-1)}$$

Dabei ist A die molekulare Fläche und V_{mol} das molekulare Volumen von DPPC ohne Wasser.
Ähnlich werden auch die Elektronen der Kopfgruppe angepasst.

$$\delta E = \rho_{\text{sub}} \times \delta V = \rho_{\text{sub}} \times A \times (l_{\text{max}} - l_{\text{head}}) \qquad \textbf{(IV-2)}$$

ρ_{sub} ist die Elektronendichte der Subphase und l_{head} ist die Länge der Kopfgruppe vor dem Radikalangriff. Dies führt zu:

$$E_{\text{head}} = A \times (\rho_{\text{head}} \times l_{\text{head}} + \rho_{\text{sub}} \times (l_{\text{max}} - l_{\text{head}}) \qquad \textbf{(IV-3)}$$

Um die Anzahl der Elektronen in der Kopfgruppe vor E_{head}(b) und nach dem Radikalangriff E_{head}(a) zu vergleichen wird die Differenz gebildet:

$$\Delta E = E_{\text{head}}(a) - E_{\text{head}}(b) = 20 - 25 \text{ e}^- \qquad \textbf{(IV-4)}$$

Diese Elektronenanzahl entspricht einem Eisen Ion. Dies bedeutet, dass ein Eisen Ion an einem DPPC Molekül bindet. Diese Schlussfolgerung ist jedoch nur unter bestimmten Annahmen richtig:

1. Die Phosphatgruppe mit ihrer großen Elektronendichte verbleibt an der Kopfgruppe.
2. Die abgetrennte Kopfgruppenkomponente hat die gleiche Elektronendichte wie Wasser und das partielle Volumen von Fe^{2+} ist Null (eigentlich sogar negativ [Haynes 2010-11]).

3. Die Radikale zerstören auch Eisen-EDTA-Komplexe, wodurch „freie“ Eisen-Ionen entstehen und an die entgegengesetzt geladene Monoschicht adsorbieren.

Diese Annahmen werden durch die IRRAS-Untersuchungen gestützt. Sie zeigten, dass die positiv geladene Aminogruppe abgetrennt wird, während die Phosphatgruppe gebunden bleibt. Weiterhin verschiebt sich die asymmetrische Phosphatschwingungsbande zu höheren Wellenzahlen und nimmt an Intensität ab. Hingegen nimmt die symmetrische Phosphatstreckschwingung an Intensität zu. Dies sind Hinweise auf das Anbinden von Eisen-Ionen.

4.1.7 Diskussion

Die Veränderungen der Isotherme durch den Radikalangriff sind reproduzierbar. Die Methode zum Messen der Effizienz des Radikalangriffs hat sich bewährt. Dabei wird die Abnahme des lateralen Drucks bei konstanter molekularer Fläche genutzt, nicht jedoch die Konzentration des Morschen Salzes, die Menge an EDTA oder die von Wasserstoffperoxid.
Vergleicht man die Effizienz des Radikalangriffs bei gleichen Ausgangskonzentrationen (EDTA-Eisen-Lösung und Wasserstoffperoxid), jedoch in unterschiedlichen Trögen mit verschiedenen Fläche/Volumen Verhältnissen, so ist diese unterschiedlich. Die Lebenszeit der Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) liegt unterhalb einer Sekunde. [Lin 1998] Dennoch zeigt die laterale Druckabnahme bei konstanter molekularer Fläche, dass die Reorganisation der Monoschicht Stunden dauert. Wie die Reaktion genau abläuft ist unbekannt. Wir können jedoch sagen, dass die Reaktion hauptsächlich an der Kopfgruppe stattfindet und die Trimethylammonium Gruppe abgetrennt wird.
Die Ursache, dass die Kinetik in unterschiedlichen Trögen variiert, liegt vielleicht an folgende Fakten:

1. Die Injektion des Wasserstoffperoxids ist lokal begrenzt.
2. Die Fenton-Reaktion ist schnell und möglicherweise schon vor dem Ende des Rührens fast vollständig vollzogen.

Wieviele Radikale die Monoschicht erreichen, hängt am Ende von der Tiefe und der Oberfläche des Troges ab, sowie vom Entstehungsort der Radikale.

Die Radikale greifen nicht nur die Monoschicht an, sondern auch die EDTA-Eisen-Komplexe, wodurch „freie“ Eisen-Ionen entstehen. Die Eisen-Ionen müssen zur geladenen Kopfgruppe diffundieren und an ihr binden. Die Entstehung der „freien“ Eisen-Ionen in der Subphase wird ungleichmäßig sein, ebenso wie ihre Verteilung.
Um die lange Zeit der Druckabnahme zu verstehen und die Diffusion mit einer Gleichung beschreiben zu können, müssen Näherungen getroffen werden. Wir gehen deshalb:

- von einer homogenen Verteilung der Eisen-Ionen aus,
- dass jedes Eisen Ion an die Monoschicht gebunden wird, das diese erreicht [Schmitt 1999] und
- das ein Eisen Ion an einem Lipid (50 $Å^2$) (Oberflächen Bedeckung Γ ist dann 2 nm^{-2}) bindet.

Ziel ist es, die Eisen-Konzentration c_0 zu berechnen, die eine Diffusionszeit t von 1000 Sekunden und einer typischen Diffusionskonstante $D_{Fe^{2+}} = 10^{-9}$ m^2s^{-1} erklärt. Dies wird mit der Gleichung IV-5 berechnet.

$$\Gamma = 2c_0\sqrt{\frac{D_{Fe^{2+}} \times t}{\pi}} \qquad \textbf{(IV-5)}$$

Die Konzentration c_0 ist somit 3 µmol L^{-1}. Diese Konzentration scheint im ersten Moment sehr klein zu sein. Aber wie man im Kapitel VI sehen wird, können solche kleinen Eisen-Ionen Konzentrationen eine Monoschicht mit negativ geladenen Lipiden (z.B. DMPA oder TMCL) irreversibel verfestigen. Die Vorstellung, dass die lange Zeit der Druckabnahme durch die Diffusion der „freien“ Eisen-Ionen zur Monoschicht zu Stande kommt, wird somit unterstützt.
Die Monoschicht konnte nach dem Radikalangiff und dem Erreichen des Gleichgewichtdrucks zu einer kleineren molekularen Fläche komprimiert werden. Die verringerte molekulare Fläche ist mit einem kleineren Neigungswinkel der Alkylketten verbunden. Dieser ist nach dem Angriff kleiner als für DPPC beobachtet. [Cevc 1987, Kaganer 1999] Die kleinste molekulare Fläche ist 40,4 $Å^2$. Dies entspricht der Fläche von 2 Alkylketten bei der, der Neigungswinkel 0° ist. [Kaganer 1999, Ishimura 2002] PA oder PE Monoschichten können zum Beispiel bis zu einem Neigungswinkel von 0° komprimiert werden (gesättigte Fettsäuren vorausgesetzt), da es zu keiner sterischen Abstoßung zwischen den Kopfgruppen kommt. Folgerichtig, sind die Abnahme des

Neigungswinkels und die Abnahme der molekularen Fläche der Lipide mit der partiellen Abspaltung der Kopfgruppe zu begründen.
Im Vergleich zu einer DPPC Monoschicht auf Wasser zeigen die Diffraktionsdaten vor dem Radikalangriff eine größere Azimuthverteilung $\Delta\psi$ und eine kleinere Korrelationslänge. Einige hydratisierte Moleküle (wahrscheinlich EDTA) adsorbieren an der zwitterionischen DPPC Monoschicht und bewirken eine unterschiedliche lokale Anordnung der Kopfgruppe innerhalb der DPPC Monoschicht. Die Isotherme sowie das IRRA Spektrum von DPPC zeigen keine erkennbaren Unterschiede zwischen DPPC auf Wasser und DPPC auf einer EDTA-Eisen-Subphase. Daher kann man davon ausgehen, dass die adsorbierte Schicht nur schwach gebunden ist und keinen erkennbaren Einfluss auf die lateralen Wechselwirkungen zwischen den Lipiden hat.
Dass der Radikalangriff bevorzugt auf einen Teil der Kopfgruppe stattfindet, wurde so nicht erwartet. Bei der Fenton-Chemie entstehen unterschiedliche Sauerstoffradikale (siehe Kapitel 2.4). Die Hydroxyl-Radikale sind unpolar und könnten im Prinzip in den hydrophoben Teil der Monoschicht eindringen und mit den Alkylketten reagieren. Dagegen spricht jedoch, dass hohe Oxidationspotential. Das Hydroxyl-Radikal reagiert dort, wo es entsteht und oxidiert jedes Molekül, mit dem es in Berührung kommt. Daher ist die Lebensdauer des Hydroxyl-Radikals auch nur einige Nanosekunden. Diese Eigenschaft spricht natürlich für einen Angriff auf die Kopfgruppe.

Alle Daten sprechen ebenfalls für einen bevorzugten Radikalangriff auf einen Teil der Kopfgruppe. Das IRRA Spektrum gibt Hinweise auf ein Abtrennen der Trimethylammonium Gruppe, wodurch die Monoschicht negativ geladen wird. Durch die negative Ladung können Eisen-Ionen anbinden, wie die Röntgenreflexion zeigt. Die Alkylketten bilden Gitter mit Korrelationslängen, die typisch für DPPC auf Wasser sind, was auf unbeschädigte Alkylketten hinweist. Diese können nach dem Radikalangriff zu kleineren Flächen mit kleineren Neigungswinkeln komprimiert werden. Eine kleinere Kopfgruppe ermöglicht dies. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass es gleich nach dem Radikalangriff zu einer homogenen Keimbildung kommt. All diese Fakten beweisen, dass die Alkylketten eine kondensierte Phase bilden. Ebenfalls sind die Alkylketten nach dem Radikalangriff immer noch gut gepackt und weisen eine all-trans Konfiguration auf (kleine Wellenzahlen der CH_2-Streckschwingung). Es sind keine Anzeichen von Fragmentierung oder lateraler Polymerisation der Alkylketten zu erkennen. Dennoch kann man nicht ausschließen, dass einige Alkylketten von der

Kopfgruppe getrennt wurden. Wäre dies der Fall, würden sich die abgetrennten Alkylketten im hydrophoben Teil der Monoschicht aufhalten, wie Messungen von DPPC Monoschichten in einer mit Alkanen gesättigten Luftatmosphäre zeigen. [Brezesinski 1996, Thoma 1996]
Die Veränderung der Kopfgruppengröße beeinflusst die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen und damit die Thermodynamik der Monoschicht. Nach dem Radikalangriff wurde eine Abnahme des Übergangsdrucks π_c gemessen, ein Hinweis auf die Abnahme der intermolekularen Abstoßung. Nach dem Radikalangriff ist die intermolekulare Wechselwirkung ähnlich der von PA oder PE mit ihren kleinen Kopfgruppen. [Cevc 1987]

4.1.8 Zusammenfassung

Der Radikalangriff auf die DPPC Monoschicht wurde mit verschiedenen Fenton-Konzentrationen durchgeführt. Die Abnahme des lateralen Drucks dient zum Messen der Effizienz des Radikalangriffs. Mit zunehmender Fenton-Konzentration verschiebt sich der Koexistenzbereich zu niedrigen Oberflächendrücken, bis dieser völlig verschwindet. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass unweigerlich nach dem Radikalangriff neue Domänen gebildet werden. Ebenso kommt es zu Domänfusionen. Die Röntgenreflexion zeigte, dass nach dem Radikalangriff Eisen-Ionen an der Monoschicht binden. Dies weist auf negativ geladene Lipide hin. Weiterhin konnte an den Isothermen eine Abnahme der molekularen Fläche in der flüssig-kondensieren Phase beobachtet werden. Bei kleinster molekularer Fläche zeigten die Röntgendiffraktionsmessungen, dass die Alkylketten nach dem Angriff einen kleineren Neigungswinkel haben, als für die große DPPC Kopfgruppe sterisch überhaupt möglich wäre. IRRAS Experimente liefern Hinweise auf ein Abtrennen eines Kopfgruppenteils. Daraus schließen wir, dass durch die kleinere Kopfgruppe ein kleinerer Neigungswinkel und eine bessere Anordnung der Alkylketten möglich sind.
Die Verfestigung der Monoschicht kommt durch einen bevorzugten Radikalangriff auf die hydrophile Kopfgruppe zustande.

Zusammenfassend führt das Zusammenspiel von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen nach dem Radikalangriff zu folgenden Effekten:

1. die sofortige Entstehung einer festen Phase
2. eine verbesserte kristalline Anordnung in der festen Phase
3. kleinere molekulare Flächen bei hohem Druck
4. Abnahme der intermolekularen Abstoßung, die die Abnahme des Übergangsdrucks von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase bewirkt.

4.2 Radikalangriff auf eine DPPC Monoschicht mit EDTA im hohen Überschuss

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass durch einen Radikalangriff die DPPC Monoschicht durch Abtrennung der positiv geladenen Kopfgruppe negativ geladen wird, wodurch Eisen-Ionen anbinden und die Monoschicht irreversibel verfestigt wird. Das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} war 5:4. Das Verhältnis H_2O_2 zu Fe^{2+} war 3:1. Der geringe Überschuss an EDTA reicht nicht aus, um „frei“ werdende Eisen-Ionen (durch Zerstörung des Eisen-EDTA-Komplexes) wieder abzufangen.
Um die Anbindung von Eisen-Ionen an die Monoschicht nach einem Radikalangriff zu verhindern, wurde das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} auf 3:1 erhöht. Das Verhältnis von H_2O_2 zu Fe^{2+} wurde ebenfalls auf 7:1 erhöht. Mögliche Veränderungen des thermodynamischen Verhaltens der Monoschicht können somit allein auf die chemischen Veränderungen der Lipide, durch den Radikalangriff, zurückgeführt werden.

4.2.1 Isothermen

Abbildung 4.11 zeigt eine Druck/Flächen Isotherme einer DPPC Monoschicht vor dem Radikalangriff auf einer Fenton-Lösung mit 15 mmol L^{-1} EDTA und 5 mmol L^{-1} Eisen(II)sulfat (schwarze Linie). Diese Isotherme ist mit der auf Wasser identisch. Der leicht erhöhte Übergangsdruck 5,0 mN m^{-1} (gegenüber 4,6 mN m^{-1} bei 21 °C) kommt

aufgrund einer leicht erhöhten Temperatur zustande. Der Radikalangriff wurde nach der gleichen Vorgehensweise wie im Kapitel 4.1 durchgeführt. Die Monoschicht wurde bis zu einem lateralen Druck von 28 mN m^{-1} komprimiert. Die molekulare Fläche wurde während des Angriffs konstant gehalten. Nach der Injektion von 0,2 ml einer 30% Wasserstoffperoxid Lösung (9,88 mol L^{-1}) (entspricht 35 mmol L^{-1} H_2O_2 in der Subphase) blieb der laterale Druck relativ konstant (Abb. 4.11, links). Die Reorganisation der Lipide bewirkt eine sehr geringe Abnahme des lateralen Drucks. Nach einer Stunde wurde die Monoschicht vollständig expandiert und wieder komprimiert (rote Linie). Die Isothermen sind vor und nach dem Radikalangriff fast identisch. Der Druckanstieg, der für die flüssig-expandierte Phase typisch ist, verschiebt sich zu etwas kleineren molekularen Flächen. Am Enddruck (28 mN m^{-1}) sind die molekularen Flächen gleich.

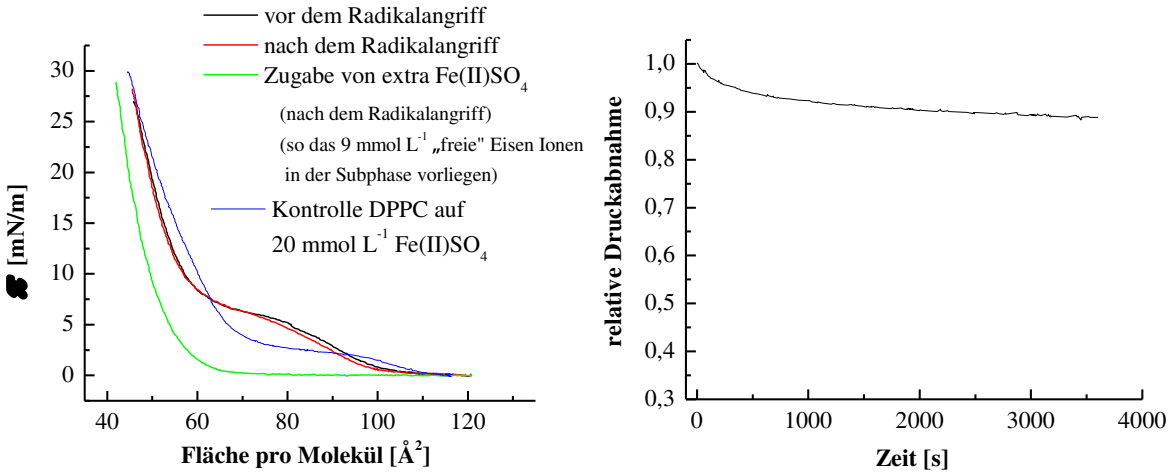


Abb. 4.11 Auswirkungen des Radikalangriffs auf DPPC Isothermen mit EDTA im hohen Überschuss bei 21 °C. Das Konzentrationsverhältnis EDTA/Fe^{2+} ist 3:1, das von Fe^{2+}/H_2O_2 ist 1:7. Links: die DPPC Monoschicht wird bis zu einem Druck von 28 mN m^{-1} komprimiert (schwarze Linie). Bei diesem lateralen Druck, wird die molekulare Fläche konstant gehalten und ein Radikalangriff durchgeführt. Der laterale Druck bleibt annähernd konstant (Abb. 4.11, rechts). Die anschließende Expansion und Kompression (rote Linie) zeigt nur minimale Unterschiede im Vergleich zur Isotherme vor den Angriff (schwarze Linie). Beim lateralen Druck von 28 mN m^{-1} wird die molekulare Fläche wieder konstant gehalten und 1 ml einer 1 molaren $Fe(II)SO_4$-Lösung hinzu gegeben (entspricht 19 mmol L^{-1} Fe^{2+} in der Subphase). Die anschließende Expansion und Kompression zeigt eine Abnahme der molekularen Fläche bei 28 mN m^{-1} (grüne Linie) sowie ein Verschwinden des Koexistenzbereichs. Zum Vergleich wurde eine Isotherme von DPPC auf 20 mmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$ aufgenommen (blaue Linie). Der Koexistenzbereich bleibt erhalten. Er findet jedoch bei einem kleineren Übergangsdruck statt.

Anschließend wurde 1 ml einer ein molaren Eisen(II)sulfat Lösung hinzugegeben. (Dies entspricht 19 mmol L^{-1} Fe^{2+} in der Subphase). Damit sind mehr Eisen-Ionen in der Subphase als EDTA. Die Monoschicht wurde wieder expandiert und komprimiert. Der Koexistenzbereich ist vollständig verschwunden. Ebenfalls kann die Monoschicht zu kleineren molekularen Flächen komprimiert werden. Die Flächenabnahme ist mit 4 $Å^2$ pro Molekül genauso groß wie bei den Radikalangriffen mit den höchsten Fenton-Konzentrationen (siehe Kapitel 4.1). Die Verfestigung der DPPC Monoschicht kann nicht allein durch das Vorhandensein hoher Eisen-Ionen Konzentrationen (20 mmol L^{-1}) zustande kommen, wie die Isotherme (blaue Linie) in Abbildung 4.11 (links) zeigt. Die molekulare Fläche bei einem Enddruck von 28 mN m^{-1} ist unverändert. Der Koexistenzbereich wird zu einem niedrigen Oberflächendruck (2 mN m^{-1}) verschoben. Dieser verschwindet jedoch nicht. Durch Temperaturerhöhung ist es möglich, den Koexistenzbereich wieder zu höheren Übergangsdrücken zu verschieben. Dies ist nach Radikalangriffen nicht möglich. Die molekulare Fläche bei einem lateralen Druck von 28 mN m^{-1} bleibt unverändert.

4.2.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie

Die Brewsterwinkel-Mikroskopie wird genutzt, um die Auswirkungen des Radikalangriffs mit dreifachen EDTA Überschuss (EDTA:Fe^{2+} = 3:1) auf makroskopischer Ebene zu untersuchen. Die Abbildung 4.12 A (oben links) zeigt typische DPPC Domänen vor dem Radikalangriff am Ende des Koexistenzbereichs (siehe Isotherme, Punkt A). Die Subphase ist eine Fenton-Lösung bestehend aus 15 mmol L^{-1} EDTA und 5 mmol L^{-1} Eisen(II)sulfat. Die vorherrschende Form der DPPC Domänen ist die „bean-shape“ Form, aber auch „multilobed“ Formen können wieder beobachtet werden (Vergleich Abb. 4.2 oben links). Nach dem Radikalangriff wurde die Monoschicht expandiert und wieder komprimiert. Die Abbildung 4.12 B (oben rechts) wurde am Punkt B der roten Isotherme aufgenommen. Die typische Form der DPPC Domänen hat sich mehrheitlich nicht geändert. Das Erscheinen von vereinzelten, festen Bestandteilen zwischen den Domänen ist jedoch auffällig. Sie sehen aus, als ob diese durch Domänenfusion entstanden sind. Das diese Bestandteile nicht der flüssig-kondensierten Phase sondern der festen Phase zu zuordnen sind, wird daraus geschlussfolgert, dass sich die Größe der Domänen weder bei der Expansion noch bei

der Kompression verändert. Aufgrund des kleinen Anteils der festen Phase verändert sich das thermodynamische Verhalten der Lipid-Monoschicht nach dem Radikalangriff nicht. Erst nach der Zugabe von zusätzlichen Eisen-Ionen kommt es zu sichtbaren Veränderungen der Lipid-Monoschicht, wenn die Konzentration der Eisen-Ionen die EDTA-Konzentration übersteigt. Die Monoschicht verfestigt sich. Es findet kein Phasenübergang (flüssig-expandiert zur flüssig-kondensiert) mehr statt. Bei vollständiger Expansion der Monoschicht und einem lateralen Druck von 0 mN m^{-1} ist die feste Phase bereits zu erkennen siehe Abbildung 4.12 C (Mitte). Bei weiterer Kompression werden die verfestigten Bestandteile der Monoschicht dichter zusammengeschoben (Bild D). Der Endzustand ist vergleichbar mit dem Radikalangriff auf eine DPPC-Monoschicht bei dem das Verhältnis EDTA:Fe^{2+} = 5:4 war. Bild E zeigt DPPC Domänen auf einer 20 millimolaren Eisen(II)sulfat-Lösung am Ende des Koexistenzbereich (blaue Isotherme, Punkt E). Sie sind im Vergleich zu DPPC Domänen auf Wasser oder auf einer Fenton-Lösung deutlich kleiner.

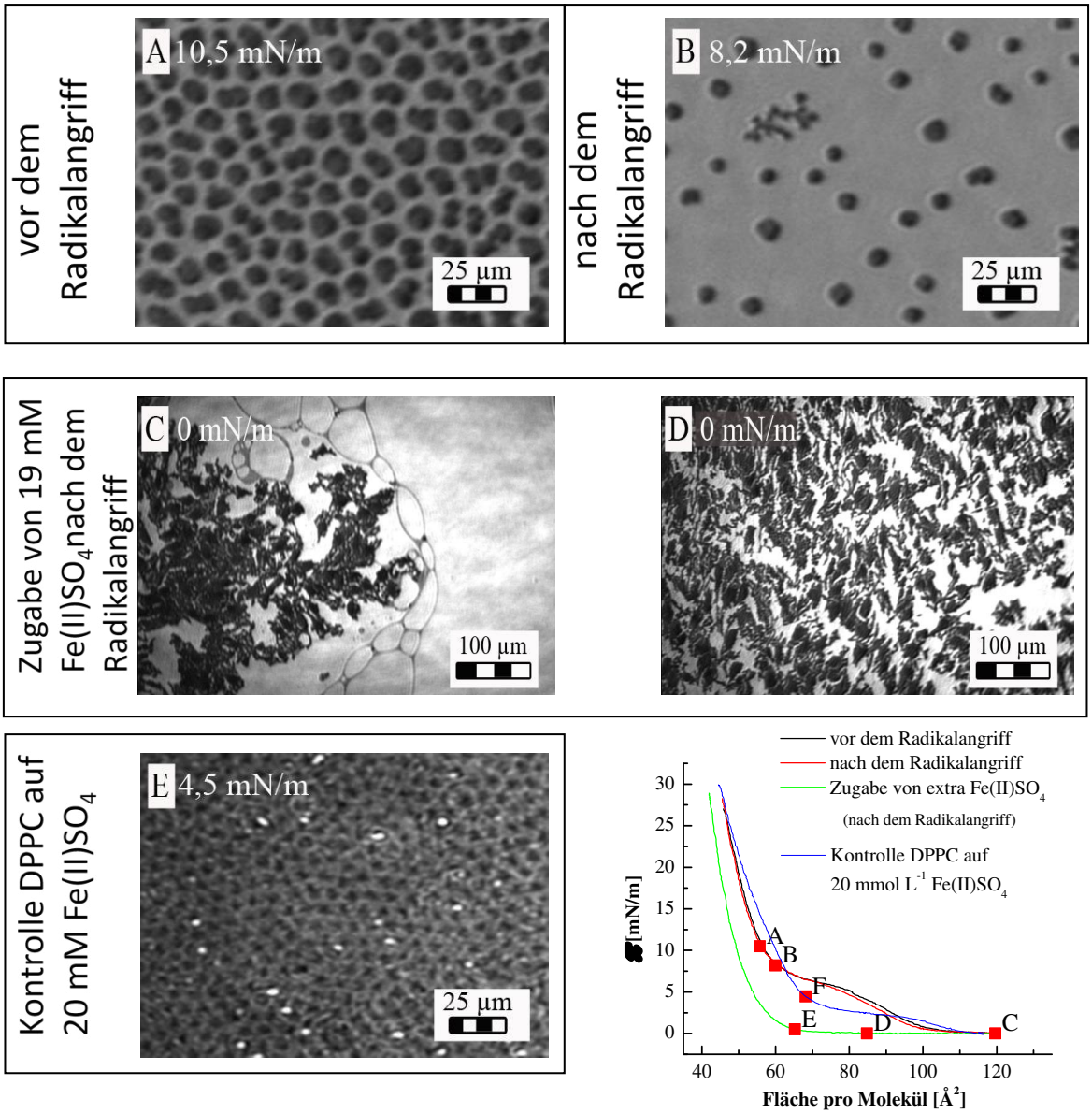


Abb. 4.12 Brewsterwinkel-Mikroskopie einer DPPC Monoschicht auf einer 5 mmol L^{-1} Fenton-Lösung mit EDTA im hohen Überschuss (EDTA:Fe^{2+} = 3:1) vor und nach dem Radikalangriff bei 21 °C. Das Konzentrationsverhältnis Fe^{2+}zu H_2O_2 war 1:7. Bild A zeigt die Domänen vor dem Radikalangriff bei 11 mN m^{-1}. Nach dem Radikalangriff wurde Bild B bei 8 mN m^{-1} aufgenommen. Die Bilder C und D wurden nach dem Radikalangriff und nach Zugabe von zusätzlichen Fe(II)SO_4 bei 0 mN m^{-1}aufgenommen. (Die dazugehörigen Flächen sind aus den Isothermen (unten rechts zu entnehmen.) Bild E zeigt DPPC Domänen am Ende des Koexistenzbereichs auf einer 20 mmolL^{-1} Fe(II)SO_4-Lösung (Kontrollversuch ohne EDTA).

4.2.3 Diskussion

Wird ein Radikalangriff auf einer DPPC-Monoschicht durchgeführt, bei der die EDTA Konzentration das Dreifache der Eisen-Ionen ist, so ist kaum ein Unterschied zwischen den Isothermen (vor und nach dem Angriff (siehe Abb. 4.11, links)) zu erkennen. Dabei ist die Fenton-Konzentration deutlich höher als im Kapitel 4.1. Die thermodynamischen Eigenschaften haben sich nach dem Radikalangriff nicht verändert. Auch während der Domänenbildung sind keine Unterschiede in Form und Größe festzustellen (siehe Abb. 4.12, A und B). Die Bilder A und B wurden bei unterschiedlichen molekularen Flächen aufgenommen, daher unterscheiden sie sich in ihrer Domänengröße und -anzahl.
Eine Verfestigung der Monoschicht tritt ein, wenn nach dem Radikalangriff eine bestimmte Menge an Eisen-Ionen in die Subphase injiziert (19 mmol L^{-1}) wird, so dass diese höher ist als die vorhandene EDTA-Konzentration (15 mmol L^{-1}). Dies ist zum einen an den Isothermen sichtbar. Der Koexistenzbereich ist völlig verschwunden. Auch bei Temperaturerhöhung ist kein Phasenübergang 1. Ordung zu beobachten. Zum anderen beweisen die BAM-Bilder die starke Verfestigung der Monoschicht. Diese Verfestigung der Monoschicht kann nur durch eine starke Bindung von den Eisen-Ionen an die Lipid-Monoschicht zustande kommen. Die DPPC Lipide sind jedoch zwitterionisch und Eisen-Ionen binden nicht so stark an diese, wie die Isotherme in Abbildung 4.11 (links, blaue Linie) zeigt. Der Koexistenzbereich ist noch sehr gut zu erkennen. Ebenfalls haben die DPPC Domänen ihre typische Form. Die Größe der Domänen ist jetzt jedoch kleiner. Feste Bestandteile der Monoschicht sind mit dem BAM nicht erkennbar.
Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Radikale die Kopfgruppe der Lipide so verändern, dass aus den zwitterionischen Lipiden negativ geladene Lipide entstehen. Der Reaktionsmechanismus könnte der Gleiche sein wie in Abbildung 4.5 dargestellt. Dieser Radikalangriff findet jedoch im Vergleich zu dem Radikalangriff im Kapitel 4.1 (EDTA:Fe^{2+}= 5:4) mit einer hohen EDTA Konzentration statt (EDTA:Fe^{2+}= 3:1). Der hohe Überschuss an EDTA scheint auszureichen, um „frei“ gewordene Eisen-Ionen wieder zu binden. Die „freien“ Eisen-Ionen entstehen aus der Zerstörung von Eisen-EDTA-Komplexe durch Radikale. Mit hohem Überschuss an EDTA wird verhindert, dass die Eisen-Ionen an die entstandene negativ geladene Monoschicht anbinden. Vereinzelt ist es jedoch möglich, wie Abbildung 4.12 Bild B zeigt, dass einige Eisen-Ionen an die negativ geladenen Lipide adsorbieren und einen kleinen Teil der

Monoschicht verfestigen. Dies ist möglich, wenn Eisen-EDTA-Komplexe sich direkt an der Monoschicht befinden. Die Radikale zerstören den Komplex und die „freien“ Eisen-Ionen können sofort an die Lipide binden. Offensichtlich scheint dieser Vorgang nicht so häufig stattzufinden. Betrachtet man die molekulare Fläche bei gleichem Enddruck (28 mN m^{-1}), so ist diese vor und nach dem Radikalangriff sowie bei DPPC auf 20 mmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$ mit 46 $Å^2$ gleich. Nur bei Zugabe von zusätzlichen Eisen-Ionen nimmt die molekulare Fläche auf 42 $Å^2$ ab. Diese molekulare Fläche ist typisch für Lipide mit 2 Alkylketten und einer kleinen Kopfgruppe wie PE oder PA. Die kleinste molekulare Fläche von 2 Alkylketten ist 40,4 $Å^2$, bei einem Neigungswinkel von 0°. [Kaganer 1999, Ishimura 2002]

Läuft die Reaktion zwischen Radikalen und Lipiden wie in Abbildung 4.5 dargestellt ab, wird die Kopfgruppe durch den Radikalangriff verkleinert. Die sterische Abstoßung nimmt zwischen den Lipiden ab. Die molekulare Fläche des Lipids sollte sich dadurch verringern. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die elektrostatische Abstoßung durch die entstandenen negativ geladenen Phospholipide zunimmt und somit die Abnahme der sterischen Abstoßung kompensiert. Eine andere Erklärung wäre, dass die Hydroxyl-Radikale die positiv geladene Trimethyl-ammoniumgruppe abtrennen und diese mit einem weiteren Hydroxyl-Radikal zu Trimethylaminoxid (TMAO) oxidiert wird (siehe Abbildung 4.13).

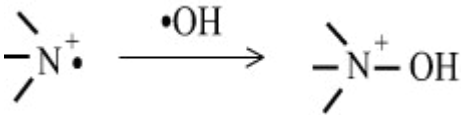


Abb. 4.13 Mögliche Reaktion des abgetrennten Trimethylammonium Radikals mit einem Hydroxyl-Radikal. Es entsteht Trimethylaminoxid (TMAO).

Aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen bleibt TMAO an der negativ geladenen Phosphatgruppe leicht gebunden, wodurch die sterischen Hinderungen zwischen den Kopfgruppen und die molekulare Fläche des Lipids erhalten bleiben. Werden Eisen-Ionen in die Subphase hinzugegeben, so dass die Eisenkonzentration die EDTA-Konzentration übersteigt, verdrängen „freie“ Eisen-Ionen die Trimethyl-aminoxide und adsorbieren fest an die negativ geladene Monoschicht. Die sterische Hinderung zwischen den Kopfgruppen nimmt ab und die Monoschicht kann zu kleineren molekularen Flächen komprimiert werden.

4.2.4 Zusammenfassung

Der Radikalangriff auf die DPPC Monoschicht wurde mit der Fenton-Reaktion durchgeführt. Der Radikalangriff wurde mit EDTA im hohen Überschuss (EDTA:Fe^{2+} = 3:1) ausgeführt. Während des Radikalangriffs bleibt der laterale Druck annähernd konstant. Die thermodynamischen Eigenschaften sind nach dem Radikalangriff unverändert, wie der Verlauf der Isotherme zeigt. Die minimale molekulare Fläche des Lipids ändert sich ebenfalls nicht. Veränderungen der thermodynamischen Eigenschaften treten erst nach Zugabe von zusätzlichen $Fe(II)SO_4$ auf. Die Bedingung ist das Vorhandensein von „freien" Eisen-Ionen. Dies ist der Fall, wenn die Eisen-Ionen Konzentration höher ist als die EDTA Konzentration. Wird die Monoschicht vollständig expandiert und wieder komprimiert findet kein Phasenübergang mehr statt. Die Brewsterwinkel-Mikroskopie zeigt, dass die Monoschicht schon bei einem lateralen Druck von 0 mN m^{-1} verfestigt ist. Die Verfestigung der Monoschicht kommt durch Anbindung der Eisen-Ionen an den Lipiden zustande. Dies weist auf negativ geladene Lipide hin. Die molekulare Fläche der Lipide ist kleiner bei gleichem lateralem Enddruck von 30 mN m^{-1}. Daraus schließen wir, dass die Kopfgruppe durch den Radikalangriff nicht nur negativ geladen wird, sondern auch kleiner wird. Die Reaktion der Hydroxyl-Radikale mit den DPPC-Lipiden könnte nach dem gleichen Rektionsschema wie in Abbildung 4.5 dargestellt ablaufen.

Zusammenfassend findet folgender Vorgang statt:

1. Die Sauerstoffradikale reagieren mit der zwitterionisch geladenen Kopfgruppe dem DPPC-Lipid so, dass diese kleiner und negativ geladen wird.
2. Die sterische Abstoßung nimmt zwischen den Kopfgruppen ab, die elektrostatische Abstoßung nimmt entsprechend zu, so dass keine Veränderungen der thermodynamischen Eigenschaften zu beobachten sind. (Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Teil der abgetrennten Kopf-gruppe elektrostatisch weiter an der restlichen Kopfgruppe gebunden bleibt.)
3. Befinden sich „freie" Eisen-Ionen in Lösung diffundieren diese zur negativ geladenen Monoschicht und binden an diese.
4. Es entsteht eine irreversibel verfestigte Phase.

4.3 Radikalangriff auf eine DPPC Monoschicht ohne EDTA

In den zwei vorherigen Abschnitten wurde EDTA genutzt, um das Ausfällen von Eisen(III)-hydroxid und das Bilden von Eisenaggregaten zu verhindern. In diesem Abschnitt soll der Radikalangriff ohne EDTA untersucht werden, um den Einfluss von Eisen und indirekt den von EDTA zu bestimmen.

4.3.1 Isothermen

Abbildung 4.14 (links) zeigt eine π/A-Isotherme einer DPPC Monoschicht auf einer 2 mmol L^{-1} Eisen(II)sulfat-Lösung. Diese Isotherme ist vergleichbar mit einer typischen DPPC Isotherme auf Reinstwasser bzw. mit der auf einer Fenton-Lösung. Für den Radikalangriff wird die Monoschicht bis zu einen lateralen Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert. Danach wird Wasserstoffperoxid injiziert. Das molare Verhältnis von H_2O_2 zu Fe^{2+} ist 3:1. Die molekulare Fläche wird während des Radikalangriffs konstant gehalten und der Abfall des lateralen Drucks gemessen (Abb. 4.14 rechts, schwarze Linie). Die Monoschicht wurde anschließend bis zu einer molekularen Fläche von 25 $Å^2$ pro Molekül komprimiert (maximale Kompression, rote Linie). Der Ausgangsdruck von 30 mN m^{-1} konnte nicht mehr erreicht werden. Danach wurde die Monoschicht vollständig expandiert und wieder komprimiert (grüne Linie). Der Koexistenzbereich ist vollständig verschwunden, wie bei einem starken Radikalangriff mit geringem EDTA Überschuss (EDTA:Fe^{2+} = 5:4, siehe Kapitel 4.1). Die Monoschicht kann bis zu einer minimalen molekularen Fläche von 25 $Å^2$ pro Molekül komprimiert werden. In Abbildung 4.14 (rechts) sind die relativen Druckabfälle der Radikalangriffe ohne und mit EDTA dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Druckabfall beim Radikalangriff ohne EDTA in den ersten Sekunden deutlich stärker ist als mit EDTA. Ebenfalls stellt sich der neue Gleichgewichtsdruck schneller ein.

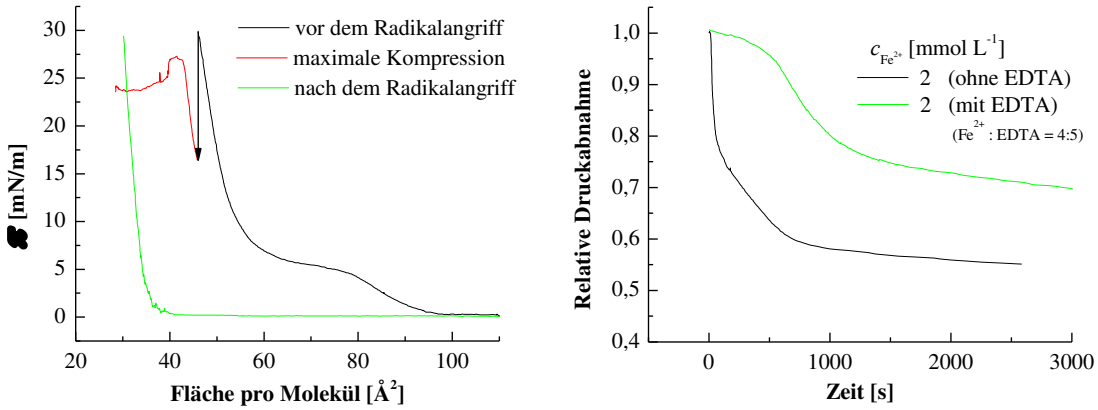


Abb. 4.14 Auswirkungen des Radikalangriffs auf eine DPPC Monoschicht ohne EDTA. Die Subphase besteht aus einer 2 mmol L^{-1} Fe(II)SO_4-Lösung. Das Konzentrations-verhältnis von Fe^{2+} zu H_2O_2 ist 1:3. Links: die DPPC Monoschicht wird bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert (schwarze Linie). Bei diesem lateralen Druck, wird die molekulare Fläche konstant gehalten und ein Radikalangriff durchgeführt. Der laterale Druck nimmt 15 Minuten lang ab, bis sich ein neuer Gleichgewichtsdruck einstellt (schwarzer Pfeil). Danach wurde die Monoschicht komprimiert. Der Ausgangsdruck von 30 mN m^{-1} konnte nicht mehr erreicht werden (rote Linie). Die anschließende Expansion und Kompression (grüne Linie) zeigt eine Abnahme der molekularen Fläche bei 30 mN m^{-1} sowie das Verschwinden des Koexistenzbereichs. Rechts: Vergleich der relativen Druckabnahme über die Zeit ohne EDTA und mit 2,5 mmol L^{-1} EDTA. Der Radikalangriff wird für beendet angesehen, wenn der laterale Druck einen neuen Gleichgewichtswert erreicht.

4.3.2 Diskussion

Im Vergleich zum Radikalangriff mit EDTA (Fe^{2+}:EDTA = 4:5) kann der stärkere Abfall des lateralen Drucks mit der hohen Konzentration an „freien“ Eisen-Ionen erklärt werden. Wie in Kapitel 4.1 gezeigt werden konnte, fragmentieren die Radikale einen Teil der Kopfgruppe. Aus dem zwitterionisch geladenen DPPC-Molekül entsteht ein negativ geladenes Lipid. Dadurch können „freie“ Eisen-Ionen an die negativ geladenen Phosphatgruppen binden. [Estralda-Lopis 2001]

Bei der Fenton-Reaktion ohne EDTA sind die Eisen-Ionen nicht gebunden. Sie sind so zusagen „frei“. Die Eisen-Ionen können sofort an die negativ geladenen Lipiden binden. Die negativ geladenen Lipide sind durch die Reaktion von DPPC-Lipide mit den Radikalen entstanden.

Unmittelbar nach der Injektion von Wasserstoffperoxid ist der Druckabfall sehr stark. Nach einer Minute ist der Abfall des lateralen Drucks vergleichbar mit dem Radikalangriff mit EDTA (Fe^{2+}:EDTA = 4:5) in der Subphase. Ab diesem Zeitpunkt ist

die Abnahme des lateralen Drucks abhängig von der Diffusion der Eisen-Ionen zur Monoschicht.

Beim Radikalangriff bei dem das Verhältnis (Fe^{2+}:EDTA = 4:5) war, liegt EDTA im leichten Überschuss vor (Kapitel 4.1). Damit „freie“ Eisen-Ionen an die negativ geladene Kopfgruppe binden können, müssen die Radikale zuerst die Eisen-EDTA-Komplexe sowie die überschüssigen EDTA Moleküle zerstören. Dies hat zur Folge, dass der starke Abfall des lateralen Drucks erst nach 10 Minuten einsetzt. Ist genügend EDTA in der Subphase vorhanden, um die Eisen-Ionen immer wieder abzufangen bevor sie die negativ geladenen Oberfläche erreichen, bleibt der laterale Druck konstant (vgl. Kapitel 4.2).

Die Abnahme der molekularen Fläche durch den Radikalangriff mit und ohne EDTA kann nicht miteinander verglichen werden, da die Vorgehensweise beider Experimente unterschiedlich war. Die Monoschicht wurde nach dem Radikalangriff ohne EDTA nochmals komprimiert (rote Linie). Aufgrund der starken Verfestigung der Monoschicht war ein Komprimieren in zwei Dimensionen nicht mehr möglich (der laterale Druck bleibt konstant). Die Monoschicht wurde wahrscheinlich in die dritte Dimension gehoben, wodurch sich Multischichten gebildet haben. Dafür spricht, dass die molekulare Fläche von ungefähr 46 $Å^2$ (die Fläche zweier Alkylketten) nach dem Radikalangriff auf 25 $Å^2$ abnimmt.

4.3.3 Zusammenfassung

Der Radikalangriff ohne EDTA führt ebenfalls zur Abnahme des lateralen Drucks bei konstanter Fläche und zur Verfestigung der Lipid-Monoschicht. Das Produkt der Reaktion von Sauerstoffradikalen mit den zwitterionisch geladenen DPPC-Lipiden sind negativ geladene Lipide. Die Abnahme des lateralen Drucks und die irreversible Verfestigung der Lipid-Monoschicht hängen nur von der Anbindung der Eisen-Ionen an die negativ geladenen Lipide ab. Je mehr „freie“ Eisen-Ionen in der Subphase umso schneller nimmt der laterale Druck ab. Die chemischen Veränderungen scheinen die gleichen zu sein, wie bei den Radikalangriffen mit EDTA.

4.4 Radikalangriffe auf DMPC Liposomen

Im Kapitel 4.1, 4.2 und 4.3 wurden die Untersuchungen zu Radikalangriffen auf DPPC Monoschichten ausführlich dargestellt. In der Natur gibt es einige Beispiele bei denen Lipid Monoschichten vorkommen, z.B. das Surfactant (eine oberflächenaktive Substanz in der Lunge). Lipid Doppelschichten kommen jedoch viel häufiger vor. Jede lebende Zelle ist von einer Zellmembran, also von einer Lipid Doppelschicht umgeben. Darum werden in diesem Kapitel die Wechselwirkungen von Sauerstoffradikalen mit unilamellaren Liposomen untersucht. Unilamellare Liposomen sind etablierte Modelle der Zellmembran. Thermodynamische Eigenschaften der Liposomen werden vor und nach dem Radikalangriff mit Hilfe von DSC-Messungen verglichen. Die Fluoreszenzmikroskopie soll uns ein makroskopisches Bild bzw. Informationen von einem Radikalangriff auf Liposomen geben.

4.4.1 Radikalangriffe auf DMPC Liposomen

In diesem Kapitel werden die Wechselwirkungen von Sauerstoffradikalen mit unilamellaren DMPC Liposomen untersucht. Die Radikale werden mit der Fenton-Reaktion hergestellt. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Fe^{2+} und EDTA ist 4:5.

4.4.1.1 DSC

Die unilamellaren DMPC-Liposomen wurden nach leichter Modifizierung des Protokolls von Moscho et. al (1996) hergestellt (siehe Kapitel 3.8.2). Die wässrige Liposomen-Lösung wurde entsprechend der gewünschten EDTA und Fe^{2+} Ionen Konzentrationen mit einer Fenton-Lösung vermischt. Das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} war 5:4. Abbildung 4.15 zeigt das Thermogramm von unilamellaren DMPC-Liposomen (nach der Ultraschallbehandlung) in einer Fenton-Lösung mit 1,75 mmol L^{-1} EDTA und 1,4 mmol L^{-1} Mohrschen Salz. Die Heizrate war immer 60 K min^{-1}. Die zwei endothermen Peaks sind charakteristisch für die jeweilige Phasenumwandlung. Die Vorumwandlung (engl. pretransition) findet bei einer Temperatur T_p von 12,9 °C statt. Die dazugehörige Phasenumwandlungsenthalpie ΔH ist 3,8 kJ mol^{-1}.

Die Hauptphasenumwandlung T_m findet bei 23,2 °C statt, mit einer Phasenumwandlungsenthalpie von 28 kJ mol^{-1}. Diese Messwerte stimmen mit den aus der Literatur gut überein (siehe Tabelle IV-1), [Cevc 1987]. Die Hauptphasenumwandlungenthalpie ist jedoch leicht erhöht.

Tabelle IV-1 Phasenumwandlungstemperaturen und Umwandlungsenthalpien von DMPC

DMPC	Temperatur T [°C]	Umwandlungsenthalpie ΔH [kJ mol^{-1}]
Vorumwandlung	14 ± 1	5.0 ± 2
Hauptphasenumwandlung	23	26

Entnommen aus [Cevc 1987]

Vorumwandlung	12,9	3,8
Hauptphasenumwandlung	23,2	28

(Eigene Messungen)

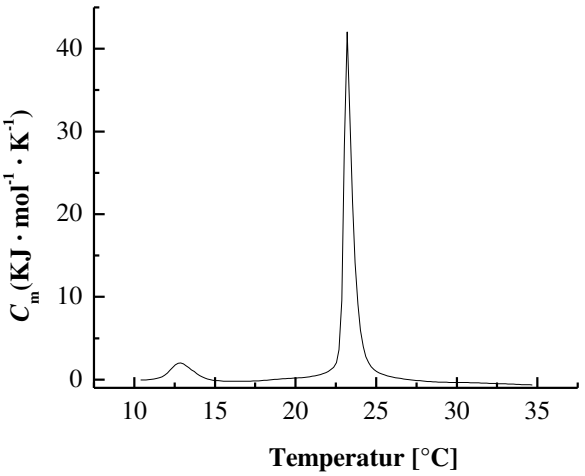


Abb. 4.15 Thermogramm von unilamellaren DMPC-Liposomen in einer Fenton-Lösung mit 1,75 mmol L^{-1} EDTA und 1,4 mmol L^{-1} Mohrschen Salz. Die Heizrate war 60 K min^{-1}. Die zwei endothermen Peaks bei T_p = 12,9 °C und T_m = 23,2 °C sind charakteristisch für die jeweilige Phasenumwandlungen von DMPC.

Vor dem Radikalangriff (vor der Injektion von H_2O_2) wurden die Thermogramme bei unterschiedlichen Konzentrationen der Fenton-Lösung aufgenommen und verglichen. Es konnte kein Einfluss der Fenton-Konzentration auf die Phasenumwandlungstemperaturen von DMPC festgestellt werden (nicht dargestellt). Werden hingegen unterschiedliche Konzentrationen vom Mohrschen Salz ohne EDTA zu den Liposomen-Lösungen hinzugegeben, kann man kleine Veränderungen von T_m beobachten (siehe

Abb. 4.16). Die Phasenumwandlungstemperatur T_m nimmt bis zu einer Konzentration $c_{Fe^{2+}}$ von 15 mmol L^{-1} leicht zu und dann wieder ab. Die maximale Verschiebung von T_m ist 1,4 Kelvin (Abb. 4.16, unten). Der gleiche Effekt ist bei der Vorumwandlungstemperatur zu beobachten. Die maximale Verschiebung von T_p durch die Eisenkonzentration ist jedoch größer und ist circa 4 Kelvin (Abb. 4.16, oben).

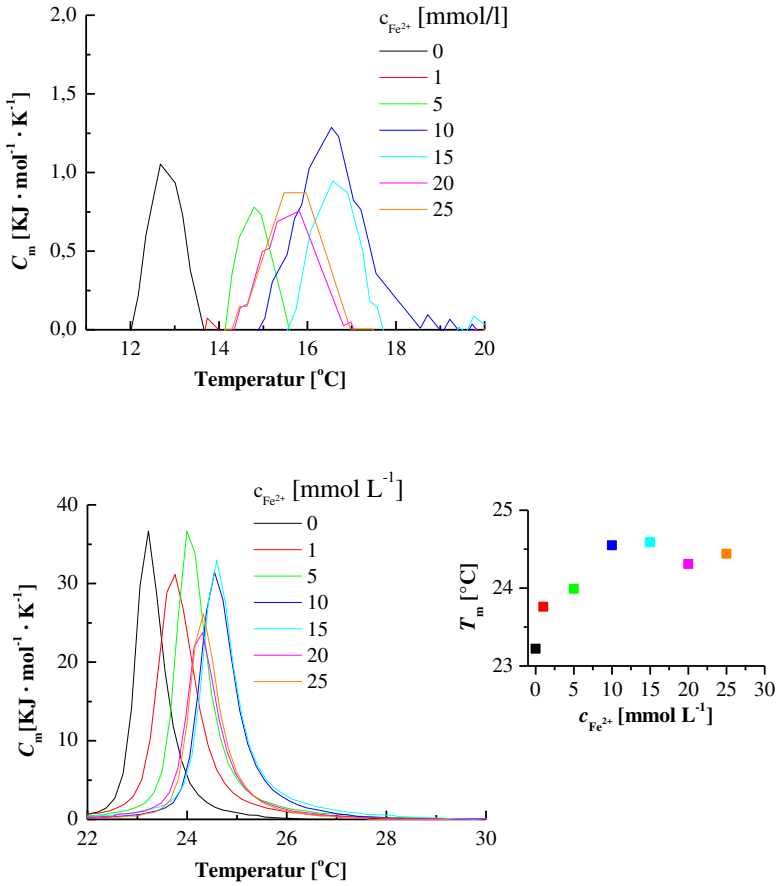


Abb. 4.16 Thermogramme von unilamellaren DMPC-Liposomen mit unterschiedliche Eisen-Ionen Konzentrationen. Die Heizrate war 60 K min^{-1}. Verschiebung der Vorumwandlungstemperatur T_p (oben) und der Hauptumwandlungstemperatur T_m (unten) durch die Eisen-Ionen Konzentration. Inset: T_m in Abhängigkeit von $c_{Fe^{2+}}$

Um Radikale zu erzeugen wurde zu der EDTA-Eisen-Lösung (Verhältnis Fe^{2+}:EDTA = 4:5) Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Das Verhältnis Fe^{2+} zu H_2O_2 war 1:6. In Abbildung 4.17 sind die Thermogramme von unilamellaren DMPC-Liposomen vor und nach Radikalangriffen mit unterschiedlichen Fenton-Konzentrationen dargestellt.

Die Vorumwandlungstemperatur (T_p) sowie die Hauptumwandlungstemperatur (T_m) verschieben sich nach dem Radikalangriff zu höheren Temperaturen. Je höher die Fenton-Konzentration desto größer sind die Phasenumwandlungstemperaturen. Dies gilt für die Vorumwandlung (Abb. 4.17, oben) sowie für die Hauptumwandlung (Abb. 4.17, unten). Ab einer Fenton-Konzentration größer 10 mmol L^{-1} ist keine Vorumwandlung beobachtbar. Die maximale Verschiebung von T_m ist 10,2 Kelvin, die von T_p ist 11,4 Kelvin. Die Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen ist durch den Radikalangriff deutlich größer, als die Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen durch die Eisen-Ionen.

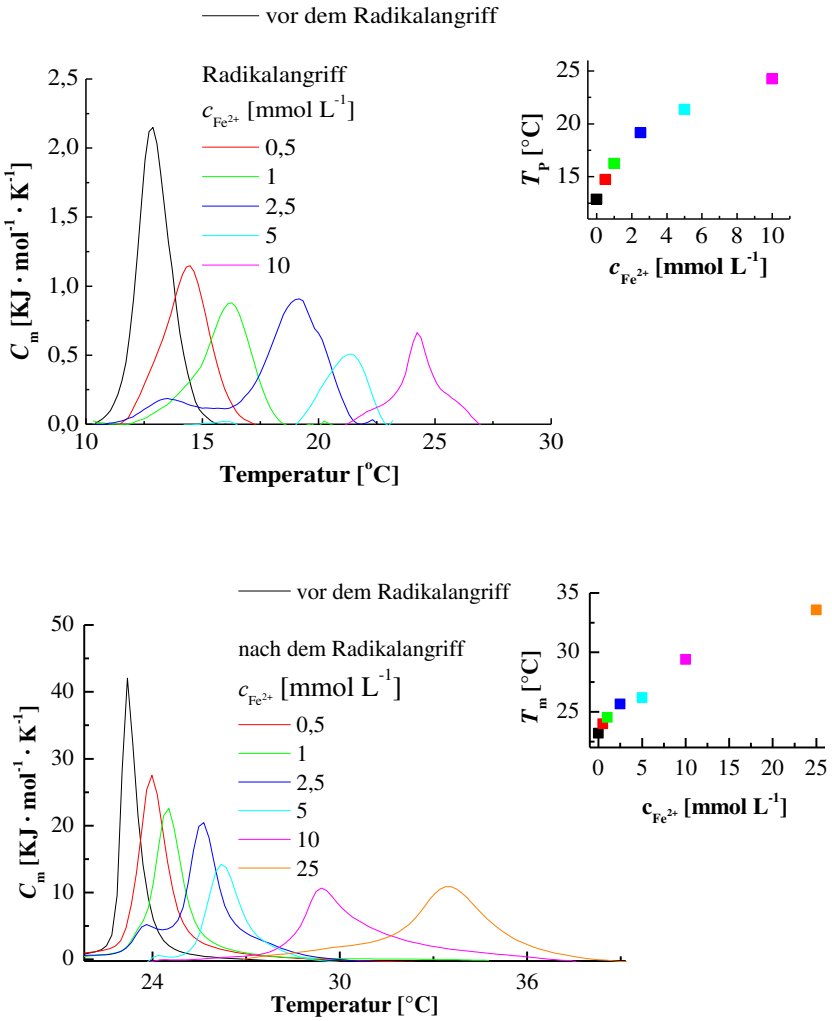


Abb. 4.17 Thermogramme von unilamellaren DMPC-Liposomen vor und nach Radikalangriffen mit unterschiedlichen Fenton-Konzentrationen. Das Konzentrationsverhältniss zwischen EDTA und Fe^{2+} war 5:4 und zwischen Fe^{2+} und H_2O_2 war 1:6. Die angegebenen Konzentration beziehen sich auf die Eisen-Ionen Konzentration. Die Heizrate war 60 K min^{-1}. Mit Erhöhung der Fenton-Konzentration verschieben sich die Phasenumwandlungstemperaturen. Verschiebung der Vorumwandlungstemperatur T_p (oben) und der Hauptumwandlungstemperatur T_m (unten) durch den Radikalangriff.

Die Halbwertsbreite $\Delta T_{m_{1/2}}$ wird nach dem Radikalangriff ebenfalls größer (siehe Abb. 4.18, links). Die Umwandlungsenthalpie der Hauptumwandlung nimmt nach dem Radikalangriff bei einer Fenton-Konzentration von 0,5 mmol L^{-1} Fe^{2+} zu. Bei einer Fenton-Konzentration größer als 0,5 mmol L^{-1} Fe^{2+} nimmt die Umwandlungsenthalpie mit zunehmender Fenton-Konzentration logarithmisch ab (siehe Abb. 4.18, rechts).

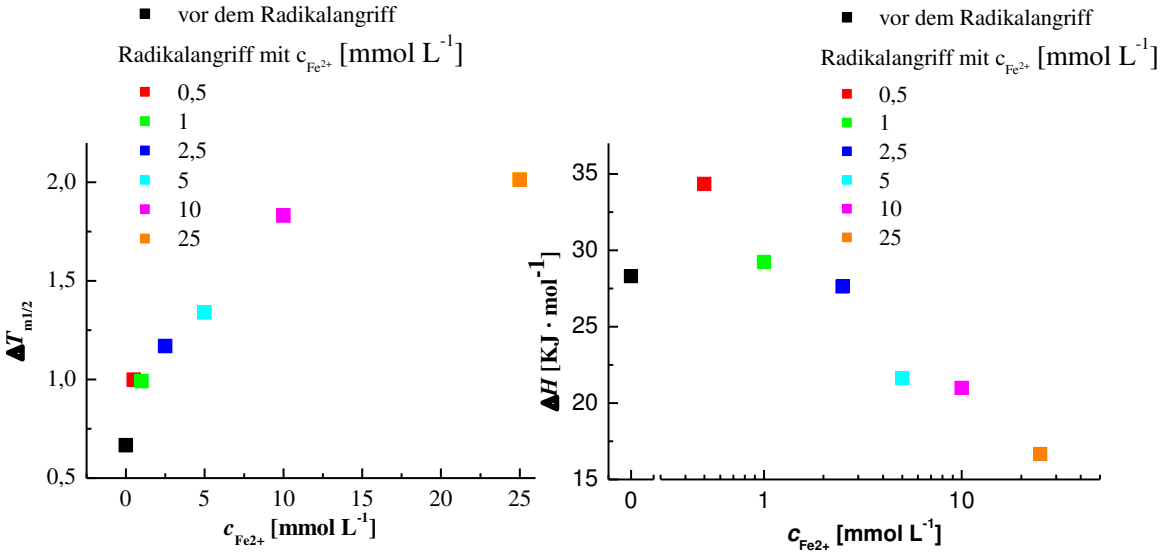


Abb. 4.18 Veränderungen der Halbwertsbreite $\Delta T_{m_{1/2}}$ und der Umwandlungsenthalpie ΔH durch Radikalangriffe mit unterschiedlichen Fenton-Konzentrationen.

4.4.1.2 Diskussion

Vor dem Radikalangriff können die für DMPC-Liposomen typischen Thermogramme aufgenommen werden. Die zwei endothermen Peaks, die charakteristisch für die jeweilige Phasenumwandlung sind, sind gut erkennbar. Nach dem Radikalangriff verschieben sich die zwei Peaks zu höheren Temperaturen. Die Hauptumwandlungstemperatur T_m verschiebt sich bei der höchsten Fenton-Konzentartion um 10,2 Kelvin, was auf eine Verfestigung der Liposomen hinweist. Diese Verfestigung kann jedoch nicht nur durch die Anbindung von Eisen-Ionen an DMPC Moleküle erklärt werden. Wie Abbildung 4.16 zeigt, verschiebt sich T_m maximal um 1,4 Kelvin durch die Wechselwirkung der Eisen-Ionen mit DMPC. Eine starke Bindung von mehrwertigen Ionen an DMPC ist aufgrund seines zwitterionischen Charakters nicht möglich. [Jacobson 1975]

Die Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen kann nur durch eine Veränderung der molekularen Struktur der DMPC Moleküle durch die Radikale zustande kommen. Der im Kapitel 4.1 beschriebene Prozess wäre eine mögliche Erklärung.

Die positive Trimethylammonium Gruppe wird durch Radikale vom Lipid abgetrennt. Aus dem zwitterionischen Lipid wird ein negativ geladenes Lipid mit einer kleineren Kopfgruppe. Durch die kleinere Kopfgruppe nimmt die sterische Hinderung ab. Die Alkylketten können sich besser anordnen, die Entropie der Lipide nimmt ab und der Phasenübergang erscheint bei höheren Temperaturen. [Biltonen 1993] Die Bildung einer negativen Kopfgruppe und die damit verbundene Zunahme der Ladungsdichte führen zu einer erhöhten elektrostatischen Abstoßung. Dies sollte nach der Gouy-Chapman Theorie zu einer Erniedrigung der Umwandlungstemperatur führen. Dieser Effekt kann jedoch durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Phosphatgruppen kompensiert werden. [Jacobson 1975] Dazu kommt, dass die Radikale nicht nur mit den Lipiden reagieren, sie zerstören ebenso die Eisen-EDTA-Komplexe, wodurch „freie“ Eisen-Ionen entstehen. Diese binden an das negativ geladene Lipid. Die Liposomen werden dadurch verfestigt. Die Phasenumwandlungstemperaturen erhöhen sich. [Jacobson 1975, Garidel 1999]

Nach dem Radikalangriff nimmt die Halbwertsbreite $\Delta T_{m_{1/2}}$ zu. Die Phasenumwandlung verläuft somit über einen größeren Temperaturbereich. Dies wird bei Liposomen beobachtet die aus zwei unterschiedlichen Lipide bestehen, die jedoch ähnliche thermodynamische Eigenschaften besitzen. [Cevc 1987, Biltonen 1993] Geht man (wie im Kapitel 4.1) davon aus, dass die Reaktion hauptsächlich an den Kopfgruppenstattfindet und die Trimethylammonium Gruppe abgetrennt wird, so entstehen an der äußeren Schicht der Liposomen negativ geladene C_{14}-Lipide. Die innere Seite könnte weiterhin aus den zwitterionisch geladenen DMPC Molekülen bestehen. Dies könnte auch der Grund sein, dass der Phasenübergang bei hohen Fenton-Konzentrationen nicht völlig verschwindet. Es ist aber auch vorstellbar, dass in der Subphase nicht genügend „freie“ Eisen-Ionen existieren, um an alle negativ geladenen Lipide zu binden. Dadurch kommt es nicht zu einer vollständigen Verfestigung der Lipide. Interessant ist der Fakt, dass die Umwandlungsenthalpie bei geringer Fenton-Konzentration (0,5 mmol L^{-1}) erst ansteigt und dann mit Erhöhung der Fenton-Konzentration fast um die Hälfte abnimmt. Dabei sei angemerkt, dass die Umwandlungsenthalpie hauptsächlich von den Van-der-Waals Kräften zwischen den

Alkylketten abhängt. Diese ist abhängig von der Alkylkettenlänge, der Alkylkettenkonformation (trans-gauche) sowie von deren Anordnung. Die Alkylkettenanordnung bzw. Alkylkettenpackung hängt wiederum von der Kopfgruppe ab. Eine kleinere Kopfgruppe bietet die Möglichkeit einer dichteren Alkylkettenpackung. Dadurch steigen die Van-der-Waals Kräfte und mit denen die Umwandlungsenthalpie. Dies ist der Fall beim schwachen Radikalangriff mit einer 0,5 mmol L^{-1} Fenton-Konzentration. Bei stärkeren Radikalangriffen nehmen die Anzahl der „freien“ Eisen-Ionen (durch Zerstörung der Eisen-EDTA-Komplexe) sowie deren Bindung an die negativ geladenen Lipide zu. Die Anbindung der Eisen-Ionen kann zu einer Einschränkung der Alkylkettenbewegungen in der flüssigen Phase sowie zur Störung der Alkylkettenordnung in der festen Phase führen. Die Enthalpie nimmt dadurch ab.

4.4.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden große unilamellare Liposomen (GUVs) mit der in Kapitel 3.8.1 beschriebenen Elektropräparation hergestellt. In Abbildung 4.19 wurden 2 Liposomen aus der hergestellten Liposomen-Lösung mit einem Konfokalmikroskop abgebildet. Bild A zeigt zwei Liposomen in einer Fokalebene. Höchst wahrscheinlich handelt es sich um unilamellare Liposomen. Aufgrund der Auflösungsgrenze (Abbe-Limit) kann man dies jedoch nur annehmen. Ebenfalls sind in Abbildung 4.19 die z-Stack-Aufnahmen von den Liposomen einmal von oben (Bild-B) und von der Seite (Bild-C) dargestellt.

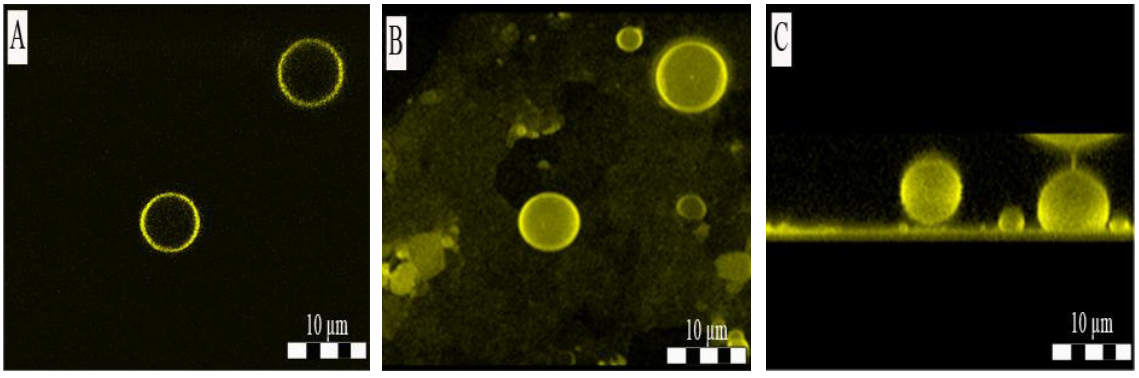


Abb. 4.19 Unilamellare DMPC-Liposomen mit 0,25 mol% NBD-PE. In der Fokalebene (rechts A) und die dazugehörigen z-Stack-Aufnahmen von oben (mitte B) und von der Seite (links C).

Neben unilamellaren Liposomen wurden aber auch vereinzelt multilamellare Liposomen, „kleine“ Liposomen (1-2 µm) eingeschlossen in großen unilamellaren Liposomen oder Liposomen die miteinander fusionieren beobachtet (siehe Abb. 4.20).

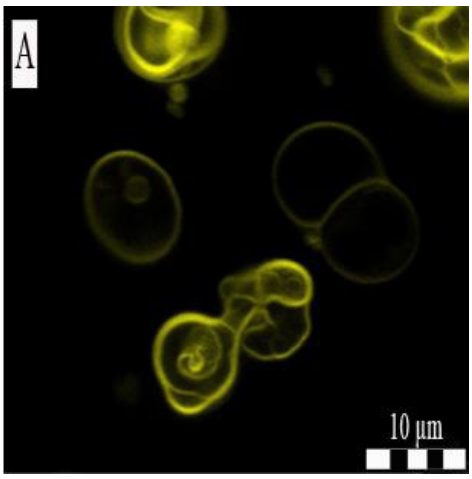


Abb. 4.20 Neben unilamellare Liposomen sind Liposomen die fussionieren, „kleine“ eingeschlossene Liposomen (1-2 µm) in großen unilamellaren Liposomen oder multilamellare Liposomen zu beobachten.

Aufgrund der photochemischen Zerstörung der Fluorophor-Moleküle durch das Anregungslicht (Photobleichung) sowie durch plötzlich auftretende Bewegungen der Liposomen, verursacht durch die Injektion von Wasserstoffperoxid, war es nicht möglich einzelne Liposomen während eines Radikalangriffs zu beobachten. Das zu beobachtende Volumen wurde deshalb vergrößert (siehe Abb. 4.21). Bild A in Abbildung 4.21 zeigt eine z-Stack Aufnahme von DMPC-Liposomen nach der Elektropräparation. Nach der Injektion einer EDTA-Eisen-Lösung (2,5 mmol L^{-1} EDTA, 2 mmol L^{-1} Fe^{2+} Endkonzentration) (Abb. 4.21, Bild B) sind im Vergleich zu den DMPC-Liposomen (Abb. 4.21, Bild A) in wässriger Lösung keine Veränderungen zu erkennen. Vor dem Radikalangriff sind viele Liposomen, vor allem unilamellare Liposomen aber auch multilamellare Liposomen vorhanden (Abb. 4.20). Die Größenverteilung ist heterogen und reicht von 1 µm bis 20 µm. Nach dem Radikalangriff (2 Stunden später) sind neben fluoreszierenden Fragmenten nur noch vereinzelt Liposomen zu finden (Abb. 4.21, Bild C). Nach 4 Stunden sind keine Liposomen (in der gesamten Lösung), sondern nur noch fluoreszierende Fragmente zu erkennen (Abb. 4.21, Bild D).

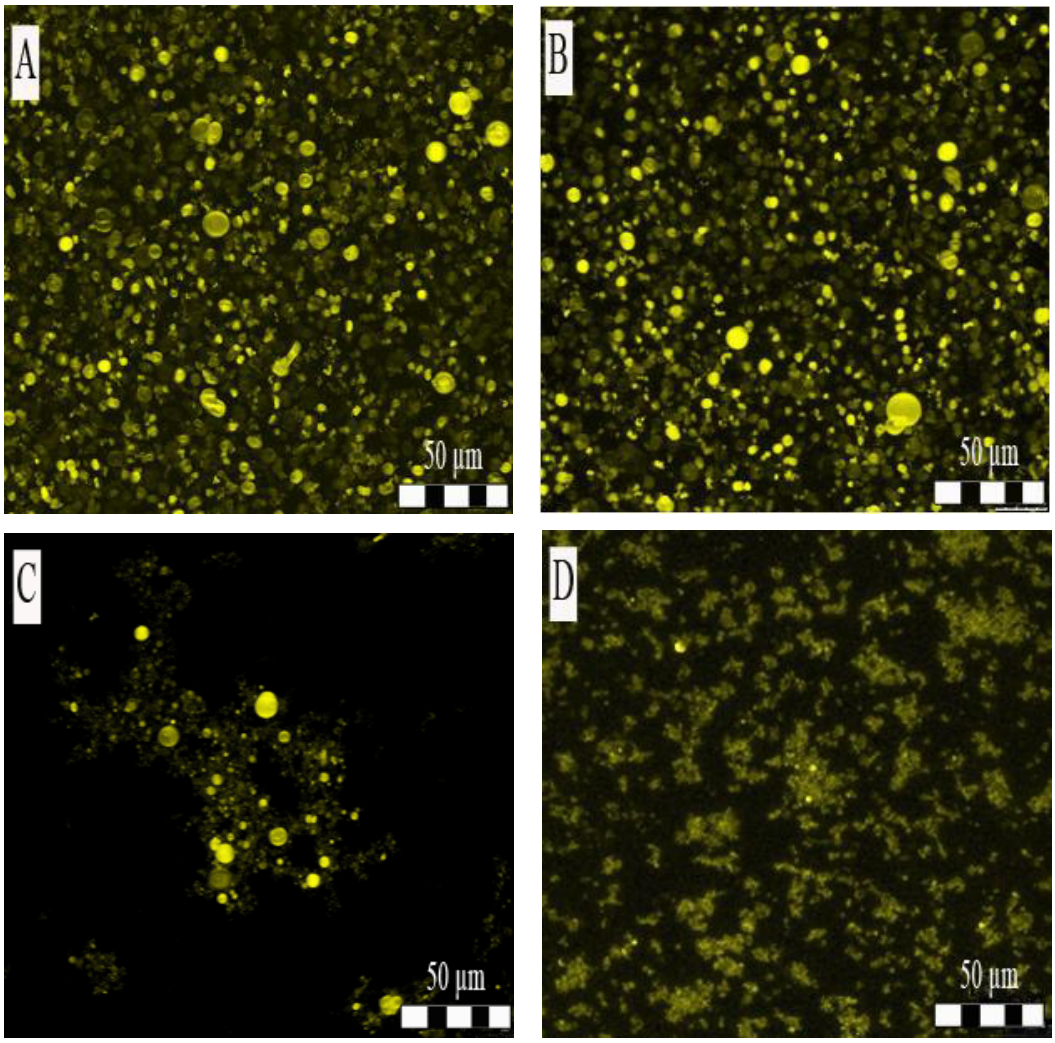


Abb. 4.21 Z-stack Aufnahmen von DMPC–Liposomen vor (Bild A und B) und nach (Bild C und D) dem Radikalangriff. Nach der Beendigung der Elektropräparation wurde Bild A aufgenommen. Nach der Zugabe einer EDTA-Eisen-Lösung sind keine Veränderungen zu beobachten (Bild B). Die Bilder C und D wurden nach 2 bzw. nach 4 Stunden nach der Injektion von H_2O_2 aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

4.4.1.4 Diskussion

Mit der Elektropräparation können große unilamellare Liposomen hergestellt werden. Die Größe der Liposomen ist jedoch sehr heterogen und reicht von 1 µm bis 20 µm. Dennoch sind auch einige multilamellare Liposomen zu beobachten. Die Zugabe von Eisen-EDTA-Komplexen hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Größe und Form der

Liposomen. Die Liposomen waren stabil. Nach 24 Stunden waren keine Veränderungen der Liposomen im Reinstwasser wie auch in der Fenton-Lösung zu beobachten. Erst durch die zusätzliche Injektion von Wasserstoffperoxid kommt es zur Zerstörung der Liposomen. Der Reaktionsmechanismus ist höchstwahrscheinlich der gleiche wie der Radikalangriff auf eine DPPC-Monoschicht (siehe Kapitel 4.1).

Anfangs findet die Reaktion hauptsächlich an den äußeren Kopfgruppen statt. Die Trimethylammonium Gruppe wird abgetrennt und es entstehen negativ geladene C_{14}-Lipide, an der äußeren Schicht der Liposomen. Eisen-Ionen können dadurch anbinden und die Außenseite der Liposomenverfestigen. Es wäre denkbar, dass die Liposomen dadurch aufgebrochen werden. Durch das Aufbrechen der Liposomen können Eisen-EDTA-Komplexe sowie Wasserstoffperoxid ins Innere der Liposomen diffundieren. Die Bildung von Radikalen und deren Reaktion mit den Lipiden im Inneren wäre somit möglich.

Ebenfalls könnten die EDTA-Eisen Moleküle sowie das Wasserstoffperoxid durch Fehlstellen und „Lipidkanäle“ (siehe Abb.4.21) in die Liposomen hinein diffundieren. Dies ist der Fall, wenn die Liposomen sich auf dem ITO-Glass befinden und noch nicht geschlossen sind. [Estes 2005] Die Bildung von Radikalen und deren Reaktion mit den Lipiden im Inneren wäre somit ebenfalls möglich. Dies sind jedoch nur Hypothesen. Fakt ist, dass die DMPC-Liposomen nach einem Radikalangriff mit einer Fenton-Lösung (EDTA:Fe^{2+} = 5:4) und Wasserstoffperoxid (Fe^{2+}:H_2O_2 = 1:6) vollständig zerstört werden.

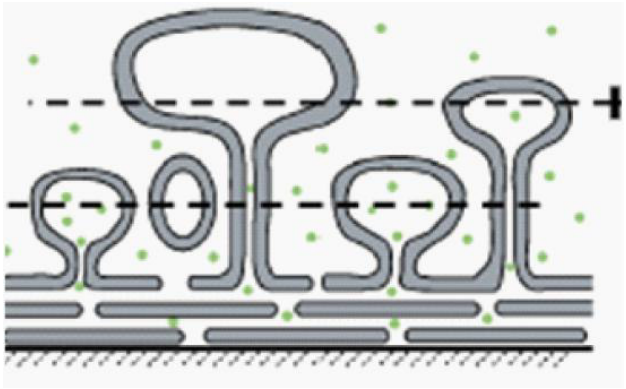


Abb. 4.22 Modell der hydratisierten planaren Doppelschichten mit ihren Fehlstellen und „Lipidkanäle” durch die Eisen-EDTA-Komplexe sowie H_2O_2 hinein diffundieren können. Entnommen aus [Estes 2005]

4.4.2 Radikalangriffe auf DMPC Liposomen mit EDTA im hohen Überschuss

4.4.2.1 DSC

Die unilamellaren DMPC-Liposomen wurden wie in Kapitel 3.8.2 und 4.4.1 beschrieben hergestellt. Der Unterschied zum Kapitel 4.4.1 ist der erhöhte Anteil an EDTA. Das Konzentrationsverhältnis EDTA zu Fe^{2+} ist 3:1. Das Konzentrationsverhältnis von Fe^{2+} zu H_2O_2 ist 1:6. Abbildung 4.23 zeigt das Thermogramm von unilamellaren DMPC-Liposomen (nach der Ultraschallbehandlung) in einer Fenton-Lösung mit 12 mmol L^{-1} EDTA und 4 mmol L^{-1} Mohrschen Salz. Die Heizrate war 60 K min^{-1}.

Vor dem Radikalangriff (schwarze Linie) ist nur ein endothermer Peak, der für die Hauptphasenumwandlung charakteristisch ist, beobachtbar. Es findet keine Vorumwandlung statt. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m findet bei 24,0 °C statt. Die Phasenumwandlungsenthalpie ist 24 kJ mol^{-1}. Die Halbwertsbreite $\Delta T_{m_{1/2}}$ ist 1,2 K. Die Werte von T_m und $\Delta T_{m1/2}$ sind somit größer als die von DMPC-Liposomen in Wasser bzw. in einer Fenton-Lösung bei der das Konzentrationsverhältnis EDTA zu Fe^{2+} gleich 5:4 ist (siehe Tabelle IV-2.).

Tabelle IV-2 Umwandlungstemperaturen, Umwandlungsenthalpien und Halbwertsbreite von DMPC-Liposomen in Wasser und in Fenton-Lösungen

DMPC Liposomen		Temperatur T [°C]	Umwandlungs-enthalpie ΔH [kJ mol^{-1}]	Halbwerts-breite $\Delta T_{m_{1/2}}$ [K]
in Wasser	Vorumwandlung	14 ± 1	5,0 ± 2	-
	Hauptphasenumwandlung	23	26	-
in Fenton-Lösung 1,75 mmol L^{-1} EDTA und 1,4 mmol L^{-1} Fe^{2+}	Vorumwandlung	12,9	3,8	-
	Hauptphasenumwandlung	23,2	28	0,6
in Fenton-Lösung 12 mmol L^{-1} EDTA und 4 mmol L^{-1} Fe^{2+}	Vorumwandlung	Nicht vorhanden	-	-
	Hauptphasenumwandlung	24	24	1,2

Nach dem Radikalangriff ist nur eine kleine Veränderung des Phasenübergangs beobachtbar (rote Linie). Die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m findet bei 25 °C statt und ist damit 1 K größer als vor dem Radikalangriff. Die Umwandlungsenthalpie hat sich um 11 kJ mol^{-1} auf 35 kJ mol^{-1} erhöht. Die Halbwertsbreite $\Delta T_{m_{1/2}}$ ist 1,5 K. Nach Zugabe von 15 mmol L^{-1} Eisen(II)sulfat, wodurch 7 mmol L^{-1}mehr Eisen-Ionen als EDTA Moleküle in Lösung sind, ist kein Phasenübergang mehr beobachtbar (rote gestrichelte Linie).

Führt man das Kontrollexperiment durch, d.h. das gleiche Experiment ohne Wasserstoffperoxid, bleibt die Hauptphasenumwandlung erhalten (schwarz gestrichelte Linie). Die Hauptphasenumwandlungstemperatur verschiebt sich um 1 Kelvin auf 25,1 °C. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem durchgeführten Experiment im Kapitel 4.3.1 (Abb. 4.16).

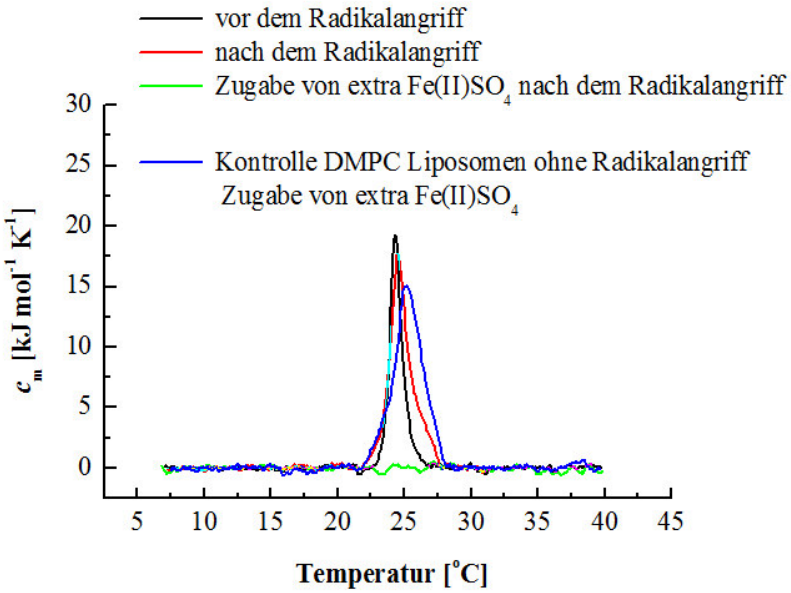


Abb. 4.23 Thermogramme von unilamellaren DMPC-Liposomen vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem Radikalangriff. Das Konzentrationsverhältnis zwischen EDTA und Fe^{2+} war 3:1. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Fe^{2+} und H_2O_2 war 1:6. Die Fe^{2+}-Konzentration war 4 mmol L^{-1}. Der Peak der Hauptphasenumwandlung verändert sich nach dem Radikalangriff nur wenig. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur verschiebt sich nur um ein Kelvin. $\Delta T_{m_{1/2}}$ nimmt um 0,3 Kelvin zu. Nach dem Radikalangriff wurde zusätzlich $Fe(II)SO_4$ zur Liposomen-Lösung hinzugegeben (grüne Linie), so dass 7 mmol L^{-1}„freie" Eisen-Ionen in der Lösung vorhanden waren. Dies führt zu einem Verschwinden des Phasenübergangs. Die blaue Linie zeigt den Kontrollversuch. Liposomen in einer EDTA-Eisen-Lösung (ohne Zugabe von H_2O_2) und Zugabe von extra $Fe(II)SO_4$, so dass ebenfalls 7 mmol L^{-1}„freie" Eisen-Ionen in der Lösung vorhanden waren. Heizrate war 60 K min^{-1}.

4.4.2.2 Diskussion

Befinden sich DMPC-Liposomen in einer 12 mmol L^{-1} EDTA und 4 mmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$ Lösung ist vor dem Radikalangriff nur ein endothermer Peak beobachtbar, der für die Hauptphasenumwandlung charakteristisch ist. Es findet keine Vorumwandlung statt. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m ist um ein Kelvin leicht erhöht (im Vergleich Liposomen im Wasser bzw. in einer Fenton-Lösung (EDTA:Fe^{2+} = 5:4)). Dies zeigt, dass die Eisen-EDTA-Komplexe mit den Lipiden leicht wechselwirken. Im Kapitel 4.1.5 wurde die Wechselwirkung von Eisen-EDTA-Komplexen mit DPPC-Monoschichten gemessen und beschrieben. Dort heißt es: Im Vergleich zu einer DPPC Monoschicht auf Wasser zeigen die Diffraktionsdaten vor dem Radikalangriff (auf einer Fenton-Lösung) eine größere Azimuthverteilung $\Delta\psi$ und eine kleinere Korrelationslänge. Daher kann man davon ausgehen, dass Eisen-EDTA-Komplexe, an der Kopfgruppe adsorbieren und die lokale Konformation verändern.

Nach dem Radikalangriff ist die Veränderung der Phasenübergangstemperatur sehr gering bzw. zu vernachlässigen, im Vergleich zu Radikalangriffen auf DMPC-Liposomen bei denen das Verhältnis EDTA:Fe^{2+} = 5:4 war. Auffällig ist jedoch die Zunahme der Umwandlungsenthalpie und der Halbwertsbreite $\Delta T_{m_{1/2}}$. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls bei einem „schwachen“ Radikalangriff mit 0,5 mmol L^{-1} Fe^{2+} und 0,625 mmol L^{-1} EDTA beobachtet (siehe Abb. 4.18). Dies kann mit einer kleineren Kopfgruppe begründet werden, wodurch eine dichtere Alkylkettenpackung möglich ist. Dadurch steigen die Van-der-Waals Kräfte und damit auch die Umwandlungsenthalpie.

Die Daten sprechen für einen bevorzugten Radikalangriff auf die Kopfgruppe. Dennoch kann man nicht ausschließen, dass auch einige Alkylketten von den Kopfgruppen abgetrennt werden. In diesem Fall, würden sich die abgetrennten Alkylketten im hydrophoben Teil aufhalten. [Brezesinski 1996, Thoma 1996] Eine bessere Anordnung der Alkylketten wäre damit wahrscheinlich möglich und damit auch eine Zunahme der Umwandlungsenthalpie. Auf jeden Fall haben die Veränderungen der molekularen Struktur der Lipide durch die Radikale nur einen kleinen Einfluss auf die Hauptphasenumwandlung. Erst wenn mehr Eisen-Ionen als EDTA-Moleküle vorliegen, findet keine Phasenumwandlung mehr statt. Dies bestätigt unserer Annahme, dass nach dem Radikalangriff aus dem zwitterionisch geladenen DMPC-Lipid ein negativ geladenes Lipid entsteht. Durch die Anbindung der Eisen-Ionen an das negativ geladene

Lipid kommt es zur Zerstörung der Liposomen. Ein Phasenübergang findet nicht mehr statt.

4.4.3 Zusammenfassung

Mithilfe der Fenton-Reaktion wurden Radikalangriffe auf DMPC-Liposomen durchgeführt. Dabei wurden die Fenton-Konzentration varriert sowie das Konzentrationsverhältnis zwischen EDTA und Fe^{2+}. Das Konzentrationsverhältnis EDTA zu Fe^{2+} war 5:4 bzw. 3:1. Das Verhältnis H_2O_2 zu Fe^{2+} war immer 6:1.
Bei den Experimenten bei denen das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} 5:4 war, verschiebt sich die Vor- und Hauptphasenumwandlungstemperatur mit zunehmender Fenton-Konzentration zu höheren Werten, was auf eine Verfestigung der Liposomen hinweist. Mit der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Liposomen nach einem starken Radikalangriff völlig zerstört sind und nur noch fluoreszierende Fragmente zu beobachten sind.
Wird der Radikalangriff auf DMPC-Liposomen durchgeführt, bei dem das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} gleich 3:1 ist, sind nach dem Angriff nur geringe Veränderungen des thermodynamischen Verhaltens zu beobachten. Eine Verfestigung bzw. die Zerstörung der Liposomen tritt erst ein, wenn die Konzentration der Eisen-Ionen höher ist als die EDTA Konzentration. Da normalerweise Eisen-Ionen nicht an DMPC binden bzw. nur schwach, kann man davon ausgehen, dass die Liposomen nach dem Radikalangriff negativ geladen sind. Die Zunahme der Umwandlungsenthalpie nach dem Radikalangriff spricht für eine Verkleinerung der Kopfgruppe. In beiden Experimenten kommt es zu einem bevorzugten Radikalangriff auf die hydrophile Kopfgruppe. Diese wird durch den Angriff negativ geladen. Die Verfestigung der Monoschicht kommt nur durch die Anbindung von Eisen-Ionen zustande. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Untersuchungen der Radikalangriffe auf Monoschichten siehe Kapitel 4.1 und 4.2.

V Radikalangriffe auf negativ geladene Modellmembranen

Im Kapitel IV wurden Radikalangriffe auf DPPC-Monoschichten und DMPC Liposomen untersucht. DPPC und DMPC sind zwitterionisch geladene Lipide. In diesem Kapitel soll die Wechselwirkung von Radikalen mit negativ geladenen Lipid-Monoschichten bestehend aus Lipiden wie DMPA, DMPG und TMCL untersucht werden.

5.1 Isotherme

Abbildung 5.1 zeigt die Druck/Flächen Isothermen einer DMPA (links) und DMPG (rechts) Monoschicht auf eine mit EDTA- und Eisen(II)sulfat gelöste Subphase (schwarze Linien). Diese Isothermen von DMPA und DMPG auf der Fenton-Lösung sind vergleichbar mit den Isothermen auf Reinstwasser. Bei beiden ist ein Phasenübergang (1. Ordnung) von der flüssig-expandierten zu flüssig-kondensierten Phase erkennbar, mit dem typischen Koexistenzbereich. Die Radikalangriffe wurden in der flüssig-kondensierten Phase bei 30 mN m^{-1} durchgeführt. Die Fenton-Lösung bestand aus Fe(II)SO_4 und EDTA im Verhältnis 4:5. Das Verhältnis Fe^{2+} zu H_2O_2 war 1:6. Während des Radikalangriffs wird die molekulare Fläche konstant gehalten und der Abfall des Oberflächendrucks gemessen. Der Radikalangriff wird als beendet angesehen, wenn sich ein neuer Gleichgewichtswert eingestellt hat. Eine zweite Isotherme wird anschließend aufgenommen. Alle Radikalangriffe werden nach diesem Ansatz durchgeführt, analog zu dem Radikalangriff auf DPPC-Monoschichten (siehe Kapitel 4.1). Nach dem Radikalangriff auf einer DMPA-Monoschicht ist der Koexistenzbereich völlig verschwunden ist (siehe Abb. 5.1, links). Dies ist auch bei Radikalangriffen auf DMPG-Monoschichten beobachtbar (siehe Abb. 5.1, rechts).
Ist die EDTA Konzentration doppelt so hoch wie die Eisen-Ionen Konzentration sind keine bzw. nur sehr kleine Veränderungen der Isotherme zu beobachten (siehe Abb. 5.2), obwohl das Konzentrationsverhältnis Fe^{2+}:H_2O_2 mit 1:13 größer war als beim vorherigen Versuch. Dieses Ergebnis ist das Gleiche wie beim Radikalangriff auf einer DPPC Monoschicht, bei dem das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} 3:1 war. Nur durch Zugabe von Eisen-Ionen, die die EDTA Konzentration übersteigt, konnten Veränderungen der Isotherme beobachtet werden (siehe Kapitel 4.2.2).

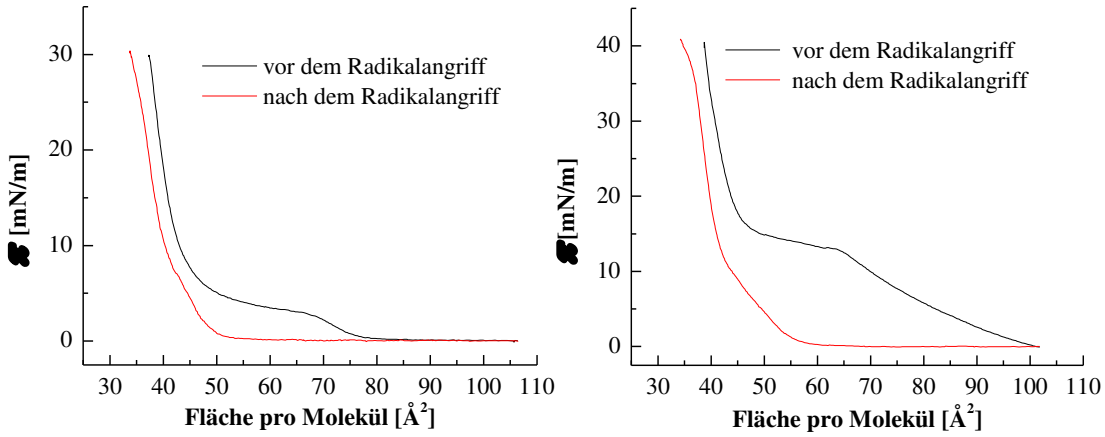


Abb. 5.1 Isothermen von DMPA (links) und DMPG (rechts) vor (schwarze Linie) und nach dem Radikalangriff (rote Linie). Das Konzentrationsverhältnis Fe^{2+} zu EDTA ist 4:5 und das von Fe^{2+} zu H_2O_2 ist 1:6. Die $Fe(II)SO_4$ Konzentration war 4 mmol L^{-1}. Die DMPA und DMPG Monoschichten wurden bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert (schwarze Linie). Bei diesem lateralen Druck, wird die molekulare Fläche konstant gehalten und ein Radikalangriff durchgeführt. Nach 2 Stunden wurde die Monoschicht komplett expandiert und wieder komprimiert. Nach dem Radikalangriff ist der Phasenübergang (1. Ordnung), aufgrund der Anbindung von Eisen, vollständig verschwunden. Es kommt zu einer Verfestigung der Monoschicht. Die Isothermen können zu kleineren molekularen Flächen komprimiert werden.

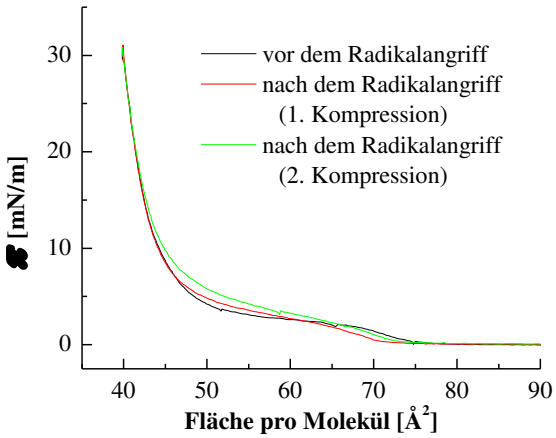


Abb. 5.2 DMPA Isothermen vor (schwarze Linie) und nach dem Radikalangriff (rote und grüne Linie). Das Konzentrationsverhältnis Fe^{2+} zu EDTA ist 1:2 und das von Fe^{2+} zu H_2O_2 ist 1:13. Die $Fe(II)SO_4$ Konzentration war 1 mmol L^{-1}. Die DMPG Monoschicht wird bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert (schwarze Linie). Bei diesem lateralen Druck, wird die molekulare Fläche konstant gehalten und ein Radikalangriff durchgeführt. Nach 2 Stunden wurde die Monoschicht komplett expandiert. Die rote Isotherme ist die erste Kompression nach dem Radikalangriff. Die grüne Isotherme wurde 2,5 Stunden nach dem Radikalangriff aufgenommen (2. Kompression). Es sind keine bzw. nur kleine Unterschiede zu sehen, die durch den Radikalangriff oder durch mehrmaliges Komprimieren und Expandieren entstanden sind.

5.2 Diskussion

Nach dem Radikalangriff bleibt die negative Ladung der Phospholipide erhalten. Darum ist das Verschwinden des Koexistenzbereichs einfach zu erklären. Die Radikale zerstören die EDTA-Komplexe. Es entstehen „freie“ Eisen-Ionen. Diese binden an die negativ geladenen Lipide an und verfestigen die Monoschicht. Aussagen, wie die Radikale mit den negativ geladenen Lipiden reagieren, welchen Einfluss sie auf das thermodynamische Verhalten haben und welchen Beitrag die Radikale auf die beobachteten Veränderungen haben, können somit nicht getroffen werden. Der Einfluss der Eisen-Ionen auf das thermodynamische Verhalten der negativ geladenen Monoschicht ist zu groß. Um „freie“ Eisen-Ionen abzufangen, wurde das Verhältnis EDTA:Fe^{2+} auf 2:1 vergrößert. Veränderungen der Isotherme konnten nach dem Radikalangriff nicht mehr beobachtet werden. Das bedeutet, dass die Radikale keinen großen Einfluss auf das thermodynamische Verhalten haben. Da das thermodynamische Verhalten der Monoschicht bei konstanter Temperatur von der Alkylkettenlänge, von der Größe der Kopfgruppe sowie von dessen Ladung abhängt, führt der Radikalangriff zu keinen deutlichen Veränderungen dieser drei Faktoren. Dies bedeutet jedoch nicht, dass keine molekularen Veränderungen der Lipide durch die Radikale stattgefunden haben (vergleich Kapitel 4.2.2). Von der Kopfgruppe abgetrennte Alkylketten würden sich z.B. im hydrophoben Teil der Monoschicht aufhalten. [Brezesinski 1996, Thoma 1996] Eine Veränderung der thermodynamischen Eigenschaften wäre somit nicht messbar. Die durchgeführten IRRAS Messungen zeigen ebenfalls keine Veränderungen der Alkylketten. Auffällig sind jedoch Veränderungen der Kopfgruppe, die jedoch zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund fehlender Vergleichsmessungen nicht auswertbar sind (siehe Anhang, Abb. Kap. 10.2).

5.3 Zusammenfassung

Werden Radikalangriffe mithilfe der Fenton-Reaktion auf negativ geladene Lipide durchgeführt, ist eine Verfestigung der Monoschicht zu beobachten, wenn das Verhältnis EDTA:Fe^{2+} = 5:4 ist. Diese Verfestigung kommt durch die Anbindung von „freien“ Eisen-Ionen an den Lipiden zustande. Das bedeutet, dass die negative Ladung der Monoschicht auch nach dem Radikalangriff erhalten bleibt. Um zu verhindern, dass „freie“ Eisen-Ionen in der Subphase sind, sollte das Verhältnis EDTA zu Fe^{2+} mindestens 2:1 sein. Wird bei diesem Verhältnis ein Radikalangriff auf einer negativ geladene Monoschicht durchgeführt, sind keine Veränderungen der Isotherme zu beobachten. Dies bedeutet jedoch nicht, dass nichts passiert ist. Die IRRAS-Messungen weisen auf Veränderungen der Kopfgruppe hin. Die Alkylketten und die Carbonylgruppe bleiben hingegen unverändert.

VI Einfluss von Eisen-Ionen auf eine negativ geladene Lipid-Monoschicht am Beispiel von TMCL

Wie man in Kapitel V sehen konnte, haben die Eisen-Ionen einen starken Einfluss auf den Verlauf der Isothermen und damit auf das thermodynamische Verhalten von negativ geladenen Monoschichten.
Am Beispiel von TMCL soll der Einfluss von Eisen-Ionen auf negativ geladene Lipid-Monoschichten, mithilfe von Isothermen, Brewsterwinkel-Mikroskopie und Röntgenreflexion, näher untersucht werden.

6.1 Isotherme und Brewsterwinkel-Mikroskopie

Abbildung 6.1 zeigt typische Druck/Flächen Isothermen von einer TMCL Monoschicht auf Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen. Es ist ein Phasenübergang (1. Ordnung) von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase erkennbar, charakterisiert durch ein Koexistenzbereich. Bei 25 °C findet der Phasenübergang bei einem lateralen Druck von 5 mN m^{-1} statt. Wie zu erwarten, verschiebt sich dieser mit zunehmender Temperatur zu höheren Übergangsdrücken. Die BAM Bilder (Abb. 6.2) wurden bei 25 °C aufgenommen. Die dazugehörigen molekularen Flächen und Drücke sind aus der Abbildung 6.1 zu entnehmen. Will man die Domänen-Formation untersuchen, muss man sich bewusst machen, dass die Form und Größe der Domänen von der Struktur der Lipide, von der Randspannung an der Phasengrenze zwischen Domänen (flüssig-kondensiert) und der umgebenden Lipide (flüssig-expandiert), von der elektrostatischen Interaktionen zwischen den Lipiden sowie von der Wechselwirkung der Lipide mit der Subphase, die die intermolekulare Wechselwirkung zwischen den Lipiden verändert abhängt (siehe Kapitel 9.3). [Möhwald 1990, Gröger 2012]
Am Beginn des Koexistenzbereichs sind die Domänen klein und rund. Ob dies der Wirklichkeit entspricht oder aufgrund der Auflösungsgrenze des BAMs resultiert ist unklar. Mit zunehmendem Druck ist ein dendritisches Wachstum der TMCL Domänen beobachtbar. Die Domänen haben die Form eines Kleeblatts. Das dendritische Wachstum konnte auch nicht durch Reduzierung der Kompressionsgeschwindigkeit verhindert werden.

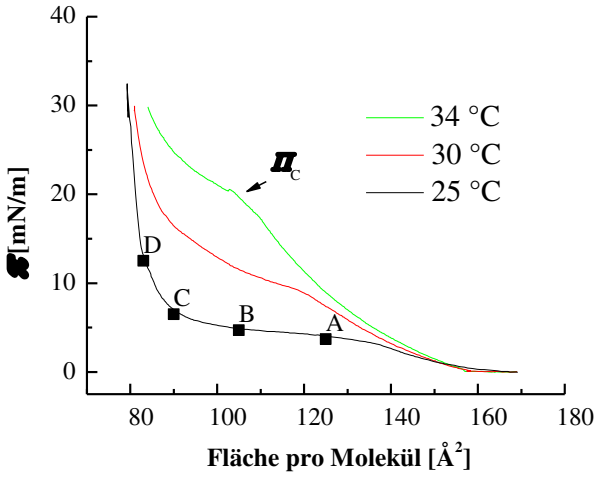


Abb. 6.1 Druck/Flächen Isothermen von einer TMCL Monoschicht auf Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen

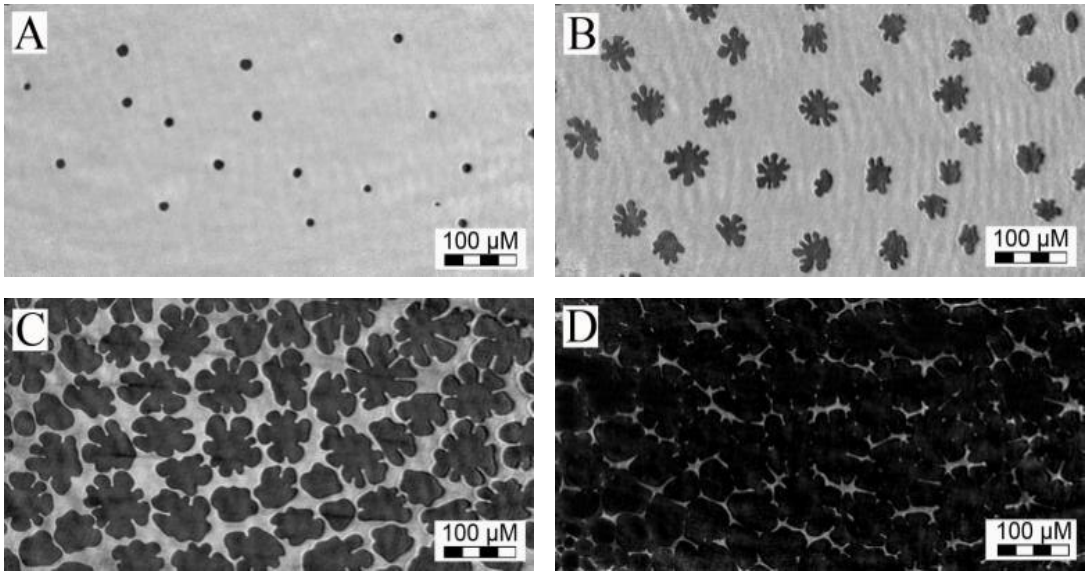


Abb. 6.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie einer TMCL Monoschicht auf Wasser. Die Bilder wurden bei den in der Isotherme eingetragenen π/A -Werten (Abb. 6.1) bei 25 °C aufgenommen.

Befindet sich Fe(II)SO_4 in der Subphase, kommt es zur irreversiblen Verfestigung der TMCL Monoschicht. Sie befindet sich in einer sogenannten festen Phase. Dies bedeutet, dass kein Phasenübergang durch Kompression oder Expansion bzw. durch Temperaturveränderung mehr stattfindet. Die irreversible Verfestigungder TMCL-Monoschicht konnte bis zu einer Fe(II)SO_4 Konzentration von 1 µmol L^{-1} beobachtet

werden (siehe Abb. 6.3 und 6.4). Abbildung 6.3 zeigt die Druck/Flächen Isothermen einer TMCL Monoschicht auf einer Fe(II)SO_4–Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Fe(II)SO_4–Konzentration ist 1 µmol L^{-1}. Ein Phasenübergang 1. Ordung ist nicht erkennbar.

Am Anfang der Kompression ist die TMCL Monoschicht bereits in der festen Phase (Abb. 6.4, Bild A). Mit zunehmender Kompression werden die einzelnen Fragmente der Monoschicht zusammengeschoben (Abb.6.4, Bild B-C). Es bildet sich eine kompakte Monoschicht. Nach anschließender und vollständiger Expansion sind große „Schollen" beobachtbar, die aufgrund von Strömungen auf der Oberfläche zum Teil auseinander gebrochen werden (Abb. 6.4, Bild D).

Der Anstieg des lateralen Drucks ist temperaturunabhängig. Dieser steigt an, sobald die festen Bestandteile das Wilhelmy-Messsytem erreichen. Da diese nicht homogen auf der Filmwaage verteilt sind, steigt der laterale Druck bei unterschiedlichen molekularen Flächen an.

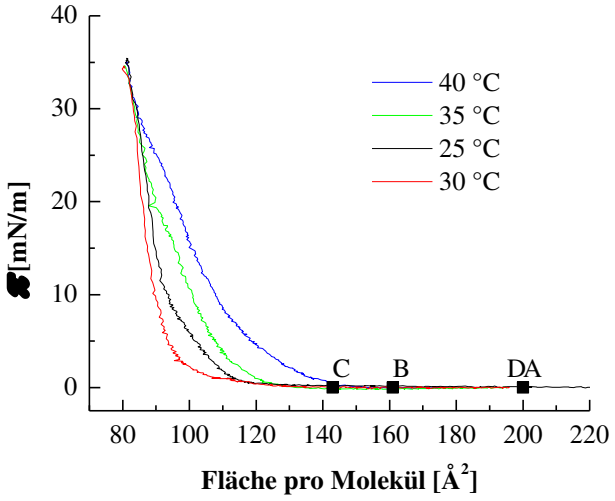


Abb. 6.3 Druck/Flächen Isotherme einer TMCL Monoschicht auf einer 1 µmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4 –Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen.

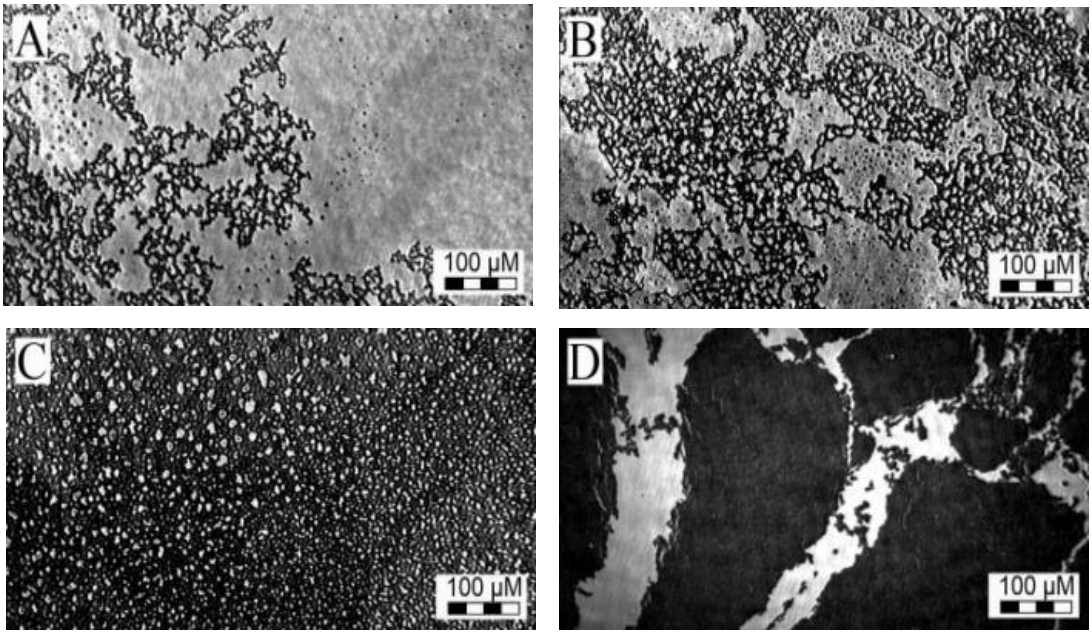


Abb. 6.4 Brewsterwinkel-Mikroskopieaufnahmen einer TMCL Monoschicht auf einer $Fe(II)SO_4$ –Subphase bei 25 °C. Die $Fe(II)SO_4$- Konzentration beträgt 1 µmol L^{-1}. Bilder A-C wurden während der Kompression aufgenommen. Nach dem die Monoschicht wieder komplett expandiert wurde, wurde Bild D aufgenommen.

Ist die Konzentration von $Fe(II)SO_4$ 0,1 µmol L^{-1} oder niedriger findet wieder ein Phasenübergang statt. Der Übergangsdruck ist jedoch erniedrigt und liegt bei 2,5 mN m^{-1} (siehe Abb. 6.5). Abbildung 6.6 zeigt die Domänen. Die dazugehörigen lateralen Drücke und molekularen Flächen sind aus der Isotherme in Abbildung 6.5 (links) zuentnehmen. Die Form und Größe der Domänen sind identisch mit den Domänen von TMCL auf Reinstwasser (vgl. Abb. 6.2). Bei einer $Fe(II)SO_4$ Konzentration von 0,01 µmol L^{-1} und einer Temperatur von 25 °C und 30 °C ist kein Unterschied zwischen den Isothermen im Vergleich zu denen auf Reinstwasser mehr zu erkennen (vgl. Abb. 6.1). Erst bei Temperaturen oberhalb von 30 °C ist der Übergangsdruck erniedrigt.

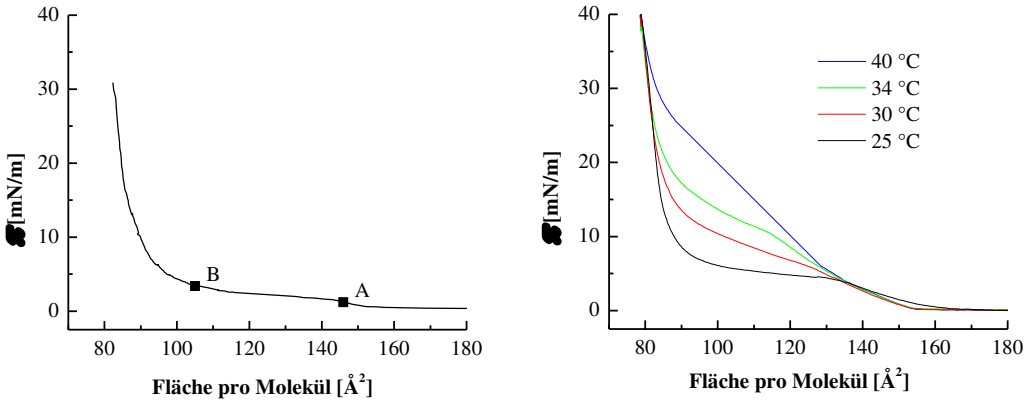


Abb. 6.5 Druck/Flächen Isotherme einer TMCL Monoschicht auf einer $Fe(II)SO_4$ – Lösung. Die Konzentration der $Fe(II)SO_4$ –Lösung ist 0,1 µmol L^{-1} bei 25 °C (links) und 0,01 µmol L^{-1} bei unterschiedlichen Temperaturen (rechts).

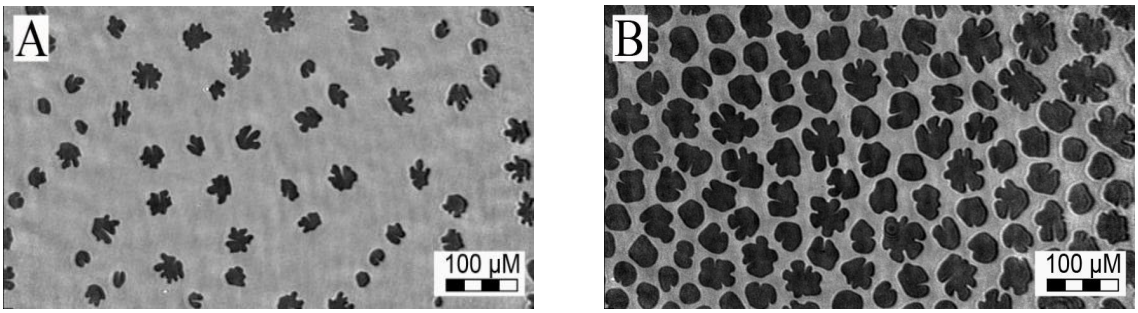


Abb. 6.6 Brewsterwinkel-Mikroskopie einer TMCL Monoschicht auf einer 0,1 µmol L^{-1} konzentrierten $Fe(II)SO_4$–Lösung. Die Bilder wurden bei den in der Isotherme eingetragenen π/A-Werten (Abb. 6.5) bei 25 °C aufgenommen.

6.2 Einfluss des pH-Wertes auf den Phasenübergang von TMCL auf einer $Fe(II)SO_4$ Subphase

Der pH-Wert ist ein entscheidender Parameter, der die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Lipiden beeinflusst und somit Einfluss auf den Phasenübergang hat. Ebenso hat der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Bildung unterschiedlicher Aqua-Eisen-Komplexe.

6.2.1 Isotherme und Brewsterwinkel-Mikroskopie

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, findet eine irreversible Verfestigung der TMCL Monoschicht auf einer $Fe(II)SO_4$ –Lösung statt, wenn die $Fe(II)SO_4$ – Konzentration größer ist als 1 µmol L^{-1}. Interessant ist, dass bei kleinerem pH-Wert (pH=1,5) wieder ein Phasenübergang der TMCL Monoschicht beobachtbar ist (siehe Abb. 6.7). Die Größe der Domänen ist im Vergleich zu denen auf Reinstwasser deutlich kleiner (siehe Abb. 6.8). Dies ist jedoch nur bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich beobachtbar. Liegt die $Fe(II)SO_4$ Konzentration im millimolaren Bereich, ist eine Verfestigung der Monoschicht auch bei pH-Werten um eins nicht zu verhindern (nicht dargestellt).

Bei einem pH-Wert von 1,3 und einer $Fe(II)SO_4$Lösung mit einer Konzentration von 1 µmol L^{-1} konnte beobachtet werden, dass der Phasenübergangsdruck der TMCL Monoschicht stärker abnimmt, wenn sich in der Subphase Fe^{3+}-Ionen anstelle von Fe^{2+}-Ionen befinden. Die Subphase war in diesem Fall eine Eisen(III)chlorid Lösung. Bei einer Temperatur von 25 °C ist kein Phasenübergang erster Ordnung zu beobachten. Es findet ein gas/flüssig-kondensierter Phasenübergang statt. Wird die Temperatur erhöht, ist der Koexistenzbereich deutlich sichtbar. Bei einer Temperatur von 30 °C ist der Übergangsdruck der TMCL Monoschicht bei Fe^{3+}-Ionen in der Subphase ca. 5 mN m^{-1} niedriger als bei Fe^{2+}-Ionen (siehe Abb. 6.7).

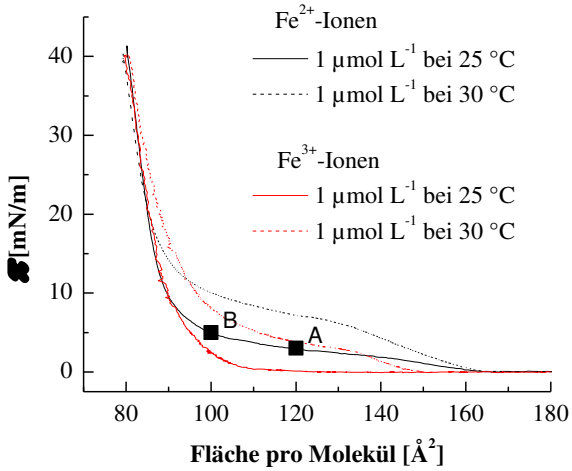


Abb. 6.7 Druck/Flächen Isotherme einer TMCL Monoschicht auf einer $Fe(II)SO_4$ – (schwarze Linie) und $Fe(III)Cl_3$ (rote Linie) -Lösung bei einem pH-Wert von 1,3. Die durchgezogenen Isothermen wurden bei 25 °C und die gestrichelten Isothermen bei 30 °C aufgenommen.

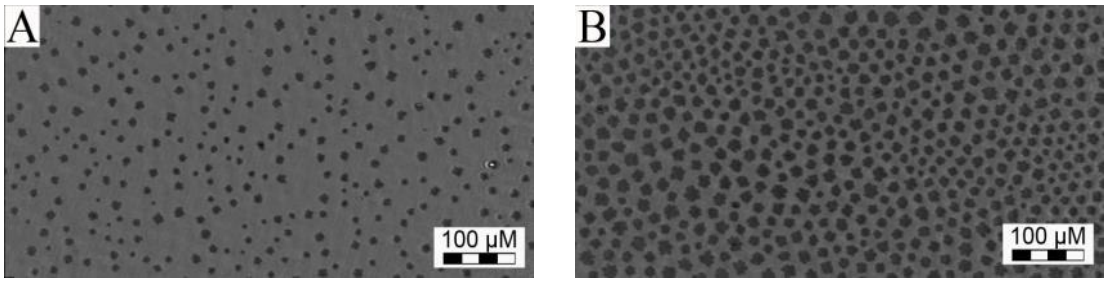


Abb. 6.8 Brewsterwinkel-Mikroskopie einer TMCL Monoschicht auf einer $Fe(II)SO_4$ – Lösung bei pH=1,3. Die $Fe(II)SO_4$-Konzentration ist 1 µmol L^{-1}. Die Bilder wurden bei den in der Isotherme eingetragenen π/A -Werten (Abb. 6.7) bei 25 °C aufgenommen.

6.2.2 Röntgenreflexion

Die Röntgenreflexionsmessungen von TMCL wurden auf Reinstwasser sowie auf einer $Fe(II)SO_4$ Lösung durchgeführt. Die $Fe(II)SO_4$–Konzentration war 1 µmol L^{-1}. Die Reflexionsmessungen von TMCL Monoschichten auf den $Fe(II)SO_4$-Lösungen wurden bei einem pH-Wert von 6,6 und 1,3 durchgeführt.

Die Reflexionsmessungen sind typisch für Phospholipidmonoschichten. Die reflektierte Intensität steigt mit q_z bis ein erstes Maximum erreicht ist. Danach folgt ein Minimum aus dessen Position die Dicke der Monoschicht bestimmt werden kann (siehe Kapitel 2.9.4.1). Weiterhin erkennt man ein zweites ausgeprägtes Maximum.

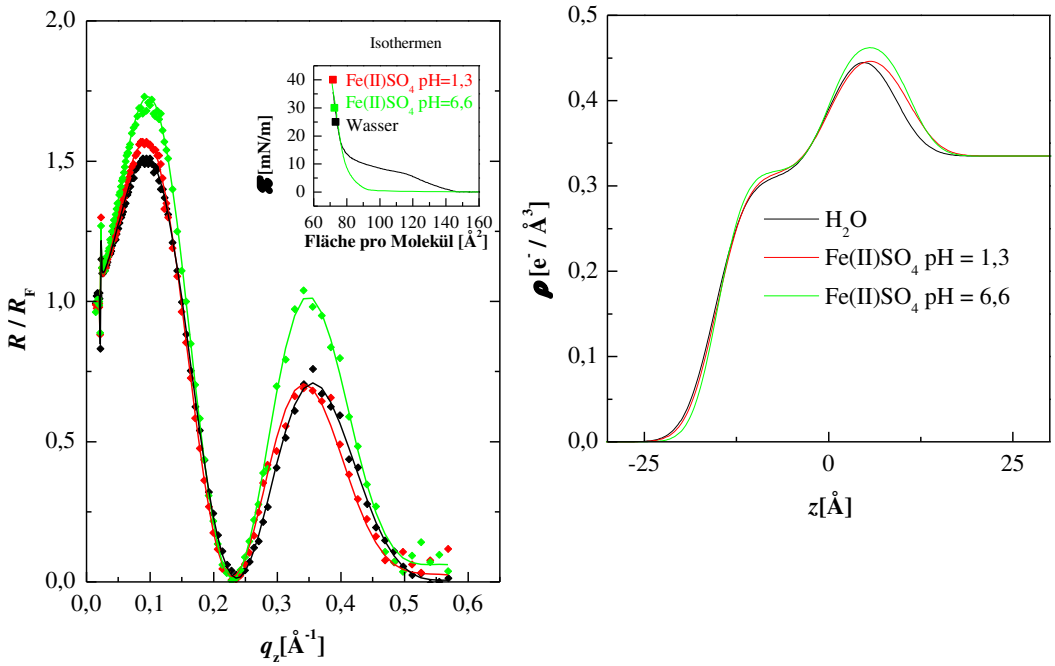


Abb. 6.9 Links: Normierte Röntgenreflektivität (links) und das dazugehörige Elektronendichteprofil (rechts) einer TMCL Monoschicht auf Reinstwasser (bei 25 mN m^{-1}, schwarz), auf $Fe(II)SO_4$ (1 µmol L^{-1}) und einem pH-Wert von 1,3 (bei 40 mN m^{-1}, rot) und auf $Fe(II)SO_4$ (1 µmol L^{-1}) und einem pH-Wert von 6,6 (bei 30 mN m^{-1}, grün). Die Isothermen sowie der laterale Druck, bei dem die Messungen durchgeführt wurden, sind im Inset abgebildet. Rechts: Das Elektronendichteprofil zeigt die unveränderte hydrophobe Region sowie die Kopfgruppe die in Länge und Elektronendichte etwas zunimmt. Zwischen der hydrophoben (Alkylketten) und hydrophilen (Kopfgruppe) Grenzfläche wird z = 0 gesetzt.

Die Abbildung 6.9 (links) zeigt die aufgenommenen Reflexionskurven. Vergleicht man die Reflexionskurven von TMCL auf Wasser (schwarze Linie) mit der von TMCL auf einer 1 µmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4 –Lösung bei einem pH-Wert von 1,3 (rote Linie), erkennt man nur geringe Unterschiede. Es sind eine Intensitätszunahme am ersten Maximum sowie eine Verschiebung des ersten Minimums und des zweiten Maximums zu kleineren q_z-Werten zu beobachten. Kleinere q_z-Werte weisen auf eine Zunahme der Schichtdicke hin. Dies kommt dadurch zustande, dass die Reflexionskurven bei unterschiedlichem lateralem Druck aufgenommen wurden. Betrachtet man hingegen die grüne Reflexionskurve (TMCL auf Fe(II)SO_4, pH=6,6), ist ein deutlicher Intensitätsanstieg der Maxima zu beobachten.

Für die Datenanalyse wurde ein Zwei-Box-Model für Phospholipidmonoschichten genutzt. Eine Box für den hydrophoben Teil mit einer geringen Elektronendichte und eine Box für die hydrophile Kopfgruppe mit hoher Elektronendichte. Die hohe Elektronendichte ist auf die Phosphatgruppe und durch die zusätzlich angebundenen Eisen-Ionen zurückzuführen. [Helm 1987, Dyck 2005]

Das Elektronendichteprofil (siehe Abb. 6.9, rechts) zeigt, dass die Dicke und die Elektronendichte der hydrophoben Ketten unverändert bleiben, während Veränderungen an der Kopfgruppe zu erkennen sind. Die Länge der Kopfgruppe nimmt aufgrund der Anbindung von Fe^{2+}-Ionen unabhängig vom pH-Wert zu. Die Elektronendichte der Kopfgruppe nimmt hingegen nur bei einem pH-Wert von 6,6 zu.

Mit dem Ziel, die Anzahl der angebundenen Eisen-Ionen pro Lipid zu bestimmen, muss die Elektronenanzahl vor und nach der Eisenanbindung verglichen werden. Um die Veränderungen zu quantifizieren, müssen die Elektronen der eingelagerten Wassermoleküle berücksichtigt werden. Nach den zwei Gleichungen VI-1 und VI-2 kann man die zwei Unbekannten, Anzahl der Wassermoleküle und Anzahl der Eisen-Ionen, bestimmen.

$$V_{\mathrm{Ges}} = A\sum l_{\mathrm{j}} = V_{\mathrm{L}} + n_{\mathrm{Fe}}V_{\mathrm{Fe}} + n_{\mathrm{H_2O}}V_{\mathrm{H_2O}} \qquad \textbf{(VI-1)}$$

$$E_{\mathrm{Ges}} = A\sum l_{\mathrm{j}}\rho_{\mathrm{j}} = E_{\mathrm{L}} + n_{\mathrm{Fe}}E_{\mathrm{Fe}} + n_{\mathrm{H_2O}}E_{\mathrm{H_2O}} \qquad \textbf{(VI-2)}$$

Um das Lipidvolumen V_{L} zu erhalten, werden die Daten von TMCL auf Reinstwasser ausgewertet. Die Anzahl der Wassermoleküle $n_{\mathrm{H_2O}}$ wird nach Gleichung VI-2 mit $n_{\mathrm{Fe}} = 0$ bestimmt. Man geht dabei von einer konstanten Elektronenanzahl des TMCL

Lipids (E_L) aus. Die Elektronenzahlen E_L und E_{H_2O} erhält man aus den Strukturformeln. V_{H_2O} lässt sich aus dessen Dichte bestimmen. Das Volumen eines Wassermoleküls beträgt 30 Å^2. Die Gesamtelektronenzahl ergibt sich aus Gleichung VI-3.

$$E_{ges.} = A(l_t \times \rho_t + l_h \times \rho_h) \qquad \textbf{(VI-3)}$$

Das Gesamtvolumen wird nach Gleichung VI-4 berechnet.

$$V_{\mathrm{Ges}} = A(l_{\mathrm{t}} \times l_{\mathrm{h}}) \qquad \textbf{(VI-4)}$$

Nach Gleichung VI-5 lässt sich das Volumen des TMCL Lipides V_L bestimmen.

$$V_{\mathrm{Ges}} = V_{\mathrm{L}} + n_{\mathrm{H_2O}} V_{\mathrm{H_2O}} \qquad \textbf{(VI-5)}$$

Nach der Bestimmung von V_L können die Gleichungen VI-1 und VI-2 durch gleichsetzen gelöst werden. Demnach bindet ein Eisen-Ion pro Lipid, bei einer $Fe(SO)_4$-Lösung mit der Konzentration von 1 µmol L^{-1} und einem pH-Wert von 6,6. Bei einem pH-Wert von 1,3 kommt etwa ein Eisen-Ion auf zwei Lipide.

6.3 Diskussion

Eisen-Ionen binden sehr stark an negativ geladene Lipide wie TMCL. Kleinste Eisen-Ionen Konzentrationen größer oder gleich 1 µmol L^{-1} führen zu einer vollständigen Verfestigung der Lipidmonoschicht. Andere divalente Kationen z.B. Ca^{2+}, Mg^{2+} binden auch direkt an die Phosphatgruppe und haben ebenfalls einen kondensierten Effekt auf eine negativ geladene Monoschicht. [DeSimone 1978, Lösche 1985, Garidel 2005] Bei einer $CaCl_2$ Lösung mit der Konzentration von 1 mmol L^{-1} ist der Koexistenzbereich von TMCL (bei 25°C) vollständig verschwunden. Wird die Temperatur jedoch erhöht, ist der Koexistenzbereich wieder zu beobachten. Es findet wieder ein Phasenübergang von flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert statt. (siehe Anhang Abb. 10.5)
Der Unterschied von Fe^{2+} und Fe^{3+} zu den divalenten Kationen wie z.B. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} etc. ist jedoch, dass die Monoschicht durch Eisen-Ionen (bei millimolaren

Konzentrationen) so verfestigt wird, dass keine Phasenübergänge durch komprimieren, expandieren oder durch Temperaturveränderungen mehr stattfinden. Die TMCL Monoschicht befindet sich unabhängig von Druck und Temperatur immer in der festen Phase. Dies bedeutet, dass die elektrostatische Wechselwirkung von Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen zu der negativ geladenen TMCL Monoschicht entweder viel größer ist im Vergleich zu Ca^{2+} Ionen oder, dass die Eisen-Ionen Komplexverbindungen mit den Lipiden eingehen.

Ab einer Fe(II)SO_4 Konzentration von 0,1 µmol L^{-1} findet wieder ein Phasenübergang statt. Der Übergangsdruck ist jedoch erniedrigt und liegt bei 2,5 mN m^{-1}. Die Größe und Form der Domänen entspricht der auf Reinstwasser. Die Konzentration der Eisen-Ionen reicht anscheinend nicht mehr aus, um die Monoschicht zu verfestigen. Um zu überprüfen, wieviele Eisen-Ionen zur negativ geladene Monoschicht diffundieren und an diese theoretisch binden, wurde die Gleichung VI-6 des zweiten Fick'schen Gesetz nach Crank J. genutzt. Die Randbedingungen sind:

- ein konstanter Diffusionskoeffizient D
- eine konstante Konzentration der negativ geladenen Lipide (der Oberfläche)
- eine unendliche Bulkkonzentration (Fe^{2+} Ionen) c_0.

$$\Gamma = 2c_0\sqrt{\frac{D_{Fe^{2+}} \times t}{\pi}} \qquad \textbf{(VI-6)}$$

Γ ist die Belegungsdichte auf der Oberfläche in mol/m^2. Die Bulkkonzentration ist c_0 und t ist die Diffusionszeit. Der Diffusionskoeffizient D ist 7,19x10^{-10} m^2/s für ½ Fe^{2+} bei 25 °C. [Haynes 2010] Um die Anzahl der Eisen-Ionen zu berechnen, die innerhalb einer bestimmten Zeit an einem Lipid anbinden, wird die Fläche A eines Lipides aus der Isotherme bestimmt. In der flüssig-kondensierten Phase beträgt diese ungefähr 80 $Å^2$. Das Verhältnis Fe^{2+}/Lipid wird nach Gleichung VI-7 berechnet.

$$N_{Fe^{2+}/lipid} = \Gamma \times N_A \times A \qquad \textbf{(VI-7)}$$

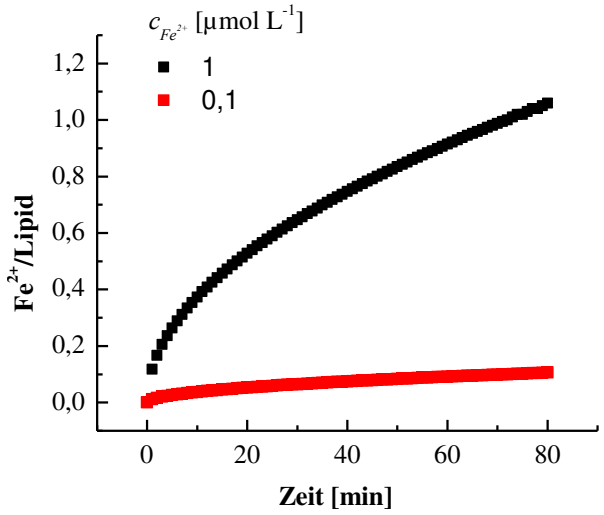


Abb. 6.10 Berechnete Absorption von Fe^{2+} Ionen pro TMCL Lipid in Abhängikeit von der Zeit

Abbildung 6.10 zeigt Anzahl der adsorbierten Fe^{2+} Ionen pro Lipid über die Zeit. Γ ist proportional zur Wurzel aus Zeit. Bei einer Fe^{2+}-Konzentration von 0,1 µmol L^{-1} adsorbiert ein Fe^{2+} Ion auf einer Fläche von 10 Lipiden nach 70 Minuten. Dies beeinflusst schon die Phasenumwandlung. Der Koexistenzbereich wird zu geringeren lateralen Drücken verschoben. Für eine Bildung der festen Phase reicht dies nicht (siehe Abb.6.5).

Nimmt die Eisen-Ionen Konzentration der Volumen-Phase zu, so steigt auch die Menge der absorbierte Eisen-Ionen an die Monoschicht, da Γ proportional c_0. Bei einer Fe^{2+} Konzentration von µmol L^{-1} absorbiert ein Fe^{2+} Ion an einem Lipid nach 70 Minuten. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit dem berechneten Ergebniss aus der Röntgenreflexion (bei pH-Wert = 6,6).

Da TMCL bei pH = 7 mindestens eine negative Ladung besizt, kann ein Eisen Ion zwei negative Lipide verbinden. Die negativ geladene TMCL Monoschicht kann somit schon bei einer Fe(II)SO_4 Konzentration von 1 µmol L^{-1} irreversibel verfestigt werden.

Viele Studien haben gezeigt, dass der pH-Wert der Lösung ein wichtiger Bindungsfaktor ist. Dieser beeinflusst zum einen die Spezies der Eisen-Ionen in der Lösung sowie die Ladungsdichte der Carboxyl- und der Phosphatgruppen von Lipidmonoschichten. [Wang 2012]

Der niedrige pH-Wert hat in unserem Fall zwei große Auswirkungen.

1. TMCL hat zwei pK_a-Werte. Der Erste liegt bei $pK_a = 2,8$ und der zweite liegt in der Nähe des physiologischen pH-Wertes. Dies bedeutet, dass TMCL vollständig protoniert vorliegt.
2. Bei einem pH-Wert von 1,3 wird die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} (siehe GleichungVI-8) sowie die nachfolgenden Protolyse Reaktionen verhindert (siehe Gleichungen VI-9 bis VI-12). Die Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen liegen zum größten Teil als Hexaaquaeisen(II)komplexe $Fe(H_2O)_6^{2+}$ bzw. Hexaaquaeisen(III)-komplexe $Fe(H_2O)_6^{3+}$ vor.

$$4Fe^{2+} + O_2 + (4+2x)H_2O \leftrightarrow 2Fe_2O_3 \cdot xH_2O + 8H^+ \qquad \textbf{(VI-8)}$$

$$[Fe(H_2O)_6]^{3+} + H_2O \leftrightarrows [Fe(H_2O)_5OH]^{2+} + H_3O^+ \qquad pK_{S1} = 2,2 \qquad \textbf{(VI-9)}$$

$$[Fe(H_2O)_5(OH)]^{2+} + H_2O \leftrightarrows [Fe(H_2O)_4(OH)_2]^{+} + H_3O^+ \qquad pK_{S2} = 3,5 \qquad \textbf{(VI-10)}$$

$$[Fe(H_2O)_4(OH)_2]^{+} + H_2O \leftrightarrows [Fe(H_2O)_3(OH)_3] + H_3O^+ \qquad pK_{S3} = 6,0 \qquad \textbf{(VI-11)}$$

$$[Fe(H_2O)_3(OH)_3] = Fe(OH)_3 \cdot aq \qquad \textbf{(VI-12)}$$

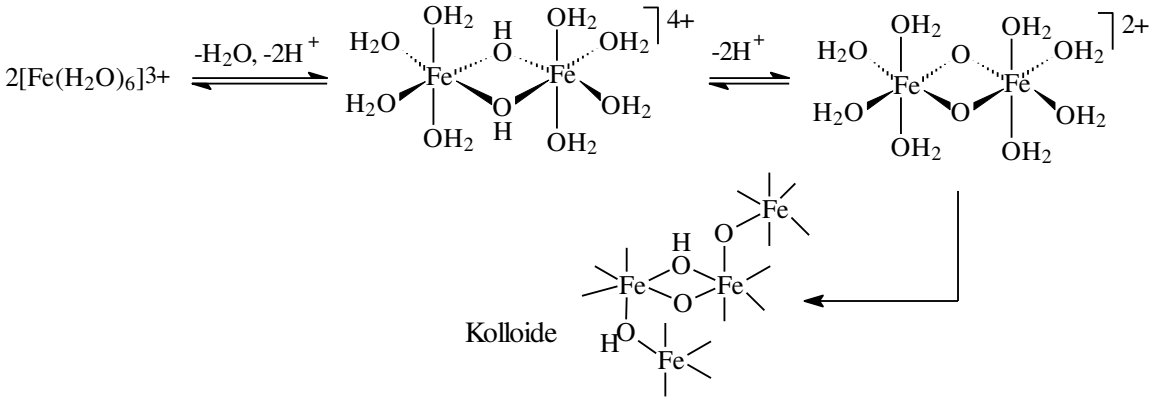


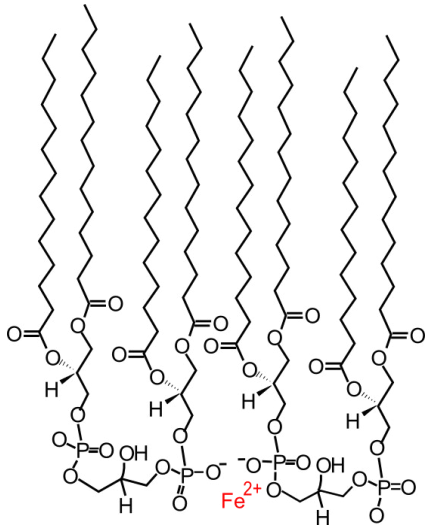
Abb. 6.11 Kondensationsreaktion von Fe^{3+}-Ionen in wässriger Lösung, entnommen aus [Rehder 2007]

Durch Verringerung des pH-Wertes (pH=1,3) werden die Phosphatgruppen der TMCL Monoschicht vollständig protoniert, wodurch die Oberflächenladungsdichte und damit die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Lipid und Kation abnimmt. Außerdem nimmt die Konkurrenz zwischen der Anbindung von Wasserstoff- und Eisen-Ionen an die Phosphatgruppe zu. Die Berechnungen aus den Röntgenreflexionsdaten ergeben, dass bei einem pH-Wert von 1,3 nur ein Eisen-Ion auf zwei TMCL Lipide kommt. Eine irreversible Verfestigung der TMCL Monoschicht auf einer 1 µmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4 Lösung wird so verhindert (siehe Abb. 6.7, 6.8). Ist die Eisen-Ionen Konzentration größer als 1 µmol L^{-1} binden aufgrund des Massenwirkungsgesetzes mehr Eisen-Ionen an. Die Monoschicht wird dadurch verfestigt.

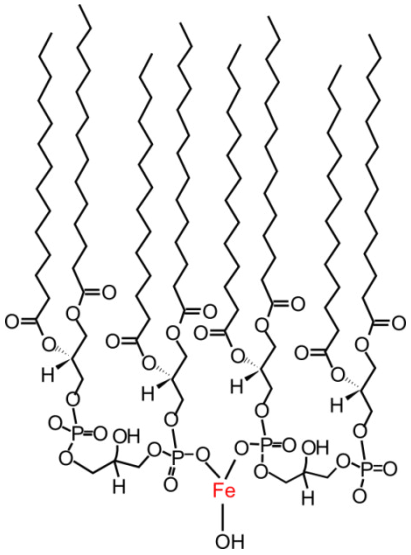
In Abbildung 6.7 ist ebenfalls zu sehen, dass Fe^{3+}-Ionen stärker anbinden als Fe^{2+}-Ionen (pH=1,5). Dies ist damit zu erklären, dass die Wechselwirkung zwischen Lipid und Kation mit zunehmender Ladung des Kations größer wird.

Liegt der pH-Wert zwischen 3 und 6, wie die meisten Experimente in dieser Arbeit, wird ein Teil der Fe^{2+}- zu Fe^{3+}-Ionen oxidiert und die Protolyse Reaktionen (Gleichung VI-9 bis VI-12) und Kondensationsreaktionen (Abb. 6.11) laufen ab. Daher sind neben $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ und $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$ auch $[Fe(H_2O)_5OH]^{2+}$, $[Fe(H_2O)_4(OH)_2]^{+}$ Komplexe sowie positiv geladene Oxo- und Hydroxo- verbrückte Aggregate in Lösung. [Stefánsson 2007, Wang 2012] Diese Komplexe und Aggregate sind positiv geladen und können somit an die negativ geladenen Lipide binden. Aufgrund der sehr starken Verfestigung der Monoschicht, kann davon ausgegangen werden, dass mehrere Lipide durch einen mehrfach geladenen Eisen-Komplex bzw. durch geladene Eisenaggregate miteinander verbunden werden. Ob diese Bindung chemischer oder elektrostatischer Natur ist, kann nicht gesagt werden. Die Festigkeit der Monoschicht spricht jedoch eher für eine chemische Bindung. Mögliche Bindungsszenarien sind in Abbildung 6.12 dargestellt. Bild a) zeigt die Anbindung von Hexaaquaeisenkomplexe $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ an zwei TMCL Moleküle. Diese Bindung beruht auf elektrostatische Wechselwirkungen. Bild b) zeigt eine mögliche Bindung von $[Fe(H_2O)_5OH]^{2+}$ an zwei Phosphatgruppen. Eine andere Möglichkeit wäre die Vernetzung von TMCL Lipiden durch Kondensationsreaktionen entstandene Eisenaggregate (Bild c). Die Bindungen im Bild b und c sind chemische Bindungen.

a)



b)



c)

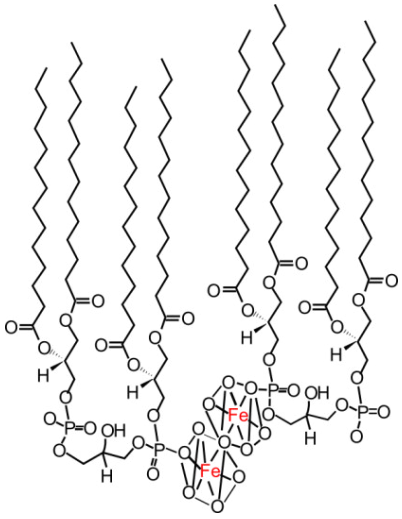


Abb. 6.12 Mögliche Eisenanbindungen: a) elektrostatische Anbindung eines $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ Ions an zwei Phosphatgruppen, b) Bindung eines $[Fe(H_2O)_5OH]^{2+}$ an zwei Phosphatgruppen, c) Bindungen mehrerer FeO_6 Oktaeder, die Sauerstoffatome können durch Hydroxylgruppen oder Wassermoleküle ausgetauscht werden, teilweise entnommen und verändert aus [Wang 2012]

6.4 Zusammenfassung

Eisen-Ionen können sehr stark an negativ geladene Lipide wie TMCL binden und die Monoschicht vollständig verfestigen. Es findet kein Phasenübergang durch Komprimieren, Expandieren oder durch Veränderung der Temperatur mehr statt.
Diese Verfestigung der TMCL-Monoschicht konnte bis zu einer Fe^{2+}-Konzentration von 1 µmol L^{-1} beobachtet werden. Bei dieser Konzentration und einem pH-Wert von 6,6 kommt ca. ein Eisen-Ion auf ein Lipid, wie theoretische Berechnungen auf Grundlage des zweiten Fick'schen Gesetzes sowie Berechnungen aus den gemessenen Röntgenreflexionsdaten zeigen. Bei physiologischem pH-Wert hat TMCL mindestens eine negative Ladung. Mehrwertige Eisen-Ionen bzw. deren Komplexe oder Aggregate können in Bezug der Ladungskompensierung zwei TMCL Lipide verbinden, wodurch die Monoschicht fest wird.
Ein Eisen Ion auf zehn Lipide reicht nicht aus, um die Monoschicht zu verfestigen. Daher ist bei einer $Fe(II)SO_4$ -Konzentration von 0,1 µmol L^{-1} wieder ein Phasenübergang zu beobachten. Aufgrund des wurzelförmigen Verlaufs, nimmt die Belegungsdichte (bei 0,1 µmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$) nur unwesentlich mit der Zeit zu. Ein geringeren Einfluss auf die Phasenumwandlung kann dennoch beobachtet werden. Der Koexistenzbereich wird zu geringeren lateralen Drücken verschoben.
Der pH-Wert ist ein entscheidender Parameter, der die Festigkeit der Monoschicht bei Anbindung von Eisen-Ionen beeinflussen kann. Bei kleinen pH-Werten kann eine Verfestigung der Monoschicht verhindert werden. Durch Verringerung des pH-Wertes (pH=1,3) werden die Phosphatgruppen der TMCL Monoschicht vollständig protoniert, wodurch die Oberflächenladungsdichte und damit die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Lipid und Kation abnimmt. Außerdem nimmt die Konkurrenz zwischen der Anbindung von Wasserstoff- und Eisen-Ionen an die Phosphatgruppe zu. Die Bindung zwischen Eisen-Ionen und Lipiden bei einem pH-Wert von 1,3 beruht dann hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen (ähnlich wie bei Ca^{2+} Ionen). Bei höheren pH-Werten wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert. Dadurch entstehen Fe^{3+}-Komplexe, Oxo- und Hydroxo- verbrückte Aggregate die an die Lipide chemisch binden, womit die starke Verfestigung zu erklären ist.

VII Einfluss von unbehandeltem und zersetztem Wasserstoffperoxid auf die Phasenumwandlung einer negativ geladenen Monoschicht am Beispiel von TMCL

In diesem Kapitel wird der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf TMCL untersucht, da die verwendete Wasserstoffperoxid Lösung (Perhydrol®, Merck) Spuren von Metallionen (im mikromolaren Bereich) enthält. Wie man im vorherigen Kapitel gesehen hat, haben geringste Eisen-Ionen Konzentration Auswirkungen auf den Phasenübergang von negativ geladenen Lipiden. Eine Eisen-Ionen Konzentration von einem Mikromolar führt zur vollständigen Verfestigung der negativ geladenen Monoschicht bei einem physiologischen pH-Wert.

7.1 Isotherme

Abbildung 7.1 zeigt die Druck/Flächen Isothermen von TMCL auf unterschiedlich konzentrierten Wasserstoffperoxid Lösungen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Koexistenzbereich zu niedrigen lateralen Übergangsdrücken verschoben wird, wenn die H_2O_2 Konzentrationen größer als 0,5 mol L^{-1} ist. Ab einer H_2O_2 -Konzentration von 2 mol L^{-1} ist kein Phasenübergang von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase zu beobachten.

Befindet sich hingegen eine TMCL Monoschicht auf einer 0,5 mol L^{-1} konzentrierten H_2O_2-Lösung, die vorher durch ein Platinnetz und anschließender UV-Bestrahlung vollständig zersetzt wurde, verschwindet der Koexistenzbereich (siehe Abb. 7.2, links). Ein Phasenübergang von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase findet nicht statt. Erst bei Temperaturerhöhung ist ein Phasenübergang erster Ordnung wieder zu erkennen. Temperaturerhöhungen führen zu einem Anstieg des Koexistentbereichs zu höheren lateralen Drücken (siehe Abb. 7.2, rechts). Führt man das gleiche Experiment mit einer zersetzten Wasserstoffperoxid Lösung mit einer Konzentration von 0,25 mol L^{-1} durch, verschiebt sich der Koexistenzbereich zu einem niedrigen lateralen Druck. Ein Phasenübergang erster Ordnung ist weiterhin deutlich zu erkennen. Der Druckanstieg, der für die flüssig-expandierte Phase typisch ist, verschiebt sich zu kleineren molekularen Flächen. Temperaturerhöhungen führen ebenfalls zu einem Anstieg des Koexistentbereichs zu höheren lateralen Drücken.

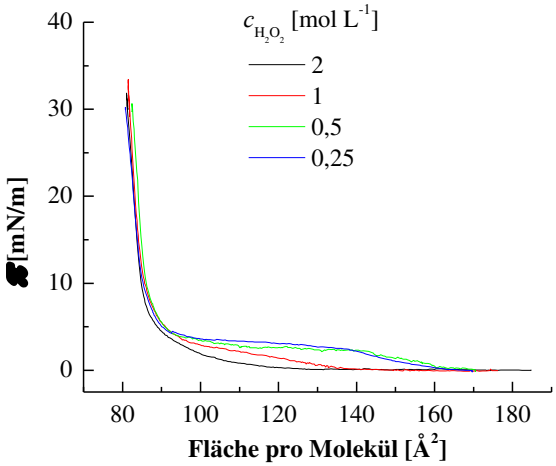


Abb. 7.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen auf die Isothermen von TMCL (bei 25 °C). Mit Zunahme der H_2O_2-Konzentration verschiebt sich der Koexistenzbereich zu niedrigen lateralen Drücken. Ab einer 2 molaren Wasserstoffperoxid-Lösung ist kein Phasenübergang 1. Ordnung zu beobachten.

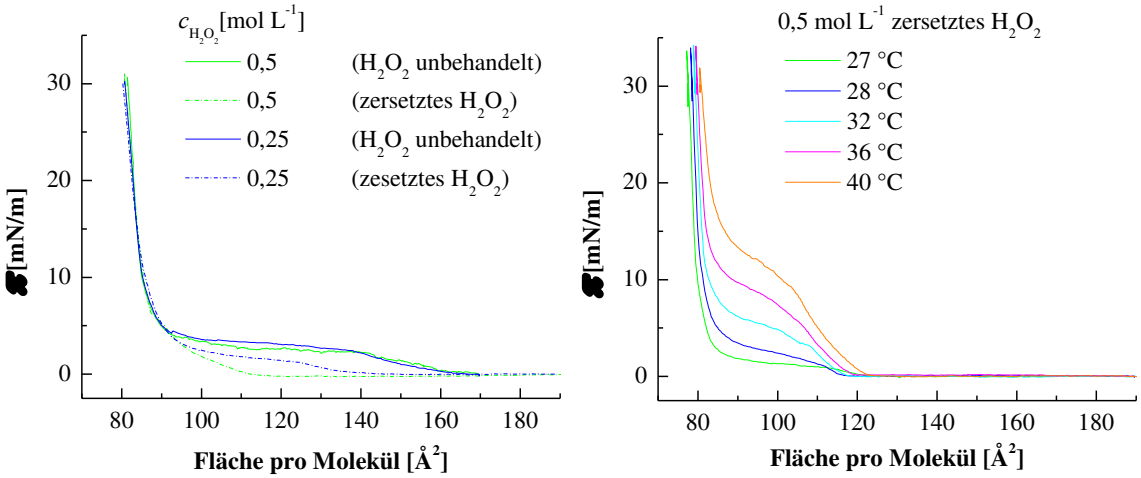


Abb. 7.2 Links: TMCL Isothermen auf unbehandelten (durchgezogene Linie) und auf zersetzten Wasserstoffperoxid-Lösungen (gestrichelte Linien) bei 25 °C. Wasserstoffperoxid wurde katalytisch an einem Platinnetz und anschließender UV-Bestrahlung zersetzt. Rechts: Isothermen von TMCL auf einer 0,5 mol L^{-1} zersetzten Wasserstoffperoxid. Mit zunehmender Temperatur findet ein Phasenübergang von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase wieder statt. Der Koexistenzbereich verschiebt sich mit zunehmender Temperatur zu höheren lateralen Drücken.

7.2 Röntgenreflexion

Für die Röntgenreflexionsmessungen befindet sich die TMCL-Monoschicht auf einer wässrigen Subphase. Die Subphase ist eine 2 molare Wasserstoffperoxid-Lösung. Diese wurde katalytisch mit einem Platinnetz zersetzt. Die Monoschicht wird bis zu einem lateralen Druck von 20 mN m^{-1} komprimiert (siehe Inset, Abb.7.3, rote Isotherme). Anschließend wird die Röntgenreflektivität gemessen (Abb.7.3, rechts, rot). Zum Vergleich wurde eine Röntgenreflexionsmessung von TMCL auf Reinstwasser bei 40 mN m^{-1} durchgeführt (Abb. 7.3, rechts, schwarz). Die Reflexionsmessungen sind typisch für Phospholipidmonoschichten. Die reflektierte Intensität steigt mit q_z, bis ein erstes Maximum erreicht ist. Danach folgt ein Minimum aus dessen Position die Dicke der Monoschicht bestimmt werden kann (siehe Kapitel 2.9.4.1). Weiterhin erkennt man ein zweites ausgeprägtes Maximum. Die Intensität der Maxima ist bei TMCL auf zersetzten H_2O_2 größer im Vergleich zu Reinstwasser. Die q_z-Position des Minimums und des zweiten Maximums sind annähernd gleich, was auf eine gleichbleibende Schichtdicke hinweist. Für die Datenanalyse wurde ein zwei Box-Model für Phospholipidmonoschichten genutzt. Eine Box für den hydrophoben Teil mit einer geringen Elektronendichte und eine Box für die hydrophile Kopfgruppe mit hoher Elektronendichte. Die hohe Elektronendichte ist auf die Phosphatgruppe zurückzuführen. [Helm 1987, Dyck 2005]

Das Elektronendichteprofil (Abb. 7.3, rechts) zeigt, dass die Größe der TMCL Kopfgruppe gleich bleibt, während die Elektronendichte der Kopfgruppe zunimmt. Die Dicke und die Elektronendichte der hydrophoben Ketten bleiben unverändert. Die Elektronendichte nimmt aufgrund der Anbindung von mehrfach geladenen Kationen wie z.B. Eisen-, Kupfer-, Bismut-, Cadmium-, Titanium Ionen etc. zu.

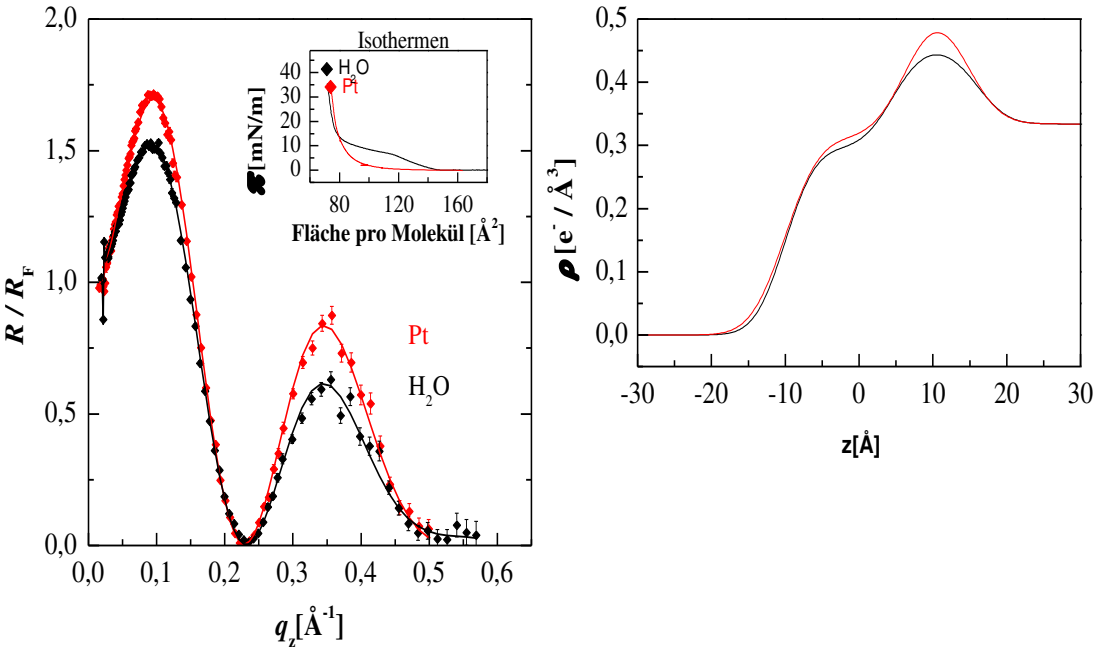


Abb. 7.3 Links: Normierte Röntgenreflektivität einer TMCL Monoschicht auf Reinstwasser (bei 41 mN m^{-1}, schwarz) und auf einer durch Platin zersetzten 2 molaren Wasserstoffperoxid-Lösung (bei 31 mN m^{-1}, rot) bei 25 °C. Die Isothermen sowie der laterale Druck, bei dem die Messungen durchgeführt wurden, sind im Inset abgebildet. Rechts: Das Elektronendichteprofil zeigt die unveränderte hydrophobe Region sowie die Kopfgruppe, bei der die Elektronendichte etwas zunimmt. Zwischen der hydrophoben (Alkylketten) und hydrophilen (Kopfgruppe) Grenzfläche wird z = 0 gesetzt.

7.3 Diskussion

Wie man in Abbildung 7.1 und 7.2 sehen kann, hat die verwendete Wasserstoffperoxid-Lösung einen Einfluss auf die Phasenumwandlung der negativ geladenen TMCL Monoschicht. Der Koexistenzbereich verschiebt sich mit zunehmender Wasserstoffperoxid-Konzentration zu kleineren lateralen Drücken. Ab einer zwei molaren Lösung findet kein Phasenübergang, von flüssig-expandierter zur flüssig-kondensierter Phase mehr statt. Die Wasserstoffperoxid-Lösung hat einen kondensierenden Einfluss auf die TMCL Monoschicht. Wird die Wasserstoffperoxid-Lösung durch Platin katalytisch oder durch UV-Bestrahlung homolytisch zersetzt, ist der kondensierende Effekt der Lösung noch stärker. Eine zersetzte 0,5 molare Wasserstoffperoxid-Lösung als Subphase führt zur Verfestigung der TMCL Monoschicht bei 25 °C. Dies ist jedoch keine irreversible Verfestigung. Anstelle eines Übergangs von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase, findet ein

Phasenübergang von der gas-analogen zur flüssig-kondensierter Phase statt. Durch Temperaturerhöhung kehrt der Koexistenzbereich zurück, der für den Phasenübergang flüssig-expandiert/flüssig-kondensiert charakteristisch ist. Die Ursache für das Kondensieren der TMCL Monoschicht ist höchstwahrscheinlich das Vorhandensein von mehrwertigen Metallionen in der Wasserstoffperoxid-Lösung. Der Hersteller (Merck) gibt z.B. Ionen Konzentrationen von Aluminium, Calcium, Cadmium, Kupfer, Eisen, Magnesium usw. an. Die einzelnen Konzentrationen liegen bei der verwendeten 30% igen (ca. 9,8 mol L^{-1}) Wasserstoffperoxid-Lösung zwischen 0,1 bis 5 µmol L^{-1}. Damit diese Metallionen nicht als Katalysator fungieren, sind diese in Komplexen gebunden, die sogenannten Stabilisatoren. Welche Komplexe dies genau sind ist nicht bekannt (Herstellergeheimnis). Wird dieses Wasserstoffperoxid katalytisch oder homolytisch zersetzt, entstehen Hydroxyl-Radikale. Diese können die Stabilisatoren zerstören, wodurch „freie“ Metallionen entstehen, die an die negativ geladenen Lipide binden können. Im Kapitel VI wurde gezeigt, dass mehrwertige Metallionen, im mikromolaren Bereich, negativ geladene Monoschichten wie z.B. TMCL verfestigen können. In einer 0,5 molaren Wasserstoffperoxid-Lösung befinden mehrwertige Kationen mit einer Konzentration von ca. 0,7 µmol L^{-1}. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine zersetzte 0,5 molare Wasserstoffperoxid-Lösung die negativ geladenen TMCL Monoschicht verfestigt. In zersetzten 0,25 molaren Wasserstoffperoxid-Lösungen ist die Konzentration an mehrwertigen Kationen zu gering, um die Monoschicht zu verfestigen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit denen aus Kapitel VI.

Zukünftige Experimente, bei denen das Anbinden von Kationen nicht erwünscht ist, sollten daher entweder mit Wasserstoffperoxid Konzentrationen durchgeführt werden, bei denen die Gesamtkonzentration der Kationen geringer als 0,1 µmol L^{-1} ist oder man arbeitet mit zusätzlichen EDTA.

7.4 Zusammenfassung

Die verwendete Wasserstoffperoxid-Lösung hat einen kondensierenden Effekt auf die negativ geladene TMCL Monoschicht. Dieser Effekt ist umso größer, je höher die H_2O_2 Konzentration ist. Ab einer zwei molaren Wasserstoffperoxid-Lösung ist kein Phasenübergang durch Kompression, Expansion oder Temperaturerhöhung mehr zu beobachten. Die Monoschicht befindet sich in einer stabilen festen Phase. Die Ursache für die Verfestigung der TMCL Monoschicht ist das Vorhanden sein von mehrwertigen Metallionen in der Wasserstoffperoxid-Lösung. Diese sind in Komplexverbindungen gebunden, sogenannten Stabilisatoren.

Bei der katalytischen bzw. homolytischen Zersetzung von H_2O_2 entstehen Hydroxyl-Radikale. Diese zerstören die Stabilistoren, wodurch „freie“ Metallionen entstehen, die an die negativ geladenen Lipide anbinden. Dies konnte mit Röntgenreflexions-messungen nachgewiesen werden. Selbst bei kleinen H_2O_2-Konzentrationen, die anscheinend keinen Einfluss auf die Phasenumwandlung von TMCL haben, sind nach der katalytischen bzw. homolytischen Zersetzung in der Lage die TMCL Monoschicht vollständig zu verfestigen. Daher sollte die Wasserstoffperoxidkonzentration, bei Experimenten mit negativ geladenen Lipiden, unter 0,25 mol L^{-1} liegen oder man gibt EDTA hinzu, um die freien Kationen abzufangen. Die Verwendung einer reineren Wasserstoffperoxidlösung mit geringeren prozentualen Anteilen von Kationen wäre die bessere und einfachere Variante. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung von Wasserstoffperoxid 30% Suprapur® (Merck, Deutschland).

VIII Radikalangriff auf eine DMPG Monoschicht mit adsorbiertem Polyethylenimin

Die Wechselwirkungen von Polymeren mit Lipid-Monoschichten, Doppelschichten oder Liposomen sind von großem Interesse. Viele Liposomen werden durch das mononukleär-phagozytierendem System (MPS) aus dem Blutkreislauf abgefangen und durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zerstört. [Immordino 2006] Es ist bekannt, dass die Zirkulationszeit in vivo durch Adsorbtion von Polymeren an Liposomen verlängert werden kann. Ebenso wird die Fusion der Liposomen dadurch verhindert. Diese und andere Eigenschaften werden in erster Linie für Drug-Delivery-Systeme erforscht. [Yang 2000] [Torchilin 2001] In diesem Kapitel soll die Wechselwirkung von ROS mit Polyethylenimin (PEI) adsorbiert an eine DMPG-Monoschicht untersucht werden. Die Sauerstoff-radikale werden mit der Fenton-Reaktion erzeugt. Um festzustellen welche Veränderungen die Radikale auf die Monoschicht und auf die adsorbierte PEI-Schicht haben, muss das zu untersuchende System und den Einfluss der einzelnen Komponenten charakterisiert werden.

8.1 Isotherme

Abbildung 8.1 zeigt die Druck/Flächen Isothermen von DMPG Monoschichten auf Reinstwasser (schwarze Linie), auf einer PEI-Lösung (rote Linie), auf einer PEI- und $Fe(II)SO_4$ -Lösung (grüne Linie) sowie PEI mit dem Fenton-Reagenz (blaue Linie). Ebenso ist eine DMPG Isotherme auf einer $Fe(II)SO_4$ Lösung dargestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Subphasenbestandteile sind der Tabelle 8.1 zu entnehmen.

Tabelle 8.1 Konzentrationen der einzelnen Subphasenbestandteile

Subphasen	Konzentrationen [mmol L^{-1}]		
	PEI	$Fe(II)SO_4$	EDTA
Reinstwasser	-	-	-
PEI	2	-	-
PEI und $Fe(II)SO_4$	2	2	-
PEI mit Fenton-Reagenz	2	4	5
$Fe(II)SO_4$	-	1	-

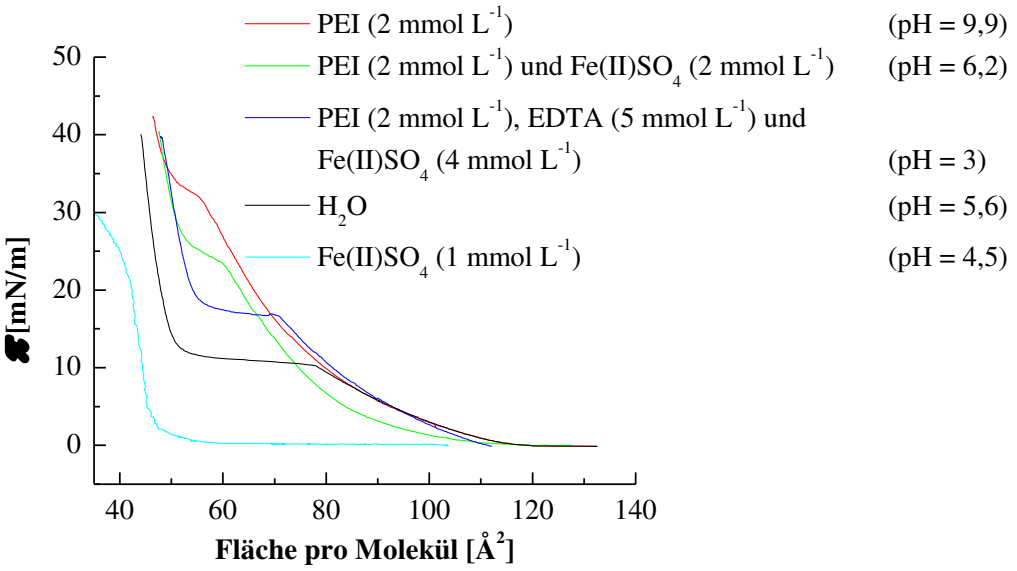


Abb. 8.1 Druck/Flächen Isothermen von DMPG Monoschichten auf Reinstwasser (schwarze Linie), auf einer PEI-Lösung (rote Linie), auf einer PEI Lösung mit $Fe(II)SO_4$ (grüne Linie) sowie PEI mit Fenton-Reagenz (blaue Linie). Die cyan farbige Isotherme ist die von DMPG auf einer $Fe(II)SO_4$–Lösung. Alle Messungen wurden bei 15 °C durchgeführt.

Bei allen Isothermen, ausgenommen DMPG auf einer $Fe(II)SO_4$ Lösung, ist ein Phasenübergang (1. Ordnung) von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase erkennbar, charakterisiert durch ein Koexistenzbereich. Der Übergangsdruck π_c von DMPG auf Reinstwasser liegt bei 10 mN m^{-1}. Befindet sich nur PEI (2 mmol L^{-1}) in der Subphase steigt der Übergangsdruck auf 31,5 mN m^{-1}. Befindet sich $Fe(II)SO_4$ bzw. ein Fenton-Reagenz zusätzlich in der PEI Lösung, nimmt der Übergangsdruck π_c wieder ab. Die Abnahme von π_c ist beim Fenton-Reagenz (17 mN m^{-1}) deutlich größer als bei $Fe(II)SO_4$ (23 mN m^{-1}). Im Vergleich zu DMPG auf Reinstwasser sind beide Übergangsdrücke immer noch höher. Durch Anbindung von PEI an die DMPG Monoschicht ist neben einer Erhöhung des Übergangsdrucks auch eine Zunahme der molekularen Fläche pro Molekül um 4 $Å^2$ in der flüssig-kondensierten Phase zu beobachten. Die Zunahme der molekularen Fläche bleibt in allen drei Fällen konstant und könnte durch das Eindringen von PEI Molekülen in die Monoschicht d.h. zwischen den Lipidmolekülen begründet werden.

Betrachtet man hingegen DMPG auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten $Fe(II)SO_4$ Lösung, stellt man fest, dass kein Phasenübergang stattfindet. Die Monoschicht befindet sich in einer festen Phase (siehe Kapitel VI). Sie kann zu einer kleineren molekularen Fläche pro Molekül bei gleichem Enddruck komprimiert werden. Die Monoschicht geht spätestens bei einem lateralen Druck von 20 mN m^{-1} durch die Kompression in die dritte Dimension. Es ist jedoch zu beachten, dass eine starke Verfestigung der Monoschicht zu unzuverlässigen Druck- und Flächenmessungen führen kann.

Die Hydroxyl-Radikale wurden mithilfe der Fenton-Reaktion erzeugt, um die Wechselwirkung von ROS mit Polyethylenimin (PEI) adsorbiert an eine DMPG-Monoschicht zu untersuchen. Um den Effekt der Radikalattacke zu quantifizieren, wird die Fenton-Konzentration variiert. Die Radikalangriffe werden bei einem lateralen Druck von 40 mN m^{-1} durchgeführt, während die molekulare Fläche konstant gehalten wird.

In Abbildung 8.2 sind die Isothermen vor und nach dem Radikalangriff dargestellt. Das Konzentrationsverhältnis von EDTA:Fe^{2+} war in beiden Experimenten 5:4. Im ersten Experiment (Abb. 8.2, links) war die Fe^{2+} Konzentration 2 mmol L^{-1}. Im zweiten Experiment (Abb. 8.2, rechts) wurde die Fe^{2+} Konzentration auf 4 mmol L^{-1} erhöht. Das Konzentrationsverhältnis Fe^{2+} zu H_2O_2 war 1:5 (links) bzw. 1:16 (rechts). Dementsprechend wird der Radikalangriff des ersten Experiments als „schwacher“ und der andere als „starker“ Angriff bezeichnet. Nach der Injektion von Wasserstoffperoxid wurde circa jede Stunde die Monoschicht expandiert und komprimiert, um Veränderungen des Phasenübergangs über die Zeit zu beobachten. (Übersichtshalber sind nicht alle Isothermen abgebildet.)

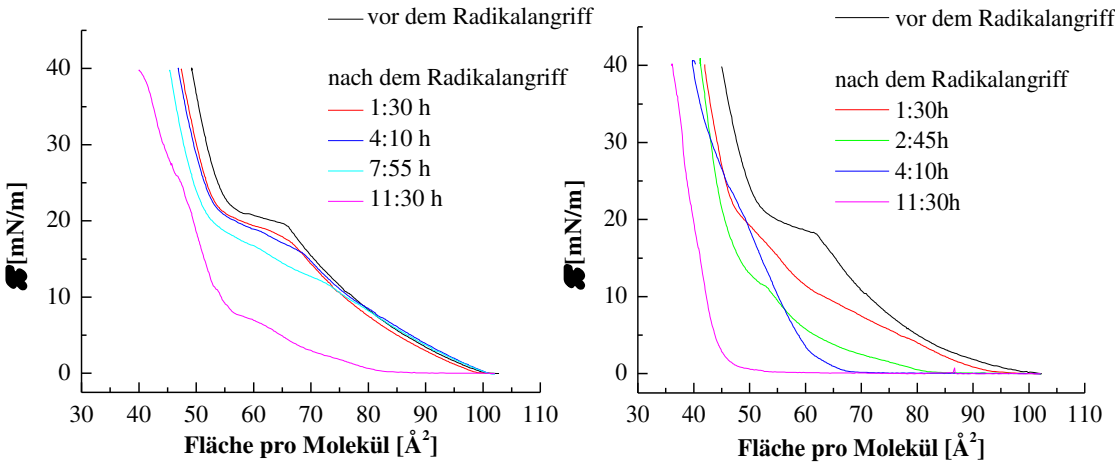


Abb. 8.2 Auswirkungen eines „schwachen“ (links) und eines „starken“ (rechts) Radikalangriff auf eine DMPG Monoschicht mit adsorbierten Polyethylenimin bei 15 °C. Die Subphase des „schwachen“ Radikalangriffs bestand aus PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (2,5 mmol L^{-1}) und Fe(II)SO_4 (2 mmol L^{-1}). Das Verhältnis Fe^{2+}:H_2O_2 war 1:5. Beim „starken“ Radikalangriff bestand die Subphase aus PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und Fe(II)SO_4 (4 mmol L^{-1}). Das Verhältnis Fe^{2+}:H_2O_2 war 1:16. Die DMPG-Monoschicht mit adsorbierten Polyethylenimin wird bis zu einem Druck von 40 mN m^{-1} komprimiert. Bei diesem lateralen Druck wird die molekulare Fläche konstant gehalten und ein Radikalangriff, durch Injektion von H_2O_2, durchgeführt. Nach der Reaktionszeit, wie in der Legende aufgeführt, wurde die Monoschicht anschließend expandiert und komprimiert. Der Übergangsdruck π_c sowie die molekulare Fläche pro Molekül nehmen mit der Zeit ab.

In beiden Fällen nimmt der Übergangsdruck π_c (von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase) sowie die molekulare Fläche pro Molekül mit der Zeit ab. Die größte Abnahme der molekularen Fläche findet in den ersten 90 Minuten statt. Während bei dem „schwachen“ Radikalangriff nach 7 Stunden und 55 Minuten noch ein Phasenübergang zu beobachten ist, ist beim „starken“ Radikalangriff die DMPG Monoschicht nach 4 Stunden und 10 Minuten irreversibel verfestigt. Es findet kein Phasenübergang mehr statt.

Vergleicht man die Abnahme der molekularen Fläche über die Zeit zwischen „schwachem“ und „starkem“ Radikalangriff (siehe Abb. 8.3) erkennt man, dass eine höhere Konzentration des Fenton-Reagenz eine größere Auswirkung auf die molekulare Fläche der Lipide hat. Die Abnahme der molekularen Fläche ist jedoch nur innerhalb der ersten 4 Stunden vergleichbar, da spätestens ab diesem Zeitpunkt die Monoschicht (beim „starken“ Angriff) derart verfestigt ist, dass sie durch Kompression in die dritte Dimension gehoben wird. Es kommt zum Messen von Artefakten, wie Messpunkt 7 (bei 620 min) und Messpunkt 8 (bei 700 min). Die durchschnittliche maximale Abnahme der

molekularen Fläche liegt nach 5 ½ Stunden bei 4 Å^2. Die Verringerung der molekularen Fläche durch den Radikalangriff macht die Flächenzunahme die durch Anbindung von PEI an die DMPG Monoschicht entsteht näherungsweise rückgängig.

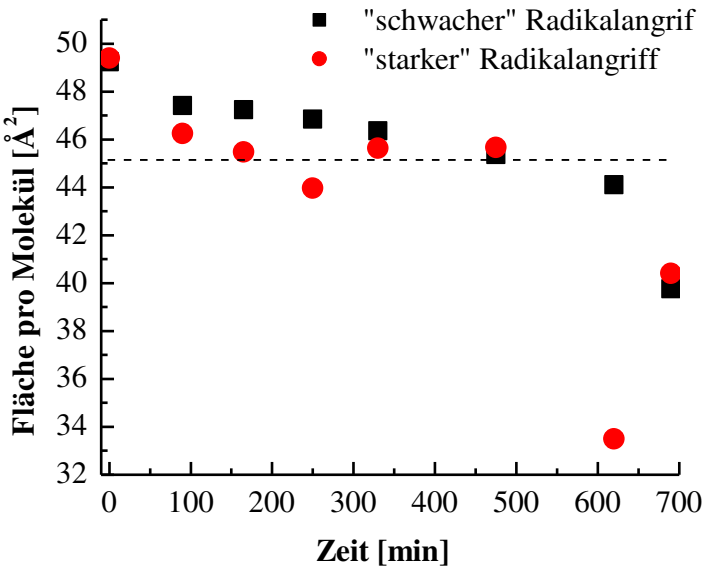


Abb. 8.3 Abnahme der molekularen Fläche über die Zeit (bei 40 mN m^{-1}) durch einen „schwachen“ (schwarze Quadrate) und „starken“ (rote Raute) Radikalangriff .

Die Abbildung 8.4 (links) zeigt einen weiteren „starken“ Radikalangriff auf eine DMPG Monoschicht mit adsorbierten Polyethylenimin. Während des Radikalangriffs wurde die molekulare Fläche konstant gehalten. Erst nach 5 Stunden und 20 Minuten wurde die erste Isotherme nach dem Radikalangriff aufgenommen. Damit ist es möglich die Abnahme des lateralen Drucks zu beobachten, bis sich ein neuer Gleichgewichtswert einstellt. Nach der Injektion von Wasserstoffperoxid nimmt der laterale Druck sehr stark ab. Nach drei bis fünf Stunden hat sich ein neuer Gleichgewichtswert eingestellt (siehe Abb. 8.4 (rechts)). Der Radikalangriff wird damit als beendet angesehen. Alle Daten die später aufgenommen wurden, können erhebliche Messunsicherheiten bzw. Artefakte aufweisen.

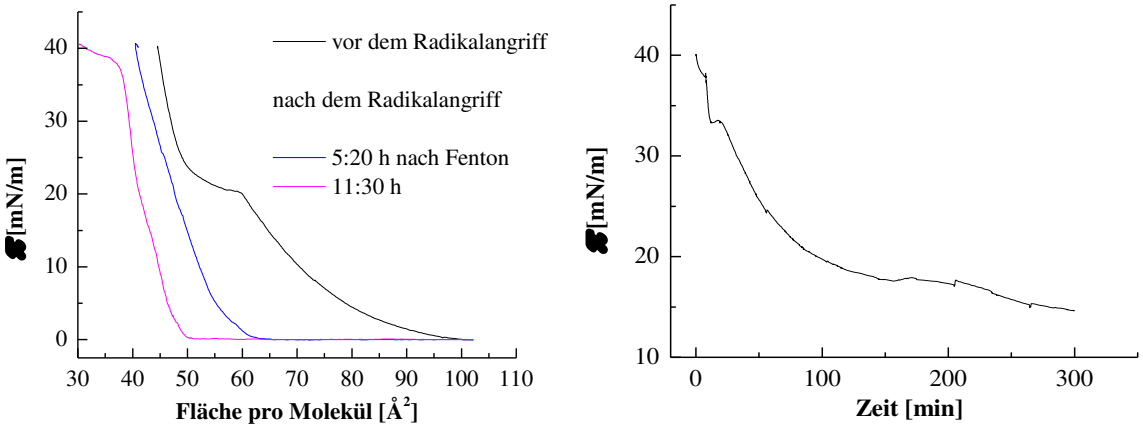


Abb. 8.4 Links: Auswirkungen eines „starken" Radikalangriffs auf eine DMPG Monoschicht mit adsorbierten Polyethylenimin bei 15 °C. Die Subphase bestand aus PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und Fe(II)SO_4 (4 mmol L^{-1}). Das Verhältnis Fe^{2+}:H_2O_2 war 1:16. Die DMPG-Monoschicht mit adsorbierten Polyethylenimin wird bis zu einem Druck von 40 mN m^{-1} komprimiert. Bei diesem lateralen Druck wird die molekulare Fläche konstant gehalten. Der Radikalangriff wird durch Injektion von H_2O_2 durchgeführt. Während des Radikalangriffs wurde die molekulare Fläche konstant gehalten. Nach fünf Stunden und 20 Minuten wurde die Monoschicht vollständig expandiert und komprimiert. Der Übergangsdruck π_c ist nicht mehr beobachtbar. Die molekulare Fläche pro Molekül hat abgenommen. Nach 11 Stunden und 30 Minuten wurde die Monoschicht nochmal expandiert und komprimiert. Es ist zu erkennen, dass die Monoschicht in die dritte Dimension gehoben wird. Rechts: Die Abnahme des lateralen Drucks während des Radikalangriffs. Ein neuer Gleichgewichtswert wird nach drei bis fünf Stunden erreicht. Der Radikalangriff wird damit als beendet angesehen.

8.2 Brewsterwinkel-Mikroskopie

Wie im Abschnitt 8.1 beschrieben, hat PEI mit und ohne Eisen-EDTA-Komplexe Auswirkungen auf den Phasenübergang sowie auf die molekulare Fläche einer DMPG-Monoschicht. Ebenso wurde eine Veränderung des Phasenübergangs und der molekularen Fläche nach dem Radikalangriff beobachtet. Die Brewsterwinkel-Mikroskopie wird genutzt, um Veränderungen und Auswirkungen von PEI mit und ohne Eisen-EDTA-Komplexe sowie die des Radikalangriffs auf makroskopischer Ebene zu untersuchen. Die Abbildung 8.5 zeigt typische DMPG Domänen auf Reinstwasser. Die Bilder A bis C wurden entlang der Isotherme (siehe Abb. 8.5, unten rechts) aufgenommen. Die dazugehörigen Drücke und Flächen sind in der Isotherme markiert.

DMPG bildet auf Wasser nach Ausheilung kreisrunde Domänen. Mit zunehmender Kompression nimmt die Domänengröße zu.

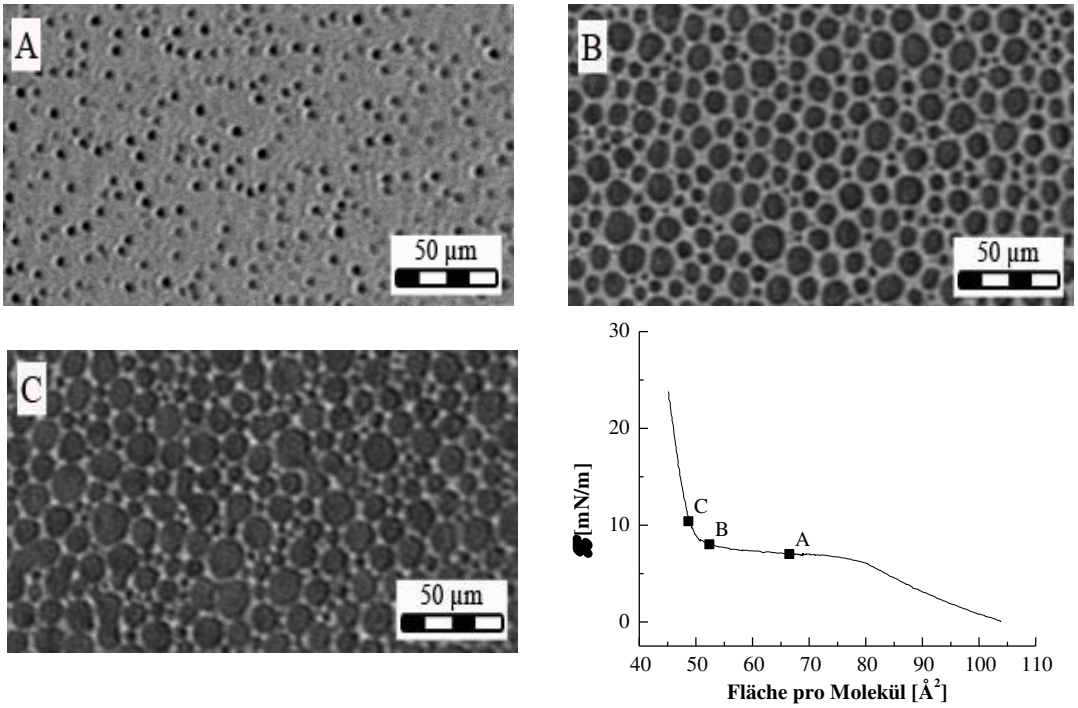


Abb. 8.5 Brewsterwinkel-Mikroskopie einer DMPG Monoschicht auf Reinstwasser entlang der Isotherme bei 15 °C. Die dazugehörigen Drücke und Flächen können aus der Isotherme (unten rechts) entnommen werden.

Befinden sich PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}) in der Subphase, verändert sich der Verlauf der Isotherme (siehe Abb. 8.1) sowie das Aussehen der Domänen (siehe Abb. 8.7). Anfangs erscheint die Form der Domänen rund. Die Größe der Domänen nimmt mit zunehmender Kompression bis zum Punkt B (siehe Abb. 8.6, blaue Isotherme) zu. Danach bleibt die Größe konstant. Die Domänen haben eine bean-shape Form. Zwischen den einzelnen Domänen ist ein auffällig großer Abstand. Bei einem lateralen Druck von 30 mN m^{-1} wäre eigentlich eine kompakte flüssig-kondensierte Monoschicht zu erwarten. Dies legt nahe, dass PEI in die Monoschicht eingelagert ist. Dies würde auch die vergrößerte molekulare Fläche bei 40 mN m^{-1} erklären. Interessant ist ebenfalls, dass die reflektierte Intensität zwischen den Domänen mit der Kompression zu nimmt. Die zunehmende Intensität ist durch eine Veränderung des Brewsterwinkels bedingt.

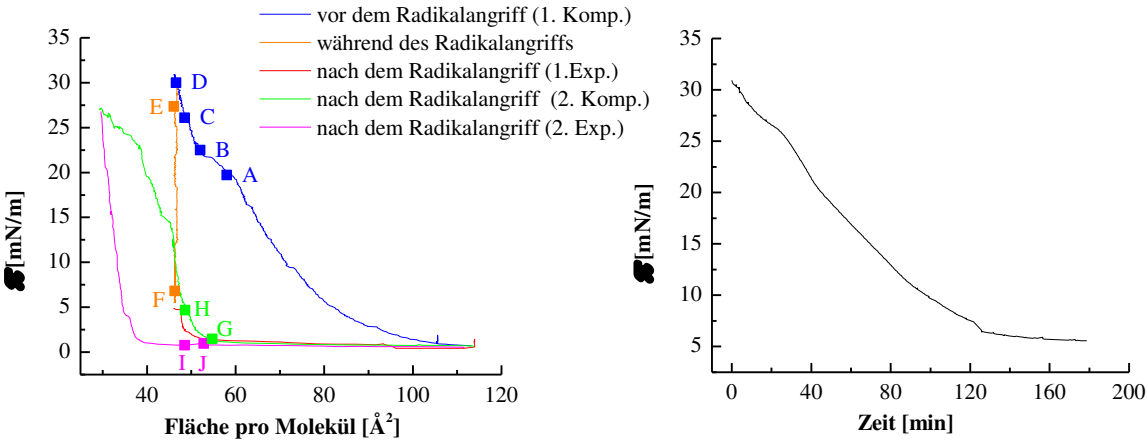
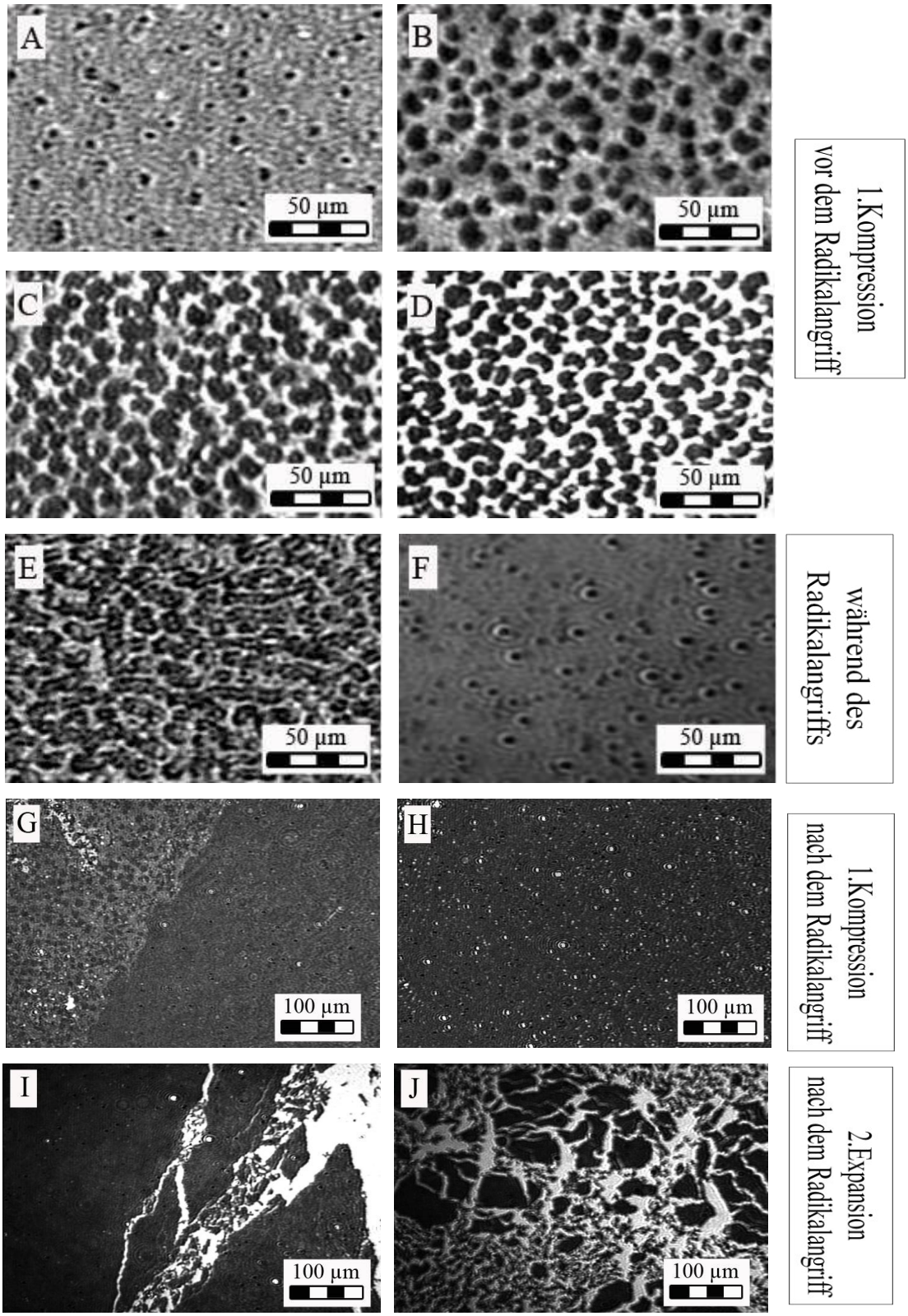


Abb. 8.6 Radikalangriff auf eine DMPG Monoschicht mit adsorbierten PEI. Die Subphase bestand aus PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}). Links: die DMPG Monoschicht wurde bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert. Bei konstanter molekularer Fläche wurde Wasserstoffperoxid unter der Barriere injiziert. Das Verhältnis Fe^{2+}:H_2O_2 war 1:2. Der laterale Druck nimmt ca. 2 Stunden ab, bis sich ein neuer Gleichgewichtsdruck einstellt (rechts). Anschließend wurde die Monoschicht komplett expandiert (rote Linie), wieder komprimiert (grüne Linie) und expandiert (magentafarbene Linie). Die markierten Quadrate A-J zeigen die zugehörigen molekularen Flächen und Drücke bei denen die BAM Bilder (siehe Abb. 8.7) aufgenommen wurden. Rechts: Abnahme des lateralen Drucks mit der Zeit.

Nach der Injektion von Wasserstoffperoxid nimmt der laterale Druck die nächsten zwei bis drei Stunden stark ab, bis sich ein Gleichgewichtsdruck von 6 mN m^{-1} einstellt (siehe Abb. 8.6, rechts). Die molekulare Fläche wird während des Radikalangriffs konstant gehalten. Die reflektierte Intensität nimmt im Verlauf des Radikalangriffs ab (siehe Abb. 8.7 Bild E und F). Es bildet sich eine homogene Monoschicht mit kleinen Domänen. Es kann nicht geklärt werden ob diese Domänen der flüssig-kondensierten Phase oder einer reinen festen Phase zu zuordnen sind. Nach dem Radikalangriff wurde die Monoschicht expandiert (rote Isoterme) und wieder komprimiert (grüne Isotherme). Die Bilder G und H wurden aufgenommen. Bild G zeigt zwei unterschiedliche Zustände der Monoschicht. Zum einen ist die Dichte der Monoschicht extrem hoch, was auf eine verfestigte Monoschicht hinweist. Zum anderen sind einzelne Domänen zu erkennen, die zum Teil durch sehr helle Bereiche umgeben sind (wie vor dem Radikalangriff). Mit weiterer Kompression ist nur noch eine verfestigte Monoschicht zu beobachten, Abb. 8.7 Bild H. Auffällig ist jedoch eine Vielzahl weißer Punkte. Bei einem lateralen Druck von 15 mN m^{-1} wird die Monoschicht in die 3. Dimension gehoben. Dies zeigt die große Abnahme der molekularen Fläche. Nach einer anschließenden Expansion, ist ein Auseinanderbrechen der verfestigten Monoschicht zu beobachten, Abb. 8.7 Bild I und J.



8.7 Brewsterwinkel-Mikroskopie von DMPG auf PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und Fe(II)SO_4 (2 mmol L^{-1}). Die Bilder A-D wurden vor dem Radikalangriff entlang der Isotherme aufgenommen. Die Bilder E und F zeigen die Monoschicht während des Radikalangriffes bei konstanter molekularer Fläche. Bilder G und H wurden während der 2. Kompression und I und J während der 2. Expansion nach dem Radikalangriff aufgenommen. (Die dazugehörigen Isothermen sowie die Drücke und Flächen bei denen die Bilder aufgenommen sind, sind aus Abbildung 8.6 zu entnehmen.)

8.3 Röntgenreflexion

Die Röntgenreflexion wurde durchgeführt, um Informationen über die vertikale Struktur (senkrecht zur Wasseroberfläche) der Monoschicht sowie über die adsorbierte PEI Schicht vor und nach dem Radikalangriff zu erhalten.

In Abbildung 8.8 sind die normierten Reflexionskurven von einer DMPG Monoschicht auf Reinstwasser dargestellt. Diese wurden entlang einer Isotherme aufgenommen. Die dazugehörigen molekularen Flächen und lateralen Drücke sind aus dem Inset zu entnehmen.

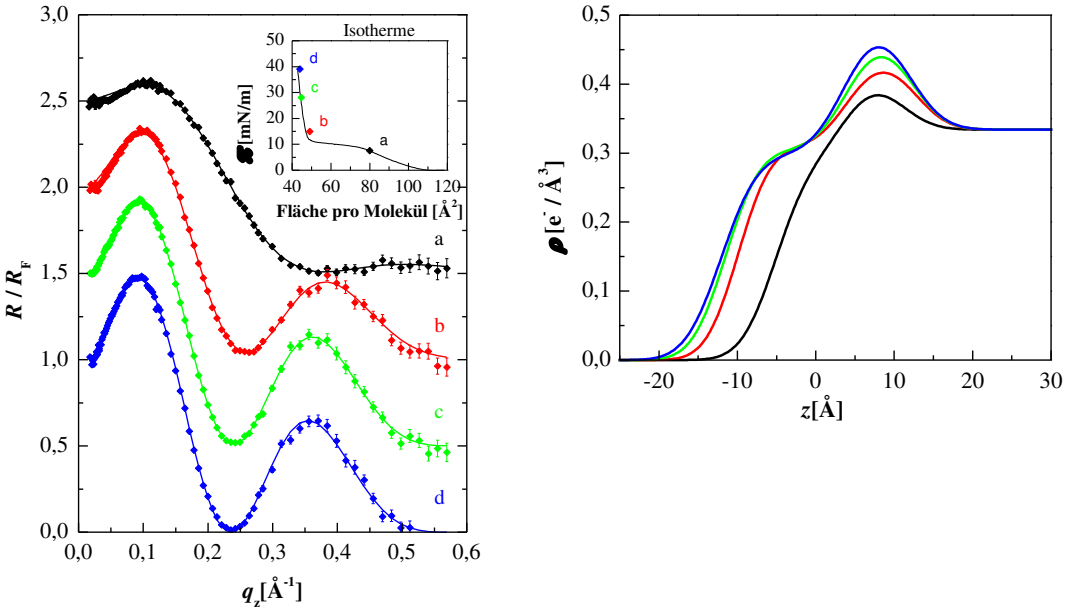


Abb. 8.8 Normierte Röntgenreflektivitäten (links) und die dazugehörigen Elektronendichteprofile (rechts) einer DMPG Monoschicht auf Reinstwasserbei 15 °C. Die Kompressions-Isotherme sowie der laterale Druck, bei dem die Messungen durchgeführt wurden, sind im Inset abgebildet. Die Röntgenreflektivitäten sind für eine bessere Übersicht um je 0,5 R/R_F gegeneinander verschoben. Das Elektronendichteprofil zeigt die Längenzunahme der hydrophoben Region sowie die Kopfgruppe deren Elektronendichte zunimmt. z = 0 wird an der Grenzfläche zwischen den hydrophoben Alkylketten und der hydrophilen Kopfgruppe gesetzt.

Die Reflexionsmessungen sind typisch für Phospholipidmonoschichten. Die reflektierte Intensität steigt mit q_z, bis ein erstes Maximum erreicht ist. Danach folgt ein Minimum aus dessen Position die Dicke der Monoschicht bestimmt werden kann (siehe Kapitel 2.9.4.1).Weiterhin erkennt man ein zweites ausgeprägtes Maximum. Mit zunehmender Kompression steigt die Intensität der zwei Maxima. Ebenfalls verschiebt sich die Position des Minimums und der zwei Maxima zu kleineren q_z-Werten, was auf eine

Schichtdickenzunahme hinweist. Die Schichtdickenzunahme erfolgt durch das Aufrichten der Alkylketten. Die dazugehörigen Elektronendichteprofile sind in Abbildung 8.8 (rechts) dargestellt. Mit zunehmender Kompression nimmt die Elektronendichte der Kopfgruppe zu, was auf Verdrängung von Wassermolekülen schließen lässt. Ebenfalls ist das Aufrichten der Alkylketten durch die Zunahme von l_t (Länge der Alkylkettenbox, siehe Kapitel 2.9.4.1) zu beobachten.

Die in Abbildung 8.9 (links) dargestellten Reflexionskurven wurden aufgenommen, um den Einfluss von einzelnen Bestandteilen der Subphase (PEI, Fe(II)SO_4, EDTA) auf die Monoschicht zu charakterisieren. Rechts sind die dazu gehörigen Elektronendichte-profile dargestellt.
Vergleicht man die Reflektionskurven von DMPG auf Reinstwasser (schwarze Linie) mit DMPG auf PEI (rote-, grüne-, blaue Linie) ist eine Verschiebung der q_z-Position des ersten Maximums zu kleineren Werten zu beobachten, was auf eine Schichtdickenzunahme des zu untersuchenden Systems hinweist. Das positive PEI bindet somit an die negativ geladene DMPG-Monoschicht. Die Dämpfung der Oszillation bzw. die starke Intensitätsabnahme des zweiten Maximums zeigt eine erhöhte Rauigkeit zwischen Kopfgruppe und adsorbierter Schicht. Bei den Messungen mit PEI mit Fe(II)SO_4 bzw. PEI mit dem Fenten-Reagenz in der Subphase ist eine starke Intensitätserhöhung direkt nach dem kritischen Winkel zu beobachten. Am stärksten ist die Intensitätserhöhung bei PEI mit Fe(II)SO_4 (grüne Linie). Die reflektierte Intensität steigt bei kleinen q_z–Werten sehr stark an. Die hohe Reflektivität sowie der hohe Kontrast zwischen PEI und Wasser (im Elektronendichteprofil) können nur durch Bindung von Eisen-Ionen mit ihrer hohen Elektronendichte, mit dem PEI zustande kommen. Wird PEI zu einer EDTA-Eisen-Lösung hinzugeben und diese als Subphase für eine DMPG-Monoschicht verwendet, steigt die reflektierte Intensität bei kleinen q_z–Werten ebenfalls sehr stark an. Mit EDTA nimmt diese aber genauso schnell wieder ab. Es ist ein extrem spitzer Peak auf dem ersten Maximum zu beobachten (blaue Linie).

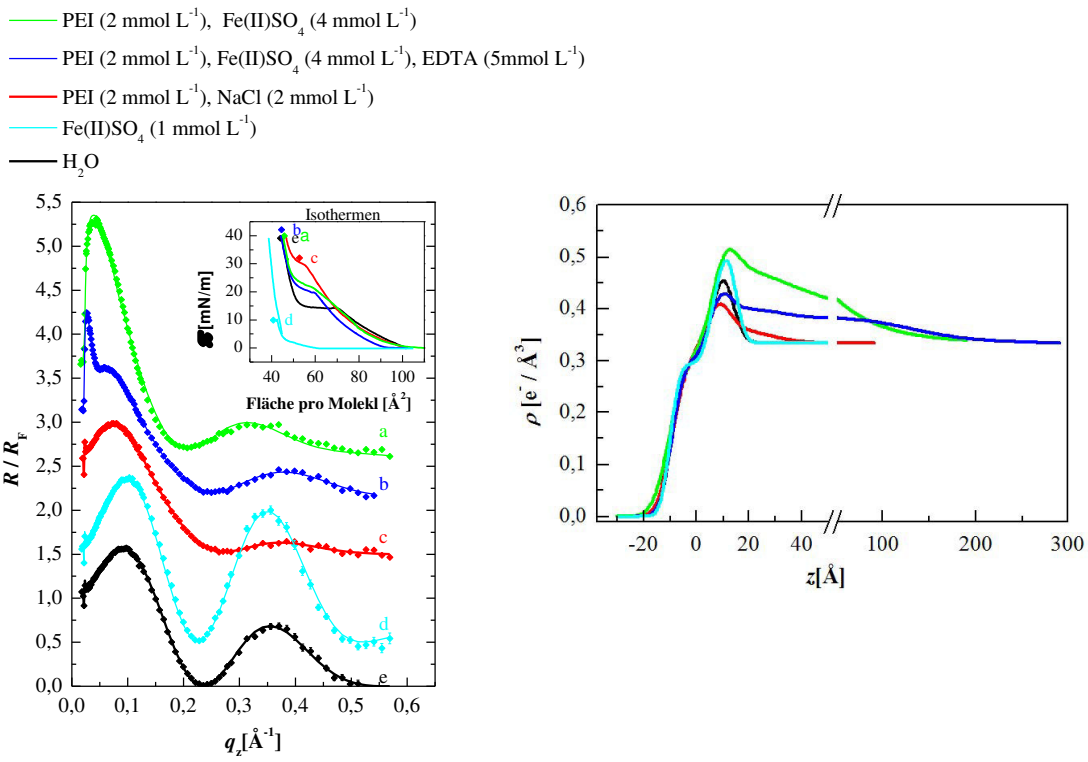


Abb. 8.9 Normierte Röntgenreflektivitäten (links) und die dazugehörigen Elektronendichteprofile (rechts) einer DMPG Monoschicht auf Reinstwasser (schwarze Linie), auf $Fe(II)SO_4$ (1 mmol L^{-1}) (cyan farbige Linie), auf einer PEI (2 mmol L^{-1}) – NaCl (2 mmol L^{-1}) Lösung (rote Linie), auf einer PEI (2 mmol L^{-1}), $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}) - Lösung (grüne Linie) und auf einer PEI (2 mmol L^{-1}), $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) -Lösung (blaue Linie). Die Röntgenreflektivitäten sind für eine bessere Übersicht gegeneinander verschoben. Die Isothermen sowie der laterale Druck und die dazu gehörige molekulare Fläche, bei dem die Messungen durchgeführt wurden (bei 15 °C), sind im Inset abgebildet.

Für die Datenanalyse, von DMPG auf Wasser und DMPG mit Eisen(II)sulfat, wurde das zwei Box-Model für Phospholipidmonoschichten genutzt. Die erste Box ist für die hydrophoben Alkylketten mit einer geringen Elektronendichte. Die Alkylketten haben die gleiche Elektronendichte wie Wasser (ca. 0,3 $e^-/Å^3$). Die zweite Box ist für die hydrophile Kopfgruppe mit hoher Elektronendichte. Diese ist auf die Phosphatgruppe und angebundene Eisen-Ionen zurückzuführen. [Helm 1987, Dyck 2005] Um die Daten von DMPG mit adsorbierter PEI-Schicht (mit NaCl bzw. $Fe(II)SO_4$) analysieren zu können, wurde das zwei Box-Modell um eine dritte Box (für die PEI-Schicht) erweitert. PEI ist aufgrund der leicht erhöhten Elektronendichte von Wasser zu unterscheiden. Die Anbindung von Anionen an das positiv geladene PEI führt ebenfalls zu einer weiteren Erhöhung der Elektronendichte und verstärkt somit den Kontrast zwischen Wasser und

PEI. Die Reflexionskurve von DMPG mit PEI und Fe(II)SO_4 zeigt direkt nach dem kritischen Winkel eine hohe Reflektivität, die dann schnell abnimmt ohne Oszillation. Ein solcher Verlauf der Reflexionskurve kann durch eine exponentielle Abnahme der Elektronendichte zur Subphase hin beschrieben werden. Für die expontielle Modellierung werden nur zwei Parameter benötigt, die Abklinglänge und die anfängliche Elektronendichte. Dazu wird das Profil durch 10 weitere gleich lange Boxen approximiert, die zusammen ein Dreifaches der Abklinglänge überdecken. Die Dichte der einzelnen Boxen wird durch den exponentiellen Abfall bestimmt. Eine Rauhigkeit zwischen den Boxen wird auf die halbe Länge der Einzelbox festgelegt.

Die Datenanalyse zeigt, dass das positive PEI an die negativ geladene DMPG-Monoschicht bindet. Während die Alkylketten von DMPG unverändert bleiben, sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der Elektronendichte der Kopfgruppen und der Dicke der adsorbierten PEI Schicht in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Subphase zu erkennen. Auch die Abnahme der Elektronendichte am Ende der adsorbierten PEI Schicht ist unterschiedlich. Adsorbiert nur PEI oder PEI-EDTA-Fe^{2+} an die DMPG Monoschicht, so kann die Abnahme der Elektronendichte mit einer gaußsche Fehlerfunktion beschrieben werden. Bei Adsorbtion eines PEI-Fe-Komplexan die DMPG Monoschicht nimmt Elektronendichte exponentiell ab.

Bei einer PEI-NaCl-Lösung als Subphase adsorbiert eine ca. 20 Å dicke PEI Schicht. Die Elektronendichte der Kopfgruppe ist kleiner als bei DMPG auf Reinstwasser. Eine Erniedrigung der Elektronendichte der Kopfgruppe ist auch bei einer PEI-EDTA-Fe(II)SO_4 Subphase zu beobachten. Die Dicke der adsorbierten Schicht beträgt 140 Å. Befindet sich PEI und Fe(II)SO_4 in der Subphase (ohne EDTA), ist die Elektronendichte der Kopfgruppe stark erhöht. Die Dicke der adsorbierten Schicht D_{PEI} ergibt sich, aufgrund des exponentiellen Abfalls, aus der doppelten Abklinglänge der Exponentialfunktion. Diese wird aus dem ersten Moment der Verteilung nach Gleichung VIII-1 berechnet [Ahrens 2004]. Die Dicke der adsorbierten Schicht ist somit 100 Å.

$$D_{PEI} = 2\frac{\int_0^\infty z(\rho(z)-\rho_{sub})\mathrm{d}z}{\int_0^\infty (\rho(z)-\rho_{sub})\mathrm{d}z} \qquad \textbf{VIII-1}$$

Bei DMPG mit $Fe(II)SO_4$ ist die Elektronendichte der Kopfgruppe im Vergleich DMPG auf Reinstwasser ebenfalls erhöht.

Tabelle VIII-1 Dicke der adsorbierten PEI Schicht an einer DMPG Monoschicht.

Subphase 2 mM PEI +	Dicke der adsorbierten Schicht
2 mM NaCl	20 Å
4 mM $Fe(II)SO_4$	100 Å
5 mM EDTA, 4 mM $Fe(II)SO_4$	140 Å
5 mM EDTA, 4 mM Cu	36 Å

Für die Röntgenreflexionsmessungen, vor dem Radikalangriff, befindet sich die DMPG-Monoschicht auf einer wässrigen Subphase bestehend aus PEI (2 mmol L^{-1}), $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}) und EDTA (5 mmol L^{-1}). Die Monoschicht wird bis zu einem lateralen Druck von 42 mN m^{-1} komprimiert (siehe Abb. 8.10 Inset, Messpunkt 0). Anschließend wird die Röntgenreflektivität (blaue Linie) gemessen. Danach wird der Radikalangriff durchgeführt. Während des Radikalangriffs wurde die molekulare Fläche konstant gehalten. In diesem Trog fiel der laterale Druck über 10 Stunden. Ein Gleichgewichtsdruck stellte sich nicht ein. Fünf Messungen (a bis b) wurden während des Radikalangriffs aufgenommen (Abb. 8.10, rechts; rot bis grün). Vier Messungen wurden bei kleinen q_z-Werten (bis 0,2 $Å^{-1}$) durchgeführt. Die fünfte Messung b (grün) wurde wieder im Standardreflexionsbereich (q_z bis 0,56 $Å^{-1}$) aufgenommen.
Anschließend wurde die Monoschicht wieder bis 42 mN m^{-1} komprimiert (Abb. 8.10, links; Inset: Punkt c) und eine weitere Röntgenreflexionsmessung durchgeführt (orange). Der molekulare Flächenverlust war 6 $Å^2$ pro Molekül. Danach wurde die Monoschicht komplett expandiert und bis 10 mN m^{-1} komprimiert. Eine letzte Röntgenreflexionsmessung (magenta) wurde durchgeführt (Abb. 8.10 links, Inset: Punkt d).

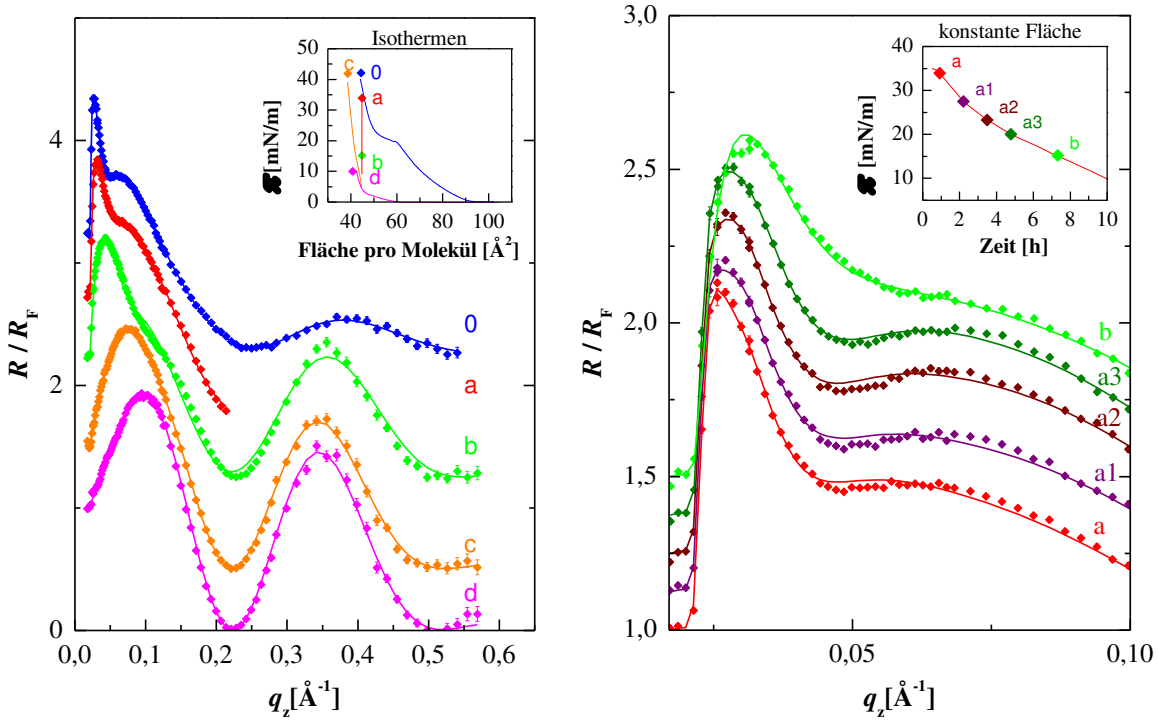


Abb. 8.10 Links: Normierte Röntgenreflektivitäten einer DMPG Monoschicht auf einer PEI (2 mmol L^{-1}), $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1})-Lösung. Die Isothermen sowie der laterale Druck, bei dem die Messungen durchgeführt wurden (15 °C), sind im Inset abgebildet.
Die Monoschicht wurde bis zu einem lateralen Druck von 42 mN m^{-1} komprimiert (blaue Isotherme) und die Messung 0 (blau) aufgenommen. Danach wurde der Radikalangriff durchgeführt. Die molekulare Fläche wurde konstant gehalten. Während des Radikalangriffs nimmt der laterale Druck ab (rote Isotherme). Die Messungen a bei 34 mN m^{-1} (rot) bis Messung b bei 13 mN m^{-1} (grün) wurden durchgeführt. Anschließend wurde die Monoschicht wieder auf 42 mN m^{-1} komprimiert (orange Isotherme) eine weitere Röntgenreflexionsmessung c (orange) wurde aufgenommen. Danach wurde die Monoschicht komplett expandiert und wieder komprimiert (magenta Isotherme). Die Messung d bei 10 mN m^{-1} (magenta) wurde durchgeführt. Für eine bessere Übersicht sind die Messungen gegeneinander verschoben. Rechts: Während des Radikalangriffs wurden drei weitere Reflektionsmessungen (alle 78 min) zwischen Messung a und b bei kleinen q_z-Werten aufgenommen. Die molekulare Fläche wurde während den Messungen konstant gehalten. Die Messungen sind für eine bessere Übersicht um 0,125 R/R_F gegeneinander verschoben.

Vor dem Radikalangriff hat die normierte Reflektionskurve den typischen Verlauf einer DMPG Monoschicht mit adsorbierten Polyethylenimin und Eisen-EDTA-Komplexen. Während des Radikalangriffs wurden Reflexionsmessungen bei kleinen q_z-Werten aufgenommen, um Veränderungen der Schichtdicke (der Adsorbierten PEI-Schicht) über die Zeit zu beobachten (Abb. 8.10, rechts, a bis b). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Peak zu höheren q_z-Werten verschoben wird und die Peakbreite zu nimmt. Dies

ist ein Indiz für die Abnahme der Schichtdicke. Die Peakintensität bleibt konstant. Am Ende des Radikalangriffs (Abb. 8.10, links, Messung b) ist die Intensität des zweiten Maximums deutlich gestiegen.

Nachdem die DMPG Monoschicht anschließend auf 40 mN m^{-1} komprimiert wurde, hat sich das erste Maximum weiter zu größeren q_z-Werten verschoben (Messung c, orange). Die hohe Intensität direkt nach dem kritischen Winkel ist verschwunden. Die typische Reflexionskurve einer Phospholipidmonoschicht bleibt vorhanden.

Die letzte Reflexionskurve (Messung d, magenta) wurde nach einer kompletten Expansion und anschließender Kompression der Monoschicht auf 10 mN m^{-1} aufgenommen. Das erste Maximum verschiebt sich noch einmal zu größeren q_z-Werten. Vergleicht man diese Reflexionskurve mit der von DMPG auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4-Lösung sind keine großen Unterschiede feststellbar. Sie sind fast identisch (siehe Abb. 8.11).

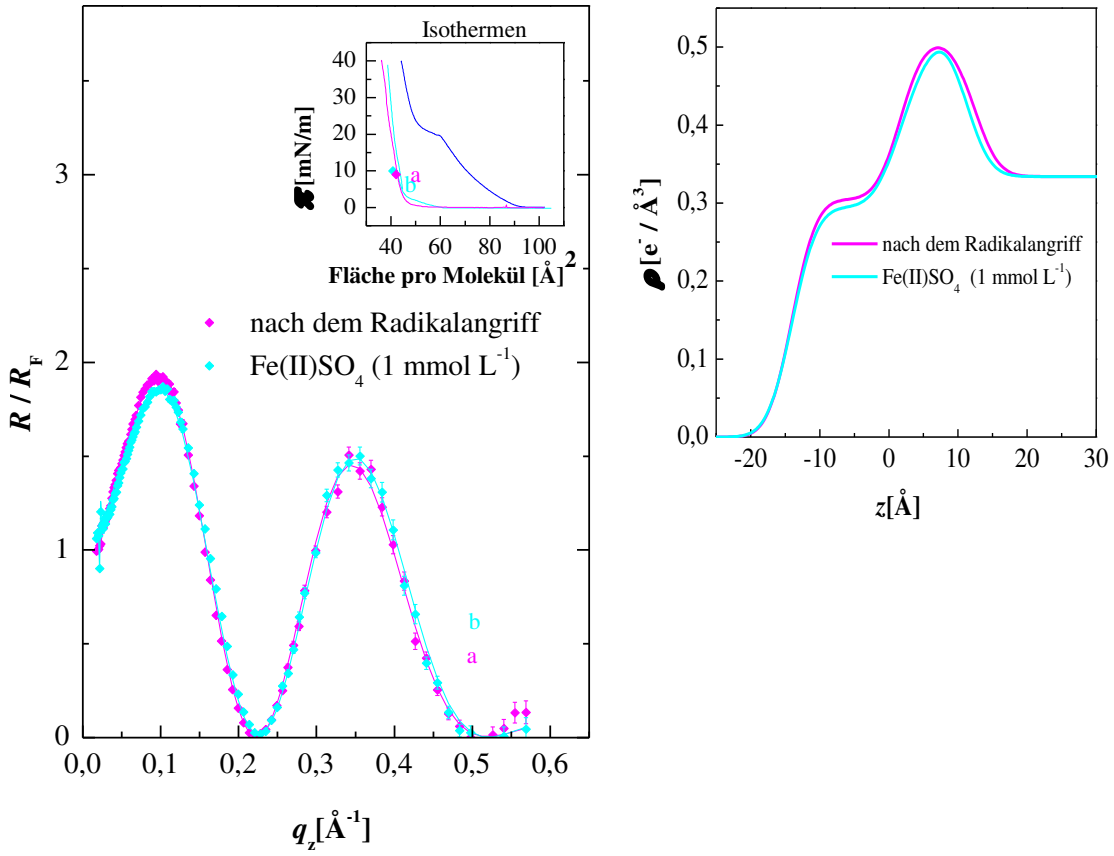


Abb. 8.11 Links: Normierte Reflexionskurven von DMPG auf PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und Fe(II)SO_4 (4 mmol L^{-1}) nach dem Radikalangriff (magenta) und DMPG auf Fe(II)SO_4 (1 mmol L^{-1}) (cyan). Rechts: Die zu den Reflexionskurven dazugehörigen Elektronendichteprofile sind nahzu identisch.

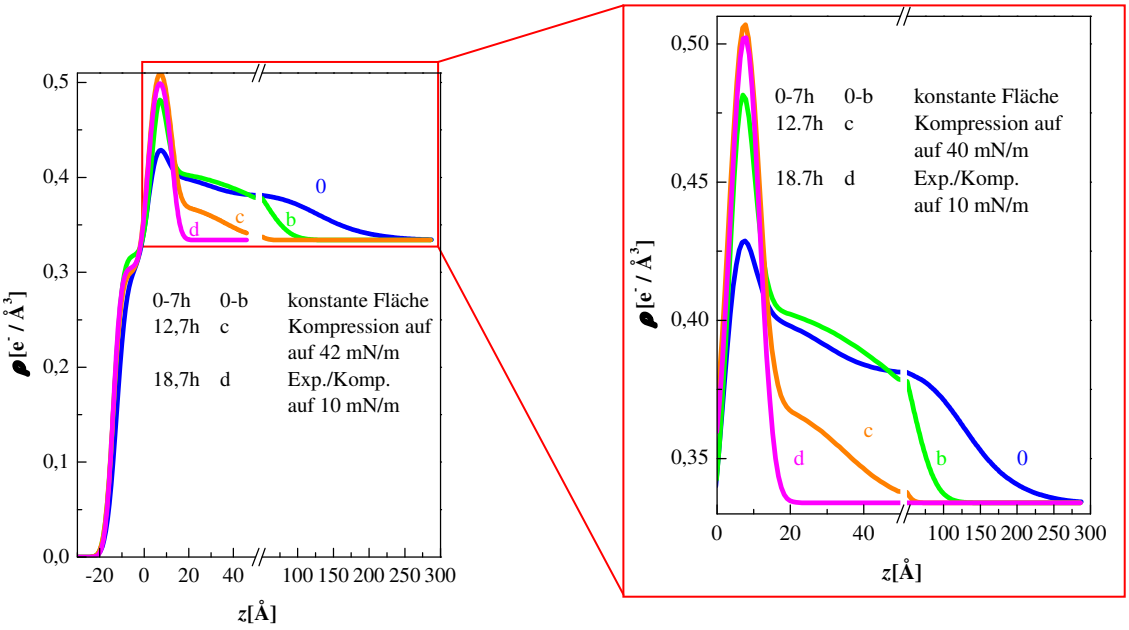


Abb. 8.12 Elektronendichteprofile von DMPG mit einer adsorbierten PEI-EDTA-Eisen-Schicht vor dem Radikalangriff (blaue Linie), nach dem Radikalangriff bei gleicher konstanter molekularer Fläche bei 13 mN m^{-1} (grüne Linie), nach der Kompression auf 42 mN m^{-1} (orange Linie) und nach vollständiger Expansion und erneuter Kompression auf 10 mN m^{-1} (magentafarbene Linie)

Die in Abbildung 8.12 dargestellten Elektronendichteprofile werden aus den entsprechenden Röntgenreflexionsprofilen aus Abb. 8.10 berechnet. Nach dem Radikalangriff ist die Dicke der hydrophoben Alkylketten unverändert. Sehr große Unterschiede sind an den Kopfgruppen zu erkennen. Vor dem Radikalangriff (blaue Linie) ist an der Lipidkopfgruppe (ca. 20 Å breit) eine sehr dicke Schicht (140 Å) mit einer hohen Elektronendichte angebunden. 7 Stunden nach dem Radikalangriff ist die Schichtdicke nur noch 56 Å breit. Die Elektronendichte dieser Schicht bleibt annähernd konstant. Gleichzeitig ist die Elektronendichte der Kopfgruppe gestiegen, wahrscheinlich durch Anbindung von Eisen-Ionen. Nach anschließender Komprimierung auf 42 mN m^{-1} nimmt die Dicke der angebundenen Schicht auf 24 Å ab. Ihre Elektronendichte nimmt ebenfalls ab. Gleichzeitig nimmt die Elektronendichte der Kopfgruppe zu. Wird die Monoschicht komplett expandiert und wieder komprimiert hat sich die angebundene Schicht abgelöst.

8.4 Röntgendiffraktion

Die Bragg Peaks der DMPG Alkylketten wurde in der flüssig-kondensierten Phase auf Reinstwasser, auf einer Subphase mit PEI (2 mmol L^{-1}), $Fe(II)SO_4$ (4 mmol L^{-1}) und EDTA (5 mmol L^{-1}) sowie auf einer $Fe(II)SO_4$-Lösung (1 mmol L^{-1}) aufgenommen und sind in Abbildung 8.12 dargestellt.

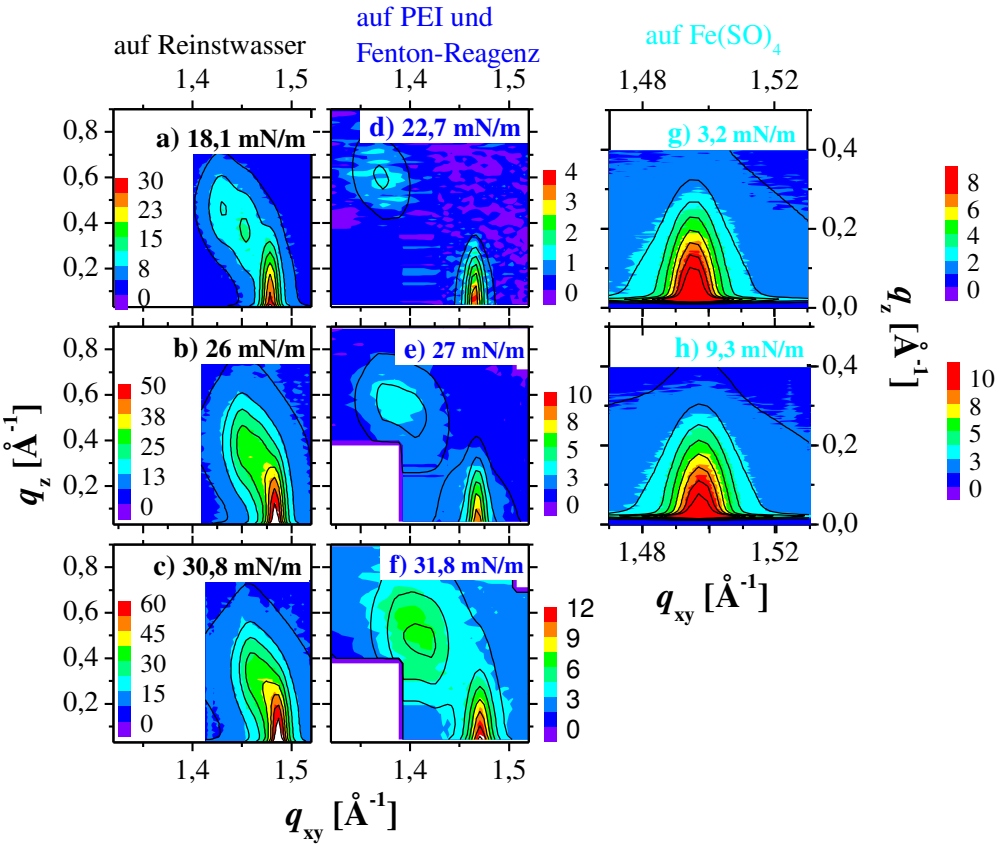


Abb. 8.13 Röntgendiffraktionsmessungen einer DMPG Monoschicht auf Reinstwasser (links), auf einer Subphase mit 2 mmol L^{-1} PEI, 4 mmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$ und 5 mmol L^{-1} EDTA (Mitte) und auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten $Fe(II)SO_4$-Lösung (rechts). Die Messungen sind entlang der Isotherme Abb. 8.14 aufgenommen. Die Linien sind Fits, die Intensitäten sind farbcodiert. Die Intensitäten sind nur innerhalb einer Messreihe vergleichbar.

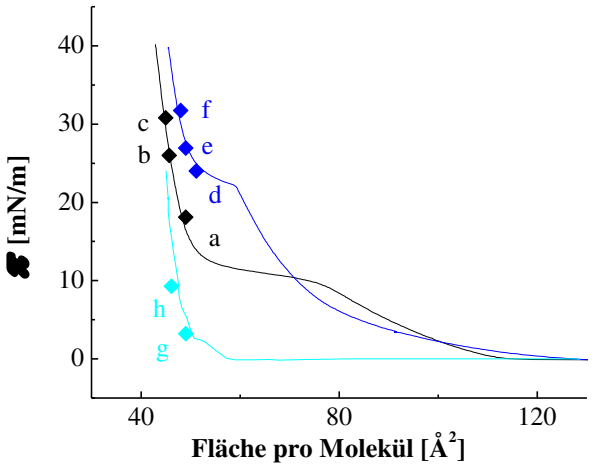


Abb. 8.14 Druck/Flächen Isothermen von DMPG auf Reinstwasser (schwarz), auf einer Subphase mit 2 mmol L^{-1} PEI, 4 mmol L^{-1} Fe(II)SO_4 und 5 mmol L^{-1} EDTA (blau) und auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4-Lösung (cyan). Für die in Abbildung 8.13 aufgenommenen Diffraktionspeaks sind die zugehörigen Messpunkten a-h eingetragen.

Die beobachtete Diffraktionwurde modelliert als Streuung an annähernd hexagonal angeordneten Alkylketten, die annähernd in die Richtung des nächsten Nachbarn geneigt sind. Der zugrunde liegenden monoklinen Einheitszelle entsprechen drei Peaks mit unabhängigen Positionen in q_{xy}. Es wurden Lorentzprofile mit zwei verschiedenen Peakbreiten in q_{xy} (inverse Korrelationlängen) bestimmt, eine für das Maximum bei kleinem q_z, eine gemeinsame für die zum Teil überlappenden Maxima bei großem q_z. Aus den zwei verschiedene Peakpositionen in q_z wurde der Neigungswinkel und der Neigungsazimut bestimmt, unter der Randbedingung, dass die q_z –Position für den Peak mit dem größten q_z –Wert die Summe der q_z-Positionen der beiden anderen Peaks ist. Freie Parameter waren weiterhin: Eine gemeinsame Peakbreite in q_z (ein Maß für die Länge der Alkylketten) für alle Peaks, sowie zwei Peakintensitäten, eine für den Peak bei kleinem q_z und eine gemeinsame für die beiden anderen. Außerdem wurde eine Hintergrundintensität in Form einer schiefen Ebene mit drei Parametern beschrieben. Für die Diffraktionspeaks von DMPG auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4-Lösung sowie nach dem Radikalangriff von DMPG mit adsorbierten PEI ab 25 mN m^{-1} wurde nur die Breite des q_{xy} Peaks genutzt.

Wird die Monoschicht komprimiert, verschieben sich die q_{xy}- Positionen zu größeren Werten, was eine Abnahme der Gitterabstände gleich kommt. Gleichzeitig verschiebt sich der q_z-Wert, bei DMPG auf Reinstwasser und auf einer PEI-EDTA-Fe(II)SO_4 -Lösung, zu kleineren Werten, was eine Abnahme des Neigungswinkels bedeutet. Bei

DMPG auf einer Fe(II)SO_4-Lösung ist unabhängig von der molekularen Fläche der Alkylketten nur ein Peak (q_z = 0) zu beobachten. Die Alkylketten stehen damit senkrecht.

Abbildung 8.15 zeigt die Fläche pro Alkylkette (projiziert auf die Wasseroberfläche) (links) sowie den Neigungswinkel (rechts) in Abhängigkeit des lateralen Drucks, die aus den Diffraktionsdaten abgeleitet wurden.

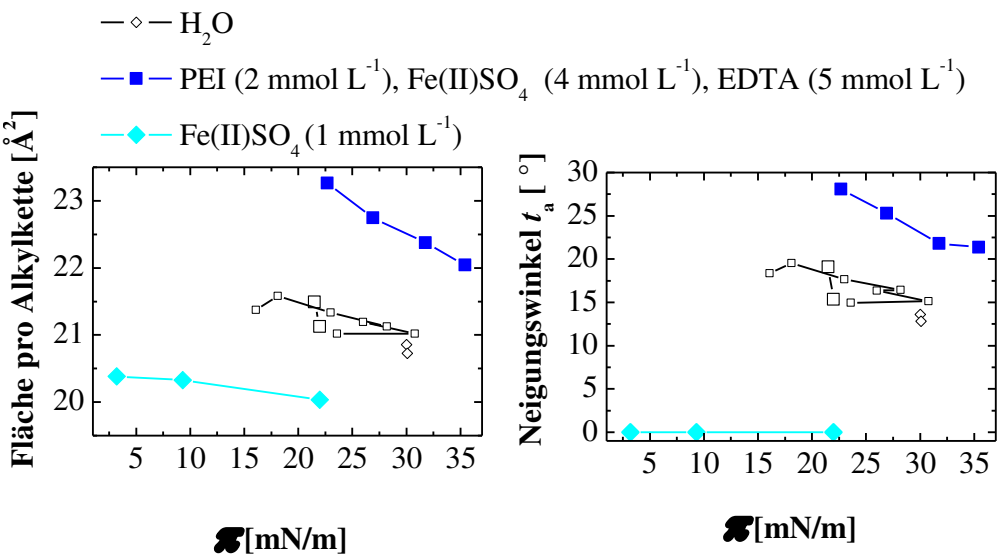


Abb. 8.15 Strukturelle Parameter bestimmt aus den Röntgendiffraktionsmessungen (wie teilweise in Abb. 8.13 gezeigt) von DMPG auf Reinstwasser (schwarz), auf einer PEI (2 mmol L^{-1}), Fe(II)SO_4 (4 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1})–Lösung (blau) sowie auf einer Fe(II)SO_4-Lösung (1 mmol L^{-1})(cyan), gemessen entlang der Isotherme. Links: Fläche pro Alkylkette in Abhängigkeit des lateralen Drucks. Rechts: Neigungswinkel t_a bezüglich der Oberflächen Normalenin Abhängigkeit des lateralen Drucks.

Die molekulare Fläche einer Alkylkette von DMPG mit adsorbierten PEI auf einer EDTA-Fe(II)SO_4-Lösung ist bei einem lateralen Druck von 20 mN/m um ca. 1,7 Å^2 größer als die auf Wasser und um ca. 3 Å^2 größer als auf einer Fe(II)SO_4-Lösung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die aus der Isotherme gewonnen wurden. Der Neigungswinkel der Alkylketten von DMPG mit adsorbierten PEI auf einer EDTA-Fe(II)SO_4-Lösung ist ebenfalls größer als auf Wasser. Den Alkylketten steht eine größere molekulare Fläche zu Verfügung, da PEI zwischen den Lipidkopfgruppen eindringt. Geht man von einer konstanten Alkylkettendichte aus, nimmt der Neigungswinkel mit Zunahme der molekularen Fläche A mit cos t_a = 40,4/A (A in Å^2)

zu. [Kaganer 1999] Bei einem lateralen Druck von 30 mN/m ist der Neigungswinkel der der Alkylketten von DMPG mit adsorbierten PEI auf einer EDTA-Fe(II)SO_4-Lösung 22°. Der Neigungswinkel der Alkylketten von DMPG auf Wasser ist 15°. In der Literatur schwanken die angegebenen Neigungswinkel für die Alkylketten von DPPG auf Wasser (30 mN/m) von 0° [Maltseva 2005], 5° [Wu 2005] über 11° [Wydro 2012] bis 27° [Neville 2006]. Der Neigungswinkel der DMPG Alkylketten wird vor allem von der elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen Kopfgruppe bestimmt. Kleinste Schwankungen des pH-Wertes sowie unterschiedliche Zusammensetzungen der Subphase haben einen großen Einfluss auf den Neigungswinkel der DMPG Alkylketten. Darum müssen Untersuchungen unter den exakt gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Dass dies nicht so einfach ist, zeigen auch die signifikanten Unterschiede bei der Bestimmung des pK_s Wertes von DPPG Monoschichten in der Literatur, dessen Wert von 1 bis 5 variiert. [Eftaiha 2012] Dies ist wahrscheinlich der Grund, dass die Angaben zum Neigungswinkel ebenfalls stark schwanken. Befindet sich die DMPG Monoschicht auf einer Fe(II)SO_4-Lösung, stehen die Alkylketten bereits bei 2 mN/m senkrecht zur Wasseroberfläche.

Nachdem die flüssig-kristalline Phase auf unterschiedlichen Subphasen charakterisiert ist, wird jetzt der Radikalangriff durchgeführt. Die Diffraktionsmessungen einer DMPG Monoschicht wurden auf einer PEI (2 mmol L^{-1}), Fe(II)SO_4 (4 mmol L^{-1}) und EDTA (5 mmol L^{-1}) Lösung vor, während und nach einem Radikalangriff durchgeführt. Der Radikalangriff wurde mithilfe der Fenton-Reaktion durchgeführt. Das Verhältnis von Wasserstoffperoxid zu Fe^{2+} war 3:1.
Die Diffraktionspeaks vor dem Angriff wurden bereits ausführlich beschrieben. Während des Radikalangriffs wurde der laterale Druck konstant gehalten. Die molekulare Fläche nimmt mit der Zeit ab. Gleichzeitig verschieben sich die q_z-Positionen des zweiten und dritten Peaks mit der Zeit zu kleineren Werten. Ebenfalls verschiebt sich die q_{xy}- Positionen des ersten Peaks ($q_z = 0$) zu etwas größeren Werten (Abb. 8.16).

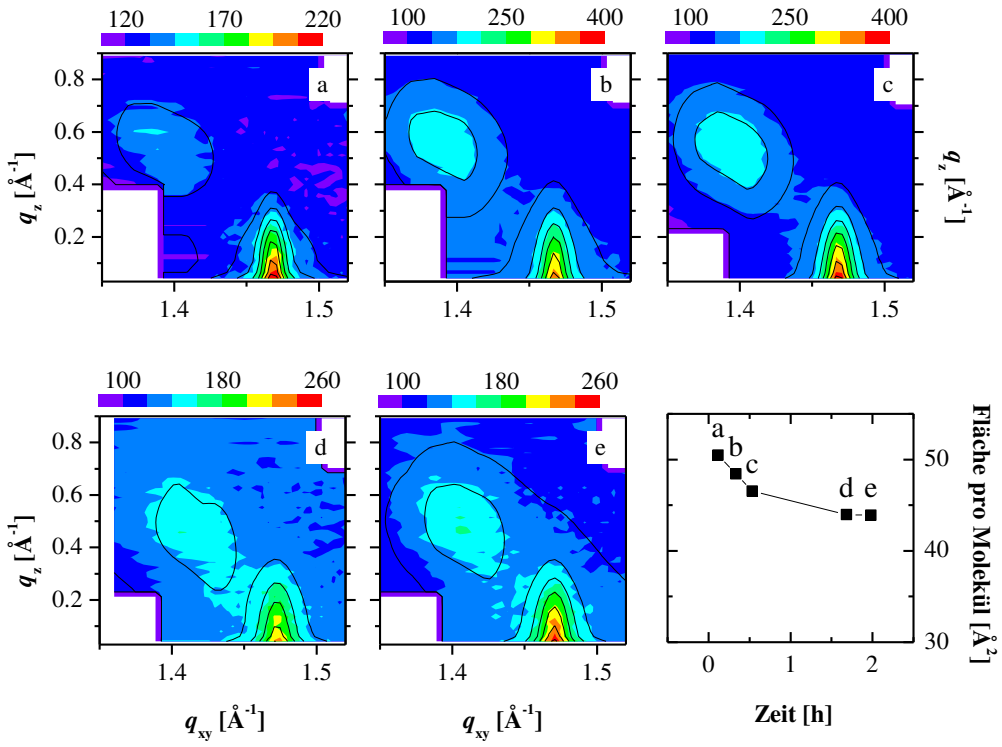


Abb. 8.16 Röntgendiffraktionsmessungen einer DMPG Monoschicht auf einer Subphase mit 2 mmol L^{-1} PEI, 4 mmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$ und 5 mmol L^{-1} EDTA, nach der Injektion von Wasserstoffperoxid. Während des Radikalangriffs wurden die Messungen bei konstantem lateralen Druck aufgenommen. Die Abnahme der molekularen Fläche mit der Zeit ist unten rechts abgebildet. Die Linien sind Fits, die Intensitäten sind farbcodiert.

Abbildung 8.17 zeigt die Diffraktionspeaks vor und nach dem Radikalangriff. Nach dem Radikalangiff wurde die Monoschicht komplett expandiert und wieder komprimiert. Ein Phasenübergang 1. Ordnung ist nicht mehr zu beobachten. Schon bei einem geringen lateralen Druck (15,2 mN m^{-1}), der vor dem Radikalangriff noch vor dem Phasenübergang lag, sind jetzt drei Diffraktionspeaks der Alkylketten mit einer NN-Orientation zu beobachten. Auch die q_z- Positionen der zwei (entarteten) Peaks sind kleiner, als die vor dem Radikalangriffs bei 23 mN m^{-1}, was eine Abnahme des Neigungswinkels zeigt. Die Gitterabstände nehmen ebenfalls ab, da die q_{xy}- Position des ersten Peaks ($q_z = 0$) sich zu größeren Werten verschiebt.

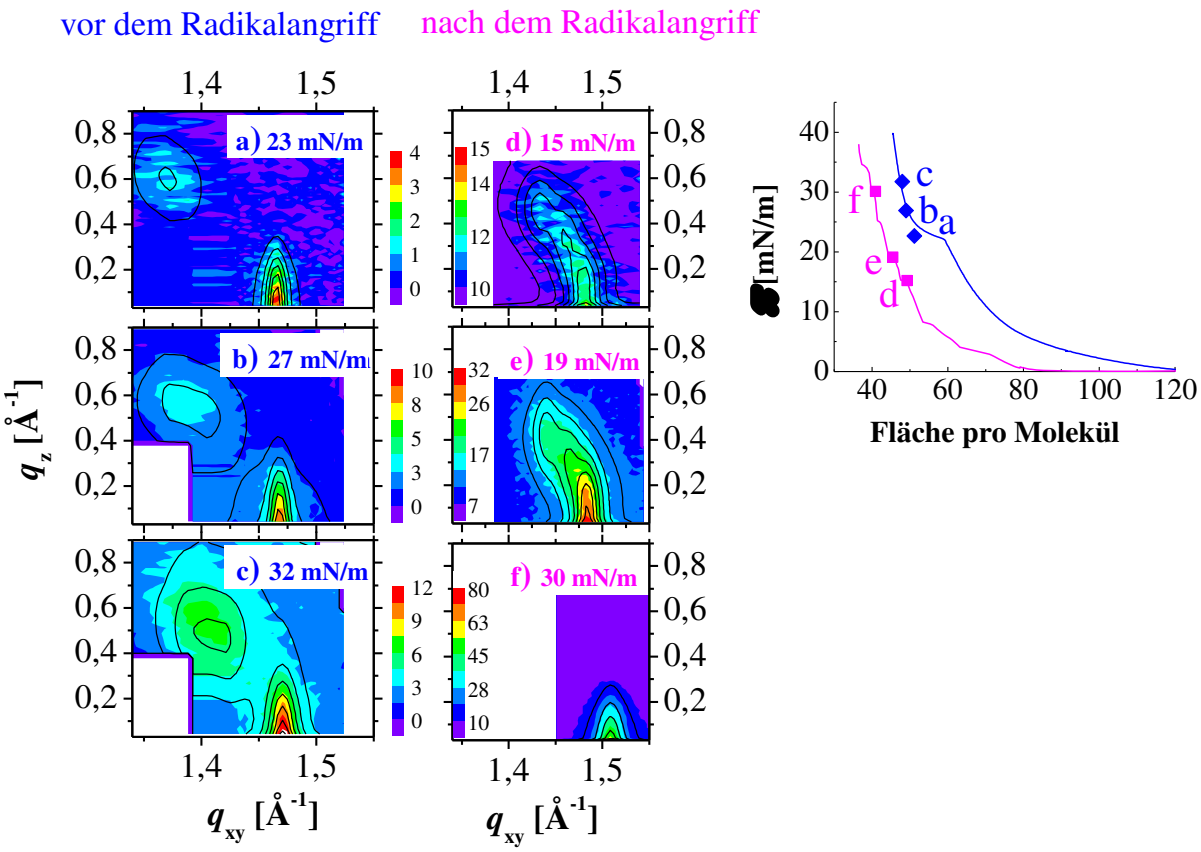


Abb. 8.17 Röntgendiffraktionsmessungen einer DMPG Monoschicht auf einer PEI (2 mmol L^{-1}), Fe(II)SO$_4$ (4 mmol L^{-1}) und EDTA (5 mmol L^{-1}) -Lösung, vor und nach einem Radikalangriff. Die Messungen sind entlang der Isotherme (von oben nach unten) bei 15 °C aufgenommen. Die Linien sind Fits, die Intensitäten sind farbcodiert. Die Intensitäten sind nur innerhalb der Messreihe vergleichbar.
Links: vor dem Radikalangriff sind drei Diffraktionspeaks erkennbar. Mit zunehmender Kompression verschiebt sich q_{xy} zu größeren Werten, was auf einen kleineren Gitterabstand hindeutet. Gleichzeitig verschieben sich die zwei Peaks bei großen q_z zu kleineren Werten, ein Hinweis auf die Abnahme des Neigungswinkels. Mitte: Kompression der Monoschicht nach dem Radikalangriff: bei einem lateralen Druck von 15 mN/m sind zwei Peaks mit größeren q_{xy}- und kleineren q_z-Positionen erkennbar. Mit zunehmender Kompression verschmelzen die Peaks zu einem. Die Alkylketten stehen senkrecht. Rechts: Isothermen vor (blau) und nach (magenta) dem Radikalangriff. Für die aufgenommenen Diffraktionspeaks sind die zugehörigen Messpunkten a-f eingetragen.

Wird die Monoschicht weiter komprimiert, verschieben sich die zwei Peaks zu kleineren q_z-Werten, bis alle drei Peaks miteinander verschmelzen. Dies bedeutet, dass der Neigungswinkel der Alkylketten mit der Kompression abnimmt bis sie senkrecht zur Oberflächennormalen stehen. Wie vorher schon beobachtet, kann die Monoschicht nach dem Radikalangriff zu einer kleineren molekularen Fläche komprimiert werden.

Aus den Diffraktionsdaten wurden die Fläche pro Alkylkette (links) und der Neigungswinkel t_a (rechts) vor, während und nach dem Radikalangriff abgeleitet (Abb. 8.18). Während des Radikalangriffes nimmt die Fläche pro Alkylkette, bei konstantem Druck, um ca. 1,5 $Å^2$ ab. Wird die Monoschicht nach dem Radikalangriff expandiert und erneut komprimiert, beträgt die Abnahme der Alkylkettenfläche 3 $Å^2$.

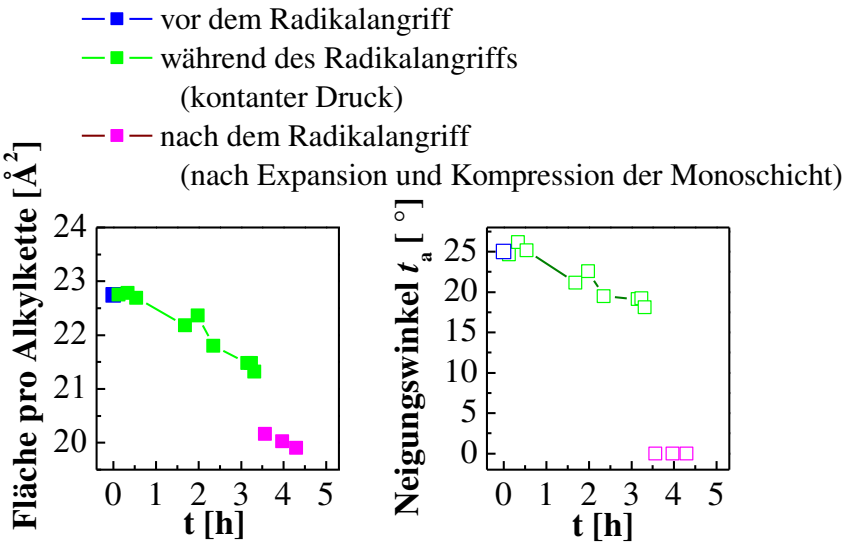


Abb. 8.18 Strukturelle Parameter entnommen aus den Röntgendiffraktionspeaks von DMPG auf 2 mmol L^{-1} PEI, 4 mmol L^{-1} Fe(II)SO_4 und 5 mmol L^{-1} EDTA vor (blau) und während (grün) und nach (magenta) dem Radikalangriff. Rechts: Fläche pro Alkylkette vor, während und nach dem Radikalangriff. Links: Neigungswinkel t_a bezüglich der Oberflächen Normalen vor, während und nach dem Radikalangriff. Während des Radikalangriffs wurde der laterale Druck konstant gehalten. Mit der Zeit nehmen die Fläche pro Molekül und der Neigungswinkel ab. Nach dem Radikalangriff (magenta) wurde die Monoschicht expandiert und wieder komprimiert. Die Alkylketten stehen senkrecht und die Fläche einer Alkylkette erreicht ihr Minimum mit 20 $Å^2$.

Während des Radikalangriffes verringert sich der Neigungswinkel, bei konstantem Druck, von 25° auf 18°. Nach dem Radikalangriff führt eine Expansion und anschließender Kompression zu einem Neigungswinkel von 0°. Die Alkylketten stehen senkrecht (siehe Abb. 8.18, rechts). Die Alkylketten von DMPG auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4 Lösung stehen ebenfalls senkrecht, wie in Abb. 8.15 dargestellt. Dies bedeutet, dass die Anbindung von Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-Ionen an die negativ geladene Phosphatgruppe ausreicht, um die Alkylketten senkrecht zur Wasseroberfläche zu stellen. Eine Verkleinerung der DMPG Kopfgruppe ist nicht notwendig.

8.5 Diskussion

Die Veränderungen der DMPG Isotherme zeigen, dass das positiv geladene PEI an die negativ geladene DMPG-Monoschicht bindet. Der Übergangsdruck π_c des Phasenübergangs (flüssig-expandiert zu flüssig-kondensiert) wird dadurch zu größeren Werten verschoben sowie die molekulare Fläche bei gleichen Enddruck vergrößert.

Die Erhöhung des Übergangsdrucks kann auf den schwach basischen Charakter von PEI zurückgeführt werden, wodurch es zu einer Erhöhung des pH-Wertes (ca. 9) kommt. Dies hat eine Deprotonierung von DMPG zufolge. Die Ladungsdichte der Monoschicht nimmt dadurch zu. Ebenso erhöht sich die elektrostatische Abstoßung zwischen den Lipiden. In Bezug auf die Ladungskompensierung können dadurch mehr PEI Moleküle an die negativ geladene DMPG Monoschicht adsorbieren. Dies führt zu einer Erhöhung der sterischen Abstoßung. Die Erhöhung der elektrostatischen- sowie sterischen Abstoßung führt zur Zunahme des Übergangsdrucks. Durch Zugabe von $Fe(II)SO_4$ bzw. des Fenton-Reagenz sinkt der pH-Wert von 9 auf 6,6 bzw. 5,5. Die Abnahme des pH-Werts hat den gegenteiligen Effekt. Durch Anbindung von PEI an die DMPG Monoschicht ist neben einer Erhöhung des Übergangsdrucks auch eine Zunahme der molekularen Fläche pro Molekül um 4-5 $Å^2$ zu beobachten. Die Zunahme der molekularen Fläche bleibt in allen drei Fällen konstant und kann durch das Eindringen von PEI Molekülen in die Monoschicht d.h. zwischen den Lipidmolekülen begründet werden. Die Brewsterwinkel-Mikroskopie von DMPG mit PEI und Fenton-Reagenz unterstützt diese Aussage. Der Abstand zwischen den einzelnen Domänen ist bei einem lateralen Druck von 30 mN m^{-1} auffällig groß. Bei diesem lateralen Druck wäre eine kompakte flüssig-kondensierte Monoschicht zu erwarten. Der hohe Kontrast zwischen den Domänen spricht für eine Veränderung des Brechungsindex der flüssigen Phase, durch das Anbinden von PEI mit Eisen-Ionen bzw. von Eisen-EDTA-Komplexen an DMPG.

Die Dicke der adsorbierten PEI Schicht hängt von der zusätzlichen Kationen-Art bzw. von denen mit EDTA gebildeten Komplexen ab. PEI ist dafür bekannt, dass es sehr flach auf geladenen Oberflächen adsorbiert. [Pericet-Camara 2006] Während die PEI Schicht mit NaCl sehr flach an DMPG adsorbiert und die Schichtdicke nur 20Å beträgt, ist die Schichtdicke mit $Fe(II)SO_4$ ohne/mit EDTA etwa 5- bis 7-mal so dick. Die Ursache für die Schichtdickenzunahme sind die Eisen-Ionen, nicht die Anionen, wie zusätzliche Messungen zeigten (siehe Anhang Abb. 10.6). Interessant ist, dass man die 100-140 Å dicke Schicht nur in Kombination von PEI und Eisen (mit und ohne EDTA)

erhält. Tauscht man die Eisen-Ionen gegen Kupfer Ionen aus adsorbiert PEI flach (siehe Anhang, Abb. 10.7).

Die Reflexionskurve sowie das Elektronendichteprofil von DMPG mit adsorbierten PEI und Fenton-Reagenz sind vergleichbar mit den amphiphilen Block Co-Polymern die bei niedrigen Salzkonzentrationen (kleiner 0,1 mol L^{-1}) Polymerbürsten bilden. [Ahrens 1998]

Bei der Röntgenreflexion kann man die angebundene PEI Schicht von Wasser unterscheiden, da die Elektronendichte von PEI gegenüber Wasser leicht erhöht ist. Zusätzlich binden Anionen elektrostatisch an das positive PEI, wodurch die Elektronendichte nochmals leicht erhöht wird. Befindet sich z.B. NaCl und PEI zusammen in Lösung, sind es die Cl^-- Ionen die an PEI binden und die Elektronendichte erhöhen. Befindet sich hingegen $Fe(II)SO_4$ mit PEI in Lösung sind es nicht nur die Sulfat-Ionen die an PEI binden. PEI kann mit Übergangsmetallen Komplexe bilden. [Zhu 2006] Es ist bekannt, dass nicht protoniertes PEI ein ungeteiltes Elektronpaar am Stickstoffatom besitzt. PEI ist somit ein Ligand und das Eisen-Ion das Zentralion. In Abbildung 8.19 ist ein PEI-Fe^{2+}-Komplex dargestellt. [Zezin 1977, Trong Nguyen 1981, Juang 1996]

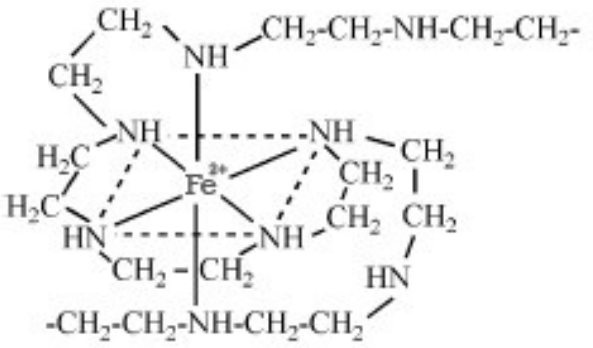


Abb. 8.19 PEI-Fe^{2+}-Komplex entnommen und verändert aus [Zhu 2006]

Sind die Fe^{2+}-Ionen hingegen mit EDTA komplexiert, ist der EDTA-Eisen-Komplex zweifach negativ geladen. Die Bindung mit dem positiv geladenen PEI beruht mehr auf elektrostatischen Wechselwirkungen, als auf Komplexierung. [Zhou 1994, Juang 1996] Dennoch bilden sich ebenfalls lange PEI Polymerbürsten, die an der DMPG Monoschicht adsorbiert sind.
Vergleicht man die Elektronendichte der DMPG Kopfgruppe auf Reinstwasser mit der auf PEI (2 mmol L^{-1}) und Fe^{2+} (4 mmol L^{-1}) ohne EDTA und mit EDTA (5 mmol L^{-1}), so ist die Elektronendichte ohne EDTA höher, mit EDTA kleiner.
Bei 2 mmol L^{-1} PEI und 4 mmol L^{-1} $Fe(II)SO_4$ kommt die erhöhte Elektronendichte der DMPG Kopfgruppe durch Anbindung von Fe^{2+}- bzw. von Fe^{3+}-Ionen an das negativ geladene Lipid zustande. 2 mmol L^{-1} PEI reichen nicht aus um 4 mmol L^{-1} Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-Ionen zu komplexieren. Für einen oktaedrischen Komplex sind mindestens 6 Monomere PEI notwendig. Das bedeutet, dass 3,66 mmol L^{-1}„freie“ Eisen-Ionen in Lösung sein können. Bei Bildung eines tetraedischen Komplexes sind immer noch 3,5 mmol L^{-1} „freie“ Eisen-Ionen in Lösung. Eine direkte Anbindung der Eisen-Ionen an die DMPG Monoschicht ist somit möglich. Befindet sich hingegen 5 mmol L^{-1} EDTA in Lösung sind alle Eisen-Ionen komplexiert. Eine direkte Anbindung der Eisen-Ionen an die negativ geladene DMPG Monoschicht ist somit nicht mehr möglich. Durch das Eindringen von PEI Molekülen in die Monoschicht nimmt die Elektronendichte der DMPG-Kopfgruppe auf Reinstwasser ab. Der Grund ist die kleinere Elektronenanzahl der PEI Moleküle im Vergleich zu der elektronenreichen Phosphatgruppe der DMPG Moleküle. Dennoch kann man an den Elektronendichteprofile erkennen, dass die Fe-EDTA-Komplexe an PEI gebunden sind und einen Anteil zur Elektronendichte der DMPG Kopfgruppe beitragen. Die erhöhte Elektronendichte der Kopfgruppe ist anders nicht zu erklären, wenn man diese mit der von DMPG mit adsorbierten PEI und NaCl vergleicht.

Der Ausgangszustand des Radikalangriffs ist somit eine negativ geladene DMPG Monoschicht. An dieser Monoschicht adsorbiert das positiv geladene PEI, das mit den negativ geladenen Eisen-EDTA-Komplexen eine 140 Å Dicke „Polymerbürstenschicht“ bildet. Das PEI mit den Eisen-EDTA-Komplexen dringen dabei auch zwischen den Lipiden ein.
Die Auswirkungen des Radikalangriffs sind reproduzierbar und hängen von der Fe^{2+}- und H_2O_2-Konzentration ab, sowie von deren Verhältnis. Je höher die Fe^{2+}- und H_2O_2

Konzentrationen und umso größer das Verhältnis H_2O_2:Fe^{2+}, umso größer sind die Auswirkungen. Damit sind gemeint: die Abnahme des Übergangsdrucks π_c (von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase), die Abnahme der molekularen Fläche pro Molekül sowie die Abnahme der Schichtdicke der „Polymerbürsten“. Alle drei nehmen mit der Zeit ab. Diese chemisch physikalischen Veränderungen finden über Stunden statt. Obwohl die Lebenszeit der Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) unterhalb einer Sekunde liegen [Lin 1998], dauert die laterale Druckabnahme bei konstanter molekularer Fläche und somit die Reorganisation der Monoschicht mehrere Stunden. Wie die Reaktion genau abläuft ist unbekannt. Wir können jedoch sagen, dass die Reaktion hauptsächlich an der Kopfgruppe und der adsorbierten „Polymerbürsten“ stattfindet. Wie die Röntgenreflexion zeigt, zerstören die freien Radikale die „Polymerbürsten“. Berg et. all. (2013) haben gezeigt, dass die Reaktion von reaktiven Sauerstoffspezien mit PEI, zum Verlust von positiven Ladungen des PEIs führt. Dies hat eine Abnahme der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen PEI und den Eisen-EDTA-Komplexen zufolge. Es ist ebenfalls bekannt, dass die Hydroxyl-Radikale die Eisen-EDTA-Komplexe zerstören, wodurch „freie“ Eisen-Ionen entstehen. [M. C. R. Symons 1998, Gröning 2011] Die Eisen-Ionen diffundieren zur negativ geladenen DMPG Kopfgruppe und binden an ihr. Dies erklärt die zunehmende Elektronendichte in der Kopfgruppe. Am Ende des Radikalangriffs entspricht das Elektronendichteprofil dem von DMPG auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten Fe(II)SO_4- Lösung. Die Diffusion der Eisen-Ionen zu geladenen DMPG Monoschicht ist der geschwindigkeits-bestimmende Schritt für die Reaktion und erklärt die über Stunden andauernde Reorganisation der Monoschicht. Die Entstehung der „freien“ Eisen-Ionen in der Subphase wird ungleichmäßig sein, ebenso wie ihre Verteilung, da die Injektion von Wasserstoffperoxid lokal begrenzt ist und die Fenton-Reaktion schnell und möglicherweise schon vor dem Ende des Rührens fast vollständig vollzogen ist. Die Maße des Troges (vor allem die Tiefe) haben dementsprechend ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktionszeit.

Während des Radikalangriffs ist, bei konstantem Druck, die Verringerung der molekularen Fläche zu beobachten. Die Abnahme der molekularen Fläche durch den Radikalangriff entspricht genau der molekularen Flächenzunahme, die durch Anbindung von PEI an die DMPG Monoschicht entsteht. Dies spricht dafür, dass sich kein PEI zwischen den Lipiden befindet. Die Abnahme der molekularen Fläche führt zu kleineren Neigungswinkel der Alkylketten. Am Ende des Radikalangriffs beträgt der

Neigungswinkel 18°. Damit verringert sich der Neigungswinkel um 7°. Der Neigungswinkel der Alkylketten von DMPG auf Wasser beträgt 15°. Der pH-Wert der verwendeten PEI-EDTA-Fe(II)SO_4-Lösung ist kleiner als von Wasser. Man würde daher aufgrund der stärkeren Protonierung, folglich eine Abnahme der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Kopfgruppen und damit einen kleineren Neigungswinkel erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Dies deutet darauf hin, dass PEI auch nach dem Radikalangriff an den Kopfgruppen der Lipide angelagert sein muss. Die Röntgenreflexionsmessungen bestätigen das.

Das noch eine rund 20 Å dicke Schicht an der Monoschicht gebunden ist, ist nicht verwunderlich. Berg et al. (2013) haben gezeigt, dass die Oberflächenladungsdichte sowie das Oberflächenpotential einer PEI Oberfläche, nach der Wechselwirkung mit Sauerstoffradikalen, um die Hälfte reduziert werden. Somit enthält PEI nach der Radikalattacke noch positiv geladene Gruppen, wodurch das PEI mittels elektrostatischer Wechselwirkung auf dem Substrat physiosorbiert bleibt. [Berg 2013] Dieses Ergebnis kann unsere Beobachtungen erklären. Erst durch Expandieren und erneutes Komprimieren löst sich die PEI-Schicht ab. Durch die Expansion der DMPG Monoschicht nimmt dessen Oberflächenladungsdichte ab. Die durch den Radikalangriff reduzierten Ladungen des PEIs reichen nicht mehr aus, um sich erneut an die DMPG Monoschicht anzubinden. Dazu kommt die zunehmende Konkurrenz „freier“ Eisen-Ionen. Wie im Kapitel 4.6 gezeigt wurde, binden Eisen-Ionen sehr stark an negativ geladene Lipide. Es kommt schon bei kleinsten Eisen-Konzentrationen (1 $\mu mol\ L^{-1}$) zu einer irreversiblen Verfestigung der Lipidmonoschicht. Die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Kopfgruppen nimmt zwischen den DMPG Molekülen ab. Die DMPG Monoschicht kann jetzt zu kleineren molekularen Flächen komprimiert werden. Die Analyse der Diffraktionsdaten zeigt eine Fläche von ca. 20 $Å^2$ pro Alkylkette. Dies entspricht der kleinsten molekulare Fläche einer Alkylkette bei der, der Neigungswinkel 0° ist. [Kaganer 1999, Ishimura 2002] Die Alkylketten stehen damit senkrecht. Dies ist nur möglich, wenn es zu keiner sterischen Abstoßung zwischen den Kopfgruppen kommt. Dies zeigt, dass sich kein PEI an den Kopfgruppen der Lipide befindet. Aufgrund der sehr starken Verfestigung der Monoschicht, kann davon ausgegangen werden, dass mehrere Lipide durch einen mehrfach geladenen Eisen-Komplex bzw. durch geladene Eisenaggregate miteinander verbunden werden.

8.6 Zusammenfassung

An eine negativ geladene DMPG Monoschicht wurde das positiv geladene Polymer PEI adsorbiert. Die Isothermen zeigen, dass sich der Koexistenzbereich zu höheren Oberflächendrücken sowie zu größeren molekularen Flächen verschiebt. Mithilfe der Röntgenreflexion konnte gezeigt werden, dass das PEI flach an die Monoschicht adsorbiert. Befinden sich Eisen-Ionen in Lösung adsorbiert eine dicke PEI Schicht. Die Reflexionskurven ähneln denen von langen „Polymerbürsten“ die in die Lösung ragen. Ähnlich dicke PEI Schichten adsorbieren wenn die Eisen-Ionen mit EDTA komplexiert sind. Interessant ist, dass dies nur mit Eisen-Ionen geschieht, jedoch nicht mit Kupfer Ionen. Die BAM Bilder zeigen, dass das PEI mit den Eisen-EDTA-Komplexen auch zwischen den Lipid Domänen eindringt. Die DMPG Monoschicht mit einer dicken adsorbierten PEI Schicht ist der Ausgangszustand des Radikalangriffs. Der Radikalangriff wurde mit verschiedenen Fenton-Konzentrationen durchgeführt. Die Fenton-Konzentration musste deutlich höher sein als bei dem Radikalangriff auf eine DPPC Monoschicht, um Veränderungen der Isotherme induzieren zu können. Dies spricht für einen gewissen Schutz der Monoschicht vor den Sauerstoffradikalen sowie vor eine Verfestigung der negativ geladenen Monoschicht durch die Anbindung von Eisen-Ionen. Ab einer bestimmten Fenton-Konzentration ist eine Veränderung des thermodynamischen Verhaltens der DMPG-Monoschicht zu beobachten. Je höher die Fe^{2+}- und H_2O_2-Konzentrationen und umso größer das Verhältnis von H_2O_2:Fe^{2+}, desto größer ist die Abnahme des Übergangsdrucks π_c (bis dieser völlig verschwindet) sowie die Abnahme der molekularen Fläche pro Molekül. Die Verringerung der molekularen Fläche durch den Radikalangriff macht die Flächenzunahme, die durch Anbindung von PEI an die DMPG Monoschicht entsteht, annähernd rückgängig. Die Röntgenreflexion zeigte, dass während des Radikalangriffs die Dicke der adsorbierten PEI Schicht abnimmt. Gleichzeitig nimmt die Elektronendichte der Kopfgruppe zu. Denn an die DMPG Monoschicht binden Eisen-Ionen bzw. Eisenaggregate an. Ebenfalls nimmt der Neigungswinkel der Alkylketten ab. Wird die Monoschicht anschließend expandiert und wieder komprimiert, ist die Monoschicht schon bei einem lateralen Oberflächendruck von Null verfestigt wie die Brewsterwinkel-Mikroskopie zeigt. Außerdem hat sich die PEI Schicht vollständig von der Monoschicht abgelöst. Bei kleinster molekularer Fläche zeigten die Röntgendiffraktionsmessungen, dass die Alkylketten senkrecht zur Oberfläche stehen.

Zusammenfassend findet folgender Vorgang statt:

1. Die Sauerstoffradikale kürzen die „Polymerbürsten“ und reduzieren die Ladungsdichte des adsorbierten PEIs.
2. Die Radikale zerstören die Eisen-EDTA-Komplexe.
3. „Freies“ Eisen diffundiert zur negativ geladenen DMPG Monoschicht.
4. Eisen-Ionen bzw. Eisenaggregate binden an die DMPG Moleküle.
5. Die Monoschicht verfestigt sich.

Das Zusammenspiel von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen nach dem Radikalangriff führt zu folgenden Effekten:

1. Abnahme der intermolekularen Abstoßung, die die Abnahme des Übergangsdrucks von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase bewirkt.
2. kleinere molekulare Flächen bei hohem Druck
3. Entstehung einer festen Phase
4. eine verbesserte kristalline Anordnung in der festen Phase.

IX Zusammenfassung der gesamten Arbeit

Unter aeroben Bedingungen sind biologische Systeme den reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) ständig ausgesetzt, (a) weil ROS als Nebenprodukte bei verschiedenen Metabolismen entstehen, (b) weil ROS durch das Immunabwehrsystem gebildet werden, (c) weil ROS als Signalmoleküle in biochemischen Systemen produziert werden, (d) weil ROS durch Strahlung (z.B. UV) andauernd gebildet werden. Außerdem entstehen sie bei chemischen Reaktionen, bei denen Übergangsmetalle involviert sind (z.B. die Fenton Reaktion, also die Reaktion von H_2O_2 mit Fe^{2+}). Diese ROS besitzen oxidative Eigenschaften und sind sehr reaktiv. Zahlreiche Studien zeigen eine Korrelation zwischen ROS und dem Auftreten von über 150 unterschiedlichen Krankheiten, angefangen von rheumatoiden Arthritis [Sweeney 2004] bis hin zu Multiple Sklerose [Gilgun-Sherki 2005, Lassmann 2007]. In den letzten Jahrzehnten ist ein großer Forschungsbereich entstanden, um den Zusammenhang von ROS und den Krankheiten besser zu verstehen. Die Biochemie der Sauerstoffaktivierung [Hamdane 2008] und ihre Rolle in biochemischen Zyklen [Elstner 1982, Andreyev 2005] sowie den antioxidativen Mechanismen und Strategien [Bilici 2001, Gosslau 2002] wurden ausführlich untersucht. Die Interaktionen von ROS mit Zellmembranen und die daraus entstehenden biophysikalischen Folgen sind weitgehend unbekannt. Dabei ist die Zellmembran ein wesentliches Merkmal von Lebewesen. Veränderungen von chemischen und mechanischen Eigenschaften der Membran, durch die Wechselwirkung mit ROS, haben weitreichende Konsequenzen für die Funktion einzelner Bestandteile sowie für die Zelle selbst.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen den reaktiven Sauerstoffspezien und den Lipiden, die das Grundgerüst der Zellmembran bilden, sowie die daraus resultierenden chemischen und physikalischen Veränderungen der Membran untersucht. Außerdem wurde der Schutz einer Modellmembran durch Adsorbtion eines Polymers untersucht.

Da natürliche Zellmembrane hoch komplexe Systeme sind, in und an denen chemische und strukturelle Prozesse häufig gleichzeitig ablaufen, wurden Lipidmonoschichten und Liposomen als Modellmembranen für die Untersuchungen gewählt. Die Radikale wurden mithilfe der Fenton-Reaktion erzeugt. Die Stärke des Radikalangriffs wurde durch die Konzentration an Wasserstoffperoxid und dessen Verhältnis zu Fe^{2+} reguliert. Um ein vollständiges Bild des Radikalangriffs auf die Modellmembran zu erhalten, war es notwendig verschiedene Untersuchungsmethoden zu verwenden. Die

Lipidmonoschichten und deren Phasenumwandlungen, von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase, wurden vor und nach dem Radikalangriff mithilfe des Langmuir-Troges und den damit aufgenommenen Isothermen untersucht. Die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Brewsterwinkel-Mikroskopie wurde genutzt, um die Veränderungen des Phasenübergangs (flüssig-expandierte zu flüssig-kondensierte Phase) und somit die Veränderungen der Form und des Wachstums von Lipid-Domänen (flüssig-kondensierte Phase) durch den Radikalangriff zu beobachten. Die laterale periodische Struktur und das vertikale Elektronendichteprofil der Lipidmonoschicht wurden mit der Röntgendiffraktion und Röntgenreflexion vor und nach dem Radikalangriff untersucht. Mit der Infrarot-Reflexion-Absorption Spektroskopie (IRRAS) konnten Aussagen über die chemische Veränderungen der Lipide nach dem Radikalangriff getroffen werden.

Die Liposomen wurden mit Differenzkalorimetrie untersucht, um die Verschiebung der Phasenübergangstemperatur durch den Radikalangriff zu beobachten. Außerdem wurden die Veränderungen der Umwandlungsenthalpie und der Halbwertsbreite $\Delta T_{m1/2}$ bestimmt. Der Radikalangriff auf Liposomen wurde mit Fluorenzmikroskopie verfolgt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Wechselwirkung von ROS mit zwitterionisch geladenen Lipiden untersucht. Die Modellmembranen bestanden aus Phosphatidylcholinen. Fasst man alle Ergebnisse der Untersuchungen zusammen, führt dies zum folgenden Resultat: Die Radikale reagieren bevorzugt mit der Kopfgruppe der zwitterionischen Phosphatidylcholinen. Es entstehen negativ geladene Phospholipide mit einer kleineren Kopfgruppe. Die Alkylketten bleiben nach dem Radikalangriff unverändert. Wie die Isothermen und die Brewsterwinkel-Mikroskopie bei Monoschichten sowie die Thermogramme bei Liposomen zeigen, hat die Reaktion keinen erkennbaren Einfluss auf das thermodynamische Verhalten. Erst durch Zugabe bzw. bei Vorhandensein von „freien“ Eisen-Ionen wird die Veränderung der Phosphocholine durch die Radikale beobachtbar. Die „freien“ Eisen-Ionen binden an die negativ geladenen Phospholipde. Dies führt im Fall von DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) Monoschichten zur Verfestigung. Nach dem Radikalangriff werden im Koexistenzbereich neue Domänen gebildet, ebenso kommt es zu Domänfusionen. Am Ende des Radikalangriffs ist die Monoschicht irreversibel verfestigt. Weder Expansion noch Temperaturerhöhung führt zur Verflüssigung der Lipidmonoschicht. Weiterhin kommt es zur Abnahme der molekularen Fläche in der flüssig-kondensierten Phase. Die Radikale verkleinern die Kopfgruppe, wodurch die sterische Abstoßung zwischen den Lipidmolekülen abnimmt. Dadurch können sich die

Alkylketten aufrichten, bis diese schließlich senkrecht zur Wasseroberfläche stehen. In der festen Phase ist eine verbesserte kristalline Anordnung der Alkylketten zu beobachten. Im Fall von DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) Liposomen führt der Radikalangriff, bei Vorhandensein von „freien" Eisen-Ionen, ebenfalls zu einer Verfestigung. Am Ende des Radikalangriffs sind die Liposomen zerstört. Zusammenfassend führt der Radikalangriff zur chemischen Veränderungen der Lipide. Die thermodynamischen Eigenschaften der Monoschicht, wie auch die der Liposomen bleiben dennoch weitgehend erhalten. Erst die Anbindung von mehrwertigen Ionen führt zu Veränderungen. Binden jedoch Eisen-Ionen bzw. deren Aggregate an die nun negativ geladenen Modellmembranen kommt es zur irreversiblen Verfestigung der Monoschicht bzw. zur Zerstörung von Liposomen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wechselwirkung von ROS mit negativ geladenen Phospholipiden untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass die negative Ladung der Phospholipide nach dem Radikalangriff erhalten bleibt.

„Freies" Eisen, welches durch die Zerstörung der Eisen-EDTA-Komplexe durch die Radikale entsteht, bindet an die negativ geladene Monoschicht. Durch die Eisenanbindung kommt es wieder zur irreversiblen Verfestigung der Modellmembran. Werden die Experimente mit EDTA im hohen Überschuss durchgeführt, um die „freien" Eisen-Ionen abzufangen, sind keine Veränderungen der thermodynamischen Eigenschaften zu beobachten. Die Alkylkettenlänge sowie die Ladung der Kopfgruppe bleiben konstant. Die durchgeführten IRRAS Messungen zeigen ebenfalls keine Veränderungen der Alkylketten.

Aufgrund der Beobachtung, dass Eisen-Ionen negativ geladene Modellmembranen verfestigen, sollte im dritten Teil dieser Arbeit die Eisenanbindung an negativ geladene Monoschichten am Beispiel des Cardiolipin TMCL quantifiziert werden. Bei einem physiologischen pH-Wert führt eine Eisen-Ionen Konzentration im mikromolaren Bereich zu einer irreversiblen Verfestigung der Monoschicht. Ungefähr ein Eisen Ion wird pro Lipid angebunden. Der pH-Wert ist ein entscheidender Parameter. Eine irreversible Verfestigung der Monoschicht kann durch einen pH-Wert von 1,3 oder niedriger verhindert werden, wenn die Eisenkonzentration kleiner als 1000 $\mu mol\ L^{-1}$ ist. Bei höheren Eisenkonzentrationen tritt auch bei diesem pH-Wert eine Verfestigung ein.

Einen kondensierenden Effekt auf Modellmembranen mit negativ geladenen Lipiden hat auch die Wasserstoffperoxid-Lösung, die für die Herstellung der Radikale verwendet wird. Dieser Effekt wird durch die katalytische bzw. homolytische Zersetzung von H_2O_2

verstärkt. Die entstehenden Radikale zerstören die Stabilisatoren in der Wasserstoffperoxid-Lösung. Die entstehenden „freien“ Metallionen binden an die negativ geladenen Lipide. Die Modellmembranen werden dadurch verfestigt.

Im vierten Teil dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von ROS mit einer negativ geladenen Lipid-Monoschicht (DMPG) mit adsorbierten Polykationen (Polyethylenimin (PEI)) untersucht. Die adsorbierte Polymerschicht dient zum Schutz der Lipidmonoschicht. Das positiv geladene Polymer PEI ist dafür bekannt, dass es an negativ geladenen Oberflächen flach adsorbiert. [Pericet-Camara 2006] Adsorbiert PEI an eine DMPG Monoschicht ist dies auch der Fall. Befinden sich jedoch Eisen-Ionen oder Eisen-EDTA-Komplexe in Lösung, adsorbiert eine geknäulte, dicke PEI Schicht (ähnlich Polymerbürsten). Dies geschieht nur mit Eisen-Ionen, nicht mit Kupfer Ionen. PEI mit den Eisen-EDTA-Komplexen dringt auch zwischen die Lipid Domänen. Die molekulare Fläche pro Molekül nimmt dadurch zu. Der Radikalangriff wurde mit verschiedenen Fenton-Konzentrationen durchgeführt. Es war eine signifikant höhere Fenton-Konzentration als bei dem Radikalangriff auf eine DPPC Monoschicht notwendig, um Veränderungen zu induzieren. Die Messungen mit komplementären Methoden zeigen folgenden Mechanismus: Die Reaktion der Sauerstoffradikale mit PEI bewirkt eine Schichtdickenabnahme sowie eine Reduzierung der Ladungsdichte der adsorbierten PEI-Schicht. Gleichzeitig zerstören die Radikale die Eisen-EDTA-Komplexe. Dadurch entsteht „freies“ Eisen, welches zur negativ geladenen DMPG Monoschicht diffundiert und an die DMPG Moleküle bindet. Weiterhin kommt es zur Abnahme der molekularen Flächein der flüssig-kondensierten Phase. Die molekulare Flächenabnahme entspricht ungefähr der Flächenzunahme, die durch die ursprüngliche Anbindung von PEI an die DMPG Monoschicht entstand. Daher befindet sich nach dem Radikalangriff kein PEI mehr zwischen den Kopfgruppen der Lipide. Die Abnahme des Neigungswinkels der gestreckten Alkylkettenist die Folge. Wird die Monoschicht nach dem Radikalangriff anschließend expandiert und wieder komprimiert, löst sich die PEI Schicht vollständig ab. Die Alkylketten stehen nun bei kleinster molekularer Fläche senkrecht. Sind genügend Eisen-Ionen zur negativ geladenen Monoschicht diffundiert, so dass ein Eisen Ion auf ein DMPG Lipid kommt, wird die Monoschicht durch die Anbindung von Eisen-Ionen irreversibel verfestigt.

Literaturverzeichnis

Abuin, E., Lissi, E., et al. (2012). "*Diffusion of hydrogen peroxide across DPPC large unilamellar liposomes*." Chemistry and Physics of Lipids 165(6): 656-661.

Adams Jr, J. D. and Odunze, I. N. (1991). "*Oxygen free radicals and Parkinson's disease*." Free Radical Biology and Medicine 10(2): 161-169.

Ahrens, H. (2001). "*Filmwagge: Grundlagen.*" Retrieved 28.07., 2014, from http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/filmwaage/filmwaage.htm.

Ahrens, H. (2005). "*Vertikales Profil und laterale Überstruktur von molekular dünnen Polymerfilmen an der Wasser/Luft-Grenzfläche*."

Ahrens, H., Förster, S., et al. (1998). "*Charged Polymer Brushes: Counterion Incorporation and Scaling Relations*." Phys. Rev. Lett. 81: 4172-4175.

Ahrens, H., Forster, S., et al. (2004). "*Nonlinear osmotic brush regime: Experiments, simulations and scaling theory*." Journal of Physical Chemistry B 108(43): 16870-16876.

Akashi, K.-i., Miyata, H., et al. (1998). "*Formation of Giant Liposomes Promoted by Divalent Cations: Critical Role of Electrostatic Repulsion*." Biophysical Journal 74(6): 2973-2982.

Als-Nielsen, J. and Möhwald, H. (1989). Synchrotron x-ray scattering studies of Langmuir films. Handbook of Synchrotron Radiation. S. Ebashi, E. Rubenstein and M. Koch, North Holland. 5:1-53.

Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., et al. (2005). "*Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*." Biochemistry (Moscow) 70(2): 200-214.

Angelova, M. I. and Dimitrov, D. S. (1986). "*Liposome electroformation*." Faraday Discussions of the Chemical Society 81(0): 303-311.

Antipina, M. N., Dobner, B., et al. (2007). "*Investigation of the Protonation State of Novel Cationic Lipids Designed for Gene Transfection*." The Journal of Physical Chemistry B 111(49): 13845-13850.

Baecker, J. (2006). "*Scheimpflug.*" Wikipedia. Retrieved 27.03., 2015, from http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Scheimpflug_Bedingung.png.

Baltes, H. (1995). "*Röntgenographische Untersuchung ultradünner Schichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche.*"Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Baltes, H., Schwendler, M., et al. (1996). "*Tail and Head Group Interactions in Phospholipid Monolayers*." J. Colloid and Interface Science 178: 135-143.

Bangham, A., Morley, C., et al. (1979). "*The physical properties of an effective lung surfactant*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism 573(3): 552-556.

Barrett, W. C., DeGnore, J. P., et al. (1999). "*Roles of Superoxide Radical Anion in Signal Transduction Mediated by Reversible Regulation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B*." Journal of Biological Chemistry 274(49): 34543-34546.

Berg, F., Block, S., et al. (2013). "*Effects of Reactive Oxygen Species on Single Polycation Layers*." The Journal of Physical Chemistry B 117(28): 8475-8483.

Bilici, M., Efe, H., et al. (2001). "*Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments*." Journal of Affective Disorders 64(1): 43-51.

Biltonen, R. L. and Lichtenberg, D. (1993). "*The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations*." Chemistry and Physics of Lipids 64(1–3): 129-142.

Blume, A. (1996). "*Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies*." Current Opinion in Colloid & Interface Science 1(1): 64-77.

Blume, A. and Kerth, A. (2013). "*IRRA-Spektroskopie an Lipid-/Proteinmonoschichten.*" Retrieved 03.02., 2015, from http://www.git-labor.de/forschung/chemie-physik/irra-spektroskopie-lipid-proteinmonoschichten?page=1.

Blume, A. and Kerth, A. (2013). "*Peptide and protein binding to lipid monolayers studied by FT-IRRA spectroscopy*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1828(10): 2294-2305.

Borg, D. (1993). Oxygen Free Radicals and Tissue Injury. Oxygen Free Radicals in Tissue Damage. M. Tarr and F. Samson, Birkhäuser Boston:12-53.

Braslau, A., Deutsch, M., et al. (1985). "*Surface Roughness of Water Measured by X-ray Reflectivity*." Phys. Rev. Lett. 58: 2457-2470.

Brezesinski, G., Thoma, M., et al. (1996). "*Structural changes of monolayers in the air/water interface contacted with n-alkanes*." J. Phys. Chem. 100: 3126-3130.

Brugger, A., Schoppmann, C., et al. (1999). "*Ultrathin Fe-oxide layers made from Langmuir–Blodgett films*." Thin Solid Films 338(1–2): 231-242.

Bruns, A. (2015). *Die Geschichte der Physik: wie es zur Physik bis heute kam*, neobooks Self-Publishing.

Bu, W., Flores, K., et al. (2008). "*Preferential Affinity of Calcium Ions to Charged Phosphatidic Acid Surface from a Mixed Calcium/Barium Solution: X-ray Reflectivity and Fluorescence Studies*." Langmuir 25(2): 1068-1073.

Bucher, P., Fischer, A., et al. (1998). "*Giant Vesicles as Biochemical Compartments: The Use of Microinjection Techniques*." Langmuir 14(10): 2712-2721.

Cadenas, E. (1995). Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. S. Ahmad, Springer US:1-61.

Campbell, A., Taylor, P., et al. (2004). "*Preparation of aqueous gel beads coated by lipid bilayers*." Chemical Communications(21): 2378-2379.

Casal, H. L. and Mantsch, H. H. (1984). "*Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes 779(4): 381-401.

Cevc, G. and Marsh, D. (1987). *Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models*. New York, John Wiley & Sons.

Chalmers, J. M. and Griffiths, P. R. (2002). *Handbook of vibrational spectroscopy*. New York, J. Wiley.

Chen, C. and Tripp, C. P. (2008). "*An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778(10): 2266-2272.

Chen, K., Thomas, S. R., et al. (2003). "*Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction*." Free Radical Biology and Medicine 35(2): 117-132.

Chi, L. F., Johnston, R. R., et al. (1991). "*Fluorescence microscopy investigations of the domain formation of fatty acid monolayers induced by polymeric gegenions*." Langmuir 7(10): 2323-2329.

Chicco, A. J. and Sparagna, G. C. (2007). "*Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease*." American Journal of Physiology-Cell Physiology 292(1): C33-C44.

Chiu, W., Avila-Sakar, A. J., et al. (1997). "*Electron crystallography of macromolecular periodic arrays on phospholipid monolayers*." Advances in Biophysics 34(0): 161-172.

Christie, W. and Han, X. (2010). "*Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis. 4*." The Oily Press, Bridgwater, England.

Cornell, D. G. and Carroll, R. J. (1983). "*Electron microscopy of lipid—protein monolayers*." Colloids and Surfaces 6(4): 385-393.

Cremer, P. S. and Boxer, S. G. (1999). "*Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports*." The Journal of Physical Chemistry B 103(13): 2554-2559.

Criado, M. and Keller, B. U. (1987). "*A membrane fusion strategy for single-channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes*." Febs Letters 224(1): 172-176.

Daum, G. (1985). "*Lipids of mitochondria*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes 822(1): 1-42.

de Gruijl, F. R., van Kranen, H. J., et al. (2001). "*UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer*." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63(1–3): 19-27.

de Meijere, K., Brezesinski, G., et al. (1997). "*Polyelectrolyte coupling to a charged lipid monolayer*." Macromolecules 30(8): 2337-2342.

DeSimone, J. A. (1978). "*The electrostatic contribution of divalent ions to the surface pressure of charged monolayers*." Journal of Colloid and Interface Science 67(2): 381-383.

Domingues, M. M., Bianconi, M. L., et al. (2013). "*rBPI21 interacts with negative membranes endothermically promoting the formation of rigid multilamellar structures*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1828(11): 2419-2427.

Dunford, H. B. (1987). "*Free radicals in iron-containing systems*." Free Radical Biology and Medicine 3(6): 405-421.

Dutta, P., Peng, J. B., et al. (1987). "*erste Röntgendiffraktion*." Phys. Rev. Lett. 58: 2228.

Dyck, M., Krüger, P., et al. (2005). "*Headgroup organization and hydration of methylated phosphatidylethanolamines in Langmuir monolayers*." PCCP 7: 150-156.

Eftaiha, A. a. F., Brunet, S. M. K., et al. (2012). "*Thermodynamic and structural characterization of a mixed perfluorocarbon–phospholipid ternary monolayer surfactant system*." Journal of Colloid and Interface Science 368(1): 356-365.

Elstner, E. F. (1982). "*Oxygen Activation and Oxygen Toxicity*." Annual Review of Plant Physiology 33(1): 73-96.

Elstner, E. F. (1990). *Der Sauerstoff : Biochemie, Biologie, Medizin*. Mannheim; Zürich [etc.], BI Wissenschaftsverlag.

Estes, D. J. and Mayer, M. (2005). "*Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1712(2): 152-160.

Estralda-Lopis, I., Brezesinski, G., et al. (2001). "*Dipalmitoyl-phosphatidylcholine/phospholipase D interactions investigated with polarization-modulated infrared reflection absorbtion spectroscopy*." Biophys. J. 80: 749-754.

Flach, C. R., Brauner, J. W., et al. (1994). "*External reflection FTIR of peptide monolayer films in-situ at the air/water interface — experimental-design, spectra-structure correlations, and effects of hydrogen–deuterium exchange*." Biophys. J. 67: 402-410.

Florsheimer, M. and Mohwald, H. (1989). "*Development of equilibrium domain shapes in phospholipid monolayers*." Chem Phys Lipids 49(4): 231-241.

Flörsheimer, M. and Möhwald, H. (1989). "*Development of equilibrium domain shapes in phospholipid monolayers*." Chemistry and Physics of Lipids 49(4): 231-241.

Frahm, R., Weigelt, J., et al. (1995). "*X-ray undulator beamline BW1 at DORIS III*." Review of Scientific Instruments 66(2): 1677-1680.

Garidel, P. and Blume, A. (1999). "*Interaction of Alkaline Earth Cations with the Negatively Charged Phospholipid 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol: A Differential Scanning and Isothermal Titration Calorimetric Study*." Langmuir 15(17): 5526-5534.

Garidel, P. and Blume, A. (2005). "*1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) monolayers: influence of temperature, pH, ionic strength and binding of alkaline earth cations*." Chemistry and Physics of Lipids 138(1–2): 50-59.

Gebert, H. (2000). "*F 5 Langmuir – Blodgett – Technik*." Anleitung physikalisches Praktikum für Fortgeschrittene - UNI- Potsdam.

Giess, F., Friedrich, M. G., et al. (2004). "*The Protein-Tethered Lipid Bilayer: A Novel Mimic of the Biological Membrane*." Biophysical Journal 87(5): 3213-3220.

Gilgun-Sherki, Y., Barhum, Y., et al. (2005). "*Analysis of gene expression in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis after treatment with a novel brain-penetrating antioxidant*." Journal of Molecular Neuroscience 27(1): 125-135.

Göbel, H. D. (1989). "*Fluoreszenz-, röntgen-und elektronenoptische Untersuchung von Phasenverhalten, Mikrostruktur und Polymerisation monomolekularer Schichten aus vernetzbaren Lipiden*."

Gosslau, A. and Rensing, L. (2002). "*Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen*." Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 35(2): 139-150.

Graf, E., Mahoney, J. R., et al. (1984). "*Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site*." Journal of Biological Chemistry 259(6): 3620-3624.

Grainger, D. W., Reichert, A., et al. (1990). "*Hydrolytic action of phospholipase A2 in monolayers in the phase transition region: direct observation of enzyme domain formation using fluorescence microscopy*." Biochim Biophys Acta 1023(3): 365-379.

Gregoriadis, G. (1995). "*Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems*." Trends in Biotechnology 13(12): 527-537.

Greifenberg, S. (2014, 20.08.2014). "*Radikalfänger.*" Retrieved 15.09, 2014, from http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/im/antioxsys/antioxsys.vlu/Page/vsc/de/ch/16/im/antioxsys/mesomerie.vscml.html.

Gröger, T., Nathoo, S., et al. (2012). "*Real-time imaging of lipid domains and distinct coexisting membrane protein clusters*." Chemistry and Physics of Lipids 165(2): 216-224.

Gröning, A., Ahrens, H., et al. (2011). "*Molecular mechanisms of phosphatidylcholine monolayer solidification due to hydroxyl radicals*." Soft Matter 7(14): 6467-6476.

Günther, J.-U. (2009). "*Röntgenographische Untersuchungen lateraler Strukturen in molekular dünnen Polyelektrolytfilmen an der Luft-Wasser-Grenzfläche*."Universitätsbibliothek

Günther, J. U., Ahrens, H., et al. (2009). "*Two-Dimensional Lamellar Phase of Poly(styrene sulfonate) Adsorbed onto an Oppositely Charged Lipid Monolayer*." Langmuir 25(3): 1500-1508.

Günzler, H. and Gremlich, H.-U. (2012). *IR-spektroskopie*, John Wiley & Sons.

Gutteridge, J. M. (1987). "*Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA*." Biochem J 243(3): 709-714.

Hacker, G. and Vogel, H. (1999). "*Grundlagen der Teilchenphysik.*" Retrieved 28.04, 2015, from http://erlangen.physicsmasterclasses.org/exp_forsc/desy_hasylab_uebersicht.gif.

Halliwell and Gutteridge (2007). "*Free radicals in biology and medicine Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. The Clarendon Press, Oxford University Press, New York, NY 10016. 1985. xii + 346 pp. 16.2 × 24.2 cm. ISBN: 0–19–8541376. $35.00*." (4. Edition).

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. New York, Oxford University Press.

Hamdane, D., Zhang, H., et al. (2008). "*Oxygen Activation by Cytochrome P450 Monooxygenase*." Photosynthesis research 98(1-3): 657-666.

Harrison, D., Griendling, K. K., et al. (2003). "*Role of oxidative stress in atherosclerosis*." The American Journal of Cardiology 91(3, Supplement): 7-11.

Hart, M. H. (1978). "*The evolution of the atmosphere of the earth*." Icarus 33(1): 23-39.

Haynes, W. M. (2010). *CRC handbook of chemistry and physics*, CRC press.

Haynes, W. M. (2010-11). *Handbook of Chemistry and Physics*. Cleveland, OH, CRC-press.

Heckl, W. M., Cadenhead, D. A., et al. (1988). "*Cholesterol Concentration Dependence of Quasi-Crystalline Domains in Mixed Monolayers of the Cholesterol-Dimyristoylphosphatidic Acid System*." Langmuir 4: 1352-1358.

Helm, C. A. (1988). *Röntgenographische und optische Untersuchungen zur Ordnung von Lipid-Monoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche*.

Helm, C. A., Laxhuber, L. A., et al. (1986). "*Electrostatic Interactions in Phospholipid Membranes I: Influence of Monovalent Ions*." Colloid & Polymer Sci. 264: 46-55.

Helm, C. A. and Möhwald, H. (1988). "*Equilibrium and Nonequilibrium Features Determining Superlattices in Phospholipid Monolayers*." J. Phys. Chem. 92: 1262-1266.

Helm, C. A., Möhwald, H., et al. (1987). "*Phospholipid Monolayer Density Distribution Perpendicular to the Water Surface. A Synchrotron X-ray Reflection Study*." Europhys. Lett. 4: 697-703.

Helm, C. A., Tippmann-Krayer, P., et al. (1991). "*The Phases of Phosphatidyl Ethanolamine Monolayers Studied by Synchrotron X-ray Scattering*." Biophys. J. 60: 1457-1476.

Hénon, S. and Meunier, J. (1991). "*Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers*." Review of Scientific Instruments 62(4): 936-939.

Herold, C., Chwastek, G., et al. (2012). "*Efficient Electroformation of Supergiant Unilamellar Vesicles Containing Cationic Lipids on ITO-Coated Electrodes*." Langmuir 28(13): 5518-5521.

Hoenig, D. and Moebius, D. (1991). "*Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy*." The Journal of Physical Chemistry 95(12): 4590-4592.

Hohner, A., David, M., et al. (2010). "*Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces*." Biointerphases 5(1): 1-8.

Holland, H. D. (2006). "*The oxygenation of the atmosphere and oceans*." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 361(1470): 903-915.

Hönig, D. and Möbius, D. (1992). "*Reflectometry at the Brewster angle and Brewster angle microscopy at the air-water interface*." Thin Solid Films 210–211, Part 1(0): 64-68.

Imlay, J. A. (2003). "*PATHWAYS OF OXIDATIVE DAMAGE*." Annual Review of Microbiology 57(1): 395-418.

Immordino, M. L., Dosio, F., et al. (2006). "*Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*." International Journal of Nanomedicine 1(3): 297-315.

Ishimura, Y., Nozaki, M., et al. (2002). . Oxygen and Life: Oxygenases, Oxydases and Lipid Mediators. Excerpta Medica. International Congress Series 1233. Amsterdam, Elsevier.

Jacobson, K. and Papahadjopoulos, D. (1975). "*Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations*." Biochemistry 14(1): 152-161.

Jiménez Del Río, M. and Vélez-Pardo, C. (2004). "*Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration*." Archives of Medical Research 35(3): 185-193.

Juang, R.-S. and Chen, M.-N. (1996). "*Measurement of Binding Constants of Poly(ethylenimine) with Metal Ions and Metal Chelates in Aqueous Media by Ultrafiltration*." Industrial & Engineering Chemistry Research 35(6): 1935-1943.

Jung, H., Kim, J., et al. (2006). "*Atomic force microscopy observation of highly arrayed phospholipid bilayer vesicle on a gold surface*." J Biosci Bioeng 102(1): 28-33.

Junge, C. (1981). "*Die Entwicklung der Erdatmosphäre und ihre Wechselbeziehung zur Entwicklung der Sedimente und des Lebens*." Naturwissenschaften 68(5): 236-244.

Kaganer, V. M., Möhwald, H., et al. (1999). "*Structure and phase transitions in Langmuir monolayers*." Reviews of Modern Physics 71: 779-819.

Kaganer, V. M., Peterson, I. R., et al. (1995). "*Tilted phases of fatty acid monolayers*." The Journal of Chemical Physics 102(23): 9412-9422.

Kanao, R., Yokoi, M., et al. (2015). "*UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase η and/or ι*." DNA Repair(0).

Keller, C. and Kasemo, B. (1998). "*Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance*." Biophysical Journal 75(3): 1397-1402.

Kerth, A. (2003). "*Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid-und Flüssigkristall-Filmen an der Luft/Wasser-Grenzfläche*." Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät.

Kjaer, K. (1994). "*Some simple ideas on X-ray reflection and grazing-incidence diffraction from thin surfactant films*." Physica B: Condensed Matter 198(1–3): 100-109.

Kjaer, K. (1994). "*Some simple ideas on X-ray reflection and grazing-incidence diffraction from thin surfactant films*." Physica B 198: 100-109.

Kjaer, K., Als-Nielsen, J., et al. (1987). "*Ordering in Lipid Monolayers Studied by Synchrotron X-Ray Diffraction and Fluorescencee Microscopy*." Phys. Rev. Lett. 58: 2224-2227.

Kjaer, K., Als-Nielsen, J., et al. (1988). "*An X-ray Scattering Study of Lipid Monolayers at the Air-Water Interface and on Solid Supports*." Thin Solid Films 159: 17-28.

Kjaer, K., Als-Nielsen, J., et al. (1989). "*Synchrotron X-ray Diffraction and Reflection Studies of Arachidic Acid Monolayers at the Air-Water Interface*." J. Phys. Chem. 93: 3200-3206.

Knight, J. (2000). "*Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system*." Annals of Clinical & Laboratory Science 30(2): 145-158.

Knoll, W., Frank, C. W., et al. (2000). "*Functional tethered lipid bilayers*." Reviews in Molecular Biotechnology 74(3): 137-158.

Kolter, T., Hartmann-Schreier, J., (2007). Phospholipide. Römpp.

Kramer, A., Wintergalen, A., et al. (2000). "*Distribution of the Surfactant-Associated Protein C within a Lung Surfactant Model Film Investigated by Near-Field Optical Microscopy*." Biophysical Journal 78(1): 458-465.

Kunath-Fandrai, G. (2004). Innovation. Das Magazin von Carl Zeiss. 14.

Lang, H., Duschl, C., et al. (1994). "*A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces*." Langmuir 10(1): 197-210.

Lassmann, H., Brück, W., et al. (2007). "*The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview*." Brain Pathology 17(2): 210-218.

Lenhert, S., Mirkin, C. A., et al. (2010). "*In situ lipid dip-pen nanolithography under water*." Scanning 32(1): 15-23.

Lewis, R. and McElhaney, R. N. (1996). "*Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes*." Infrared spectroscopy of biomolecules: 159-202.

Lewis, R. N. A. H. and McElhaney, R. N. (2009). "*The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1788(10): 2069-2079.

Lewis, R. N. A. H. and McElhaney, R. N. (2013). "*Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1828(10): 2347-2358.

Lewis, R. N. A. H., Zweytick, D., et al. (2007). "*Calorimetric, X-Ray Diffraction, and Spectroscopic Studies of the Thermotropic Phase Behavior and Organization of Tetramyristoyl Cardiolipin Membranes*." Biophysical Journal 92(9): 3166-3177.

Lian, T. and Ho, R. J. Y. (2001). "*Trends and developments in liposome drug delivery systems*." Journal of Pharmaceutical Sciences 90(6): 667-680.

Lin, S.-S. and Gurol, M. D. (1998). "*Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on iron oxide: Kinetics, mechanism, and implications*." Environ. Sci. Technol. 32: 1417-1423.

Lind, M. D., Hamor, M. J., et al. (1964). "*Stereochemistry of Ethylenediaminetetraacetato Complexes. II. The Structure of Crystalline Rb[Fe(OH2)Y].H2O. III. The Structure of Crystalline Li[Fe(OH2)Y.2H2O*." Inorganic Chemistry 3(1): 34-43.

Lösche, M., Helm, C. A., et al. (1985). "*Formation of Langmuir-Blodgett Films via Electrostatic Control of the Lipid/Water Interface*." Thin Solid Films 133: 51-64.

Lösche, M. and Möhwald, H. (1984). "*Fluorescence microscope to observe dynamical processes in monomolecular layers at the air/water interface*." Rev. Sci. Instrum. 55(12): 1968-1972.

M. C. R. Symons, J. M. C. G. (1998). "*Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology, and Medicine*." Oxford Science Publications(Edition: 1st).

Mager, M. D. and Melosh, N. A. (2007). "*Lipid Bilayer Deposition and Patterning via Air Bubble Collapse*." Langmuir 23(18): 9369-9377.

Maget-Dana, R. (1999). "*The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1462(1–2): 109-140.

Maltseva, E., Kerth, A., et al. (2005). "*Adsorption of Amyloid β (1–40) Peptide at Phospholipid Monolayers*." ChemBioChem 6(10): 1817-1824.

Manley, S. and Gordon, V. D. (2001). Making Giant Unilamellar Vesicles via Hydration of a Lipid Film. Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, Inc.

McCord, J. M. (2000). "*The evolution of free radicals and oxidative stress*." The American Journal of Medicine 108(8): 652-659.

McMillin, J. B. and Dowhan, W. (2002). "*Cardiolipin and apoptosis*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1585(2–3): 97-107.

Međedović, S. and Locke, B. R. (2006). "*Platinum catalysed decomposition of hydrogen peroxide in aqueous-phase pulsed corona electrical discharge*." Applied Catalysis B: Environmental 67(3–4): 149-159.

Mendelsohn, R., Brauner, J. W., et al. (1995). "*External infrared reflection-absorption spectrometry of monolayer films at the air-water-interface*." Annu. ReV. Phys. Chem. 46: 305-334.

Mendelsohn, R. and Mantsch, H. (1986). "*Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction*." Progress in lipid protein interactions 2: 103-146.

Mendelsohn, R., Mao, G., et al. (2010). "*Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1798(4): 788-800.

Mennicke, U. and Salditt, T. (2002). "*Preparation of Solid-Supported Lipid Bilayers by Spin-Coating*." Langmuir 18(21): 8172-8177.

Möhwald, H. (1990). "*Phospholipid and phospholipid protein monolayers at the air/water interface*." Annual Review of Physical Chemistry 41: 441-476.

Möhwald, H. (1993). "*Surfactant layers at water surfaces*." Reports on Progress in Physics 56(5): 653.

Möhwald, H. (2009). "*Amphiphile Monolayers at the Air/ Water Interface*." Max Planck Institut aof Colloids and Interfaces-Vortrag.

Montal, M. and Mueller, P. (1972). "*Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties*." Proceedings of the National Academy of Sciences 69(12): 3561-3566.

Montes, L. R., Alonso, A., et al. (2007). "*Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions*." Biophysical Journal 93(10): 3548-3554.

Moriwaki, S.-I., Ray, S., et al. (1996). "*The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: Reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability*." Mutation Research/DNA Repair 364(2): 117-123.

Moscho, A., Orwar, O., et al. (1996). "*Rapid preparation of giant unilamellar vesicles*." Proceedings of the National Academy of Sciences 93(21): 11443-11447.

Mueller, P., Rudin, D. O., et al. (1962). "*Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System*." Nature 194(4832): 979-980.

Müller, L., Carmele, D., et al. "*Röntgenbeugung und Reflektometrie.*" Physikalisches Institut B, RWTH Aachen. Retrieved 07.06, 2012, from http://institut2a.physik.rwth-aachen.de/de/teaching/praktikum/Anleitungen/FK04-Roentgenbeugung.pdf.

Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2001). "*The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors*." Advanced Drug Delivery Reviews 53(3): 285-305.

Neville, F., Cahuzac, M., et al. (2006). "*Lipid Headgroup Discrimination by Antimicrobial Peptide LL-37: Insight into Mechanism of Action*." Biophysical Journal 90(4): 1275-1287.

Nohl, H. (1994). "*Biologie und Toxikologie des Sauerstoffs*." Chirurgische Forschung. Die Milz, Sauerstoffradikale und Reperfusionsvorgänge. Zuckschwerdt-Verlag, München: 59-80.

Nollert, P., Kiefer, H., et al. (1995). "*Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces*." Biophysical Journal 69(4): 1447-1455.

O'leary, W. and Wilkinson, S. (1988). "*Gram-positive bacteria*." Microbial lipids 1: 117-201.

Oberley, L. W. (1988). "*Free radicals and diabetes*." Free Radical Biology and Medicine 5(2): 113-124.

Ogawa, Y., Kodaka, M., et al. (2002). "*Trigger lipids inducing pH-dependent liposome fusion*." Chemistry and Physics of Lipids 119(1–2): 51-68.

Olanow, C. W. (1990). "*Oxidation reactions in Parkinson's disease*." Neurology 40(10 Suppl 3): suppl 32-37; discussion 37-39.

Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., et al. (2001). "*Decreased Cardiolipin Synthesis Corresponds with Cytochromec Release in Palmitate-induced Cardiomyocyte Apoptosis*." Journal of Biological Chemistry 276(41): 38061-38067.

Ott, M., Robertson, J. D., et al. (2002). "*Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process*." Proceedings of the National Academy of Sciences 99(3): 1259-1263.

Pace, G. W. and Leaf, C. D. (1995). "*The role of oxidative stress in HIV disease*." Free Radical Biology and Medicine 19(4): 523-528.

Pautot, S., Frisken, B. J., et al. (2003). "*Engineering asymmetric vesicles*." Proceedings of the National Academy of Sciences 100(19): 10718-10721.

Pelicano, H., Carney, D., et al. (2004). "*ROS stress in cancer cells and therapeutic implications*." Drug Resistance Updates 7(2): 97-110.

Pericet-Camara, R., Papastavrou, G., et al. (2006). "*Interaction forces and molecular adhesion between pre-adsorbed poly(ethylene imine) layers*." Journal of Colloid and Interface Science 296(2): 496-506.

Pott, T., Bouvrais, H., et al. (2008). "*Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions*." Chemistry and Physics of Lipids 154(2): 115-119.

Pryor, W. A. (1986). "*Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions*." Annual Review of Physiology 48(1): 657-667.

Rainier, S., Jain, M. K., et al. (1979). "*Phase transition characteristics of diphosphatidylglycerol (cardiolipin) and stereoisomeric phosphatidyldiacylglycerol bilayers: Mono- and divalent metal ion effects*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 558(2): 187-198.

Rehder, D. (2007). Bioanorganische Chemie I (Eisen, Molybdän und Nickel). Vorlesungsskriptum zur Vorlesung im Wintersemester 2006/2007. Uni-Hamburg.

Reimhult, E., Höök, F., et al. (2002). "*Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†*." Langmuir 19(5): 1681-1691.

Reimhult, E., Höök, F., et al. (2002). "*Vesicle adsorption on SiO2 and TiO2: Dependence on vesicle size*." The Journal of Chemical Physics 117(16): 7401-7404.

Reiter, R., Motschmann, H., et al. (1992). "*Ellipsometric microscopy. Imaging monomolecular surfactant layers at the air-water interface*." Langmuir 8(7): 1784-1788.

Reviakine, I. and Brisson, A. (2000). "*Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy*." Langmuir 16(4): 1806-1815.

Richmond, D. L., Schmid, E. M., et al. (2011). "*Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents*." Proceedings of the National Academy of Sciences.

Richter, R., Mukhopadhyay, A., et al. (2003). "*Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study*." Biophysical Journal 85(5): 3035-3047.

Rossi, C. and Chopineau, J. (2007). "*Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies*." European Biophysics Journal 36(8): 955-965.

Rytomaa, M. and Kinnunen, P. K. (1995). "*Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions*." J Biol Chem 270(7): 3197-3202.

Sachse, C. (2003). "*19F-Festkörper-NMR-Untersuchungen zur Orientierung und Dynamik des antimikrobiellen Peptids PGLa in Lipidmembranen*." Insitut für Biochemie und Biophysik: 145.Friedrich-Schille-Universität Jena

Sarkar, R., Pal, P., et al. (2010). "*On the origin of iron-oxide nanoparticle formation using phospholipid membrane template*." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 79(2): 384-389.

Schäfer, J., Höbel, S., et al. (2010). "*Liposome–polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery*." Biomaterials 31(26): 6892-6900.

Schirrmeister, B. E., de Vos, J. M., et al. (2013). "*Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event*." Proceedings of the National Academy of Sciences 110(5): 1791-1796.

Schmitt, J., Mächtle, P., et al. (1999). "*Preparation and Optical Properties of Colloidal Gold Monolayers*." Langmuir 15: 3256-3266.

Shapovalov, V. L., Dittrich, M., et al. (2010). "*Use of Total Reflection X-ray Fluorescence (TRXF) for the Quantification of DNA Binding to Lipid Monolayers at the Air−Water Interface*." Langmuir 26(18): 14766-14773.

Shapovalov, V. L., Ryskin, M. E., et al. (2007). "*Elemental analysis within the electrical double layer using total reflection X-ray fluorescence technique*." Journal of Physical Chemistry B 111(15): 3927-3934.

Soltwedel, O. (2011). "*Bestimmung und Beeinflußung von lateralen und vertikalen Eigenschaften von Polyelektroltymultischichten*." Institut of Physics.Uni-Greifswald

Staneva, G., Angelova, M. I., et al. (2004). "*Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes*." Chemistry and Physics of Lipids 129(1): 53-62.

Stefaniu, C. and Brezesinski, G. (2014). "*Grazing incidence X-ray diffraction studies of condensed double-chain phospholipid monolayers formed at the soft air/water interface*." Advances in Colloid and Interface Science 207(0): 265-279.

Stefaniu, C., Brezesinski, G., et al. (2014). "*Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces*." Advances in Colloid and Interface Science 208(0): 197-213.

Stefánsson, A. (2007). "*Iron(III) Hydrolysis and Solubility at 25 °C*." Environmental Science & Technology 41(17): 6117-6123.

Sugiyama, M., Matsuura, M., et al. (2004). "*Possible mechanism of polycation liposome (PCL)-mediated gene transfer*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1660(1–2): 24-30.

Sweeney, S. E. and Firestein, G. S. (2004). "*Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation*." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36(3): 372-378.

Taylor, P., Xu, C., et al. (2003). "*A novel technique for preparation of monodisperse giant liposomes*." Chemical Communications(14): 1732-1733.

Thoma, M., Schwendler, M., et al. (1996). "*Ellipsometry and X-ray Reflectivity Studies on Monolayers of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine in Contact with n-Dodecane, n-Hexadecane and Bicyclohexyl*." Langmuir 12: 1722-1728.

Tippmann-Krayer, P. (1991). *Röntgen-, elektronen-und lichtoptische Studien der temperaturabhängigen Struktur und Stabilität ultradünner organischer Schichten*, na.

Tocanne, J. F., Ververgaert, P. H. J. T., et al. (1974). "*A monolayer and freeze-etching study of charged phospholipids I. Effects of ions and pH on the ionic properties of phosphatidylglycerol and lysylphosphatidylglycerol*." Chemistry and Physics of Lipids 12(3): 201-219.

Tolan, M. (1999). *X–ray Scatering from Soft–Matter Thin Films*
Heidelberg, Springer.

Torchilin, V. P. (2001). "*Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems*." Journal of Controlled Release 73(2–3): 137-172.

Trong Nguyen, Q., Jyline, Y., et al. (1981). "*Concentration of cupric and nickel ions by complexation-ultrafiltration. Synergic effect of succinic acid*." Desalination 36(3): 277-283.

Tsukanova, V., Grainger, D., et al. (2002). "*Monolayer Behavior of NBD-Labeled Phospholipids at the Air/Water Interface*." Langmuir 18: 5539-5550.

Tsukanova, V., Grainger, D. W., et al. (2002). "*Monolayer Behavior of NBD-Labeled Phospholipids at the Air/Water Interface*." Langmuir 18(14): 5539-5550.

TU-München (2009). Erzeugung und Untersuchung monomolekularer Schichten mit Hilfe einer Filmwaage. I. o. Physic.

Un, K., Sakai-Kato, K., et al. (2012). "*Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes*." Biomaterials 33(32): 8131-8141.

Vollhardt, D. (2014). "*Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface*." Current Opinion in Colloid & Interface Science 19(3): 183-197.

Wagner, K. and Brezesinksi, G. (2007). "*Phospholipase D activity is regulated by product segregation and the structure formation if phoshatidic acid within model membranes*." Biophys. J. 93: 2373-2383.

Walters, R. W., Jenq, R. R., et al. (2000). "*Distinct Steps in the Adsorption of Pulmonary Surfactant to an Air-Liquid Interface*." Biophysical Journal 78(1): 257-266.

Wang, S. and Shi, X. (2001). "*Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis*." Molecular and Cellular Biochemistry 222(1-2): 3-9.

Wang, W., Pleasants, J., et al. (2012). "*Amorphous iron-(hydr) oxide networks at liquid/vapor interfaces: In situ X-ray scattering and spectroscopy studies*." Journal of Colloid and Interface Science 384(1): 45-54.

Wang, Z., Klipfell, E., et al. (2011). "*Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease*." Nature 472(7341): 57-63.

Wei, Y.-H. (1998). "*Oxidative Stress and Mitochondrial DNA Mutations in Human Aging*." Experimental Biology and Medicine 217(1): 53-63.

Weis, R. M. (1991). "*Fluorescence microscopy of phospholipid monolayer phase transitions*." Chemistry and Physics of Lipids 57(2–3): 227-239.

Weiss, J. (1952). The Free Radical Mechanism in the Reactions of Hydrogen peroxide. Advances in Catalysis. V. I. K. W.G. Frankenburg and E. K. Rideal, Academic Press. Volume 4:343-365.

Wesołowska, O., Michalak, K., et al. (2009). "*Giant unilamellar vesicles—a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems*." Acta Biochim. Pol 56: 33-39.

Wilkinson, S. (1988). "*Gram-negative bacteria*." Microbial lipids 1: 299-488.

Wolff, S. P. (1993). "*Diabetes mellitus and free radicals: Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications*." British Medical Bulletin 49(3): 642-652.

Wong, J. Y., Majewski, J., et al. (1999). "*Polymer-Cushioned Bilayers. I. A Structural Study of Various Preparation Methods Using Neutron Reflectometry*." Biophysical Journal 77(3): 1445-1457.

Wu, G., Majewski, J., et al. (2005). "*Interaction between Lipid Monolayers and Poloxamer 188: An X-Ray Reflectivity and Diffraction Study*." Biophysical Journal 89(5): 3159-3173.

Wydro, P., Flasiński, M., et al. (2012). "*Molecular organization of bacterial membrane lipids in mixed systems—A comprehensive monolayer study combined with Grazing Incidence X-ray Diffraction and Brewster Angle Microscopy experiments*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1818(7): 1745-1754.

Yamashita, Y., Oka, M., et al. (2002). "*A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1561(2): 129-134.

Yang, L. and Alexandridis, P. (2000). "*Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids*." Current Opinion in Colloid & Interface Science 5(1–2): 132-143.

Zezin, A. B., Kabanov, N. M., et al. (1977). "*Ternary polymer-metal complexes based on polyacrylic acid, linear polyethyleneimine and copper*." Polymer Science U.S.S.R. 19(1): 138-146.

Zhou, R., Palmer, V., et al. (1994). "*Removal of inorganic ions by polymer-based colloid-enhanced membrane filtration in aqueous solution*." Water Research 28(5): 1257-1260.

Zhou, Y., Berry, C. K., et al. (2007). "*Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation*." Biomaterials 28(6): 1298-1306.

Zhu, Q., Shentu, B., et al. (2006). "*Swelling behavior of polyethylenimine–cobalt complex in water*." European Polymer Journal 42(6): 1417-1422.

X Anhang

10.1 Radikalangriffe auf Lipidmonoschichten durch die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Herstellung von Hydroxyl-Radikalen die Fenton-Reaktion genutzt. Der Nachteil dieser Reaktion ist das Vorhanden sein von Eisen-Ionen. Diese müssen durch EDTA Moleküle abgefangen werden, bevor sie an den negativ geladenen Lipiden binden. Auch die EDTA Moleküle selbst wechselwirken mit den Lipiden. In diesem Kapitel wird eine andere Methode zur Herstellung von Hydroxyl-Radikalen verwendet. Die katalytische Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin. Der große Unterschied zur Fenton-Reaktion ist, dass die Radikale nicht heterogen in der gesamten Lösung sondern homogen am Platinnetz bzw. am Platinplättchen entstehen. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass kein EDTA und keine Eisen-Ionen benötigt werden, die mit den Lipiden wechselwirken (vgl. Kap. IV, V). In der Literatur finden sich unterschiedliche Meinungen, ob es bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxid an Platin zur Freisetzung von Hydroxyl-Radikalen kommt [Weiss 1952] oder ob sie nur auf der Oberfläche existieren [Međedović 2006]. In diesem Abschnitt wurden die Hydroxyl-Radikale mithilfe der katalytischen Zersetzung von Wasserstoffperoxid erzeugt und deren Wechselwirkung mit DPPC Monoschichten bzw. DMPC Liposomen untersucht.

Isotherme

Abbildung 10.1 zeigt die Druck/Flächen Isothermen von DPPC vor und nach dem Radikalangriff. Diese wurden mit einer Filmwaage von Riegler & Kirstein (R & K, Potsdam, Germany) aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einem Thermostat (DC-30 Thermo-Haake, Haake-Technik, Karlsruhe, Germany) eingestellt und der Oberflächendruck mit einen Wilhelmy-Messsystem gemessen. Ein Filterpapier dient als Wilhelmy-Plättchen (analog Kapitel 3.3). Auf dem Boden der Filmwaage wurde ein Platinnetz (3x5 cm^2) gelegt. Die Subphase bestand aus Reinstwasser. Der Abstand zwischen Platinnetz und Wasseroberfläche beträgt ca. 1-2 mm. Nach dem Spreiten der DPPC-Lipidlösung wird 10 Minuten gewartet, damit das Chloroform sich verflüchtigen kann. Die Monoschicht wird dann mit einer Geschwindigkeit von 3-9 $Å^2$ $Molekül^{-1}$

min^{-1} komprimiert (schwarze Linie). Wenn der gewünschte Oberflächendruck (30 mN m^{-1}) für den Radikalangriff erreicht wird, wird die entsprechende Menge an H_2O_2 (0,5ml H_2O_2 9,88 mol L^{-1}) mit einer Nadel unter der Barriere in die Subphase injiziert. Während der Reaktion wurde die Fläche pro Molekül konstant gehalten. Nach 2 Stunden wurde die Monoschicht expandiert und wieder komprimiert (rote Linie).

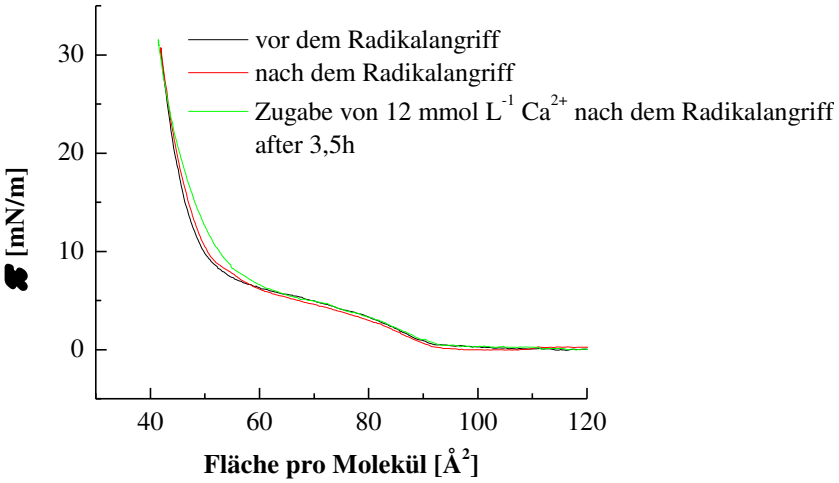


Abb. 10.1 Vor dem Radikalangriff wurde die DPPC Monoschicht bis zu einem Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert (schwarze Linie). Bei konstanter molekularer Fläche wurde 0,5 ml einer 9,88 mol L^{-1} Wasserstoffperoxid-Lösung unter der Barriere in die Subphase injiziert. Nach 2 Stunden wurde die Monoschicht vollständig expandiert und komprimiert (rote Linie). Anschließend wurden 12 mmol L^{-1} Ca^{2+} unter der Barriere in die Subphase injiziert. Nach 3,5 Stunden wurde die Monoschicht expandiert und komprimiert.

Vor der Injektion von H_2O_2 ist eine typische DPPC Isotherme auf Reinstwasser zu beobachten (schwarze Linie). Es ist ein Phasenübergang (1. Ordnung) von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase erkennbar, charakterisiert durch ein Koexistenzbereich. Der Übergangsdruck π_c ist 3,6 mN m^{-1}. Nach dem Radikalangriff sind keine Veränderungen der Isotherme zu beobachten (rote Linie). Dies bedeutet zwangsläufig nicht, dass durch die Radikale keine chemischen oder strukturellen Veränderungen der Lipide erfolgt sind, wie man in Kapitel 4.2 sehen konnte. Daher wurden 12 mmol L^{-1} $CaCl_2$ mit einer Nadel unter der Barriere in die Subphase injiziert und vorsichtigt gerührt. Nach 3,5 Stunden wurde die Monoschicht expandiert und wieder komprimiert (grüne Linie). Es sind keine Veränderungen zu beobachten.

DSC

Ein ähnliches Experiment wurde mit DMPC Liposomen durchgeführt. Diese wurden wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben hergestellt. Die Liposomen Suspension wurde anschließend in einem Becherglass mit Magnetrührstäbchen gegeben und mit einem Magnetrührer vorsichtig gerührt. Die Hydroxyl-Radikale wurden durch die katalytische Zersetzung von 3% Wasserstoffperoxid-Lösung (ca. 1 mol L^{-1}) hergestellt. Als Katalysator wurden zwei Platinschwarz Plättchen (je 1x2 cm^2) genutzt. In Abbildung 10.2 sind die Thermogramme von unilamellaren DMPC-Liposomen vor und nach Radikalangriffen dargestellt. Es ist nur eine kleine Veränderung der Thermogramme zu erkennen. Vor dem Radikalangriff (schwarze Linie) ist die Hauptumwandlungs-temperatur (T_m) 23,7 °C. Nach dem Radikalangriff (rote Linie) verschiebt sich T_m um 0,5 K. Auch die Halbwertsbreite $\Delta T_{m1/2}$ sowie die Umwandlungsenthlapie nehmen nur leicht zu (um 0,37 K bzw. um 5 kJ mol^{-1}). Bei Zugabe von 5 mmol L^{-1} bzw. 16 mmol L^{-1} $CaCl_2$ verschiebt sich die Hauptumwandlungstemperatur (T_m) jeweils nur um 0,3 K.

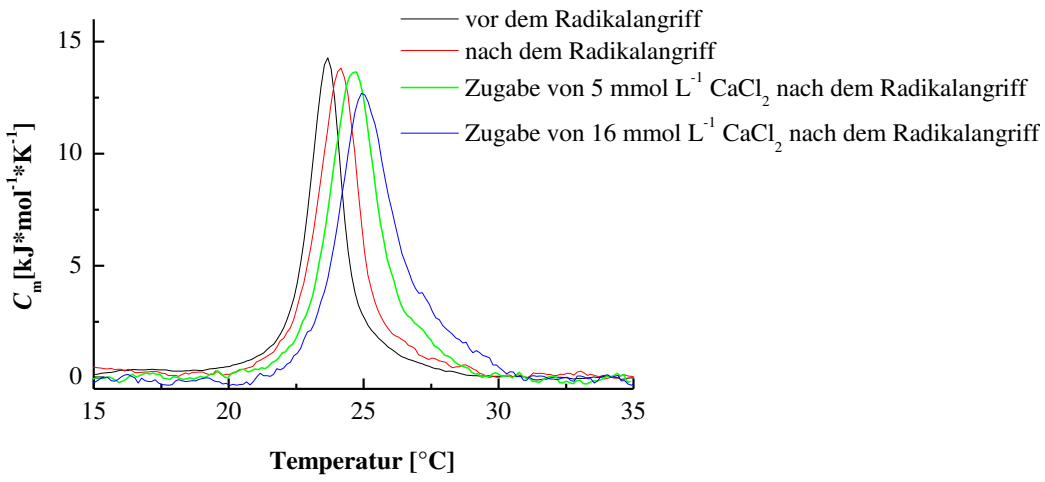


Abb.10.2 Thermogramme von unilamellaren DMPC-Liposomen vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem Radikalangriff. Nach dem Radikalangriff wurden zur Liposomen-Lösung 5 mmol L^{-1} (grüne Linie) bzw. 16 mmol L^{-1} (blaue Linie) hinzugegeben. Die Heizrate war 60 K min^{-1}.

Diskussion

Die Radikalangriffe, durch die katalytische Zersetzung von Wassersoffperoxid zeigen keine Veränderungen der Phasenumwandlung von DPPC Monoschichten sowie von DMPC Liposomen. Auch bei Radikalangriffen, die mit der Fenton-Reaktion durchgeführt wurden, konnte anfangs keine Veränderungen der Phasenumwandlung beobachtet werden, wenn die Konzentration von EDTA in hohem Überschuss vorlag. Erst durch Zugabe von divalenten Kationen konnte eine Veränderung der Phasenübergänge beobachtet werden, wodurch die Veränderungen der Lipide durch die Radikale sichtbar wurde (siehe Kapitel 4.2.). Bei den jetzigen Experimenten bewirkt auch eine Zugabe von divalenten Ionen keine Veränderungen des Phasenübergangs bei DPPC Monoschichten bzw. nur geringe Veränderungen des Phasenübergangs bei DMPC Liposomen. Die geringe Verschiebung der Hauptphasenumwandlungs-temperatur T_m kommt durch die eleketrostatische Wechselwirkung von DMPC Liposomen mit den zweifach geladenen Calcium Ionen zustande. Den gleichen Effekt haben auch Eisen-Ionen auf DMPC Liposomen (siehe Kapitel 4.4.1.1, Abb. 4.15). Da ansonsten keine Veränderungen statt finden, kann dies bedeuten, dass die Hydroxyl-Radikale nur auf der Platinoberfläche existieren, was die Theorie von Mededovic und Locke (2006) unterstützen würde. Beim Radikalangiff auf die DPPC Monoschicht wäre es auch denkbar, dass die Strecke vom Platinnetz bis zur Monoschicht (1-2 mm), die die Hydroxyl-Radikale durch Diffusion zurücklegen müssten, aufgrund der extrem kurzen Lebensdauer der Hydroxyl-Radikale, zu weit ist. Beim Radikalangriff auf DMPC Liposomen kann es nur zu Wechselwirkungen zwischen Hydroxyl-Radikalen und Lipiden kommen, wenn sich die Liposomen in unmittelbarer Nähe zu den Platinplätchen befinden. Durch das ständige Rühren sollte dieser Zustand des öfteren eintreffen. Dennoch sind keine Veränderungen zu beobachten. Trotzdem kann man nicht mit hundertprozentiger Sicherheit sagen, dass die Radikale keine Veränderungen der Lipide hervorrufen. Auf den Phasenübergang haben sie jedenfalls keinen Einfluss.

Zusammenfassung

Die Radikalangriffe durch die katalytische Zersetzung von Wassersoffperoxid zeigen keine Veränderungen der Phasenumwandlung von DPPC Monoschichten sowie von DMPC Liposomen. Die Theorie von Mededovic und Locke (2006), bei der die Hydroxyl-Radikale nur auf der Oberfläche existieren, würde dies erklären. Sollten die Radikale doch auf irgendeine Weise mit den Lipiden wechselwirken, hat dies jedoch keinen Einfluss auf die Phasenumwandlung.

Bei Radikalangriffen auf zwitterionisch geladenen Lipiden wären ohne das Vorhandensein von „freien“ Eisen-Ionen keine Veränderungen des Phasenübergangs bei Lipidmonoschichten sowie bei Liposomen beobachtbar gewesen (vgl. Kap. 4.2.). Das Anbinden der Eisen-Ionen an den Lipiden nach dem Radikalangriff und die dadurch verursachte Verfestigung war ein Marker für die chemisch strukturelle Veränderung der Lipide.

Bei der Untersuchung von Radikalangriffen auf negativ geladene Lipidmonoschichten können die Eisen-Ionen nicht als Marker benutzt werden, da die Eisen-Ionen an den negativ geladenen Lipiden auch ohne Radikalangriff binden. Wie man im vorherigen Kapitel gesehen hat, haben geringste Eisen-Ionen Konzentration Auswirkungen auf den Phasenübergang von negativ geladenen Lipiden. Eine Eisen-Ionen Konzentration von einem Mikromolar führt zur vollständigen Verfestigung der negativ geladenen Monoschicht bei einem physiologischen pH-Wert.

10.2 Radikalangriff auf eine DMPA Monoschicht IRRAS-Messungen

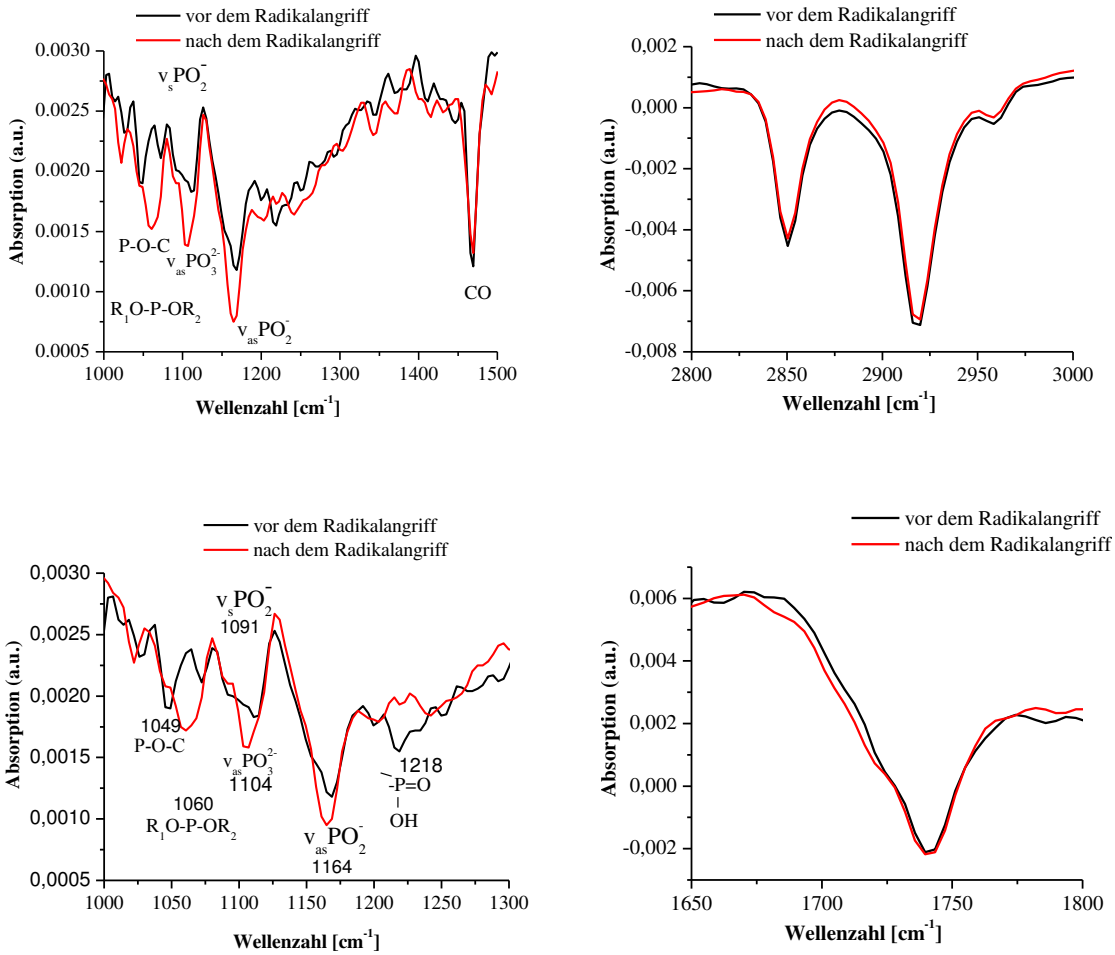


Abb. 10.3 p-polarisierte IRRA-Spektren einer DMPA-Monoschicht bei 21 °C vor (schwarze Linien) und nach (rote Linien) dem Radikalangriff mit einer Fenton-Konzentration von 2 mmol L^{-1}. Vor dem Radikalangriff wurde die Monoschicht bis zu einem lateralen Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert. Bei einer konstanten Fläche wurde wurde das IRRA Spektrum aufgenommen. Nach dem Radikalangriff wurde die Monoschicht vollständig expandiert und wieder bis zu einem lateralen Druck von 30 mN m^{-1} komprimiert. Ein weiteres IRRA-Sktrum wurde aufgenommen. Oben: typische IR-Banden von der Kopfgruppe (links) und den Alkylketten (rechts) vor und nach dem Radikalangriff. Unten: Vergrößerung der Schwingungsbanden der PO_2^- - (links) und der C=O (rechts) Gruppen.

10.3 Brewsterwinkel-Mikroskopie von TMCL auf einer 1 mmol L^{-1} $CaCl_2$-Lösung

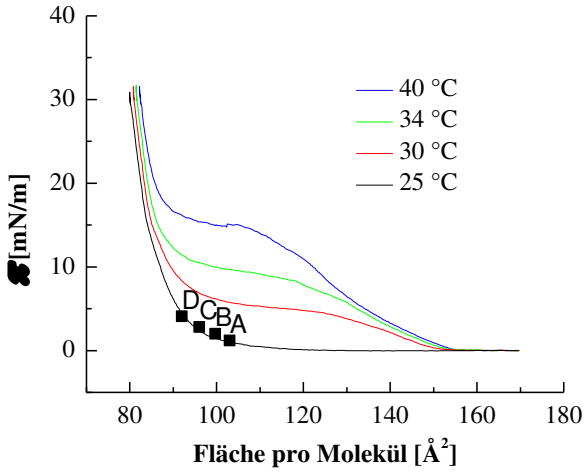


Abb. 10.4 π/A-Isothermen von TMCL auf einer 1 mmol L^{-1} $CaCl_2$-Lösung bei vier unterschiedlichen Temperaturen

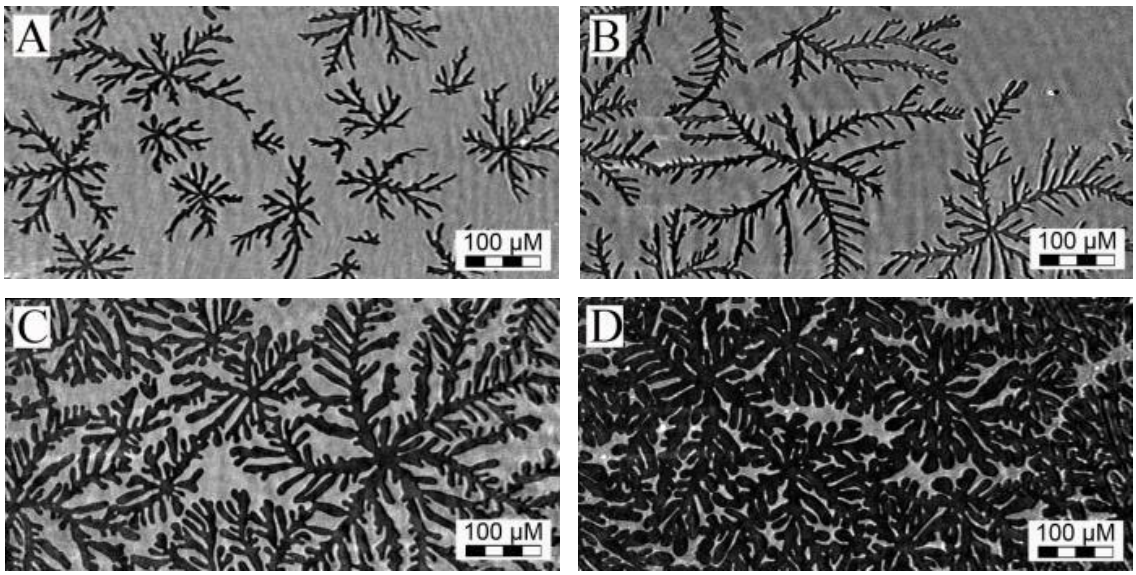


Abb. 10.5 Brewsterwinkel-Mikroskopie von TMCL Domänen auf einer 1 mmol L^{-1} konzentrierten $CaCl_2$-Lösung bei 25 °C. Die dazugehörigen molekuaren Flächen und lateralen Drücken bei denen die Bilder aufgenommen wurden sind aus der Abbildung 10.4 zu entnehmen.

10.4 Röntgenreflexion von DMPG mit adsorbiertem PEI

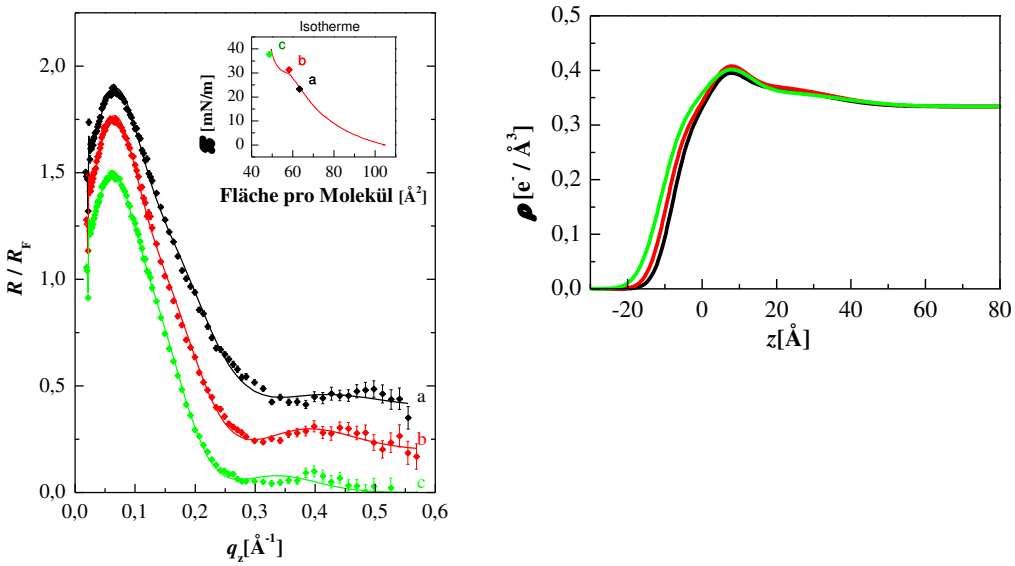


Abb. 10.6 Normierte Röntgenreflektivitäten (links) und die dazugehörigen Elektronendichteprofile (rechts) einer DMPG Monoschicht mit adsorbierten PEI (2 mmol L^{-1}), NaCl (2 mmol L^{-1}) und Na_2SO_4 (4 mmol L^{-1}) entlang der Isotherme.

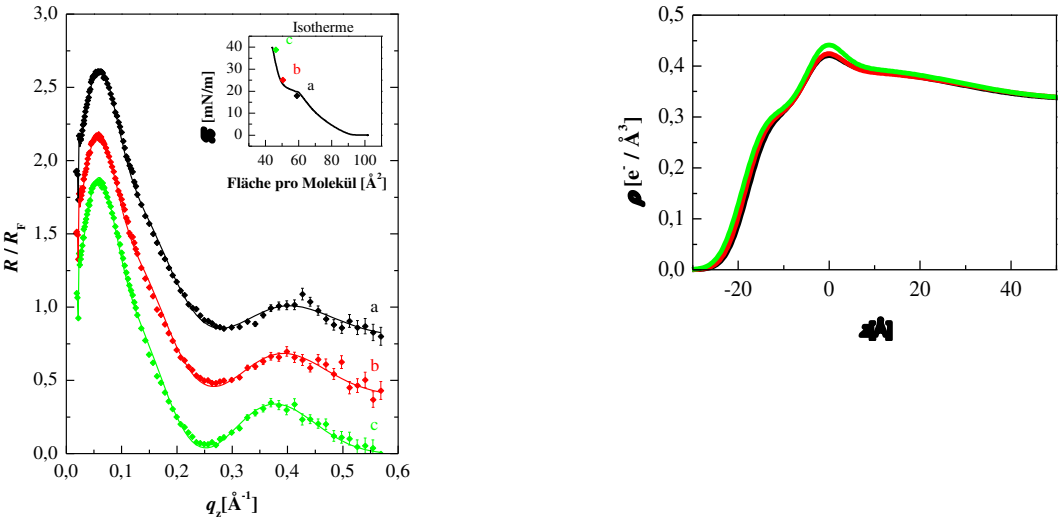


Abb. 10.7 Normierte Röntgenreflektivitäten (links) und die dazugehörigen Elektronendichteprofile (rechts) einer DMPG Monoschicht mit adsorbierten PEI (2 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) und $CuCl_2$ (4 mmol L^{-1}) sowie NaCl (2 mmol L^{-1}). Die Isothermen sowie der laterale Druck und die dazu gehörige molekulare Fläche, bei dem die Messungen durchgeführt wurden (bei 15 °C), sind im Inset abgebildet.