

Solubilisierung lipophiler Substanzen durch Phospholipidvesikel

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie
der Universität Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Erik Brückner

aus Marl

Essen im Jahre 2000

Referent: Prof. Dr. H. Rehage

Korreferent: Prof. Dr. G. Peschel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2000

Am Meer, am wüsten, nächtlichen Meer
steht ein Jüngling-Mann,
die Brust voll Wehmut, das Haupt voll Zweifel,
und mit düstern Lippen fragt er die Wogen:
"O löst mir das Rätsel des Lebens,
das qualvoll uralte Rätsel,
worüber schon manche Häupter gegrübelt,
Häupter in Hieroglyphenmützen,
Häupter in Turban und schwarzem Barett,
Perückenhäupter und tausend andre,
arme, schwitzende Menschenhäupter.
Sagt mir, was bedeutet der Mensch?
Woher ist er kommen? Wo geht er hin?"

Wer wohnt dort oben auf den goldenen Sternen?"
Es murmeln die Wogen ihr ew'ges Gemurmel,
es wehet der Wind, es fliehen die Wolken,
es blinken die Sterne gleichgültig und kalt.
Und ein Narr wartet auf Antwort.

Heinrich Heine

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 1996 bis Januar 2000 im Institut für Physikalische Chemie der Universität Gesamthochschule Essen im Rahmen eines interdisziplinären Graduiertenkollegs „Verbesserung des Wasserkreislaufs urbaner Gebiete zum Schutz von Boden und Grundwasser“ angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. H. Rehage

für die interessante Themenstellung, die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. G. Peschel danke ich recht herzlich für die Übernahme des Korreferates. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs möchte ich für die angenehme Atmosphäre, die Diskussionsbeiträge und die Möglichkeit des Einblicks in die unterschiedlichsten Interessengebiete der verschiedenen Fachbereiche danken. Für die Kooperation bei der Untersuchung der Vesikel/Zell-Interaktionen sei C. Ehrenstein und Prof. Dr. G. Obe besonders gedankt.

Ich danke allen Mitgliedern des Institutes für die Kollegialität, Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Dr. P. Sonntag für die nahezu unzähligen Diskussionen, R. König für die ständige Hilfsbereitschaft und Dr. A. Walter für die unermüdlichen Lektorentätigkeiten. N. Wegen, I. Schneeweiß und H. Song danke ich für die tatkräftige Mithilfe zum Gelingen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Dr. U. Seifert und Dr. H.-G. Döbereiner (MPI Golm) für das ständige Interesse an dieser Arbeit und die interessanten Diskussionen bedanken. Ferner gilt mein Dank Dr. J. Hotz.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und natürlich bei Dr. P. Meineke, deren Hilfsbereitschaft ich nicht in Worte zu fassen vermag.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
1 Grundlagen.....	4
1.1 Historischer Hintergrund.....	5
1.2 Phospholipide	5
1.3 Geometrische Betrachtung der Packung von Amphiphilen.....	6
1.4 Kräfte innerhalb der Doppelschicht	9
1.5 Dynamik der Doppelschichtstrukturen.....	9
1.6 Bedeutung der Selbstorganisation für die Funktion der Zelle	10
1.7 Polymorphismus der Phospholipide	11
1.8 Einteilung der Vesikel.....	14
1.9 Gestalt von Vesikeln.....	14
1.10 Stabilität von Vesikeln	16
1.11 Darstellung und Eigenschaften von Phospholipidvesikeln	17
1.12 Solubilisierung in Mizellen und Vesikeln.....	19
1.13 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme.....	20
1.14 Verwendung von Vesikeln zur Solubilisierung lipophiler Substanzen.....	21
1.15 Problemstellung	22
Ergebnisse.....	23
2 Lokalisierung lipophiler Solubilisate innerhalb der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln.....	23
2.1 Untersuchungsmethoden zur Lokalisierung des Solubilisats in Vesikeln.....	23
2.2 Protonenresonanzspektroskopie zur Charakterisierung der Packungseigenschaften innerhalb der Doppelschicht	23
2.3 Röntgendiffraktometrie zur Charakterisierung struktureller Einflüsse innerhalb der Doppelschicht	34
2.4 Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der inneren Eigenschaften der Doppelschicht	40
3 Thermotrope Eigenschaften von Vesikeln.....	47
3.1 Dynamische Differenzkalorimetrie	47
3.2 Einfluß des Phasenverhaltens auf die Morphologie von Vesikeln.....	61
3.3 Mikroskopische Untersuchung des thermotropen Polymorphismus.....	63
3.4 Zusammenfassung.....	66
4 Mechanochemische Eigenschaften von Phospholipidvesikeln.....	67
4.1 Elastische Eigenschaften amphiphiler Substanzen	67

4.2 Elastizität von Vesikeln.....	67
4.3 Bestimmung der Biegesteifigkeit	69
4.4 Methoden zur Bestimmung der Biegesteifigkeit.....	71
4.5 Optimierung der Methode der Fluktuationsanalyse.....	78
4.6 Numerische Simulationen.....	79
4.7 Fluktuationsanalyse von Vesikeln	96
4.8 Einfluß lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit	103
4.9 Temperaturabhängige Formfluktuationsanalyse.....	109
4.10 Zusammenfassung	115
4.11 Bedeutung der Biegesteifigkeit von Vesikeln.....	115
5 Kinetische Untersuchungen zur Solubilisierung	118
5.1 Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran	118
5.2 Kinetik der Solubilisierung lipophiler Substanzen.....	130
6 Einfluß von Vesikeln auf das mutagene Potential lipophiler Schadstoffe	138
6.1 Bedeutung von Vesikeln im Hinblick auf Mobilisierungserscheinungen.....	138
6.2 Fremdstoffmetabolismus lipophiler Stoffe in Organismen.....	138
6.3 Schwesterchromatidenaustausch-Test (SCE).....	139
6.4 Einfluß von Vesikeln auf die Gentoxizität.....	141
6.5 Zusammenfassung.....	151
7 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme	152
7.1 Wege zu morphologisch schaltbaren vesikulären Strukturen.....	152
7.2 Vesikel als Templat zur Polymerisation.....	160
8 Zusammenfassung und Ausblick.....	172
8.1 Zusammenfassung.....	172
8.2 Ausblick.....	175
9 Material und Methoden.....	176
9.1 Reinigung der verwendeten Chemikalien	176
9.2 Methoden zur Vesikeldarstellung.....	176
9.3 Experimentelle und analytische Methoden	178
10 Literaturverzeichnis.....	190
11 Anhang	197

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen chemischer Substanzen

BrdUrd	5-Bromdesoxyuridin
BTX	Benzol, Toluol, Xylol
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat

Begriffliche Abkürzungen

CHO	Ovar des chinesischen Hamsters
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
GUV	Riesige unilamellare Vesikel
LUV	Große unilamellare Vesikel
MLV	Multilamellare Vesikel
ROI	Relevanter Bildausschnitt
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
SUV	Kleine unilamellare Vesikel

Abkürzungen numerischer Faktoren und Konstanten

a	Platzbedarf eines Amphiphils
a_0	Optimale Fläche der polaren Kopfgruppe eines Amphiphils
a_l^m	Amplituden der Kugelfunktionen
A, A_0	Fläche, Ausgangsfläche
B_l	Theoretische Koeffizienten der Legendre-Polynome
c	Krümmung, reziproker Radius
c_0	Spontane Krümmung
C_p	Spezifische Wärmekapazität
d	Durchmesser,
d_l	Dicke der Doppelschicht
D	Diffusionskoeffizient
E	Energie
G, G^0	Gibbs-Energie, Standard Gibbs-Energie
H	Enthalpie, Standard Enthalpie
j	Permeationsrate
k	Boltzmann-Konstante
K	Gleichgewichtskonstante
k_c	Modul der Biegesteifigkeit
\bar{k}_c	Modul der Gauß'schen Krümmung
k_s	Modul der Dehnung
l	Quantenzahl, anguläres Moment
l_c	Kritische Länge der unpolaren Ketten eines Amphiphils
m	Quantenzahl
n	Lamellenzahl
n_{DMPC}	Stoffmenge DMPC
N	Laufende Nummer
p	Druck
P	Packungsparameter, Verteilungskoeffizient
P_l^m	Legendre Polynome
q	Modenzahl
r	Radius
r_0	Radius einer äquivalenten Sphäre
R	Allgemeine Gaskonstante
S, S^0	Entropie, Standard Entropie
t	Zeit
T	Temperatur

u	Relative Deformation
U_1	Term zur Ermittlung der Biegesteifigkeit
v	Volumen der unpolaren Ketten eines Amphiphils
V_{eff}	Effektives Volumen
X	Molenbruch
Y_l^m	Kugelfunktionen
a	Umsatzvariable
b	Isobarer thermischer Flächenausdehnungskoeffizient
b_{\perp}	Ausdehnungskoeffizienten des Membranquerschnitts
δ	Chemische Verschiebung
Δ	Dimensionsloser Flächenüberschuß
g	Grenzflächenspannung
g_v	Volumenausdehnung
h	Viskosität
h_c	Exponent
H	Mittlere Krümmung
j	Azimutwinkel
J	Polarwinkel
κ	Interaktionskonstante
K	Gauß'sche Krümmung
l	Wellenlänge
n_q	Amplituden der Konturfluktuation der Fouriertransformation
m	Chemisches Potential
q	Bragg-Winkel
s	Laterale Spannung
\bar{s}, s_{eff}	Effektive Membranspannung
t	Relaxationszeit
$x(\mathbf{g}, t)$	Anguläre Autokorrelationsfunktion