

## 9 Material und Methoden

### 9.1 Reinigung der verwendeten Chemikalien

#### 9.1.1 Wasser

Das bei den Versuchen verwendete Wasser (Seralpur) mit einem pH-Wert von 6.0 wurde zur Vermeidung bakterieller Kontamination unter Verwendung eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0.2  $\mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius) steril filtriert. Im Anschluß wurde gelöster Sauerstoff durch mehrmaliges Entgasen und Belüften mit Argon entfernt.

#### 9.1.2 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) AIBN

2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) wurde durch Kristallisation aus Methanol gereinigt.

#### 9.1.3 Monomere für die Polymerisation

Die Monomere für die Polymerisation wurden zur Reinigung unter Vakuum destilliert und bis zur Verwendung unter Argon bei  $-18^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 9.2 Methoden zur Vesikeldarstellung

Die Vesikel wurden je nach Größe und Homogenität nach folgenden Präparationsmethoden dargestellt.

#### 9.2.1 Darstellung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mit Hilfe der Ultraschallmethode

Die Darstellung kleiner unilamellarer Vesikel erfolgte gemäß der Ultraschallmethode [28]. Phosphatidylcholin (DMPC bzw. DPPC) wurde in einem Reaktionsgefäß nach Schlenck in Wasser dispergiert. Im Anschluß wurde die Dispersion für etwa 60 Minuten unter Argon bei einer Temperatur  $10^\circ\text{C}$  oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  in einem Ultraschallbad (Sonorex TK 52, Bandelin) behandelt, bis eine klare, leicht opaleszente Flüssigkeit entstanden war.

#### 9.2.2 Darstellung großer Vesikel mit Hilfe der Extrudertechnik (LUVET)

Eine wäßrige Dispersion des Phosphatidylcholins wurde mit Hilfe zweier gasdichter Spritzen 20 mal durch die Polycarbonatmembran eines Extruders (LiposoFast, Avestin Inc.) gepreßt. Hierbei wurde der Extruder auf eine Temperatur  $10^\circ\text{C}$  oberhalb  $T_m$  temperiert. Bei der Präparation kamen unterschiedliche Membranen mit Porengrößen von 100 nm, 200 nm bzw. 400 nm zum Einsatz. Die anschließende Lagerung der Vesikel erfolgte ebenfalls bei einer Temperatur  $10^\circ\text{C}$  oberhalb  $T_m$ . Die mikroskopische Untersuchung zeigte Vesikel in homogener Verteilung.

Der Verlust an Phospholipid durch Rückstände an der Polycarbonatmembran wurde für verschiedene Konzentrationen durch Bestimmung der Massendifferenz der Membran vor und nach der Verwendung ermittelt. Diese lag in jedem Fall deutlich unterhalb eines Massenverlustes von 2 %. Eine entsprechende Korrektur der effektiven Konzentration wurde jeweils vorgenommen.

### 9.2.3 Darstellung von Riesenvesikeln

#### 9.2.3.1 Quellmethode nach Reeves und Dowben

Phosphatidylcholin wurde in Chloroform gelöst und in einen Spitzkolben gefüllt. Das Lösungsmittel wurde unter leichter Rotation des Gefäßes zunächst mit Hilfe eines Argonstroms bei einer Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  entfernt. Die vollständige Abtrennung des Lösungsmittels erfolgte über einen Zeitraum von 6 Stunden unter Vakuum (20 hPa). Auf diese Weise entstand ein gleichmäßiger, farbloser Lipidfilm. Dieser wurde im Anschluß mit Wasser bis zur jeweiligen Konzentration versetzt und zur Quellung für 24 Stunden auf eine Temperatur von 10°C oberhalb  $T_m$  temperiert. Der entstandene milchig weiße Film wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden bei gleicher Temperatur mit Hilfe eines Schüttlers (Gerhardt) vollständig dispergiert.

#### 9.2.3.2 Elektropräparation

Ein Volumen von 3  $\mu\text{L}$  einer Stammlösung von Dimyristoylphosphatidylcholin in Chloroform ( $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) wurde unter Schutzgas bei 35°C auf ein mit Indium-Zinnoxid beschichtetes Glas (FLC Optics AB, Göteborg) gespreitet. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurde das Glas 3 Stunden in ein evakuiertes Gefäß eingebracht. Hierdurch wurde ein gleichmäßiger dünner Film des Lipids erhalten. Das Glasplättchen wurde nun derart in die wassergefüllte Reaktionskammer eingesetzt, daß der Lipidfilm vollständig benetzt war. Die Reaktionskammer wurde verschlossen, auf 35°C temperiert und auf dem Objektisch eines Auflichtmikroskops befestigt. Nach Anbringen der Elektroden erfolgte nach einer 30-minütigen stromlosen Quellphase die Quellung im elektrischen Wechselfeld. Hierzu wurde die Spannung sukzessive auf  $3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei konstanter Frequenz von 10 Hz erhöht und 2 Stunden konstant gehalten. Durch Herabsetzen der Frequenz und leichtes Schwenken der Reaktionskammer wurden die entstandenen Vesikel anschließend vorsichtig von der Glasoberfläche abgelöst und in eine temperierte Küvette (Hellma) zur mikroskopischen Untersuchung überführt.

### 9.3 Experimentelle und analytische Methoden

#### 9.3.1 Protonenresonanzspektroskopische Untersuchung

Die Protonenresonanzspektren wurden mit einem Varian-Spektrometer (Gemini XL 200) bei einer Meßfrequenz von 200 MHz und einer Scanzahl von 32 in D<sub>2</sub>O aufgenommen. Als innerer Standard fungierten die undeuterten Anteile des deuterierten Lösungsmittels.

##### 9.3.1.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die Untersuchung der Lokalisierung aromatischer Solubilisate wurde unter Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 50 nm durchgeführt. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe der Ultraschallmethode gemäß 9.2.1. Die Konzentration von Phosphatidylcholin (DMPC bzw. DPPC) betrug 10 mmol · L<sup>-1</sup>. Als Lösungsmittel fungierte D<sub>2</sub>O (99.9 % ig) anstelle von Wasser. Aliquote der Vesikeldispersion von jeweils 1 mL wurden in ein trockenes NMR-Röhrchen eingebracht und dieses mit einem Septum gasdicht verschlossen. Im Anschluß erfolgte die Titration mit dem jeweiligen Solubilisat bei einer Temperatur von 25°C unter Verwendung einer gasdichten Spritze (Hamilton).

#### 9.3.2 Röntgendiffraktometrie vollständig hydratisierter lamellarer Phasen

Die Röntgenstreuexperimente erfolgten unter Verwendung eines Siemens Röntgendiffraktometers D5000 und eines Siemens Kristalloflex-Generators. Dieser erzeugt mittels eines Quarzmonochromators Strahlung der Wellenlänge  $\lambda = 0.15406$  nm (Cu-K <sub>$\alpha$</sub> ). Als Detektor fungierte ein Szintillationsdetektor (Siemens). Die Meßdaten wurden mit einem Personalcomputer (PC 486) und der Software Diffrag erfaßt.

##### 9.3.2.1 Allgemeine Präparationsmethode

Jeweils 9.0 mg Dimyristoylphosphatidylcholin wurden oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  mit 40 Gew.-% Wasser hydratisiert, in einem 2 mm · 80 mm Markröhrchen mit Toluol versetzt und vermischt. Das Röhrchen wurde hermetisch verschlossen und in den Probenhalter eingebracht. Die jeweilige Dichte der Dispersionen wurde pyknometrisch bestimmt.

Die röntgenografische Untersuchung erfolgte bei einer Temperatur von  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  mit einer Scangeschwindigkeit von  $2.5^\circ \cdot \text{h}^{-1}$ . Der jeweilige Blindwert des Probenröhrchens wurde mit Hilfe der Software Origin 5.0 von den Spektren subtrahiert.

### 9.3.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung eines Spektrofluorimeters (JY 3, Jobin Yvon) bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm (Bandbreite 4 nm).

#### 9.3.3.1 Allgemeine Präparationsmethode

Pyren wurde unter Erwärmen im Ultraschallbad in einer Konzentration von  $c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  in Wasser gelöst und die Lösung 6 Stunden mit Argon gespült. Die Darstellung der Vesikel erfolgte nach Dispergieren des Phospholipids in der wäßrigen Pyrenlösung. Die klare, leicht opaleszente Dispersion wurde unter Schutzgas in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$  überführt und mit einem Septum gasdicht verschlossen. Anschließend erfolgte die Titration mit dem jeweiligen lipophilen Solubilisat bei konstanter Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  unter Verwendung einer gasdichten Spritze (Hamilton).

#### 9.3.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die kalorimetrischen Messungen erfolgten unter Verwendung eines leistungskompensierenden, dynamischen Differenzkalorimeters isoperiboler Betriebsart (DSC-2, Perkin Elmer), wobei Wasser bzw. Luft als inerte Referenz diente. Die Messung wurde mit einer Heizrate von  $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$  und einer Empfindlichkeit von  $20.9 \text{ mJ} \cdot \text{s}^{-1}$  durchgeführt. Die Meßwertaufnahme erfolgte über ein Voltmeter mit IEEE488 Schnittstelle, die eine Übertragung zu einem Computer (Mega ST2, Atari) zur Datenauswertung erlaubt. Zur Ermittlung der molaren Enthalpie der Phasenumwandlung wurde mit Indium als Standard kalibriert. Die Bestimmung der Peakfläche erfolgte durch Integration unter Verwendung der Software Origin 5.0 (Microcal).

#### 9.3.4.1 Allgemeine Präparationsmethode

Das jeweilige zu untersuchende Lipid wurde zunächst in Wasser in einer Konzentration von  $c = 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dispergiert und die entsprechenden Vesikel gemäß Abschnitt 9.2 dargestellt. Von dieser Dispersion wurden im folgenden Aliquote entnommen, mit der jeweiligen lipophilen Substanz bis zum festgesetzten Molverhältnis versetzt und homogenisiert. Eine bekannte Menge dieses Gemisches (üblicherweise 15 - 30 mg) wurde in den Probenbehälter, einem Großraumpfännchen aus Edelstahl mit einem Volumen von  $60 \mu\text{L}$  (Perkin Elmer) eingefüllt und dieses hermetisch verschlossen.

#### 9.3.4.2 Darstellung kristalliner $L_c$ -Phasen

Zur Darstellung von Vesikeln in der  $L_c$ -Phase wurden diese nach 9.3.4.1 vorbereitet, 7 Tage in einem gasdichten Probengefäß auf  $2^\circ\text{C}$  temperiert und anschließend vermessen.

### 9.3.5 Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten routinemäßig unter Verwendung eines BH-2 Durchlichtmikroskops (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Ölimmersionskondensators sowie eines Ölimmersionsobjektivs mit 60-facher Vergrößerung (N.A. = 1.4). Die Bildaufnahme erfolgte durch Projektion des Zwischenbildes mit Hilfe eines Zoomokulars (6.5-fach) auf den CCD-Chip einer hochauflösenden Schwarzweiß-Videokamera (CF 8/1, Kappa) unter anschließender Echtzeit-Bildbearbeitung mit Hilfe eines Bildprozessors (Argus 20, Hamamatsu). Die Bildfolgen wurden mit Hilfe eines S-VHS Videorekorders aufgezeichnet und auf einen Monitor (HR Trinitron PVM 1454 QM, Sony) ausgegeben.

#### 9.3.5.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die Darstellung der DPPC-Vesikel ( $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) erfolgte mit Hilfe der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 bei einer Temperatur von  $45^\circ\text{C}$ . Die Zugabe der entsprechenden Menge der lipophilen Substanz erfolgte durch Mischen in einer Bördelflasche mit Septum (Merck) unter anschließender Temperierung auf die Beobachtungstemperatur. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte unter Verwendung einer Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) bei konstanter Temperatur.

#### 9.3.6 Bestimmung der elastischen Eigenschaften

Die Bestimmung der elastischen Konstanten erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops BX-50 (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Phasenkontrastobjektivs mit 40-facher Vergrößerung,  $NA = 0.75$  (Ph 2, Olympus Optical Company). Das Mikroskop wurde zur Vermeidung des Einflusses externer Schwingungen auf eine hierzu konstruierte schwingungsgedämpfte Grundplatte montiert. Die variable Nachvergrößerung erfolgte durch Kombination eines 5-fach Zoomokulars mit einem Vergrößerungswechsler. Das Kamerasystem bestand aus einer hochauflösenden digitalen CCD-Kamera („lens-on-chip“-Technologie) mit Peltierkühlung (Sensi Cam, Super VGA, PCO). Die Bildübertragung zu einem Personal Computer (Pentium II, 233 MHz) erfolgte digital mit einer Graustufentiefe von 12 Bit.

Die digitale Bildbearbeitung und -verarbeitung erfolgte unter Verwendung der kommerziellen Bildverarbeitungssoftware Optimas 6.0 für Windows 95 (Stemmer Imaging, Weinheim). Die integrierte Makrosprache in C erlaubte hierzu eine Automatisierung der einzelnen Bildbearbeitungsschritte. Die Bilder der Bildfolgen (üblicherweise 200 - 400 Einzelbilder) wurden nacheinander der Bildbearbeitung sowie der anschließenden Bildanalyse zugeführt. Die Konturerkennung erfolgte mit Hilfe des in Optimas implementierten Algorithmus nach Lui [96]. Die Konturdaten wurden als Dateninput für die theoretische Auswertung zur Ermittlung der elastischen Konstanten verwendet.

Die nachfolgende Analyse erfolgte mit Hilfe eines hierzu entwickelten Programmes in C++ (Borland) auf einem Personal Computer (Pentium II, 233 MHz).

### 9.3.6.1 Allgemeine Präparationsmethode

Jeweils 0.695 mg L- $\alpha$ -Dimyristoylphosphatidylcholin wurden in 200  $\mu$ L Chloroform gelöst und in eine 1.5 mL Bördelflasche (Merck) eingefüllt. Die Darstellung der Vesikel erfolgte unter Verwendung der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 ( $c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Nach Zugabe von Toluol wurde das Gefäß gasdicht verschlossen. Der milchig weiße Film wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden mit Hilfe eines Schüttlers bei einer Temperatur von 30°C dispergiert und die Dispersion erneut 24 Stunden temperiert.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurde ein Aliquot vorsichtig entnommen und in eine auf 30°C temperierte, runde Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) mit einem Volumen von 36  $\mu$ L und einer Schichtdicke von 0.2 mm eingefüllt. Die Küvette wurde durch Aufsetzen eines Deckglases ( $d = 0.17 \text{ mm}$ ) verschlossen und in die Objektkammer eines temperierbaren Objektisches eingebracht. Die videomikroskopische Untersuchung der Fluktuationsamplituden von DMPC-Vesikeln erfolgte bei konstanter Temperatur von 30°C nach einer Relaxationszeit von etwa 3 Stunden nach Einfüllen der Vesikel in die Objektkammer.

### 9.3.7 Ermittlung der effektiven Toluolkonzentration in DMPC-Vesikeln

Die photometrischen Untersuchungen erfolgten mittels UV/VIS-Spektrophotometer Cary 1E (Varian). Die Meßdaten wurden mit Hilfe eines Personalcomputers (PC 386) aufgenommen.

#### 9.3.7.1 Allgemeine Präparationsmethode

Eine Dispersion multilamellarer Vesikel wurde gemäß 9.2.3.1 in einer Konzentration von  $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dargestellt. Aliquote dieser Dispersion wurden in Bördelflaschen (Merck) überführt, mit Toluol entsprechend den molaren Verhältnissen der mikroskopischen Untersuchungen versetzt und gasdicht verschlossen. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Hilfe eines Schüttlers (Gerhardt) intensiv durchmischt und für etwa 4 Stunden bei 30°C gelagert. Die Dispersion wurde im Anschluß zur Abtrennung der Vesikelphase 60 Minuten bei 20000 g unter Verwendung einer temperaturkontrollierten Zentrifuge (Beckman J2-HS) bei einer Temperatur von 30°C zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde mit einer gasdichten Spritze (Hamilton) entnommen und in eine mit einem Septum versehene Quarzküvette (1 mL Schichtdicke) überführt. Die Ermittlung der Toluolkonzentration erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Absorption des Toluol bei einer Wellenlänge von 361 nm. Kalibriert wurde mit einer entsprechenden Lösung von Toluol in Wasser (Abbildung 9-1).

Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung der Vesikelphase wurde die Lösung auf etwa 5°C abgekühlt, über einen ebenfalls kalten Membranfilter mit einer Porengröße von 20 nm filtriert und der erneuten Konzentrationsbestimmung zugeführt. Hierbei ergaben sich insbesondere im Bereich hoher Toluolkonzentrationen Abweichungen, da in diesem Bereich die Vesikel aufrahmen und nicht durch Zentrifugation abtrennbar sind.

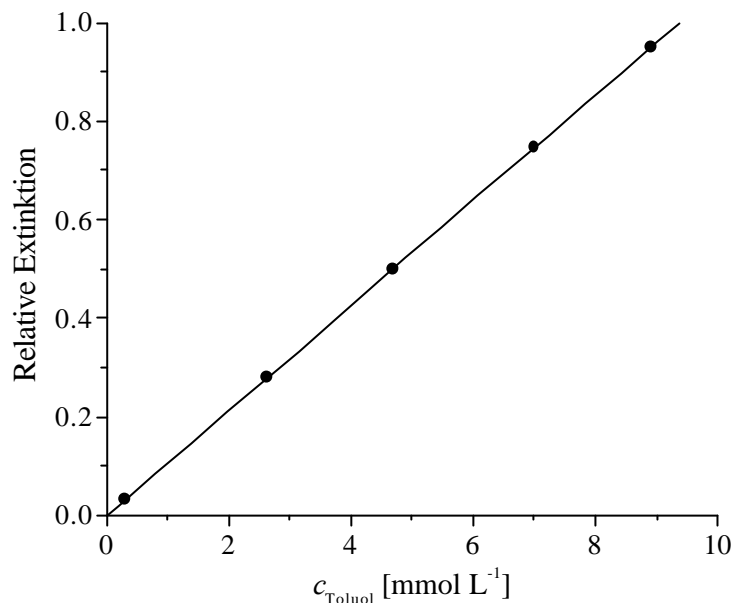


Abbildung 9-1: Kalibrierung zur Bestimmung der Toluolkonzentration in einer wässrigen Lösung bei einer Absorptionswellenlänge von 361 nm (Auflösung: 0,2 nm, Scanrate: 0,033 s nm<sup>-1</sup>).

### 9.3.8 Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran

Die Untersuchung des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops BX-50 (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Phasenkontrastobjektives 40-facher Vergrößerung, N.A. = 0,75 (Ph 2, Olympus Optical Company).

#### 9.3.8.1 Allgemeine Präparationsmethode

Eine Dispersion riesiger DMPC-Vesikel wurde unter Verwendung der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 ( $c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dargestellt und in eine runde Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) mit einem Volumen von 36  $\mu\text{L}$  und einer Schichtdicke von 0,2 mm eingefüllt. Die Küvette wurde in die Objektkammer eines temperierbaren Objektisches eingebracht und auf 30°C erwärmt. Anschließend wurde ein Toluoltropfen ( $V = 5 \mu\text{L}$ ) zudosiert und die Küvette durch Aufsetzen eines Deckglases ( $d = 0,17 \text{ mm}$ ) zur mikroskopischen Untersuchung hermetisch verschlossen.

### 9.3.9 Untersuchung der Solubilisierungsrate

Die mikroskopischen Untersuchungen der Solubilisierungsraten erfolgten mit Hilfe eines BX-50 Auflichtmikroskops (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Trokkenalobjektives 40-facher Vergrößerung, N.A. = 0.75 (Ph 2, Olympus Optical Company). Die Bestimmung der Grenzflächenspannung wurde mit einem optischen Kontaktwinkelmeßgerät (OCA 20, DataPhysics) durchgeführt.

#### 9.3.9.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die jeweilige Vesikeldispersion ( $c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) wurde mit Hilfe der Extrudertechnik gemäß Abschnitt 9.2.2 unter Verwendung einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 200 nm hergestellt. Ein Aliquot dieser Dispersion wurde in eine speziell konstruierte Teflon-Mikrokammer ( $V = 170 \text{ } \mu\text{L}$ ) eingefüllt, diese verschlossen und in die Objektkammer des temperierbaren Objektisches eingebracht. Nach Temperierung auf die gewünschte Untersuchungstemperatur wurde mit Hilfe einer Spritze (Hamilton)  $1 \text{ } \mu\text{L}$  des in wäßriger Lösung emulgierten Öls zugegeben. Die Verdünnung des Öls wurde hierbei so klein gewählt, daß im Reaktionsraum möglichst wenig (d.h. maximal 3 bis 5) Tropfen vorliegen. Die mikroskopische Untersuchung eines einzelnen, frei beweglichen Tropfens erfolgte unmittelbar nach dem Einfüllen. Hierzu wurden Bildfolgen in einem Intervall von 1 s - 10 s digital aufgenommen und auf einem Personal Computer (Pentium II, 233 MHz) gespeichert. Die Auswertung der Tropfengeometrie erfolgte unter Verwendung der Software Optimas 6.0 (Stemmer Imaging, Weinheim). Die zeitabhängige Abnahme des Tropfenradius wurde durch Ermittlung des äquivalenten Radius der Kreisfläche der zweidimensionalen Projektion des Tropfens bestimmt.

Eine Dispersion kleiner unilamellarer Vesikel ( $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) wurde gemäß 9.2.1 dargestellt und ein Aliquot von 5 mL in eine Küvette (Hellma) eingefüllt. In diese wurde ein Hexadekantropfen ( $V = 16 \text{ } \mu\text{L}$ ) innerhalb einer Sekunde über eine Kapillare eingebracht und die Grenzflächenspannung des an der Kapillare adsorbierten Tropfen als Funktion der Zeit bestimmt.

#### 9.3.10 Schwesterchromatidenaustausch-Test (SCE)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Verwendung eines Brutschanks (Heraeus, Hanau) mit  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Die Zentrifugation der Zellen wurde in einer Zentrifuge (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgte mit Hilfe eines BX-50 Durchlichtmikroskops (Olympus) und einem Ölimmersionsobjektiv 100-facher Vergrößerung, N.A. = 1.4.



### 9.3.10.1 Allgemeine Präparationsmethode

Alle Experimente wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter keimfreien Bedingungen in einem Sterilraum unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Glasgeräte wurden in einem Trockenschrank bei 180°C zweimalig sterilisiert, hitzeempfindliche Materialien wurden in einem Autoklaven (Varioklav) 50 Minuten bei 120°C autoklaviert. Alle weiterhin verwendeten Materialien wurden vor dem Gebrauch mit Ethanol (70 %ig) gewaschen.

### 9.3.10.2 Verwendete Wasch- und Inkubationsmedien

Alle verwendeten Lösungen wurden durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.1 µm filtriert, um auch Mykoplasmen zurückzuhalten. Folgende Medien wurden verwendet:

#### 9.3.10.2.1 Vollmedium

Vollmedium wurde jeweils frisch angesetzt. Dieses bestand zu 90 % aus McCoy's 5A-Medium und zu 10 % aus fötalem Kälberserum (FKS). Zusätzlich wurden die Antibiotika Penicillin (100 Einheiten pro mL) und Streptomycin ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) zur Vermeidung bakterieller Kontamination zugesetzt.

#### 9.3.10.2.2 PBS (phosphate buffered saline)

PBS bezeichnet eine  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freie phosphatgepufferte Salzlösung folgender Zusammensetzung:

$\text{NaCl } c = 137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KCl } c = 2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 c = 8.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4 c = 1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  mit einem pH-Wert von 7.35.

#### 9.3.10.2.3 Trypsin/EDTA-Lösung

Die Trypsin/EDTA-Lösung bestand aus 0.05 % Trypsin, einem proteolytisch aktiven Enzym, das die Ablösung fixierter Zellen ermöglicht sowie 0.02 % EDTA gelöst in PBS.

### 9.3.11 Kultivierung der CHO-Zellen

Zur Untersuchung wurden Zellen des Typs CHO-9 des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* verwendet. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Aufgetaute Zellen wurden kultiviert und nach etwa 40 Passagen verworfen. Unter optimalen Bedingungen dauerte ein Zellzyklus etwa 14 Stunden. Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte unter Verwendung steriler Kunststoff-Petrischalen (Greiner, Nürtingen) mit einem Durchmesser von 96 mm in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre und 95 % wasserdampfgesättigter Luft. Das sterile Kulturmedium wurde in regelmäßigen Abständen zur Gewährleistung eines ungestörten Wachstums der Zellen gewechselt. Alle zwei bis drei

Tagen erfolgte bei vollständiger Monoschichtbelegung der Bodenfläche der Petrischale eine Subkultivierung.

### 9.3.12 Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen umfaßte folgende Arbeitsschritte:

Die jeweiligen Zellkulturen wurden zunächst makroskopisch und mikroskopisch beurteilt, im Anschluß das Kulturmedium abgegossen und die Monoschichten mit 2 - 3 mL PBS gespült. Nach Überschichtung der Zellen für 2 - 3 Minuten mit einem dünnen Film Trypsin/EDTA-Lösung wurde die Trypsinwirkung mit 2 mL Vollmedium abgestoppt. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette abgespült und suspendiert. Jeweils 250 - 350  $\mu\text{L}$  Zellsuspension wurden je Kulturschale verwendet und die Zellen anschließend im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert.

### 9.3.13 Behandlung der CHO-Zellen

Auf eine Synchronisation der Zellkulturen vor der Behandlung wurde verzichtet. Die Zellen wurden 18 Stunden vor Behandlungsbeginn subkultiviert und in Petrischalen eingesäht. Hierbei wurde die Zelldichte so gewählt, daß sich die Kultur während der Behandlung in exponentiellem Wachstum befand und bei Beendigung der Kultur eine hohe mitotische Aktivität vorlag. Für diesen Zeitraum wurde den Zellkulturen für die SCE-Bestimmung BrdUrd in einer Konzentration von  $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  zugesetzt. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer auf  $1 \cdot 10^7$  Zellen je Petrischale bestimmt.

### 9.3.14 Präparation der Behandlungslösung

Die Behandlungslösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch zubereitet. Die zu untersuchende Substanz wurde in der gewünschten Konzentration zu 3 mL Vollmedium in einer 3 mL-Bördelflasche (Merck) gegeben und hermetisch verschlossen. Die Lösung wurde im Anschluß über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  mit Hilfe eines Schüttlers (Gerhardt) gleichmäßig durchmischt.

### 9.3.15 Präparation der Vesikeldispersion

Dimyristoylphosphatidylcholin wurde unter Verwendung von Vollmedium in der entsprechenden Konzentration von  $c = 1 - 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dispergiert. Für die Untersuchungen wurden kleine unilamellare (SUV) sowie große unilamellare Vesikel (LUV) eingesetzt. Große Vesikel wurden hierzu mit Hilfe der Extrudermethode gemäß Abschnitt 9.2.2 unter Verwendung zweier gestapelter Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 100 nm und 200 nm dargestellt. Die Überführung der Dispersion in kleine unilamellare Vesikel erfolgte mit Hilfe der Ultraschallmethode gemäß Abschnitt 9.2.1.

Nach Aliquotierung wurde die jeweilige lipophile Substanz in der gewünschten Konzentration zu der Vesikeldispersion gegeben und über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer Temperatur von 35°C mit Hilfe eines Schüttlers gleichmäßig durchmischt. Die Vesikeldispersion wurde über ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0.2 µm (Minisart, Sartorius) steril filtriert.

### 9.3.16 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen erfolgte im konfluenten Zustand und umfaßte folgende Arbeitsschritte:

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit serumfreien Medium gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml der Behandlungslösung mit unterschiedlicher Konzentration der Testsubstanz folgte eine Inkubation über 2 Stunden. Im Anschluß wurde die Behandlungslösung entfernt, die Zellen dreimal mit serumfreien Medium gewaschen und mit Vollmedium überschichtet. Die Erholungszeit nach der Exposition betrug für alle Experimente 18 Stunden und erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> und begann mit dem Auswaschen der Behandlungslösung. Die Zellen erhielten während der Erholungszeit kein BrdUrd.

### 9.3.17 Aufarbeitung der behandelten Zellkulturen

Zwei Stunden vor Beginn der Aufarbeitung wurde den Zellen 0.08 µg · mL<sup>-1</sup> des Spindelgifts Colcemid zugesetzt. Die induzierten C-Metaphasen erlauben eine verlässliche Analyse struktureller Chromosomenveränderungen. Die Aufarbeitung unter nicht sterilen Bedingungen umfaßte folgende Arbeitsschritte. Die lose haftenden mitotischen Zellen wurden mittels Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 120 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml einer hypotonen 1%igen Natriumcitratlösung 8 Minuten bei 37°C überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde zweimal tropfenweise ein Gemisch aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1 (Fixativ) zugegeben. Anschließend wurde jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende der Fixierung wurde der Zellüberstand in Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets bis auf etwa 0.5 mL entfernt und das Zellpellet mit Hilfe einer Pasteurpipette suspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Anschluß auf die kalte, feuchte und fettfreie Oberfläche eines Objektträger aufgetropft. Die so angefertigten Präparate wurden über 24 Stunden im Trockenschrank bei 37°C getrocknet.

### 9.3.18 FPG-Färbung der Präparate

Die FPG-Färbung (Fluoreszenz-**plus**-Giemsa) erfolgte nach folgendem Verfahren:

Die getrockneten Präparate wurden 20 Minuten in  $4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  einer wäßrigen Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 (Bisbenzimid) eingebracht. Nach mehrmaligem Spülen der Objektträger mit destilliertem Wasser und PBS wurden diese eingedeckelt und 20 Minuten auf einer Heizplatte bei  $60^\circ\text{C}$  mit Schwarzlicht bestrahlt. Nach Entfernen der Objektträger wurden die Präparate erneut mit destilliertem Wasser gespült und unter Verwendung einer wäßrigen Giemsalösung (5 % Giemsafarblösung, 20 % Phosphatpuffer) bei pH 6.8 10 Minuten gefärbt. Im Anschluß wurde mit destilliertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

### 9.3.19 Auswertung

Die Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte lichtmikroskopisch. Für eine hinreichend genaue statistische Auswertung wurden pro Behandlungspunkt 50 vollständig differentiell gefärbte Metaphasen mit 20 - 22 Chromosomen auf SCE ausgewertet. Als SCE wurde hierzu ein Farbwechsel auf einer Chromatide von hell nach dunkel und umgekehrt gewertet. Die SCE aller Chromosomen einer Metaphase entsprechen den SCE pro Zelle.

#### 9.3.19.1 Statistische Auswertung

Die Analyse der Meßdaten auf statistisch signifikante Unterschiede erfolgte mit Hilfe des Student's *t*-Test für unabhängige Stichproben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $p < 0.05$ ) gelten die verglichenen Mittelwerte als signifikant unterschiedlich.

### 9.3.20 Polymerisation in Phosphatidylcholin-Vesikeln

Die Untersuchung der Polymerisation lipophiler Monomere in der Doppelschicht riesiger Vesikel erfolgte mit Hilfe der Videomikroskopie. Hierzu kam ein BX-50 Durchlichtmikroskop in Kombination einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung mit Konversionslinse (Olympus Optical Company) zum Einsatz. Die Anregung erfolgte im UV-Bereich mit einer 100 W Quecksilber-Hochdrucklampe sowie einem Standardmodul, das aus einem Breitbandanregungsfilter ( $I_{\text{Anregung}} = 330 - 385 \text{ nm}$ ), einem dichroitischen Teilerspiegel (DM400) und einem Sperrfilter ( $I_{\text{Sperr}} = 420 \text{ nm}$ ) bestand.

Die Charakterisierung der Polymerisationsprodukte in großen unilamellaren Vesikeln erfolgte mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie sowie der Protonenresonanzspektroskopie. Die kalorimetrischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung eines dynamischen Differenzkalorimeters (DSC-2, Perkin Elmer). Die Protonenresonanzspektren wurden mit Hilfe eines Varian-Spektrometers (Gemini XL 200) bei einer Meßfrequenz von 200 MHz durchgeführt.

### 9.3.20.1 Allgemeine Präparationsmethode

Phosphatidylcholinvesikel wurden mit der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 (bzw. der Extrudertechnik gemäß 9.2.2) in einer Konzentration von  $c = 1$  (bzw. 10)  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dargestellt und in einem Reaktionsgefäß ( $V = 3 \text{ mL}$ ) unter Inertgasatmosphäre auf  $10^\circ\text{C}$  oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur temperiert.

Ein Volumen von 1 mL des äquimolaren Monomergemisches, bestehend aus einem reaktiven Monomer und einem Quervernetzer, wurde unter Inertgasatmosphäre mit einer Spatelspitze AIBN versetzt. Als Monomer fungierte ein Gemisch aus Styrol und *p*-Divinylbenzol bzw. Methacrylsäurebutylester und Ethylenglycoldimethacrylat.

Ein Aliquot dieser Lösung wurde zu der Vesikeldispersion in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 gegeben und unter Rühren über einen Zeitraum von 6 Stunden equilibriert. Durch Steigerung der Temperatur auf etwa  $60^\circ\text{C}$  wurde die Reaktion gestartet und das Reaktionsgemisch weitere 6 Stunden auf  $60^\circ\text{C}$  temperiert. Die trübe Dispersion wurde mikroskopisch untersucht. Durch vorsichtige Zugabe von Methanol und anschließende Zentrifugation wurde das Polymer isoliert, das weiße Pulver anschließend mehrmals mit Methanol gewaschen und nach der Trocknung ebenfalls mikroskopisch untersucht.

### 9.3.20.2 Kalorimetrische Untersuchungen

Zur Durchführung der kalorimetrischen Untersuchungen wurden DPPC-Vesikel in einer Konzentration von  $c = 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  mit dem jeweiligen Monomergemisch ( $c = 25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) versetzt, in einen Probenbehälter eingebracht und kalorimetrisch untersucht. Im Anschluß wurde die Probe 3 Stunden auf  $60^\circ\text{C}$  temperiert und erneut kalorimetrisch untersucht.

### 9.3.20.3 Protonenresonanzspektroskopische Untersuchung

Die protonenresonanzspektroskopischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel (SUV), die gemäß 9.3.1 hergestellt wurden. Ein äquimolares Gemisch von Styrol und Divinylbenzol wurde in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 solubilisiert und spektroskopisch untersucht. Nach einer thermisch initiierten Polymerisation über einen Zeitraum von 10 Stunden bei  $60^\circ\text{C}$  mit AIBN als Initiator wurde das Reaktionsgemisch erneut protonenresonanzspektroskopisch untersucht.

### 9.3.20.4 Mikroskopische Untersuchung

Riesige DMPC-Vesikel wurden mit dem Reaktionsgemisch beladen und unter Inertgas in eine Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) eingefüllt und durch Aufsetzen eines Herasil-Deckglases ( $d = 0.17$  mm) verschlossen. Die Küvette wurde in die Objektkammer des temperierbaren Objektisches eingebracht und auf  $30^{\circ}\text{C}$  temperiert. Die Beobachtung der Reaktion einzelner unilamellarer Vesikel erfolgte bei gleichzeitiger photochemischer Initiierung unter Verwendung eines Durchlichtmikroskops in Kombination mit einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung zur Anregung im UV-Bereich. Die entsprechende Absorptionsbande der Azogruppe des 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) zeigt ein Maximum bei 360 nm.

### 9.3.21 Beeinflussung der Vesikelmorphologie

Die Untersuchung des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop BX-50 (Olympus Optical Company) in Kombination mit einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung gemäß 9.3.20 unter Verwendung eines Phasenkontrastobjektives 40-facher Vergrößerung, N.A. = 0.75 (Ph 2, Olympus Optical Company).

#### 9.3.21.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die Darstellung riesiger Vesikel erfolgte unter Verwendung einer Lösung von DMPC ( $c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und Pyren (10 Mol-%) in Chloroform mittels der in beschriebenen 9.2.3.1 Quellmethode. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung einer Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) bei konstanter Temperatur.