

Einleitung

1 Grundlagen

Das wissenschaftliche Interesse an Phospholipidvesikeln ist in den letzten 35 Jahren seit der Aufklärung der kolloidalen Struktur dieser Assoziationsaggregate immens gestiegen. Die Bedeutung der Vesikel erstreckt sich über eine Vielzahl von Forschungsgebieten beginnend bei den Kolloidwissenschaften [1,2], über die Biophysik [3] bis in den Bereich der Medizin [4].

Vesikel stellen aus wissenschaftlicher Sicht Minimalsysteme lebender Zellen dar und sind inzwischen zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der Mimetik biologischer Membranen geworden. Sie dienen dem Studium von Permeationseigenschaften der Zellmembranen [5], von Funktionsweisen membrangebundener Enzyme [6,7], zellulärer Transportvorgänge [2] und der Stabilität sowie der Gestalt von Zellen [1].

Bereits realisierte sowie mögliche zukünftige Anwendungen von Vesikeln basieren auf den amphiphilen Eigenschaften und der hiermit verbundenen Möglichkeit zur Solubilisierung oder Verkapselung sowohl wasserunlöslicher als auch wasserlöslicher Substanzen und Wirkstoffe. Die Biokompatibilität und die geringe Toxizität der Phospholipide ermöglicht kosmetische und pharmazeutische Anwendungen. So hat sich der Begriff „Liposomen“ im Bereich der Kosmetika, dem zur Zeit bedeutendsten Einsatzgebiet der Phospholipide, als ein alltäglich gebräuchlicher Term etabliert. Die geringen allergenen Eigenschaften, aber auch das Eindringen und Verfrachten von Wirkstoffen in tiefer gelegene Hautschichten spielen hierbei eine besondere Rolle [8].

Nachdem der anfängliche Optimismus einer möglichen Verwendung von Vesikeln als „wirkstoffliefernde Systeme“ im Bereich der Medizin zunächst verebbte, sind mittlerweile Medikamente auf der Basis unilamellarer Liposomen auf dem Markt [9]. Die Applikation ist nicht nur durch Injektion des liposomalen Wirkstoffes in die Blutbahn möglich; hochflexible Vesikel, sogenannte Transfersomen, sind sogar in der Lage, den Wirkstoff über die Haut diffusiv in den Organismus einzubringen [10]. Eine Anwendung kationischer Vesikel findet sich in der Gentherapie. Synthetische Kationentenside ermöglichen in Anlehnung an virale Prozesse die sogenannte Transfektion, d.h. das Einschleusen von Erbmaterial in intakte Eukaryontenzellen [11].

Für industrielle Anwendungen werden zunehmend solche Tenside interessant, die als nachwachsender Rohstoff kostengünstig und leicht biologisch abbaubar sind. Aus diesem Grund finden sich potentielle Anwendungen der Phospholipide in der tertiären Erdölförderung [12], der Bodensanierung [13], sowie der Beseitigung von Öl auf Wasseroberflächen [14].

Phospholipide stellen den Hauptbestandteil natürlicher Zellmembranen dar und sind somit auf der Erdoberfläche ubiquitär verbreitet. Viele Wasseroberflächen weisen eine Monoschichtbelegung mit verschiedensten Lipiden auf.

Ferner ist in natürlicher Umgebung die Aggregation der Phospholipide zu sphärisch geschlossenen Doppelschichten, den Vesikeln oder Liposomen, möglich. Hierbei dienen sandige oder gesteinsreiche Oberflächen als Template zur Bildung der vesikulären Strukturen [15]. Über den Weg der Solubilisierung in der Doppelschicht von Vesikeln werden auf diese Weise potentielle, natürliche Mobilisierungspfade lipophiler Schadstoffe eröffnet.

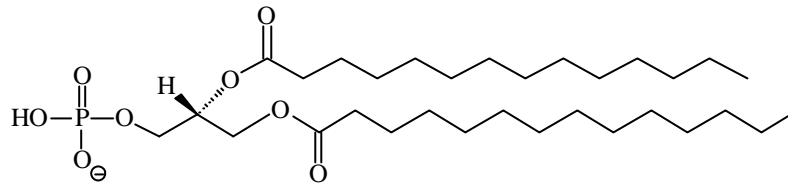
1.1 Historischer Hintergrund

Aus historischer Sicht läßt sich die Verwendung von Phospholipidvesikeln vermutlich auf einige tausend Jahre vor Christi Geburt datieren [15]. Die Verwendung von Lecithin aus Eigelb als Emulgator in Koch- und Backprozessen, zur Herstellung von Tinten oder als Waschmittel ist seit langer Zeit gängig. Obgleich viele dieser Anwendungen noch bis in die heutige Zeit gebräuchlich sind, erfolgte die detaillierte Aufklärung der Struktur von Vesikeln oder Liposomen erst im 20. Jahrhundert [16].

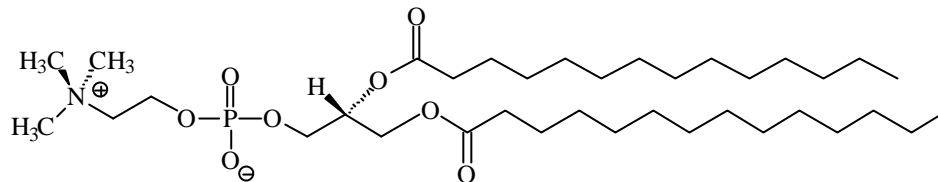
Phospholipide und insbesondere die Klasse der Phosphatidylcholine (Lecithine) wurden im Jahre 1846 von Goble als Fraktion des Eigelbs entdeckt. Der Name „lécithine“ stammt von der griechischen Bezeichnung „lekitos“ (λεκίθος) für Eigelb. Ein Hühnereigelb enthält etwa ein Gramm Lecithin. Die entsprechende Strukturformel konnte 1968 von Strecker aufgeklärt werden [15]. Virchow beschrieb erstmals 1854 das Quellverhalten von Lipiden in wäßriger Lösung [17], wobei die ersten optischen Abbildungen dieser „künstlichen Zellen“ von Lehmann auf das Jahr 1911 datiert werden [18]. Mit der detaillierten Aufklärung der kolloidalen Struktur von Vesikeln durch Alec Bangham im Jahre 1964 [16] wuchs das wissenschaftliche Interesse an Vesikeln enorm.

1.2 Phospholipide

Phospholipide bilden die Grundbausteine biologischer Membranen. Sie sind Derivate der Phosphatidsäure, einem Phosphorsäureester des 1,2-Diglycerids (Abbildung 1-1) und entstehen als Phosphatidylderivate durch Veresterung mit Ethanolamin, Cholin, Serin, Inosit, Glycerin oder Phosphatidylglycerin. Bei den natürlich vorkommenden Phospholipiden ist eine der beiden Fettsäuren mit geradzahligem Kohlenstoffzahl häufig ungesättigt und liegt in *cis*-Konfiguration vor.



Dimyristoylphosphatidsäure (DMPA)



Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)

Abbildung 1-1: Strukturformel von Dimyristoylphosphatidsäure (DMPA) sowie vom zwitterionischen Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC).

Phospholipide weisen neben einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe einen unpolaren lipophilen Molekülbereich auf. Aufgrund dieses amphiphilen Charakters zeigen die Moleküle eine deutliche Tendenz zur Anreicherung an Grenzflächen. Der ausgeprägte lipophile Acylbereich bedingt eine geringe Wasserlöslichkeit, so daß Phospholipide, die im wäßrigen Medium dispergiert werden, zur spontanen Selbstorganisation neigen. Hierbei kommt es zur bevorzugten Aggregation in planaren Doppelschichten oder zur Bildung sphärisch geschlossener Doppelschichtstrukturen, den sogenannten Vesikeln oder Liposomen. Die treibende Kraft für diese Selbstorganisation ist die Minimierung der Kontaktzone zwischen der wäßrigen Phase und der hydrophoben Region des Amphiphils.

1.3 Geometrische Betrachtung der Packung von Amphiphilen

Ein einfaches und doch wirkungsvolles Modell zur Vorhersage der Aggregationsform von Amphiphilen in wäßriger Lösung ist die geometrische Betrachtung der Moleküle mit Hilfe des Packungsparameters P . Dieser wird definiert als

$$P = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (1.1)$$

mit dem effektiven Volumen v der unpolaren Ketten des Moleküls, der optimalen Fläche a_0 der polaren Kopfgruppe, bei welcher das chemische Potential m^0 minimal ist und der kritischen Länge l_c der unpolaren Ketten (Abbildung 1-2). Letztere ist ein semiempirischer Parameter, wobei l_c im fluiden Zustand aufgrund des Vorliegens von gauche-Konformeren gemäß Tanford [19] um etwa einen Faktor 0.7 kleiner als die Länge der voll ausgestreckten Kette l_{\max} mit n Methylengruppen ist.

Allgemein gilt [20]

$$l_c \leq l_{\max} \approx (0.1265n + 0.154)\text{nm} \quad (1.2)$$

sowie

$$v \approx (26.9n + 27.4) \cdot 10^{-3} \text{nm}^3. \quad (1.3)$$

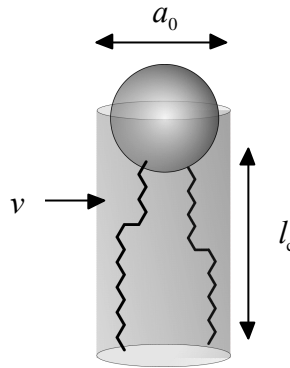


Abbildung 1-2: Modell zur Beschreibung des dimensionslosen Packungsparameters P eines Amphiphils (Erläuterungen im Text). Die Struktur des Moleküls ist vereinfacht durch einen polaren Kopf und zwei unpolare Paraffinketten wiedergegeben.

Ein Amphiphil weist eine „vorgeprägte“ Form auf und unterliegt bei der Aggregatbildung gewissen geometrischen Zwängen. Theoretisch ist eine Vielzahl verschiedener Aggregatformen möglich, wobei jedoch entropisch diejenige Struktur mit der kleinsten Zahl aggregierter Moleküle bei gegebener Geometrie bevorzugt wird. Kleinere Strukturen hingegen bedingen eine Abweichung von der optimalen Fläche der polaren Kopfgruppe a_0 und sind somit energetisch ungünstig.

Für Amphiphile, die in einer Mizelle mit dem Radius r und der Aggregationszahl M aggregieren, gilt folglich aus geometrischen Gesichtspunkten

$$M = \frac{4\pi r^2}{a_0} = \frac{4\pi r^3}{3v}. \quad (1.4)$$

Da der Mizellradius $r = 3v/a_0$ die kritische Länge l_c nicht überschreiten kann, gilt die Beziehung

$$\frac{v}{a_0 \cdot l_c} < \frac{1}{3}. \quad (1.5)$$

Einkettige Tenside wie beispielsweise Lysolipide sowie kurzkettige Phospholipide weisen einen großen Kopfbereich im Vergleich zum unpolaren Teil auf ($v < a_0 \cdot l_c$), so daß diese in Form sphärischer ($P < 1/3$) oder stäbchenförmiger Mizellen ($1/3 < P < 1/2$) aggregieren. Im Falle zweikettiger Phospholipide gilt $v \approx a_0 \cdot l_c$ und folglich sind Lamellen, Diskenmizellen oder große Vesikel (vgl. Abbildung 1-3) die bevorzugten Aggregationsformen ($P \approx 1$). Lipide mit sehr kleinen Kopfgruppen oder einem sehr ausgeprägten lipophilen Bereich können ferner inverse Strukturen ($P > 1$) ausbilden.

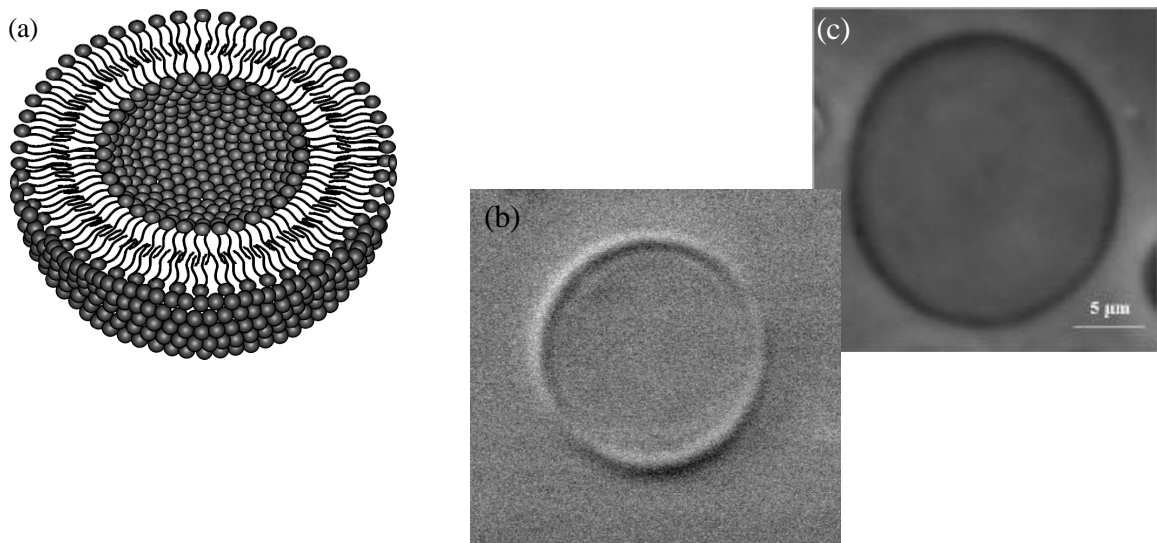


Abbildung 1-3: (a) Schematische Darstellung eines unilamellaren Vesikels als Schnitt durch die dreidimensionale Struktur. Die geschlossene Doppelschicht umschließt als dünne Membran ($d = 3 - 5 \text{ nm}$) ein inneres wäßriges Kompartiment. Vesikel können im Gegensatz zu Mizellen in Größenordnungen dargestellt werden, die für videomikroskopische Untersuchungen zugänglich sind. Mikroskopische Aufnahmen unilamellarer DMPC-Vesikel unter Verwendung eines differentiellen Interferenzkontrastes (b) und eines Phasenkontrastes (c).

1.3.1 Faktoren, welche den Packungsparameter der Phospholipide beeinflussen

Faktoren wie Temperaturänderungen, pH-Wert oder Ionenkonzentrationen können den Packungsparameter P von Phospholipiden und resultierend die Aggregatform der Amphiphile beeinflussen. Aber auch die Einlagerung kleiner organischer Moleküle wie kurzkettige Alkane bewirkt durch Erhöhung des effektiven Volumens v des lipophilen Bereichs eine Änderung des Packungsparameters und führt zur Bildung größerer Vesikel oder inverser Aggregate [21].

1.4 Kräfte innerhalb der Doppelschicht

Das Konzept der geometrischen Betrachtung der Packung von Amphiphilen ist sehr vereinfacht. Es vernachlässigt attraktive und repulsive Kräfte innerhalb der Doppelschicht, die in unterschiedlicher Entfernung von der Grenzfläche zur wässrigen Phase ansetzen (Abbildung 1-4) und zur Energie des Systems beitragen.

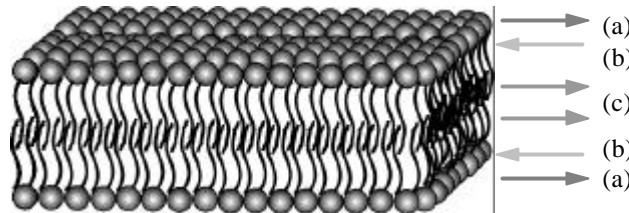


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Kräfte innerhalb einer Lipiddoppelschicht, welche die Packungseigenschaften der Amphiphile beeinflussen [20]: Die Grenzflächenspannung (b) wirkt als attraktive Kraft an der Grenzfläche zwischen Wasser und den Kohlenwasserstoffketten. Die abstoßende Kraft der Kopfgruppen (a) ist hingegen oberhalb dieser Grenzfläche wirksam. Im lipophilen Bereich resultiert in fluiden Membranen aufgrund der eingeschränkten Freiheit der lipophilen Ketten weiterhin ein lateraler Druck (c).

Da die lipophilen Ketten der fluiden Doppelschicht nicht vollständig ausgestreckt vorliegen ($l_c \approx 0.7 \cdot l_{\max}$) resultiert ebenfalls ein lateraler Druck im lipophiler Bereich der Doppelschicht. Dieser tritt bei einer Doppelschicht der Dicke d_1 in einer gewissen Entfernung D von der eigentlichen Grenzfläche auf und ist von der Krümmung r abhängig. Mit k_c der Biegesteifigkeit gilt vereinfacht [21]

$$\Delta E = \frac{2gd_1D}{r^2} = \frac{k_c}{2r^2}. \quad (1.6)$$

Die Grenzflächenspannung g von Vesikeln liegt im Bereich von $g = 20 - 50 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [20].

1.5 Dynamik der Doppelschichtstrukturen

Der ausgedehnte lipophile Bereich von Phospholipidmolekülen wie Dimyristoylphosphatidylcholin bedingt eine bevorzugte Aggregation in Form lamellarer Phasen oder vesikulärer Strukturen und beeinflusst überdies die statischen und dynamischen Eigenschaften der Aggregate. Die Ausbildung von Doppelschichten erfolgt in wässrigem Medium bereits bei Konzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, in Konzentrationen deutlich unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc) einkettiger Tenside ($cmc \approx 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Die Aufenthaltsdauer t_R der Monomeren liegt in mizellaren Strukturen bei etwa $1 \cdot 10^{-4} \text{ s}$. Die Amphiphile stehen somit in ständigem Gleichgewicht mit

der umgebenden wäßrigen Phase und die Aggregate sind kinetisch instabil. In Doppelschichtstrukturen erfolgt dieser Austausch bei einer Aufenthaltsdauer im Bereich $t_R = 1 \cdot 10^4$ s wesentlich langsamer. Vesikel sind daher im Gegensatz zu Mizellen stabil bei Verdünnung der umgebenden Lösung. Überdies ist der transversale Austausch von Phospholipidmolekülen von einer Monoschicht zur anderen, der sogenannte „Flip-Flop“, möglich. Der Flip-Flop ist jedoch ein langsamer Vorgang ($10^2 - 10^5$ s), der mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden ist und wesentlich von der Natur der Kopfgruppe beeinflusst wird. Dies liegt darin begründet, daß die Lipidmoleküle beim Austausch den hydrophoben Membranbereich mit ihrer polaren Kopfgruppe durchdringen müssen [22]. Die laterale Beweglichkeit der Phospholipide ist in der Ebene fluider Doppelschichten vergleichsweise hoch: Ein Molekül legt in einer Sekunde die Strecke von 1 μm zurück [23].

Die Doppelschicht von Vesikeln weist eine Dicke von weniger als 5 nm auf. Sie stellt somit ein dünnes und extrem weiches Material mit molekularen Dimensionen dar. Diese Weichheit manifestiert sich in der geringen Biegesteifigkeit, die dazu führt, daß lamellare Phasen und Vesikel thermisch angeregte Fluktuationen, sogenannte Undulationen zeigen. Die Membranen unterliegen einer ständigen Auslenkung aus ihrer Gleichgewichtslage, ein Phänomen, das in Kapitel 4 ausführlich diskutiert wird.

Neben der extremen Weichheit ist die Doppelschicht von Vesikeln sehr stabil und bildet eine mechanische, chemische wie auch eine elektrische Barriere zwischen dem eingeschlossenen inneren Kompartiment und der äußeren wäßrigen Phase.

1.6 Bedeutung der Selbstorganisation für die Funktion der Zelle

Phospholipide sind als Hauptbestandteil natürlicher Zellmembranen der Grundbaustein für das zelluläre Leben in all seiner Komplexität. Die geschlossene Doppelschichtstruktur schafft die Voraussetzung für eine funktionelle Kompartimentierung unter Abgrenzung des umgebenden Milieus (vgl. Abbildung 1-5). Sie gewährleistet selektive Permeabilitäten und den geordneten, separaten Ablauf einer Vielzahl spezifischer enzymatischer Reaktionen. In Form eines zweidimensionalen Lösungsmittels fungiert die Doppelschicht als Matrix zur Ein- und Anlagerung von Proteinen, Enzymen, signalübertragenden Molekülen und dem stabilisierenden Cytoskelett. Liposomen, winzige Pendanten der Zellen, sorgen ferner als schützende Hülle für den intra- und interzellulären Transport von Makromolekülen.

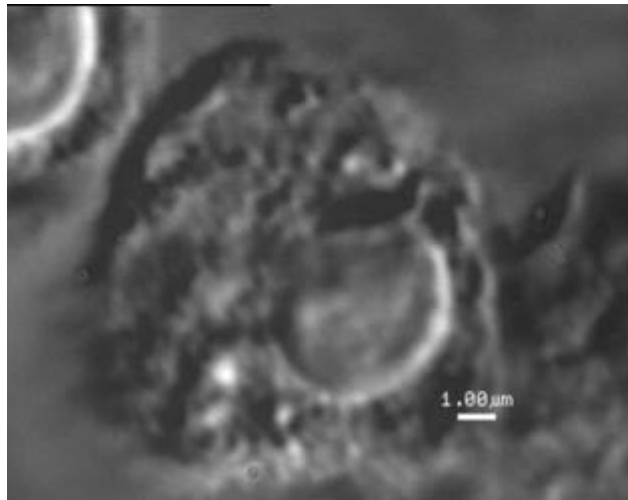


Abbildung 1-5: Mikroskopische Aufnahme einer Alveolar-Makrophage der Ratte. Die gesamte Zelle wird von einer Plasmamembran umgeben, die das Cytosol vom äußeren Medium abgrenzt. Im Zellinnern ist die Kernhülle sowie einzelne Zellorganellen zu erkennen.

Die Lipidmembran weist interessante elastische Eigenschaften auf. Sie ist als weiches Material leicht zu biegen, jedoch vergleichsweise schwer zu dehnen. Dies erlaubt beispielsweise den Erythrocyten, die im Blutkreislauf migrieren, über hunderte von Kilometern durch die engen Kapillaren der Blutgefäße zu gelangen, ohne dabei einen Verlust an Ionen zu erleiden.

1.7 Polymorphismus der Phospholipide

Diacylphosphatidylcholine langkettiger Fettsäuren sind in Wasser nahezu unlöslich. Die Dispersion von Phospholipiden in wäßriger Lösung führt zur Ausbildung typischer Doppelschichtstrukturen. Diese weisen ein ausgeprägtes Phasen- und Strukturverhalten in Form eines lyotropen sowie thermotropen Polymorphismus auf.

1.7.1 Lyotroper Polymorphismus

Reine Phospholipide liegen aufgrund ihres hygroskopischen Charakters in der Regel in Form von Monohydraten vor (Abbildung 1-6). Die Temperatur der Hauptumwandlung zur L_a -Phase sinkt mit steigendem Wasseranteil bis zur vollständigen Hydratisierung der Kopfgruppe des Amphiphils. Eine weitere Erhöhung des Wasseranteils führt oberhalb eines Wasseranteils von 33 Gew.-% zur Bildung eines heterogenen Zweiphasengebietes. In diesem Bereich koexistieren vollständig hydratisierte, parallel angeordnete Stapel lamellarer Phasen (vergleichbar den smektischen Phasen) und eine Wasserphase. Bei weiterer Verdünnung wird die Bildung sphärisch geschlossener Doppelschichtmembranen, sogenannter Vesikel, möglich.

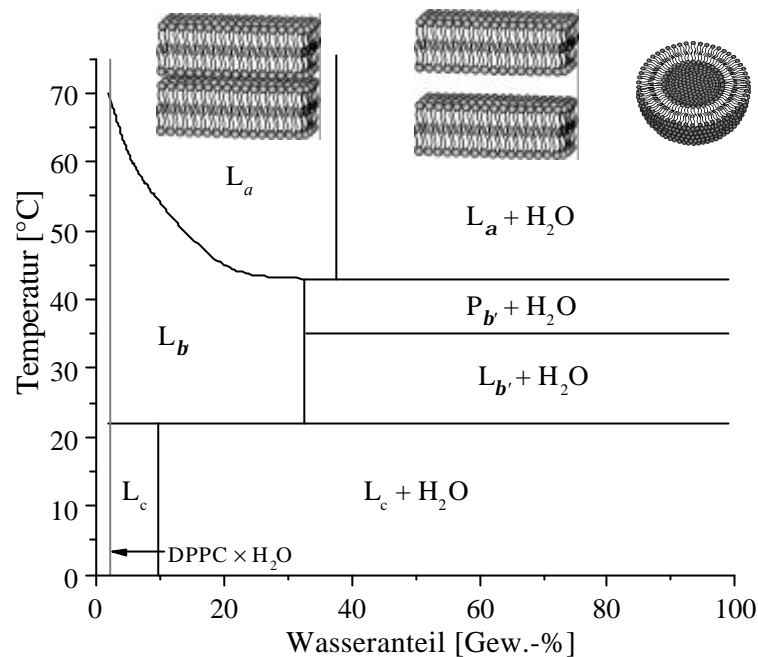


Abbildung 1-6: Vereinfachtes binäres Zustandsdiagramm des Systems 1,2-Dipamitoylphosphatidylcholin/Wasser zur Erläuterung des thermotropen sowie lyotropen Polymorphismus [24]. Die Klassifikation der einzelnen Phasen der Phospholipide im Phasendiagramm erfolgt gemäß der Nomenklatur nach Luzatti durch Kennzeichnung der Überstruktur durch einen entsprechenden Großbuchstaben. Die Art der Packung der Kohlenwasserstoffketten, welche die Strukturbildung maßgeblich beeinflusst, wird in Form von Indices angehängt. Im System Dipamitoylphosphatidylcholin/Wasser kann im wesentlichen zwischen vier Phasen, unterschieden werden. L_c kennzeichnet eine kristalline Phase, L_b und P_b repräsentieren jeweils Gelphasen sowie L_a die flüssig-kristalline Phase.

1.7.2 Thermotroper Polymorphismus

Im Bereich niedriger Temperaturen dominiert der hohe Ordnungsgrad der nahezu vollständig gestreckten, parallel angeordneten Acylreste und ermöglicht ein Maximum an van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die Anordnung der Methylengruppen entspricht der energetisch günstigen all-trans-Konformation. In der hochgeordneten kristallinen L_c-Phase sowie der L_b-Phase liegen die Ketten in einer orthorhombischen bzw. gestört orthorhombischen Packung vor. Die Kopfgruppen sind innerhalb der L_c-Phase relativ immobil und nur unvollständig hydratisiert [25]. Mit steigender Temperatur erfolgt die Subgel-Umwandlung in die L_b-Phase unter Anstieg der Mobilität der Kopfgruppe. Hierdurch dringt verstärkt Wasser in den Bereich der Grenzflächen ein. Die Ketten weisen in der L_b-Phase eine Neigung von etwa 30° zur Ebene der Doppelschicht auf. Die Oberflächentexturen der L_b-, aber auch insbesondere der P_b-Phase, der sogenannten Ripple-Phase, sind mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken visualisierbar [23]. In der P_b-Phase liegen die Acylketten in einem

gestörten hexagonalen Gitter mit einer Gitterkonstante von $a = 0.42 \text{ nm}$ vor und weisen wiederum jeweils eine Neigung von etwa 30° zur lokalen Ebene der Doppelschicht auf [26]. Die Doppelschicht weicht in die dritte Dimension unter Bildung regelmäßiger wellenförmiger Texturen konstanter Abstände von 25 nm aus (vgl. Abbildung 1-7). Weiterhin zeigen die Amphiphilmoleküle Rotationen um die Längsachse.

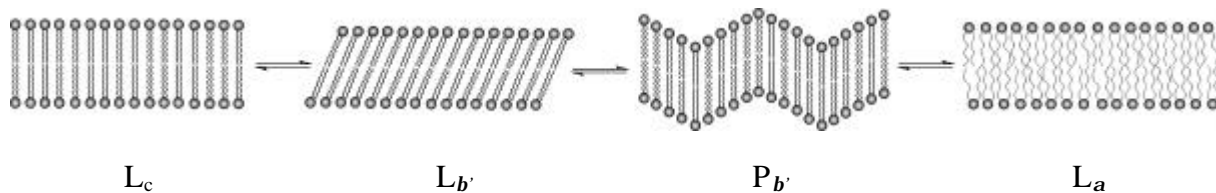


Abbildung 1-7: Schematische Anordnung der Diacylphosphatidylcholine innerhalb der Doppelschicht der verschiedenen thermotropen mesomorphen Phasen entsprechend steigender Temperatur.

Oberhalb der charakteristischen Hauptumwandlungstemperatur T_m erfolgt die Hauptumwandlung in die ungeordnete, flüssig-kristalline L_α -Phase. Kooperatives Schmelzen der Acylketten führt zur trans-gauche-Isomerisierung und zu einer schnellen lateralen Diffusion ($D \approx 1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), sowie zu einer Rotation der Lipidmoleküle unter deutlicher Zunahme der Fluidität der Doppelschicht. Die Bildung der energetisch angeregten Rotationsisomere bewirkt eine laterale Ausdehnung, sowie eine vertikale Stauchung der Membran. Die Vesikelmembran ist mit Hilfe der Videomikroskopie visualisierbar, so daß die laterale Ausdehnung der Doppelschicht unter Verwendung riesiger Vesikel mikroskopisch beobachtet werden kann (vgl. Abbildung 1-8).

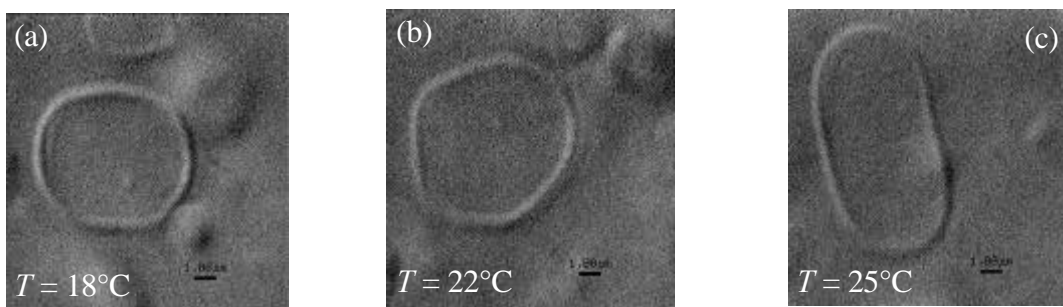


Abbildung 1-8: Mikroskopische Untersuchung der Phasenumwandlung eines unilamellaren DMPC-Vesikels. In der L_b -Phase (a) weist das Vesikel typischerweise polyhedrale Anordnungen auf, da die geneigten Doppelschichten nicht in Form einer Sphäre gepackt werden können. Durch Erhöhung der Temperatur erfolgt die kontinuierliche Umwandlung in die flüssig-kristalline L_α -Phase (c). Die Bildfolgen verdeutlichen die Zunahme der Membranfläche unter Ausbildung einer elliptischen Struktur.

Die Packung der Amphiphile ist in der fluiden Phase weniger kompakt, so daß das Solubilisierungsvermögen für kleine lipophile Moleküle ansteigt. Wasser dringt vermehrt in die fluide Doppelschicht ein und die Grenze zwischen polarer und unpolarer Region der Doppelschicht wird zunehmend diffuser [23].

1.8 Einteilung der Vesikel

Vesikel können anhand der Lamellenzahl und der Vesikelgröße charakterisiert werden (Tabelle 1-1), Eigenschaften, die stark von den Präparationsbedingungen abhängen. Hinsichtlich der Anzahl der Doppelschichten unterscheidet man zwischen unilamellaren und multilamellaren Vesikeln. Während unilamellare Vesikel relativ gut theoretisch charakterisiert sind, ist über multilamellare Systeme aufgrund ihrer Komplexität wenig bekannt.

Tabelle 1-1: Klassifizierung unilamellarer Vesikel nach der Größe.

Unilamellare Vesikel	Größe [μm]
Kleine unilamellare Vesikel (SUV)	0.02 - 0.1
Große unilamellare Vesikel (LUV)	0.1 - 1.0
Riesige unilamellare Vesikel (GUV)	> 1.0

1.9 Gestalt von Vesikeln

Präparationen riesiger Vesikel führen zu einer enormen Vielfalt unterschiedlichster Vesikel in Form und Gestalt. Diese Vielfalt inspiriert sowohl die theoretische, als auch die experimentelle Wissenschaft, nicht zuletzt, da Vesikel als Minimalmodelle für biologische Zellen angesehen werden können. Sie dienen dem Verständnis natürlicher Phänomene und letztendlich der Aufklärung von Ursachen verschiedenster Krankheiten. Insbesondere Gestaltänderungen spielen eine wichtige Rolle im Verständnis der Zelltopologie bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielsweise der Endo- oder Exocytose.

Die eigentliche Gestalt von Vesikeln kann theoretisch durch Minimierung der Krümmungsenergie bei konstanter Membranfläche A und innerem Volumen V erhalten werden. Ferner können die einzelnen Monoschichten eine unterschiedliche Anzahl an Molekülen aufweisen, so daß eine Flächendifferenz ΔA der inneren Monoschicht A_i und der äußeren Monoschicht A_a mit $\Delta A = A_a - A_i$ berücksichtigt werden muß. Auf dieser Grundlage ist es möglich, „Gestalt-Phasendiagramme“ der Vesikel zu berechnen, die für Einkomponentensysteme gut mit den experimentellen Beobachtungen der Phasenkontrastmikroskopie übereinstimmen [3].

Auf dieser Basis wird es möglich, Gestaltänderungen von Vesikeln, wie sie beispielsweise bei Erhöhung der Temperatur auftreten, zu beschreiben. Die Erhöhung der Temperatur bedingt eine laterale Ausdehnung der Doppelschicht unter Zunahme der Membranfläche A , wobei das eingeschlossene Volumen aufgrund des vergleichbar geringeren thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Wasser nahezu konstant bleibt. Ausgehend von einer sphärischen Vesikelgestalt, die bei gegebener Membranfläche ein maximales Volumen einschließt, führt die Erhöhung der Temperatur zu einer elliptischen Deformation unter Ausbildung einer Diskocyte, entsprechend der Gestalt von roten Blutkörperchen. Wird die Möglichkeit einer unterschiedlichen Anzahl an Lipidmolekülen in den einzelnen Monoschichten der Doppelschicht berücksichtigt, so folgt aus der geringfügig unterschiedlichen thermischen Ausdehnung der einzelnen Monoschichten (analog einem Bimetall) eine Vielzahl möglicher Vesikelgestalten (vgl. Abbildung 1-9).

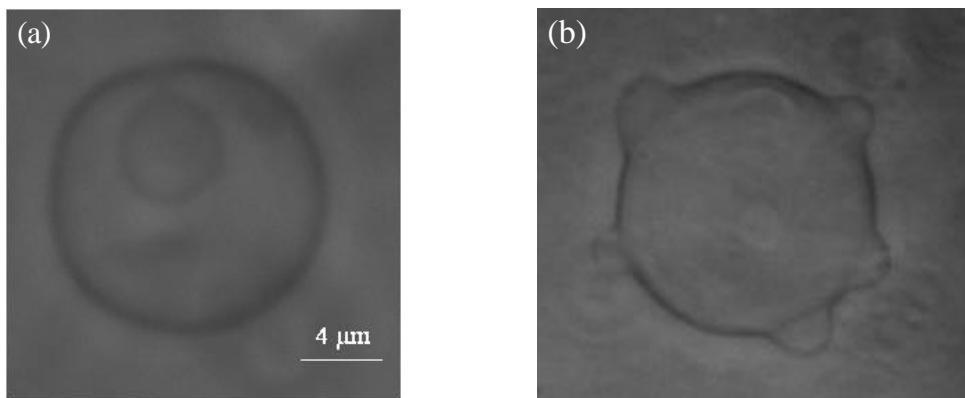


Abbildung 1-9: Unterschiedliche Gestalt unilamellarer DMPC-Vesikel: (a) Stomatocyte, (b) Echinocyte.

Die Symmetrie der Doppelschicht kann ebenfalls durch Induktion einer Krümmung aufgrund eines unsymmetrischen Einbaus von Fremdmolekülen oder durch unterschiedliche an die Membran angrenzende Medien gebrochen werden. Die theoretischen Modelle beschreiben jedoch nur „ideales“ Verhalten von Vesikeln. Das Verhalten „realer“ Vesikel wird dagegen oftmals durch Membrandefekte oder Inhomogenitäten in der Zusammensetzung diktiert und führt zu ungewöhnlichen Formen (Abbildung 1-10).

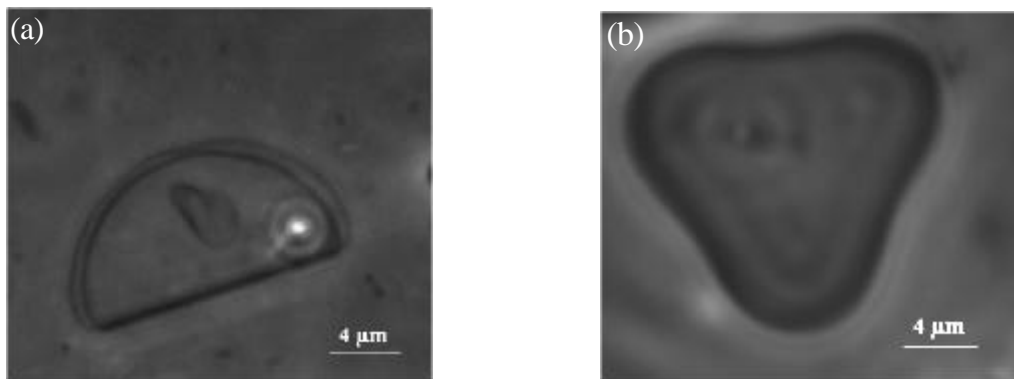


Abbildung 1-10: „Ungewöhnliche“ Vesikelgestalten von DMPC nach Solubilisierung lipophiler Substanzen wie (a) Hexadekan oder (b) Styrol.

1.10 Stabilität von Vesikeln

Vesikel befinden sich aus energetischer Sicht in einem metastabilen Zustand. Die günstigste Anordnung der Doppelschicht sollte planar sein. Kommt es jedoch bei der Quellung lamellarer Phasen zu einem Kontakt des hydrophoben Bereichs am Rand der Schicht mit der wäßrigen Umgebung, so schließt sich die Doppelschicht unter Ausbildung eines Vesikels [2]. Die resultierende sphärisch geschlossene Struktur mit einer Biegesteifigkeit $k_c > 0$ entspricht somit keinem thermodynamisch stabilen Zustand. Entropische Beiträge zur freien Energie eines Vesikels liegen in der Größenordnung von kT und sind im allgemeinen verglichen zur Krümmungsenergie mit $10 - 100 kT$ klein. Ein Vesikel ist somit in einer relativ stabilen Struktur „gefangen“. In der Praxis sind Vesikel in der fluiden Phase über einen Zeitraum einiger Monate bis hin zu Jahren stabil.

Wird die Fläche riesiger unilamellarer Vesikel um mehr als $\Delta A/A = 5 - 10 \%$ entsprechend einer Temperaturerhöhung von $10 - 15^\circ\text{C}$ erhöht, so wird die Membran instabil und öffnet sich. Die Energie E_p zur Erzeugung einer Pore mit dem Radius r_p in einer Membran ist durch die auftretenden Randwechselwirkungen und der hiermit verbundenen Grenzflächenspannung g_p gegeben nach

$$E_p = 2\pi r_p g_p. \quad (1.7)$$

Der Energiebetrag E_p ist im allgemeinen groß, so daß einmal entstandene Löcher in der Membran sich relativ schnell schließen. Entropisch stabilisierte Vesikel sind im Falle einer sehr geringen Biegesteifigkeit k_c möglich, d.h. falls $8\pi k_c \sim kT$ ist. Im Falle geringer Randwechselwirkungen ($2\pi r_p g_p \sim kT$) können offene Doppelschichtfragmente entstehen (vgl. Abbildung 1-11).

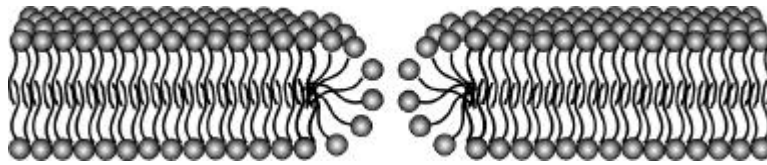


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung einer hydrophilen Pore nach Stabilisierung des hydrophoben Randes der Doppelschicht mittels einkettiger Amphiphile unter Erniedrigung der Randwechselwirkungen g_p .

1.11 Darstellung und Eigenschaften von Phospholipidvesikeln

Vesikel können in sehr unterschiedlichen Größenordnungen dargestellt werden (vgl. Tabelle 1-1). Hierzu existieren eine ganze Reihe von Methoden, von denen im folgenden jedoch ausschließlich diejenigen Methoden vorgestellt werden, bei denen eine Kontaminierung der Vesikel durch organische Lösungsmittel oder grenzflächenaktive Substanzen auszuschließen ist. Problematisch zeigt sich die Darstellung von Vesikeln in enger Größenverteilung und einheitlicher Lamellenzahlen, was besonders im Bereich riesiger Vesikel schwer zu realisieren ist.

1.11.1 Kleine unilamellare Vesikel (SUV)

Kleine unilamellare Vesikel (SUV) können unter dem Einfluß von Kavitationskräften durch Ultraschallbehandlung erzeugt werden [27, 28]. Die Vesikel zeigen jedoch Anomalien in Eigenschaften und Stabilität [29] und weisen hohe Membranspannungen auf. Grund hierfür ist die ausgeprägte Membrankrümmung, die bedingt, daß sich die Phospholipide nicht mehr ihrer optimalen Packung entsprechend in der Doppelschicht einlagern können. Kleine unilamellare Vesikel sind intrinsisch asymmetrisch, sie weisen eine unterschiedliche Anzahl an Molekülen und unterschiedliche Krümmungen in der jeweiligen Monoschicht auf. Sie sind thermodynamisch instabiler als ihre großen Pendanten und gehen häufig Fusionen ein, um den Überschuß an freier Energie zu dissipieren.

1.11.2 Große unilamellare Vesikel (LUV)

Zur Darstellung großer unilamellarer Vesikel in homogener Größenverteilung eignet sich die Extrudermethode [30]. Hierbei wird eine Dispersion multilamellarer Vesikel mehrfach durch eine Polycarbonatmembran mit etwa 6 μm langen zylindrischen Poren gepreßt. Die Vesikel werden zylindrisch deformiert und zerfallen in unilamellare Vesikel [31]. Die Größe der Vesikel ist abhängig von dem verwendeten Porendurchmesser der Polycarbonatmembran, wobei die Homogenität der Größenverteilung durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen der eingesetzten multilamellaren Vesikel verbessert werden kann [32]. Der Vorteil der Methode liegt in der Einfachheit und dem vergleichbar geringen zeitlichen Aufwand.

1.11.3 Riesige Vesikel (GUV)

Die Darstellung riesiger Vesikel kann unter Verwendung der Quellmethode wie auch der Elektropräparation erfolgen. Die Membran riesiger Vesikel ist mit Hilfe der Videomikroskopie visualisierbar, so daß detaillierte Aussagen über strukturelle, wie auch intrinsische Änderungen der Doppelschicht möglich werden.

1.11.3.1 Quellmethode

Bei der Quellmethode nach Reeves und Dowben [33] wird zunächst ein dünner Film des Phospholipids durch Spreiten einer Lösung des Lipids in Chloroform auf ein Substrat (Glas oder Teflon) und anschließender Entfernung des Lösungsmittels erzeugt. Nach Zugabe von Wasser erfolgt die Quellung (vgl. Abbildung 1-12) unter Bildung riesiger unilamellarer und multilamellarer Vesikel. Nachteilig bei der Quellmethode ist die oftmals sehr geringe Ausbeute an unilamellaren Vesikeln.

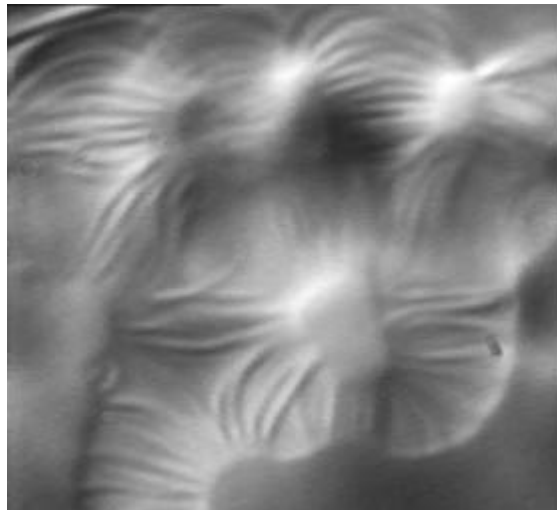


Abbildung 1-12: Mikroskopische Aufnahme der Lamellenbildung bei Beginn der Quellung von DMPC in Wasser.

1.11.3.2 Elektropräparation

Eine deutliche höhere Ausbeute an unilamellaren Vesikeln liefert die Methode der Elektropräparation in einem elektrischen Wechselstromfeld [34]. Hierbei wird ein dünner Film des Phospholipids auf einer von zwei gegenüberliegenden Elektroden erzeugt. Die Elektroden bestehen aus zwei plan-parallelen Glasplatten, die den eigentlichen Reaktionsraum bilden und auf der Innenseite mit einem elektrisch leitendem Indium-Zinnoxid beschichtet sind (ITO-Glas). Die Transparenz der Reaktionszelle erlaubt die mikroskopische Kontrolle des Präparationsverlaufs. Zur Vesikeldarstellung wird die Zelle mit Wasser gefüllt. Durch Anlegen eines Wechselfeldes von 10 Hz und einer sukzessiven Erhöhung der Feldstärke auf

$1 - 3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ erfolgt die Bildung unilamellarer Vesikel, deren Durchmesser sich mit der Zeit durch Fusionen erhöht. Die Vesikel weisen direkt nach der Präparation hohe Membranspannungen von $10^{-3} - 10^{-4} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ auf, relaxieren jedoch nach etwa einer Stunde auf Spannungen von etwa $10^{-8} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [35].

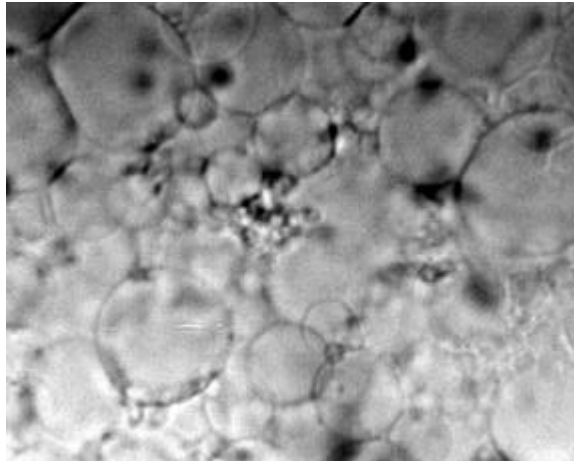


Abbildung 1-13: Videomikroskopische Aufnahme von auf der Elektrode adsorbierten Vesikeln während der Elektropräparation.

1.12 Solubilisierung in Mizellen und Vesikeln

Die Solubilisierung spielt in vielen technischen Prozessen wie dem Färben, der Stofftrennung und dem Reinigen eine bedeutende Rolle. Als Solubilisierung bezeichnet man im engeren Sinne die Herstellung einer thermodynamisch stabilen, isotropen Lösung einer mäßig- bis schwerlöslichen Substanz in einem umgebenden Lösungsmittel (zumeist Wasser) durch Zugabe amphiphiler Substanzen [36]. Die Lösungsvermittler können hierbei in Form von Monomeren mit der unpolaren Substanz interagieren oder nach Aggregation zu Assoziationskolloiden wie Mizellen oder Vesikeln[‡] das entsprechende lipophile Solubilisat in den lipophilen Bereich einlagern. Die solubilierte Substanz befindet sich in der Folge in einem dynamischen Gleichgewicht mit der wässrigen Umgebung.

Der Einbau eines lipophilen Solubilisats in den lipophilen Bereich führt zum Quellen des Assoziats und verläuft somit unter Aufwendung von Volumenarbeit pV . Der Druck p folgt in Mizellen aus dem Laplacedruck. Im Bereich der Kopfgruppen kommt es bedingt durch die veränderten Packungsbedingungen zu ungünstigen Wechselwirkungen, wodurch das Solubilisierungsvermögen begrenzt wird.

[‡] Bei der Solubilisierung in Vesikeln kann nach den angeführten Voraussetzungen nicht von isotropen, thermodynamisch stabilen Aggregaten ausgegangen werden, so daß die exakte Definition der Solubilisierung und entsprechend einer Solubilisierungskapazität schwierig ist.

Für mizellare Systeme gilt im Falle der Einlagerung eines Solubilisats mit dem Molvolumen V_m und der Konzentration c in der Mizelle [37]

$$c = c_\infty \cdot \exp\left(-\frac{2gV_m}{r_m RT}\right). \quad (1.8)$$

Hierbei bezeichnet r_m den Radius der Mizelle, g die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und der Mizelle und c_∞ die Sättigungskonzentration des Solubilisats in einer vergleichbaren makroskopischen Phase. Aus Gleichung (1.8) wird ersichtlich, daß Kugelmizellen ein kleineres Solubilisierungsvermögen für lipophile Substanzen aufweisen, als Scheibchenmizellen, lamellare Phasen oder Vesikel. Ferner hängt die Solubilisierungskapazität stark von der Temperatur, der Ionenstärke, sowie der Struktur und Polarität des Solubilisats ab.

1.13 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme

Vesikel sind für eine Vielzahl bereits realisierter und potentieller Anwendungsgebiete von Interesse, von denen einige exemplarisch vorgestellt werden. Hierbei muß besonders auf einen Unterschied hingewiesen werden, den vesikuläre Strukturen gegenüber thermodynamisch stabilen Systemen wie Mizellen oder Mikroemulsionen aufweisen. Die Verwendung thermodynamisch stabiler Systeme hat den Nachteil, daß diese sehr schnell auf Änderung der chemischen Umgebung reagieren. Ein häufiges Problem ist das Auftreten von Verdünnungen während des Einsatzes. Hierbei kommt es bei Mizellen und Mikroemulsionen oftmals zur Destabilisierung der Strukturen und infolgedessen zu einer unerwünschten Wirkstofffreigabe oder zur Ineffizienz der erwünschten Wirkung. Phospholipidvesikel sind hingegen, wie bereits diskutiert, kinetisch festgesetzte Strukturen mit metastabilem Charakter und somit weitestgehend stabil gegen Verdünnung. Sie können als „Transportcontainer“ oder zur Solubilisierung lipophiler Substanzen auch in hoher Verdünnung eingesetzt werden.

1.13.1 Bedeutung von Vesikeln als wirkstoffliefernde Systeme

Vielfach ist der direkte Einsatz eines Wirkstoffes aufgrund seiner geringen Löslichkeit oder unzureichenden Spezifität nicht möglich, so daß für eine zielgerichtete Applikation zusätzlich ein wirkstofflieferndes System benötigt wird. Im Bereich biologischer Systeme sind hierzu Vesikel aufgrund ihrer Biokompatibilität besonders geeignet und führen zu einer deutlichen Erhöhung der Effizienz. So kann beispielsweise durch den Einsatz liposomaler Pflanzenschutzmittel die nötige Pestizidmenge um bis zu 50% reduziert werden, da hierdurch ein verbesserter Transport durch die pflanzliche Cuticula erfolgt [38].

Die zielgerichtete Verabreichung ist insbesondere in der Medizin von Bedeutung. Liposomen spielen im biologischen System eine entscheidende Rolle beim inter- wie auch intrazellulären Transport von Makromolekülen. Analog sollte es möglich sein, Wirkstoffe mit Hilfe von Vesikeln selektiv am gewünschten Zielort freizusetzen, um beispielsweise Krebs-

zellen zu bekämpfen. Die Applikation liposomengebundener Medikamente kann durch Injektion in die Blutbahn erfolgen. Diese Methode hat den Vorteil der langsamen und gezielten Freisetzung oftmals stark zell- und gewebeschädigender Wirkstoffe nach Eintrag in den Organismus. Hochflexible Vesikel, sogenannte TransfersomenTM, sind in der Lage, die Haut diffusiv zu durchdringen und solubilisierte Wirkstoffe in die Blutbahn einzubringen. Auf diese Weise soll es in Zukunft möglich sein, Medikamente wie Insulin durch Auftragen auf die Haut ohne eine nötige Injektion zu applizieren [10].

1.14 Verwendung von Vesikeln zur Solubilisierung lipophiler Substanzen

Im Bereich industrieller Anwendungen werden zunehmend Tenside wie die Phospholipide interessant, die als nachwachsender Rohstoff wenig kostenintensiv, gleichzeitig leicht biologisch abbaubar und somit umweltverträglich sind. Phospholipide fallen als Nebenprodukt der Sojaölproduktion kostengünstig an und dienen in Form von Vesikeln zur Solubilisierung lipophiler Substanzen. Neben einer möglichen Verwendung von Vesikeln zur tertiären Erdölförderung [12], zeigen diese sehr gute Eigenschaften bei der Sanierung ölkontaminierter Böden [13] und der Beseitigung von Öl auf Wasseroberflächen [14]. Die Grenzflächenspannung einer Hexadekan/Wasser-Grenzfläche wird beispielsweise bis auf Werte von $g \approx 3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ erniedrigt [12]. Weiterhin ist die Stabilität der Vesikel gegen Verdünnung von erheblichen Vorteil. Mehrwertige Kationen wie Ca^{2+} , die insbesondere bei Anwendungen im Bereich des Bodens vorhanden sind, zeigen bei Abwesenheit anionischer Phospholipide keinerlei Einfluß auf die Vesikelstruktur [13].

1.15 Problemstellung

Phospholipide sind als natürliche Lösungsvermittler in Form von Vesikeln in der Lage lipophile Substanzen zu solubilisieren und somit deren Löslichkeit im wässrigen Milieu beträchtlich zu erhöhen. Dies eröffnet eine Vielzahl potentieller Anwendungsmöglichkeiten und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei natürlich auftretenden Mobilisierungserscheinungen lipophiler Schadstoffe im Bereich der Pedosphäre.

Während unilamellare Phospholipidvesikel gut charakterisierte Systeme darstellen, ist bezüglich der Interaktion mit lipophilen Substanzen recht wenig bekannt. Für eine Vielzahl von Anwendungen ist eine umfassende Kenntnis hinsichtlich des Einflusses lipophiler Solubilisate auf die Eigenschaften der Vesikelmembran sowie eine detaillierte Aufklärung der Mechanismen der Solubilisierung unerlässlich. Dies war Motivation der vorliegenden Arbeit, die sich detailliert dem Studium der Interaktion lipophiler aromatischer Substanzen mit der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln widmet. Hierzu erfolgt zunächst eine Lokalisierung des Solubilisats und eine Charakterisierung des Einflusses auf die strukturellen sowie thermotropen Eigenschaften der Doppelschicht.

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf der Bestimmung der Biegesteifigkeit, einer wichtigen elastischen Eigenschaft der Vesikelmembran. Hierzu wird als Methode die Videomikroskopie vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert und zur Bestimmung der Biegesteifigkeit quasi-sphärischer Vesikel verwendet wurde. Auf dieser Methode basierend wird erstmals der konzentrationsabhängige Einfluß von Toluol als lipophilem Solubilisat auf die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel aufgezeigt und mit den Ergebnissen auf molekularer Ebene korreliert.

Ferner wird der eigentliche Solubilisierungsprozeß lipophiler Substanzen durch Vesikel analysiert. Zur Ermittlung der Interaktion von Vesikeln mit natürlichen Zellen wird eine Studie vorgestellt, die sich der Untersuchung des Einflusses auf das mutagene Potential widmet.

Abschließend werden mögliche Anwendungen von Vesikeln, die auf der Wechselwirkung mit lipophilen Solubilisaten beruhen, aufgezeigt. Hierzu zählt die Nutzung der Vesikelgestalt als Templat zur Darstellung von Kapselmaterialien sowie die Darstellung morphologisch schaltbarer vesikulärer Systeme.