

**Untersuchungen zur Stabilisierung von Membranproteinen
mit ungewöhnlichen Phospholipiden**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte
Abhandlung

vorgelegt von
Sandra Pisch-Heberle
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. R.D. Schmid

Mitberichter: Prof. Dr. D. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.00

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1996 bis Dezember 1999 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Betreuung der Arbeit, die jederzeit gewährte Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. U.T Bornscheuer danke ich für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für die zahlreichen Diskussionen.

Der japanischen Organisation NEDO möchte ich meinen Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. A. Blume für die Betreuung der physikochemischen Untersuchungen, seine Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Ergebnisse und die gewährte Gastfreundschaft.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. G. Förster für seine geduldige Einführung in die Problematik der Röntgenographie und seine umfassende Hilfe und Unterstützung bei der experimentellen Durchführung und Auswertung der Ergebnisse.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Biochemie, insbesondere Frau Dr. Ulrike Schmid gilt mein Dank für viele interessante Gespräche, stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Bei Frau Dipl.-Biol. Petra Traub und Frau Dipl.-Ing. Gaby Neumann möchte ich mich herzlich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken bedanken.

Herrn Dr. D. Schwarz und Herrn Dr. P. Kissilev vom Max Delbrück Center Berlin-Buch danke ich für wertvolle Anregungen, die praktische Unterstützung und die gewährte Gastfreundschaft.

Den Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Chemie der Universität Halle möchte ich meinen Dank für zahlreiche produktive Diskussionen, die stete Hilfsbereitschaft und die außerordentliche Gastfreundschaft aussprechen. Insbesondere Frau Dr. Maria Requero und Frau

Bettina Fölting danke ich für die Aufnahme von IR-spektren und für die Durchführung von DSC-Messungen.

Herrn Prof. H. Ohkawa, Herrn Dr. H. Inui und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pesticide Biochemistry danke ich für viele wertvolle Diskussionen, die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und Gastfreundschaft während meines Aufenthalts am Institut für Landwirtschaft, Universität Kobe, Japan.

An dieser Stelle möchte ich mich beim deutschen Akademischen Austauschdienst DAAD für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsaufenthalts in Japan bedanken.

Herrn Dr. P. Fischer, Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung, Stuttgart danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Prof. H.H. Meyer, Universität Hannover danke ich für die Überlassung der acetylenischen Fettsäuren.

Frau Dr. H. Watzlawick, vom Institut für Industrielle Genetik, Stuttgart danke ich für die Einführung in den Umgang mit radioaktiven Substanzen.

Herrn Prof. Bayerl und Herrn Dipl.-Phys. M. Hildebrand, Universität Würzburg danke ich für die praktische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente zur Gößenbestimmung von Liposomen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Zum Schluß, doch eigentlich an erster Stelle gilt mein Dank meinem Mann Jochen und meiner Familie für die jahrelange geduldige Unterstützung und für die schönen nichtakademischen Ablenkungen.

**Für Jochen
und meine Eltern**

Im Gebirge der Wahrheit kletterst du
nie umsonst: Entweder du kommst
schon heute weiter hinauf oder du
übst deine Kräfte, um morgen höher
steigen zu können.

Nietzsche

Kurzfassung: Untersuchungen zur Stabilisierung von Membranproteinen mit ungewöhnlichen Phospholipiden.

Phospholipide, eine wichtige Lipidklasse, haben eine Vielzahl biologischer Funktionen. Neben ihrer Rolle als Signalmoleküle und Energiereserve sind sie zentrale Bestandteile biologischer Membranen aller Organismen. Daher stieg ihre Bedeutung für eine Anwendung auf dem Gebiet der Pharmazie und Kosmetik. So werden Liposomen zum Beispiel in der biomedizinischen Forschung als Wirkstoffschleusen eingesetzt¹ und Phospholipide, die Inhibitoren wie Aza-Zucker, Nukleoside und Peptide als Kopfgruppe tragen⁶, sind potentielle Pharmazeutika. Da die *de novo* Synthese von Phospholipiden schwierig ist, ist ihre Wirkungsweise in Membranprozessen hauptsächlich mit Eigelbextrakten³ und Bakterienkulturen² untersucht worden. In vorangegangenen Arbeiten, die sich mit der Anwendung von Phospholipiden für die Stabilisierung von Membranproteinen beschäftigten⁵, wurden eine Reihe von isomeren Phosphatidylcholinen synthetisiert, die acetylenische Fettsäuren tragen und einen T_m -Wert im Bereich physiologischer Temperaturen haben. Da biologische Membranen aus Phospholipiden unterschiedlicher Kopfgruppen bestehen, wurden über Kopfgruppenaustausch mit Phospholipase D mit vier neue Gruppen acetylenischer Phospholipide - Ethanolamin, L-Serin, Glycerol und Phosphatidat – erhalten⁴.

Diese Verbindungen wurden physikochemisch (DSC, FT-IR und Röntgenbeugung) charakterisiert. Ein großer Vorteil dieser acetylenischen Phospholipide ist ihr um ca. 30 °C niedriger T_m -Wert im Vergleich zu dem entsprechenden gesättigten Phospholipid.

Jedoch war bisher nicht bekannt, welchen Einfluß die ungewöhnlichen Phospholipide auf die Aktivität und Stabilität von integralen Membranproteinen ausüben. Der Einfluß der acetylenischen Phospholipide auf die Aktivität einer mitochondrialen P450-Monooxygenase des steroidogenen Stoffwechsels - P450_{SCC} (CYP11A1) - war daher Gegenstand der Untersuchung. Dabei wurde eine geeignete Technik zur Herstellung von Liposomen mit einem Durchmesser von 100 nm entwickelt, wobei die Grössenverteilung der Liposomen durch Lichtstreuung ermittelt wurde. Es ergaben sich Gesetzmäßigkeiten im Bereich der Acylketten hinsichtlich der Lage der Dreifachbindung. Gleichzeitig wurde ein signifikanter Einfluß der verschiedenen Kopfgruppen beobachtet.

¹Barratt, G. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **862**, 153-.

²Kannenbergh, E., Blume, A., Geckeler, K. und Poralla, K. (1985) *Biochimica et Biophysica Acta* **814**, 179-.

³Paternostre, M.T., Roux, M. und Rigaud, J.L. (1988) *Biochemistry* **27**, 2669-.

⁴Pisch, S., Bornscheuer, U.T., Meyer, H.H. und R.D., S. (1997) *Tetrahedron* **53**, 14627-.

⁵Rürup, J., Manova, M., Brezesinski, G. und Schmid, R.D. (1994) *Chem. Phys. Lipids* **70**, 187-.

⁶Wang, P. (1993) *Am. Chem. Soc* **115**, 10487-.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGEN UND PHYSIKALISCHE GRÖßEN	5
2	EINLEITUNG.....	7
2.1	LIPIDE.....	9
2.1.1	<i>Biomembranen und ihre Lipidkomponenten.....</i>	9
2.1.2	<i>Lipide mit ungewöhnlicher Struktur.....</i>	11
2.1.3	<i>Selbstorganisation und Polymorphismus von Lipiden</i>	12
2.1.4	<i>Thermotropes Phasenverhalten von Lipiden.....</i>	14
2.2	PHYSIKALISCHCHEMISCHE METHODEN ZUR LIPIDCHARAKTERISIERUNG.....	19
2.2.1	<i>Kalorimetrische Methoden DSC.....</i>	19
	<i>FT-IR-Spektroskopie.....</i>	22
2.2.2.1	Charakteristische Schwingungen der Acylketten.....	23
2.2.2.2	Charakteristische Schwingungen des hydrophilen Molekülbereichs.....	24
2.2.3	<i>Röntgenbeugung.....</i>	27
2.2.3.1	Allgemeines.....	27
2.2.3.2	Röntgenbeugung an Phospholipid-Dispersionen.....	30
2.3	ANALYTISCHE METHODEN ZUR LIPIDCHARAKTERISIERUNG.....	34
2.3.1	<i>HPLC-Analytik.....</i>	34
2.3.2	<i>Iatroscan-Analysator (TLC-FID).....</i>	34
2.3.3	<i>Dünnschichtchromatographie.....</i>	35
2.3.4	<i>Kernresonanzspektroskopie (NMR).....</i>	36
2.4	PHOSPHOLIPASEN D.....	38
2.4.1	<i>Allgemeines.....</i>	38
2.4.2	<i>Vorkommen und Bedeutung.....</i>	40
2.4.3	<i>Biotransformationen mit Phospholipasen D.....</i>	41
2.4.3.1	Substratspezifität und Enzymkinetik.....	41
2.4.3.2	Nukleophile für die Transphosphatidylierung.....	42
2.4.4	<i>Lösungsmittelsysteme für die Transphosphatidylierung mit PLD.....</i>	43
2.4.4.1	Weitere Einflußgrößen für die Transphosphatidylierung mit PLD.....	45
2.4.4.2	Anwendungsgebiete der Syntheseprodukte von PLD.....	45
2.5	P450-MONOOXYGENASEN ALS MODELLE FÜR MEMBRANPROTEINE.....	47
2.5.1	<i>Historischer Hintergrund der Entdeckung von P450.....</i>	47
2.5.2	<i>Die P450 Superfamilie-Evolution, Biodiversität und Nomenklatur</i>	49
2.5.2.1	Evolution.....	49
2.5.2.2	Biodiversität.....	50
2.5.2.3	Nomenklatur.....	51
2.5.3	<i>Oxygenierungs- Mechanismus von P450</i>	52
2.5.3.1	Der katalytische Zyklus von P450.....	52
2.5.4	<i>Protein-Lipid Wechselwirkungen in P450 Systemen.....</i>	57
2.5.5	<i>Substrat-Spezifität eukaryotischer P450-Monooxygenasen.....</i>	59
2.5.6	<i>Steroidogenische P450-Enzyme</i>	64

2.5.6.1	Steroidhormone des Körpers	64
2.5.6.2	P450 _{SCC} -Enzyme System	66
2.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	68
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	69
3.1	CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESSEN DER PHOSPHOLIPIDE	69
3.1.1	<i>Allgemeines</i>	69
3.1.2	<i>Optimierung des Reaktionssystems für die quantitative Synthese der acetylenischen Phospholipide durch Transphosphatidylierung mit Phospholipase D</i>	71
3.1.3	<i>Isolierung und Reinigung der Rohprodukte</i>	72
3.1.4	<i>Analytik der acetylenischen Phospholipide</i>	73
3.1.4.1	Dünnschichtchromatographie	73
3.1.4.2	Analytische HPLC	74
3.1.5	<i>Kernresonanzspektroskopie NMR</i>	75
3.1.6	<i>Diskussion- Synthese der (1,2)-Diacyl-phospholipide</i>	75
3.2	PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHOLIPIDE - KALORIMETRIE (DSC)- FT-IR-SPEKTROSKOPIE UND RÖNTGENBEUGUNG	77
3.2.1	<i>Vorbemerkungen</i>	77
3.2.2	<i>Durchführung und Auswertung</i>	78
3.2.3	<i>1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-Phosphatidylcholin (1a)</i>	79
3.2.3.1	Kalorimetrie	79
3.2.3.2	FT-IR-Spektroskopie	80
3.2.4	<i>1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (2a)</i>	94
3.2.4.1	Kalorimetrie	94
3.2.4.2	FT-IR-Spektroskopie	96
3.2.4.3	Röntgenbeugung	102
3.2.5	<i>1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (1d)</i>	105
3.2.5.1	Kalorimetrie	105
3.2.5.2	FT-IR-Spektroskopie	106
3.2.6	<i>1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (2d)</i>	112
3.2.6.1	Kalorimetrie	112
3.2.6.2	FT-IR-Spektroskopie	115
3.2.6.3	Röntgenbeugung	121
3.2.7	<i>1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidsäure (1b)</i>	124
3.2.7.1	Kalorimetrie	124
3.2.7.2	FT-IR-Spektroskopie	125
3.2.8	<i>1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidsäure (2b)</i>	129
3.2.8.1	Kalorimetrie	129
3.2.8.2	FT-IR-Spektroskopie	130
3.2.8.3	Röntgenbeugung	134
3.2.9	<i>1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylserin (1e)</i>	146
3.2.10	<i>1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylserin (2e)</i>	147
3.2.10.1	Kalorimetrie	147
3.2.10.2	FT-IR-Spektroskopie	148

3.2.10.3	Röntgenbeugung	154
3.2.11	<i>1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (1c)</i>	157
3.2.11.1	Kalorimetrie	157
3.2.11.2	Röntgenbeugung	158
3.2.12	<i>Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (2c)</i>	161
3.2.12.1	Kalorimetrie	161
3.2.13	<i>Vergleichende Diskussion über das spezifische Verhalten der acetylenischen Phospholipide</i>	163
3.2.13.1	Kalorimetrie	163
3.2.13.2	FT-IR-Spektroskopie	166
3.2.13.3	Röntgenbeugung	173
3.3	EINSATZ DER PHOSPHOLIPIDE ZUR STABILISIERUNG VON MEMBRANPROTEINEN	180
3.3.1	<i>Rekonstitution und Aktivitätsstimulierung von Cytochrom P450_{SCC} aus Rind</i>	180
3.3.1.1	Lichtstreuung an Lipid-Cholesterol Vesikeln	181
3.3.1.2	Effekt von isomeren acetylenischen Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen auf die katalytische Aktivität von P450 _{SCC} in DMPC Vesikeln	182
3.3.1.3	Zeitverlauf der Bildung von Pregnenolon in Vesikeln aus Mischungen verschiedener acetylenischer Phospholipide mit DMPC	186
3.3.1.4	Einfluß des Anteils acetylenischer Phospholipide auf die Aktivität von P450 _{SCC} in Vesikeln in Mischungen mit DMPC	188
3.3.1.5	Einfluß des Cholesterol-Lipid Verhältnisses auf die Aktivität von P450 _{SCC}	190
3.3.1.6	Effekt der Adrenodoxin-Konzentration auf die Aktivität von P450 _{SCC}	192
3.3.1.7	Effekt von isomeren acetylenischen Phospholipiden auf die katalytische Aktivität von P450 _{SCC} in Tween 20 Lösungen	194
3.3.2	<i>Diskussion</i>	195
4	ZUSAMMENFASSUNG	201
5	MATERIALIEN UND METHODEN	207
5.1	MATERIALIEN	207
5.1.1	<i>Geräte</i>	207
5.1.2	<i>Chemikalien und Lösungsmittel</i>	208
5.1.3	<i>Enzyme</i>	209
5.2	METHODEN	209
5.2.1	<i>Physikochemische Methoden</i>	209
5.2.1.1	Kalorimetrie-DSC	209
5.2.1.2	FT-IR-Spektroskopie	210
5.2.1.3	Röntgenbeugung	210
5.2.1.4	Partikelgrößenbestimmung der Liposomen	211
5.2.2	<i>Analytische Methoden</i>	211
5.2.2.1	Dünnschichtchromatographie zur Lipidcharakterisierung	211
5.2.2.2	Analytische Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	211
5.2.2.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	211
5.2.2.4	Phospholipase D-Aktivitätstest mittels pH-Stat-Assay	212
5.2.2.5	Konzentrationsbestimmungen der P450 _{SCC} -Monooxygenase, Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase ..	212
5.2.3	<i>Allgemeine Methoden</i>	212

5.2.3.1	Präparative Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).....	212
5.2.3.2	Liposomempräparation zur Partikelgrößenbestimmung.....	212
5.2.3.3	Dialyse der Enzyme	213
5.2.4	<i>Chemoenzymatische Synthesen der Phospholipide</i>	213
5.2.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der 1,2-Di-(Octadecin)-phospholipide.....	213
5.2.5	<i>Einsatz der Phospholipide zur Stabilisierung von Membranproteinen- Aktivitätsstimulierung der P450-Monooxygenase P450_{SCC} aus Rinderherz</i>	218
5.2.5.1	Allgemeines	218
5.2.5.2	Präparation von Phospholipid-Vesikeln	218
5.2.5.3	Rekonstitution von P450 _{SCC} und enzymatischer Aktivitäts-Assay	218
5.2.5.4	Enzymatischer Aktivitäts-Assay von P450 in Tween 20-Micellen	219
6	LITERATUR	221

1 Abkürzungen und Physikalische Größen

Lipide

PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
DMPA	1,2-(Dimyristoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat
DMPC	1,2-(Dimyristoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DOPC	1,2-(Dioleoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-(Dipalmitoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DSPC	1,2-(Distearoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
PL	Phospholipid allgemein
PX	acetylenisches Phospholipid
CL	Cardiolipin

Kurzcode der acetylenischen 1,2-(Diacyl)-phospholipide siehe Abbildung 3.1.1-1.

Chemikalien

CDI	Carbonyldiimidazol
DBU	1,8-Diaza-bicyclo[5,4,0]-7-undecen
DCM	Dichlormethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GPC	Glycerophosphatidylcholin

Methoden

DC	Dünnschichtchromatographie
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FT-IR	Fourrier transform-Infrared
HPLC	Hochauflösende-Flüssigkeitschromatographie
NMR	Kernmagnetresonanz

Phasen

L_{α}	Flüssigkristalline Phase
L_{β}	Gelphase

$L_{\beta'}$	Gelphase mit Tiltwinkel
P_{β}	„Ripple Phase“
$P_{\beta'}$	„Ripple Phase“ mit Tiltwinkel
LC	flüssigkristallin
L_c	Quasikristalline Phase
L_c'	Quasikristalline Phase mit Tiltwinkel

Sonstige Größen

Å	Angström
C_p	Molwärme bei konstantem Druck
δ	Deformationsschwingung
γ, w, r, t	bending, wagging, rocking, twisting
H	Enthalpie
h	Stunde
I	Intensität
min	Minute
ν	Frequenz, Valenzschwingung
ν_s, ν_{as}	symmetrische, antisymmetrische Valenzschwingung
nm	Nanometer
O_{\perp}	Orthorhombische Anordnung der Fettsäureketten, wobei die zig-zag Ebenen der Fettsäureketten senkrecht aufeinander stehen.
O_{\perp}'	Orthorhombische Anordnung der Fettsäureketten, die zig-zag Ebenen der Fettsäureketten stehen senkrecht aufeinander, die Ketten sind über eine Spiegelebene aufeinander abbildbar, die parallel zu den Kettenachsen verläuft.
O_{\parallel}	Orthorhombische Anordnung der Fettsäureketten, wobei die zig-zag Ebenen der Fettsäureketten parallel aufeinander stehen.
R_f	Laufstrecke einer Substanz relativ zur Gesamtlänge des Mediums
R_t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
T	Temperatur
t	Zeit

2 Einleitung

Lipide, zu denen auch die Phospholipide gehören, besitzen ein breites Spektrum biologischer Funktionen. So dienen sie als Signalmoleküle und hochangereicherte Energiespeicher. Doch vor allem kommen Phospholipide in großer Menge in biologischen Membranen vor, wo sie neben Glykolipiden und Cholesterol den höchsten Anteil der Membranlipide stellen.

Biologische Membranen sind für das Leben unerlässlich, denn sie verleihen Zellen Individualität, indem sie sie von ihrer Umgebung abgrenzen.

Sie wirken jedoch nicht nur als passiver Schutzwall (Lehninger, A.L., 1985), sondern funktionieren als hochselektive Permeabilitätsschranken für verschiedene Ionen und Moleküle. Dadurch wird die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums reguliert.

Membranen besitzen spezifische Rezeptoren für äußere Reize, oder sie erzeugen selbst Signale, die chemischer oder elektrischer Natur sein können (Stryer, L., 1991). Bei der biologischen Kommunikation spielen sie somit eine zentrale Rolle.

Das Grundgerüst einer Membran ist die Lipid-Doppelschicht, in die Proteine eingebettet sind. Membranen sind keine starren Strukturen, denn Lipide und viele Membranproteine sind permanent in lateraler Bewegung. Die Wanderung eines Moleküls von einer Membranoberfläche zur anderen wird transversale Diffusion oder „flip-flop“ genannt. Sie ist ein sehr langsamer Vorgang und dauert 10^9 mal so lange wie die Diffusion in lateraler Richtung.

Singer und Nicolson entwarfen 1972 ein Modell für die Organisation biologischer Membranen, das ‘flüssige Mosaik’ (Singer, S.G. *et al.*, 1972). Danach sind Membranen zweidimensionale Lösungen gerichteter Proteine und Lipide, die sich bei physiologischen Temperaturen im fluiden Zustand befinden. Für das Funktionieren der Membran ist die richtige Membranlipid-Zusammensetzung wesentliche Voraussetzung (Buddecke, E., 1985; Träuble, H., 1971). Die Rekonstitution von Proteinen in synthetische Phospholipidmembranen verläuft nur bei Temperaturen oberhalb der charakteristischen Temperatur des Hauptphasenübergangs (T_m) erfolgreich. Ist der T_m -Wert zu hoch, besteht die Gefahr der Protein-Denaturierung. Phospholipide ungewöhnlicher Fettsäuren könnten jedoch eine interessante Alternative darstellen. Hierauf wird ausführlich in Kapitel 3 eingegangen.

Abbildung 2-1. zeigt eine Plasmamembran nach dem Modell des „flüssigen Mosaiks“.

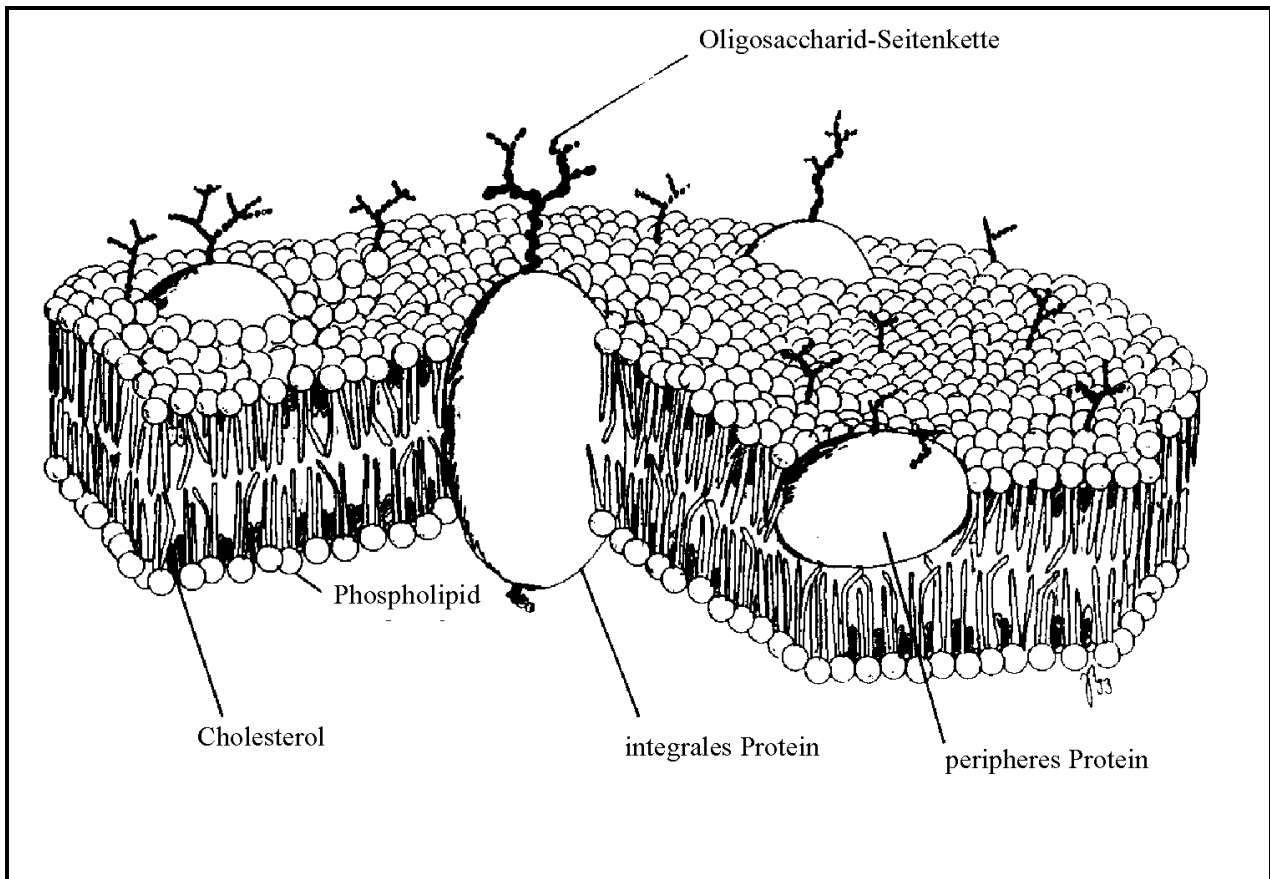


Abbildung 2.1.1-1: Plasmamembran nach dem Modell des „flüssigen ‘Mosaiks“ (Singer, S.G. *et al.*, 1972).

2.1 Lipide

2.1.1 Biomembranen und ihre Lipidkomponenten

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt wurde, sind biologische Membranen für alle Lebensvorgänge unerlässlich. Zwei wichtigste biologische Energiegewinnungsprozesse, die Photosynthese und die oxidative Phosphorylierung, laufen an Membransystemen ab.

Den Hauptteil aller Lipide in Zellmembranen stellen neben den Glykolipiden und Cholesterol die Phospholipide (Stryer, L., 1991) dar. Phospholipide leiten sich entweder von Sphingosin oder von Glycerin ab. Ein Glycerinphosphatid besteht aus einem Glycerin-Grundgerüst, das in den Positionen 1 und 2 mit Fettsäuren und in Position 3 mit Phosphat verestert ist. So ergibt sich die systematische Bezeichnung 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphat, wobei *sn* stereospezifisch numeriert bedeutet. Die Nomenklatur geht auf (Hirschmann, H., 1960) zurück.

Eine Chiralität des Glycerinmoleküls kommt durch eine selektive, nicht statistische Verteilung der Substituenten über die Positionen 1, 2 und 3 zustande. Das S-Enantiomer 2,3-Diacyl-*sn*-glycero-1-phosphat wurde bis heute in der Natur nicht nachgewiesen.

In typischen Membranphospholipiden ist die Phosphateinheit mit einer primären Alkoholgruppe verestert. Daraus ergeben sich beispielsweise Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositole (PI) etc. Dabei unterscheidet man nach strukturellem Aufbau des polaren Bereichs zwischen negativ geladenen (PS, PG, PI, PA) und zwitterionischen (PE, PC) Lipiden (Eibl, H., 1984). Die vielfältigen Eigenschaften der Phospholipide liegen in ihrem amphiphilen Charakter begründet. Sie gliedern sich in eine hydrophile, polare Kopffregion und den hydrophoben, apolaren Bereich der Kohlenwasserstoffketten.

Die Fettsäuren sind gewöhnlich aus geradzahligem Kohlenstoffketten aufgebaut, deren Länge typischerweise zwischen 14 und 24 Atomen variiert. Natürliche Phospholipide enthalten an den 1 und 2 Positionen des Glycerin-Grundgerüsts verschiedene Fettsäureketten (Hoppe, W. *et al.*, 1982).

In pflanzlichen Material überwiegen die mehrfach ungesättigten Acylketten, während bei Säugetieren der Anteil an gesättigten Kohlenwasserstoffen dominiert. Tabelle 2.1.1-1 bietet einen Überblick über die Verteilung der Fettsäuren in natürlichen Lecithinen aus Soja, Ei und Ratte (Kukis, A., 1978).

Natürliche Phospholipide tragen an den Positionen *sn1* und *sn2* des Glycerin-Grundgerüsts unterschiedliche Fettsäureketten. Membranen selber stellen ebenfalls kein homogenes Gebilde dar und sind aus einer Mischung aus mehreren Lipiden aufgebaut. So besitzt zum Beispiel die

Membran von Erythrocyten über 100 verschiedene molekulare Arten von Lipiden (Van Deenen, L.L.M. *et al.*, 1974). Ähnliches gilt für die meisten Plasma- und Organellmembranen. Die Ursachen dieser Vielfalt und die Faktoren, die eine Änderung der Lipidzusammensetzung als Reaktion auf externe Variablen bewirken, bedürfen noch der Aufklärung. Es ist wahrscheinlich, daß die Lipidzusammensetzung von Membranen zu einem großen Teil einige grundsätzliche, physikalische Eigenschaften der enthaltenen Lipide reflektiert. Dies beinhaltet zum einen Eigenschaften der Gel- und der flüssigkristallinen Phase von Lipidbilayern, zum anderen die Fähigkeit von Lipiden (im flüssigkristallinen Zustand) zusätzlich zur lamellaren Phase verschiedene Strukturen (Polymorphismus) anzunehmen (Cullis, P.R. *et al.*, 1986).

Kürzel	Verbindung	Relativer Gehalt an PC [%] in Lecithin aus		
		Soja	Ei	Ratte
C16:0	Palmitinsäure	17,2	35,3	28,2
C18:0	Stearinsäure	3,8	13,5	18,0
C18:1	Ölsäure	22,6	26,8	8,4
C18:2	Linolsäure	47,8		
C18:2	cis,cis-6,9-Octadecadiensäure		5,7	19,4
C18:3	α -Linolensäure	8,6		
C18:3	γ -Linolensäure		0,2	
C20:3	all cis-8,11,14-Eicosatriensäure			1,0
C20:4	Arachidonsäure		1,0	17,0
C22:5	all cis-7,10,13,16,19-Docosapentaensäure		1,3	1,5
C22:6	all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure		12,6	3,5

Tabelle 2.1.1-1: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren in natürlichen Lecithinen aus Soja, Ei und Ratte.

2.1.2 Lipide mit ungewöhnlicher Struktur

Fettsäuren, deren Kohlenstoffgerüst Oxo-, Hydroxy- oder Epoxygruppen, *trans*-konfigurierte Doppelbindungen, Dreifachbindungen, Cyclen oder Verzweigungen enthalten, werden als ungewöhnlich bezeichnet. Im Gegensatz dazu stehen die geradkettig gesättigten und *cis*-konfigurierten ungesättigten gewöhnlichen Fettsäuren. Heute sind weit mehr als Eintausend dieser ungewöhnlichen Fettsäuren in der Natur bekannt (Schmid, R.D., 1987). Trotz dieser großen Anzahl ist das Wissen über die biologischen Funktionen ungewöhnlicher Fettsäuren und ihrer Derivate, wie Wachsester, Triglyceride und Phospholipide, gering und ihre wirtschaftliche Anwendung beschränkt.

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften könnten gerade diese Verbindungen zu technischen Problemlösungen durch die Fettchemie beitragen (Schmid, R.D. *et al.*, 1982).

Fettsäuren mit Dreifachbindungen sind in der Natur, wie zum Beispiel in der Pflanzenwelt, weit verbreitet. Sie können aus Angiospermien als Bestandteile ätherischer Öle isoliert werden

(Bohlmann, F. *et al.*, 1957; Bu'Lock, J.D., 1956; Wailes, P.C., 1956). Der größte Teil dieser aus der Volksmedizin bekannten Heil- und Pflanzengifte entstammt der Familie Compositae (Schulte, K.E. *et al.*, 1960). (Sörensen, N.A. *et al.*, 1941) entdeckte den Matricaria-Ester (2,8-Dien-4,8-diindecansäure-methylester) aus Matricaria indora. Gemische von antibiotisch wirksamen Acetylenen wie zum Beispiel die Nemotinsäure (5,6-Dien-8,10-diin-4-hydroxyundecansäure) wurden aus Kulturflüssigkeit von Mikroorganismen und niederen Pflanzen sowie aus verschiedenen Basidomyceten isoliert (Bu'Lock, J.D. *et al.*, 1955). Die Tarinsäure (6-Octadecinsäure) ist die erste bekannte natürliche Fettsäure und wurde 1892 von Arnaud im Samenöl des mittelamerikanischen Baumes Picramnia tariri gefunden (Arnaud, A., 1892). Die Ximeninsäure (*trans*-11-Octadecen-9-insäure), die im Kernöl der afrikanischen Ximenia-Arten vorkommt (Lighthelm, S.P. *et al.*, 1952) und die Crepeninsäure (*cis*-9-Octadecen-12-insäure) aus Crepis foetida (Mikolajczak, K.L., 1964) besitzen eine Eninstruktur. Die Kerne der Früchte von Onguekoa gore engl. enthalten Isanöl, das zu 34 % aus Isansäure (17-Octadecen-9,11-diinsäure) besteht (Steger, A. *et al.*, 1937), die aufgrund ihrer Rotfärbung auch als Erythrogensäure bezeichnet wird. Sie besitzt die für konjugierte Diene charakteristische Neigung zur Polymerisation und begründet damit das technische Interesse an diesen Verbindungen. Acetylenfettsäuren wurden auch in Membranlipiden und Triglyceriden von Moosen gefunden. Dies ist möglicherweise ein Grund für die Kälteadaptionsfähigkeit dieser Pflanzen (Gellermann, J.L., 1975). Diese Tatsache wirft die Frage nach der Beziehung zwischen Zusammensetzung von Membranen, d.h. den physikochemischen Eigenschaften und deren Funktion auf.

2.1.3 Selbstorganisation und Polymorphismus von Lipiden

Phospholipide sind amphiphile Moleküle, d. h. sie bestehen aus einem hydrophoben (lipophilen) und einem hydrophilen Teil. Dispergiert man Phospholipid-Monomere in wässrigem Milieu, erfolgt der Aufbau von geordneten Doppelschichten bei den meisten Phospholipiden und Glykolipiden spontan. Die treibende Kraft der Aggregation ist ein hydrophober Effekt. Durch den Kontakt der gesättigten Kettenbereiche werden Wassermoleküle ausgeschlossen (Tanford, C., 1973) und Wechselwirkungen zwischen Acylketten und Wasser verhindert, was einen energetisch ungünstigen Zustand hervorrufen würde. Die polaren Kopfgruppen der Phospholipide bilden durch Assoziation mit dem umgebenden Wasser eine Hydrathülle. Die Struktur des Wassers mit sehr vielen Wasserstoffbrücken ist extrem empfindlich gegenüber Veränderungen, die durch Moleküle eines gelösten Stoffes (Fettsäureketten) hervorgerufen werden. In der Umgebung eines Kohlenwasserstoffmoleküls würde sie zusammenbrechen und

die Folge wäre eine Struktur mit viel kleinerer Entropie. Bilden die gelösten Moleküle Überstrukturen aus, wird die Berührungsfläche zwischen den hydrophoben Ketten und dem umgebenden Wasser verkleinert. Durch die so verminderte Wirkung des hydrophoben Teils, behält das Wasser seine normale Struktur mit einer größeren Entropie. Durch die Aggregatbildung erhöht sich die Gesamtentropie des Systems.

Die Art der gebildeten Überstrukturen wird durch die Grenzflächenspannung der polaren (p) und apolaren (a) Teilbereiche im Molekül bestimmt. Einen Überblick gibt Abbildung 2.1.3-1.

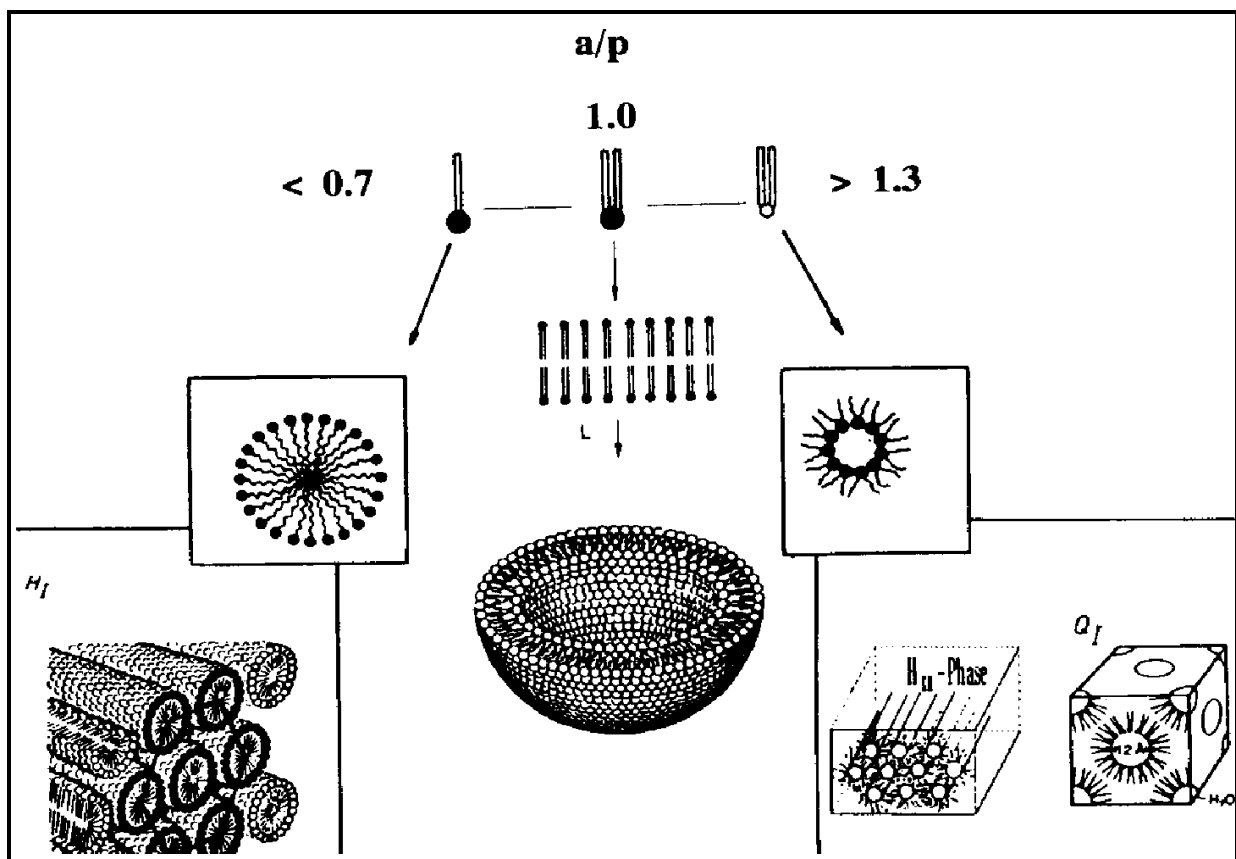


Abbildung 2.1.3-1: Darstellung verschiedener Phospholipid-Überstrukturen in Abhängigkeit von der Molekülstruktur, mit L: lamellare Phase, H_I : normale hexagonale Phase, H_{II} : inverse hexagonale Phase und a/p : Packungsparameter des hydrophoben Molekülbereichs/Packungsparameter des hydrophilen Molekülbereichs.

Nur eine geringe Anzahl von Lipiden, wie das Lyso-Phosphatidylcholin mit nur einer Acylkette am Glycerin, bildet Micellen oder hexagonale Phasen H_I . Eine große Anzahl von Lipiden nimmt die Struktur von hexagonalen Phasen H_{II} bei Hydratisierung an oder induziert diese Struktur in gemischten Lipidsystemen, wie zum Beispiel das Phosphatidylethanolamin (PE) oder Cholesterol. Lamellare Strukturen bevorzugen Lipide wie das Phosphatidylcholin (PC),

Phosphatidylserin (PS) oder Sphingomyelin. Diese Lipide können auch Lipide wie das Phosphatidylethanolamin in Doppelschichten stabilisieren, wenn ihr Anteil zwischen 20 und 60 mol % in der Membran beträgt. Die Bevorzugung bestimmter Strukturen in reinen und gemischten Lipidsystemen wird zum Beispiel von Faktoren wie dem Sättigungsgrad der Acylketten, Temperatur, Kopfgruppengröße, Ionisierung und Hydratisierung bestimmt (Cullis, P.R. *et al.*, 1986). Ein vereinfachtes Schema dazu zeigt Abbildung 2.1.3-2.

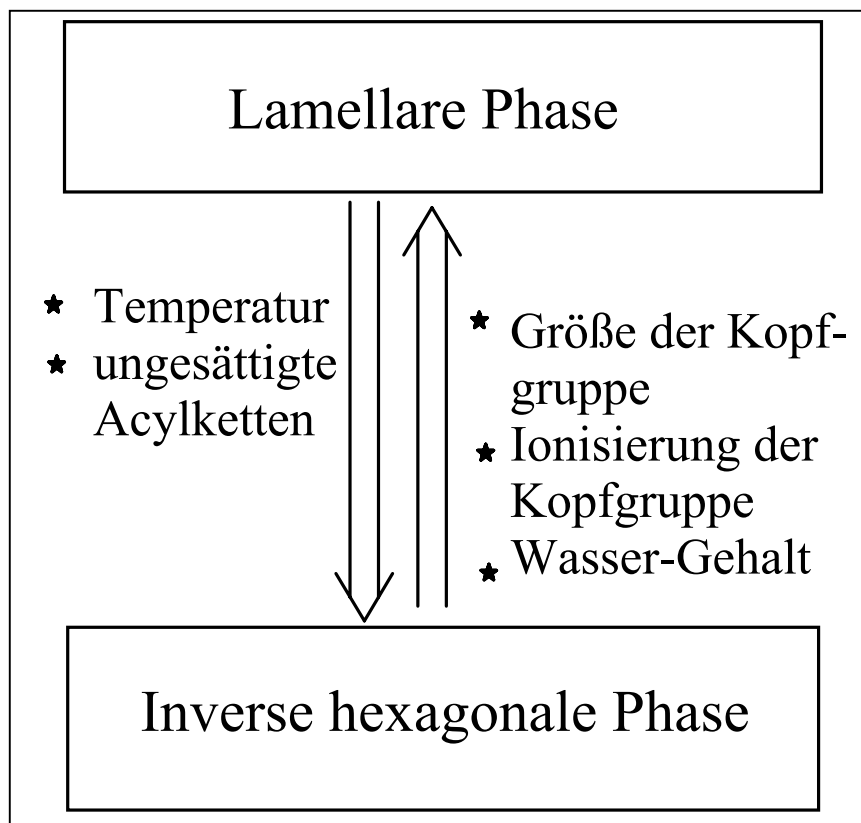


Abbildung 2.1.3-2: Faktoren, die die Strukturen in Lipidsystemen beeinflussen.

2.1.4 Thermotropes Phasenverhalten von Lipiden

Wäßrige Dispersionen von Phospholipiden weisen einen thermotropen Polymorphismus auf. Innerhalb der Lipid-Doppelschichten entstehen Strukturen verschiedener Symmetrie, die durch Phasenübergänge voneinander getrennt sind. Abbildung 2.1.4-1 zeigt die thermotropen Phasenzustände einer Lipid-Doppelschicht und die Bezeichnung und Struktur der lamellaren Phasen.

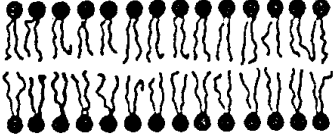
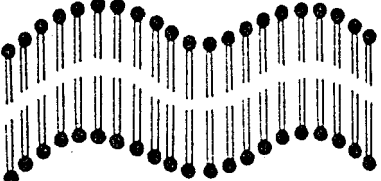
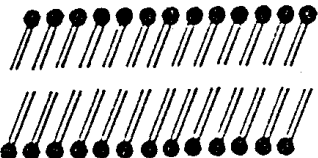
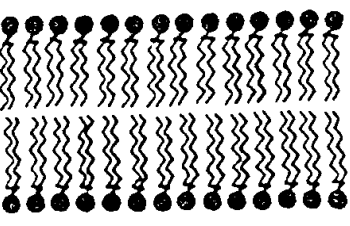
Phase	Struktur der Doppelschicht	Gitter / Packung
L_{α}		Fluide Ketten, <i>trans-gauche-trans</i> Konformation der Acylketten
$P_{\beta'}$		Ketten all-trans, Zweidimensionale Kettenpackung
$L_{\beta'}$		Ketten all-trans, Neigungswinkel 30°, Zweidimensionale Kettenpackung
L_c		Ketten all-trans, Supergitter oder Molekülgitter

Abbildung 2.1.4-1: Ausgewählte thermotrope Phasen einer Lipid-Doppelschicht.

Die L_{α} -Phase (flüssigkristalline Phase) besitzt uniaxiale Symmetrie und zeichnet sich sowohl durch eine hohe Flexibilität der Kohlenwasserstoffketten (gauche-Konformation, „Kinken“) als auch durch eine hohe Beweglichkeit der Lipidmoleküle in der Membranebene aus (laterale Diffusion).

Findet man in der Ebene der Doppelschicht eine regelmäßige Anordnung, so spricht man von der L_{α} -Phase. Sie zeichnet sich durch ihre Biaxialität aus und unterscheidet sich von der L_{α} -Phase

durch das zusätzliche Auftreten einer lateralen Orientierungsordnung. Charakteristisch für beide Phasen ist die kurzreichweitige Ordnung der Kohlenwasserstoffketten.

Alle Phasen des Typs β (Gelphasen: L_{β} , $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$) zeigen langreichweitige Ordnung. Die Kohlenwasserstoffketten, die in *all-trans* Konformation vorliegen, bilden in der Membranebene ein zweidimensionales Gitter (hexagonal, orthorhombisch, triklin) und die Phasen stellen geordnete Membranzustände dar. Obwohl jedes Lipidmolekül aus einer Kopfgruppe und zwei Kohlenwasserstoffketten besteht, impliziert eine solche zweidimensionale Packung keine geordnete Packung des ganzen Lipidmoleküls. Tatsächlich ergaben Analysen von Pulverspektren dieser Phasen einen hohen Grad positionaler Unordnung in den Kopfgruppen (Sun, W.J. *et al.*, 1994).

Je nach Stellung der Kohlenwasserstoffketten zur Membrannormalen treten die Phasen L_{β} (Kettenrichtung parallel zur Membrannormalen) oder $L_{\beta'}$ (Kettenrichtung geneigt zur Membrannormalen) auf. Liegt eine hexagonale Packung der $L_{\beta'}$ -Phase vor, so ist diese durch den unterschiedlichen Platzbedarf von Ketten und Kopfgruppe und die daraus resultierende Neigung der Lipide gegen die Membrannormale, verzerrt.

In der Phase $P_{\beta'}$ sind die Kohlenwasserstoffketten ebenfalls zur Membrannormalen geneigt, jedoch findet man zusätzlich eine waschbrettartige Struktur der Membranebene. Dadurch wird es den Ketten ermöglicht, ein reguläres hexagonales Gitter einzunehmen, wobei es zu einem Anstieg der Dicke der Lipid-Doppelschicht kommt.

Außer der $L_{\alpha'}$ -Phase werden alle aufgezählten Symmetrien an Lipidmembranen beobachtet (Birrell, G.B. *et al.*, 1976; Chapman, D. *et al.*, 1967; Luzatti, V., 1968; Sirota, E.B. *et al.*, 1988; Smith, G.S. *et al.*, 1988; Tardieu, A. *et al.*, 1973).

In der Subgelphase L_c' kommt zum Gitter der Kohlenwasserstoffketten der $L_{\beta'}$ -Phase ein weiterer Ordnungsparameter hinzu. Bei hydratisiertem DPPG (Blaurock, A.E. *et al.*, 1986) wird das Kohlenwasserstoffgitter der $L_{\beta'}$ -Phase durch ein Molekülgitter in der L_c' -Phase ersetzt. Die Gitter in den beiden Monolayern eines jeden Bilayers korrelieren, doch es gibt keine Wechselbeziehung zwischen den Bilayern.

Während die Struktur der L_c' -Phase von DPPC (Raghunathan, V.A. *et al.*, 1995) in mancher Hinsicht der L_c' -Phase von DPPG ähnelt, gibt es hier auch wichtige Unterschiede zwischen beiden Systemen, nämlich die Präsenz eines molekularen Supergitters bei DPPC. Beim Phasenübergang $L_{\beta'} \rightarrow L_c'$ im DPPC-Wasser System wird das molekulare Supergitter gebildet, ohne das Gitter der Kohlenwasserstoffketten zu zerstören. Die gleichzeitige Existenz der beiden

Gitter erfordert, daß beide die gleiche Symmetrie haben und tatsächlich ist die Einheitszelle des Supergitters doppelt so groß wie die des Kettengitters. Da der Phasenübergang $L_{\beta'} \rightarrow L_c$ eine Neuorientierung der Lipidmoleküle innerhalb des Bilayers erfordert, ist dies erwartungsgemäß ein sehr langsamer Prozeß.

Diese Phasenübergänge sind thermisch auslösbar, sie können jedoch auch durch Parameter wie pH-Wert und Ionenstärke des wäßrigen Mediums bei konstanter Temperatur induziert werden. Eine künstliche, nur von einer Sorte von Phospholipid aufgebaute Membran, geht bei der jeweils charakteristischen Temperatur T_m von der festen amorphen oder gelartigen Phase (β -Phase) in eine flüssig-kristalline Phase (α -Phase) über. Dies wird als Hauptphasenübergang bezeichnet. Als strukturelle Änderung tritt ein ein 'Schmelzen' der Acylketten auf. Ihre dadurch gewonnene Beweglichkeit erhöht die Fluidität der L_{α} -Phase (Tilcock, C.P.S., 1986). Der Übergang $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ wird als Vorumwandlung („Pretransition“ T_p) bezeichnet und der Phasenübergang $L_c \rightarrow L_{\beta'}$ als Subumwandlung T_s .

Der T_m -Wert ist abhängig vom Aufbau der Kopfgruppe, von der Länge und dem Sättigungsgrad der Acylketten (Bloom, M. *et al.*, 1991; Blume, A., 1983; Blume, A., 1988). Die Anwesenheit verschiedener Lipide in unterschiedlichem Verhältnis liefert die jeweils benötigte Fluidität. Lipide, die bei physiologischen Temperaturen die Gel-Phase bevorzugen sind jedoch nur in geringem Anteil in biologischen Membranen enthalten (Stubbs, C.D., 1983). Die Membran-Fluidität ist umgekehrt proportional zur Membran-Viskosität. Diese wiederum ist invers-proportional zur rotations- und lateralen Diffusionsfrequenz von Membrankomponenten. Es ist bekannt, daß der Einbau von gesättigten Lipiden und Cholesterol die Fluidität von Membranen senkt. Cholesterol steigert jedoch die rotatorische Diffusionsfrequenz (Gosh, R. *et al.*, 1982). Der Haupteinfluß von Cholesterol ist eine Erhöhung der Ordnung in den Acylketten (Davis, J.H., 1983).

Abbildung 2.1.4-2 illustriert einige Begriffe, die bei physikalischen Untersuchungen an Modellmembranen wichtig sind.

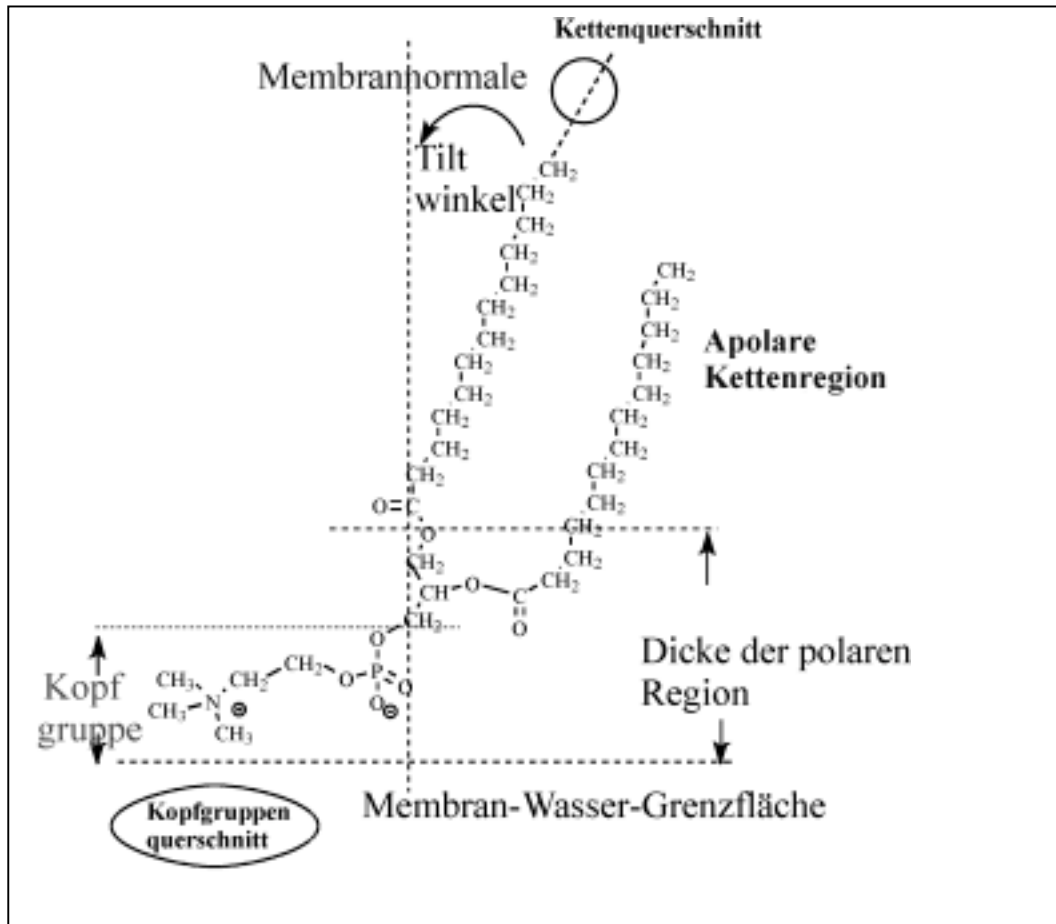


Abbildung 2.1.4-2: Schematische Darstellung einer Modellmembran.

2.2 Physikalisch-Chemische Methoden zur Lipidcharakterisierung

Die Strukturaufklärung von Lipidmembranen kann mit zahlreichen physikalischen Methoden in Angriff genommen werden. Ohne auf die Beschreibung der Methoden und ihrer Aussagekraft näher einzugehen (siehe Übersichtsartikel: (Chapman, D., 1973; Pesce, A.J. *et al.*, 1971), soll jedoch erwähnt werden, daß diese Techniken in zwei Klassen eingeteilt werden können. Zur ersten Klasse gehören Methoden, die ohne Störung der Membrananordnung arbeiten (z.B. Röntgenbeugung, Kernspinresonanz, DSC, FT-IR-Spektroskopie); zur zweiten die Methoden, die mit externen Indikatormolekülen arbeiten und möglicherweise Störungen der Membranordnung in Kauf nehmen. Dies ist ein Nachteil, der allen „Label“-Techniken (Fluoreszenz-Polarisation) anhaftet und zu Fehlinterpretationen führen kann (Shinitzky, M. *et al.*, 1978). Im folgenden wird nur auf die Röntgenbeugung, Kalorimetrie und FT-IR-Spektroskopie eingegangen, da diese Techniken ausschließlich in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.2.1 Kalorimetrische Methoden DSC

Phasenübergänge können in Lipidmembranen durch Temperaturerhöhung ausgelöst werden. Die dafür notwendige Energie kann mit kalorimetrischen Methoden gemessen werden, wobei die Differential Scanning Calorimetry (DSC) die gebräuchlichste Methode darstellt. Aus der Thermodynamik ist bekannt, daß die Gibbs'sche freie Energie beim Phasenübergang stetig ist, falls der Phasenübergang reversibel durchlaufen wird. Da die mikroskopische Struktur der neuen Phase von der Alten verschieden ist, tritt gewöhnlich eine sprunghafte Änderung der Entropie $\Delta S^{1 \rightarrow 2}$ am Phasenübergang auf. Dem entspricht eine latente Wärme

$$\Delta Q_t = T_t \Delta S^{1 \rightarrow 2} .$$

Gleichung 2.2.1-1

Wird der Phasenübergang von niedrigen zu hohen Temperaturen durchlaufen, so besitzt die neue Phase eine höhere Entropie als die ursprüngliche und damit muß die latente Wärme dem System zugeführt werden. Im umgekehrten Fall, der Abkühlung, wird die latente Wärme vom System abgegeben.

Welcher thermodynamischen Größe entspricht nun die latente Wärme ΔQ_t ? Ausgehend von der Gibbs'schen freien Energie

$$G = H - TS$$

Gleichung 2.2.1-2

und der Bedingung

$$\Delta G = 0 = \Delta H - T_t \Delta S$$

Gleichung 2.2.1-3

die aus der Stetigkeit von G beim Phasenübergang folgt, ergibt sich eine sprunghafte Änderung der Enthalpie

$$\Delta H = T_t \Delta S,$$

Gleichung 2.2.1-4

wobei T_t die Temperatur ist, bei der der Phasenübergang stattfindet. Die Enthalpie berechnet sich aus der Beziehung

$$H = U + pV.$$

Gleichung 2.2.1-5

Wird der Prozess isotherm – isobar geführt, dann folgt:

$$\Delta H = dU + pdV$$

Gleichung 2.2.1-6

Und mit dem 1.Hauptsatz

$$\Delta U = dQ - pdV$$

Gleichung 2.2.1-7

kann die beim Phasenübergang zu- oder abgeführte Wärme der Änderung der Enthalpie

$$\Delta H = \Delta Q_t$$

Gleichung 2.2.1-8

zugeordnet werden.

Soll ein System Wärme aufnehmen oder abgeben, so muß zwischen dem System und seiner Umgebung eine endliche Temperaturdifferenz bestehen. Durch die Temperaturdifferenz entstehen Wärmeströme und damit können Wärmelecks auftreten, die im Zusammenhang mit Wärmetransporterscheinungen wie Wärmeleitung, Wärmeübergang usw. einhergehen.

Eine elegante Methode, die Wärmelecks so klein wie möglich zu halten, ist im Leistungskompensations-Differenz-Kalorimeter gegeben.

Bei dieser Technik werden Proben- und Referenz-Substanz einzeln beheizt. Die individuelle Heizleistung wird mit Hilfe eines vorgegebenen Temperatur-Zeit-Programms so geregelt, daß Probe und Referenz zu jeder Zeit dieselbe Temperatur besitzen. Sobald eine mikroskopische Veränderung in der Probe stattfindet, wird die Heizleistung der Probenheizung derart dynamisch verändert, daß die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz idealerweise null bleibt.

Die Meßgröße der Leistungsdifferenz-Kalorimetrie ist somit die Differenz der Heizleistung ΔP und diese wiederum entspricht der Differenz der Wärmeströme dQ / dt zwischen Meßzelle und Referenz. Die Meßkurve ergibt sich somit aus der Differenz der beiden Wärmeströme bzw. der Differenz der Heizleistung

$$Q = \int_{t_1}^{t_2} \Delta P(t) dt - \int_{t_1}^{t_2} (C_P - C_R) \beta dt \quad \text{Gleichung 2.2.1-9}$$

wobei t_1 , t_2 den Beginn und das Ende der Meßkurve, C_P und C_R die Wärmekapazitäten der Probe und der Referenzsubstanz und β die Heizrate bedeuten. C_P läßt sich als Funktion der Temperatur bestimmen:

$$C_P = \frac{1}{m} \frac{dQ}{dT} = \frac{1}{\beta m} dQ(T) \quad \text{Gleichung 2.2.1-10}$$

und mit

$$\Delta H = \Delta Q \quad \text{Gleichung 2.2.1-11}$$

ergibt sich durch Integration der gemessenen $C_P(T)$ - Funktion die Enthalphiedifferenz der Phasenumwandlung

$$\Delta H = \int_{T_A}^{T_E} C_P(T) dT \quad \text{Gleichung 2.2.1-12}$$

mit T_A und T_E als Anfangs- und Endtemperatur der Meßkurve. Abbildung 2.2.1-1 zeigt das Schaltbild eines Leistungsdifferenz-Kalorimeters.

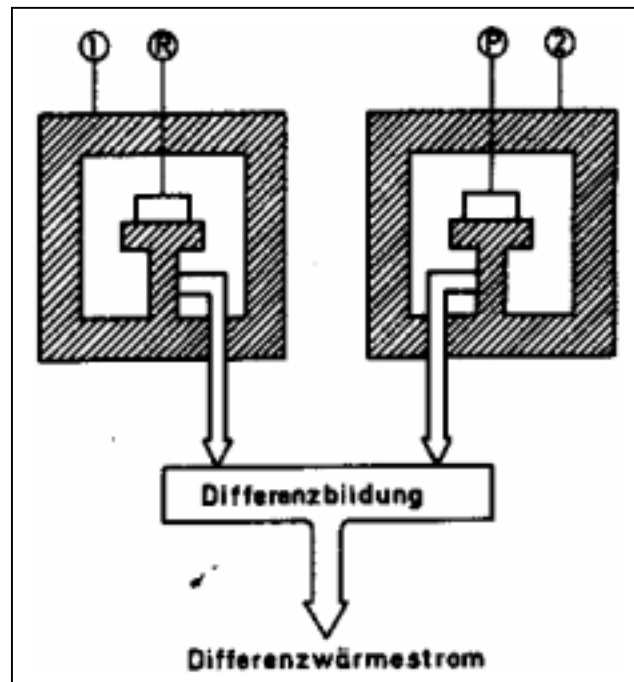


Abbildung 2.2.1-1: Schaltbild eines Leistungsdifferenz-Kalorimeters mit ①: Kalorimeter 1, ② Kalorimeter 2, P. Probe, R: Referenz.

2.2.2 FT-IR-Spektroskopie

Die Fourier transform-Infrarot Spektroskopie ist eine leistungsfähige Technik in der Erforschung des Polymorphismus von Phospholipiden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die vorher schon angesprochene Tatsache, daß keine spektroskopischen Markierungen des Moleküls erforderlich sind, so daß die FT-IR-Spektroskopie als nicht-invasive Möglichkeit zum Studium von biologischem Material angesehen werden kann. Theorien, verschiedene Methoden und Techniken, die in biophysikalischen Untersuchungen zur Anwendung kommen, sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben worden, so daß hier auf die entsprechenden Artikel verwiesen wird (Rahmelow, K. *et al.*, 1996; Snyder, R.G., 1960; Snyder, R.G. *et al.*, 1982), (Blume, A., 1996; Mendelsohn, R. *et al.*, 1993).

Die IR-Spektren von Phospholipiden weisen eine Reihe von Absorptionsbanden auf, deren spektrale Parameter von der Natur der Kopfgruppe und den Fettsäureketten sowie dem Phasenzustand des Lipids abhängen. Da in IR-Spektren Absorptionsbanden auftreten, die lokalisierten Schwingungen einzelner Molekülsegmente zugeschrieben werden können, ist die Interpretation der spektroskopischen, aber auch phänomenologischen Befunde auf molekularer Ebene möglich.

Obwohl die Infrarotbanden von Wasser einige spektrale Regionen maskieren, ist die ganze spektrale Region zugänglich, indem man Spektren der Lipid-Dispersionen in H₂O und D₂O kombiniert. Im folgenden werden nun die charakteristischen Acylketten-Schwingungen und Schwingungen des hydrophilen Molekülbereichs näher beschrieben.

Charakteristische Schwingungen der Acylketten

Die CH₂-Streckschwingungen ergeben Banden in der spektralen Region von 3000-2800 cm⁻¹, mit den antisymmetrischen CH₂-Streckschwingungen bei 2910 cm⁻¹ und den symmetrischen bei 2850 cm⁻¹. Die Intensität der Banden geht hauptsächlich auf die Absorption der großen Zahl von Methyleneinheiten der Fettsäureketten zurück. Absorptionen von CH₂-Gruppen im Kopfgruppenbereich tragen nur in geringem Maße zur Gesamtintensität bei. Die Absorptionsbanden der terminalen Methylgruppen der Fettsäureketten bei 2956 cm⁻¹ (antisymmetrische Schwingung) und 2870 cm⁻¹ sind wegen deren geringen Zahl deutlich intensitätsärmer. Die Frequenzen der Methylengruppen sind von der Konformation der Fettsäureketten abhängig und reagieren auf Temperatur-induzierte Veränderungen *des trans-gauche* Verhältnisses in den Acylketten. Dies trifft auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, auf die Methylstreckschwingungen zu. Dabei verschiebt sich bei einem Phasenübergang der Phospholipide von der Gel in die flüssigkristalline Phase das jeweilige Bandenmaximum zu höheren Wellenzahlen. Die Methylene streckschwingungsbanden sind wegen ihrer großen Intensität besonders geeignet, als Indikator des Phasenzustandes des Lipids und der konformationellen Ordnung der Fettsäureketten zu dienen (Casal, H.L. *et al.*, 1984; Casal, H.L. *et al.*, 1987a; Dluhy, R.A. *et al.*, 1983; Jackson, M. *et al.*, 1989; Wallach, D.F.H. *et al.*, 1979). Die Bandenlage läßt sich als quantitatives Maß für die konformationelle Ordnung der Fettsäureketten und die damit verknüpfte Dichte der Packung der Lipidmoleküle in der Modelmembran auswerten.

Die Deformationsschwingungen der Methyl- und Methylengruppen sind im Bereich von 1500 – 1350 cm⁻¹ angesiedelt. Die CH₂-Scherschwingung führt zu Banden um 1468 cm⁻¹. Die Anzahl dieser Banden wie auch ihre Frequenz hängt von der Packung der Acylketten und ihrer Konformation ab. Die Deformationsschwingung der Methylgruppe tritt bei ca. 1380 cm⁻¹ (symmetrisch) auf.

Infrarotspektren von Polymethylenketten zeigen ebenfalls charakteristische Bandenserien in der Region von 1380-1190 cm⁻¹, mit einer Anzahl und Frequenz, die eine Funktion der Kettenlänge darstellt. Diese Progression der Methylkippschwingungsbanden wird nur beobachtet, wenn die Ketten in *all-trans* Konformation vorliegen. Dies tritt bei Lipiden folglich nur in der Gelphase auf und ist ein Indikator für den Ordnungszustand der Acylketten. Für eine Fettsäurekette mit n

Methyleneinheiten werden $n/2$ dieser Banden beobachtet (Senak, L. *et al.*, 1992). Die Bandenprogression überlappt mit der starken antisymmetrischen Bande der PO_2^- -Streckschwingung bei 1220 cm^{-1} . Diese Phosphatbande ist ebenfalls charakteristisch für den Gelzustand, da sie sich in der flüssigkristallinen Phase zu höheren Wellenzahlen verschiebt.

Charakteristische Schwingungen des hydrophilen Molekülbereichs

Schwingungen funktioneller Gruppen im hydrophilen Molekülbereich führen zu vielfältigen Infrarotbanden. Die interessanteste Bande, um den Bereich des Lipidmoleküls an der Phasengrenzfläche zu untersuchen, stellt die Ester-Carbonylgruppe dar. Die $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung führt zu Banden von $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Die Schwingungsbande wässriger Lipid-Dispersionen ist asymmetrisch. Die Asymmetrie wurde ursprünglich durch konformationelle Unterschiede der *sn*-1 und *sn*-2 Fettsäureketten begründet (Mushayakarara, E. *et al.*, 1982), wie sie auch in den Röntgenstrukturanalysen kristalliner Phospholipide zu erkennen sind (Pascher, I. *et al.*, 1992). Die Carbonylgruppe der *sn*-2-Fettsäurekette sollte sich in einer Umgebung höherer Dielektrizität als die Carbonylgruppe der *sn*-1-Fettsäurekette befinden. Durch „zweite Ableitungsspektroskopie“ oder Selbstdekonvolution (Kaupinnen, J.K. *et al.*, 1981) wurden die Bandenlagen der Absorption der *sn*-1 $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe auf 1472 cm^{-1} und der *sn*-2 Gruppe auf 1727 cm^{-1} bestimmt. Tatsächlich bestehen sowohl die Banden der *sn*-1 $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe als auch der *sn*-2 $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe jeweils aus einer Überlagerung von mindestens zwei Banden. Dies konnte von (Blume, A., 1988) durch IR-Spektroskopie an *sn*-2 $^{13}\text{C}=\text{O}$ -markierten Phospholipiden gezeigt werden. Der Isotopeneffekt bewirkt eine Verschiebung der $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Bande um ca. 42 cm^{-1} zu tieferen Wellenzahlen und erlaubt so die getrennte spektroskopische Betrachtung der beiden Carbonylgruppen. Sie zeigen beide eine asymmetrische Bandenform. Es handelt sich jeweils um die Überlagerung von zwei oder auch drei Absorptionsbanden. Durch den Vergleich mit IR-Spektren der Modellspezies Essigsäureethylester in Lösungsmitteln unterschiedlicher Dielektrizitätskonstanten und Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, konnte die Asymmetrie der Carbonylbanden auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und den Carbonylgruppen der Phospholipide zurückgeführt werden (Blume, A., 1988). Die Absorptionsbande bei der höchsten Wellenzahl entspricht der Absorption einer nicht hydratisierten Carbonylgruppe, Banden bei niedrigeren Wellenzahlen können qualitativ „einfach, zweifach, ...“-hydratisierten Carbonylbanden zugeordnet werden. Diese Interpretation eröffnet die Möglichkeit, aus den Carbonylbanden der Phospholipide die relativen Hydratationsverhältnisse an der polaren-apolaren Grenzfläche der Modelmembran abzulesen. Die asymmetrische Form der Carbonylbanden und die Frequenz der Hüllkurve ist abhängig vom Phasenzustand des Lipids, da sich bei der Phasenumwandlung die Kopfgruppenhydratation

ändert. Im allgemeinen scheint die Bandenintensität der hydratisierten Carbonylgruppen bei der Phasenumwandlung zuzunehmen.

Die Banden der C-O-Streckschwingung bei etwa 1170 cm^{-1} sind weniger charakteristisch, da diese Schwingungen mit den C-C-Streckschwingungen koppeln können. Weitere charakteristische Schwingungen resultieren aus Schwingungen der Phosphatgruppe. Es existieren zwei starke Banden bei 1220 und 1080 cm^{-1} , die der Streckschwingung der P=O-Doppelbindung (jeweils antisymmetrisch und symmetrisch) zugeordnet werden können. Die Bande bei 1220 cm^{-1} findet man nur bei nicht hydratisierten Lipidem, bei hydratisierten Lipiden verschiebt sie sich zu höheren Wellenzahlen (1250 cm^{-1}).

Einen Überblick wichtiger IR-aktiver Schwingungen wäßriger Phospholipid-Dispersionen gibt Tabelle 2.2.2-1. Es werden folgende Symbole verwendet:

v: Valenzschwingung; as: antisymmetrisch; s: symmetrisch

δ : Deformationsschwingung, Scherschwingung; s: symmetrisch; as: antisymmetrisch;

γ : Deformationsschwingung; w: wagging (Kipp-); r: rocking (Pendel-);

A: Assoziation.

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Symbol
3028	Antisymmetrische Methylstreckschwingung des Cholins	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$
2956	Antisymmetrische Methylstreckschwingung	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2920	Antisymmetrische Methylenstreckschwingung	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2873	Symmetrische Methylstreckschwingung	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
2850	Symmetrische Methylenstreckschwingung	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1740	Estercarbonylstreckschwingung	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1468	Methylenscherschwungung	$\delta(\text{CH}_2)_n$
1418	Scherschwungung der α -Methylengruppe	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$
1380	Symmetrische Methylscherschwungung	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
1370-1340	Methylenscherschwungungen charakteristischer Konformere	$\gamma_{\text{w}}(\text{CH}_2)_n$
1325-1180	Methylenkippschwungungen (Progression)	$\gamma_{\text{w}}(\text{CH}_2)_n$
1250	Antisymmetrische Phosphatstreckschwingung (nicht hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäurediestergruppierung)	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
1220	Antisymmetrische Phosphatstreckschwingung (hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäurediestergruppierung)	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
1180	Antisymmetrische Phosphatstreckschwingung (hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäuremonoestergruppierung)	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
1170	Antisymmetrische Streckschwingung der Ester-(C-O)-Gruppierung	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$

Tabelle 2.2.2-1: Wichtige IR-aktive Schwingungen wässriger Phospholipid-Dispersionen. Die angegebenen Wellenzahlen entsprechen mittleren Werten.

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Symbol
1100	Antisymmetrische Phosphatstreckschwingung (hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäuremonoestergruppierung)	$\nu_{as}(\text{PO}_3^{2-})$
1080	Symmetrische Phosphatstreckschwingung (hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäurediestergruppierung)	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
1075	Symmetrische Phosphatstreckschwingung (hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäuremonoestergruppierung)	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
980	Symmetrische Phosphatstreckschwingung (hydratisiertes Lipid mit Phosphorsäuremonoestergruppierung)	$\nu_s(\text{PO}_3^{2-})$
970	Antisymmetrische Streckschwingung des Cholins	$\nu_s(\text{C-N}^+-\text{C})$
725	Methylenpendelschwingung	$\gamma_r(\text{CH}_2)_n$
3400	Streckschwingung von H ₂ O	$\nu(\text{OH})$
2125	Assoziationsschwingung von H ₂ O	$\nu_A(\text{H}_2\text{O})$
1645	Scherschwingung von H ₂ O	$\delta(\text{H}_2\text{O})$
2500	Streckschwingung von D ₂ O	$\nu(\text{OD})$
1555	Assoziationsschwingung von D ₂ O	$\nu_A(\text{D}_2\text{O})$
1215	Scherschwingung von D ₂ O	$\delta(\text{D}_2\text{O})$
1146	Scherschwingung von HOD	$\delta(\text{HOD})$

Tabelle 2.2.2-2: Fortsetzung von Tabelle 2.2.2-1.

2.2.3 Röntgenbeugung

Allgemeines

Beugungsmethoden, speziell die Röntgenbeugung ist der verlässlichste Weg, die Struktur von Lipidphasen zu charakterisieren. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit Wellenlängen im Bereich von 0,1 nm. In dieser Arbeit wurde mit CuK α -Strahlung ($\lambda=0,15418$ nm) gearbeitet. Die Wechselwirkung von Röntgenstrahlen mit biologischem Material kann als sehr schwach betrachtet werden. Deswegen müssen Proben für die Röntgenbeugung einen Durchmesser von 0,1 – 1,0 nm besitzen und eine hohe Konzentration der Struktur von Interesse

enthalten. Jedoch kann die Probe in biologisch relevantem Ausmaß hydratisiert werden. Röntgenstrahlen werden fast ausschließlich an Elektronen gebeugt und Daten aus Röntgenbeugungsexperimenten liefern eine direkte Information über die Elektronenverteilung der Probe. Aus diesem Grund ist die Beugung von Röntgenstrahlen am hydrophilen Bereich (Elektronendichte $0,43 \text{ e}/\text{\AA}^3$) eines Lipidbilayers ausgeprägter als am hydrophoben Bereich (Elektronendichte $0,12 \text{ e}/\text{\AA}^3$) (Levine, Y.K., 1973). Röntgenbeugung kann geometrisch folgendermaßen beschrieben werden: für jede mögliche Brechungsrichtung kann man sich eine Reihe paralleler Ebenen in der Probe so angeordnet vorstellen, daß sie einige der einfallenden Röntgenstrahlen reflektieren. Die Abstände d dieser reflektierenden Netzebenen lassen sich aus der Bragg'schen Gleichung berechnen:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta$$

nReflexordnung

Gleichung 2.2.3-1

dNetzebenenabstand

λWellenlänge der Röntgenstrahlung

θStreuwinkel

Wenn jedes Atom genau auf diesen Netzebenen lokalisiert wäre, hätten die ausfallenden Strahlen alle die gleiche Intensität. Das dies nicht der Fall ist, sieht man wenn man ein Röntgendiagramm einer Phospholipid-Dispersion betrachtet, wo die Intensitäten plötzlich von einem Reflex zum Anderen wechseln oder die Reflexe in unterschiedlichen Abständen auftreten. Genau diesen Sachverhalt kann man erwarten, wenn eine Reihe von Atomen nicht genau auf den Netzebenen sitzt, sondern im Volumen der Einheitszelle verteilt ist. Es ist möglich daß es Netzebenen gibt, die ein Atom einschließen oder nahe an diesem vorbeiführen und so Reflexe hoher Intensität verursachen. Strahlen, die aus Atomen zwischen den Netzebenen resultieren, werden nicht die gleiche Phase besitzen wie die Strahlen, die sich aus Atomen auf den Netzebenen ergeben. Das Ergebnis ist ein geschwächerer oder ausgelöschter Strahl. Zusammenfassend betrachtet ist die spezifische Verteilung der Atome im Volumen der Einheitszelle die Größe, die die Intensitäten der ausfallenden Strahlen bestimmt.

Der Streuwinkel ergibt sich aus

$$\theta = \tan^{-1}(x/s)$$

Gleichung 2.2.3-2

x....Abstand des reflektierten Strahls zum direkten Strahl auf dem Röntgenfilm

s....Abstand der Probe zum Röntgenfilm entlang der Richtung des direkten Strahls.

Die Reflexe haben die Form von Sichel, da die Multilayer der Lipid-Dispersion nicht einheitlich orientiert sind.

Abbildung 2.2.3-1 zeigt ein schematisches Diagramm einen Röntgenbeugungsexperiments.

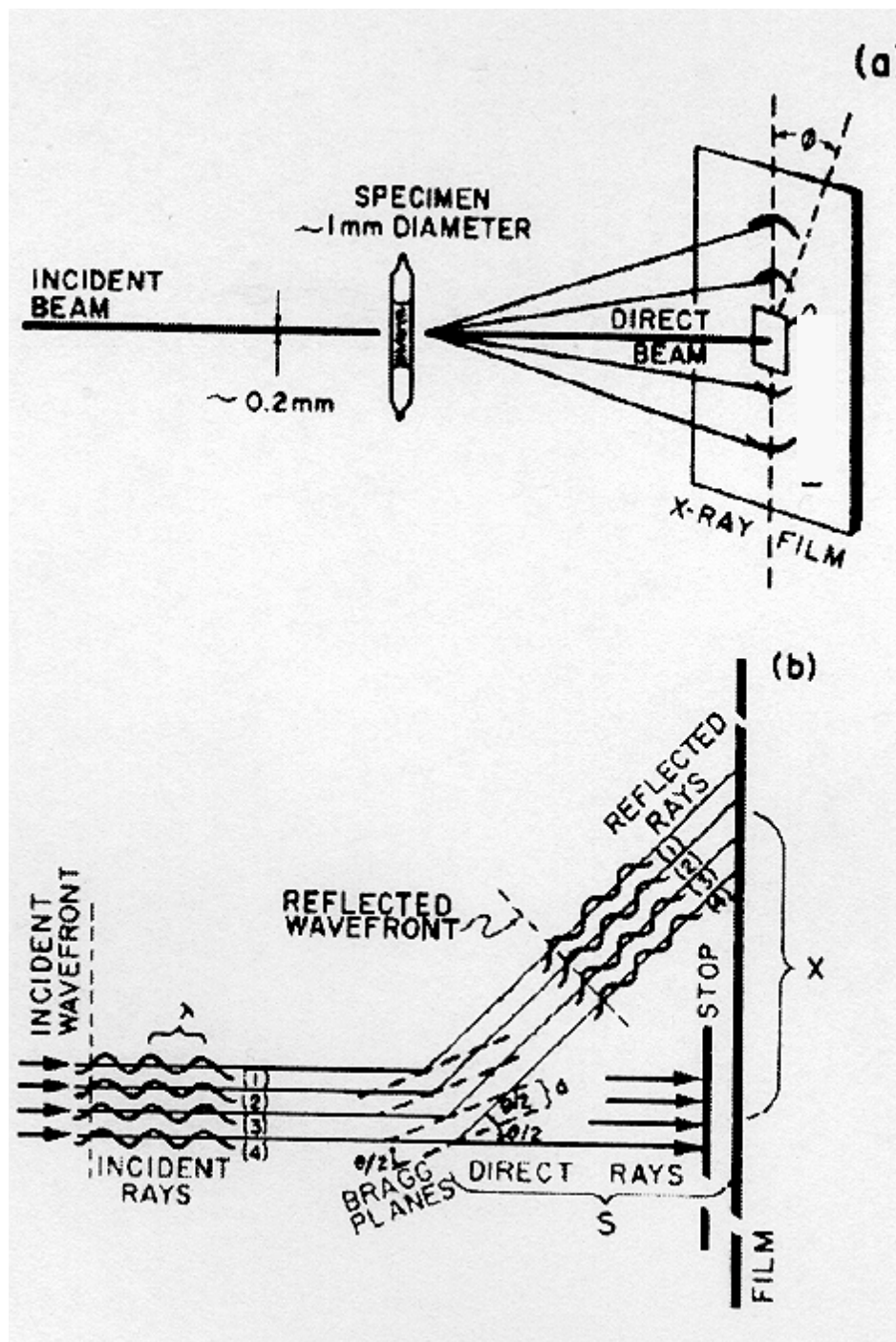


Abbildung 2.2.3-1: Schema eines Röntgenbeugungsexperiments.

Röntgenbeugung an Phospholipid-Dispersionen

Wie schon in Kapitel 2.1.3 beschrieben, bilden Phospholipide in Kontakt mit Wasser spontan Doppelschichten aus. Die langreichweitige, translatorische Anordnung der Lipid-Wasser-Aggregate (Bilayer, Zylinder, Micellen) führt zu einem ein-, zwei- oder dreidimensionalen Gitter. Diese periodische Wiederholung von Strukturelementen erzeugt Reflexe im sogenannten Kleinwinkelbereich des Beugungsdiagramms. Aus der Bragg'schen Gleichung und der mit Miller'schen Indizes beschriebenen Streuebenen gelten für eine lamellare, hexagonale oder kubische Anordnungen folgende Verhältnisse der ermittelten, reziproken d-Werte (Seddon, J.M., 1990):

- *Lamellar:* $2d \sin\theta = 1\lambda$ **Gleichung 2.2.3-3**

Verhältnis: 1 : 2 : 3 : 4

- *Hexagonal:* $2d \sin\theta = (h^2 + hk + k^2)^{1/2} \lambda$ **Gleichung 2.2.3-4**

mit $(hk) = (10), (01), (20), (21), (22), (30), \dots$

Verhältnis: 1 : $(3)^{1/2}$: 2 : $(7)^{1/2}$: 3 : $(12)^{1/2}$

In der flüssigkristallinen Phase werden durch die thermische Unordnung in der Regel nicht alle Beugungsordnungen beobachtet. Abstände d , die an Lipidmembranen gemessen werden, liegen zwischen 4 nm und 20 nm, je nach Länge der Kohlenwasserstoffketten und der Dicke der Wasserschicht, die zusammen den gemessenen Abstand d ausmachen.

Je nach Art der Wechselwirkung der Lipide mit Wassermolekülen wird das Wasser in das gebundene nichtfrierende und das assoziierte Hydratwasser („trapped water“) eingeteilt. Das gebundene Hydratwasser kann aus DSC-Untersuchungen bestimmt werden. Röntgenographische Messungen ermöglichen eine Auswertung von „trapped water“. Mit dem Gefrieren des freien Wassers ändert sich das chemische Potential μ . Ein Teil des Wassers wird somit aus den Bilschichten gezogen, bis ein neues Gleichgewicht erreicht wird. Aus der Änderung des Lamellenabstands d kann der Anteil n_T dieses locker gebundenen „trapped water“ nach Gleichung 2.2.3-5 berechnet werden, unter der Voraussetzung, daß keine Änderung der Kettenpackung auftritt (Förster, G. *et al.*, 1989b).

$$n_T = \frac{F \Delta d Z N_A 10^{-21}}{M_W}$$

Gleichung 2.2.3-5

d....Bischofstand, lamellare Periodizität [nm]

Z....Anzahl der Lipidketten

A....Fläche pro Kette [nm²]

N_A....Avogadrokonstante

M_W....Molmasse des Wassers [g/mol]

F....Faktor für Kettenanordnung, F=1 (gegenständig angeordnet), F=2 (verzahnt angeordnet).

Neben den Reflexen im Bereich kleiner Winkel beobachtet man noch Reflexe bei größeren Winkeln. Die Reflexe im Weitwinkelbereich des Streudiagramms liefern Aussagen über die Packung der Moleküle und die zweidimensionale Ordnung der Kohlenwasserstoffketten innerhalb der Überstruktur.

Im geordneten Membranzustand erscheinen scharfe Reflexe. Sie sind charakteristisch für gestreckte, starre Kohlenwasserstoffketten, die senkrecht oder geneigt zur Membranebene stehen. Wertet man diese Reflexe mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung aus, so ergeben sich für die Gelphase (β-Phasen) Werte zwischen 0,37 - 0,46 nm. In vielen Fällen findet man nur einen scharfen Reflex oder einen Reflex mit breiter Schulter im Bereich von 0,41 – 0,43 nm. Diese Reflexe werden einer hexagonalen Anordnung der Kohlenwasserstoffketten zugeordnet, da sie mit dem Beugungsbild kristalliner Kohlenwasserstoffketten von Fettsäuren gut übereinstimmen (Malkin, T., 1952; Müller, A., 1932). Beim Vorliegen der hexagonalen Symmetrie muß die Kohlenwasserstoffkette rotationssymmetrisch um die Molekülachse orientiert sein. Die Rotationssymmetrie kann entweder durch Rotation der Fettsäureketten oder durch Kinkenbildung in der Kohlenwasserstoffkette erreicht werden, wobei die Rotation des gesamten Moleküls zur Erklärung der hexagonalen Symmetrie bei Fettsäuren angenommen wurde (Dorset, D.L., 1974; Hui, S.W. *et al.*, 1974; Müller, A., 1932). Die hexagonalen Beugungsintensitäten an Lipidmembranen konnten dagegen durch ein Modell frei rotierender Kohlenwasserstoffketten beschrieben werden (Vainshtein, B.K., 1963). Zwar werden die experimentellen Daten von diesem Modell gut reproduziert, doch sind in Lipidmolekülen die Fettsäureketten mit dem Glyceringerüst fest verankert und daher kann die Rotation nicht ohne Störung der lateralen Packung ablaufen. Abbildung 2.2.3-2 stellt die lamellaren Lipiddoppelschichten in der L_β- und L_{β'}-Phase schematisch dar.

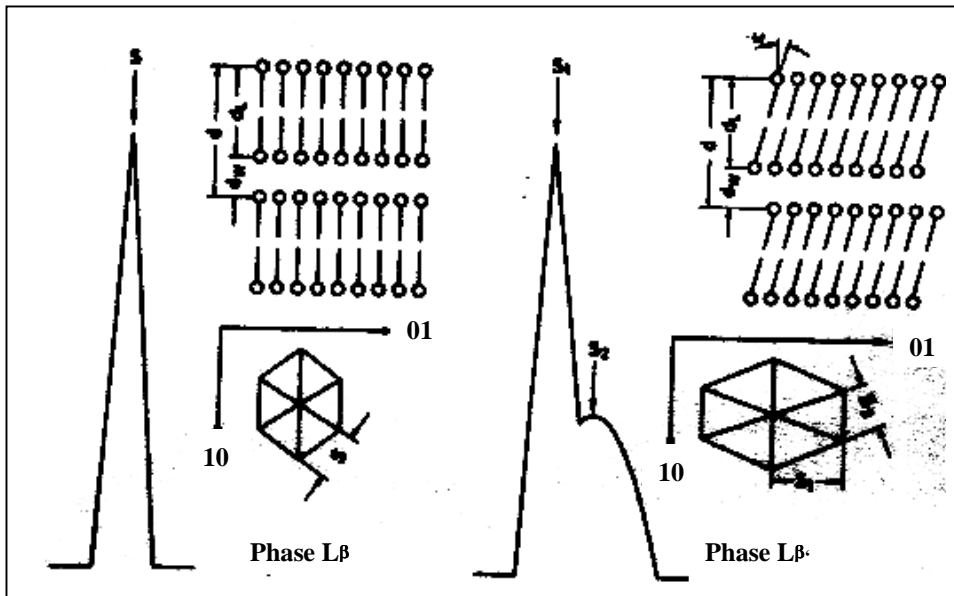


Abbildung 2.2.3-2: Schematische Darstellung lamellarer Lipiddoppelschichten in der L_{β} - und L_{β}' -Phase.

Die Rotationssymmetrie um die Molekülachse muß also durch andere Mechanismen realisiert werden z.B. über Drehschwingungen genügend große Amplitude der CH_2 - Segmente oder gtg-Kinkenbildung, die dynamische Effekte innerhalb der Lipidmembran darstellen.

Außer der hexagonalen Symmetrie, ausgezeichnet durch einen scharfen Reflex im Bereich von 0,41- 0,42 nm-Bereich, können im geordneten Gelzustand die Kohlenwasserstoffketten schräg zur Membranebene angeordnet sein. Die Neigung zur Membranebene hat zur Folge, daß die hexagonale Packung in eine „gestört“ hexagonale Packung übergeht. Als Beugungsbild zeigt diese Phase zwei Reflexe im 0,4 nm, wobei der eine Reflex scharf und intensiv, der dicht benachbarte diffus und weniger intensiv ist. Eine qualitative Erklärung dieses Beugungsbildes liefert die Berücksichtigung der Kohärenzlängen. Eine schematische Darstellung der Kohärenzlängen zeigt Abbildung 2.2.3-3.

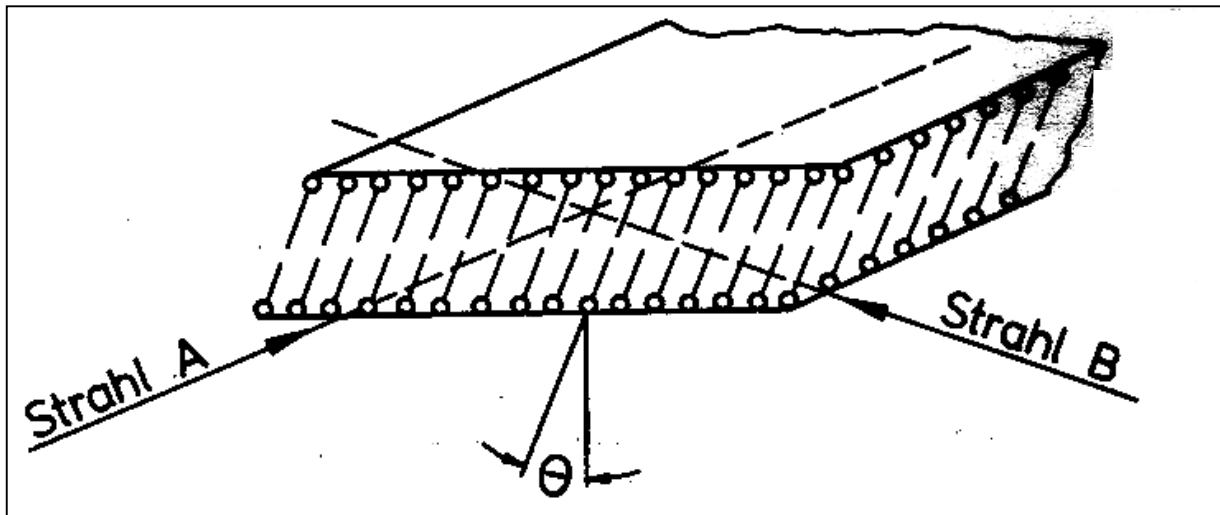


Abbildung 2.2.3-3: Schematische Darstellung der Kohärenzlängen bei geneigten Kohlenwasserstoffketten.

Während Strahl A eine unendliche Kohärenzlänge „sieht“, ist das für Strahl B nicht der Fall. Endliche Kohärenzlängen führen aber zu einer Linienverbreiterung und damit ergibt sich ein scharfer und ein diffuser Reflex.

Zweikettige Lipide zeigen bei Temperaturen unterhalb der Gelphase eine Subgelphase L_c' mit geordneter Struktur. Die Subgelphase ist durch eine Vielzahl an Reflexen im Weitwinkelbereich charakterisiert.

Bei Temperaturen unter 0 °C erhält das Streudiagramm noch zusätzliche Eisreflexe bei $2\theta = 22,6; 24,1; 25,7, 33,3$ und $39,8\text{ °}$. Sie entsprechen den Reflexen (100), (002), (101), (102) und (110) der hexagonalen Eismodifikation (Dowell, L.A. *et al.*, 1961).

Wird die laterale Ordnung aufgehoben, so erscheint eine diffuse Streubande mit einem Maximum bei $0,45\text{-}0,47\text{ nm}$. Hier ist die langreichweitige Ordnung aufgehoben. Die CH_2 -Kettensegmente besitzen Innen große Beweglichkeit und daraus resultiert eine große Unordnung der Ketten („geschmolzene“ Ketten, α -Phase).

Weiterhin findet man jedoch scharfe Reflexe im Kleinwinkelbereich, mit anderen Worten die periodische Überstruktur bleibt erhalten. Dieser Phasenzustand repräsentiert den Grundzustand biologischer Membranen.

2.3 Analytische Methoden zur Lipidcharakterisierung

2.3.1 HPLC-Analytik

Phospholipide unterscheiden sich im Grad der Ausprägung ihrer hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften. Dieser amphiphile Charakter der Phospholipide stellt an eine Trennung durch die Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie hohe Anforderungen. Je nach der Aktivität des Adsorbens und der Polarität der Phospholipide werden eine Reihe verschiedener Lösungsmittel verwendet. Die Zusammensetzung des Elutionsmittels wird üblicherweise während der Elution verändert, um eine bessere Trennung und kürzere Analysezeiten zu gewährleisten. Der Einsatz von Detektoren wird durch die Art des Lösungsmittels und der Phospholipide bestimmt. Die UV-Detektion stößt an ihre Grenzen, wenn das Lösungsmittelgemisch Chloroform enthält, da dieses im gleichen UV Bereich wie die Phospholipide absorbiert. Weiterhin kann eine nicht-isokratische Elution Probleme durch

Schwankungen in der Absorption bereiten. Eine Alternative stellt der Einsatz von Flammenionisations-Detektoren (FID) dar (Kiuchi, K. *et al.*, 1977). Ein großer Nachteil dieser Detektionsmethode ist die Zerstörung der Probe.

Eine herausragend geeignete Detektionsmethode für Phospholipide ist der Lichtstreu-Detektor, dessen Einsatz durch neue technische Entwicklungen seit mehreren Jahren möglich ist (Brenton, L. *et al.*, 1989; Christie, W.W., 1985). Es wird mit einer Vielzahl von Säulenmaterialien gearbeitet, doch hauptsächlich zum Einsatz kommen folgende Materialien:

- ◆ Reversed-Phase-Säulen (Brenton, L. *et al.*, 1989; Jungalwala, F.B. *et al.*, 1979; Sorithos, N. *et al.*, 1985).
- ◆ Kieselgel-Säulen (Jungalwala, F.B. *et al.*, 1976).
- ◆ Polygo- und Ultrasil-NH₂-Säulen (Hanson, V. *et al.*, 1980; Rimpler, M. *et al.*, 1987).
- ◆ Kationen-Austausch-Säulen (Odham, G. *et al.*, 1988).

Die durch die Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie erhaltenen Daten, müssen jedoch durch eine weitere, eindeutige Analysemethode wie z.B. die Kernresonanzspektroskopie bestätigt werden.

2.3.2 Iatroscan-Analysator (TLC-FID)

Der Iatroscan-Analysator ist eine Kombination aus dem Prinzip der Dünnschichtchromatographie (TLC) und einem Flammenionisations-Detektor. Dabei wird die

Probe auf eine dünne, 15 cm lange, mit Kieselgel gefüllte Glaskapillare aufgetragen und in einer Kammer mit dem geeigneten Lösungsmittelgemisch entwickelt. Anschließend läßt man die Kapillare im Detektor entlang einer Flamme laufen und die zuvor aufgrund unterschiedlicher Polaritäten getrennten Substanzen werden durch einen Flammenionisations-Detektors erfaßt. Mit Hilfe eines Integrators können die Konzentrationen der Substanzen mit unterschiedlichen Retentionszeiten (R_T) aus den entsprechenden Peakflächen ermittelt werden.

Die Vorteile des FID-TLC liegen in sehr kurzen Analysezeiten und der eindeutigen Charakterisierungsmöglichkeit, basierend auf dem unterschiedlichen Laufverhalten der Phospholipide. Mögliche Probleme liegen in der Entwicklung eines geeigneten Elutionsmittels.

Übliche Elutionsmittel sind z.B. Mischungen aus:

- ◆ Chloroform-Methanol-Wasser
- ◆ Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser
- ◆ Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser-Aceton (Juneja, L.R. *et al.*, 1987).

Abbildung 2.3.2-1 zeigt ein typisches Chromatogramm.

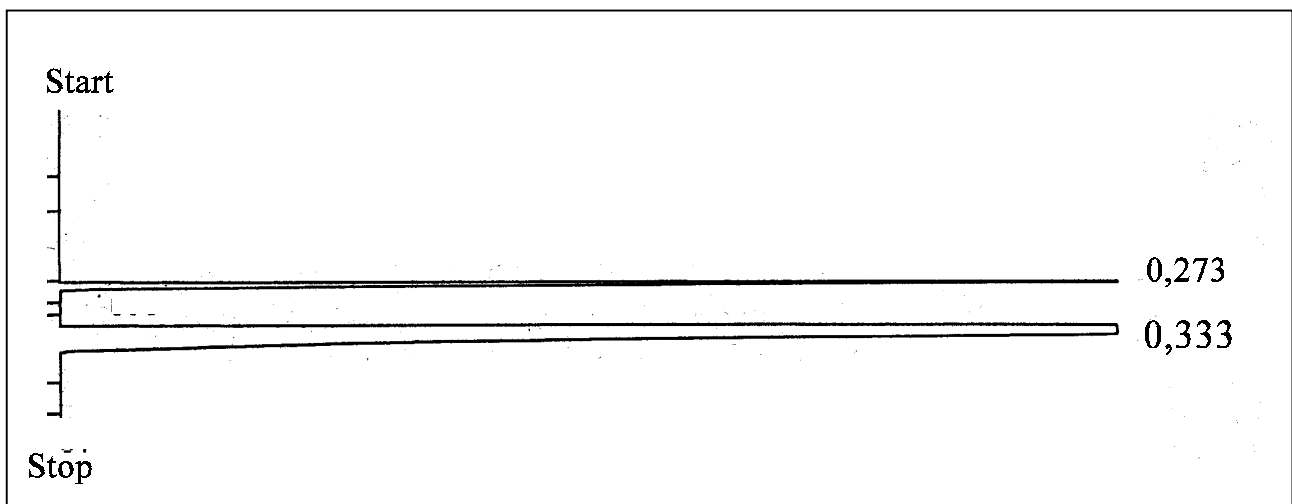


Abbildung 2.3.2-1: Iatrosan-Diagramm einer Lösung von PC ($R_T = 0,333$) und PE ($R_T = 0,273$) in Chloroform.

2.3.3 Dünnschichtchromatographie

Der Vorteil der Dünnschichtchromatographie, die zur Detektion bei der Säulenchromatographie diente, liegt in der einfachen Handhabung und kurzen Analysezeiten. Sie ist zur qualitativen

Analyse der verschiedenen Phospholipide gut geeignet, da diese je nach Kopfgruppe ein deutlich unterschiedliches Laufverhalten bei Anwendung des geeigneten Lösungsmittels besitzen. Je nach Zusammensetzung der Lipide kommen unterschiedliche Lösungsmittelsysteme zur Anwendung:

- ◆ Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser in unterschiedlichen Verhältnissen, (Skipski, V.P. *et al.*, 1964).
- ◆ Chloroform-Methanol-Ammoniumhydroxid (65:35:5 v/v), (Rouser *et al.*, 1969).
- ◆ Chloroform-Methanol-Wasser (65:35:5 v/v), (Lepage, 1964).

Es haben sich auch eine Reihe unterschiedlicher Reagentien zur Detektion der Lipide als geeignet erwiesen:

- ◆ Iod-Dampf (Skipski, V.P. *et al.*, 1964).
- ◆ Ninhydrin für Phospholipide mit freien Aminogruppen.
- ◆ Dinitrophenylhydrazin (Reitsema, R.H., 1954).
- ◆ Modifiziertes Dragendorff Reagenz (Wagner, H. *et al.*, 1961) für Cholin.
- ◆ Ethanolische Phosphormolybdänsäure-Lösung zur allgemeinen Detektion der Phosphorgruppen.
- ◆ 40%-ige Schwefelsäure (Mangold, H.K., 1961).
- ◆ 2', 7'-Dichlorfluorescein für neutrale Lipide.

Ein Parameter für das Laufverhalten von Verbindungen ist der R_f -Wert. Dieser Wert ist das Verhältnis aus der Laufhöhe der Probe (gemessen vom Startfleck) zur Höhe der Lösungsmittelfront.

2.3.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Charakterisierung der Phospholipide mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bereitet diverse Probleme. Phospholipide besitzen die Eigenschaften in Lösung Aggregate zu bilden, so daß die Auflösung charakteristischer Signale durch intermolekulare Kopplungen stark beeinträchtigt wird. Das Problem der Aggregation tritt in Lösungsmitteln wie z. B. Chloroform auf. In polareren Lösungsmitteln wie Methanol, treten diese Schwierigkeit nicht auf, doch durch die geringe Löslichkeit der Phospholipide kommt es wieder zu ähnlich schlecht aufgelösten Signalen. Für PE kann das Problem der Aggregation durch Zugabe einer kleinen Menge Triethylamin zu einer Lösung von PE in Chloroform gelöst werden. PE geht dabei von der zwitterionischen in die anionische Form über (Jiang, R.T. *et al.*, 1984).

Weitere Nachteile der ^1H -NMR-Spektroskopie liegen in der relativ großen Substanzmenge, die benötigt wird. Enthält die Substanz unbekannte Verunreinigungen, sind oft keine eindeutigen Aussagen über die Struktur der Probe möglich. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sie bei reinen Substanzen einen eindeutigen Beweis für deren Struktur liefern kann.

2.4 Phospholipasen D

2.4.1 Allgemeines

Phospholipasen katalysieren die Biotransformation von Phospholipiden. Je nachdem an welcher Stelle im Molekül der Angriff des Enzyms stattfindet, unterscheidet man zwischen vier verschiedenen Klassen von Phospholipasen:

- ◆ Phospholipasen A₁
- ◆ Phospholipasen A₂
- ◆ Phospholipasen C
- ◆ Phospholipasen D

Abbildung 2.4.1-1 zeigt die Regiospezifität der verschiedenen Phospholipasen.

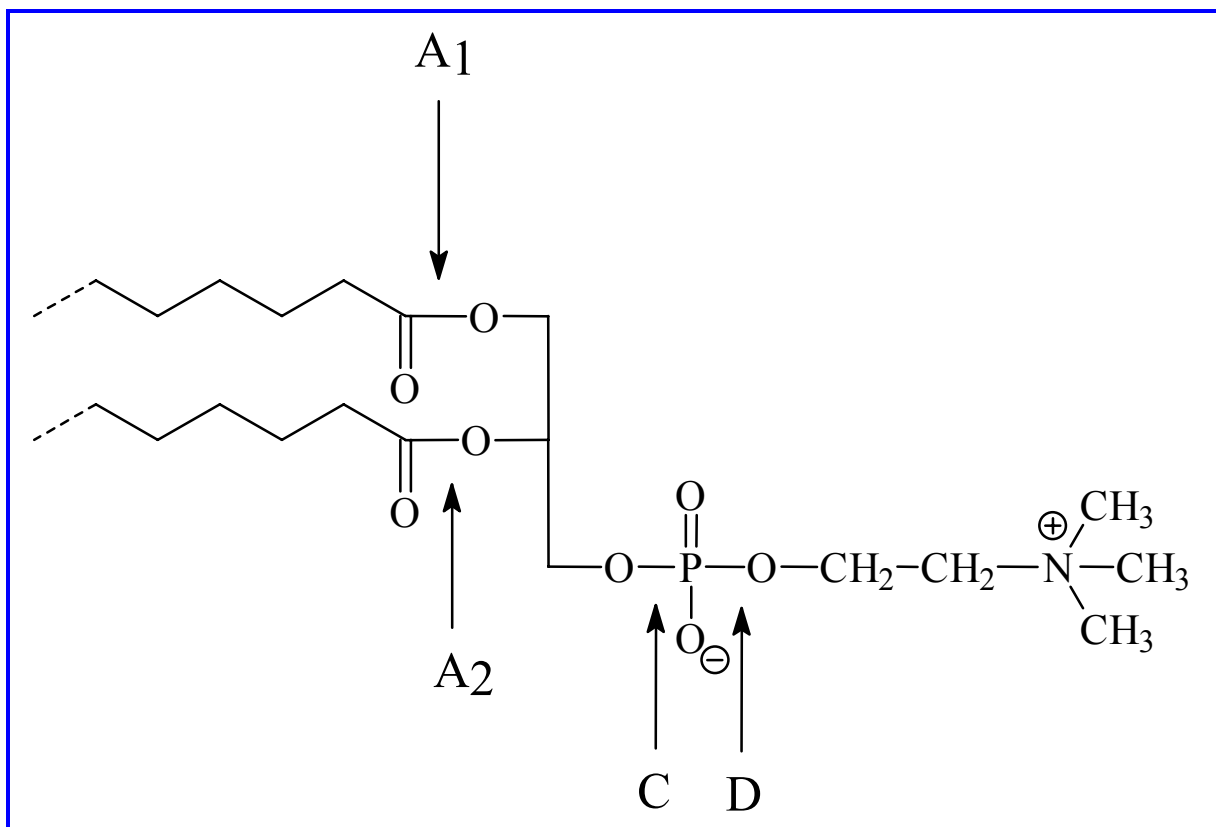


Abbildung 2.4.1-1: Regiospezifität der verschiedenen Phospholipasen A₁, A₂, C und D.

Phospholipasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen. Sie wirken, indem sie Acylreste oder andere Säurereste unter Bildung von kovalenten Enzym-Säure-Intermediaten auf verschiedene Nukleophile übertragen. Handelt es sich bei dem Nukleophil um Wasser, spricht man von einer Hydrolyse, in anderen Fällen von einer Ver- bzw. Umesterung. Im speziellen Fall der

Phospholipase D liegt eine Transphosphatidylierung vor, wenn das Nukleophil von Wasser verschieden ist.

Phospholipasen und allgemein Lipasen zeichnen sich dadurch aus, daß sie an Grenzflächen aktiviert werden. Sie zeigen fast keine Aktivität, solange das Substrat nicht aggregiert vorliegt. Wird jedoch die Löslichkeitsgrenze des Substrats überschritten, nimmt die Aktivität der Lipase plötzlich zu, sobald das Substrat eine Emulsion bildet (Desnuelle, P., 1961; Sarda, L. *et al.*, 1958).

Die kinetischen Eigenschaften von Lipasen können nicht durch das Michaelis-Menten Modell beschrieben werden, da dieses eine Reaktion in homogener Phase voraussetzt. Ein wahrscheinliches Modell für lipolytische Enzyme besteht aus zwei Schritten (Van Tilbeurgh, A., 1993):

1. Die physikalische Adsorption des Enzyms an der Lipidgrenzfläche beinhaltet eine Aktivierung des Enzyms.
2. Anschließend erfolgt die Bildung des Enzym-Substrat Komplexes, der zum Produkt umgesetzt wird. Gleichzeitig erfolgt die Regenerierung des Enzyms.

Dieser zweite Schritt kann als 'Michaelis-Menten Modell der Grenzfläche' gedeutet werden. Zusätzlich wurden weitere Modelle für die Kinetik der kompetitiven Inhibierung in Anwesenheit und Abwesenheit von Detergentien und für die Grenzflächenaktivierung vorgeschlagen (Ransac, S. *et al.*, 1991). Der katalytische Mechanismus von Phospholipase D war lange Zeit unklar. Doch auf der Grundlage stereochemischer Untersuchungen erscheint ein Mechanismus, bei dem ein Enzym-Substrat-Übergangskomplex gebildet wird, als sehr wahrscheinlich (Jiang, R.T. *et al.*, 1984). Abbildung 2.4.1-2 zeigt diesen Mechanismus.

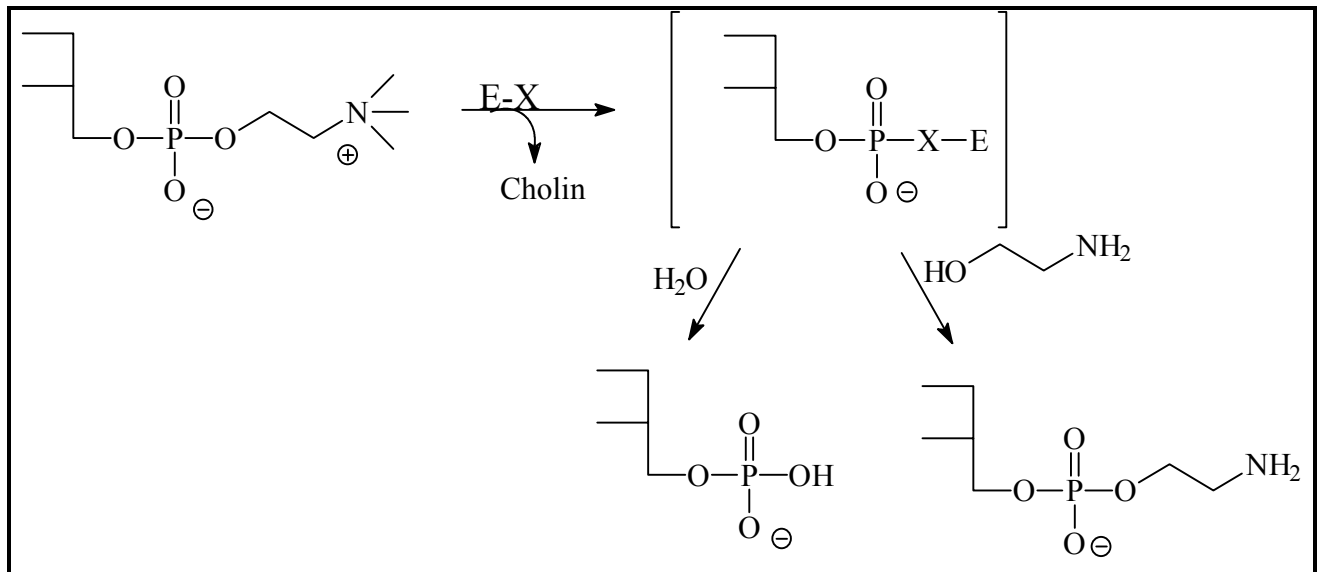


Abbildung 2.4.1-2: Reaktionsmechanismus von PLD am Beispiel einer Transphosphatidylierung von PC zu PE (Jiang, R.T. *et al.*, 1984).

2.4.2 Vorkommen und Bedeutung

Phospholipase D (PLD) wurde zuerst in Pflanzen entdeckt (Heller, M., 1978). Die physiologische Rolle, die Phospholipase beim Wachstum von Pflanzen spielt, ist noch nicht ganz geklärt. Es wurde jedoch eine unterschiedliche PLD-Aktivität in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Konzentration der Membranphospholipide bei Kälteschock (Willemot, C., 1983; Yoshida, S., 1979), Wasserstreß (Chetal, S. *et al.*, 1989; Saini, R.S. *et al.*, 1990), Alterung (Cheour, F. *et al.*, 1992; Paliyath, G. *et al.*, 1987) und Keimung (Herman, E.M., 1980) festgestellt. In Geweben, die durch einen Kälteschock verletzt waren, wurde der Verlust an Membranphospholipiden einer erhöhten PLD Aktivität zugeschrieben. Die hohe Aktivität von PLD wird durch den Zusammenbruch der Zellkompartimente verursacht, so daß PLD mit den Zellmembranen in Kontakt kommt. Neuere Studien an Säugetieren ergaben, daß der Abbau von Phospholipiden durch Phospholipase D eine Rolle bei der Reizweiterleitung spielt (Billah, M.M. *et al.*, 1990).

Lösliche Formen von PLD sind aus mehreren Pflanzen (Heller, M. *et al.*, 1974; Wang, P., 1993), (Allgyer, T.T. *et al.*, 1979; Lee, M.H., 1989; Witt, W. *et al.*, 1987)- und Bakterienarten (Immamura, S. *et al.*, 1979; Kokusho, Y. *et al.*, 1993; Shimbo, K. *et al.*, 1989; Witt, W. *et al.*, 1987) isoliert und gereinigt worden.

Obwohl die enzymatischen Eigenschaften der isolierten Enzyme sehr ähnlich waren, lagen die Molekulargewichte zwischen 75 und 200 kDa.

Inzwischen werden Phospholipasen D auch durch rekombinante Expression in Wirtsorganismen, wie z. B. *Escherichia coli* erhalten (Iwasaki, 1994; Iwasaki, 1995). Tabelle 2.4.2-1 zeigt eine kleine Auswahl verschiedener PLD.

Quelle von Phospholipase D	Literatur
<i>Ricinus communis L.</i>	(Wang, 1993)
Weißkohl	(Davidson <i>et al.</i> , 1958)
<i>Actinomadura sp.</i>	(Kokusho <i>et al.</i> , 1993)
<i>Sreptomycetes antibioticus</i>	(Shimbo <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptoverticillium hachijoense</i>	(Ohkawa, y. <i>et al.</i> , 1975)
<i>Streptomycetes chromofuscus</i>	(Immamura <i>et al.</i> , 1979)
<i>Streptomycetes lydicus</i>	(Shimbo <i>et al.</i> , 1993)
<i>Streptomycetes lividans</i>	(Koller <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptomycetes scabies</i>	(Raymer <i>et al.</i> , 1990)
<i>Streptomycetes cacaoi</i>	(Chang <i>et al.</i> , 1990)
<i>Streptomycetes tendae</i>	(Koller <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptomycetes sp. AA 586</i>	(Shuto <i>et al.</i> , 1988)
<i>Streptomycetes sp., Sigma Typ VII</i>	(Testet-Lamant, 1992)

Tabelle 2.4.2-1: Auswahl verschiedener Phospholipasen D.

2.4.3 Biotransformationen mit Phospholipasen D

Substratspezifität und Enzymkinetik

Phospholipase D hydrolysiert Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylserin (PS) und noch wenige andere Verbindungen. Die Substratspezifität hängt von der Quelle der PLD und den Reaktionsbedingungen ab. Das am häufigsten verwendete Substrat ist PC. PLD aus Rinderserum reagiert jedoch spezifisch mit Glycosyl-phosphatidylinositol und zeigt keine Aktivität gegenüber PI und PC. Eine Kenngröße für die Substratspezifität ist das Verhältnis k_{cat}/K_m ($M^{-1}\cdot s^{-1}$). Dabei bedeutet k_{cat} die maximale Anfangsreaktionsgeschwindigkeit pro Unit Enzymkonzentration und K_m die Substratkonzentration bei halber maximaler Reaktionsgeschwindigkeit. K_m wird auch Michaelis-Menten Konstante genannt. Die Bestimmung dieser Werte erfolgt am einfachsten durch Variation der Substratkonzentration [S] und Messung der Reaktionsgeschwindigkeit V.

Oft wird hierbei die doppelt reziproke Auftragung von $1/V$ nach $1/[S]$ nach Lineweaver-Burk gewählt. Dies hat allerdings den Nachteil, daß bei hohen Substratkonzentrationen aufgenommene Werte gestaucht, und Daten für niedrige Konzentrationen höher bewertet werden. Eine Alternative bietet die Methode von Eadie-Hofstee. Hierbei wird die Reaktionsgeschwindigkeit V gegen den Quotienten $V/[S]$ aufgetragen. Aus dem Diagramm lassen sich dann jeweils die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante bestimmen. Die K_m -Werte von Enzymen variieren zwischen 10^{-1} und 10^{-7} M und hängen vom Substrat und den Bedingungen seiner Umgebung (pH, Temperatur, Ionenstärke) ab (Stryer, L., 1991). Dieses Michaelis-Menten Modell kann nur auf den zweiten Reaktionsschritt der Modell Reaktion für lipolytische Enzyme (siehe Kapitel 2.4.1) angewandt werden.

Nukleophile für die Transphosphatidylierung

Prinzipiell sind Verbindungen mit primären Hydroxylgruppen als Nukleophile geeignet. Die Spezifität richtet sich auch hier nach dem Ursprung der PLD.

Tabelle 2.4.3-1 gibt einen Überblick über die bisher erfolgreich zur Transphosphatidylierung eingesetzten Nukleophile.

Nukleophil	Ursprung der PLD	Substrat	Literatur
Saccharide wie Glucose, Ribose, Galactose, Maltose etc.	<i>Actinomadura sp.</i> , 362	Eigelb-Lecithin, Soja- und Krill-Lecithin, DPPC, DMPC etc.	(Kokusho <i>et al.</i> , 1993)
L-Ascorbinsäure	<i>Streptomyces lydicus</i> D 121	PC aus Eigelb	(Nago <i>et al.</i> , 1990)
Triethylenglycol, Glucose	<i>Streptomyces antibioticus</i> S-170	PC aus Soja	(Shimbo <i>et al.</i> , 1993)
L-Serin, D-Serin	<i>Streptomyces sp.</i> , Weißkohl	PC	(Juneja <i>et al.</i> , 1989)
Dihydroxyaceton	<i>Streptomyces sp.</i>	DPPC	(Takami <i>et al.</i> , 1994)
(2-Hydroxyethyl)-indol, Ethanol, (2-Hydroxyethyl)-phthalimid etc.	<i>Streptomyces sp.</i>	1- <i>O</i> -Alkyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin (PAF-Acether)	(Testet-Lamant, 1992)
Nucleoside wie Cytidin, Thymidin, NeplanocinA etc.	<i>Streptomyces sp.</i> AA 586	Alkylphosphorylcholin	(Shuto <i>et al.</i> , 1988)
2,5,7,8-Tetramethyl-6-hydroxy-2-(hydroxyethyl)-Chroman	<i>Streptomyces lydicus</i>	PC aus Eigelb	(Koga <i>et al.</i> , 1994)

Tabelle 2.4.3-1: Überblick über die Verwendung verschiedener Nukleophile in der Transphosphatidylierung mit PLD.

2.4.4 Lösungsmittelsysteme für die Transphosphatidylierung mit PLD

Für enzymatische Reaktionen wurde lange Zeit eine rein wäßrige Umgebung als allein geeignetes Reaktionsmedium angenommen. Viele Reaktionen wie die Synthese von Estern, die Polymerisation von Aminosäuren und Zuckern, Dehydratisierungsreaktionen etc. können nicht in wäßriger Lösung durchgeführt werden, da dies thermodynamisch ungünstig ist. In den

vergangenen Jahren gab es auf dem Gebiet der Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln bzw. in organisch-wäßrigen Lösungsmittelgemischen große Erfolge.

Die potentiellen Vorteile dieser Methoden sind:

- ◆ Die hohe Löslichkeit vieler Verbindungen in organischen Lösungsmitteln.
- ◆ Die Möglichkeit hydrolytische Reaktionen in synthetische Reaktionen umzukehren.
- ◆ Das Vermindern von Substrat- oder Produktinhibierung, gegenüber rein wäßrigen Lösungsmitteln.
- ◆ Die einfache Trennung von Produkt und Enzym am Ende der Reaktion.

Prinzipiell gibt es zwei Probleme:

- ◆ Die Denaturierung des Enzyms an der Grenzfläche zwischen wäßriger und organischer Phase. Diese Gefahr kann durch eine Immobilisierung des Enzyms in wäßriger Phase und durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration verringert
- ◆ Die Denaturierung oder Inhibierung des Enzyms durch ein organisches Lösungsmittel, das mit Wasser mischbar ist (Klibanov, A.M., 1977). Diese Gefahr kann eliminiert werden, indem man ein Lösungsmittel wählt, dessen Löslichkeit in Wasser geringer als 1% ist. Prinzipiell kann auch bei sehr geringer Löslichkeit des organischen Lösungsmittels in Wasser eine Inhibierung des Enzyms stattfinden. In diesem Fall sollte man ein anderes organisches Lösungsmittel mit geringer Wasserlöslichkeit wählen.

Ein System aus Wasser mit einem darin unlöslichen Lösungsmittel nennt man ein Zweiphasensystem. Nachteile eines Zweiphasensystems stellen die Stofftransportlimitierung und die hohen Rührergeschwindigkeiten dar. Zweiphasensysteme wurden mit Lipasen und Esterasen zur Estersynthese bzw. Umesterung (Klibanov, A.M., 1977), mit Proteasen zur Peptidsynthese (Nakanishi, E., 1986) und zur Steroidumwandlung (Buckland, B.C., 1975) eingesetzt. Auch die Transphosphatidylierungsreaktion wurde bisher fast ausschließlich in Zweiphasensystemen durchgeführt. Beispiele hierfür sind in Kapitel 2.4.4.2 aufgeführt.

Der Einfluß des Lösungsmittels auf die biologische Aktivität des Enzyms ist vermutlich auf die essentielle Wasserschicht an dessen Oberfläche zurückzuführen. Dies liegt daran, daß Wasser direkt oder indirekt in alle nichtkovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals Kräfte eingebunden ist. Diese Wechselwirkungen halten die natürliche, katalytisch aktive Konformation des Enzyms aufrecht.

Polare Lösungsmittel stören vermutlich gerade diese Wechselwirkungen und inaktivieren das Enzym.

Zur Charakterisierung der Lösungsmittel wurde von (Laane, c. *et al.*, 1987) der Verteilungskoeffizient P eines organischen Lösungsmittels im Oktanol/Wasser Gemisch vorgeschlagen. Als allgemeine Richtschnur formulierte Laane folgende Zusammenhänge:

- ◆ Lösungsmittel mit $\log P < 2$ inaktivieren das Enzym
- ◆ Lösungsmittel mit $2 < \log P < 4$ beeinflussen die Aktivität in nicht vorhersagbarem Ausmaß
- ◆ In Lösungsmitteln mit $\log P > 4$ bleibt die katalytische Aktivität erhalten.

In der Weise wie die $\log P$ -Werte organischer Lösungsmittel zunehmen, sinkt auch ihre Mischbarkeit mit Wasser.

Weitere Einflußgrößen für die Transphosphatidylierung mit PLD

Je nach Ursprung der PLD und Reaktionsbedingungen liegt die optimale Reaktionstemperatur zwischen 20 °C und 60 °C. Höhere Temperaturen ermöglichen eine höhere Löslichkeit des Substrats und des Nukleophils, begünstigen jedoch gleichzeitig aber die Inaktivierung des Enzyms.

PLD reagieren sehr empfindlich auf den pH-Wert, bei dem die Reaktion durchgeführt wird. Das pH-Optimum liegt je nach PLD zwischen 4 und 8.

Die Aktivität der meisten PLD wird weiterhin durch Zugabe von zweiwertigen Kationen (Ca, Mg) beträchtlich erhöht, und auch der Zusatz von Additiven wie EDTA kann sich als vorteilhaft erweisen (Nakajima, J., 1994).

Anwendungsgebiete der Syntheseprodukte von PLD

Neben der Bedeutung von reinen Phospholipiden für synthetische Modell-Membranen sind sie an vielen biologischen Prozessen beteiligt. Außerdem wird zunehmend ihre Bedeutung für pharmazeutische und kosmetische Wirkstoffe erkannt:

- ◆ Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin werden zur Darstellung von Liposomen genutzt, die dann als Träger für Pharmazeutika eingesetzt werden (Ryman, B.E. *et al.*, 1980). Eine neuere Entwicklung auf diesem Gebiet ist der Einsatz von Phospholipiden mit polymerisierbaren Glycolipoat-Kopfgruppen, die den Lipid-Vesikeln eine höhere Stabilität verleihen (Braun-Falco, O. *et al.*, 1992; Pax, H. *et al.*, 1993). Liposomen, die Phospholipide mit Mannose als Kopfgruppe enthalten, sind in der Lage pharmakologische Wirkstoffe gezielt zu Makrophagen zu schleusen (Barratt, G., 1986).

- ◆ Dihydroxyaceton wurde neben anderen α -Hydroxymethylketonen von der kosmetischen Industrie als Mittel zur Selbstbräunung entdeckt. Es läßt sich auf der Haut jedoch schlecht verteilen. Die Phosphatidylierung von Dihydroxyaceton stellt hier eine Alternative dar.
- ◆ Dinucleoside zeigen eine *in vitro* und *in vivo* Aktivität gegen den HIV-Virus. So ist AZT (3'-Azido-3'-Desoxythymidin) das erste Mittel, das zur Bekämpfung der HIV-Infektion eingesetzt wurde. Nach neuen Erkenntnissen besitzen Nucleosid-Diphosphat-Diglyceride ebenfalls eine *in vitro*-Aktivität gegen den HIV-Virus. Ein Vorteil dieser Phospholipide besteht in der Freisetzung des antiviralen Nucleosid-Monophosphats als Ergebnis der metabolischen Substitution des Liponucleotids (Hostetler, K.Y., 1991); Van Wijk, G.M.T., 1992).
- ◆ Phospholipide, die als Kopfgruppe Inhibitoren wie Aza-Zucker, Nucleoside und Peptide besitzen, könnten wichtige pharmazeutische Wirkstoffe darstellen (Wang, P., 1993) Aza-Zucker sind Inhibitoren von Glycosidasen und deshalb wichtig für die Behandlung von metabolischen Erkrankungen wie Diabetes (Horii, S., 1986). Außerdem werden sie als antivirale und Antitumor-Wirkstoffe eingesetzt (Humphries, M.J., 1986; Walker, B.D., 1988).

2.5 P450-Monooxygenasen als Modelle für Membranproteine

2.5.1 Historischer Hintergrund der Entdeckung von P450

Die Entdeckungsgeschichte von Cytochrom P450 begann vor circa 40 Jahren mit den Arbeiten von (Axelrod, J., 1955) und (Brodie, B. *et al.*, 1955), die berichteten, daß ein Enzymsystem im Endoplasmatischen Reticulum der Leber in der Lage ist, bestimmte xenobiotische Verbindungen oxidativ zu metabolisieren. Im gleichen Jahr zeigte (Hayaishi, O. *et al.*, 1955), daß Dioxygenase-Reaktionen in microsomalen Präparationen der Leber möglich sind, wogegen (Mason, H.S. *et al.*, 1955) herausfand, daß im gleichen System auch Monooxygenase-Aktivität vorhanden war, welches NADPH als Reduktionsmittel benötigte. Die eigentliche Entdeckung eines Kohlenmonoxid (CO) bindenden Pigments in Lebermicrosomen, das eine Absorptionsbande bei 450 nm aufweist, wurde unabhängig voneinander von (Garfinkel, D., 1958) und (Klingenberg, M., 1958) gemacht, denen allgemein die Entdeckung von P450 zugeschrieben wird. Omura und Sato konnten später zeigen, daß dieses Pigment tatsächlich ein Hämoprotein der Klasse der b-Typ Cytochrome war (Omura, T. *et al.*, 1964), und sie führten als erste den Namen P450 ein, nach der Wellenlänge des UV Absorptionsmaximum im optischen Spektrum des CO-Komplexes von Cytochrom P450 (Omura, T. *et al.*, 1962). Abbildung 2.5.1-1 zeigt ein typisches CO-Differenz-Spektrum von P450.

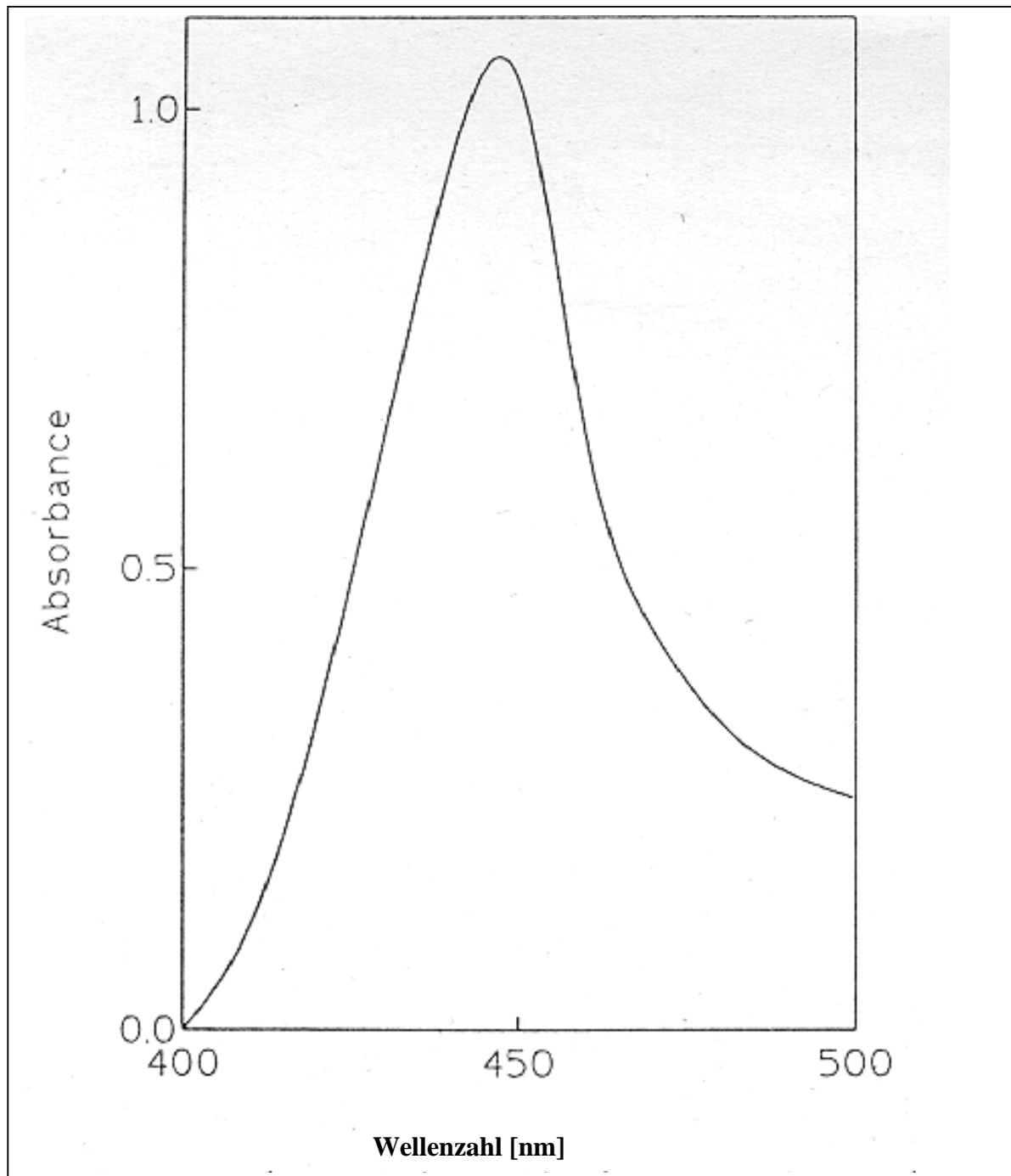


Abbildung 2.5.1-1: CO-Differenz-Spektrum von P450, das den charakteristischen Soret Peak um 450 nm darstellt.

Diese und andere Forscher zeigten auch, daß die Position der charakteristischen Soret Bande bei 450 nm als Folge der Bindung von unterschiedlichen Substraten an das Enzym verschoben werden kann (Schenkman, J.B., 1970; Schenkman, J.B. *et al.*, 1967). Der Einfluß der Substratbindung auf die UV Absorptionseigenschaften von Cytochrom P450 ist von besonderer Bedeutung, da sich herausgestellt hat, daß unterschiedliche Arten von Substraten unterschiedliche spektrale Verschiebungen auslösen: Typ I, II und modifizierter Typ II (Schenkman, J.B., 1970).

Eine Typ I Verschiebung wird durch unpolare Substrate ausgelöst, was eine hypsochrome Verschiebung der Soret Bande verursacht, wogegen Typ II Substrate eine bathochrome Verschiebung bewirken, was mit einer Ligandation des Häm-Eisens in Verbindung gebracht wird. Modifizierte Typ II Bindung hat ein UV Spektrum zur Folge, das den Anschein eines Spiegelbildes der Typ I spektralen Verschiebung hat, hervorgerufen durch eine Wechselwirkung zwischen Substrat und einer alternativen Bindungsstelle am Enzym.

Estabrook und andere Wissenschaftler zeigten schließlich, daß Cytochrom P450 die terminale Oxygenase im adrenalen Corticoid System für die C21-Hydroxylierung von Steroiden darstellt (Cooper, D.Y. *et al.*, 1965; Estabrook, R.W. *et al.*, 1963). Diese Rolle von P450 als terminale Oxidase wurde später für das microsomale System der Leber im Endoplasmatischen Reticulum bestätigt (Diehl, H. *et al.*, 1969).

Die Arbeiten von Gunsalus und anderen über bakterielles P450_{cam} (Katagiri, M. *et al.*, 1968; Tyson, C.A. *et al.*, 1972), Kimura und Suzuki über adrenales, mitochondriales P450 (Kimura, S. *et al.*, 1965; Suzuki, K. *et al.*, 1965) und Coon und Mitarbeiter über microsomales P450 (Lu, A.Y.H. *et al.*, 1968; Lu, A.Y.H. *et al.*, 1969) etablierten die Redox Komponenten in der Elektronentransportkette der P450-Monooxygenasen. Auf den Elektronentransport und die daran beteiligten Redox Systeme wird in Kapitel 2.5.3 näher eingegangen.

Zusätzliche Information wurde durch die ESR (Elektronen Spin Resonanz) Spektroskopie erhalten, die ergab, daß Cytochrom P450 ein Low-Spin Fe³⁺-Hämoprotein darstellt (Hashimoto, Y. *et al.*, 1962), das eine Thiol Gruppe als axialen Liganden des Eisen-Häm-Komplexes trägt (Bayer, E. *et al.*, 1969; Hill, H.A.O. *et al.*, 1970). Dieses Erkenntnis war eine Erklärung für die ungewöhnliche Position der Soret Bande und ihre Beeinflussung in Form von Charge Transfer Übergängen durch Substrate und andere Verbindungen.

Die Annahme einer Eisen-Schwefel Bindung in P450, die aus einer kovalent gebundenen Cystein-Gruppe stammt, wurde schließlich durch die Veröffentlichung der Röntgenkristallstruktur von P450_{cam} bestätigt (Poulos, T.L., 1985).

2.5.2 Die P450 Superfamilie-Evolution, Biodiversität und Nomenklatur

Evolution

Es wird angenommen, daß die gesamte P450 Superfamilie von Enzymen über einen Zeitraum von mindestens 1400 Millionen Jahren aus einem P450 "Ur-Gen" entstanden ist (Nebert, D.W. *et al.*, 1991b). Sie ging wahrscheinlich aus einem primitiven prokaryotischen Organismus hervor, der einen Mechanismus benötigte, um die ansteigende atmosphärische

Sauerstoffkonzentration für den oxidativen Metabolismus der Kohlenstoff Quellen nutzen zu können.

Es gibt jedoch Spekulationen darüber, daß der Ursprung von P450 sogar viel früher gewesen sein könnte, beim Beginn des terrestrischen Lebens selbst (Nebert, D.W. *et al.*, 1994). Von Eisen-Schwefel Proteinen und Enzymen glaubt man, daß sie bereits vor 3500 Millionen Jahren in Archaeobakterien vorkamen und diese mögen ihren probiotischen Ursprung in FeS₂ Mineralien gehabt haben (Keller, M. *et al.*, 1994), die in der Lage waren, Redox-Reaktionen einzugehen. Obwohl die sukzessive Oxygenierung der Atmosphäre vor etwa 2000 Millionen Jahren begann (Bryant, C., 1993), weiß man, daß nur geringe Konzentrationen von molekularem Sauerstoff für P450 katalysierte Reaktionen benötigt werden. Zudem besitzt das Enzym auch reduzierende Eigenschaften, da es in der Lage ist, die Bildung von Wasser aus Sauerstoff zu katalysieren (Archakov, A.I. *et al.*, 1990).

Aus der Tertiärstruktur der P450-Enzyme, die aus Röntgenbeugungsexperimenten zugänglich ist, läßt sich der Hinweis gewinnen, daß sie hinsichtlich ihrer Evolutionsgeschichte mit anderen Eisen enthaltenen Proteinen wie zum Beispiel Cytochrom b und c, Katalase und Globinen verwandt sind (Lewis, D.F.V., 1996), da all diese Enzyme ähnliche supersekundäre Struktur motive aufweisen.

Tatsächlich läßt sich der phylogenetische Stammbaum von Cytochrom P450 mit der zur Zeit gültigen Zeitskala der Evolution terrestrischer Lebensformen während der vergangenen 1400 Millionen Jahre vergleichen (Gonzalez, F.J. *et al.*, 1990; Nebert, D.W. *et al.*, 1991b).

Prokaryotische Bakterien wie zum Beispiel Purpurbakterien oder gram-positive Bakterien von denen man weiß, daß sie P450 enthalten, paßten sich trotz ihres anaeroben Ursprungs vor ca. 1900 Millionen Jahren nach und nach dem steigenden Sauerstoffgehalt der Atmosphäre an, der aus der Entwicklung der Photosynthese betreibenden Cyanobakterien resultierte.

Die Möglichkeit, daß eukaryotische Zellorganellen ihren Ursprung in Bakterien haben, ist faszinierend und könnte zum Beispiel die Unterschiede zwischen mitochondrialem und microsomalem P450 erklären (Woese, C.R., 1987). So könnten Mitochondrien und Chloroplasten durch Endocytose aus Proteobakterien und Cyanobakterien entstanden sein, und so die Entwicklungsgeschichte der Eukaryoten eingeleitet haben.

Biodiversität

Obwohl Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) erstmals in Microsomenpräparationen der Leber von Säugetieren gefunden wurde, wurde es nach und nach in vielen Organen und Geweben weiterer Tiere, Pflanzen, Pilzen und Bakterien entdeckt.

Bis zu diesem Zeitpunkt sind über 230 individuelle P450 Proteine entsprechend ihrer Proteinsequenz charakterisiert worden, und Formen dieses Enzyms sind in jeder Klasse von Lebewesen, wie zum Beispiel Säugetieren, Vögeln, Fischen (Andersson, T. *et al.*, 1992), Reptilien, Amphibien, Insekten (Feyereisen, R., 1993), Pflanzen (Durst, F., 1991), Bakterien und Pilzen existent (Nelson, D.R. *et al.*, 1993).

Pilze besitzen eine relativ geringe Anzahl von P450 Spezies. Hefe hat nur drei im kompletten Genom (CYP52, CYP56, CYP61: Sterolmetabolismus). Daraus folgt, daß P450 Enzyme für Pilze nicht sehr nützlich sind. P450 ist im Stoffwechsel von Pilzen außerdem noch am Schutz vor Pflanzengiften, an der Synthese von Pilzgiften und an der Nutzbarmachung von Alkanen beteiligt (Ohkawa, H. *et al.*, 1999).

Wenn Organismen komplexer werden, scheinen sie willkürlich ein P450-Enzym auszuwählen und es zu amplifizieren, um ihre gewachsenen Ansprüche erfüllen zu können. So hat das Insekt *Drosophila melanogaster* etwa 80 P450 Gene, während bis jetzt bei der Pflanze *Arabidopsis thaliana* etwa 170 P450 Gene gefunden wurden.

Dagegen wurden bei Säugetieren bisher nur ca. 50-70 P450 Gene gefunden und dies veranschaulicht wahrscheinlich die Strategie von Pflanzen, eine große Anzahl von Sekundärmetaboliten herzustellen, von denen viele durch Hydroxylierungsreaktionen entstehen (Ohkawa, H. *et al.*, 1999).

Die Verteilung der P450 Proteine in den verschiedenen Organen von Säugetieren wurde detailliert untersucht (Waterman, M.R., 1992), und es stellte sich heraus, daß sie hauptsächlich in der Leber vorkommen (Paine, A.J., 1981), doch sie sind ebenfalls in der Niere, der Lunge (Smith, B.R. *et al.*, 1982), den Keimdrüsen, den Nebennieren (Pasanen, M. *et al.*, 1989), im Gehirn, der Nasenschleimhaut, der Gebärmutter, der Bauchspeicheldrüse, der Milz, dem Verdauungstrakt (Kaminsky, L.S. *et al.*, 1992), und der Haut vorhanden (Mukhtar, H. *et al.*, 1989).

Nomenklatur

Cytochrom P450 gehört zu einer P450 Superfamilie, die über 300 verschiedenen Proteine umfaßt, welche in 36 Familien und Subfamilien unterteilt wurden.

Die P450 Nomenklatur hat sich wegen der Entdeckung immer neuer P450 Isoenzyme immer wieder verändert. Die zur Zeit gültige Nomenklatur basiert auf der Proteinsequenz Homologie (Nebert, D.W. *et al.*, 1991a) und benutzt CYP als Abkürzung für Cytochrom. Danach folgt eine Nummer für die Proteinfamilie (zum Beispiel 1, 2, 3), ein Großbuchstabe für die Subfamilie (zum Beispiel A, B, C) und abschließend findet man eine Nummer für das spezielle Protein.

Die Grundlage für die Zuordnung eines neuen P450 Gens oder einer Proteinsequenz zu einer CYP Nummer ist dabei folgende (Nelson, D.R. *et al.*, 1993):

- (a) es besteht ≤ 40 % Identität zwischen zwei Familien
- (b) es besteht > 55 % Identität zwischen Subfamilien innerhalb einer Familie
- (c) es besteht > 97 % Identität zwischen den allelischen Varianten.

Es ist jedoch immer noch geläufig, bestimmte (steroidogene) P450 Enzyme nach der Position zu benennen, an der die Oxygenierung stattfindet: 11 β , 17 α , C21, SCC und 14DM, was sich auf 11 β Hydroxylierung, 17 α -Hydroxylierung, C21-Hydroxylierung, Seitenketten Spaltung (side chain cleavage) und 14-Demethylierung bezieht.

Für eine ausführlichere Darstellung der verschiedenen Nomenklaturesysteme wird auf folgende Publikationen verwiesen: (Nebert, D.W. *et al.*, 1991b; Nelson, D.R. *et al.*, 1993).

2.5.3 Oxygenierungs- Mechanismus von P450

Der katalytische Zyklus von P450

Die Mehrheit der von P450 katalysierten Reaktionen hat folgende Stöchiometrie:



RH steht dabei für ein Substrat, welches im Verlauf der Reaktion hydroxyliert wird. Die Reaktion verbraucht zwei Reduktionsequivalente, d.h. zwei Elektronen und zwei Protonen. Die Monooxygenierung wird durch ein Sauerstoffmolekül verursacht, welches während des katalytischen Prozesses gespalten wird. Ein Sauerstoffatom wird dabei ins Substrat inkorporiert, während das zweite Atom zu Wasser reduziert wird. Die Elektronen werden dabei von NADPH (NADH) über besondere Elektronentransportsysteme auf Cytochrom P450 übertragen. Hierbei unterscheiden sich mitochondriale aber auch viele Bakterien von microsomalen P450 Systemen.

In mitochondrialen Systemen besteht das Elektronentransportsystem aus zwei Proteinen: Adrenodoxin Reduktase, ein FAD enthaltene Flavoprotein und Adrenodoxin, welches ein Ferredoxin ähnliches Eisen-Schwefel (Fe₂S₂) Protein darstellt (Hanukoglu, I., 1992b; Lambeth, J.D. *et al.*, 1985). Dabei werden von NADPH (NADH) zwei Elektronen auf die Adrenodoxin Reduktase übertragen, während Adrenodoxin als mobiler Ein-Elektronen-Shuttle jeweils nur ein Elektron auf P450 überträgt (Lambeth, J.D. *et al.*, 1982).

Microsomale P450 Systeme sind von einer P450 Reduktase abhängig, welches ein Flavoprotein ist, das FAD und FMN als Co-Faktoren trägt (Hanukoglu, I., 1992a). Während des katalytischen

Zyklus werden zwei Elektronen auf die FAD-Domäne der Reduktase übertragen und schließlich je ein Elektron von der FMN-Domäne auf Cytochrom P450 (Vermilion, J.L. *et al.*, 1981). Der FMN Co-Faktor erfüllt hier die gleiche Aufgabe wie Ferredoxin in mitochondrialen Systemen. Einige microsomale Systeme akzeptieren das zweite Elektron auch von Cytochrom b_5 (Backes, W.L., 1993).

Die verschiedenen Elektronentransportketten sind in Tabelle 2.5.3-1 zusammengefaßt (Lewis, D.F.V., 1992).

P450 System	Elektronentransportkette
Bakterien	NADH → Putidaredoxin Reduktase → Putidaredoxin → P450 _{cam}
Mitochondrien	NADPH → Adrenodoxin Reduktase → Adrenodoxin → P450 _{SCC}
Microsomen	NADPH → Cytochrom P450 Oxidoreduktase → P450

Tabelle 2.5.3-1: Elektronentransportkette in verschiedenen P450 Systemen.

Der tatsächliche katalytische Zyklus kann sich je nach Elektronenquelle und Substrattyp verändern, wird jedoch im wesentlichen durch Abbildung 2.5.3-1, die ein vereinfachtes Schema darstellt, wiedergegeben.

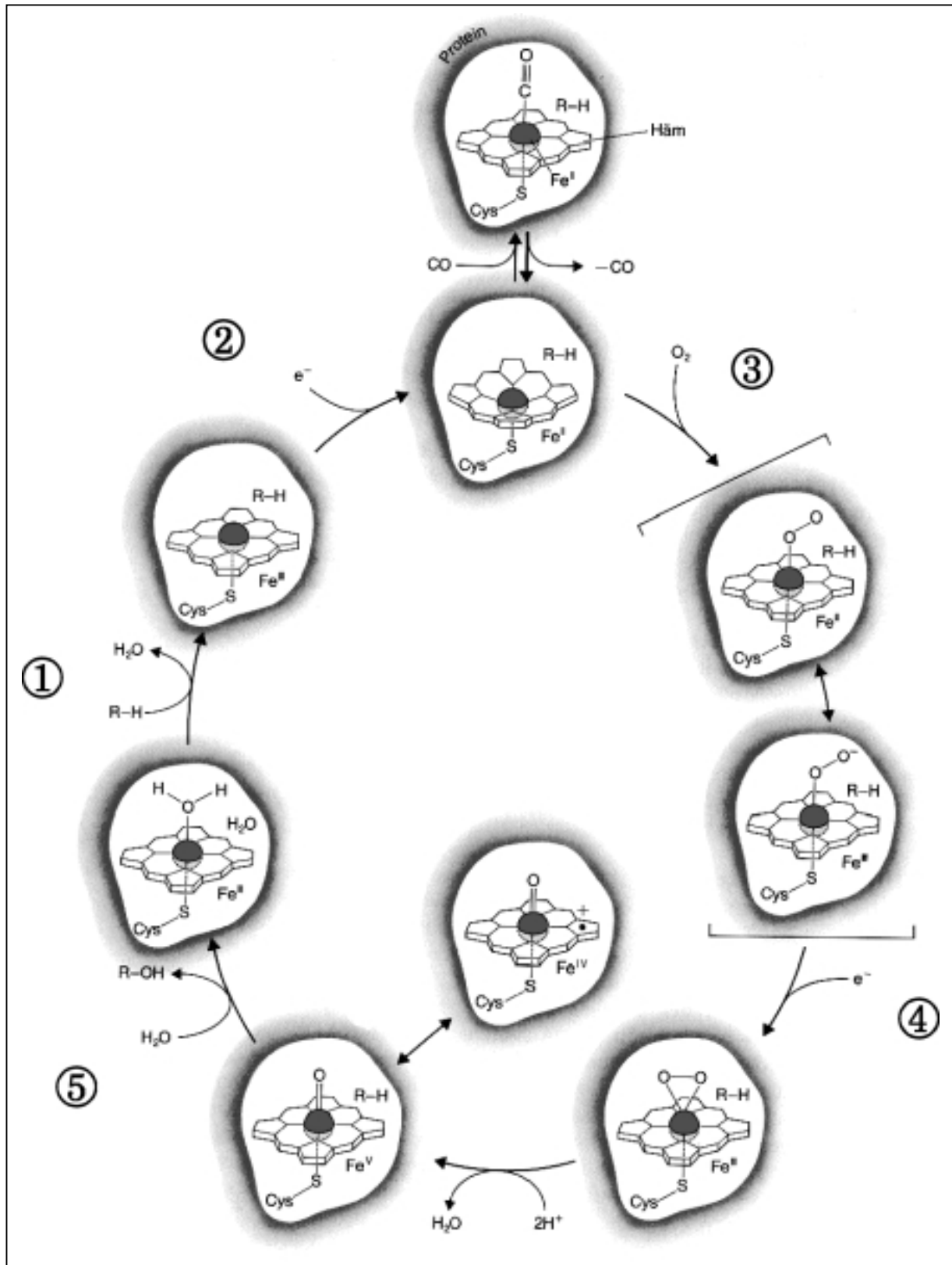


Abbildung 2.5.3-1: Reaktionszyklus und enzymatische Zwischenstufen in P450-katalysierten Oxygenierungen (Lewis, D., F.V. *et al.*, 1992). ①: Substrat Bindung, ②: Erste Reduktion, ③: Bindung von O₂, ④: Zweite Reduktion, ⑤: Produkt Bildung.

Verfolgt man den katalytischen Zyklus im Uhrzeigersinn, werden die vorgeschlagenen Zwischenstufen und der detaillierte Mechanismus immer weniger gut verstanden. Dies liegt hauptsächlich an der Zeitskala, in der die Reaktionen ablaufen und an den Techniken, die eingesetzt werden können, diese zu untersuchen.

Der kinetische und thermodynamische Verlauf in den verschiedenen Zwischenstufen zeigt in bakteriellen und microsomalen Systemen eine große Ähnlichkeit, was auf einen gemeinsamen Mechanismus schließen läßt (Ruckpaul, K. *et al.*, 1984). Im Folgenden werden die einzelnen katalytischen Schritte aus Abbildung 2.5.3-1 kurz beschrieben.

1. Schritt - Substratbindung: Im Ausgangszustand liegt das Enzym in einem Low-Spin Fe^{3+} Zustand vor, wobei Wasser die Häm-Tasche einnimmt. Die Substratbindung vollzieht sich schnell, mit hoher Affinität und wird von einer Veränderung des Absorptionsspektrums begleitet. Diese resultiert aus einer Verschiebung des Eisen-Spin Gleichgewichts von der Low-Spin Konfiguration in eine High Spin Konfiguration. Diese Verschiebung wird besonders durch Typ I Substrate ausgelöst. Die Soret Absorptionsbande verschiebt sich somit für Typ I Substrate von 416-420 nm (Low Spin) nach 385-394 nm (High Spin).

Die Desolvatation des Aktiven Zentrums durch das Substrat (Griffin, B.W. *et al.*, 1972) führt zu einem günstigeren Entropiezustand ($\Delta S > 0$). Generell gesehen ist die Bindung von hydrophoben Substraten an das aktive Zentrum von P450 ein Entropie getriebener Prozeß.

Der relativ stabile Substrat-Enzym Komplex erleichtert nun den Elektronentransfer vom Elektronendonator (Flavoprotein Reduktase oder Adrenodoxin) zum Häm-Fe(III) (Guengerich, F.P., 1983), da das Redoxpotential von P450 durch die Substratbindung um ca. 100 mV gesenkt wird (Ruckpaul, K. *et al.*, 1989). Man nimmt an, daß durch die Substratbindung eine Konformationsänderung im Enzym ausgelöst wird, was eine Wechselwirkung mit den Redox-Partnern mit sich bringt (Bernhardt, R. *et al.*, 1988; Veitch, N.C. *et al.*, 1992).

2. Schritt - erste Reduktion: Ein relativ schneller Schritt im katalytischen Zyklus ist die Übertragung des ersten Elektrons von einer Reduktase oder einem Redoxin zu P450.

In mitochondrialen Systemen findet zuvor eine Elektronenübertragung von NAD(P)H auf eine Redoxin Reduktase statt, was im Fall von P450_{cam} nur ca. 600 s^{-1} bei 4 °C benötigt, wobei der anschließende Transfer auf das Redoxin langsamer verläuft (26 s^{-1} bei 4 °C) (Archakov, A.I. *et al.*, 1990).

In microsomalen Systemen ist die Elektronenübertragung von NADPH auf die Flavin-Reduktase wesentlich langsamer (28 s^{-1} bei CYP2B4). Der folgende Inter-Flavin Elektronentransfer

zwischen den FAD- und FMN enthaltenden Subdomänen ist wiederum relativ schnell, wobei die beiden Flavin Ringe dicht beieinander liegen. (4 Å entfernt voneinander) (Ruckpaul, K. *et al.*, 1984).

Anscheinend erniedrigt die Bindung der Redoxpartner das Redoxpotential von P450, was darauf hinweist, das es eine Zusammenarbeit zwischen Bindung und Elektronentransport gibt (Archakov, A.I. *et al.*, 1990).

Im Fall von P450_{cam} nimmt man an, daß mindestens vier basische Seitengruppen in der Nähe des Häm Zentrums von P450 Ionenpaarwechselwirkungen mit komplementären Säure-Gruppen von Putidaredoxin eingehen (Stayton, P.S. *et al.*, 1990).

In microsomalen Systemen gibt es ähnliche Wechselwirkungen zwischen Reduktase und P450. Für P450_{LM2} sind einige daran beteiligte Aminosäurereste durch chemische Modifikationen identifiziert worden (Bernhardt, R. *et al.*, 1988; Lewis, D.F.V. *et al.*, 1995).

3. Schritt – Sauerstoff Anlagerung: Molekularer Sauerstoff wird nun sehr schnell an den High-Spin Eisen(II) P450-Substrat Komplexes gebunden. Die Geschwindigkeitskonstante dieses Prozesses beträgt über $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 25 °C. Der entstandene Komplex ist relativ stabil, die Autoxidation zu Superoxid verläuft mit einer Geschwindigkeit von $0,01 \text{ s}^{-1}$ bei 20 °C (Archakov, A.I. *et al.*, 1990). Durch die Bindung von Sauerstoff an P450 kehrt Eisen(II) in die Low-Spin Konfiguration zurück. Es gibt Hinweise darauf, daß der $\text{O}_2 \text{ Fe(II)}$ -Komplex im Gleichgewicht zur kanonischen Form $\text{O}_2^- \text{ Fe(III)}$ vorliegt, was durch die Übertragung eines Elektrons auf das Sauerstoffmolekül geschehen könnte (Archakov, A.I. *et al.*, 1990).

Die Energie der Spin-Spin Wechselwirkung aus der Paarung von Triplet Sauerstoff (zwei ungepaarte Elektronen) mit High-Spin Fe(II) P450 (vier ungepaarte Elektronen) ist zwar signifikant, doch gibt es gewichtigere elektronische Faktoren für die hohe Affinität von Sauerstoff zum P450 Fe(II)-Substrat Komplex. Häm-Eisen mit Eisen im Fe(II) Zustand ist ein guter π -Donator, was die starke Bindung von π -Akzeptoren wie O_2 und CO begünstigt (Da Silva, J.J.R.F. *et al.*, 1991).

4. Schritt – zweite Reduktion: Die Übertragung des zweiten Elektrons ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten katalytischen Mechanismus. Es entsteht ein Komplex den man formal als $\text{Fe}^{2+} \text{O}_2^-$ oder $\text{Fe}^{3+} \text{O}_2^{2-}$ ansehen kann. Der Zerfall dieses Komplexes führt zur Freisetzung von Superoxid, was jedoch durch die Belegung des Häm Zentrums durch das Substrat zum großen Teil unterdrückt wird (Archakov, A.I. *et al.*, 1989). Beim Zerfall des reduzierten Oxy-Cytochrom P450 Komplexes kann auch Wasserstoffperoxid

entstehen, besonders wenn die Oxygenierung des Substrats ungünstig ist (Archakov, A.I. *et al.*, 1990).

Mit gebundenem Substrat unterliegt der reduzierte Oxy-Cytochrom P450 Komplex rasch einer Umlagerung, wodurch das oxygenierte Substrat und Wasser mit einer Geschwindigkeitskonstante von 30 min^{-1} freigesetzt wird, was je nach Substrat und P450 Spezies beträchtlich variieren kann (Ruckpaul, K. *et al.*, 1989).

5. Schritt – Produktbildung: Der Mechanismus des Zusammenbruchs des reduzierten Oxy-Cytochrom P450 Komplexes und der Produktbildung ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurden schon eine Reihe von Mechanismen vorgeschlagen, und es ist möglich, daß je nach Substrat oder P450 Isoenzym der eine oder andere zutrifft (Kappus, H., 1993; Ortiz de Montellano, P.R., 1986; Rein, H. *et al.*, 1993). Die meisten Arbeiten favorisieren eine Eisen (V) Oxen ($\text{Fe}=\text{O}$) Zwischenverbindung als oxygenierende Spezies (Coon, M.J. *et al.*, 1980; Sligar, S.G. *et al.*, 1984), wobei es auch kritische Gegenstimmen gibt (Sawyer, D.T., 1987).

2.5.4 Protein-Lipid Wechselwirkungen in P450 Systemen

Alle eukaryotischen P450 Isoenzyme sind mit einer Membran assoziiert. Ein N-terminales Segment aus 20-40 Aminosäuren bei microsomalen P450 Enzymen, der N-Terminus der P450 Reduktasen und der C-Terminus von Cytochrom b_5 enthalten hydrophobe Aminosäuren, die die Phospholipidmembran durchspannen. Die Enzyme werden dadurch in der Membran verankert, so daß der größte Teil des Proteins dem Cytoplasma zugewandt bleibt (Monier, S. *et al.*, 1988; Nef, P. *et al.*, 1989).

Da die hydrophoben Segmente in der Aminosäuresequenz von P450 zwischen 20-40 Reste lang sind, nimmt man an, daß sie strukturell entweder aus einer einzigen Helix mit 20 Aminosäuren oder einem "helix turn helix" Motiv bestehen (Ozols, J., 1989). Es konnte gezeigt werden, daß eine Helix aus 20 Aminosäuren gerade die richtige Länge hat, eine Membran zu durchspannen und basierend auf der Hydrophobizität des P450 N-Terminus, ist es wahrscheinlich, daß die bevorzugte Konformation eine α -Helix ist (Nelson, D.R. *et al.*, 1988). Die enzymatische Spaltung des N-Terminus führt bei microsomalen P450 Enzymen zum Rückgang der katalytischen Aktivität sowie der Bindung an die Redoxpartner.

Mit Elektronen Spin Resonanz Techniken durchgeführte Rotationsdiffusions Versuche an microsomalem P450 ergaben, daß sich sechs individuelle P450 Einheiten an einer Membran zu einem Cluster zusammenlagern und um eine sechszählige Achse parallel zur Membranoberfläche rotieren. Dabei assoziieren die N-terminalen Segmente der einzelnen P450

Einheiten zu einem Membran durchspannenden Aggregat (Schwarz, D. *et al.*, 1990a). Diese Entdeckung wird durch Erkenntnisse aus Gefrierbruch Elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterstützt (Schwarz, D. *et al.*, 1990b).

Schon vor über 20 Jahren wurde angenommen, daß sich eine hexamere Einheit von P450 Molekülen um eine zentrale Reduktase lagert (Stier, A., 1976), die in viel niedrigerer Konzentration in der Zelle vorkommt, als P450 (Shiraki, H. *et al.*, 1984). Dies deutet darauf hin, daß P450 Enzyme keine statisch an die Membran gebundenen Komplexe, sondern mobile Einheiten sind (Archakov, A.I. *et al.*, 1990).

Mitochondriale P450 Enzyme sind an der Matrix Seite der Inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Churchill, P.F. *et al.*, 1978b; Mitani, F. *et al.*, 1982). Diese mitochondrialen P450 Enzyme verhalten sich ebenfalls als hydrophobe Proteine aber im Gegensatz zu microsomalen Systemen besitzen Sie kein N-terminales, hydrophobes Segment, das man als in der Membran verankert voraussagen könnte (Morohashi, K. *et al.*, 1987). Die Regionen von mitochondrialen P450 Enzymen, die mit der Membran in Wechselwirkung treten sind bisher noch unbekannt. Die Redoxpartner Adrenodoxin Reduktase und Adrenodoxin (im Fall von P450_{11A1}) sind leicht zu solubilisierende Proteine und besitzen keine besonders hydrophoben Regionen (Hanukoglu, I., 1992b; Kimura, T. *et al.*, 1967).

Immunocytochemische Studien haben ergeben, daß sie wahrscheinlich über ionische Wechselwirkungen mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert sind (Hanukoglu, I. *et al.*, 1990). Neuere Studien über die Rotation des mitochondrialen CYP_{11A1} (P450_{SCC}) in Proteoliposomen durch zeitaufgelöste verzögerte Fluoreszenz Depolarisations Anisotropie haben ergeben, daß dieses P450 ebenfalls hexamere Cluster bildet, die 1 nm tief mit einem Durchmesser von 11,4 nm in die Membran eingebettet sind (Schwarz, D. *et al.*, 1993).

Wie man sieht, es gibt hinreichend Hinweise darauf, daß die Membran eine wichtige Rolle in microsomalen und mitochondrialen Systemen spielt (Archakov, A.I. *et al.*, 1990; Ingelman-Sundberg, M., 1986; Ruckpaul, K. *et al.*, 1984; Schenkman, J.B. *et al.*, 1993). Tatsächlich erfüllt die Membran gleichzeitig eine Reihe von Funktionen. Sie vereinfacht und regelt die Wechselwirkung zwischen den Redoxpartnern, sie reguliert die Integration des Enzyms in die Membran, und ist das Medium, durch welches das Substrat Zugang zum aktiven Zentrum von P450 erhält. Die strukturellen Eigenschaften der Phospholipid Moleküle sowie der Membran als gesamte Einheit beeinflussen den Spin Gleichgewichtszustand des Hämoproteins in microsomalen Systemen (Ruckpaul, K. *et al.*, 1982). Für das mitochondriale P450_{11A1} wurde beobachtet, daß es bestimmte „activator“ Lipide wie zum Beispiel Cardiolipin gibt, die die Wechselwirkung des Substrats Cholesterol mit dem Enzym verstärken was zu einer

Aktivitätssteigerung des Enzyms führt (Igarashi, Y. *et al.*, 1986; Lambeth, J.D., 1981). Inzwischen gibt es sogar die Erkenntnis, daß nicht Bilayer-Strukturen wie hexagonale H_{II} Phasen die Aktivität von P450_{SCC} positiv beeinflussen (siehe Kapitel 3.3).

2.5.5 Substrat-Spezifität eukaryotischer P450-Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysieren oxidative Reaktionen einer Vielzahl endogener und exogener lipophiler Verbindungen und führen dabei über 60 verschiedenen enzymatische Reaktionen wie zum Beispiel Oxygenierungen, Reduktionen, Dehalogenierungen, Demethylierungen aus. Die 300 bisher sequenzierten Isoformen des Enzyms (Nelson, D.R. *et al.*, 1993) sind in der Lage, Hunderttausende verschiedener Substanzen zu metabolisieren (Porter, T.D. *et al.*, 1991). Abbildung 2.5.5-1 gibt eine Übersicht über P450 katalysierte Reaktionen.

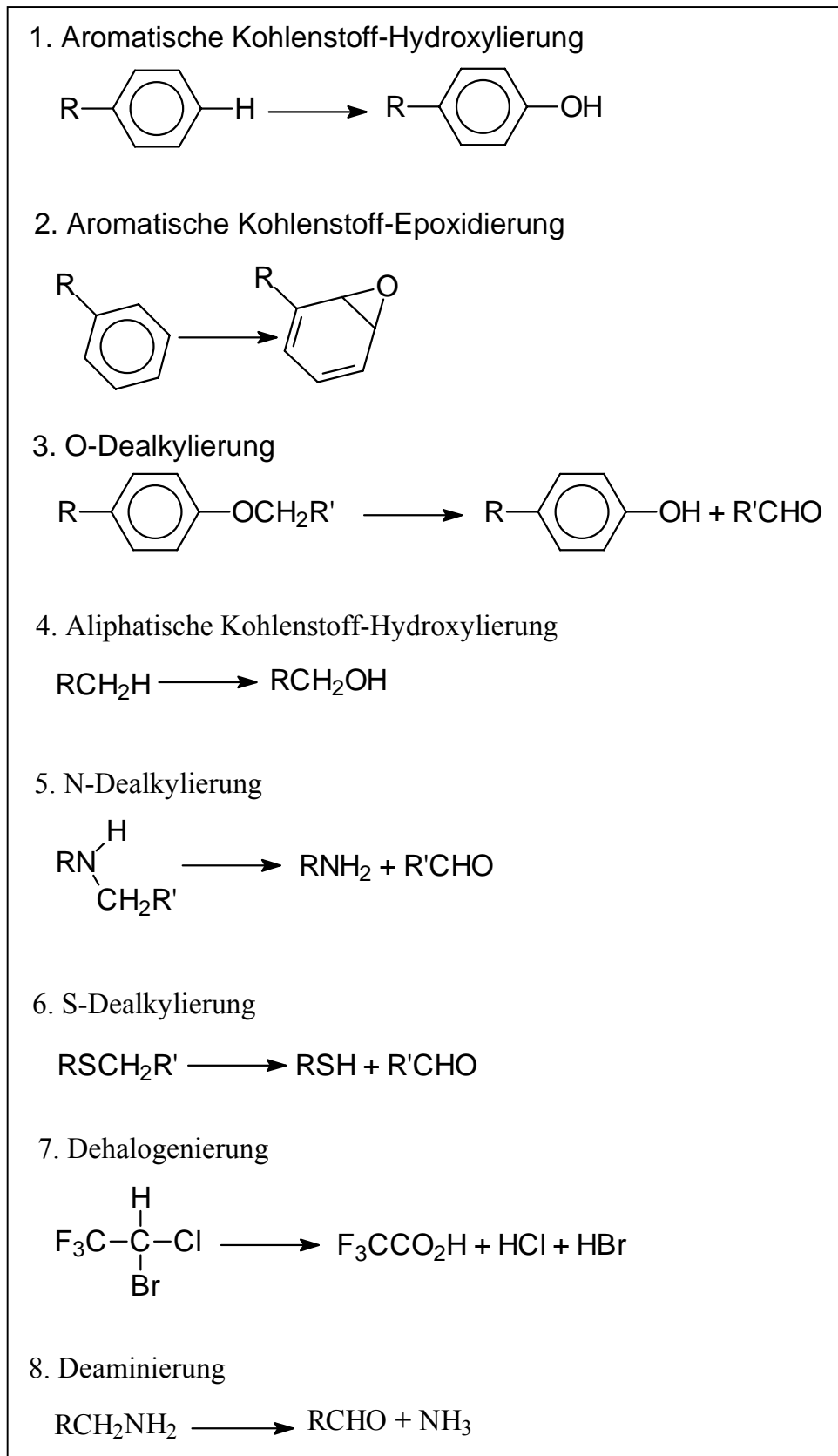


Abbildung 2.5.5-1: Übersicht über P450-katalysierte Reaktionen katalysiert.

Endogener Metabolismus. Cytochrome P450 der Familien CYP1, CYP2 und CYP3 sind nur in wenigen Fällen in den Metabolismus endogener Substanzen involviert und in einigen Fällen

katalysieren sie die Reaktionen an Steroiden. Die Hydroxylierungen geschehen jedoch an Positionen der Steroide, die sich von denen die mit der Biosynthese zu tun haben, unterscheiden (Zimniak, P. *et al.*, 1993). Für eine Übersicht über diese Reaktionen wird auf die Literatur verwiesen: (Schenkman, J.B., 1992).

Dafür sind in Säugetieren Enzyme der CYP4 Familie für die ω - und ω -1 Hydroxylierung von längerkettigen Fettsäuren wie Laurinsäure verantwortlich, und andere Isoenzyme werden mit der ω -Hydroxylierung von bestimmten Prostaglandinen und Leukotrienen in Verbindung gebracht (Kupfer, D., 1980).

Die verbleibenden Familien in Säugetieren sind mit der Biosynthese von Steroidhormonen beschäftigt und ihre Nomenklatur wird von der Position des Steroid-Kerns abgeleitet, an der die Hydroxylierung stattfindet (Nelson, D.R. *et al.*, 1993; Schenkman, J.B. *et al.*, 1993). Auf diese Enzyme wird in Kapitel 2.5.6 näher eingegangen. Neben den Reaktionen die zu Steroidhormonen führen, katalysieren Cytochrome wie zum Beispiel CYP7, CYP27 und CYP12 die Bildung von Gallensäuren aus Cholesterol. Dies geschieht hauptsächlich in der Leber und beinhaltet 7α - 27- und 12α -Hydroxylierungen wobei Cholsäure und Chenodeoxycholsäure entstehen können (Okuda, K. *et al.*, 1993). Dies ist zudem ein wichtiger Weg, Cholesterol im Organismus abzubauen und zu eliminieren (Lewis, D.F.V., 1996)

CYP27 katalysiert weiterhin die Hydroxylierung von Vitamin D3 und seiner Hydroxy-Derivate, wobei die Hydroxylierungen an Positionen 25 und 26 am Steroid-ähnlichen Nukleus erfolgen (Hollis, B.W. *et al.*, 1993).

Exogener Metabolismus. Den größten Anteil an P450 Enzymen, die am exogenen Metabolismus bei Säugetieren beteiligt sind, enthält die Leber (Guengerich, F.P., 1993b), jedoch wurden kleinere Mengen zum Beispiel auch in der Haut (Mukhtar, H. *et al.*, 1989), der Lunge (Arinc, E., 1993), dem Verdauungstrakt, dem Gehirn (Warner, M. *et al.*, 1993), der Nasenschleimhaut (Longo, V. *et al.*, 1991), Bauchspeicheldrüse, Milz und Gebärmutter gefunden. Tatsächlich hat man P450 Enzyme in jedem Zelltyp des Körpers außer in Erythrocyten und im Skelettmuskel nachgewiesen (Guengerich, F.P., 1993a).

P450 Monooxygenasen sind an der Detoxifizierung und (oder) die Aktivierung von Xenobiotica wie zum Beispiel Pestiziden beteiligt und so gibt es inzwischen viele Publikationen über den Anstieg dieser Enzyme im Körper in Abhängigkeit von Medikamentengaben, Alkoholgenuß, Tabakkonsum, Exposition gegenüber Chemikalien, Krankheit, Alter und ethnogeographischen Populationen.: (Gonzalez, F.J. *et al.*, 1994; Murray, M., 1992; Pasanen, M. *et al.*, 1989; Watkins, P.B., 1990).

Bei Säugetieren sind am xenobiotischen Metabolismus überwiegend die Enzyme der Familien CYP1, 2 und 3 beteiligt. Es scheint, daß verschiedenen Familien und Subfamilien unterschiedliche Strukturtypen von Substraten metabolisieren. Tabelle 2.5.5-2 enthält Beispiele aus verschiedenen CYP Familien und ihren typischen Substraten (Lewis, D.F.V., 1996).

Es gibt einige Beispiele aus den CYP4 und CYP6 Familien bei Pilzen, Bakterien und Pflanzen, die in der Lage sind, Fremdsubstanzen umzusetzen (Sariaslani, F.S., 1991). Insekten besitzen Enzyme der CYP6 Familie, die wahrscheinlich ausschließlich in dieser Klasse von Wirbellosen Tieren vorkommen und die eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Pflanzengiften spielen (Nelson, D.R. *et al.*, 1993). Außerdem sind Spezies aus den Familien CYP9A1 und CYP12A1 für die Resistenz gegenüber Insektiziden wie Thiodicarb und Organophosphaten verantwortlich (Bassett, M.H. *et al.*, 1997).

Obwohl die Prinzipien der Funktionsweise von P450 inzwischen klar sind, ist die Aufklärung der spezifischen Aufgabe jeder einzelnen P450 Spezies langsam und schwierig. Die heterologe Expression von P450 cDNAs, gefolgt von einem Screening nach potentiellen Substraten, ist die gängige Methode der Wahl (Ohkawa, H. *et al.*, 1999).

CYP Familie / Subfamilie	Marker Substrate	Rezeptor: Induktor	Typische Substrate und Substanzklassen
CYP1A1	Ethoxy-resorufin	Ah: TCDD (Carcinogen)	Planare, polyaromatische Kohlenwasserstoffe, Nitroarene wie Benzopyren, Nitropyren
CYP1A2	Methoxy-resorufin, Caffein	Ah: TCDD, PAH's, Isosafrole	Planare heterozyklische und polyaromatische Amine und Amide wie Glu-P-1 und andere Mutagene in gekochter Nahrung, Caffeine, Theophylline und 2-Acetylaminoflourene
CYP2A	Coumarin	kaum induzierbar	Coumarin (3- und 7-Hydroxylierung).
CYP2B	Pentoxy-resorufin, Phenobarbital	Phenobarbital	Nicht-planare Moleküle und relativ hydrophobe Substanzen wie Barbiturate und Chlorierte Pestizide wie DDT, Chlordan;Cyclophosphamide
CYP2C	(S)-Mephenytoin, Tolbutamid	kaum induzierbar	Relativ polare, nicht-planare Verbindungen wie Tolbutamid, Warfarin und Mephenytoin, enthalten Wasserstoffbrückenbindungs-Donor / Akzeptor Atome ca. 8-10 Å von der Stelle der Oxygenierung entfernt.
CYP2E	p-Nitophenol, N,N-Dimethyl-anilin	Ethanol, akuter Nahrungsmangel, Diabetes	Lösungsmittel mit niedrigem Molekulargewicht wie Benzol, Halogenalkane, Halogenalkene, Ethanol, Aceton und Nitrosamine wie DMN, DEN
CYP3	Niphedipin	Synthetische Steroide, PCN, TAO, Dexamethason	Große Moleküle mit hohem Molekulargewicht wie macrolide Antibiotika z.B. Erytromycin, Cyclosporin, und viele Pharmazeutika
CYP4	Laurinsäure	ppar: Clofibrat 4A4, durch Schwangerschaft oder Progesteron induziert	Langkettige Fettsäuren wie Laurinsäure, aber auch Phthalatester

Tabelle 2.5.5-1: Exogener Substratmetabolismus hepatischer P450 Familien CYP1-4 (Lewis, D.F.V., 1996).

2.5.6 Steroidogenische P450-Enzyme

Steroidhormone des Körpers

Die Konzentration von Steroidhormonen im Blut fluktuiert mit einer spezifischen Periodizität oder als Antwort auf physiologische und pathologische Veränderungen, um so die diversen Prozesse im Körper steuern zu können. In Säugetieren gibt es drei endokrine Organe, die sich auf die Produktion von Steroidhormonen spezialisiert haben: die Nebennierenrinde, Eierstöcke und Testikel. Während der Schwangerschaft wird die Plazenta zu einer zusätzlichen Quelle von Steroidhormonen (Hanukoglu, I., 1992a).

Die Steroidhormon Produktion dieser Organe ist durch spezifische extrazelluläre Hormone und Faktoren, die eine Serie von intrazellulären Prozessen in Gang setzen, geregelt. Heute geht man davon aus, daß die Produktion von Steroidhormonen von der Geschwindigkeit des Steroidmetabolismus, d.h. von Biosynthese und Katabolismus, abhängt (O'Malley, B.W. *et al.*, 1991).

Der Weg der Steroidhormon Biosynthese beginnt mit Cholesterol. Cholesterol wird in veresterter Form in Lipid Vesikeln aufbewahrt. Trophische Hormone lösen eine Kette von Reaktionen aus die zur Hydrolyse der Cholesterolester und zur Freisetzung von Cholesterol führen. Anschließend wird Cholesterol in die Mitochondrien transportiert, wo P450_{SCC} die Umsetzung zu Pregnenolon katalysiert (Jefcoate, C.R. *et al.*, 1992). Nach diesem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt laufen nun mit dem Fluß der Substrate durch die Enzymsysteme, die im Endoplasmatischen Reticulum und Mitochondrien lokalisiert sind, die nachfolgenden biosynthetischen Schritte ab.

Steroidhormone sind hydrophobe Moleküle die nach ihrer Synthese in der Zelle durch die Membran in den Blutkreislauf diffundieren können und somit nicht in intrazellulären Vesikeln aufbewahrt werden. Dies steht im Kontrast zu Peptidhormonen und Neurotransmittern die in intrazellulären Vesikeln angehäuft und erst auf einen spezifischen Reiz hin, sekretiert werden.

Inzwischen wurden cDNAs fast aller wichtigen steroidogenen Enzyme isoliert und man hat daraus gelernt, daß die meisten nur von einem Gen codiert werden. Für Schlüsselenzyme wie P450_{SCC} gibt es keine verschiedenen Gene die spezifisch in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Ein einziges Gen trägt daher alle die Signale für eine spezifische Regulation in verschiedenen Geweben und Zellen. Eine weitere Tatsache ist, daß manche Enzyme wie zum Beispiel P450c17 oder P450c18 mehr als nur eine Reaktion katalysieren.

Die ersten zwei wichtigen Schritte in der Biosynthese von Steroiden laufen in allen steroidogenen Organen gleich ab:

(1) Umsetzung von Cholesterol zu Pregnenolon durch P450_{SCC} in Mitochondrien.

(2) Umsetzung von Pregnenolon zu Progesteron durch 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3β -HSD) im Endoplasmatischen Reticulum.

Die nachfolgenden Schritte im Steroid Metabolismus werden von Enzymen katalysiert, die nur in einigen steroidogenen Zelltypen exprimiert werden. Die zellspezifische Expression der Enzyme bestimmt die Fähigkeit einer Zelle, die verschiedenen Steroidhormone zu synthetisieren (Hanukoglu, I., 1992a) (siehe Abbildung 2.5.6-1).

Das folgende Kapitel 2.5.2.2 befaßt sich nun mit dem Enzymsystem von P450_{SCC}, auf das sich die Untersuchungen dieser Arbeit konzentriert haben.

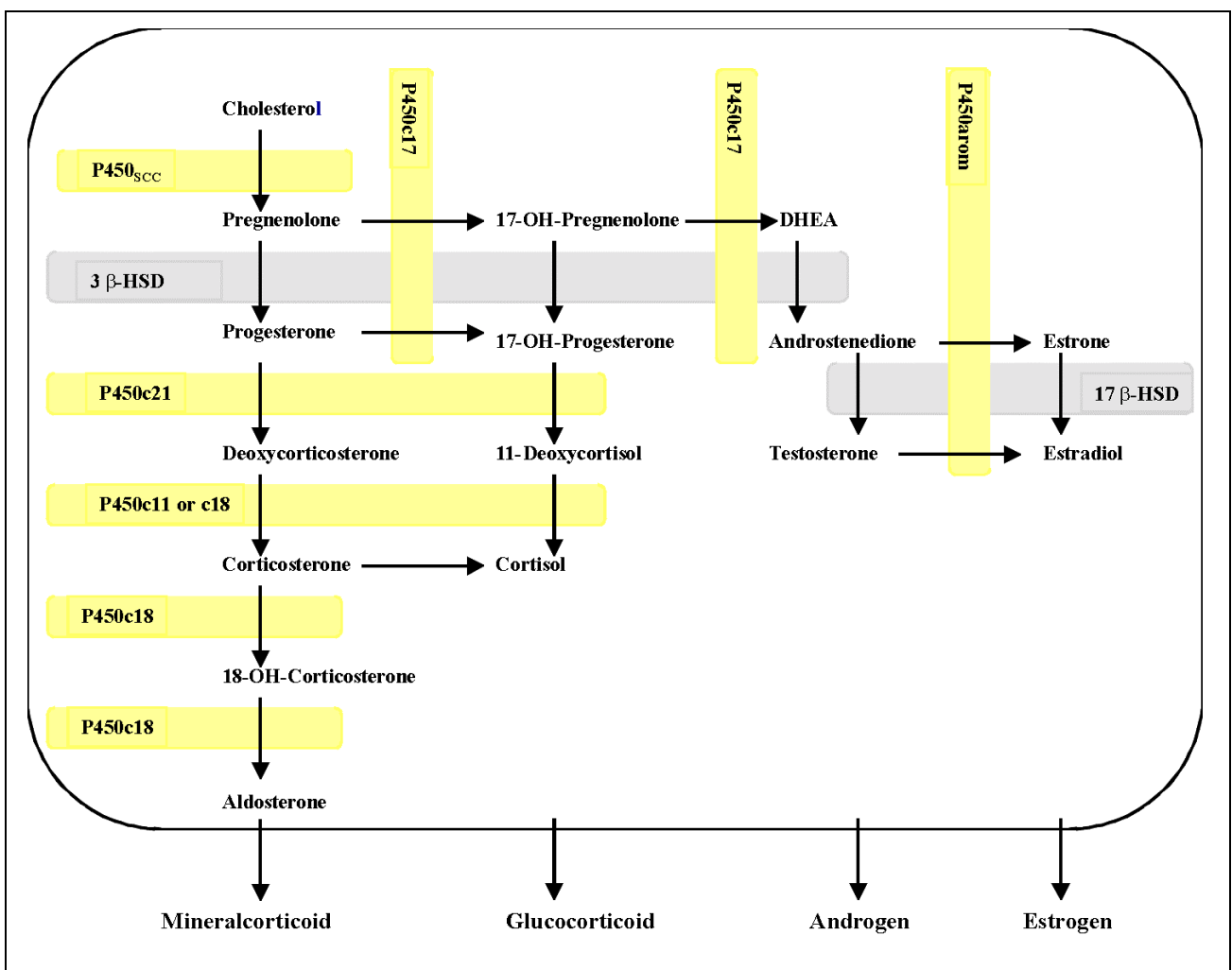


Abbildung 2.5.6-1: Weg der ersten Schritte der Steroidhormon Biosynthese in den Zellen der Nebennierenrinde und den Geschlechtsdrüsen (Hanukoglu, I., 1992a).

Aus Abbildung 2.5.6-1 geht hervor, daß neben den Cytochrom P450 Enzymen auch Steroid Oxydoreduktasen an der Biosynthese von Steroidhormonen beteiligt sind.

P450_{SCC}-Enzyme System

P450_{SCC} ist ein integrales mitochondriales Protein, daß auf der Matrix Seite der inneren Mitochondrienmembran der Nebennierenrinde lokalisiert ist (Churchill, P.F. *et al.*, 1978a). Das Enzym katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese von Steroidhormonen (Jefcoate, C.R. *et al.*, 1992). Cholesterol wird in drei aufeinanderfolgenden Hydroxylierungen in Pregnenolon umgewandelt. Zuerst erfolgen die Hydroxylierungen in den Positionen C-22 und C-20 der Cholesterolseitenkette und dann folgt der Bruch der Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung zwischen C-20 und C-22, wobei Pregnenolon und Isocaproaldehyd entstehen (siehe Abbildung 2.5.6-2) (Takemori, S. *et al.*, 1975).

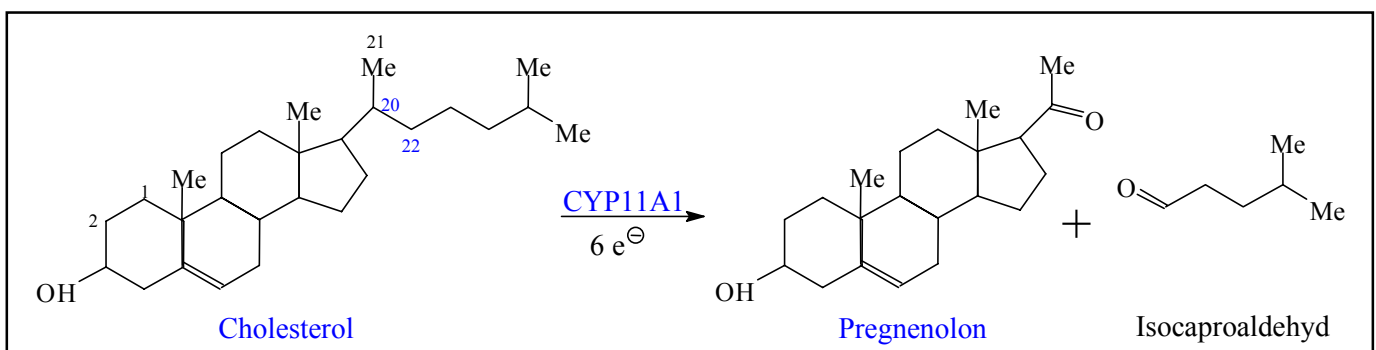


Abbildung 2.5.6-2: P450_{SCC} katalysierte Seitenkettenspaltung von Cholesterol.

Die Reaktion erfordert drei Moleküle NADPH und O₂ (Hume, R. *et al.*, 1978), wobei die Gleichgewichtskonzentrationen der freien hydroxylierten Zwischenverbindungen sehr gering sind (Burstein, S. *et al.*, 1975). Die hydroxylierten Zwischenverbindungen binden fest an das Enzym und zeigen keine signifikante Dissoziation. Dagegen ist die Dissoziationskonstante des Endproduktes Pregnenolon 40 bis 600 mal höher und ermöglicht so dessen Ablösung vom Enzym (Orme-Johnson, N.R., 1990). Wie schon in Kapitel 2.5.3 dargestellt wurde, werden die Elektronen von NADPH über Adrenodoxin Reduktase (AR) und Adrenodoxin (ADX) zum Cytochrom P450_{SCC} transportiert.

In starken Detergentien hat P450_{SCC} ein Molekulargewicht von 48000, nimmt aber in wässriger Umgebung oligomere Strukturen (n=4-8 oder 16) an (Shikita, M. *et al.*, 1973). Die hydrophile Domäne des Enzyms trägt die Häm-Bindungssequenz und die Adrenodoxin Bindungsstelle, die parallel zur Membranoberfläche zur wässrigen Umgebung hin exponiert ist (Seybert, D.W. *et al.*, 1979). Die Komplexbindung zwischen ADX und P450_{SCC} beinhaltet wahrscheinlich eine Wechselwirkung zwischen Carboxylgruppen von Adrenodoxin und positiv geladenen Regionen von P450_{SCC} (Lys-377, Lys-381 und Arg-385) (Tsukabi, M. *et al.*, 1989). Die Cholesterol Bindungsstelle liegt in der hydrophobe Membran, in der das Substrat "gelöst" ist (Seybert, D.W.

et al., 1979). ADX selber ist ein 12 kDa großes peripheres Membranprotein (Lambeth, J.D. *et al.*, 1982), wobei die Adrenodoxin Reduktase teilweise in die Phospholipidmembran eingebettet ist.

P450_{SCC} wird in allen drei Zonen der Nebennierenrinde exprimiert: in Testikeln, den Eierstöcken und den Zellen des Follikelepithels (Mitani, F. *et al.*, 1982). Auf niedrigem Niveau wird P450_{SCC} auch im Gehirn produziert (Akwa, Y. *et al.*, 1991).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die enzymatische Modifizierung von Phosphatidylcholinen als Komponenten für synthetische Membranen. Bei physiologischen Temperaturen befinden sich natürliche Membranen im fluiden Zustand, was bei der Wahl der Phospholipide berücksichtigt werden muß. In natürlichen Membranen wird die Fluidität auch durch die Art der Fettsäureketten ihrer Lipidmoleküle geregelt. Je ungesättigter oder verzweigter die Fettsäureketten, desto niedriger ist der T_m -Wert der Lipide (Kotyk, A. *et al.*, 1977). Daraus ergibt sich eine höhere Fluidität für die Membran. Ungesättigte Fettsäuren sind jedoch sehr oxidationsempfindlich, was die Membranstabilität gefährdet. Eine gezielte chemische Modifizierung der Phospholipid-Kohlenwasserstoffketten ist deshalb für eine technische Anwendung erforderlich, da die Rekonstitution von Proteinen nur oberhalb T_m erfolgreich verläuft. Zum Beispiel liegt der T_m -Wert einer DSPC-Membran bei 56,0 °C. 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (PC14) und 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (PC4) besitzen einen T_m -Wert von 23,2 °C und waren somit für eine Rekonstitution von Membranproteinen (Rürup, J., 1994) geeignet. Eine Synthese der entsprechenden Phospholipide mit modifizierter Kopfgruppe erschien deshalb bedeutsam.

Das Ziel der Arbeit war, ausgehend von PC14 und PC4 einen „Baukasten“ aus acetylenischen Lipiden als Matrixmoleküle für eine künstliche Membran herzustellen. Dies sollte durch Kopfgruppenaustausch oder Transphosphatidylierung mit Phospholipase D und den Nucleophilen Glycerin, Ethanolamin, L-Serin und Wasser erreicht werden.

Gegenstand der anschließenden physikochemischen Untersuchung war, den Einfluß der Variationen im hydrophilen (veränderte Kopfgruppe) und hydrophoben Molekülbereich (Position der Dreifachbindung) auf die Eigenschaften der Lipide zu ermitteln. Um die Phasen- und Struktureigenschaften der synthetisierten Verbindungen festzustellen, wurden kalorimetrische, FT-IR-spektroskopische und röntgenographische Untersuchungen durchgeführt. Nach der Charakterisierung der synthetisierten Lipide kann ihr Einfluß auf die Aktivität des Membranproteins P450_{SCC} aus Rind untersucht werden. Die Aktivität dieses Enzyms wird maßgeblich durch die Lipidmembran, in die es eingebettet ist, bestimmt (Lambeth, J.D. *et al.*, 1979). Dabei ist wichtig, eine geeignete Methode zur Liposomenpreparation zu entwickeln.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Chemoenzymatische Synthesen der Phospholipide

3.1.1 Allgemeines

Die Modifizierung der polaren Kopfgruppen von natürlichen oder synthetischen Phospholipiden durch Phospholipase D ist die mit am häufigsten angewandte enzymatische Methode in der Synthese von modifizierten Phospholipiden (Kovatchev, S. *et al.*, 1978). Phospholipase D (EC 3.1.4.4) hydrolysiert L- α -Phosphatidylcholine zu Phosphatidsäure und Cholin und in der Anwesenheit eines Alkohols (Nukleophils) entsteht ein neues Phospholipid mit modifizierter Kopfgruppe.

Die isomerenreinen 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phospholipide (**1b-1e**, **2b-2e**) wurden durch Transphosphatidylierung mit den Nukleophilen Wasser, Ethanolamin (**4**), Glycerin (**5**) und L-Serin (**6**) mit den Substraten 1,2-Di-(Octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**1a**) und 1,2-Di-(Octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**2a**) synthetisiert.

Abbildung 3.1.1-1 zeigt die chemisch-enzymatische Synthese der acetylenischen Phospholipide.

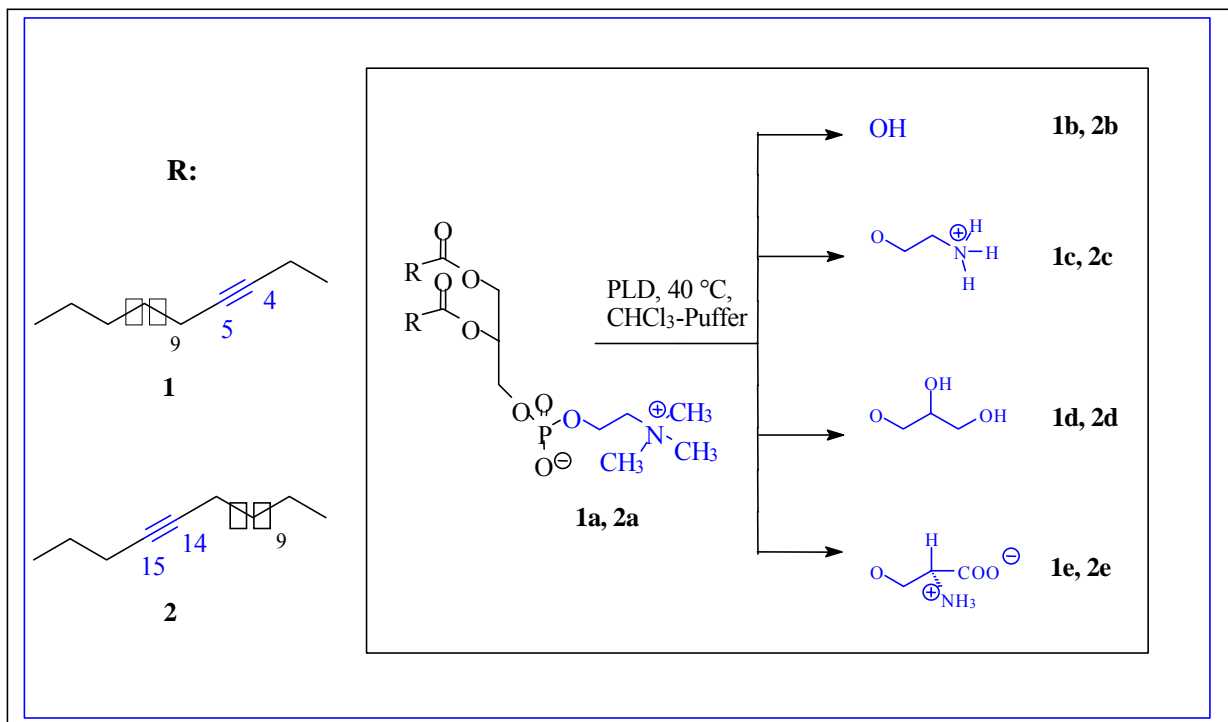


Abbildung 3.1.1-1: Transphosphatidylierung mit Phospholipase D.

Die Darstellung von (1a) und (2a) erfolgte nach (Rürup, J. *et al.*, 1994). Dabei wurde der chirale Synthesebaustein *sn*-Glycero-phosphocholin (GPC) (3) in einer Alkoholysereaktion mit dem entsprechenden acetylenischen Fettsäureimidazolid umgesetzt. Die Alkoholysereaktion und die Aktivierung der Fettsäuren (1, 2) mit Imidazol erfolgten im Gegensatz zu (Rürup, J. *et al.*, 1994) in Dichlormethan als Lösungsmittel. Abbildung 3.1.1-2 zeigt die Synthese der acetylenischen Phosphatidylcholine. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte entgegen (Rürup, J. *et al.*, 1994) ausschließlich durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton : Chloroform (9:1). Dadurch konnten die Ausbeuten von 44 % auf bis zu 98 % gesteigert werden.

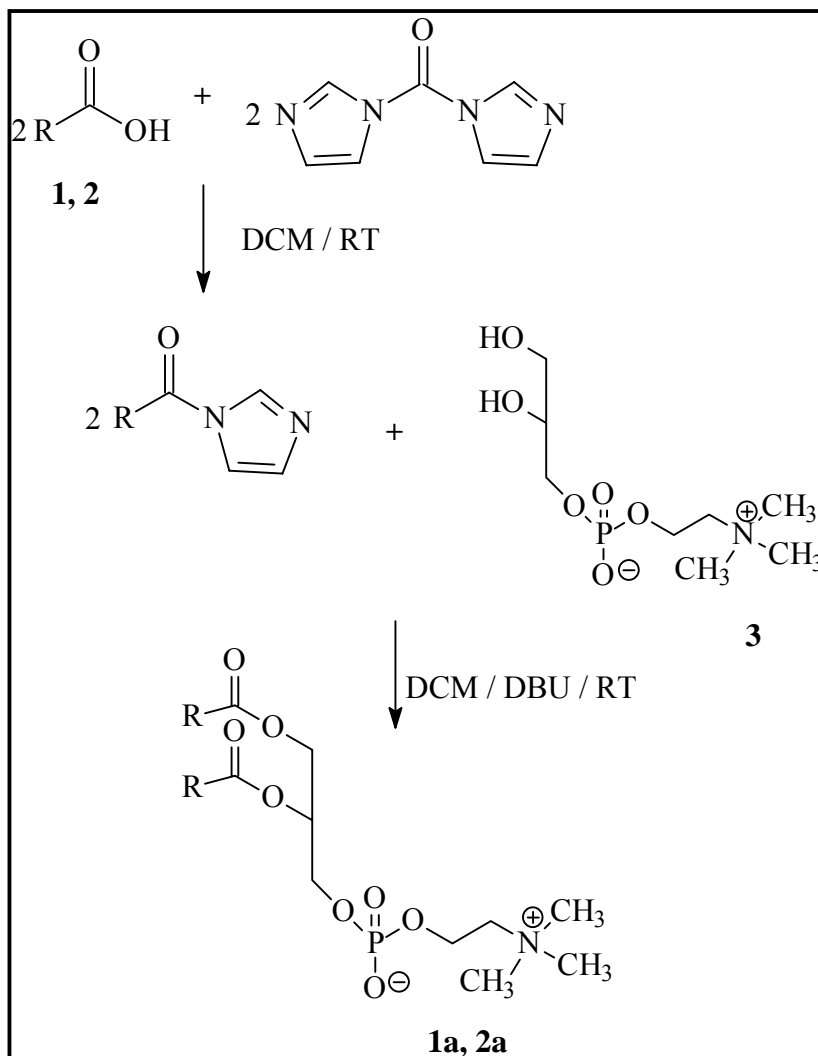


Abbildung 3.1.1-2: Acylierung von GPC (3) mit Fettsäureimidazolid in Dichlormethan.

3.1.2 Optimierung des Reaktionssystems für die quantitative Synthese der acetylenischen Phospholipide durch Transphosphatidylierung mit Phospholipase D

Während der Diplomarbeit (Pisch, S. *et al.*, 1997) wurde das Reaktionssystem für die Transphosphatidylierung anhand von Substrat (**2a**) optimiert.

Die Reaktionsbedingungen dieser Optimierungsversuche im Minimaßstab wurden auf eine quantitative Synthese der Phospholipide übertragen und angepaßt.

Für die präparative Synthese wurde Phospholipase D aus *Streptomyces antibioticus* verwendet. Nach einer Reaktionsdauer von 1 Std erhielt man 99 % Umsatz der Phosphatidylcholone (**1a**, **2a**) zu den entsprechenden Phospholipiden PX (**1b-1e**, **2b-2e**) mit 100 % Selektivität.

Es ist jedoch möglich, daß bei darüber hinausgehenden Reaktionszeiten eine Hydrolyse des bereits gebildeten Produkts auftreten kann und die Selektivität der Reaktion sinkt. Die Ausbeuten von 74-91 % resultierten aus Substanzverlusten während der Extraktion der Rohprodukte und Verluste bei der Reinigung über präparative HPLC.

Die Reaktion wurde in einem System aus Wasser und einem darin unlöslichen Lösungsmittel (Zweiphasensystem) durchgeführt. Die wäßrige Phase bestand aus 0,1M Natriumacetat-0,1 M Calciumchlorid-Puffer. Untersuchungen bezüglich dem Einfluß des pH-Werts ergaben einen optimalen Umsatz des Substrats bei pH 5,6 und einen deutlichen Umsatzrückgang bei pH 6,5 (Juneja, L.R. *et al.*, 1989).

Die Art des Lösungsmittels beeinflußt die Enzymstabilität und Transphosphatidylierungsrate von Phospholipase D (Juneja, L.R. *et al.*, 1988; Takami, M. *et al.*, 1994; Yamamoto, I. *et al.*, 1995). Es wurden Chloroform, Diethylether und Ethylacetat als Lösungsmittel getestet und nach 60 min wurde in allen Systemen ein quantitativer Umsatz detektiert. Diese Lösungsmittel beeinflussen die Enzymstabilität und die Transphosphatidylierungsrate positiv. Da es bei präparativen Synthesen von Vorteil ist, eine möglichst große Menge Substrat umzusetzen, wurden die Synthesen in Chloroform als organische Phase durchgeführt, da in diesem System die Löslichkeit des Substrats am höchsten war.

Das Verhältnis von Lösungsmittel und wäßriger Phase spielt in Transphosphatidylierungsreaktionen eine kritische Rolle. Zu hohe Konzentrationen des Lösungsmittels können zu einer Inaktivierung des Enzyms führen (Sale, M.F.O. *et al.*, 1989).

Wurde der Anteil der Chloroform Phase im Verhältnis zur wäßrigen Phase von 1:1,5 auf 1:1 erhöht, wurde ein starker Rückgang des Substratumsatzes festgestellt.

Für die quantitative Darstellung der Phospholipide wurde die Reaktion somit in einer Chloroform-Wasser Suspension im Verhältnis 1:1.5 durchgeführt.

Die Transphosphatidylierungsrate ist eine Funktion der Konzentration des Nukleophils. Mit zunehmender Konzentration des Nukleophils steigt die Transphosphatidylierungsrate an, bis es zu einer Inhibierung der Reaktion kommt (Juneja, L.R. *et al.*, 1987; Juneja, L.R. *et al.*, 1988; Juneja, L.R. *et al.*, 1989). Im Fall der hier beschriebenen Reaktionssysteme konnte bis zu einem Nukleophilgehalt von 30 % (w/v bezogen auf die wäßrige Phase) keine Inhibierung der Reaktion festgestellt werden. Für eine quantitative Umsetzung wurde eine Konzentration des Nukleophils von 20 % gewählt, da hier die Anfangreaktionsgeschwindigkeiten am höchsten waren (Pisch, S. *et al.*, 1997).

Für präparative Synthesen ist der Einsatz von möglichst hohen Phospholipidkonzentrationen wünschenswert. Zu hohe Substratkonzentrationen können eine Inhibierung des Enzyms bewirken (Juneja, L.R. *et al.*, 1987). Bis zu einer Substratkonzentration von 10 gl^{-1} konnte kein Umsatzrückgang detektiert werden, doch es ergab sich eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit. Deswegen wurde bei der präparativen Synthese mit einer Substratkonzentration von 8,3 gl^{-1} gearbeitet.

Je nach Ursprung der Phospholipase D und Art des Substrats werden unterschiedliche Temperaturen für die Transphosphatidylierung bevorzugt. Bei einer ungünstig gewählten Temperatur kann es zu einer Hydrolyse des Produkts, zu einem geringeren Umsatz des Substrats oder zu einer Inaktivierung des Enzyms D kommen.

Für die präparative Synthese wurde eine Reaktionstemperatur von 40 °C gewählt, da sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei 30 °C verringerte. Höhere Temperaturen wurden nicht getestet, da aus der Literatur bekannt ist, daß dies zu einer Inaktivierung der Phospholipase D führen kann (Juneja, L.R. *et al.*, 1988; Juneja, L.R. *et al.*, 1989; Sale, M.F.O. *et al.*, 1989).

3.1.3 Isolierung und Reinigung der Rohprodukte

Die Rohprodukte wurden aus der Reaktionslösung durch Abtrennen der organischen Phase und Extraktion der wäßrigen Phase mit Chloroform isoliert. Hierbei war es wichtig, die vereinigten organischen Phasen nicht nur mit Wasser zu waschen, sondern zugleich die in der Pufferlösung enthaltenen Calcium-Ionen zu entfernen, die an die Kopfgruppen der anionischen Phospholipide binden. Dies ist ein wichtiger Schritt, da die Phospholipide, deren Kopfgruppen durch Calcium-

Ionen komplexiert sind, veränderte physikochemische Eigenschaften zeigen (siehe Kapitel 2.2). Die Extraktion der Calcium-Ionen konnte durch eine 0,1 M EDTA-Lösung erreicht werden. Nach diesem Schritt war es wichtig, die organische Phase wiederum mit Wasser zu waschen, um die letzten Spuren EDTA zu entfernen, die ebenfalls zu veränderten physikochemischen Eigenschaften führen würden. Die An- bzw. Abwesenheit von Calcium-Ionen sowie von EDTA-Molekülen wurde durch DSC-Messungen deutlich.

Die Phospholipide wurden anschließend mittels HPLC über unmodifiziertes Nucleosil gereinigt. Die Trennung erfolgte mit einem linear ansteigenden Gradienten von 99% Lösungsmittel A (Isopropanol:n-Hexan = 4:3) zu 100 % Lösungsmittel B (Isopropanol:n-Hexan:Wasser = 8:6:1,5) in 20 min mit einer Flußrate von 20 ml min⁻¹. Die Probenmenge je Lauf betrug 500 µl einer Chloroform-Lösung von 400 mg Rohprodukt.

Auf der Säule fand zu einem geringen Anteil (< 10 %) eine Hydrolyse des Produkts in Phosphatidsäure statt.

3.1.4 Analytik der acetylenischen Phospholipide

Dünnschichtchromatographie

Eine schnelle und allgemein anerkannte Methode zur Reinheitsbestimmung und Identifizierung von Phospholipiden stellt die Dünnschichtchromatographie dar. Im Falle einer reinen Verbindung erhält man einen einzigen, definierten Fleck. Phospholipide, die durch Oxidation degradiert wurden, ergeben dagegen einen Schmier, mit einem „Tailing“ bis zum Ursprung. Außerdem ergeben synthetische Phospholipide kleinere und enger abgegrenzte Flecke als Phospholipide aus natürlichen Quellen. Als mobile Phase wurde eine Lösung aus Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) verwendet. Bei der Verwendung eines säurefreien Laufmittels werden die Phospholipide entsprechend der Natur ihrer Kopfgruppen getrennt (siehe Tabelle 3.1.4-1). Anschließend wurden die Phospholipide durch Besprühen mit einer Phosphormolybdänsäurelösung visualisiert.

Phospholipid	PA 1b, 2b	PC 1a, 2a	PE 1c, 2c	PG 1d, 2d	PS 1e, 2e
Octadec-4-insäure R_f [min⁻¹]	0,51	0,23	0,48	0,39	0,25
Octadec-14-insäure R_f [min⁻¹]	0,49	0,21	0,46	0,37	0,23

Tabelle 3.1.4-1: R_f-werte der acetylenischen Phospholipide.

Analytische HPLC

Zur analytischen Trennung der acetylenischen Phospholipide wurde wie bei der präparativen HPLC mit einer unmodifizierten Kieselgel-Säule (Nukleosil) gearbeitet. Die Trennung erfolgte mit einem linear ansteigenden Gradienten von 99% Lösungsmittel A (Isopropanol:n-Hexan = 4:3) zu 100 % Lösungsmittel B (Isopropanol:n-Hexan:Wasser = 8:6:1,5) in 20 min mit einer Flußrate von 1 ml min⁻¹. Das verwendete Phasensystem führte zu längeren Retentionszeiten mit Zunahme des polaren Charakters der Kopfgruppe. Im Gegensatz zu einer Reversed Phase ODS wirkte (Rürup, J., 1994) sich die Position der Dreifachbindung bzw. die Polarität der Acylketten nur in sehr geringem Maße auf die Retentionszeit aus (siehe Tabelle 3.1.4-2).

Phospholipid	PA 1b, 2b	PC 1a, 2a	PE 1c, 2c	PG 1d, 2d	PS 1e, 2e
Octadec-4-insäure-PL R_t [min⁻¹]	13,5	31,7	15,1	17,1	20,1
Octadec-14-insäure-PL R_t [min⁻¹]	13,1	31,5	15,0	16,9	19,1

Tabelle 3.1.4-2: Retentionszeiten R_t der acetylenischen Phospholipide gemessen durch Analytische HPLC.

Als Lipid-Standards wurden DSPC, DSPE, DPPA, PS aus Schweinehirn und PG aus Eigelb eingesetzt.

3.1.5 Kernresonanzspektroskopie NMR

Charakteristisch für alle ^1H -NMR-Spektren der Phospholipide waren die Protonen des Glycerin-Grundgerüsts. Die Spektren der Lipide wurden mit den Ergebnissen von (Lammers, J.G. *et al.*, 1978; Rürup, J. *et al.*, 1994) und (Basti, M.M. *et al.*, 1990) verglichen. Es konnte gezeigt werden, daß keine Hydrolyse zum Lyso-Phospholipid stattgefunden hatte. So erschien das Glycerin C2-H in allen Proben bei $\delta = 5,05\text{-}5,25$ ppm. Das Lyso-DSPC zeigte nach (Lammers, J.G. *et al.*, 1978) hingegen ein Signal des C2-Protons bei $\delta = 3,61$ ppm. Zudem erschienen die Signale des Glycerin-C1-H_b bei $\delta = 4,05\text{-}4,2$ ppm als Multiplett und des Glycerin-C1-H_a bei $\delta = 4,3\text{-}4,41$ ppm als Dublett eines Dubletts. Das Signal für die Glycerin-C1-Protonen für das Lyso-DSPC lag nach (Lammers, J.G. *et al.*, 1978) hingegen bei $\delta = 4,04$ ppm.

Weiterhin konnte anhand der Spektren gezeigt werden, daß keine Oxidation der Dreifachbindung zu Epoxiden oder Hydroxyderivaten stattgefunden hatte. So enthielten die Spektren keine charakteristischen Signale der Epoxygruppe, die nach (Kannan, R. *et al.*, 1974) bei $\delta = 2,52\text{-}2,75$ ppm lagen. Auch Signale der Hydroxygruppe bei $\delta = 3,1$ ppm und der Ketogruppe bei $\delta = 2,3$ ppm (Triplett) waren nicht vorhanden.

3.1.6 Diskussion- Synthese der (1,2)-Diacyl-phospholipide

Das 1,2-Diacylphosphatidylcholin der isomeren Octadec-4-insäure und Octadec-14-insäure als Substrat für die Transphosphatidylierung mit Phospholipase D ist zwar nach (Rürup, J. *et al.*, 1994) durch eine einfache, chemische Methode zugänglich. Hier konnten die Ausbeuten jedoch durch Verwendung von Dichlormethan als Lösungsmittel und durch eine Reinigung des Rohproduktes durch mehrmaliges Umkristallisieren ohne eine Anwendung der präparativen HPLC um über 140 % von 40 % auf bis zu 98 % gesteigert werden.

Die während der Diplomarbeit (Pisch, S. *et al.*, 1997) durchgeführte Optimierung des Reaktionssystems für die Transphosphatidylierung im Minimaßstab bildete nach einer Anpassung der Parameter die Grundlage für die Synthese der Phospholipide im präparativen Maßstab. Durch optimale Reaktionsbedingungen gelang die chemisch-enzymatische Darstellung der acetylenischen Phospholipide PX (**1b-1e**, **2b-2e**) mit variierten Kopfgruppen in sehr guten Ausbeuten zwischen 74 % und 91 %.

Hohe Ausbeuten der neuen Lipide PX hängen von verschiedenen Faktoren des Reaktionssystems (Temperatur, Substrat, Lösungsmittel, pH, Verhältnis Puffer/organische Phase) ab. Die acetylenischen Phosphocholine (**1a**, **2a**) haben sich bei der Transphosphatidylierung mit Phospholipase D aus *Streptomyces antibioticus* als geeignete Substrate herausgestellt, da sie zu 100 % umgesetzt wurden. Die Substratkonzentration von $8,3\text{ gl}^{-1}$ wurde hier so gewählt, daß die

Reaktionsgeschwindigkeit nicht negativ beeinflusst wurde. Nach (Juneja, L.R. *et al.*, 1987) erfolgte bei der Synthese von PG aus PC eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit ab einer Substratkonzentration von 15 g l^{-1} . Bei ansteigenden PC Konzentrationen trat eine Inhibierung der Reaktion auf.

Die Selektivität der Transphosphatidylierungsreaktion ist eine Funktion des Nukleophils und dessen Konzentration im wässrigen Medium, wenn es wasserlöslich ist. Das PX/PA Verhältnis kann also als Indikator für eine relative Affinität der zwei konkurrierenden Nukleophile X und Wasser für den intermediären Enzym-Substrat Komplex angesehen werden. So berichtete zum Beispiel Juneja (Juneja, L.R. *et al.*, 1987), daß man PG ohne Nebenproduktbildung von PA durch den Einsatz einer 30 % igen Lösung von Glycerin unter Verwendung von PLD aus Weißkohl erhielt. Im Gegensatz dazu berichten (D'Arrigo, P. *et al.*, 1996) von der Umsetzung von PC aus Soja mit PLD aus *Streptomyces sp.* in einer Emulsion mit 9,2 % Glycerin und erreichten damit eine Selektivität von ca. 85 %.

Unter Verwendung von PLD aus *Streptomyces sp.* erzielten (Juneja, L.R. *et al.*, 1989) und (D'Arrigo, P. *et al.*, 1996) jedoch unterschiedliche Selektivitäten für die Transformation von PC zu PS. Während (Juneja, L.R. *et al.*, 1989) mit einer 35,7 % igen Nukleophilkonzentration arbeitete und eine Selektivität von 100 % verwirklichte, erzielte (D'Arrigo, P. *et al.*, 1996) mit einer Nukleophilkonzentration nur eine Selektivität von 55 % (bei 98 % Umsatz). In dieser Arbeit konnten die acetylenischen Phosphocholine (**1a**, **2a**) aber bei einer Nukleophilkonzentration von 20 % zu den entsprechenden Phospholipden PA, PE, PS und PG mit einer Selektivität von 100 % umgesetzt werden.

3.2 Physikochemische Charakterisierung der Phospholipide - Kalorimetrie (DSC)- FT-IR-Spektroskopie und Röntgenbeugung

3.2.1 Vorbemerkungen

Eine bedeutsame Strukturmodifikation ist die Einbringung einer oder mehrerer Doppel- oder Dreifachbindungen in die Kohlenwasserstoffketten von Lipiden, da die Anzahl von ungesättigten Gruppen eine bedeutsame Rolle für die Fluidität der Membran spielt (Cevec, G., 1991).

Das thermotrope Verhalten von gesättigten Phosphatidylcholin-Wasser-Systemen ist heute weitgehend beschrieben: sie existieren in vier charakteristischen lamellaren Phasen und mit sinkender Temperatur treten diese in folgender Sequenz auf:

1. Kalorimetrisch findet man eine Hauptumwandlung, die als Phasenübergang $P_{\beta} (P_{\beta'}) \rightarrow L_{\alpha}$ von geordneten Kohlenwasserstoffketten mit *all-trans* Konfiguration in ungeordnete Kohlenwasserstoffketten mit hohem Anteil von *gauche*-Konformeren gedeutet wird.
2. Unterhalb der Hauptumwandlung existiert eine Vorumwandlung, bei der ein Übergang von $L_{\beta} (L_{\beta'}) \rightarrow P_{\beta} (P_{\beta'})$ stattfindet. Im Gegensatz zur Hauptumwandlung, die durch das Verschwinden der lateralen, langreichweitigen Ordnungen ausgezeichnet ist, bleiben bei der Vorumwandlung diese Ordnungen erhalten.
3. Schließlich wurde zum ersten mal die Subumwandlung $L_{c'} \rightarrow L_{\beta'}$ von (Chen, S.C. *et al.*, 1980) in vollständig hydratisierten, kristallinen DPPC Doppelschichten entdeckt.

In diesem Abschnitt soll der Einfluß der Dreifachbindung in den Ketten auf Phasen- und Struktureigenschaften diskutiert werden. Hinzu kommt eine systematische Veränderung der Kopfgruppe der acetylenischen Phospholipide, so daß sich ein interessantes Zusammenspiel zwischen Strukturmodifikation im hydrophoben und hydrophilen Molekülbereich ergibt.

Um die sich daraus ergebenden Phasen- und Struktureigenschaften festzustellen, wurden drei leistungsfähige Techniken kombiniert: die Differential Scanning Calorimetry, die Fourier transform-Infrarot Spektroskopie und die Röntgenbeugung.

In den nachfolgenden Kapiteln sollen die unterschiedlichen acetylenischen Phospholipide einzeln besprochen werden, um anschließend im Kapitel 3.2.13 generelle Aussagen über die Stoffklasse der acetylenischen Phospholipide zu diskutieren. Anhand der Verbindung PC4 werden die in der FT-IR-Spektroskopie auftretenden Banden ausführlich beschrieben. Die nachfolgenden Kapitel befassen sich mit den Besonderheiten der jeweiligen Verbindung. Die

Lipide PE4, PE14 und PS4 wurden nur kalorimetrisch untersucht, da eine Hydratisierung schwierig war und von PA4 wurden nur IR-Spektren in D₂O aufgenommen.

3.2.2 Durchführung und Auswertung

Die DSC-Untersuchungen an wässrigen Dispersionen von Phospholipiden wurden mit einem adiabatischen Differential Power Scanning Mikrocalorimeter MC-2 (Microcal Corp., USA) und einem VP-DSC (Microcal Corp., USA) durchgeführt. Es wurde sowohl der T_m-Wert als auch die Enthalpieänderungen ΔH der Hauptphasenübergänge bestimmt. Dazu wurden wässrige zuvor ausgewogene Phospholipid-Dispersionen durch Ultraschallbeschallung homogenisiert und in die Probenzelle gefüllt. Es wurde in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 90 °C gemessen.

Die röntgenographischen Untersuchungen wurden an einem Horizontalzählrohrgoniometer HZG-4 (VEB Präzisionsmechanik, Freiberg, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden in einem Temperaturbereich von -40 °C bis 90°C untersucht. Es wurden die Reflexe im Kleinwinkelbereich ausgewertet, wobei der Schichtabstand d berechnet und die Überstruktur bestimmt wurde.

Aus den Reflexen im Weitwinkelbereich wurden Aussagen über die Packung der Moleküle und den Zustand der Kohlenwasserstoffketten innerhalb der Überstruktur getroffen.

FT-IR Untersuchungen wurden an einem BioRad FTS 165 Fourier transform-Infrarot Spektrometer (Biorad, Krefeld, Deutschland) aufgenommen und die Spektren mit Software von Grams (BioRad, Krefeld, Deutschland) ausgewertet. Aus charakteristischen spektralen Regionen der FT-IR Spektren wurden Einblicke in das konformationelle Verhalten und die Packung der verschiedenen Molekülbereiche der Phospholipide erhalten.

3.2.3 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-Phosphatidylcholin (1a)

Kalorimetrie

Die zu **1a** analoge Verbindung ohne Dreifachbindung in den Ketten (DSPC) zeigte eine Hauptumwandlung bei 54,8 °C. Unterhalb der Hauptumwandlung trat bei 50,6 °C eine Vorumwandlung mit geringerer Enthalpieänderung auf. Die Subumwandlung wurde nicht untersucht.

Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**1a**) ergab zwei deutlich voneinander getrennte Umwandlungen, wobei die Peakform gegenüber der Vergleichsverbindung DSPC verbreitert war (Abbildung 3.2.3-1).

Mit der Einbringung der Dreifachbindung in die Kohlenwasserstoffketten in der Nähe des Glycerins verschob sich die Hauptumwandlung zu einem niedrigerem Wert. Bei PC4 wurde als einziger der untersuchten Verbindungen eine Vorumwandlung festgestellt. Tabelle 3.2.3-1 gibt einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter.

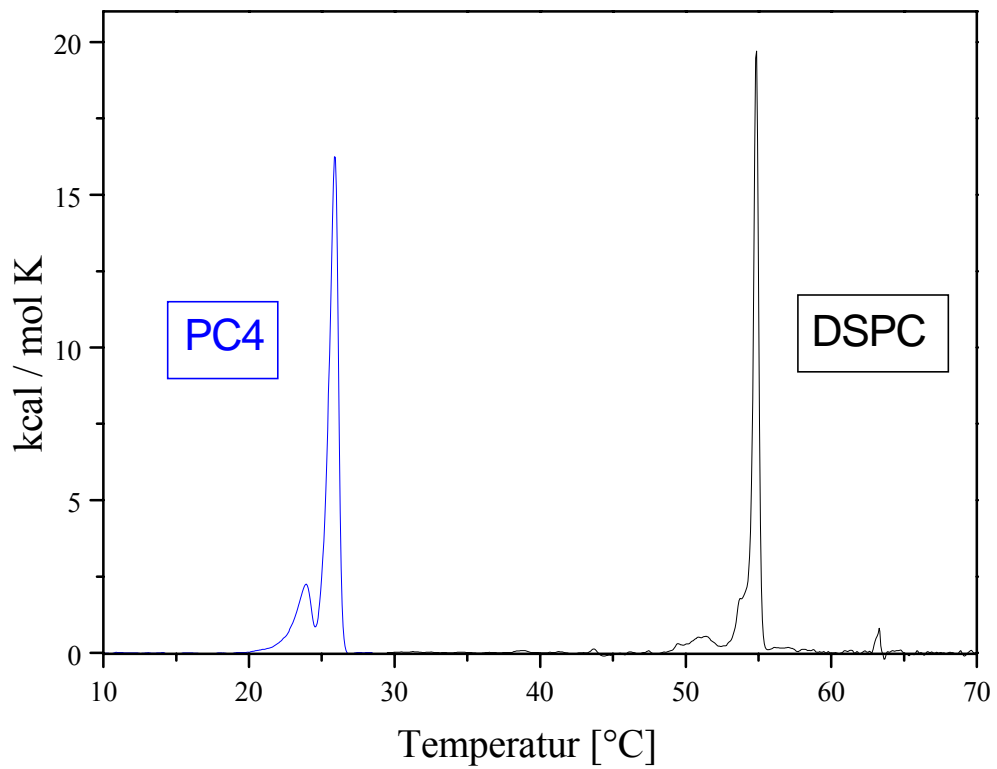


Abbildung 3.2.3-1: Normierte DSC-Aufheizkurven von PC4 und DSPC.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PC4	25,8	23,9	56,5
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.3-1: Phasenumwandlungsparameter von PC4 und DSPC.

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.3-2 und 3.2.3-3 zeigen den C-H-Streckschwingungsbereich von PC4 und der gesättigten Verbindung DSPC.

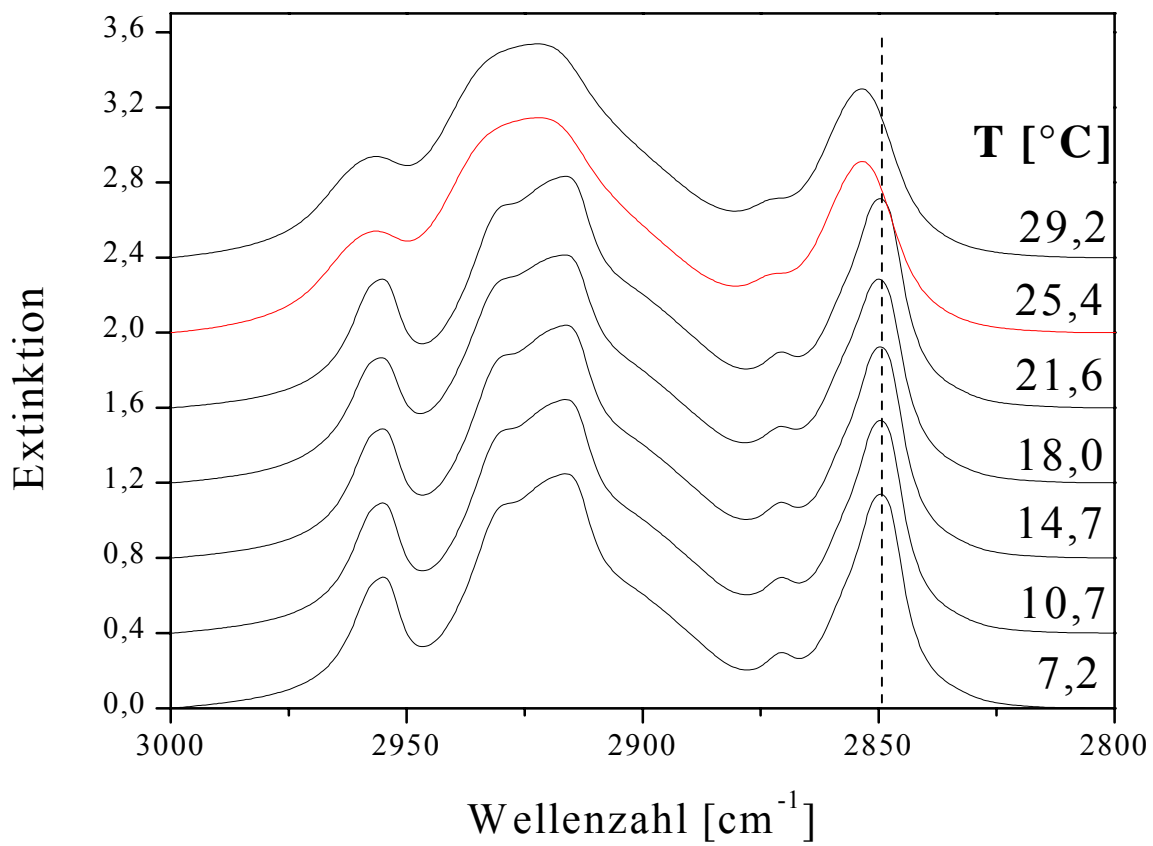


Abbildung 3.2.3-2: C-H-Streckschwingung von PC4 im Bereich der Phasenumwandlung.

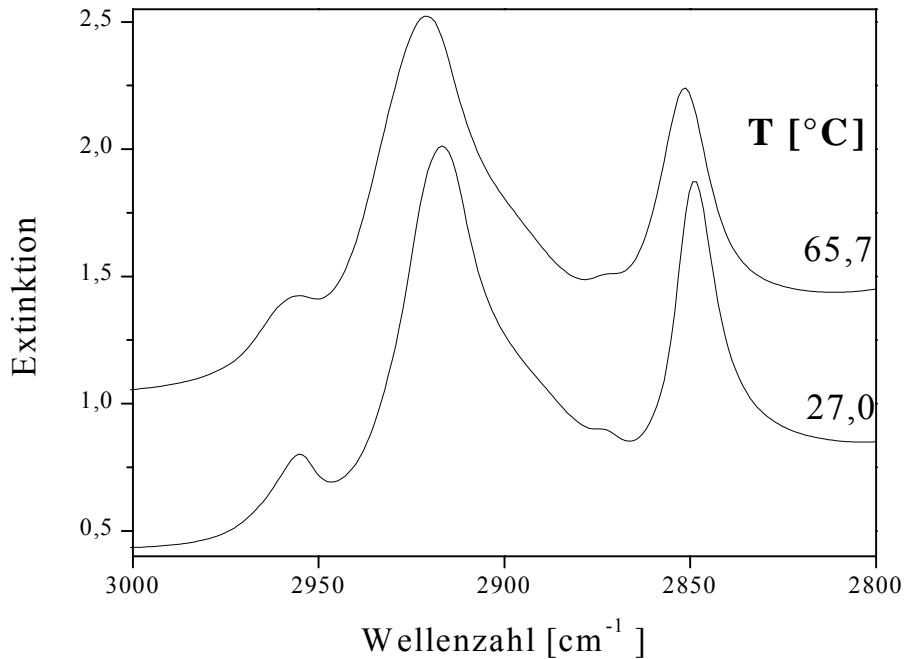


Abbildung 3.2.3-3: C-H-Streckschwingung von DSPC vor und nach der Phasenumwandlung.

Eine Phasenumwandlung der Phospholipide von der Gel- in die LC-Phase äußert sich durch eine Verschiebung der Bandenmaxima zu höheren Wellenzahlen. Gleichzeitig nimmt die Intensität der Banden ab und die Halbwertsbreite zu (siehe Kapitel 2.2.2.1).

Es ließen sich deutliche Unterschiede im Absorptionsverhalten beider Phospholipide feststellen (Abbildung 3.2.3-3). In der Gelphase zeigte DSPC das typische Verhalten gesättigter Phospholipide mit der intensiven antisymmetrischen Methylenstreckschwingung bei 2919 cm^{-1} , einer intensiven symmetrischen Methylenstreckschwingung bei 2849 cm^{-1} und der schwächeren und breiteren antisymmetrischen Methylstreckschwingung bei 2955 cm^{-1} . Bei PC4 war das Bandenmaximum der antisymmetrischen Methylenstreckschwingung ($2916,5\text{ cm}^{-1}$) zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben und die Methylstreckschwingung erschien als ungewöhnlich scharfe, intensive Bande bei 2955 cm^{-1} . Dies könnte auf eine dichte Kettenpackung hindeuten, bei der die Methylgruppen engen Kontakt haben, so daß sich die Änderung des Dipolmoments durch intermolekulare Wechselwirkungen verstärkt. Die symmetrische Methylenstreckschwingung absorbierte bei $2848,9\text{ cm}^{-1}$.

Die antisymmetrische Methylenstreckschwingung war unterhalb des Hauptphasenübergangs aufgespalten, mit einer Schulter bei 2930 cm^{-1} . Diese Aufspaltung wird wahrscheinlich durch das acetylenische Kettensegment verursacht. Es könnte eine zusätzliche CH_2 -Schwingungspopulation entstanden sein, die aus benachbarten Methylengruppen der Dreifachbindung resultiert. Eine

stärkere Aufspaltung dieser Schwingungsbande wurde bereits bei Diacetylenischen Phospholipiden beobachtet (Rudolph, A.S. *et al.*, 1987). Demzufolge müßte auch die symmetrische CH₂-Streckschwingung aufgespalten sein. Möglicherweise deutet die schwache Schulter auf der hochfrequenten Seite der ν_s -CH₂-Bande in der Tieftemperaturphase von PC4 auf dieses Verhalten hin.

Es ist wahrscheinlich, daß die Aufspaltung der antisymmetrischen Streckschwingungsbande ein konformationeller Effekt der C-H-Schwingungen und nicht eine Bande ist, die aus Fermi Resonanz Wechselwirkung mit Obertönen der Methylendeformationsschwingung resultiert, da diese aus Symmetriegründen nur Raman- aktiv sind (Snyder, R.G. *et al.*, 1982).

Abbildung 3.2.3-4 zeigt die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur für PC4 und DSPC.

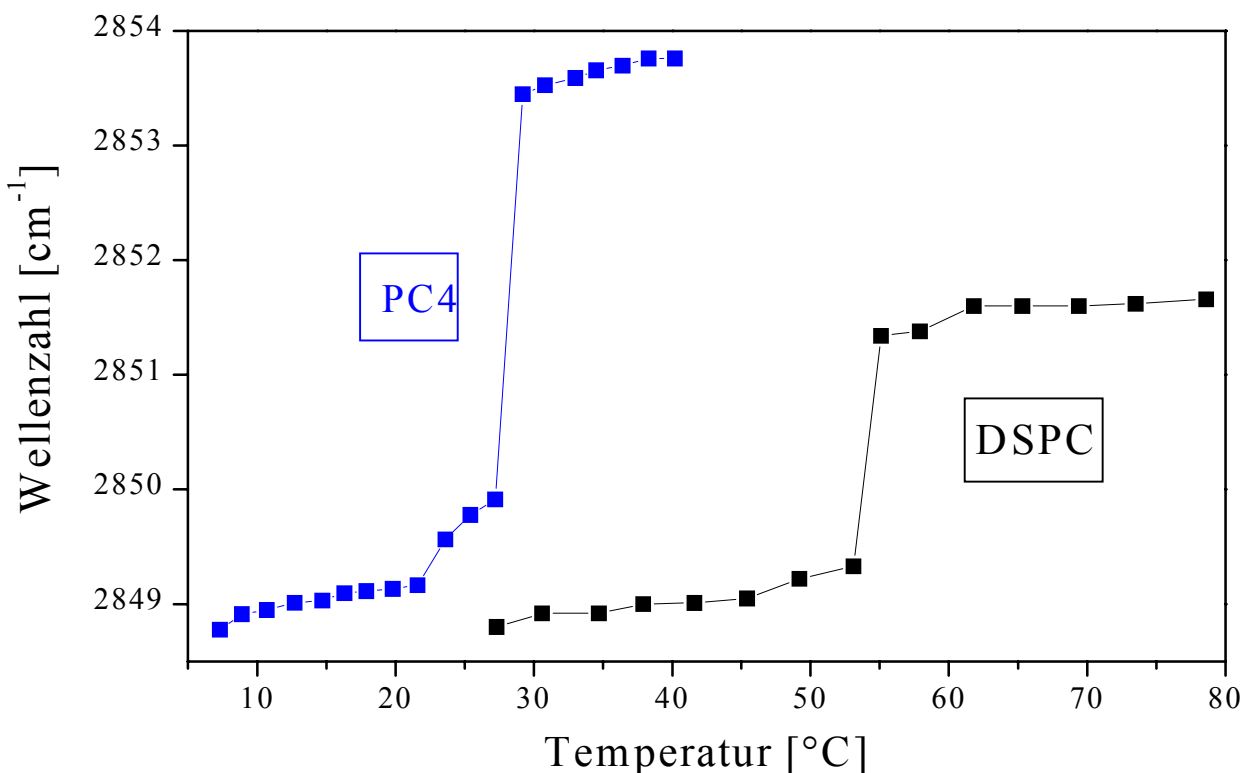


Abbildung 3.2.3-4: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PC4 und DSPC.

Die IR-spektroskopisch ermittelten Phasenumwandlungstemperaturen stimmten gut mit den kalorimetrischen Daten überein. Die Umwandlung von der Gelphase in die LC-Phase gab sich durch eine Verschiebung des Bandenmaximums bei PC4 um ca. 4 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen zu erkennen, während sich bei DSPC nur eine Verschiebung um ca. 3 cm^{-1} ergab. In der Gel- oder Subgelphase liegen die Fettsäureketten im Idealfall in einer *all-trans*-Konformation vor. In der Tieftemperaturphase verhielten sich PC4 und DSPC bezüglich der konformationellen Ordnung ihrer Fettsäureketten ähnlich. In der LC-Phase war die Lage der symmetrischen Streckschwingung von PC4 jedoch um 2 Wellenzahleinheiten zu höheren Wellenzahlen verschoben. Die Fettsäureketten von PC4 scheinen sehr viel ungeordneter zu sein als bei DSPC. Diese Beobachtung korreliert mit der um $10,4\text{ kJ/mol}$ höheren Enthalpie der Hauptphasenumwandlung von PC4 im Vergleich zu DSPC.

Im Spektralbereich von $1760\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ zeigen die Infrarotspektren von Phospholipiden starke Absorptionen, die auf Streckschwingungen ihrer Ester-Carbonyl-Gruppen zurückgeführt werden können. Die Lage und Intensität der Absorptionsbanden ist von der Konformation der Ester-Carbonyl-Gruppe abhängig. Sie reagieren auf Veränderungen der Polarität in der lokalen Umgebung und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen und Wechselwirkungen mit geeigneten Liganden beeinflusst. Eine Veränderung der Bandenkontur stellt ein Hinweis auf eine Veränderung der Struktur oder der Hydratation der polar-apolaren Grenzfläche der Membran dar (Blume, A. *et al.*, 1988).

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen den Einfluß der Dreifachbindung in PC4 im Vergleich zu DSPC auf die Hydratationsverhältnisse an der polaren-apolaren Grenzfläche der Modellmembran. Es werden jeweils Spektren beider Verbindungen oberhalb und unterhalb T_m dargestellt.

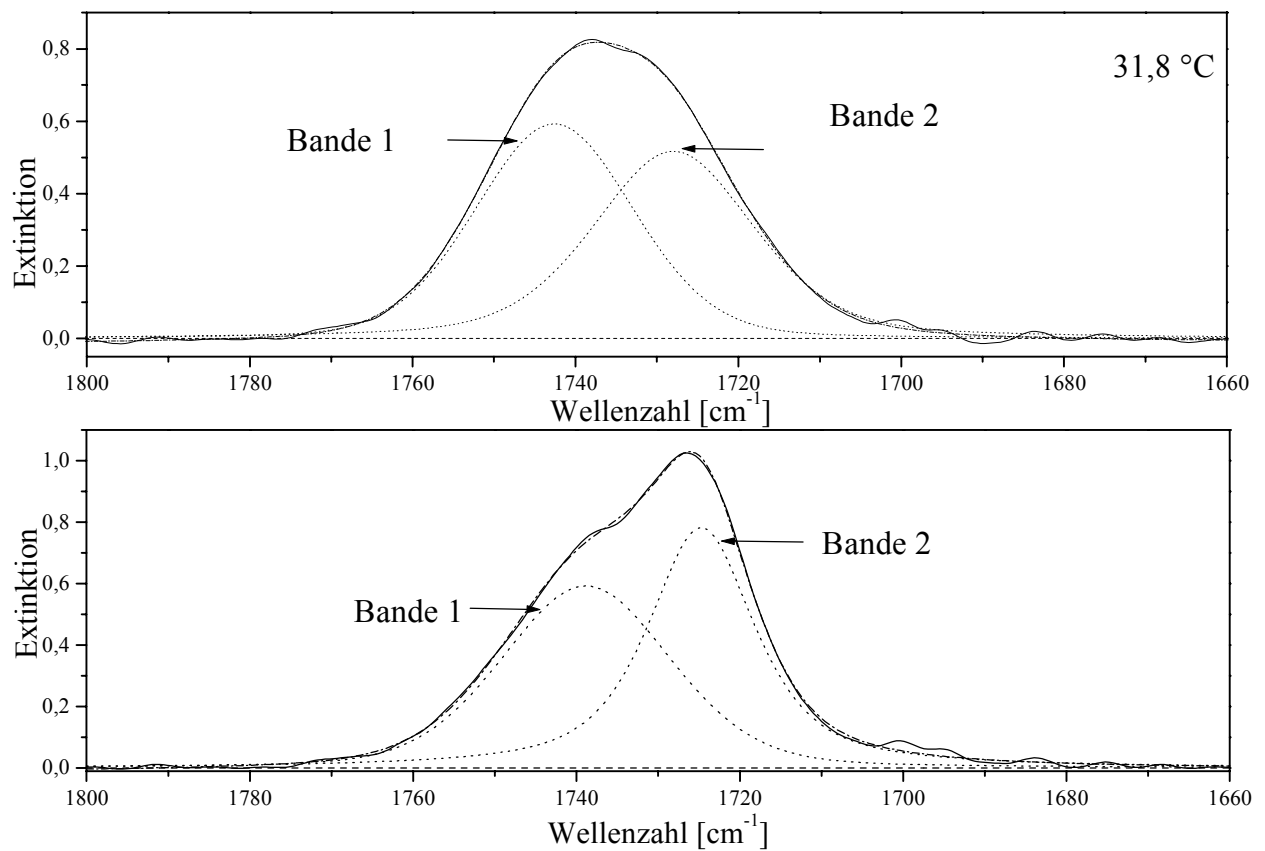


Abbildung 3.2.3-5: Carbonylbanden von PC4 oberhalb und unterhalb von T_m (25,8 °C). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

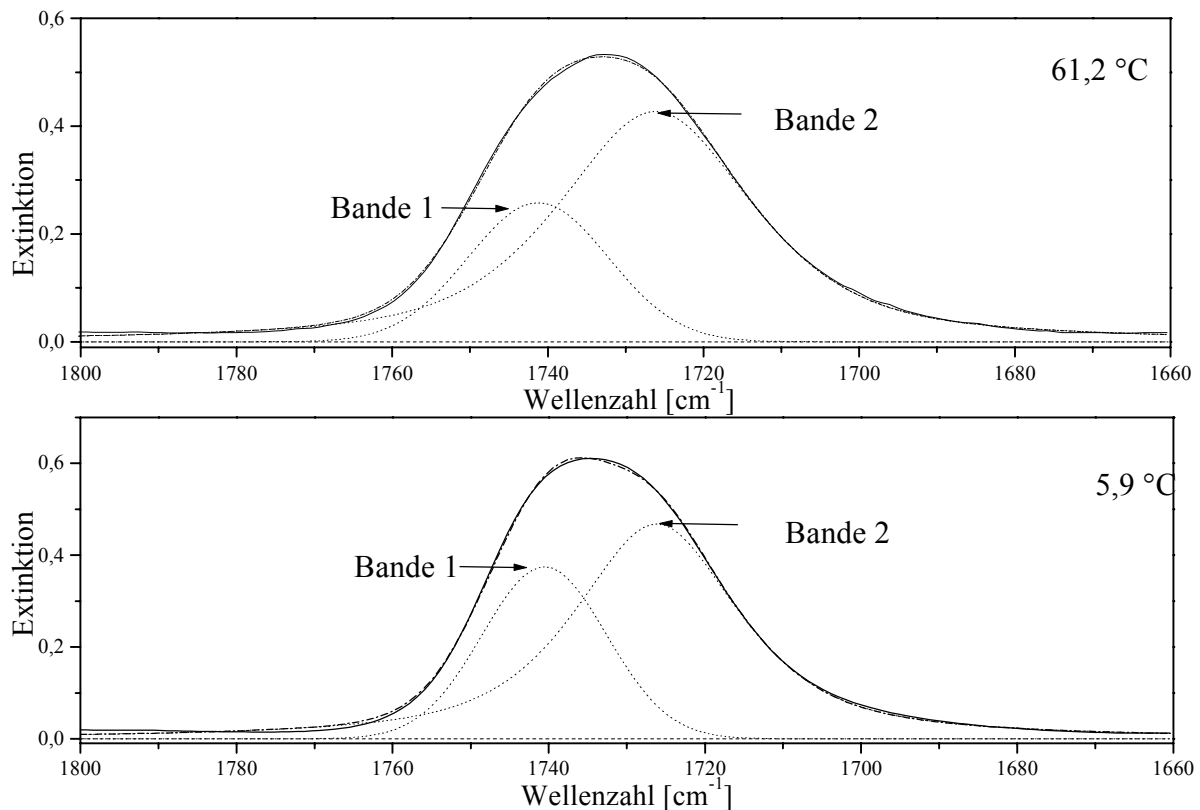


Abbildung 3.2.3-6: Carbonylbanden von DSPC oberhalb und unterhalb von T_m (54,7 °C). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Es ließen sich folgende Tendenzen feststellen.

Unterhalb des Hauptphasenübergangs trat das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve von PC4 bei 1726 cm^{-1} auf, während das von DSPC bei 1734 cm^{-1} lag. In der LC-Phase verschob sich das Bandenmaximum der Hüllkurve bei DSPC zu niedrigeren Wellenzahlen (1731 cm^{-1}) während sich bei PC4 eine Verschiebung zu höheren Wellenzahlen ergab (1738 cm^{-1}).

Die Hüllkurve ist eine Überlagerung von zwei Einzelbanden, die durch die Kombination von Gauß- und Lorenzfunktion simuliert wurde (Tuchtenhagen, J., 1994). Die simulierte Absorptionsbande bei der höchsten Wellenzahl entspricht der Absorption einer nicht hydratisierten Carbonylgruppe, Banden bei niedrigeren Wellenzahlen können qualitativ „einfach, zweifach, ...“ hydratisierten Carbonylbanden zugeordnet werden (siehe Kapitel 2.2.2.2). Bei DSPC führte die Phasenumwandlung zu einer Zunahme der integralen Intensität der

niederfrequenten Bande 2 (1726 cm^{-1}) auf Kosten der höherfrequenten Bande 1 (1740 cm^{-1}). Daraus ließ sich eine Zunahme der Hydratation an der polaren-apolaren Phasengrenzfläche erkennen.

Bei PC4 nahm die integrale Intensität der niederfrequenten Bande 2 (1728 cm^{-1}) mit dem Übergang in die LC-Phase ab, wobei die höherfrequente Bande 1 (1742 cm^{-1}) nur geringfügig intensitätsstärker war. Bei PC4 war die Bande 2 (1724 cm^{-1}) im Gegensatz zu DSPC unterhalb der Hauptphasenumwandlung relativ scharf, die Halbwertsbreite nahm mit dem Übergang in die LC-Phase zu und die Wellenzahl des Maximums verschob sich zu höheren Wellenzahlen. Diese Tatsache und die tiefe Bandenlage der Hüllkurve unterhalb T_m deutet auf die Existenz einer hochgeordneten Subgelphase hin.

Im Wellenzahlenbereich von 1500 bis 1000 cm^{-1} zeigen die IR-Spektren von Phospholipiden eine Vielzahl von Absorptionen, die sich zum großen Teil überlagern. Im spektralen Bereich von 1500 - 1200 cm^{-1} ist die Bandenzuordnung jedoch eindeutiger. Abbildungen 3.2.3-5 und 3.2.3-6 zeigen IR-Spektren von PC4 und DSPC im Wellenzahlbereich von 1500 bis 1000 cm^{-1} .

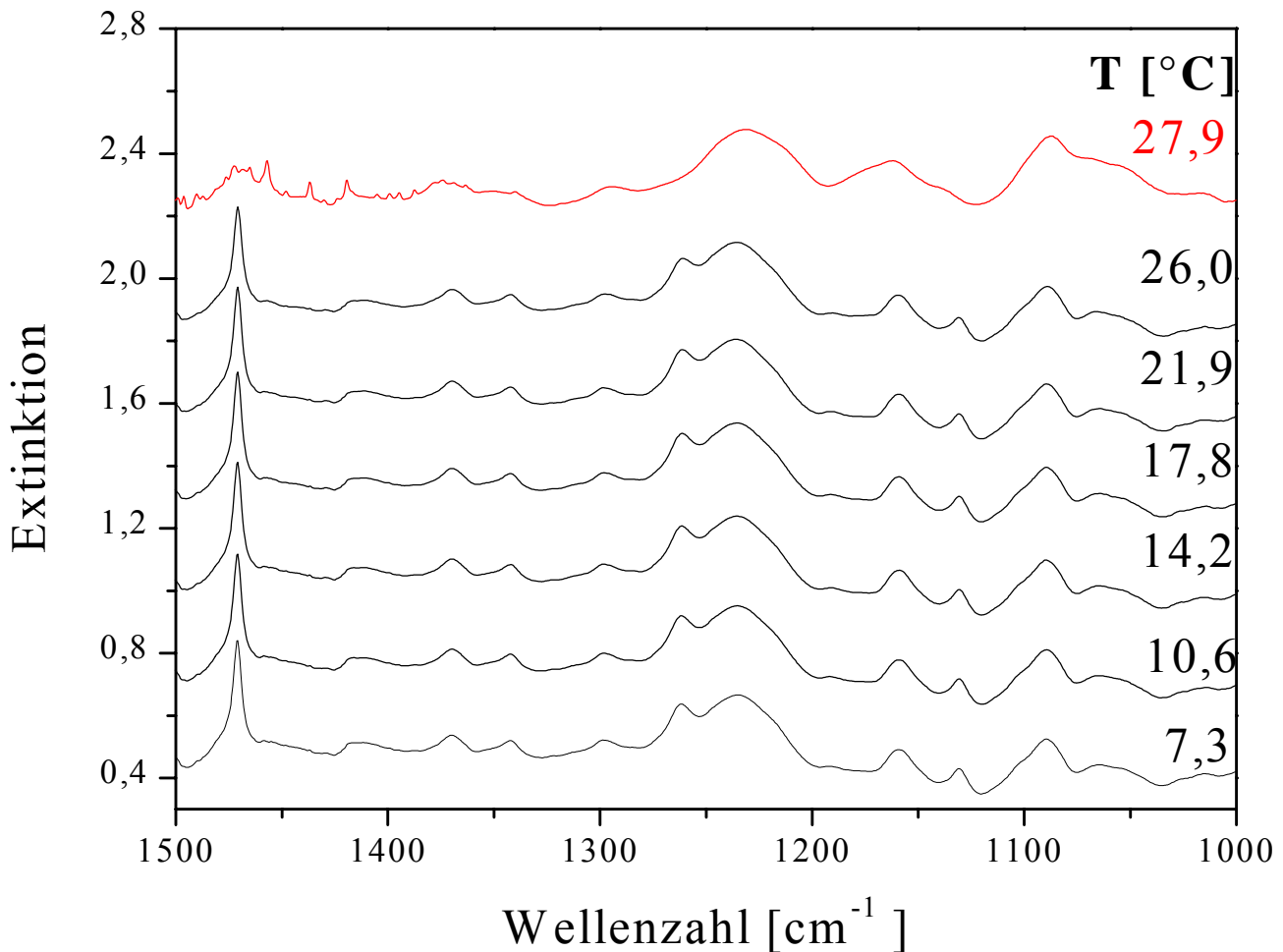


Abbildung 3.2.3-7: IR-Spektren von PC4 in 0,1 M NaCl-Lösung, pH 7 im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm^{-1} .

Bei 1470 cm^{-1} ist bei PC4 die Bande der CH₂-Scherschwungung der Fettsäureketten zu finden. Diese Bande war im Vergleich zu DSPC sehr scharf und zeigte keine Aufspaltung. Dies deutet auf eine hochgeordnete Gelphase hin mit paralleler Packung der Fettsäureketten, eine ortorhombische Kettenpackung kann ausgeschlossen werden. Auf der niederfrequenten Seite der Methylenscherschwungsbande war bei 1456 cm^{-1} eine Schulter zu erkennen. Diese stammt wahrscheinlich nicht von Schwingungen der Fettsäureketten, sondern ist Schwingungen des Glycerins zuzuordnen (Tuchtenhagen, J., 1994). Es könnte sich um Scherschwingungen der CH₂-Gruppen des Glycerinrückgrats handeln, deren Banden durch die Nähe zur polaren *sn*-1 und *sn*-2-Estergruppe verschoben sind. Der gleiche Effekt gilt für die Schwingung der zur C=O-Gruppe α -ständigen Methyleneinheit, die bei 1416 cm^{-1} absorbierte. Bei 1370 cm^{-1} ist die Bande der symmetrischen Deformationschwungung der terminalen Methylgruppen der Fettsäureketten zu beobachten. Die Bande bei 1342 cm^{-1} könnte der Methylenkippschwungung von end gauche

Konformeren zugeordnet werden (Fringeli, U.G. *et al.*, 1981) und trat auch bei DMPC als vergleichbar intensive Bande auf. Diese Absorption ist typischerweise nur oberhalb der Hauptphasenumwandlung zu sehen und verschwindet mit dem Übergang in die LC-Phase. Die relativ hohe Intensität der Bande deutet auf eine außergewöhnlich hohe Zahl von Konformeren in der Tieftemperaturphase von PC4 hin. Normalerweise schließen sich in den Spektren der Lipide in der Gelphase in diesem Bereich die Progressionen der Kippschwingungen („wagging progression“) der Fettsäureketten an. Da bei PC4 die Methylenkette am C4-Atom durch die Dreifachbindung unterbrochen ist, konnten keine Progressionsbanden beobachtet werden. Die Absorptionsbande bei 1298 cm^{-1} konnte nicht zugeordnet werden, möglicherweise handelt es sich um Absorptionen des Glycerins

Eine bei gesättigten Lipiden bisher nicht beobachtete Absorption trat bei 1262 cm^{-1} auf, die bei Temperaturen oberhalb T_m verschwand. In diesem Bereich (1270 cm^{-1}) trat auch in Spektren des diacetylenischen Phospholipids 1,2-bis-(tricoso-10,12-diynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin eine Bande auf, die nicht zugeordnet wurde. Diese Bande könnte von einer nicht hydratisierten PO_2^- -Gruppe stammen. Mit dem Übergang in die LC-Phase war sie nur noch als Schulter erkennbar (Rudolph, A.S. *et al.*, 1987). Bei hydratisierten Lipiden mit Phosphorsäurediestergruppierung wie z.B. DMPC absorbiert die PO_2^- -Gruppe bei circa $1220\text{--}1225\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$). Bei Lipiden in trockenem Zustand liegt die Bande der antisymmetrischen PO_2^- -Streckschwingung bei ca. 1260 cm^{-1} (Fringeli, U.G. *et al.*, 1981). Die symmetrische PO_2^- -Streckschwingung absorbiert bei hydratisierten Lipiden zwischen 1085 und 1075 cm^{-1} . Die Bandenlage der entsprechenden trockenen Probe ist um ca. 5 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen hin verschoben (Ter-Minassian-Saraga, L. *et al.*, 1988). Bei PC4 war die antisymmetrische PO_2^- -Schwingung bei 1234 cm^{-1} lokalisiert. Oberhalb T_m verlagerte sich dann die Bande dieser Schwingung zu niedrigeren Wellenzahlen (1230 cm^{-1}). Die Bande der symmetrischen PO_2^- -Streckschwingung war ebenfalls zu höheren Wellenzahlen hin verschoben und wurde bei 1089 cm^{-1} beobachtet. Da die Phosphatbanden eigentlich keine Temperaturabhängigkeit zeigen, sind sie wenig geeignet, zur Aufklärung des Phasenverhaltens von Phospholipiden beizutragen. Die Bandenlagen der untersuchten Verbindungen wiesen jedoch auf eine teilweise dehydratisierte Tieftemperaturphase hin (siehe Bande bei 1262 cm^{-1}), wobei mit dem Phasenübergang in die LC-Phase eine vermehrte Hydratation auftrat. Die symmetrische PO_2^- -Streckschwingung überlagert die Bande der symmetrischen CO-O-C-Streckschwingung (Ter-Minassian-Saraga, L. *et al.*, 1988). Die antisymmetrischen CO-O-C-Streckschwingung wurde bei DMPC bei 1180 cm^{-1} beobachtet, bei PC4 wurde die Schulter bei 1190 cm^{-1} dieser Schwingung zugeordnet werden. Bei PC4 absorbierten bei 1159 cm^{-1} und 1129 cm^{-1} zwei Gruppierungen, die oberhalb T_m durch

eine breite Bande bei 1162 cm^{-1} ersetzt wurden. Diese Banden traten nur in der Tieftemperaturphase auf und wurden bei DMPC und auch bei anderen acetylenischen Verbindungen nicht beobachtet (siehe nachfolgende Kapitel). Die Bande bei 1066 cm^{-1} konnte der Streckschwingungen der P-O-(C^K)- und der C^K-O-(P)-Gruppen (C^K = C^{Kopfgruppenalkohol}) zugeordnet werden. Diese Bande ist von der Natur der Kopfgruppe abhängig und bei PE wäre sie zu tieferen Wellenzahlen verschoben (Goni, F.M. *et al.*, 1986).

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Bemerkung
1468	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1456	$\delta(\text{C}^{\text{G}}\text{H}_2)$	Schulter
1418	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	
1370	$\delta_s(\text{CH}_3)$	
1342	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	eg Konformation
1298		nicht zugeordnet
1262		verschwindet $>T_m$, möglicherweise nicht hydratisierten PO_2^- -Gruppe (ν_{as})
1234	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, ungewöhnlich tief, temperaturunabhängig
1190	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$	
1159	möglicherweise Kopfgruppengitter	Maximum verschiebt sich $>T_m$, zu 1162 cm ⁻¹ verschoben
1129		verschwindet $>T_m$, möglicherweise Skelett-Vibration der $\nu(\text{C}^{\text{G}}\text{-O-(P)})$ -Gruppe
1089	$\nu_s(\text{CO-O-C})$	durch $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ überlagert
1066	$\nu(\text{P-O-(C}^{\text{K}}))$ od. $\nu(\text{C}^{\text{K}}\text{-O-(P)})$	

Tabelle 3.2.3-2: IR-Spektren von PC4 in H₂O im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm⁻¹.

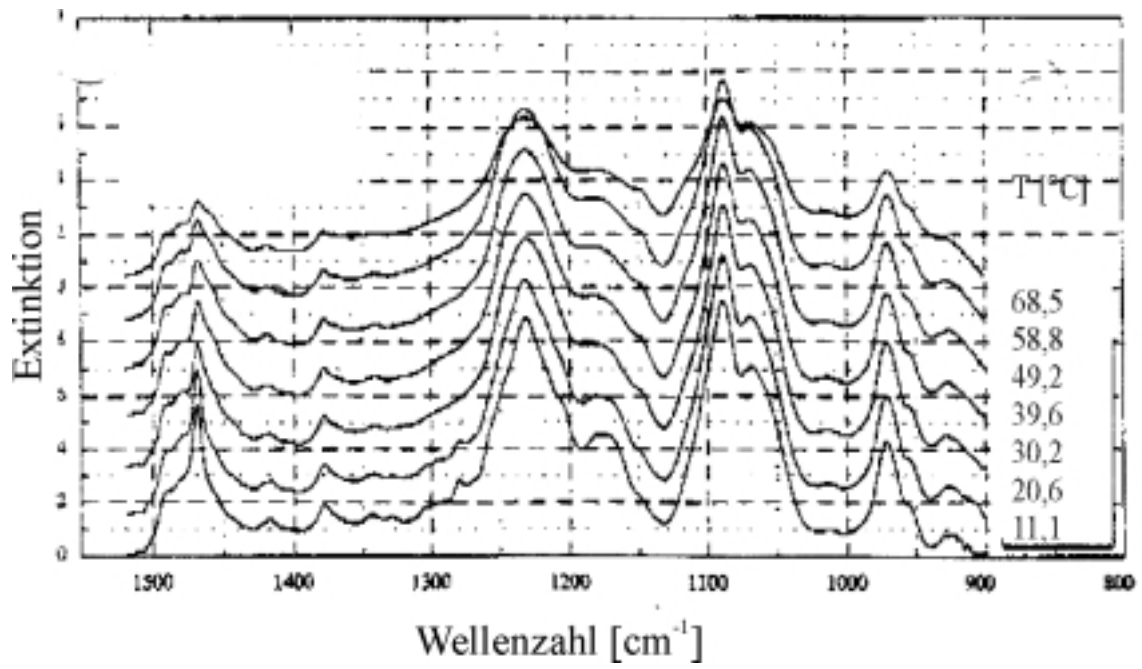


Abbildung 3.2.3-8: IR-Spektren von DMPC in H₂O im Wellenzahlbereich von 1500 – 900 cm⁻¹ (Tuchtenhagen, J., 1994).

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Bemerkung
1485, 1475	$\delta_{as}((\text{CH}_3)_3\text{N}^+)_n$	Schultern
1468	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1457	$\delta(\text{C}^G\text{H}_2)$	Schulter
1418	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	
1378	$\delta_s(\text{CH}_3)$	
1368	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	gtg' (kink) Konformation + gtg Konformation
1355	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	dg Konformation
1342	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	eg Konformation
1325-1205	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	Progression
1228	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig
1175	$\nu_{as}(\text{CO-O-C})$	
1120	$\nu(\text{C}^G\text{-O-(P)})$	
1085	$\nu_s(\text{CO-O-C})$	durch $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ überlagert
1083	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig
1065	$\nu(\text{P-O-(C}^K))$ od. $\nu(\text{C}^K\text{-O-(P)})$	
980	$\nu(\text{P-O-(C}^G))$	durch $\nu_{as}(\text{C-N}^+\text{-C})$ überlagert, von der Natur der Kopfgruppe unabhängig
970	$\nu_{as}(\text{C-N}^+\text{-C})$	
930	$\nu_s(\text{C-N}^+\text{-C})$	

Tabelle 3.2.3-3: Absorptionsbanden von DMPC in H₂O im Wellenzahlbereich von 1500 – 900 cm⁻¹ (Tuchtenhagen, J., 1994).

3.2.4 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**2a**)

Kalorimetrie

Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**2a**) ergab einen breiten Umwandlungspeak ohne Vorumwandlung. Der T_m -Wert von PC14 war erwartungsgemäß mit der Hauptumwandlungstemperatur von PC4 vergleichbar, da die Länge des längsten Kettensegments, welches nicht durch die Dreifachbindung unterbrochen ist, bei beiden Verbindungen identisch ist.

Tabelle 3.2.4-1 und Abbildung 3.2.4-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PC14	23,2	-	53,3
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.4-1: Phasenumwandlungsparameter von PC14 und DSPC.

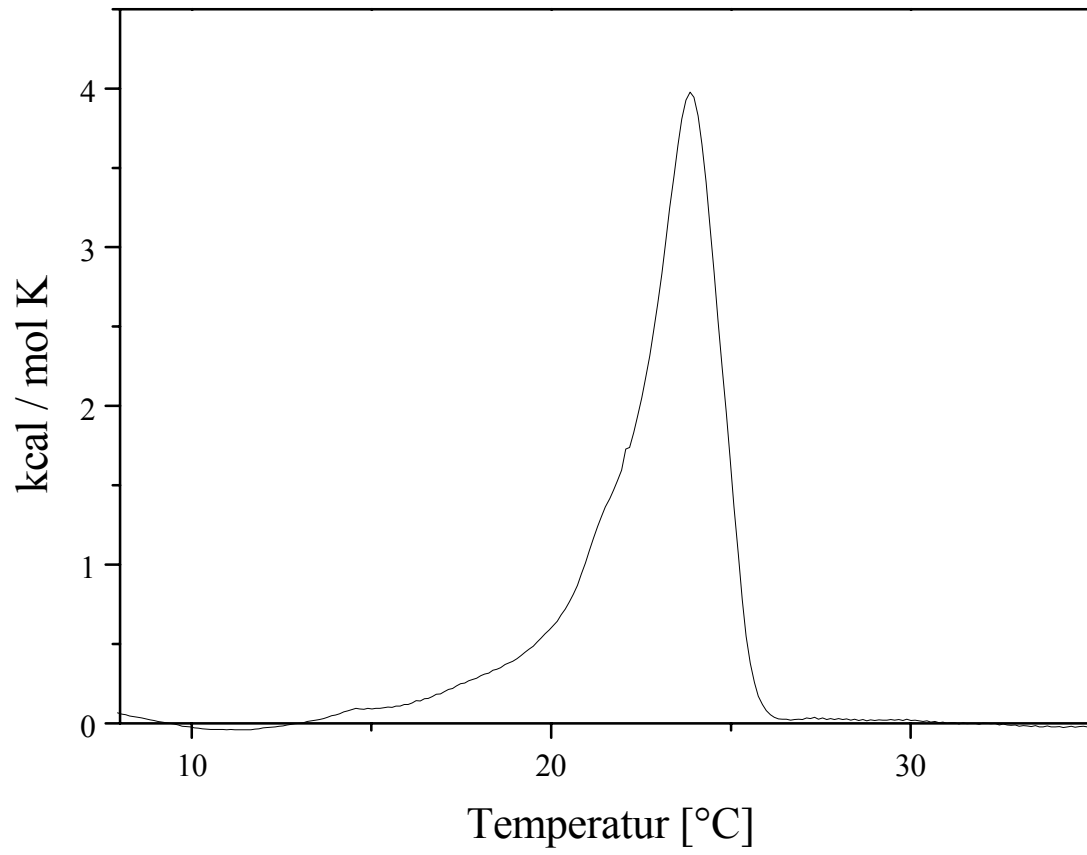


Abbildung 3.2.4-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PC14.

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.4-2 zeigt den C-H-Streckschwingungsbereich von PC14.

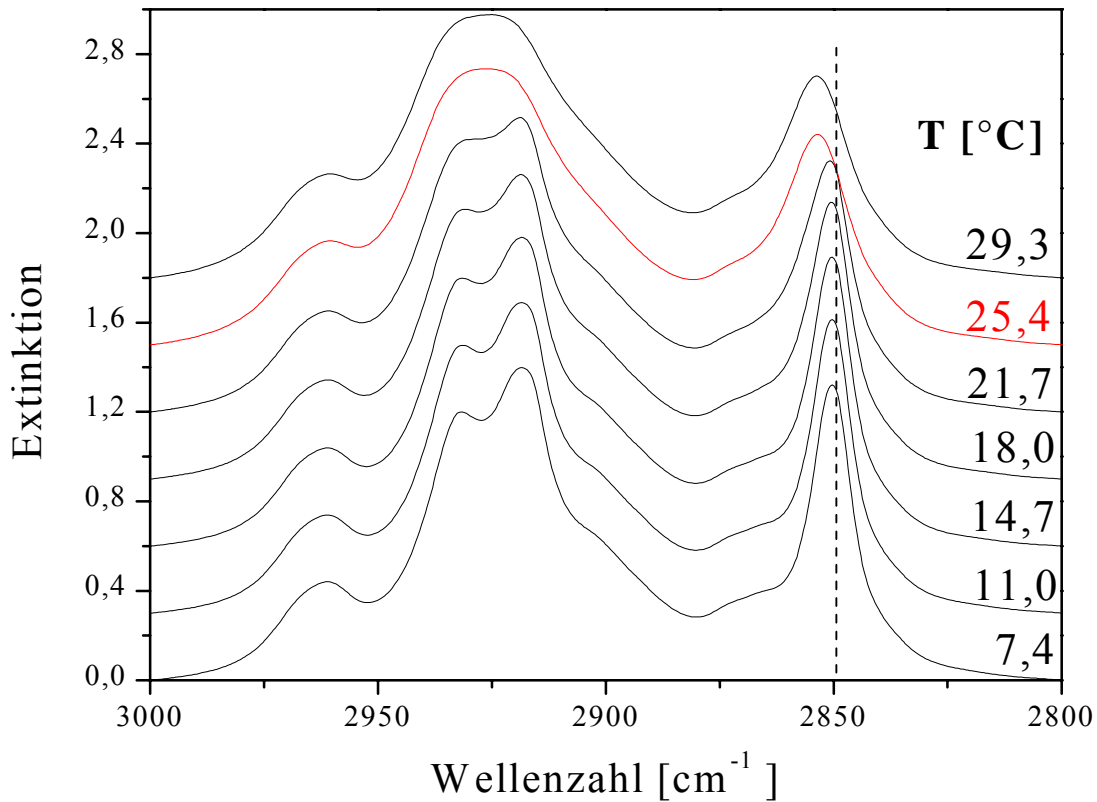


Abbildung 3.2.4-2: C-H-Streckschwingung von PC14 im Bereich der Phasenumwandlung.

Vor der Phasenumwandlung erschien bei PC14 die symmetrische Methylenstreckschwingung bei $2850,3 \text{ cm}^{-1}$. Die Bandenlage war im Vergleich zu DSPC und PC4 zu höheren Wellenzahlen verschoben. Die antisymmetrische Methylenstreckschwingung (2917 cm^{-1}) war unterhalb des Hauptphasenübergangs sehr viel stärker aufgespalten, mit einer Schulter bei 2931 cm^{-1} . Wie schon im Kapitel 3.2.3.2 besprochen, wird diese Aufspaltung wahrscheinlich durch das acetylenische Kettensegment verursacht. Sie ist stärker als bei PC4, da sie aus Schwingungen benachbarter Methylengruppen der Dreifachbindung resultiert (Rudolph, A.S. *et al.*, 1987), welche bei den 14-in-Phospholipiden nicht durch die Nähe zum Carbonyl-C-Atom behindert werden. Die antisymmetrische Methylstreckschwingung erschien wie bei DSPC als wenig scharfe, breitere Bande bei 2960 cm^{-1} .

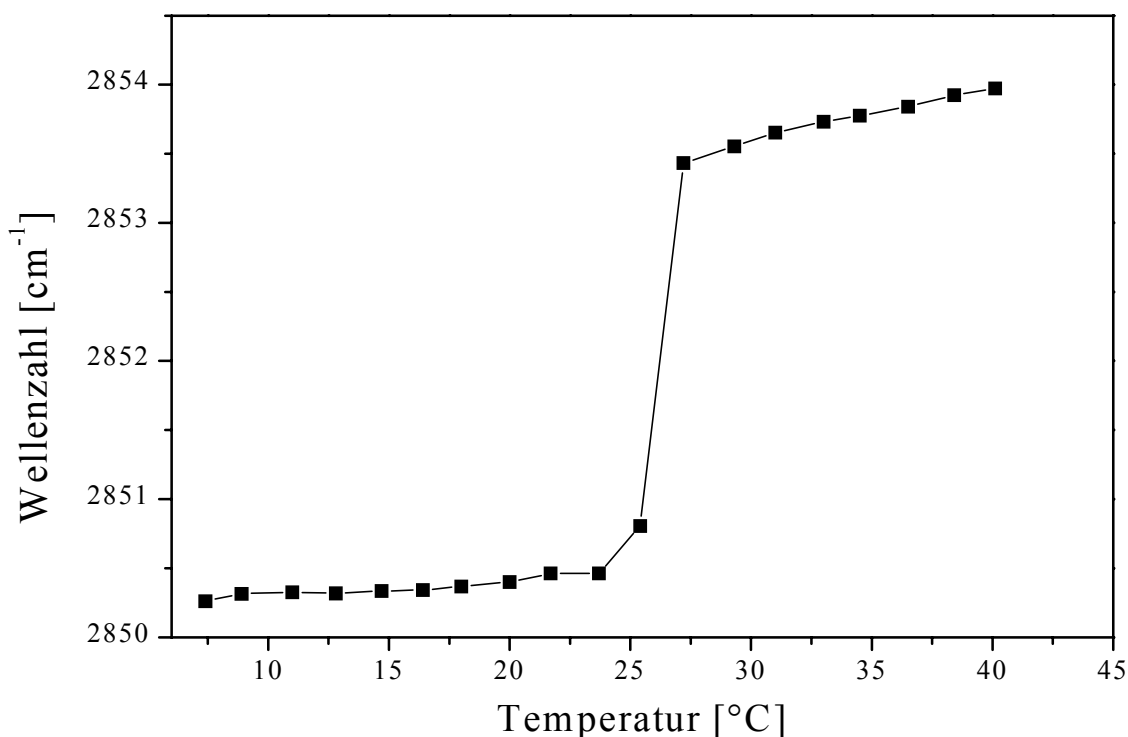


Abbildung 3.2.4-3: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PC14.

Auffällig war jedoch die Verschiebung dieser Bande zu höheren Wellenzahlen im Vergleich zu PC4 (2955 cm⁻¹) und DSPC (2955 cm⁻¹). Dies könnte darauf hindeuten, daß sich die Fettsäureketten bei PC14 weniger gut „packen“ als bei PC4. Darauf weist auch die um 3,2 kJ/mol niedrigere Enthalpiedifferenz der Hauptphasenumwandlung zwischen PC4 und PC14 hin.

Abbildung 3.2.4-3 zeigt die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur von PC14. Die IR-spektroskopisch ermittelte Phasenumwandlungstemperatur stimmte gut mit den kalorimetrischen Daten überein. Die Umwandlung von der Gelphase in die LC-Phase gab sich durch eine Verschiebung des Bandenmaximums um 3,5 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen zu erkennen (3 cm⁻¹ bei DSPC, siehe Abbildung 3.2.3-4).

PC14 kam der idealen *all-trans* Anordnung der Fettsäureketten nicht so nahe wie PC4 und DSPC, da die Bande der symmetrischen CH₂-Streckschwingung in der Tieftemperaturphase um

1 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschoben war. Die höhere Bandenlage in der LC-Phase bei PC14 und PC4 könnte darauf hindeuten, daß die Verbindungen möglicherweise bestimmte *gauche*-Konformere bevorzugt ausbilden, wobei PC14 und PC4 dafür mehr Spielraum zu haben scheinen. Neben dem Anteil der *gauche*-Konformere könnten auch Packungseffekte die CH_2 -Banden beeinflussen.

Abbildung 3.2.4-4 zeigt den Spektralbereich von $1800\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$ oberhalb und unterhalb von T_m .

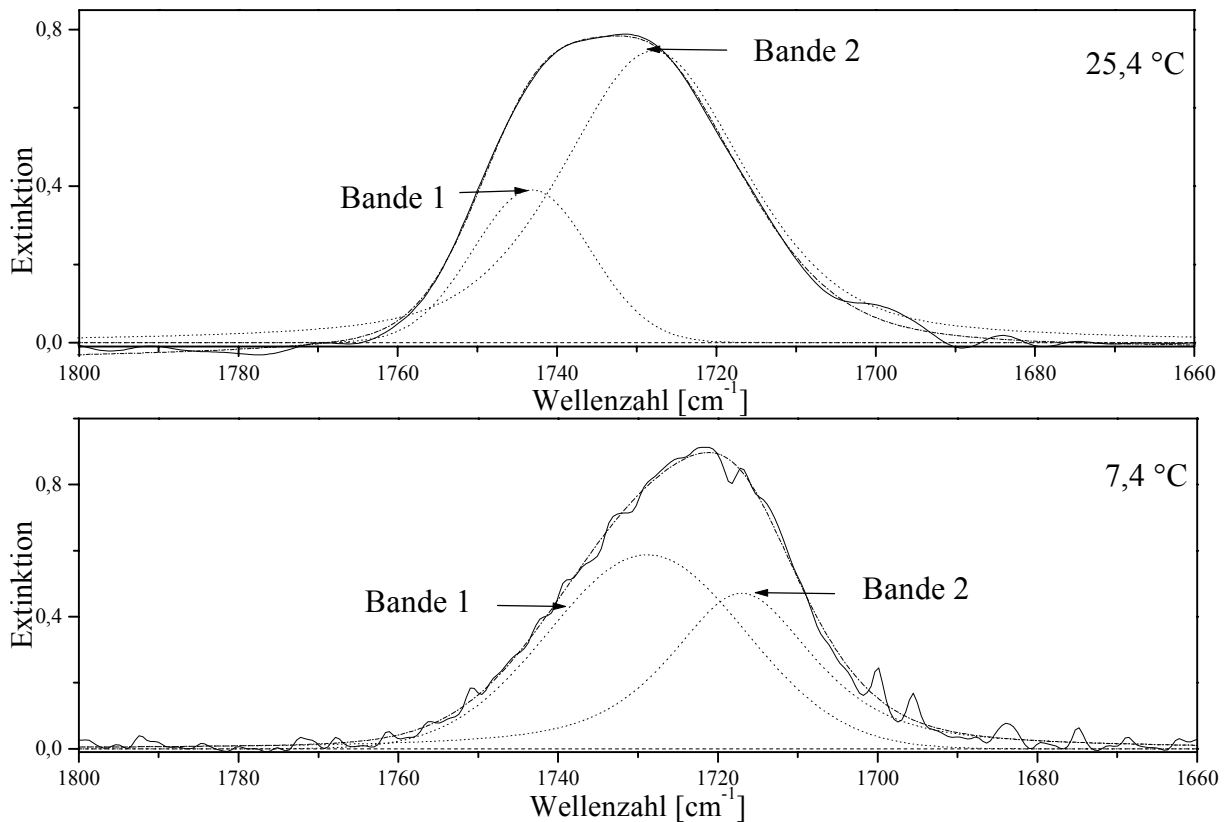


Abbildung 3.2.4-4: Carbonylbanden von PC14 oberhalb und unterhalb von T_m ($23,2 \text{ °C}$). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Unterhalb des Hauptphasenübergangs trat das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve bei 1721 cm^{-1} auf und verschob sich in der LC-Phase nach 1732 cm^{-1} . Damit verhielt sich PC14

ähnlich wie PC4, nur daß die Bandenmaxima um $5\text{-}6\text{ cm}^{-1}$ zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben waren. Die Bandenlage der simulierten Bande 2 (1717 cm^{-1}) bei sehr tiefen Wellenzahlen unterhalb T_m könnte auf starken Wasserstoffbrückenbindungen von immobilisiertem, eingeschlossenem Wasser beruhen und deutet wie bei PC4 auf eine teilweise dehydratisierte, kristalline Phase (Subgelphase) hin. Doch anders als bei PC4 nahm die integrale Intensität der Bande 1 mit dem Übergang in die LC-Phase wie bei DSPC zu und Bande 2 verschob sich zu höheren Wellenzahlen.

Abbildung 3.2.4-5 zeigt IR-Spektren von PC14 im Wellenzahlbereich von 1500 bis 900 cm^{-1} und Abbildung 3.2.4-6 zeigt einen Ausschnitt von $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$. Die Zuordnung der Absorptionsbanden erfolgt in Tabelle 3.3.4-2.

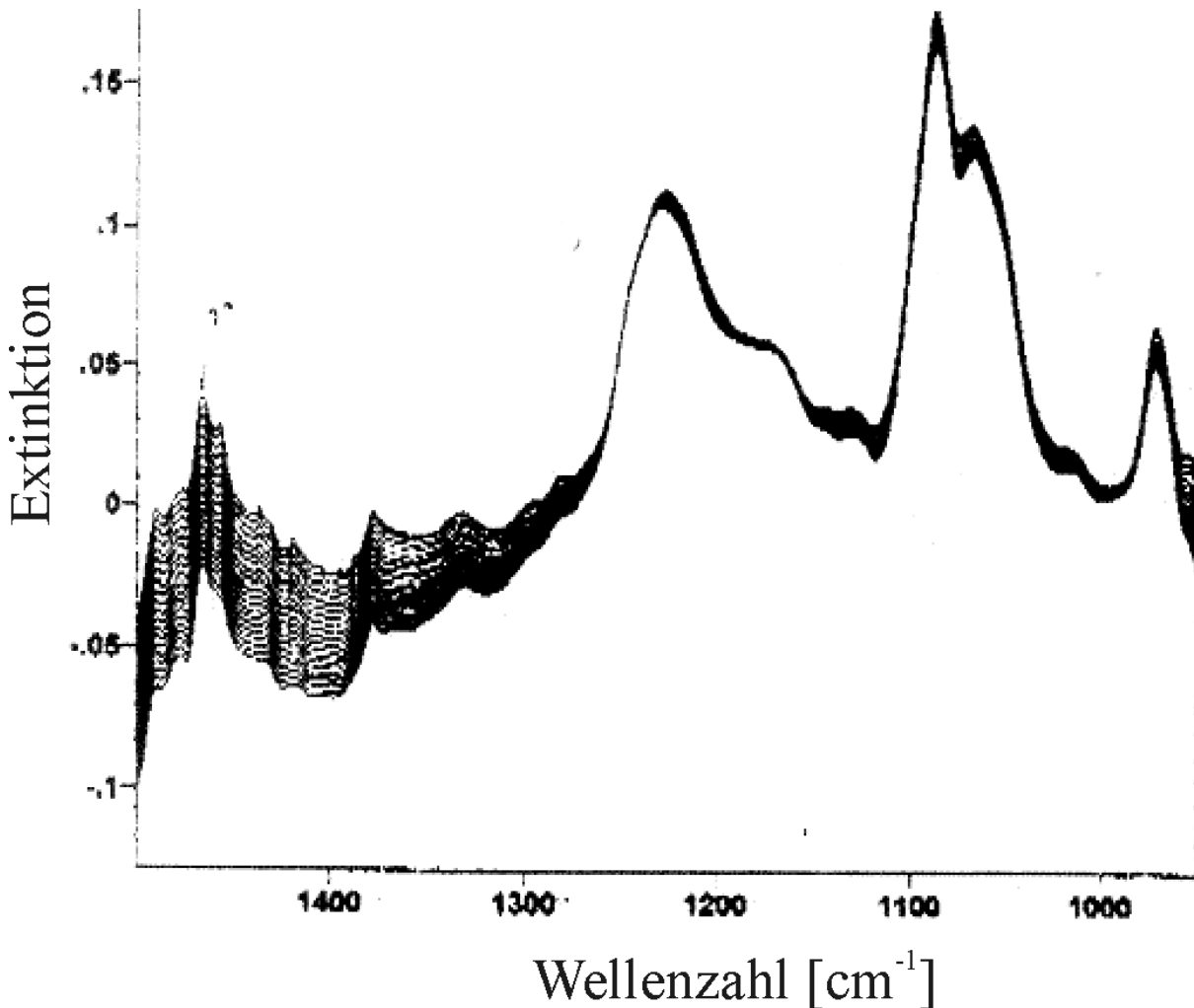


Abbildung 3.2.4-5: IR-Spektren von PC14 in H_2O im Wellenzahlbereich von $1500 - 900\text{ cm}^{-1}$.

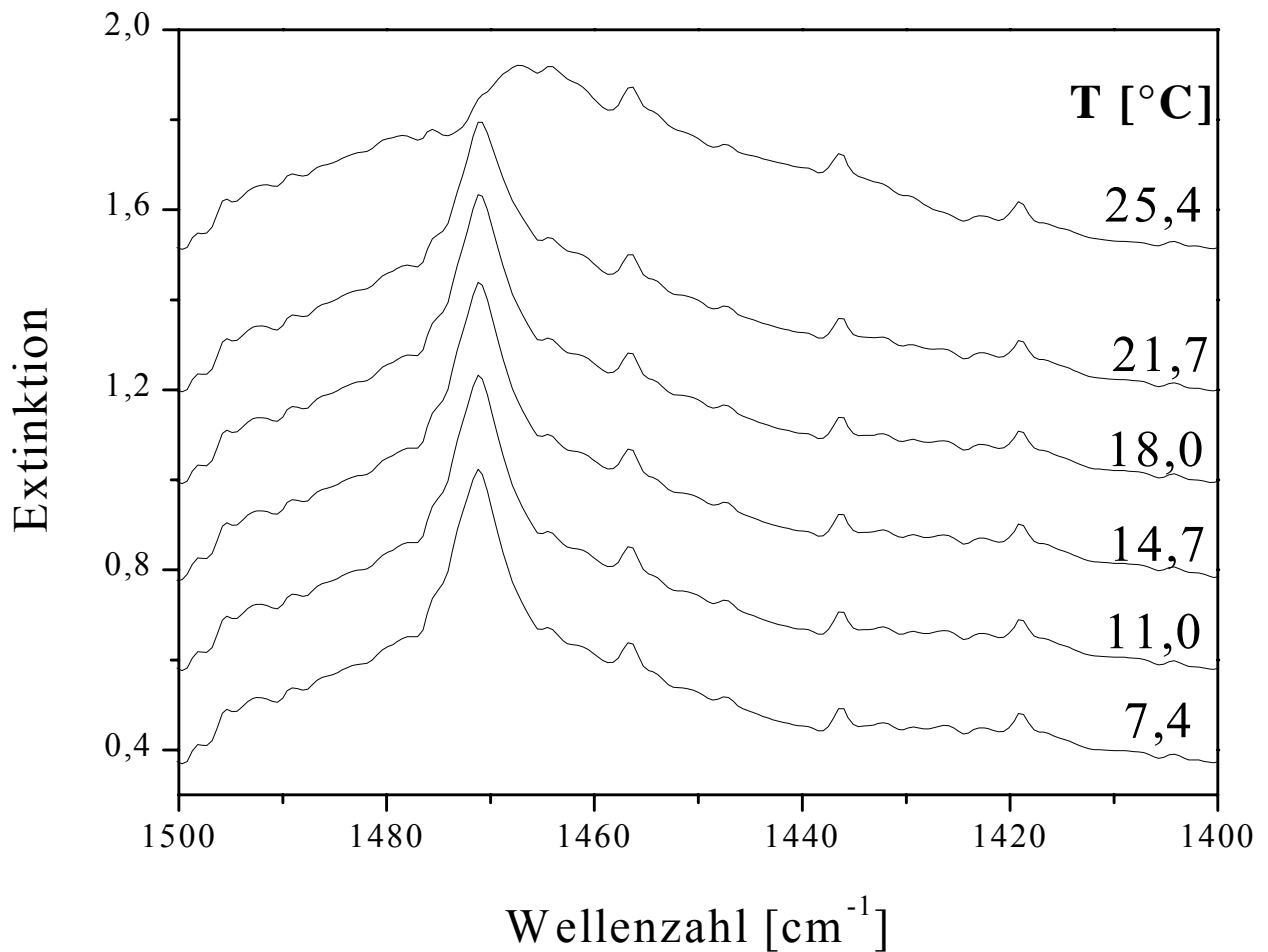


Abbildung 3.2.4-6: IR-Spektren von PC14 in 0,1 M NaCl-Lösung, pH 7 im Wellenzahlbereich von 1500 - 1400 cm^{-1} .

Bei 1471 cm^{-1} war die Bande der CH_2 -Scherschwingung der Fettsäureketten zu finden. Aufgrund der geringeren Schärfe der Bande als bei PC4 könnte auf weniger gut gepackte Fettsäureketten geschlossen werden. Eine eindeutige Interpretation ist wegen der geringen Auflösung der Spektren jedoch schwierig. Im Bereich von $1470 - 1320 \text{ cm}^{-1}$ waren die üblichen Schwingungen von CH_2 - und CH_3 -Gruppen lokalisiert (siehe Tabelle 3.2.4-2). Da bei PC14 im Gegensatz zu PC4 auf das Carbonyl-C-Atom der Fettsäureketten ein zwölfgliedriges CH_2 -Segment folgt, traten ab 1321 bis 1205 cm^{-1} in den Spektren der Tieftemperaturphase die Progressionen der Kippschwingungen („wagging progression“) der CH_2 -Gruppen auf. Die Hydratationsverhältnisse waren höher als bei PC4, da die Bande der antisymmetrischen PO_2^- -Streckschwingung (1229 cm^{-1}) um 5 cm^{-1} zu tieferen Wellenzahlen verschoben war. Abbildung 3.2.4-6 läßt sich kein Hinweis auf eine dehydratisierte PO_2^- -Gruppe entnehmen (siehe PC4).

Bei 1139 cm^{-1} war eine Bande zu finden, die nur unterhalb T_m auftrat. Die Absorption bei 1014 cm^{-1} konnte nicht zugeordnet werden.

Wellenzahl [cm^{-1}]	Zuordnung	Bemerkung
1471	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1457	$\delta(\text{C}^G\text{H}_2)$	Schulter
1437		nicht zugeordnet
1419	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	
1382	$\delta_s(\text{CH}_3)$	
1336	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	eg Konformation
1321-1207	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	5 Progressionsbanden
1229	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig
1175	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$	Schulter
1139		verschwindet $>T_m$,
1089	$\nu_s(\text{CO-O-C})$	durch $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ überlagert
1071	$\nu(\text{P-O-(C}^K))$ od. $\nu(\text{C}^K\text{-O-(P)})$	
1014		nicht zugeordnet
971	$\nu_{\text{as}}(\text{C-N}^+\text{-C})$	

Tabelle 3.2.4-2: Absorptionsbanden von PC14 in H_2O im Wellenzahlbereich von $1500 - 900\text{ cm}^{-1}$.

Röntgenbeugung

Abbildung 3.2.4-7 zeigt ausgewählte Streudiagramme von PC14, die die auftretenden Phasen charakterisieren.

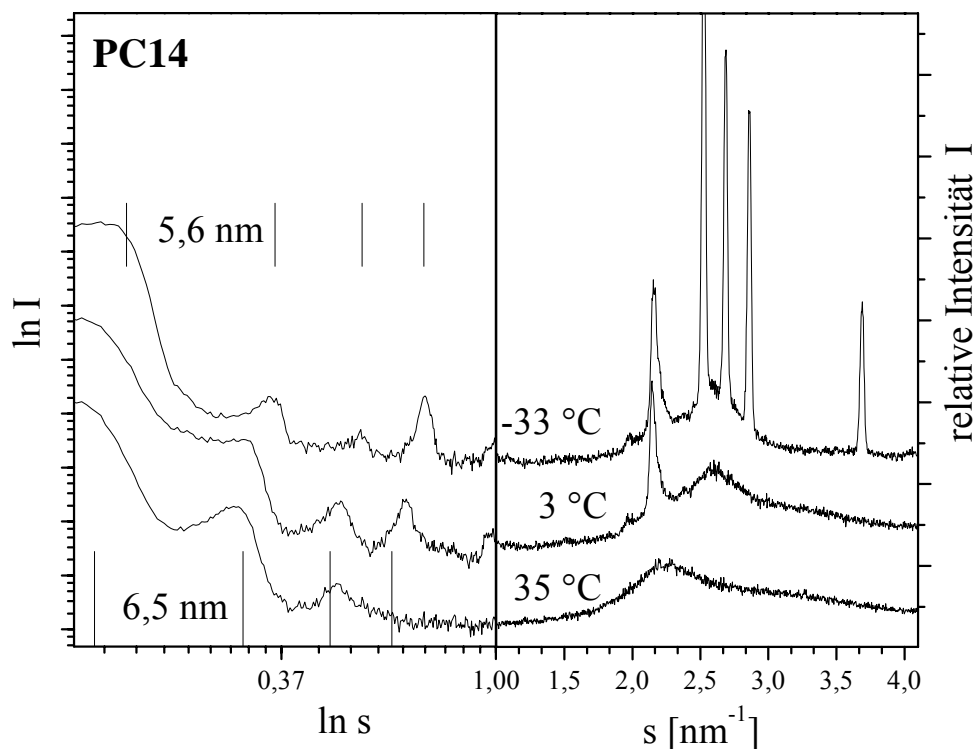


Abbildung 3.2.4-7: Charakteristische Streudiagramme der Phase SG1+Eis (oben), SG1 (Mitte) und L_α (unten) von PC14. Links ist der Kleinwinkelbereich mit Kennzeichnung der Ordnungen, rechts der Weitwinkelbereich dargestellt.

Die erhaltenen Reflexe im Kleinwinkelbereich lagen im Verhältnis $s_1 : s_2 : s_3 = 1 : 2 : 3$, was auf die Existenz lamellarer Phasen in allen Temperaturbereichen hinweist. Die Schichtung der Bischichten scheint sehr regelmäßig zu sein, was die Annahme erlaubt, daß die laterale Packung eine hohe Ordnungstendenz besitzt. Beim Gefrieren des Wassers wird das Wasser aus dem Kopfgruppenbereich der Bischichten gezogen und der Schichtabstand sank von 6,1 nm auf 5,6 nm. Beim „Schmelzen“ der Ketten stieg der Wiederholabstand auf 6,5 nm an, was unter dem Wert liegt, den DSPC zeigt (siehe Tabelle 3.2.13-6). Aussagen zur Polymorphie lassen sich durch Kombination der Analysen der Reflexe aus dem Klein- und Weitwinkelbereich machen.

Die Phase unterhalb T_m wies im Weitwinkelbereich einen scharfen Reflex bei $2,13 \text{ nm}^{-1}$ und einen breiten bei $2,56 \text{ nm}^{-1}$ auf. Unterhalb $0 \text{ }^\circ\text{C}$ enthielt das Streudiagramm noch zusätzliche Eisreflexe bei $s = 2,52, 2,68, 2,85, 3,69$ und $4,38 \text{ nm}^{-1}$ der hexagonalen Eismodifikation (vergl. Abbildung 3.2.4-7 oben). Für die Tieftemperaturphase von PC14, die unterhalb $19 \text{ }^\circ\text{C}$ auftrat, wird hier die Bezeichnung Gelphase SG1 eingeführt. Die Lage ihrer Weitwinkelreflexe unterscheidet sich von der für DSPC typischen Gelphase LC', bei der ein scharfer Peak mit breiter Schulter im Bereich von $s = 2,36 - 2,42 \text{ nm}^{-1}$ beobachtet wird (Stümpel, J., 1981). Der hier beobachteten Phase kann andererseits nicht der typische Charakter der Subgelphase Lc' von DSPC zugesprochen werden, weil ausgeprägte Weitwinkelreflexe im Streubereich bis $s = 1 \text{ nm}^{-1}$ fehlen (Raghunathan, V.A. *et al.*, 1995). Die schwachen Reflexe bei $s = 0,97 \text{ nm}^{-1}$ und $s = 1,93 \text{ nm}^{-1}$ sind nicht mit denen identisch, die bei DSPC ($s = 0,99 \text{ nm}^{-1}, 1,47 \text{ nm}^{-1}$) und DPPC ($s = 1 \text{ nm}^{-1}, 1,47 \text{ nm}^{-1}$) gemessen wurden (Stümpel, J., 1981). In Abbildung 3.2.4-8 zeigt der Schichtabstand von PC14 eine Konstanz der Werte innerhalb des Existenzgebiets der Phasen und reproduzierbare Sprünge beim Schmelzen / Gefrieren des Lösungsmittels bzw. Schmelzen / Erstarren der Ketten. Dieses Verhalten spricht für eine Subgelphase, da bei DPPC in der Gelphase ein Anstieg des Schichtabstands von $dd/dT = 0,004 \text{ nm}/^\circ\text{C}$ (Sun, W.J. *et al.*, 1996). Der Subgelcharakter von SG1 äußert sich auch darin, daß die Lage der Weitwinkelreflexe im Temperaturintervall von $19 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $-37 \text{ }^\circ\text{C}$ nahezu konstant bleibt (vergl. Abbildung 3.2.4-7, oben). Die Umwandlung der zwei Weitwinkelreflexe in einen breiten, diffusen Kettenreflex war bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ abgeschlossen (vergl. Abbildung 3.2.4-7, unten). Dies ist für die Hauptumwandlung charakteristisch. Aufgrund der Röntgenuntersuchungen kann auf eine Phasenabfolge SG1+Eis ($0 \text{ }^\circ\text{C}$) \rightarrow SG1 ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) \rightarrow LC geschlossen werden. Abbildung 3.2.4-8 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Schichtabstands d von PC14 beim Aufheizen.

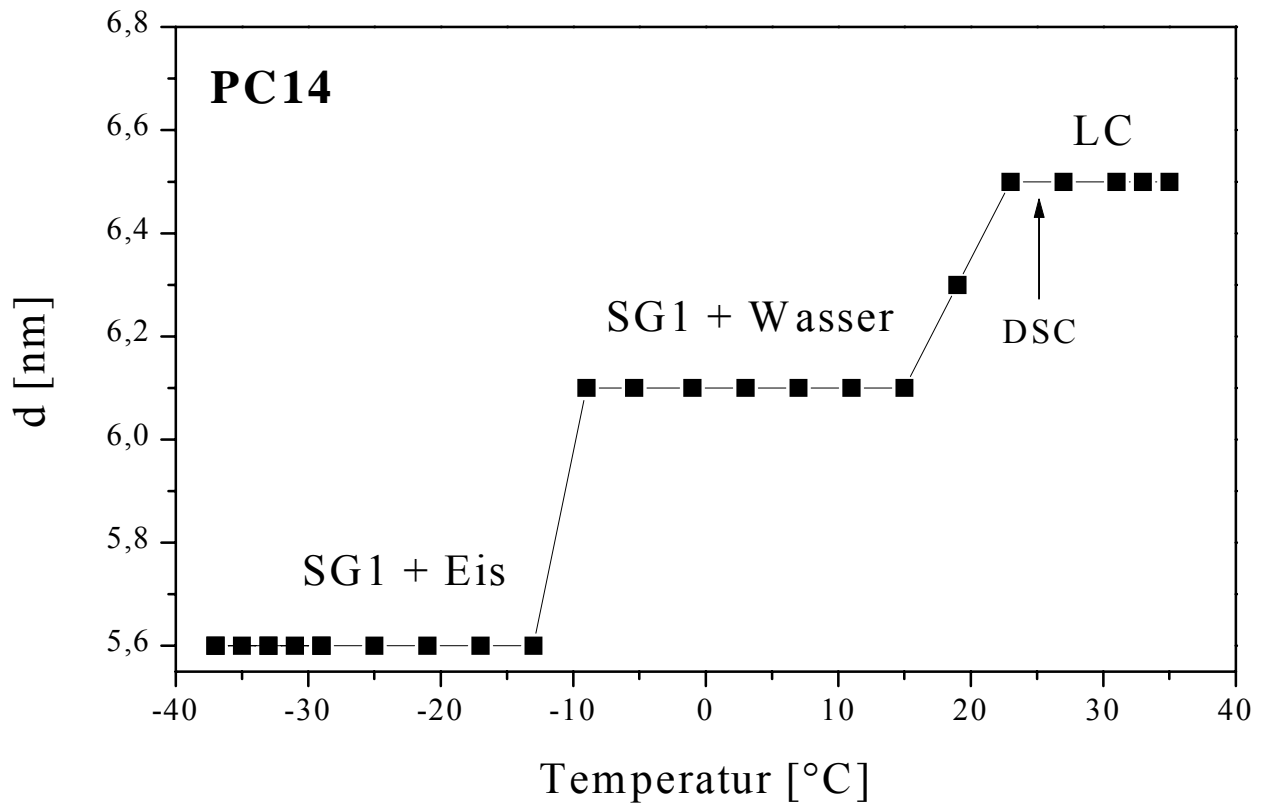


Abbildung 3.2.4-8: Temperaturabhängigkeit des Bischoichtabstands von PC14 beim Aufheizen.

3.2.5 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerin (**1d**)

Kalorimetrie

Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**1d**) ergab einen breiten Umwandelungspeak mit Schulter unterhalb T_m . Eine Vorumwandlung war nicht zu erkennen. Gesättigte Phosphatidylglycerine besitzen normalerweise einen dem entsprechenden Phospholipid mit Cholin-Kopfgruppe vergleichbaren T_m -Wert (New, R.R.C., 1990). Der T_m -Wert von PG4 war jedoch um 5,5 °C höher als bei PC4. Durch das Element der Dreifachbindung scheint sich bei PG4 die raumerfüllende Kopfgruppe besser packen zu können als bei der analogen Verbindung mit gesättigten Fettsäureketten, so daß die Tieftemperaturphase stabilisiert wird. Tabelle 3.2.5-1 und Abbildung 3.2.5-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PG4	31,3	-	51,1
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.5-1: Phasenumwandlungsparameter von PG4 und DSPC.

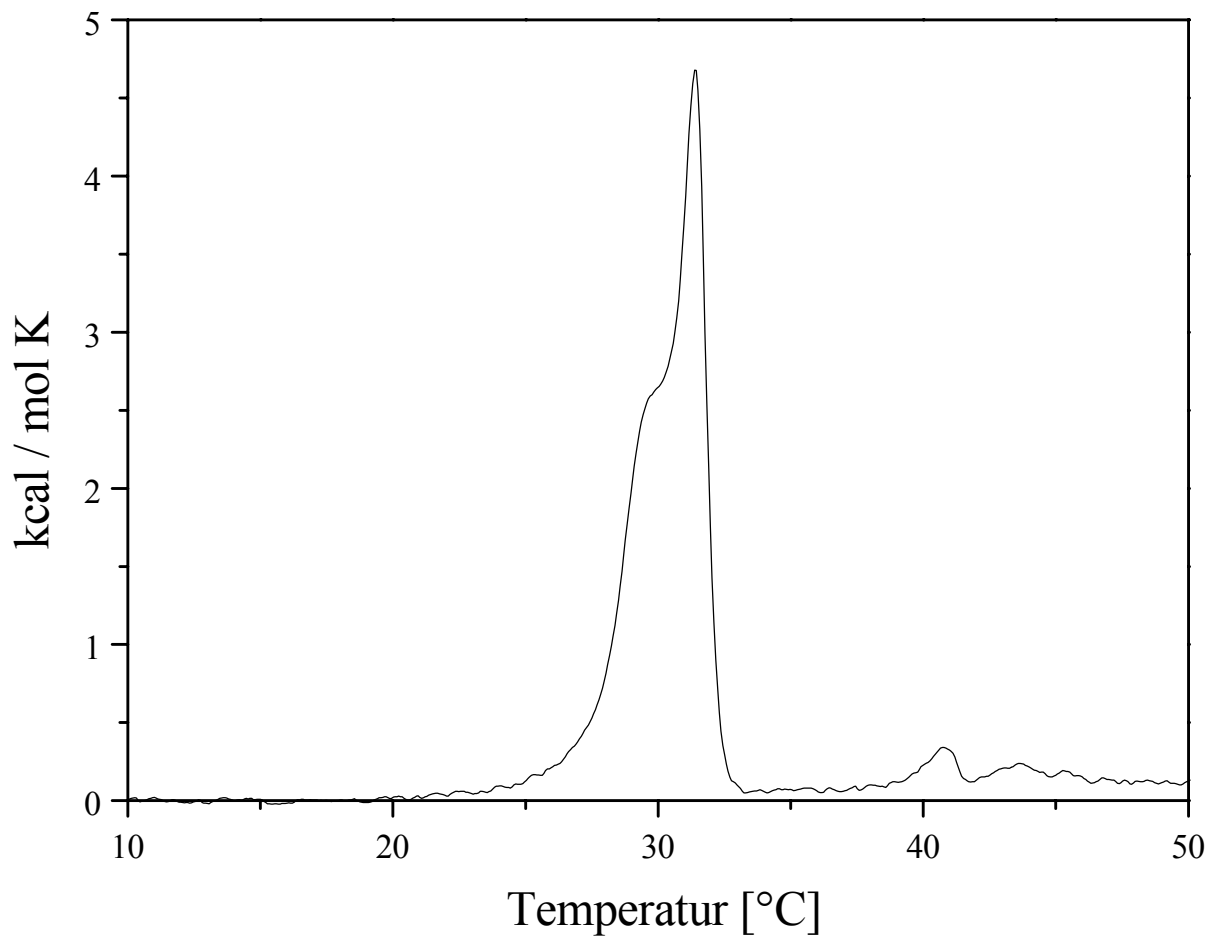


Abbildung 3.2.5-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PG4 .

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.4-1 zeigt den C-H-Streckschwingungsbereich von PG4.

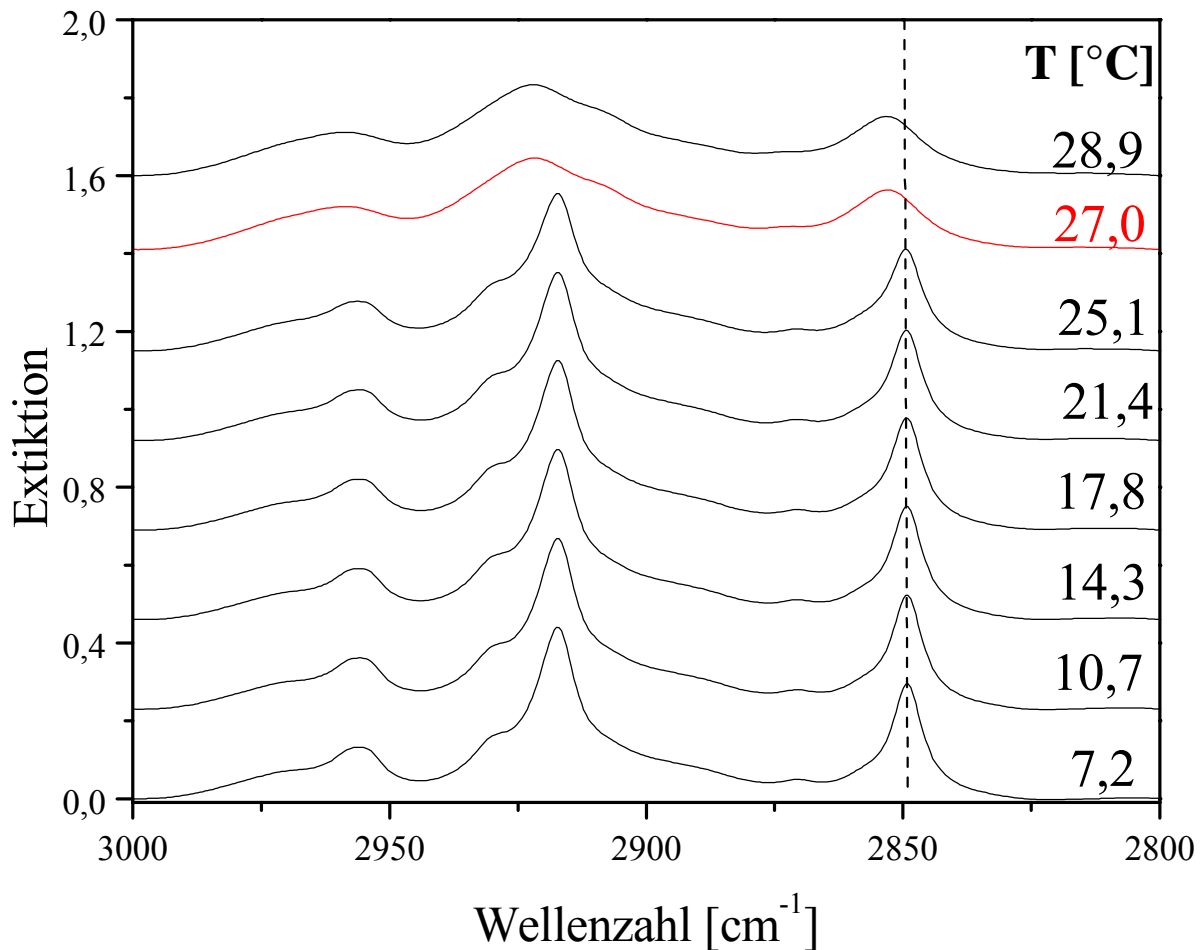


Abbildung 3.2.5-2: C-H-Streckschwingungsbereich von PG4 in 0,1 M D₂O-NaCl-Lösung, pH 7.

Die Lage der Bandenmaxima der symmetrischen und antisymmetrischen Methylenstreckschwingungen war auf beiden Seiten der Hauptumwandlung mit PC4 vergleichbar. Auffällig war wie bei PC4 die intensive Methylstreckschwingung bei 2956 cm⁻¹. Die antisymmetrische Methylenstreckschwingung war durch das acetylenische Kettensegment unterhalb T_m aufgespalten doch die Intensität der hochfrequenten Bande (2926 cm⁻¹) war geringer als bei PC4 (siehe Kapitel 3.2.3.2).

Abbildung 3.2.5-3 zeigt die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur für PG4.

Die IR-spektroskopisch ermittelte Phasenumwandlungstemperatur war um 4 °C niedriger als die aus kalorimetrischen Daten bestimmte Temperatur. Die Hauptumwandlung gab sich durch eine Verschiebung des Bandenmaximums um 4,3 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen zu erkennen. PG4 hatte in der Tieftemperaturphase eine *all-trans* Anordnung der Fettsäureketten, die mit DSPC

vergleichbar war. Die Bandenlage in der LC-Phase war dagegen um $1,5 \text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen verschoben, was auf die Ausbildung unterschiedlicher *gauche*-Konformere schließen läßt. Entsprechend war Umwandlungsenthalpie von PG4 um 5 kJ/mol höher als bei DSPC.

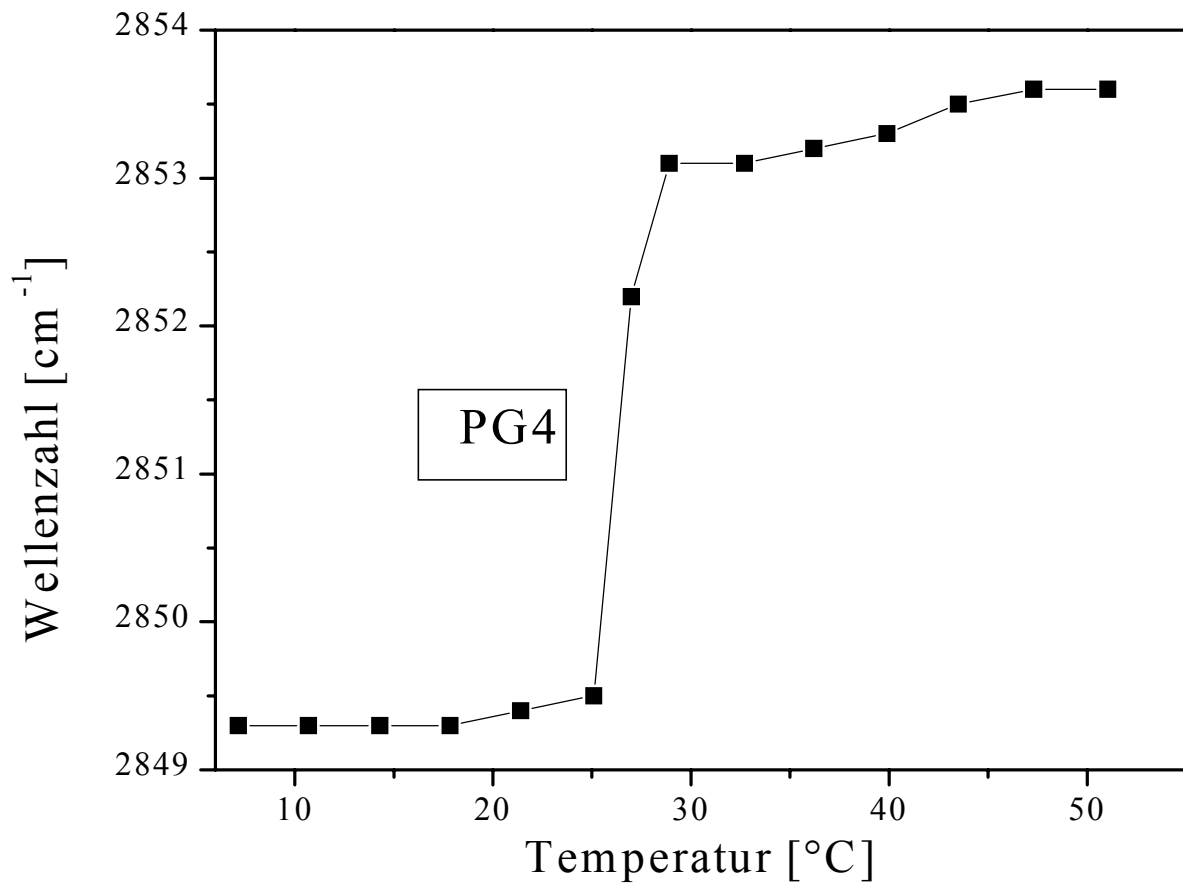


Abbildung 3.2.5-3: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PG4.

Abbildung 3.2.5-4 zeigt den Spektralbereich von $1800\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ jeweils vor und nach dem Phasenübergang.

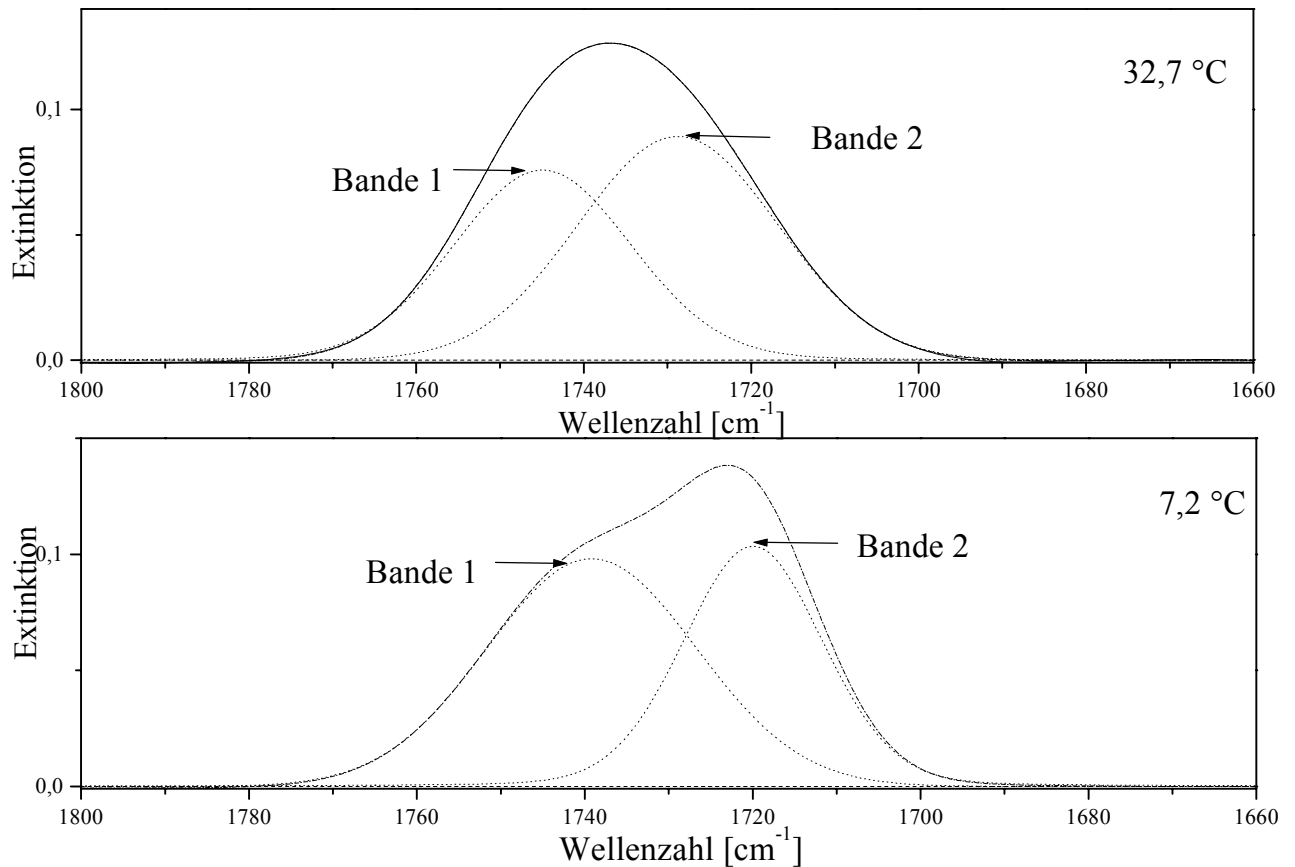


Abbildung 3.2.5-4: Carbonylbanden von PG4 bei pH 7 (PG4^-) oberhalb und unterhalb von T_m ($31,3\text{ °C}$). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Die Hydratationsverhältnisse von PG4 sind mit PC4 vergleichbar. PG4 besaß eine experimentelle Hüllkurve mit tief liegendem Maximum (1723 cm^{-1}), das sich mit dem Phasenübergang zu höheren Wellenzahlen verschob (1732 cm^{-1}). Bande 2 (1720 cm^{-1}) war unterhalb T_m ebenfalls scharf ausgeprägt im Gegensatz zu DSPC und die integrale Intensität dieser Bande nahm oberhalb des Phasenübergangs auf Kosten von Bande 1 (1745 cm^{-1}) zu, wurde breiter mit dem Absorptionsmaximum bei 1729 cm^{-1} . Diese gravierenden Veränderungen

lassen auf was auf eine Subgelphase unterhalb T_m schließen läßt. Abbildung 3.2.5-5 zeigt IR-Spektren im Wellenzahlbereich von $1500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$. Es werden nur charakteristische Absorptionen besprochen, eine Zuordnung aller Banden zeigt Tabelle 3.3.5-2.

Bei 1472 cm^{-1} war die scharfe Bande der CH_2 -Scherschwungung der Fettsäureketten zu finden. Dies läßt wie bei PC4 auf eine geordnete Kettenpackung mit parallel angeordneten Acylketten schließen. Die breite Bande bei 1405 cm^{-1} entstammte der symmetrischen Streckschwungung der COO^- -Gruppierung von EDTA, welches nach der Synthese des Lipids eingesetzt wurde, um Ca^{2+} -Ionen aus der Probe zu entfernen. Bei den gleichen Wellenzahlen wie bei PC4, traten auch bei PG4 ungewöhnliche Absorptionen auf: die Bande bei 1262 cm^{-1} trat nur in Spektren unterhalb T_m auf, ebenso wie die Absorption bei 1128 cm^{-1} . Die Bande bei 1158 cm^{-1} wurde oberhalb T_m durch eine breite Bande bei 1162 cm^{-1} ersetzt. Letztere Banden resultieren möglicherweise aus Schwingungen einer „Struktur“, die durch eine regelmäßige Anordnung der Kopfgruppen gebildet wird. Die Bande bei 1045 cm^{-1} konnte den Streckschwungungen der P-O- (C^{K})- und der C^{K} -O-(P)-Gruppen ($\text{C}_{\text{K}} = \text{C}^{\text{Kopfgruppenalkohol}}$) zugeordnet werden und war im Vergleich zu PC4 zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Die entsprechende Gruppierung war bei DMPG $^-$ bei 1050 cm^{-1} lokalisiert (Tuchtenhagen, J., 1994). Die Absorption bei 1018 cm^{-1} konnte nicht zugeordnet werden.

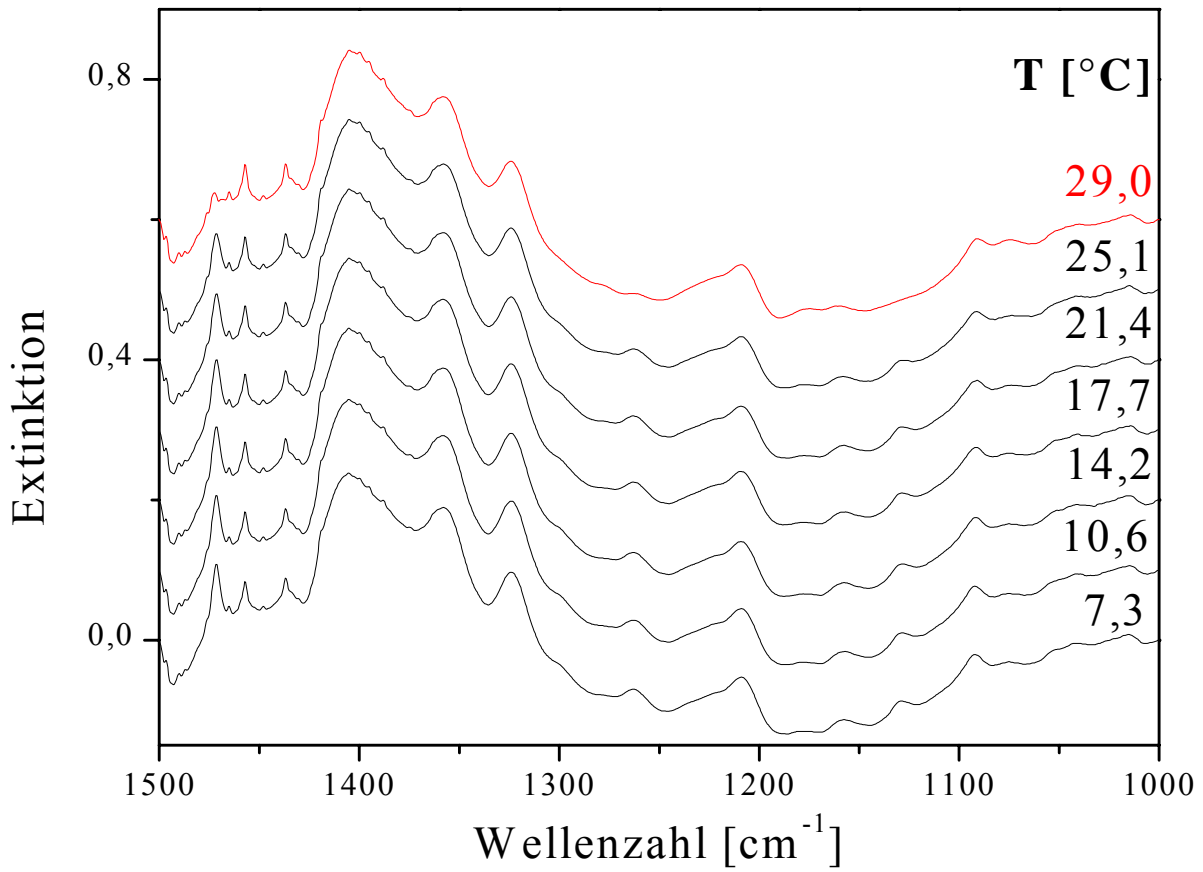


Abbildung 3.2.5-5: IR-Spektrum von PG4 in 0,1 M NaCl-Lösung, pH 7 (PG4) im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm^{-1} .

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Bemerkung
1472	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1457	$\delta(\text{C}^{\text{G}}\text{H}_2)$	
1437		nicht zugeordnet
1418	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	Schulter
1405	$\nu_s(\text{COO}^-)$ von EDTA	EDTA Reste aus Synthese
1378	$\delta_s(\text{CH}_3)$	von EDTA Absorption überlagert
1358		nicht zugeordnet
1324		nicht zugeordnet
1298		Schulter, nicht zugeordnet
1262		verschwindet $>T_m$, nicht zugeordnet
1225	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	Schulter, hydratisiertes Lipid, ungewöhnlich hoch lokalisiert, temperaturabhängig
1177	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$	intensitätsarme Absorption
1158		Maximum verschiebt sich nach $1162 \text{ cm}^{-1} >T_m$
1128		verschwindet $>T_m$,
1092	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	Schulter
1074	$\nu_s(\text{CO-O-C})$	durch $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ überlagert
1045	$\nu(\text{P-O-(C}^{\text{K}}))$ od. $\nu(\text{C}^{\text{K}}\text{-O-(P)})$	
1018		nicht zugeordnet, wenig intensiv

Tabelle 3.2.5-2: Absorptionsbanden von PG4 in NaCl-Lösung im Wellenzahlbereich von 1500 – 1000 cm⁻¹.

3.2.6 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (2d)

Kalorimetrie

Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**2d**) ergab einen Umwandlungspeak, der unterhalb T_m verbreitert erschien. PG14 besaß erwartungsgemäß einen mit PC14 vergleichbaren T_m -Wert

(New, R.R.C., 1990). Tabelle 3.2.6-1 und Abbildung 3.6.5-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PG14	23,8	-	44,3
DSPC	54,7	51,4	46.1

Tabelle 3.2.6-1: Phasenumwandlungsparameter von PG14 und DSPC.

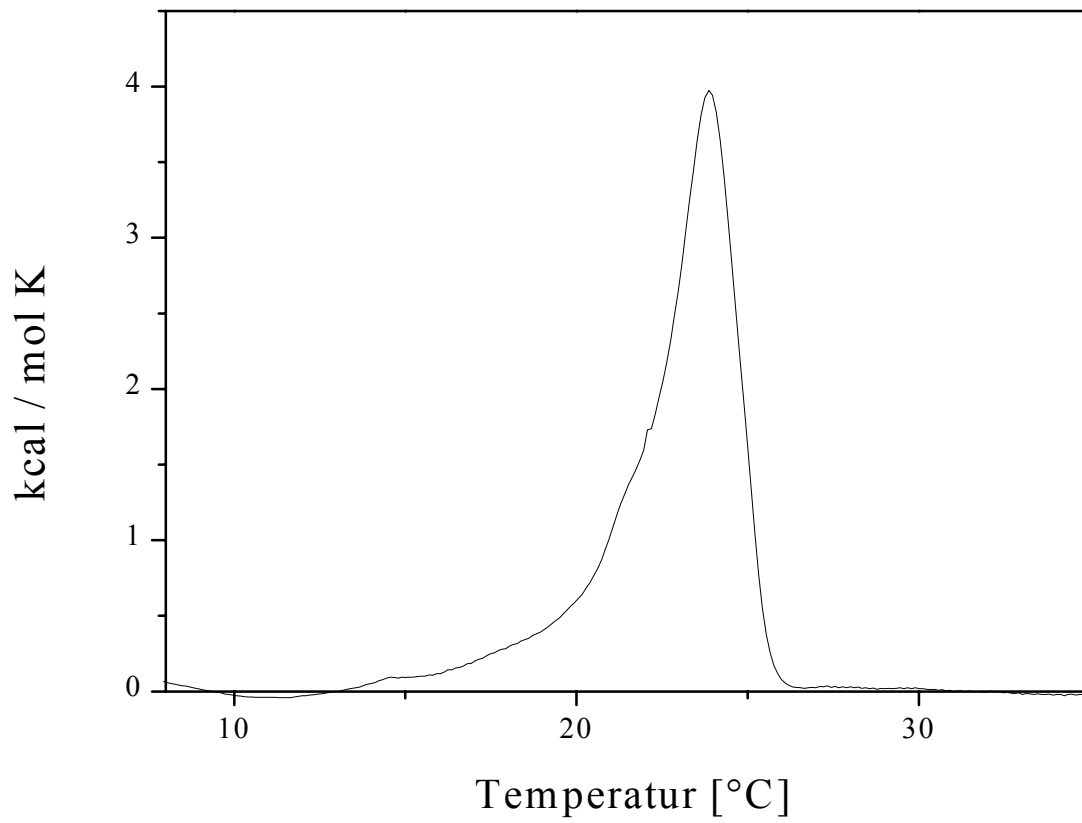


Abbildung 3.2.6-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PG14.

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.6-2 zeigt den C-H-Streckschwingungsbereich und Abbildung 3.2.6-3 die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur für PG14. Die symmetrische ($2850,4 \text{ cm}^{-1}$)- und die antisymmetrische ($2918,4 \text{ cm}^{-1}$) Methylenstreckschwingung waren links von T_m im Vergleich zu DSPC um 1 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschoben. Die Bandenlage der symmetrischen Methylenstreckschwingung in der LC-Phase war wie bei den bisher besprochenen acetylenischen Lipiden bei PG14 um 2 cm^{-1} bei höheren Wellenzahlen gegenüber DSPC lokalisiert.

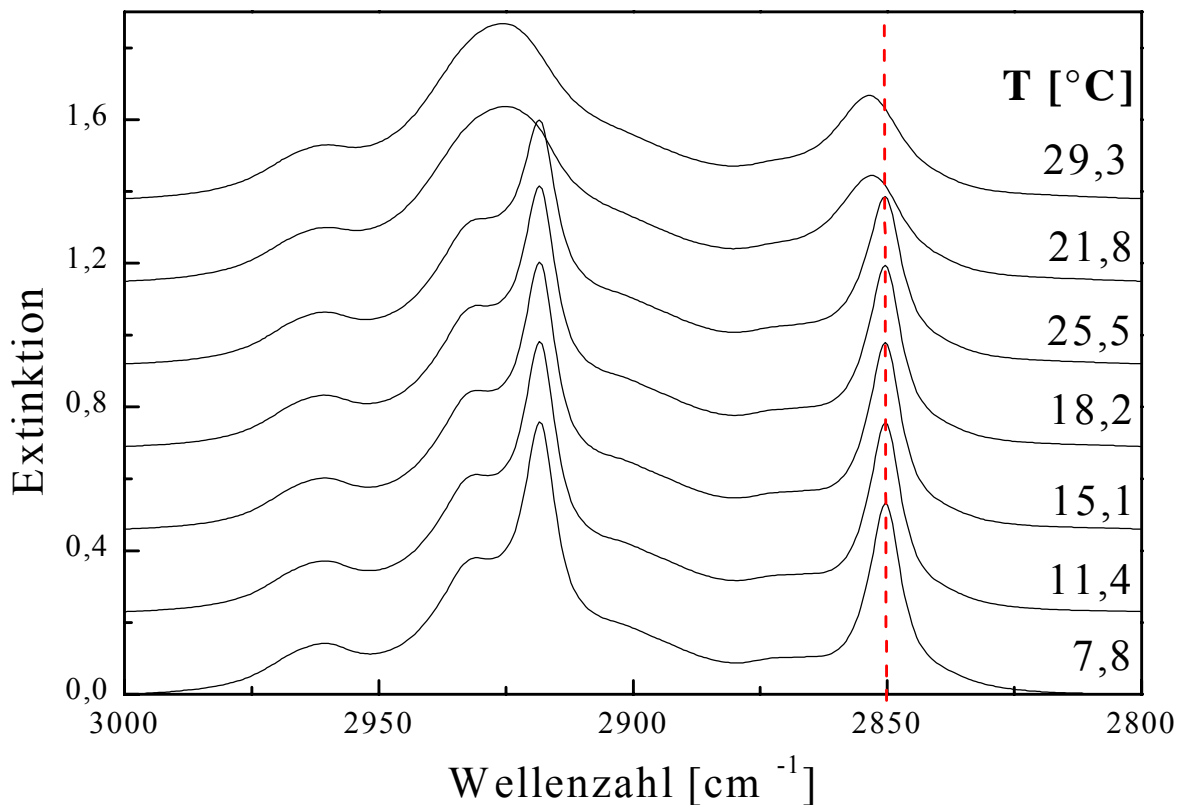


Abbildung 3.2.6-2: C-H-Streckschwingungsbereich von PG14 in 0,1 M D₂O-NaCl-Lösung, pH 7.

Die Intensität der höherfrequenten Bande der aufgespalteten antisymmetrischen Methylenstreckschwingung unterhalb des Hauptphasenübergangs war größer als bei der entsprechenden 4-in Verbindung mit einer Schulter bei 2931 cm^{-1} (siehe Kapitel 3.2.3.2 und

Kapitel 3.2.4.2). Wie bei DSPC und PC14 erschien die Methylstreckschwingung als wenig scharfe, breitere Bande bei 2960 cm^{-1} . Auffällig war jedoch die Verschiebung dieser Bande zu höheren Wellenzahlen im Vergleich zu PG4 (2956 cm^{-1}) und DSPC (2958 cm^{-1}).

Die IR-spektroskopisch ermittelte Phasenumwandlungstemperatur stimmte gut mit der aus kalorimetrischen Daten ermittelten Temperatur überein. Die Umwandlung von der Tieftemperaturphase in die LC-Phase gab sich durch eine Verschiebung des Bandenmaximums bei PG14 um $3,4\text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen zu erkennen.

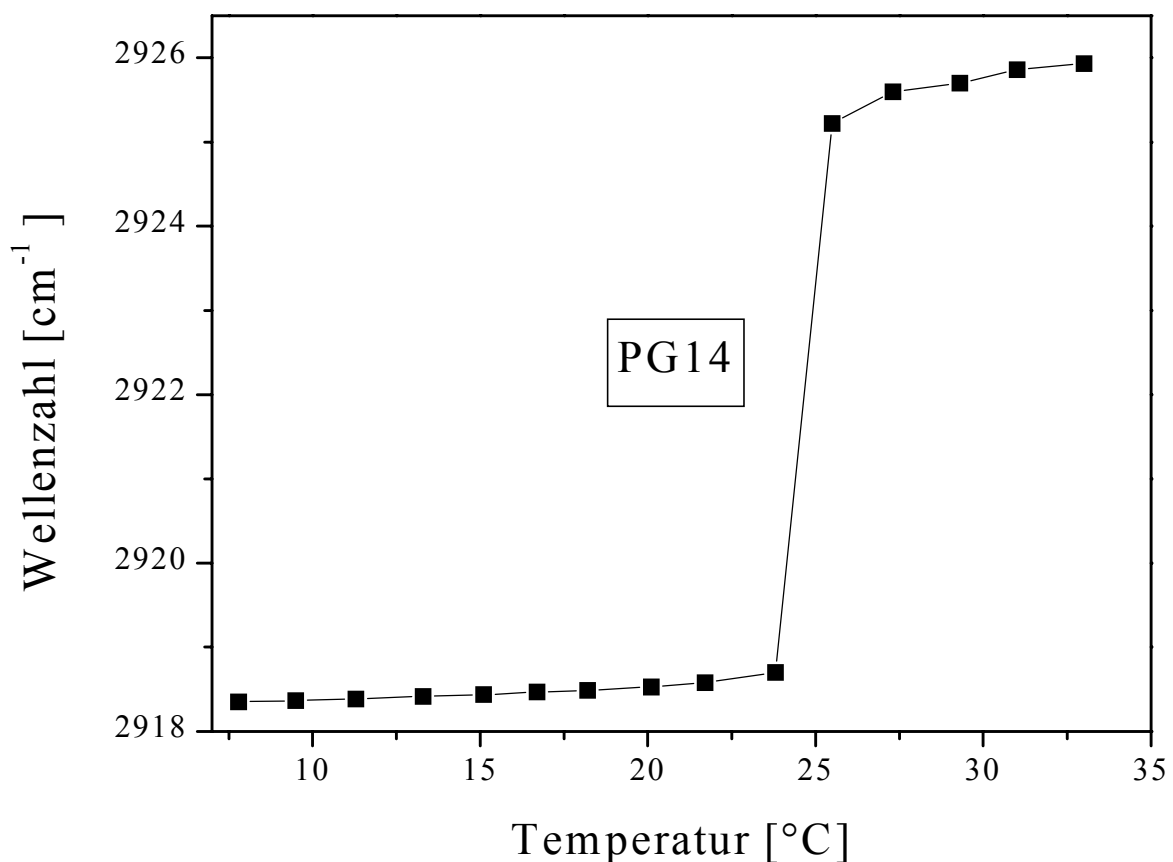


Abbildung 3.2.6-3: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PG14.

Abbildung 3.2.6-4 zeigt den Spektralbereich von $1800\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ jeweils oberhalb und unterhalb T_m .

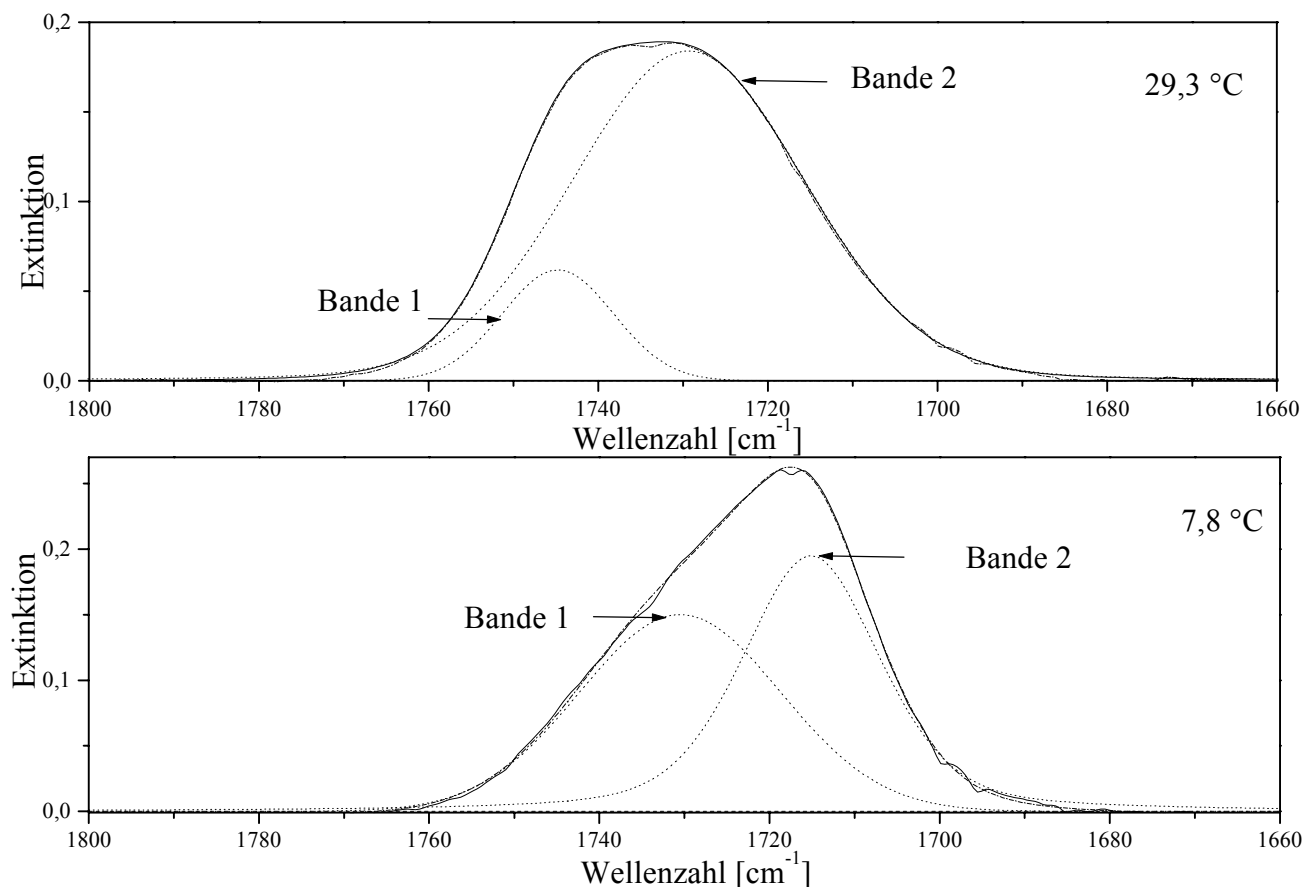


Abbildung 3.2.6-4: Carbonylbanden von PG14 bei pH 7 (PG14^-) oberhalb und unterhalb von T_m ($23,8\text{ °C}$). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Die Bandenlagen der Carbonylgruppe von PG14 waren mit PC14 vergleichbar. Bei beiden Verbindungen besaßen die experimentellen Hüllkurven noch tiefliegendere Absorptions-Maxima als das jeweilige 4-in-Phospholipid (1718 cm^{-1} bei PG14), welche sich mit dem gel/flüssigkristallin Phasenübergang zu höheren Wellenzahlen verschoben (1732 cm^{-1}). Bande 2 (1715 cm^{-1}) war unterhalb T_m ebenfalls schärfer ausgeprägt als bei DSPC, die integrale Intensität dieser Bande nahm mit dem Phasenübergang auf Kosten von Bande 1 (1745 cm^{-1}) zu und die

Halbwertsbreite wurde größer in der LC-Phase mit einem Maximum bei 1729 cm^{-1} , was auf eine Subgelphase unterhalb T_m schließen läßt.

Abbildung 3.2.6-5 zeigt IR-Spektren von PG14 im Wellenzahlbereich von 1500 bis 1000 cm^{-1} und Tabelle 3.3.6-2 enthält eine Zuordnung der aufgetretenen Absorptionen. Die scharfe Bande der CH_2 -Schwingung der Fettsäureketten bei 1472 cm^{-1} war ebenso intensiv wie bei PG4 (vgl. PC4 mit PC14). Die Bande bei 1403 cm^{-1} entstammte der symmetrischen Streckschwingung der COO^- -Gruppierung von EDTA, welches nach der Synthese des Lipids eingesetzt wurde, um Ca^{2+} -Ionen aus der Probe zu entfernen. Durch den Sitz der Dreifachbindung am C14-Atom der Acylkette konnten Progressionsbanden entstehen (1321 bis 1202 cm^{-1}). Die Absorption bei 1262 cm^{-1} , die bei PC4 und PG4 nur in der Tieftemperaturphase vorhanden war, trat bei PG14 erst oberhalb T_m auf. Sie könnte von einer dehydratisierten PO_2^- -Gruppe stammen. Die Spektren von PC14 zeigten diese Bande nicht. Die Bande bei 1112 cm^{-1} zeigte ebenfalls eine Temperaturabhängigkeit. Temperaturabhängige Banden waren auch bei PC4, PC14 und PG4 im Wellenzahlbereich zwischen 1158 und 1128 cm^{-1} lokalisiert. Die Bande bei 1047 cm^{-1} konnte den Streckschwingungen der P-O-(C^{K})- oder der C^{K} -O-(P)-Gruppen ($\text{C}^{\text{K}} = \text{C}^{\text{Kopfgruppenalkohol}}$) zugeordnet werden (vgl. PG4).

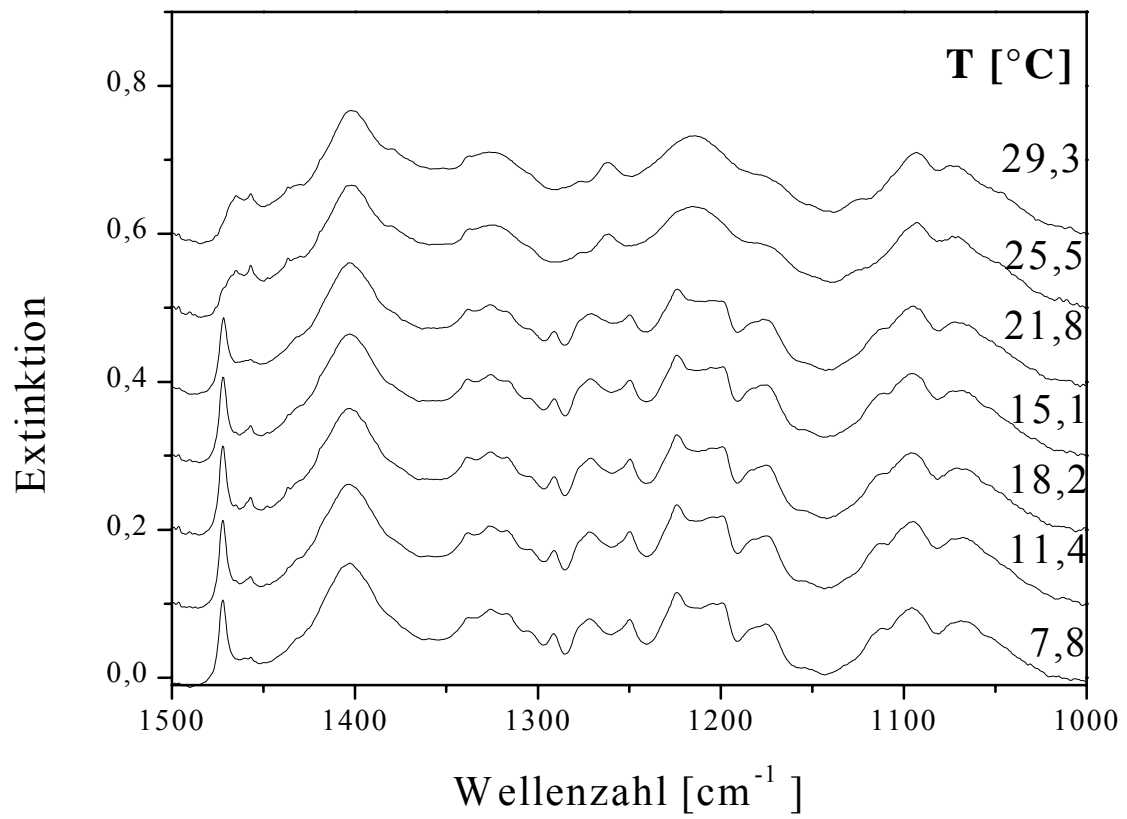


Abbildung 3.2.6-5: IR-Spektrum von PG14 in 0,1 M NaCl-Lösung, pH 7 im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm^{-1} .

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Bemerkung
1472	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1433		Schulter, nicht zugeordnet
1419	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	Schulter
1403	$\nu_s(\text{COO}^-)$ von EDTA	EDTA Reste aus Synthese
1381	$\delta_s(\text{CH}_3)$	Schulter
1338	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	eg Konformation
1321-1202	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	5 Progressionsbanden
1262		kommt $>T_m$, möglicherweise PO_2^- dehydratisiert
1214	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig, von Progression überlagert
1175	$\nu_{as}(\text{CO-O-C})$	
1112		verschwindet $>T_m$
1096	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	
1071	$\nu_s(\text{CO-O-C})$	
1047	$\nu(\text{P-O-(C}^{\text{K}}))$ oder $\nu(\text{C}^{\text{K}}\text{-O-(P)})$	Schulter

Tabelle 3.2.6-2: Absorptionsbanden von PG14 in H₂O im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm⁻¹.

Röntgenbeugung

Abbildung 3.2.6-6 zeigt ausgewählte Streudiagramme von PG14, die die auftretenden Phasen charakterisieren.

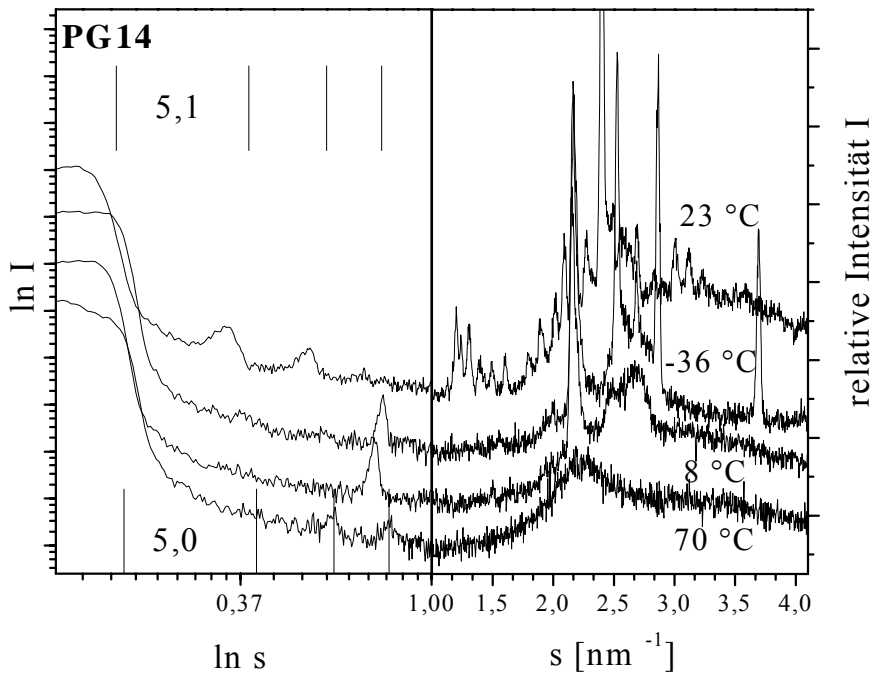


Abbildung 3.2.6-6: Charakteristische Streudiagramme der Phase SG1+Eis (2. Streukurve von oben), SG1 (3. Streukurve von oben), L_α (unten) und kristalline Phase C (oben) von PC14. Links ist der Kleinwinkelbereich mit Kennzeichnung der Ordnungen, rechts der Weitwinkelbereich dargestellt.

Die Reflexe im Kleinwinkelbereich zeigen, daß eine lamellare Struktur vorlag. Die d-Werte betragen 5,1 nm bei niedrigen Temperaturen, wenn das Wasser ausgefroren war. Nach dem Eisschmelzen stiegen die Schichtabstände auf 5,4 nm an. Nach dem Schmelzen der Ketten nahmen die d-Werte auf 5,1 nm und ab 60 °C auf 5,0 nm ab (vgl. Abbildung 3.2.6-6 links). Ungewöhnlich waren die Intensitäten im Kleinwinkelbereich. Unterhalb T_m waren nur die 1.- und 4. Ordnung deutlich ausgeprägt während in der LC-Phase die lamellare Überstruktur sogar Reflexe bis zur 4. Ordnung bei mittlerer Intensität ergab.

Die Streureflexe im Weitwinkelbereich zeigt Abbildung 3.2.6-6 (rechts). Der scharfe Reflex bei $s = 2,17 \text{ nm}^{-1}$ und der breite bei $s = 2,7 \text{ nm}^{-1}$ deuten auf die Existenz einer Gelphase G_x hin, die nicht mit einer L_β -Phase des DSPC vergleichbar ist (Stümpel, J., 1981). Gegenüber PC14

zeichnet sich der breite Reflex durch eine stärkere Intensität und geringere Halbwertsbreite aus. Beide Streueffekte liegen beim PG14 weiter auseinander als bei allen anderen untersuchten Lipiden (siehe Abbildung siehe 3.2.15-1). Ein Zusatzreflex im Streubereich zwischen Kleinwinkel- und Weitwinkelreflexen konnte als 8. Ordnung des Schichtabstands interpretiert werden (siehe Abbildung 3.2.6-6 rechts, 3. Streukurve von oben), so daß es unwahrscheinlich ist, daß ein Molekülgitter vorliegt. Als Besonderheit des PG14 war zu beobachten, daß nach der Präparation eine Kristallstruktur C erhalten war, die einen Schichtabstand von 5,8 nm aufwies (siehe Abbildung 3.2.6-6 rechts, obere Streukurve). Nach dem Aufschmelzen und Abkühlen bildete sich die Phase G_x aus, die innerhalb der Meßserie stabil war und nicht rekristallisierte. In Abbildung 3.2.6-6 ist zu erkennen, daß bei $s = 2,42 \text{ nm}^{-1}$ ein Zusatzreflex auftrat, der bei der Indizierung der Kettenpackung der Gelphasenstruktur G_x berücksichtigt werden muß, so daß es sich vielmehr um eine Subgelphase G_x handelt. Es fand auch bei PG14 kein linearer Anstieg der d-Werte in der Subgelphase statt. Das Schmelzen von Eis setzte im Gegensatz zu PC14 schon bei -4 °C ein. Durch eine verstärkte Hydratation bei dem Übergang in die LC-Phase sollte der Schichtabstand ansteigen. PG14 zeigte jedoch ein gegenläufiges Verhalten, was möglicherweise mit einer Umorientierung der Kopfgruppe von einer „stehenden“ in eine „liegende“ Position zu tun hat. Ab 30 °C lagen fluide Ketten vor, wobei die DSC-Umwandlung schon bei $23,8 \text{ °C}$ beobachtet wurde. In der LC-Phase blieb beim Aufheizen die diffuse Streubande der fluiden Ketten zwar bestehen, doch nahm der lamellare Abstand um $0,1 \text{ nm}$ weiter ab, was eine Folge einer stetigen Veränderung im Kopfgruppenbereich sein könnte. Insgesamt wurden beim PG14 die niedrigsten Schichtabstände beobachtet. Das Phasenverhalten kann somit folgendermaßen beschrieben werden: $C (31 \text{ °C}) \rightarrow L_{\alpha}$; $G_x + \text{Eis} (-4 \text{ °C}) \rightarrow G_x (30 \text{ °C}) \rightarrow L_{\alpha}$. Abbildung 3.2.6-7 gibt einen Überblick der lamellaren Abstände von der Temperatur.

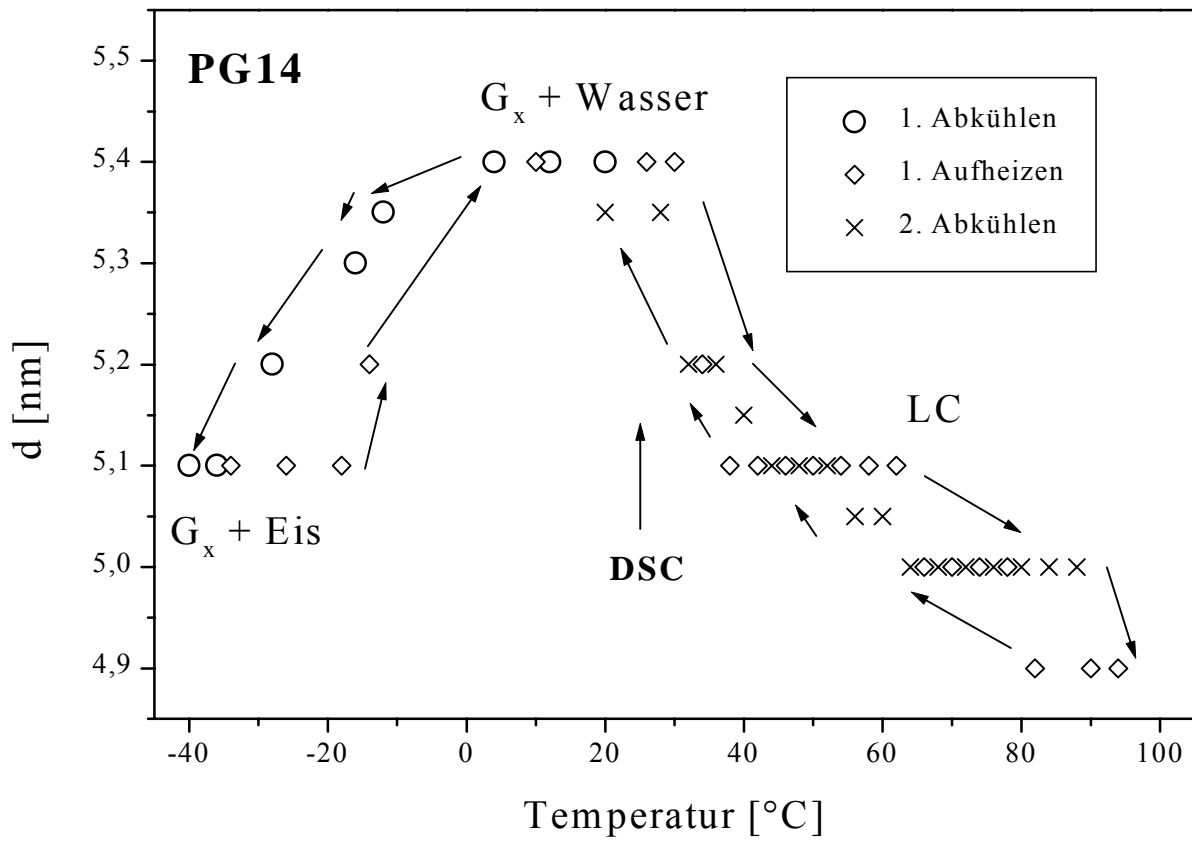


Abbildung 3.2.6-7: Temperaturabhängigkeit des Bilschichtabstands von PG14 beim mehrmaligen Abkühlen und Aufheizen.

3.2.7 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidsäure (**1b**)

Kalorimetrie

Tabelle 3.2.7-1 und Abbildung 3.2.7-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter. Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**1a**) ergab einen breiten Umwandlungspeak. Die ungewöhnlich hohe Umwandlungsenthalpie läßt auf eine hoch geordnete Tieftemperaturphase schließen.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PA4	44,6	-	70,8
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.7-1: Phasenumwandlungsparameter von PA4 und DSPC.

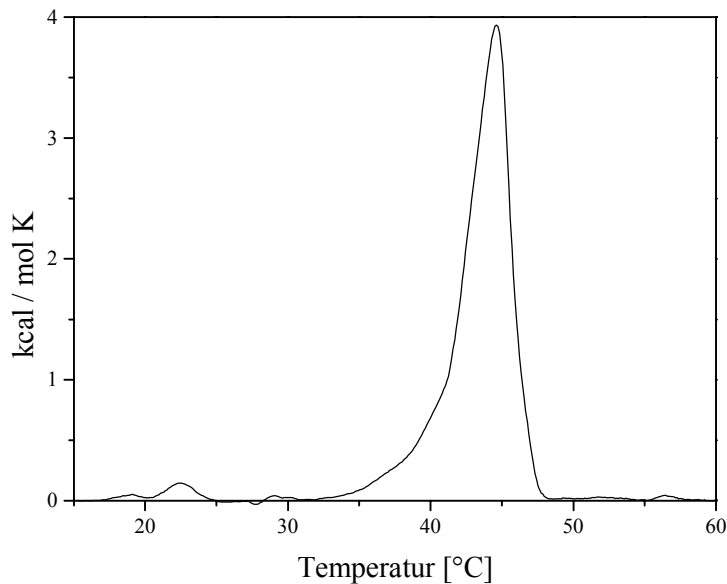


Abbildung 3.2.7-1: Normierte DSC-Aufheizkurven von PA4.

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.7-2 zeigt den C-H-Streckschwingungsbereich und Abbildung 3.2.7-3 zeigt die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur. Charakteristisch für dieses Lipid in der Tieftemperaturphase waren die im Vergleich zu DSPC und PC4 zu tieferen Wellenzahlen hin verschobene symmetrische Methylenstreckschwingung ($2847,5\text{ cm}^{-1}$) und Methylstreckschwingung ($2953,6\text{ cm}^{-1}$). Diese Bandenlage weist auf eine extrem hoch geordnete Phase hin. Die antisymmetrische Methylenstreckschwingung bei $2917,5\text{ cm}^{-1}$ war aufgespalten mit einer Schulter bei 2928 cm^{-1} (siehe Kapitel 3.2.3.2). Die Umwandlung von der Tieftemperaturphase in die LC-Phase gab sich durch eine Verschiebung des Bandenmaximums um $3,7\text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen zu erkennen.

Die IR-spektroskopisch ermittelte Phasenumwandlungstemperatur war um $4,0\text{ °C}$ höher als die aus kalorimetrischen Daten bestimmte Temperatur. Dies könnte durch Konzentrationseffekte bedingt sein, so daß die durch die DSC-Messung ermittelte Temperatur korrekt ist.

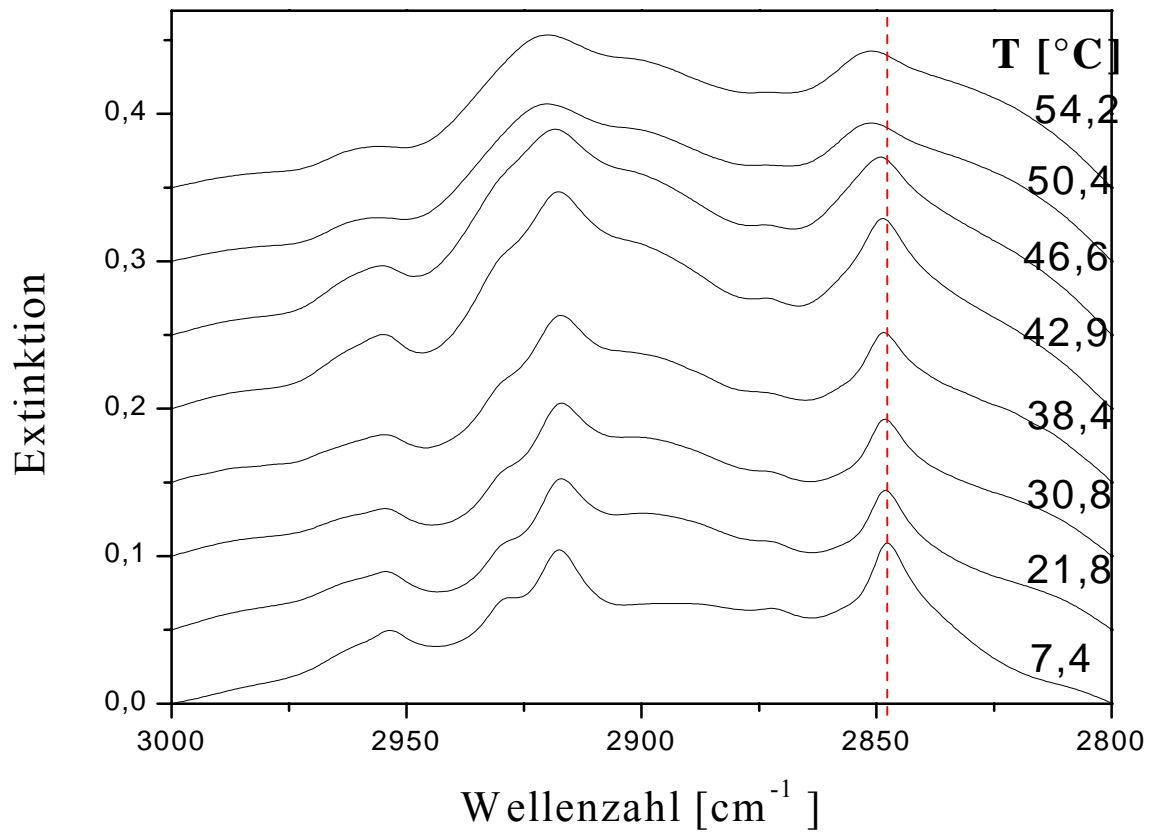


Abbildung 3.2.7-2: C-H-Streckschwingungsbereich von PA4 in 0,1 M D₂O-NaCl-Lösung, pH 7 (PA4).

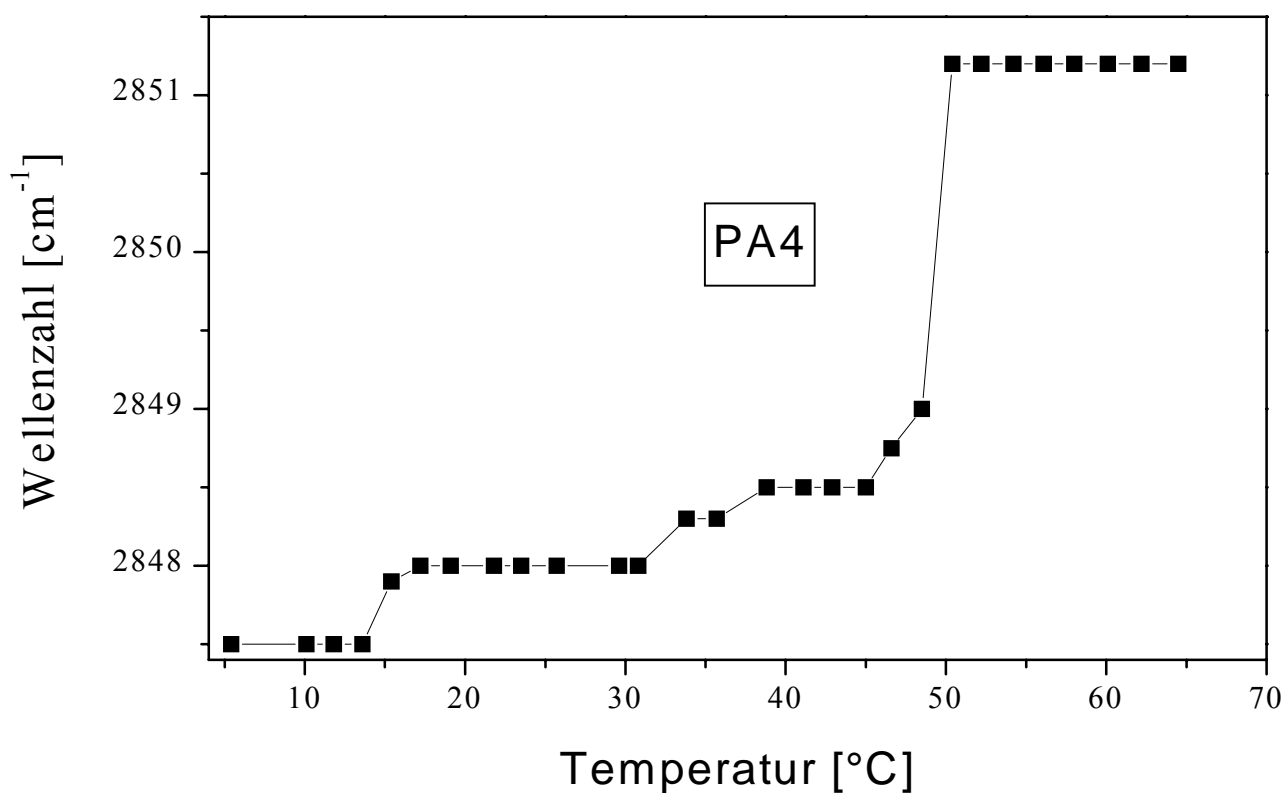


Abbildung 3.2.7-3: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PA4.

Den Spektralbereich von 1800-1660 cm⁻¹ veranschaulicht Abbildung 3.3.7-4. Die Hydratationsverhältnisse von PA4 waren mit denen von PC4 vergleichbar, nur daß eine Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Spektren durch die Vorgabe von drei statt zwei Einzelbanden erzielt werden. Dabei ergaben sich ungewöhnlich hohe Frequenzen für die simulierten Carbonylbanden 1.

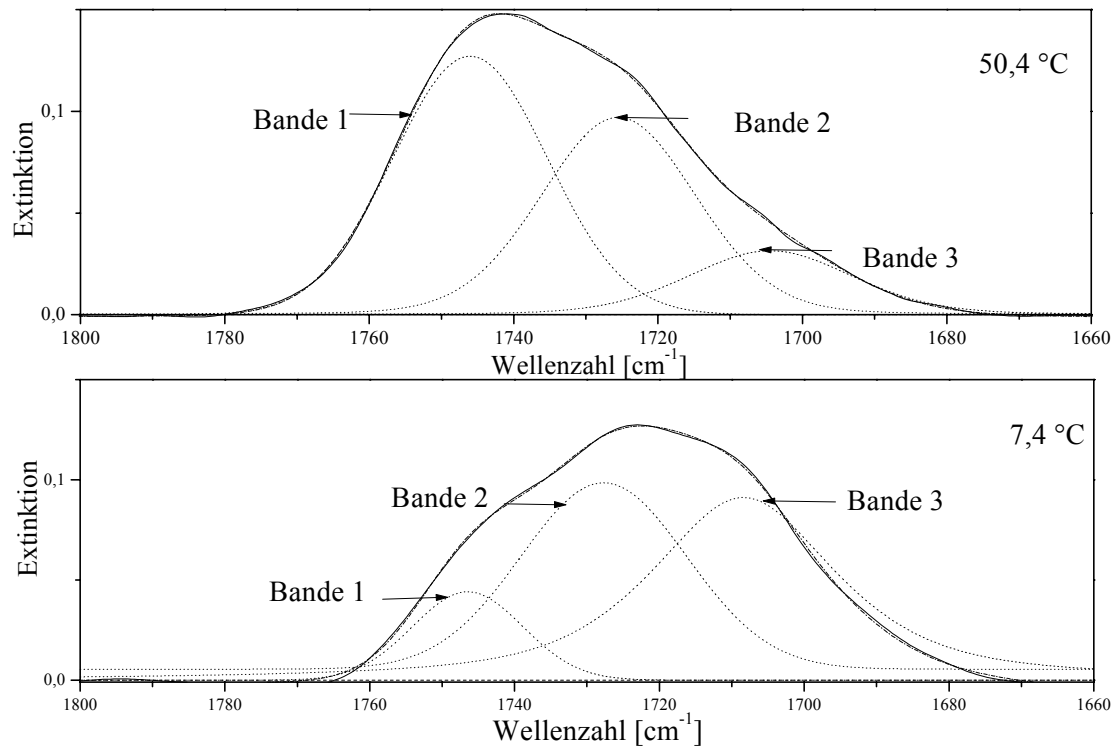


Abbildung 3.2.7-4: Carbonylbanden von PA4 bei pH 7 (PA4^-) oberhalb und unterhalb von T_m ($44,6\text{ °C}$). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Wie bei PC lag auch bei PA4 das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve unterhalb des Hauptphasenübergangs bei tieferen Wellenzahlen (1722 cm^{-1}) im Vergleich zu DSPC. Es verschob sich in der LC-Phase zu höheren Wellenzahlen (1742 cm^{-1}). Mit dem Phasenübergang nahm die integrale Intensität der Bande 1 auf Kosten von Bande 2 und 3 zu, während DSPC genau das gegenteilige Verhalten zeigte.

3.2.8 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidsäure (**2b**)

Kalorimetrie

Tabelle 3.2.8-1 und Abbildung 3.2.8-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter. Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**2b**) ergab einen Umwandlungspeak mit Schulter unterhalb T_m . Die ungewöhnlich hohe Umwandlungsenthalpie läßt auf eine hoch geordnete Tieftemperaturphase schließen, ähnlich wie bei PA4.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PA14	38,9	-	64,8
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.8-1: Phasenumwandlungsparameter von PA14 und DSPC.

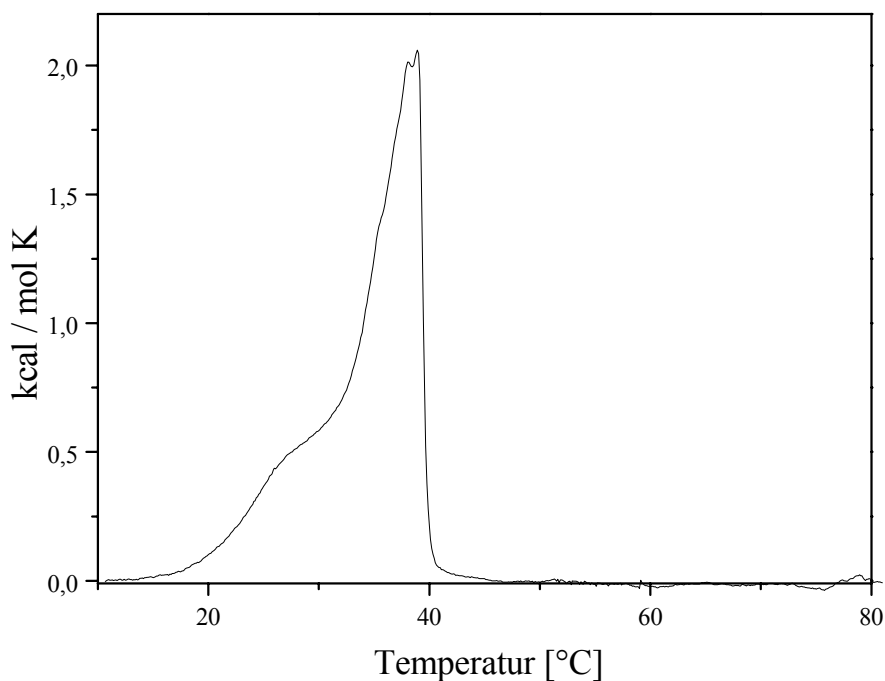


Abbildung 3.2.8-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PA14.

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.8-2 zeigt den C-H-Streckschwingungsbereich von PA14 und Abbildung 3.2.8-3 zeigt die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur für PA14.

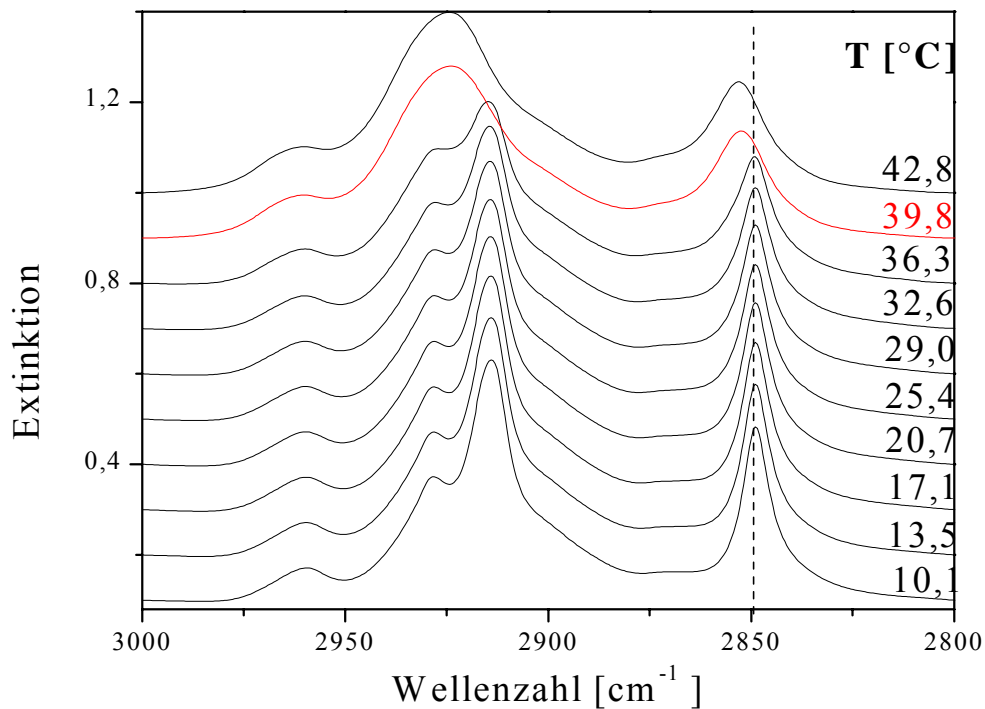


Abbildung 3.2.8-2: C-H-Streckschwingungsbereich von PA14, 0,1 M NaCl- Lösung in D_2O , pH 7 (PA14).

Die IR-spektroskopisch ermittelte Phasenumwandlungstemperatur stimmte gut mit der aus kalorimetrischen Daten bestimmten Temperatur überein. Die Umwandlung von der Tieftemperaturphase in die LC-Phase gab sich durch eine Verschiebung des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung um $3,8 \text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen zu erkennen ($2849 \rightarrow 2852,8 \text{ cm}^{-1}$). Die Aufspaltung der antisymmetrischen Methylenstreckschwingung unterhalb des Hauptphasenübergangs war höher als bei der entsprechenden 4-in Verbindung mit einer Schulter bei $2928,1 \text{ cm}^{-1}$ (siehe Kapitel 3.2.3.2 und Kapitel 3.2.4.2). Wie bei DSPC und den 14-in-Verbindungen PC14 und PG14 erschien die Methylstreckschwingung als wenig scharfe, breitere Bande bei 2959 cm^{-1} .

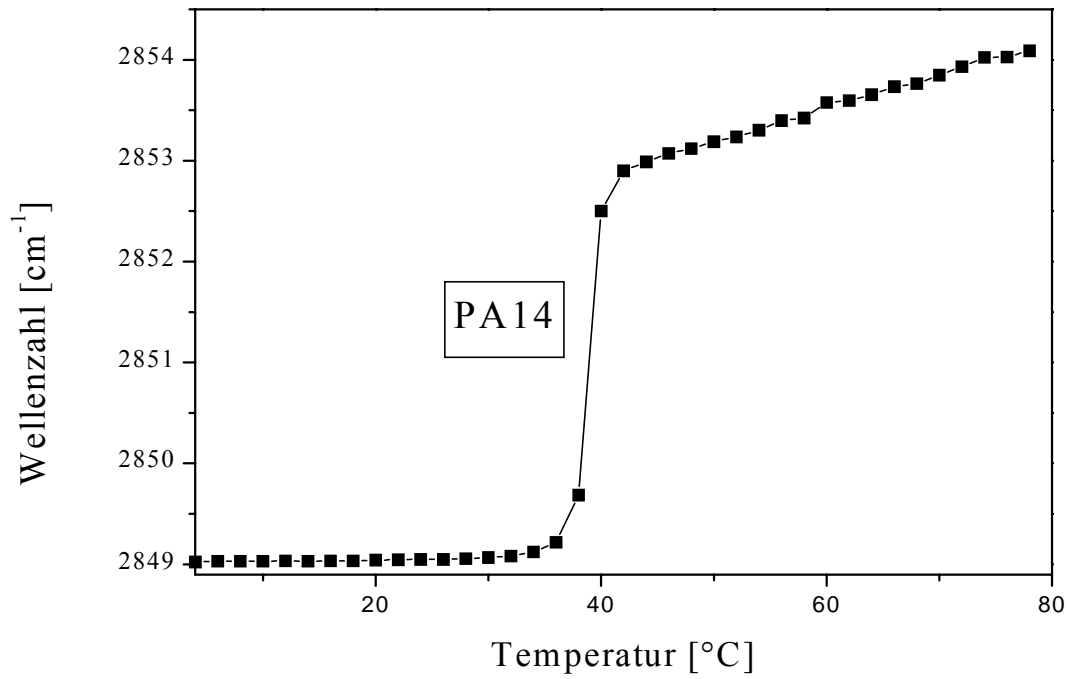


Abbildung 3.2.8-3: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PA14.

Spektren im Wellenzahlbereich von 1800 –1660 cm⁻¹ vor und nach der Phasenumwandlung zeigt Abbildung 3.2.8-4.

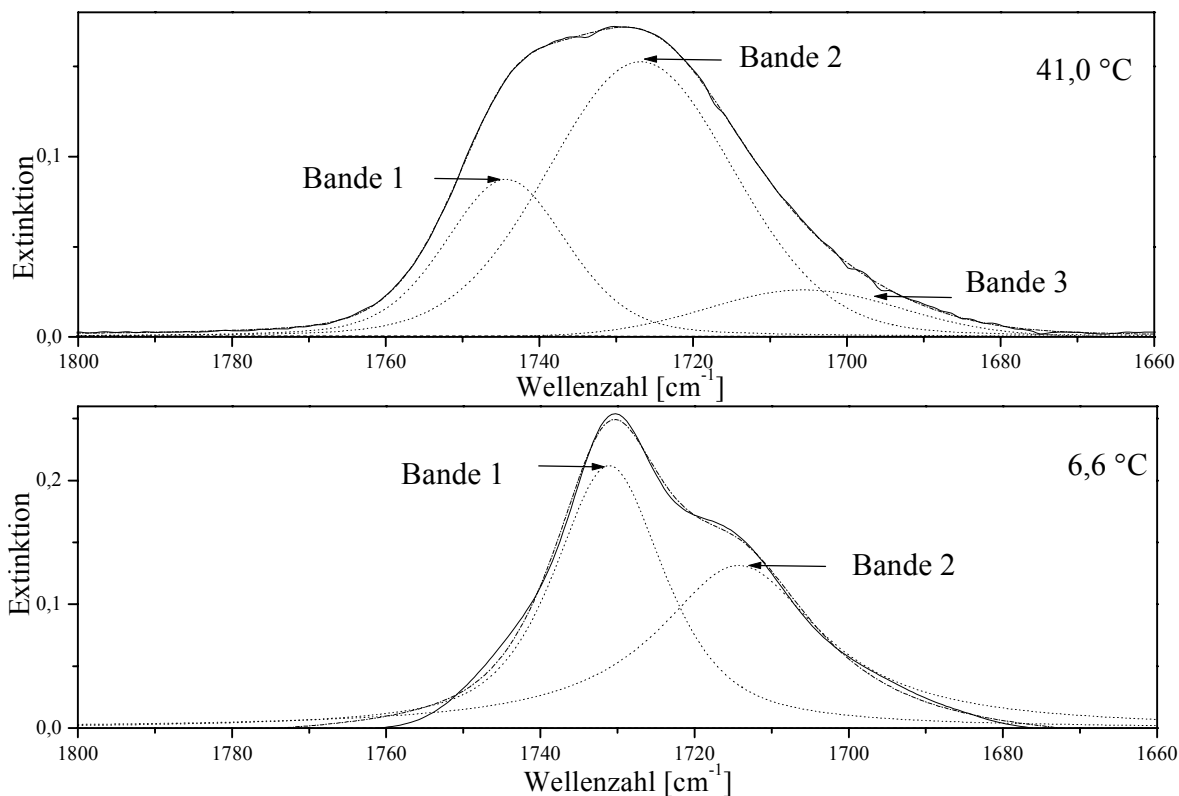


Abbildung 3.2.8-4: Carbonylbanden von PA14 bei pH 7 (PA14⁻) oberhalb und unterhalb von T_m (38,9 °C). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Der Hydratisierungsgrad von PA14 entsprach dem von DSPC. Das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve verschob sich mit dem Übergang in die LC-Phase um 1 cm⁻¹ zu niedrigeren Wellenzahlen (1729 cm⁻¹). Ebenso nahm die integrale Intensität der Banden 2 (1727 cm⁻¹) und 3 (1706 cm⁻¹) auf Kosten der Bande 1 (1744 cm⁻¹) zu.

Abbildung 3.2.8-5 zeigt IR-Spektren von PA14 im Wellenzahlbereich von 1500 bis 1000 cm⁻¹ und in Tabelle 3.2.8-2 erfolgt die Zuordnung der Banden.

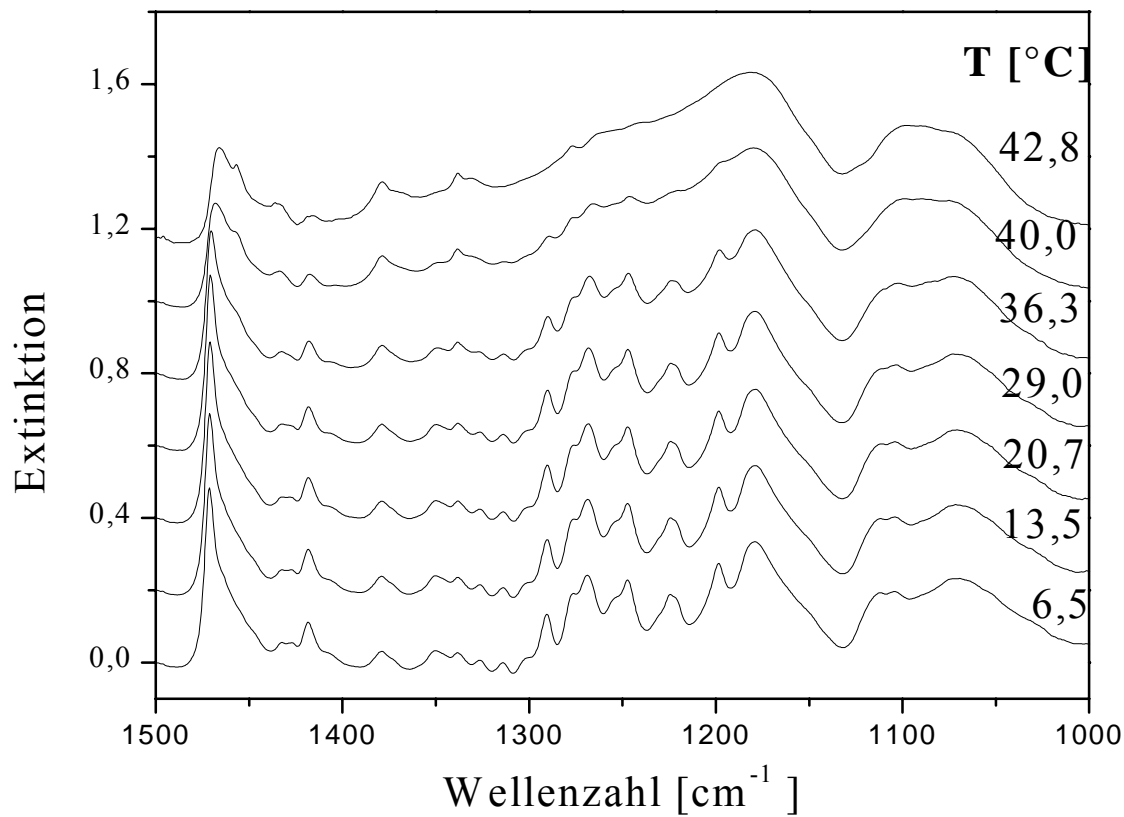


Abbildung 3.2.8-5: IR-Spektren von PA14 in NaCl-Lösung, pH 7 (PA14⁻) im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm⁻¹.

Bei 1471 cm⁻¹ war die intensive, jedoch weniger scharfe Bande der CH₂-Scherschwingung der Fettsäureketten zu finden. Die Progressionen der Kippschwingungen der Fettsäureketten waren besonders intensiv und traten im Bereich von 1289 bis 1198 cm⁻¹ in der Tieftemperaturphase auf. Die antisymmetrische PO₂⁻-Streckschwingung absorbierte bei 1181 cm⁻¹ und die symmetrische PO₂⁻-Streckschwingung bei 1072 cm⁻¹. Die Verschiebung dieser Banden zu tieferen Wellenzahlen im Vergleich zu DSPC wurde durch die Änderung der Kopfgruppenladung verursacht. Eine ungewöhnliche Absorption trat bei 1112 cm⁻¹ in der Tieftemperaturphase auf.

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Bemerkung
1471	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1433		Schulter, nicht zugeordnet
1418	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	Schulter
1379	$\delta_s(\text{CH}_3)$	
1350		möglicherweise $\gamma(\text{CH}_2)_n$, dg Konformation, verschwindet $>T_m$, (Tuchtenhagen, J., 1994)
1338		eg Konformation
1289-1198	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	5 Progressionsbanden
1181	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig,
1175	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$	Schulter
1112		verschwindet $>T_m$,
1072	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig

Tabelle 3.2.8-2: Absorptionsbanden von PA14 in NaCl-Lösung, pH 7 im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm⁻¹.

Röntgenbeugung

Abbildung 3.2.8-6 zeigt ausgewählte Streudiagramme von PA14 die die auftretenden Phasen charakterisieren.

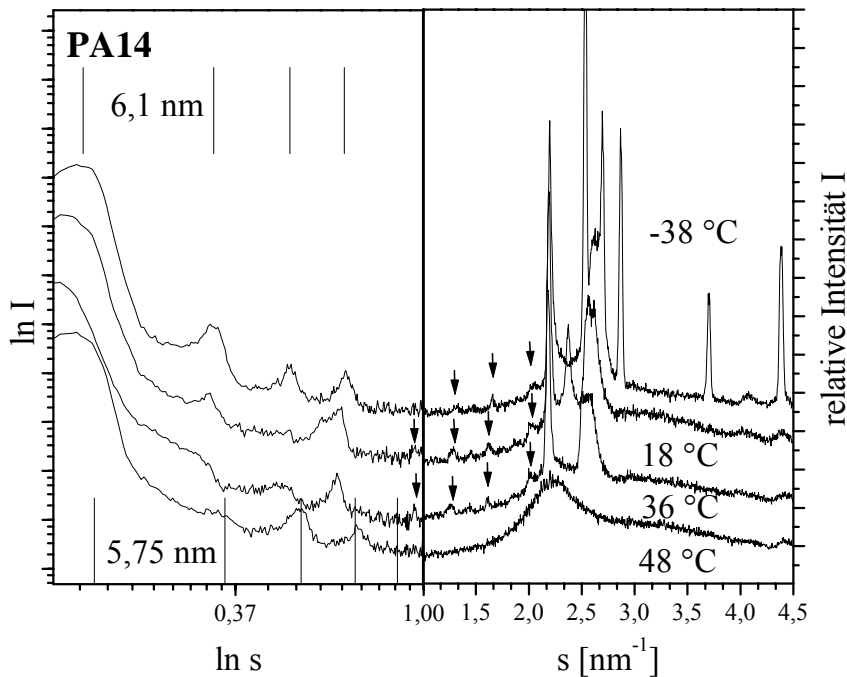


Abbildung 3.2.8-6: Charakteristische Streudiagramme der Phase SG3+Eis (oben), SG3 (temperaturabhängig) (2. Streukurve von oben), SG3+Wasser (2. Streukurve von unten) und LC (unten).

Die Reflexe im Kleinwinkelbereich zeigen, daß eine lamellare Struktur vorlag. Die Bishichtabstände sind in Abbildung 3.2.8-7 in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Sie betragen 6,1 nm bei niedrigen Temperaturen, bei denen das Wasser ausgefroren war. Nach dem Eisschmelzen nahmen die Bishichtabstände Werte auf 6,0 nm ab. Nach dem Schmelzen der Ketten trat ein weiter Rückgang auf 5,75 nm auf. Der große d-Wert bei niedrigen Temperaturen ist ein ungewöhnliches Ergebnis. Es könnte einen Hinweis darauf geben, daß die Ketten mit ihrer Achse orthogonal zur Membranebene angeordnet sind. Eine Abnahme des d-Werts mit steigender Temperatur könnte bedeuten, daß sich die Ketten mit zunehmender Hydratation relativ zur Membranebene zu neigen beginnen. Diese Annahme würde auch eine Erklärung dafür liefern, daß sich die Intensität der Kleinwinkelreflexe mit steigender Temperatur verändern. In der LC-Phase waren die 3. und 4. Ordnung intensiv ausgeprägt.

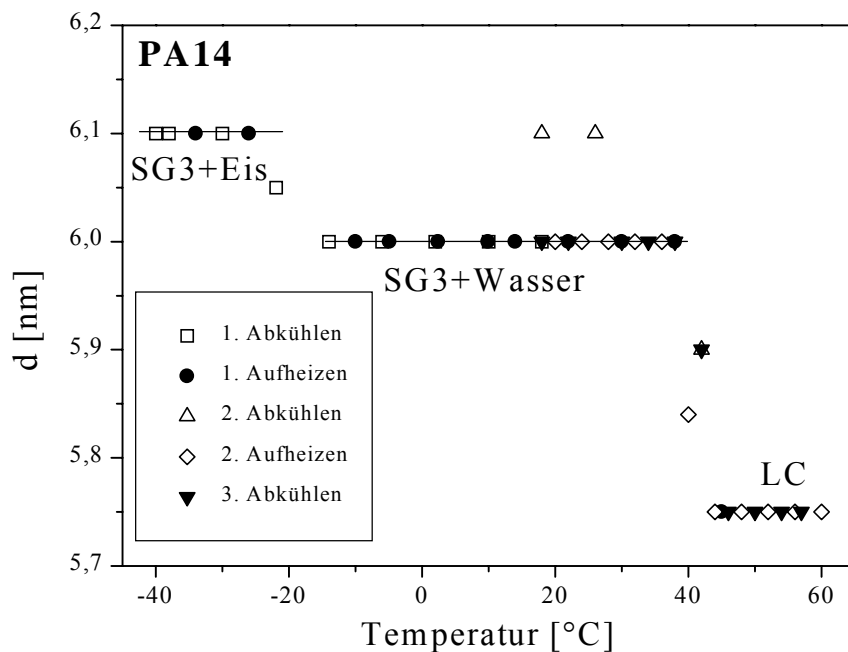


Abbildung 3.2.8-7: Temperaturabhängigkeit der Bilschichtabstände von PA14 beim wiederholten Aufheizen und Abkühlen.

Die Streureflexe im Weitwinkelbereich zeigten wie bei der Verbindung PE4 zusätzliche Reflexe eines Molekülgitters mit sehr kleiner Intensität bei $s = 2,01 \text{ nm}^{-1}$, $1,60 \text{ nm}^{-1}$, $1,26 \text{ nm}^{-1}$ und $2,33 \text{ nm}^{-1}$ (siehe Abbildung 3.2.8-6). Ein scharfer Reflex und ein breiter Reflex mit sehr starker Intensität stammen wie bei den übrigen Lipiden von der Kettenpackung. Die relativ scharfe Ausprägung des breiten Reflexes, der einen Doppelreflex darstellt (siehe Abbildung 3.2.8-8), kann mit einer Ausrichtung der Acylketten mit der Kettenachse senkrecht zur Membranebene gedeutet werden. Die Zusatzreflexe des Molekülgitters weisen wie bei PE4 auf die Existenz einer Subgelphase hin, die hier mit der Abkürzung SG3 bezeichnet werden soll. Diese Subgelphase zeigte jedoch charakteristische Veränderungen. Nach dem Verschwinden der Eisreflexe bei -14 °C erschien reversibel bei $s = 2,333 \text{ nm}^{-1}$ ein neuer Reflex, der bis 18 °C existent war. Bei Temperaturen oberhalb 18 °C verschwand der Reflex bei $s = 2,333 \text{ nm}^{-1}$ und wurde erst beim Abkühlen wieder registriert. Die kalorimetrischen Untersuchungen ergaben bei 18 °C keinen Phasenübergang, so daß die Existenz dieses Zusatzreflexes mit temperaturabhängigen Veränderungen in der Packung der Phase SG3 zusammenhängen muß. Es handelte sich bei der vorliegenden Subgelphase wie bei PE4 nicht um eine L_c -Phase des DPPC (Stümpel, J., 1981), da sich die bei PA14 vorliegenden Reflexlagen der Zusatzreflexe von der

Phase L_c' unterscheiden. Das Phasenverhalten kann mit folgendem Polymorphieschema beschrieben werden: SG3+Eis (-10 °C) \rightarrow SG3 (40 °C) \rightarrow LC.

Da bei der Verbindung PA14 viele scharfe Zusatzreflexe gemessen werden konnten wurden Indizierungsversuche unternommen und jeweils die Gitterparameter bestimmt. In einem „trial and error“ Verfahren wurden drei Packungsmodelle dahingehend untersucht, ob sich die gemessenen Streukurven nach entsprechender Indizierung und Berechnung gemittelter Gitterparameter zufriedenstellend reproduzieren lassen. Folgende Subzellen wurden den Versuchen zugrunde gelegt: $O\perp$, da sie der Grundbaustein der Hybridsubzelle HS1 ist, $O\perp'$, da sie der Grundbaustein der Hybridsubzelle HS2 ist und $O\parallel$, da eine parallele Lage der Kohlenwasserstoffketten in der Kristallstruktur der Phosphatidsäure nachgewiesen wurde.

Zur Analyse wurden mit dem peakfit Modul des Programms Origin 4.1 die experimentelle Streukurve bei 20 °C in die Reflexe zerlegt. Abbildung 3.2.8-8 zeigt die so erhaltene Fitkurve.

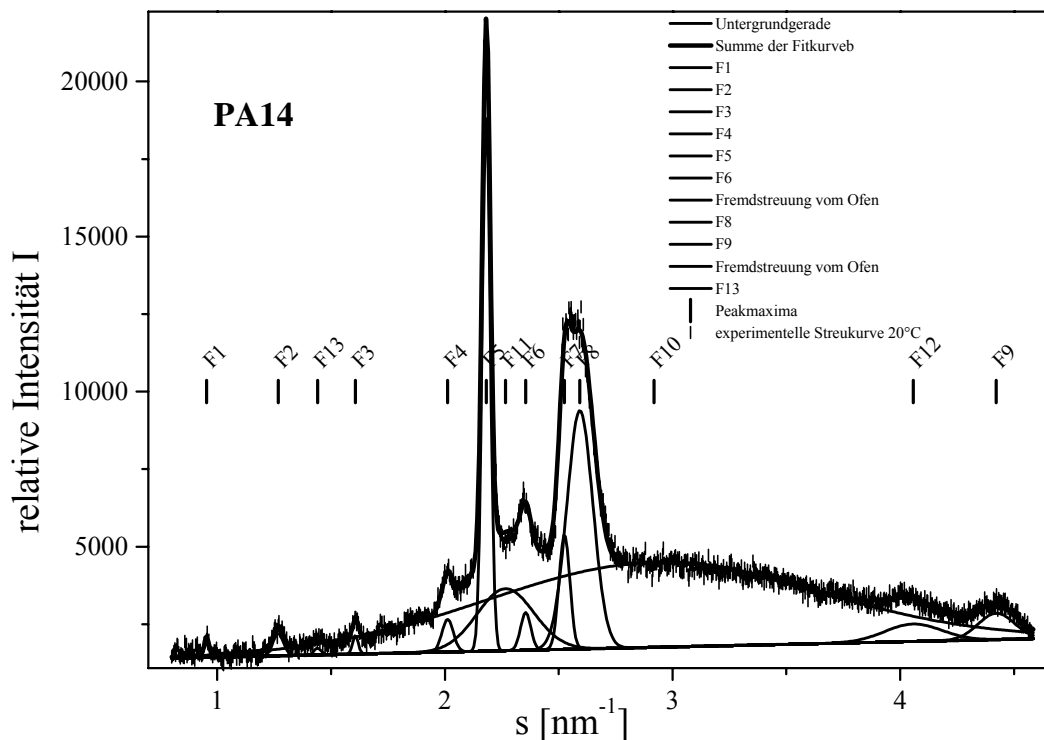


Abbildung 3.2.8-8: Zerlegung der experimentellen Streukurve von PA14 bei 20 °C in unterschiedliche Streubeiträge (Gaußprofile).

Die Vorlagen für die unterschiedlichen Hybridsubzellen sind aus Ergebnissen der Röntgenkristall-Strukturanalyse abgeleitet und vereinen die Packungsprinzipien

unterschiedlicher Subzellen. Beispielweise sind in HS1 Elemente der Subzellen O_{\perp} und T_{\parallel} (Abrahamsson, S. *et al.*, 1978).

Als erste Näherung wurden die intensiven Reflexe der Verbindung PA14 indiziert, als ob eine echte Packung O_{\perp} vorliegen würde. Abbildung 3.2.8-9 zeigt ein Modell einer solchen Packung mit den dazugehörigen Netzebenen.

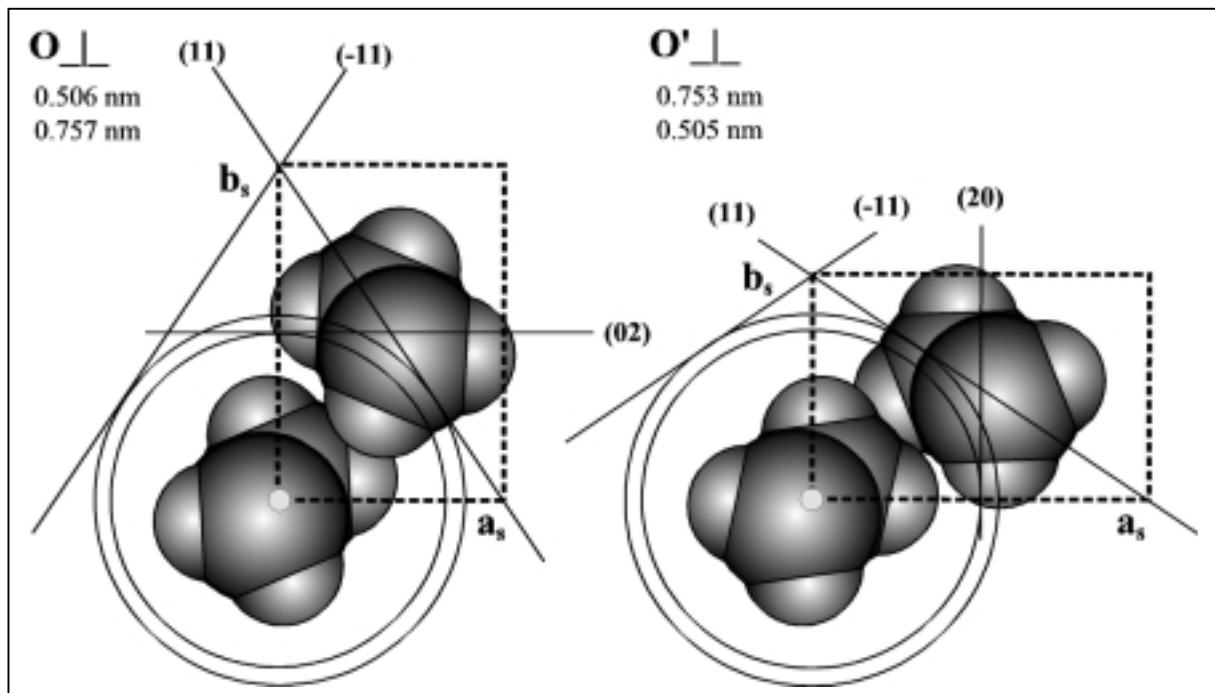


Abbildung 3.2.8-9: Modelle der Subzelle O_{\perp} (links) und O'_{\perp} (rechts) mit den dazugehörigen Netzebenen.

Den Hauptreflexen wurden folgende Netzebenen zugeordnet:

Reflex F5: Indices (11) (-11) $\rightarrow s = 2,182 \text{ nm}^{-1}$

Reflex F8: Index (02) $\rightarrow s = 2,593 \text{ nm}^{-1}$

Für den reziproken Netzebenenabstand s gilt folgende Gleichung:

$$s_{hk}^2 = h^2/a^2 + k^2/b^2. \quad \text{Gleichung 3.2.8-1}$$

$$\text{Mit } s_{11}^2 = s_{-11}^2 = 1^2/a^2 + 1^2/b^2 = 2,182^2 \text{ (nm}^{-1}\text{)}^2 \quad \text{Gleichung 3.2.8-2}$$

$$\text{und } s_{02}^2 = 0^2/a^2 + 2^2/b^2 = 2,593^2 \text{ (nm}^{-1}\text{)}^2 \quad \text{Gleichung 3.2.8-3}$$

ergaben sich für die Subzelle O_{\perp} folgende Werte:

$a_s = 0,570$ nm und $b_s = 0,770$ nm.

Für die Hybridsubzelle HS1, die Abbildung 3.2.8-10 zeigt, folgen daraus in guter Näherung die Gitterparameter:

$a = 1,140$ nm und $b = 0,771$ nm, da HS1 aus O_{\perp} durch Verdopplung der Gitterkonstante a entsteht.

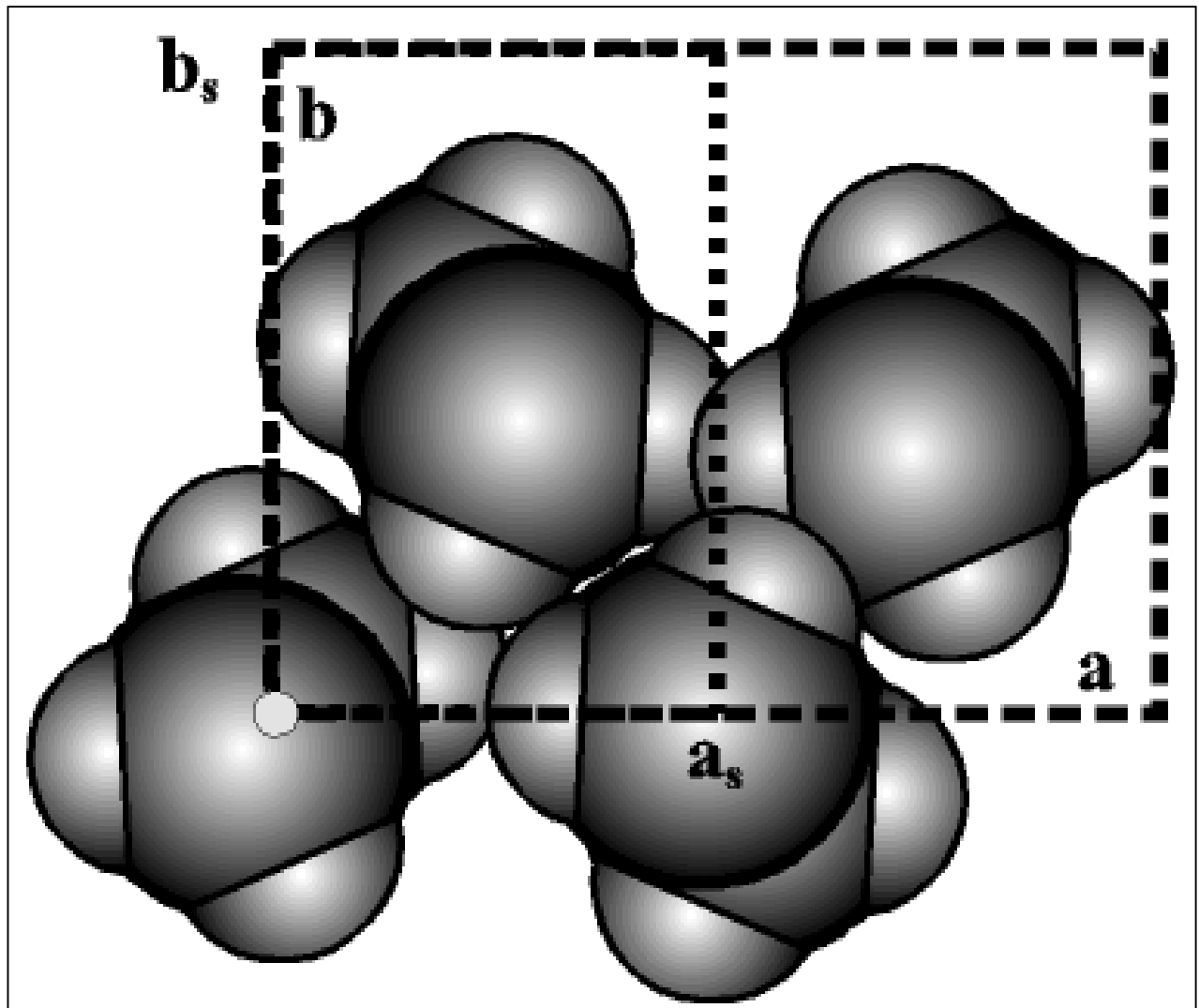


Abbildung 3.2.8-10: Modell der Hybridsubzelle HS1.

Anschließend wurde versucht, alle Reflexe im 2D reziproken Gitter graphisch zu indizieren, um dann mittels „least square“ Verfahren die Gitterparameter zu verfeinern. Bei diesem Verfahren werden Reflexe ausgewählt und Netzebenen zugeordnet. Daraus ergaben sich veränderte Gitterkonstanten sowie der Winkel γ . Abbildung 3.2.8-11 zeigt das reziproke Gitter der Hybridsubzelle, bevor das „least square“ Verfahren angewandt wurde. Wie aus

Abbildung 3.2.8-11 deutlich wird, konnten nicht allen Reflexen Netzebenen zugeordnet werden. Das „least square“ Verfahren lieferte jedoch keine besseren Ergebnisse. Deshalb wurde mit einem anderen Typ von Subzelle ein weiterer Versuch gestartet.

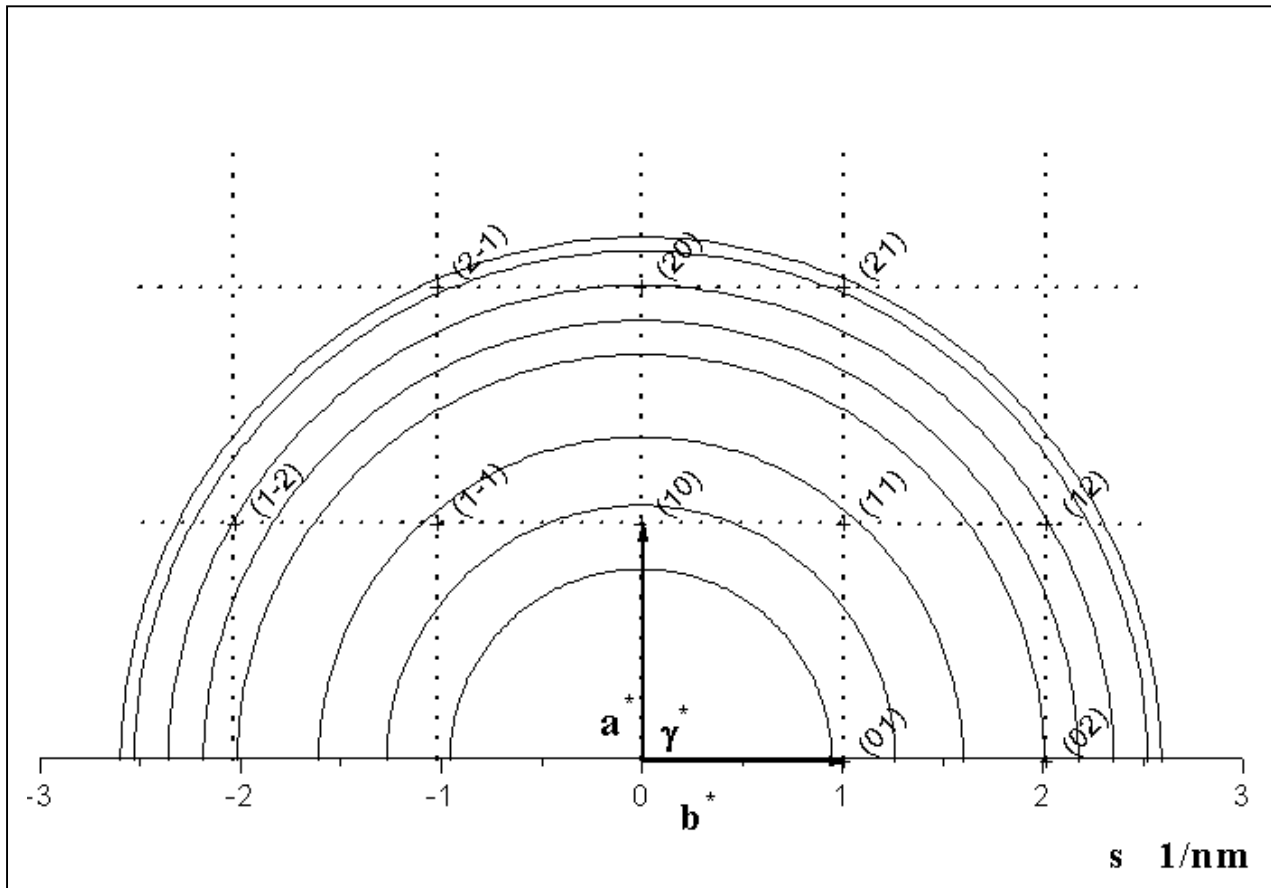


Abbildung 3.2.8-11: Reziprokes Gitter einer Subzelle HS1 mit den zuvor errechneten Gitterparametern $a = 1,140 \text{ nm}$ und $b = 0,771 \text{ nm}$ und einem Winkel $\gamma = 90^\circ$. Die Kreise wurden aus den experimentell erhaltenen Reflexen berechnet.

Die Hybridsubzelle HS2 soll die Eigenheiten der Packung der Subzellen $O_{\perp'}$, O_{\perp} , O'_{\parallel} , M_{\parallel} und T_{\parallel} vereinen (Abrahamsson, S. *et al.*, 1978). Als erste Näherung wurden bei HS2 die intensiven Reflexe indiziert, als ob eine echte Packung $O_{\perp'}$ (siehe Abbildung 3.2.8-9, rechts) vorliegen würde. Den Hauptreflexen wurden folgende Netzebenen zugeordnet:

Reflex F5: Indices (11) (-11) $\rightarrow s = 2,182 \text{ nm}^{-1}$

Reflex F8: Index (20) $\rightarrow s = 2,593 \text{ nm}^{-1}$

Auf dem gleichen Weg wie beim ersten Indizierungsversuch ergaben sich für die Subzelle $O_{\perp'}$ folgende Gitterparameter:

$a_s = 0,570 \text{ nm}$ und $b_s = 0,7710 \text{ nm}$.

In Abbildung 3.2.8-12 ist dargestellt, wie aus den Gitterparametern der Subzelle O_{\perp} die Abmessung der Hybridsubzelle HS2 berechnet werden kann (Abrahamsson, S. *et al.*, 1978).

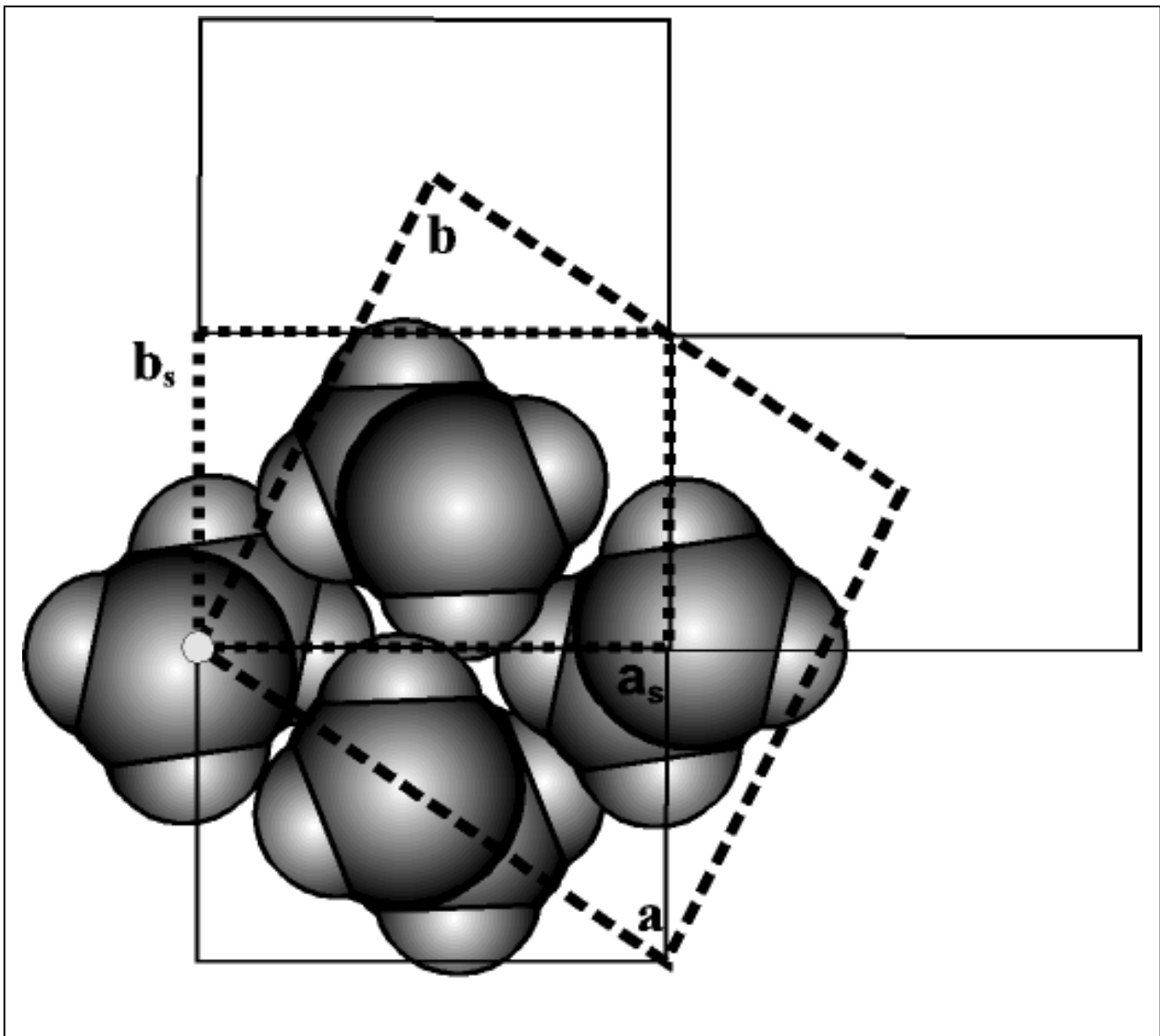


Abbildung 3.2.8-12: Zusammenhang von HS2 (gestrichelt) und O_{\perp} (punktirt). Die Netzebenen (-11), (11) und (20) der Subzelle O_{\perp} erhalten in HS2 die Indices (2-1), (02) und (21).

Eine erste Näherung für die Gitterkonstanten von HS2 führte zu folgenden Parametern:

$$a = 0,958983645 \text{ nm}, b = 0,937859 \text{ und } \gamma = 102,2^\circ.$$

Anschließend wurde versucht, alle Reflexe im 2D reziproken Gitter graphisch zu indizieren, um dann mittels „least square“ Verfahren die Gitterparameter zu verfeinern. Dieses Verfahren lieferte auch bei HS2 kein verbessertes Ergebnis.

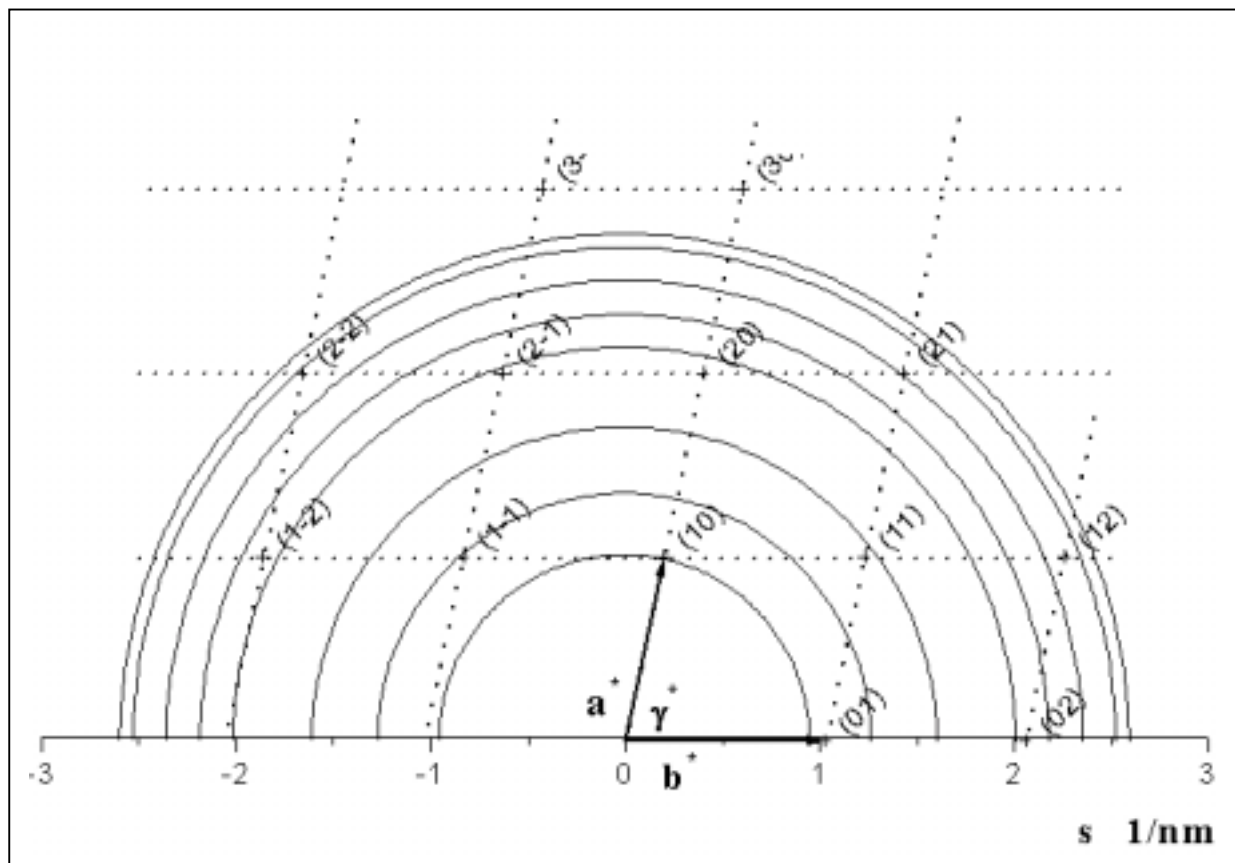


Abbildung 3.2.8-13: Reziprokes Gitter einer Subzelle HS2 mit den zuvor errechneten Gitterparametern $a = 0,959$ nm, $b = 0,938$ und $\gamma = 102,2^\circ$. Die Kreise wurden aus den experimentell erhaltenen Reflexen berechnet.

Ein Vergleich der gemessenen und berechneten Reflexlagen (siehe Abbildung 3.2.8-13) legte den Schluß nahe, daß noch nicht die richtige Indizierung gefunden wurde. Literaturdaten aus Einkristalluntersuchungen zeigen, daß DMPA·Na einzigartige Strukturbesonderheiten aufweist (Sundell, S., 1994) und eine triklinische Subzelle $T_{||}$ besitzt:

- geneigte Ketten in der B-Schicht (PE: senkrecht),
- Glycerin-backbone liegt parallel zur Oberfläche (PE: senkrecht),
- zick-zack-Ebenen der Ketten sind parallel - $T_{||}$ (PE: unter einem Winkel zueinander - HS1).

Aus den Gitterparametern der triklinen Subzelle T|| wurden folgende Daten für eine zweidimensionale Packung der Ketten verwendet (siehe Abbildung 3.2.8-14) (Sundell, S., 1994):

- $a_s = 4,26 \text{ \AA}$, daraus ergibt sich in der Zeichenebene: $a_s' = a_s \sin\beta$ **Gleichung 3.2.8-4**

- $b_s = 5,25 \text{ \AA}$, daraus ergibt sich in der Zeichenebene: $b_s' = a_s \cdot \sin\alpha$ **Gleichung 3.2.8-5**

- $c_s = 2,53 \text{ \AA}$

- $\beta_s = 96^\circ$, $\alpha_s = 66^\circ$, $\gamma_s = 114^\circ$

Im Fall von PA14 lag ein aufgeweitetes Gitter vor, bei dem die Gitterparameter der triklinen Subzelle zu einer neuen Subzelle O|| aufgeweitet wurden (Abrahamsson, S. *et al.*, 1978). Deshalb wurde die Indizierung in einer Subzelle O|| vorgenommen. Abbildung 3.2.8-15 veranschaulicht die Subzelle des neuen Molekülgitters. Es gelten die Beziehungen:

$$a = 2 a_s' \quad \text{Gleichung 3.2.8-6}$$

$$b^2 = (a_s')^2 - (2 b_s')^2 \quad \text{Gleichung 3.2.8-7}$$

Daraus ergeben sich $a = 0,847 \text{ nm}$, $b = 0,986 \text{ nm}$, $\gamma = 90^\circ$.

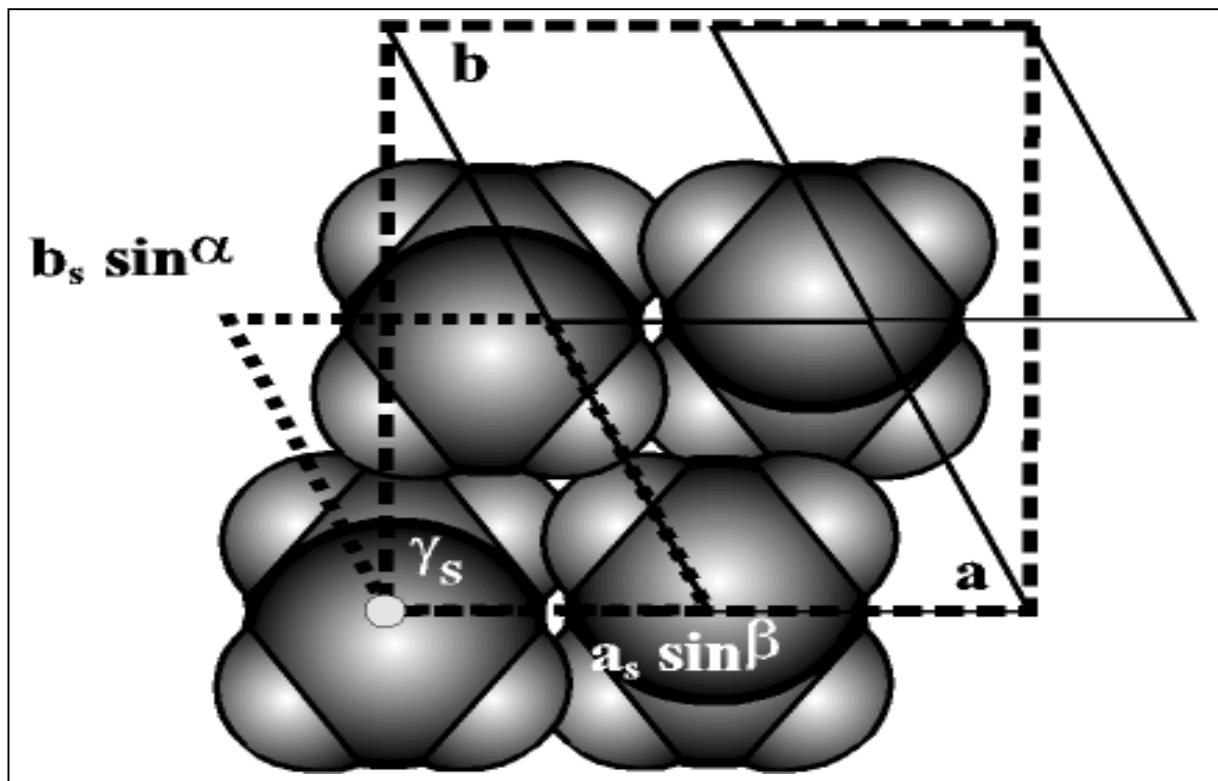


Abbildung 3.2.8-14: Übergang von $T_{||}$ zu $O_{||}$. Es ergibt sich ein aufgeweitetes Molekülgitter mit den Gitterkonstanten a und b .

Anschließend wurde eine Indizierung mit den neu berechneten Netzebenenabständen durchgeführt. Abbildung 3.2.8-15 zeigt, daß die gefundenen Reflexe sehr gut dem Model entsprachen.

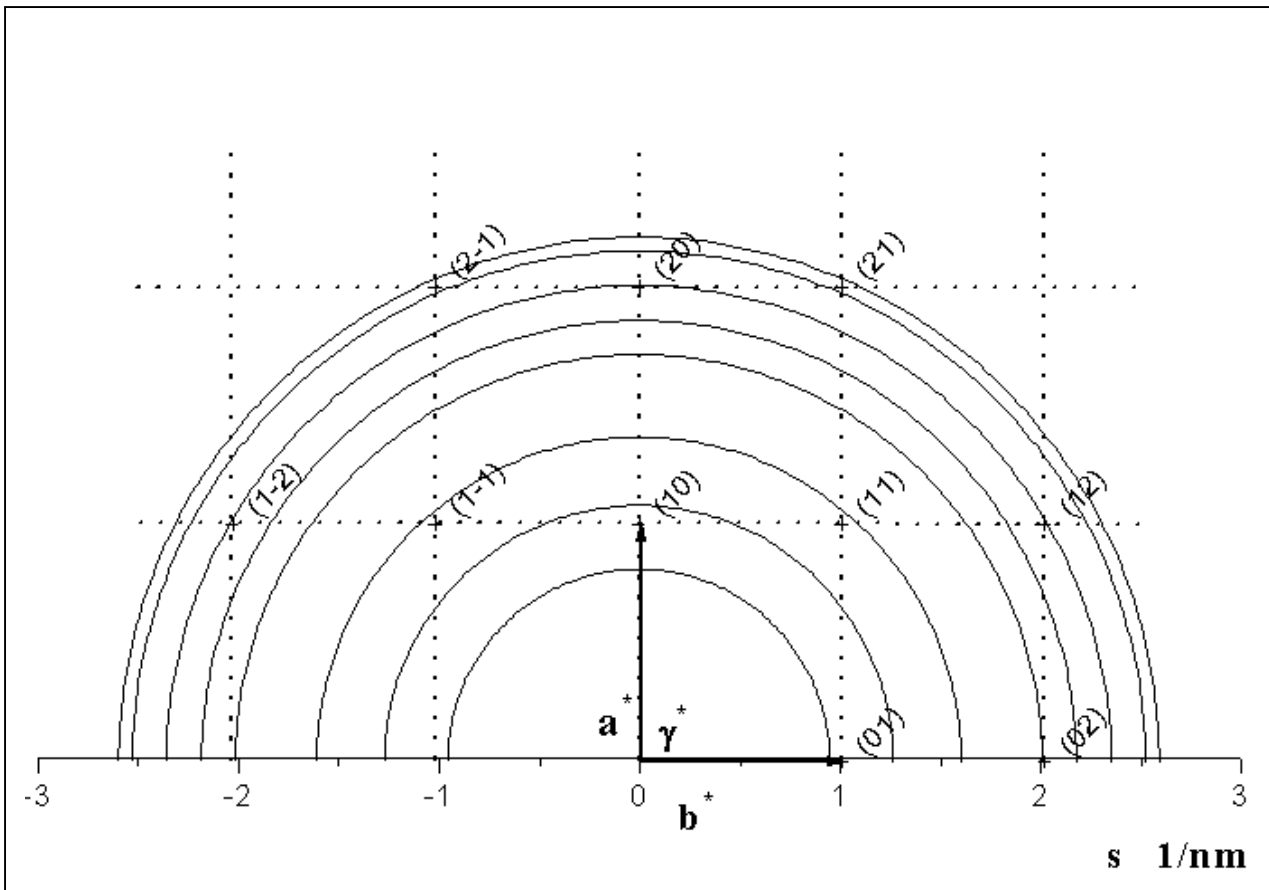


Abbildung 3.2.8-15: Reziprokes Gitter einer Subzelle $O||$ mit den zuvor errechneten Gitterparametern $a = 0,847 \text{ nm}$, $b = 0,986 \text{ nm}$, $\gamma = 90^\circ$. Die Kreise wurden aus den experimentell erhaltenen Reflexen berechnet.

Durch eine „least square“-Mittelung für $O||$, bei der die intensivsten Reflexe, die durch die Kettenpackung der Fettsäuren verursacht werden, herausgelassen wurden, konnten alle übrigen Reflexe indiziert werden. Es ergaben sich neue Gitterparameter, die gut mit den ursprünglich errechneten übereinstimmten:

- $a = 0,852 \text{ nm}$, $b = 0,988 \text{ nm}$, $\gamma = 90^\circ$.

Somit ist die Subzelle $O||$ ein geeignetes Modell für die Packung der Lipidmoleküle der Verbindung PA14, die dazu den Vorzug hat, auf den Packungseinheiten der Phosphatidsäure mit gesättigten Ketten aufzubauen.

3.2.9 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylserin (**1e**)

Tabelle 3.2.9-1 und Abbildung 3.2.9-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter. Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**1e**) war breiter als bei DSPC. Die Umwandlungsenthalpie läßt auf Ordnungsverhältnisse wie bei DSPC schließen.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PS4	33,7	-	44,7
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.9-1: Phasenumwandlungsparameter von PS4 und DSPC.

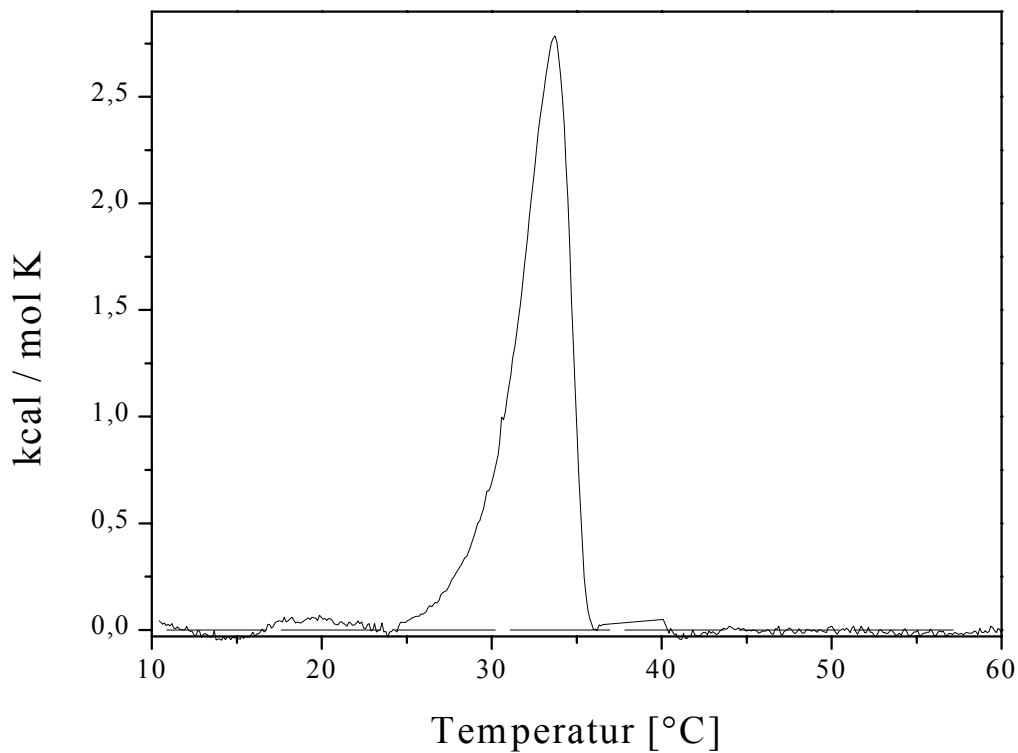


Abbildung 3.2.9-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PS4.

3.2.10 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylserin (**2e**)

Kalorimetrie

Tabelle 3.2.10-1 und Abbildung 3.2.10-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter. Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**2e**) ergab einen Umwandlungspeak mit Schulter oberhalb T_m . Die Umwandlungsenthalpie war höher als bei PS4, doch die T_m -Werte beider Verbindungen hatten erwartungsgemäß die gleiche Größenordnung.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PS14	32,6	-	57,1
DSPC	54,7	51,4	46,1

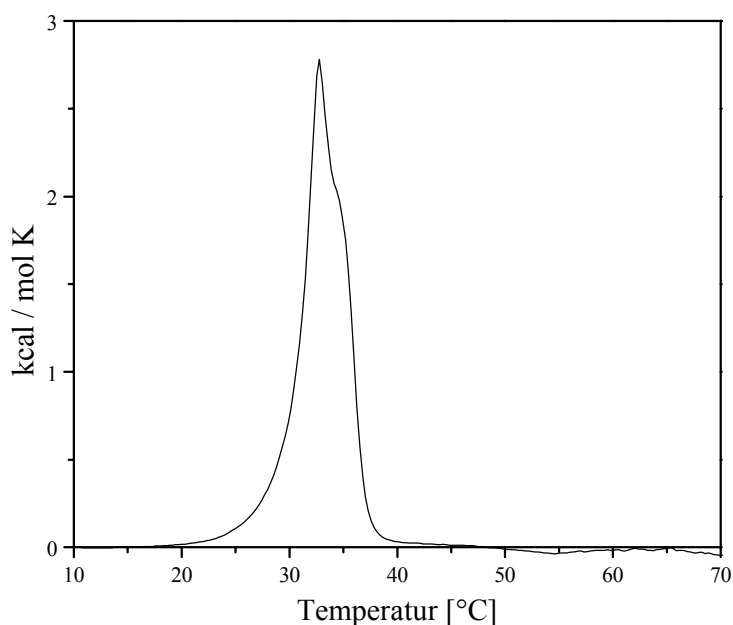


Tabelle 3.2.10-1: Phasenumwandlungsparameter von PS14 und DSPC.

Abbildung 3.2.10-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PS14.

FT-IR-Spektroskopie

Abbildung 3.2.10-2 zeigt den C-H-Streckschwingungsbereich und Abbildung 3.2.10-3 zeigt die Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung als Funktion der Temperatur für PS14. Die IR-spektroskopisch ermittelte Phasenumwandlungstemperatur stimmte gut mit der aus kalorimetrischen Daten bestimmten Temperatur überein.

In der Tieftemperaturphase waren die Bandenmaxima der symmetrischen Methylenstreckschwingung ($2849,5 \text{ cm}^{-1}$) zu höheren und der antisymmetrischen Methylenstreckschwingungen (2915 cm^{-1}) bei tieferen Wellenzahlen im Vergleich zu DSPC lokalisiert. In der LC-Phase waren die Bandenmaxima beider Schwingungen zwischen $1,8 - 2,3 \text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen verschoben. Die antisymmetrische Methylenstreckschwingung war unterhalb des Hauptphasenübergangs aufgespalten (siehe Kapitel 3.2.3.2), mit einer Schulter bei 2928 cm^{-1} . Die Methylstreckschwingung (2960 cm^{-1}) erschien wie bei DSPC und den Verbindungen PC14, PG14 und PA14 als breitere Bande (2960 cm^{-1}).

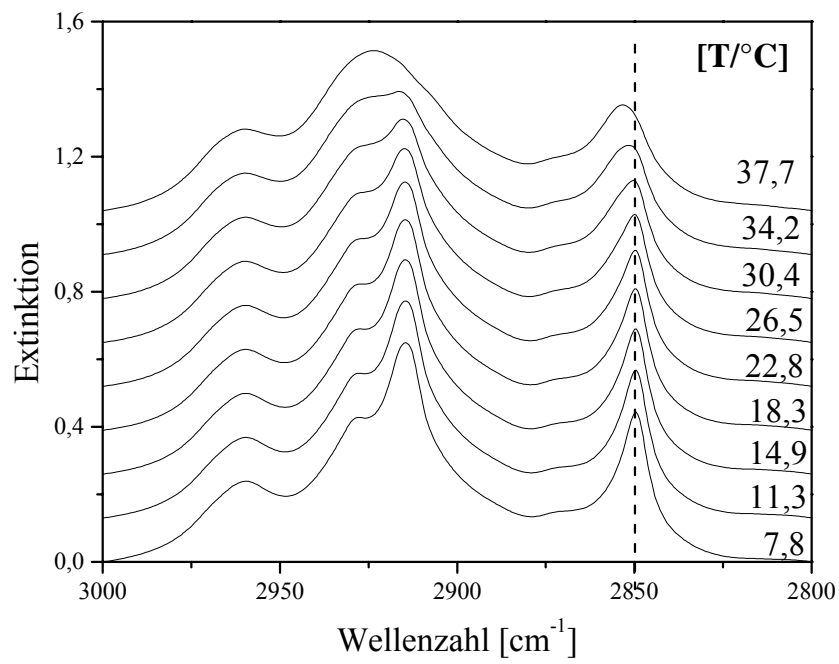


Abbildung 3.2.10-2: C-H-Streckschwingungsbereich von PS14 in 0,1 M D₂O-NaCl-Lösung pH 7.

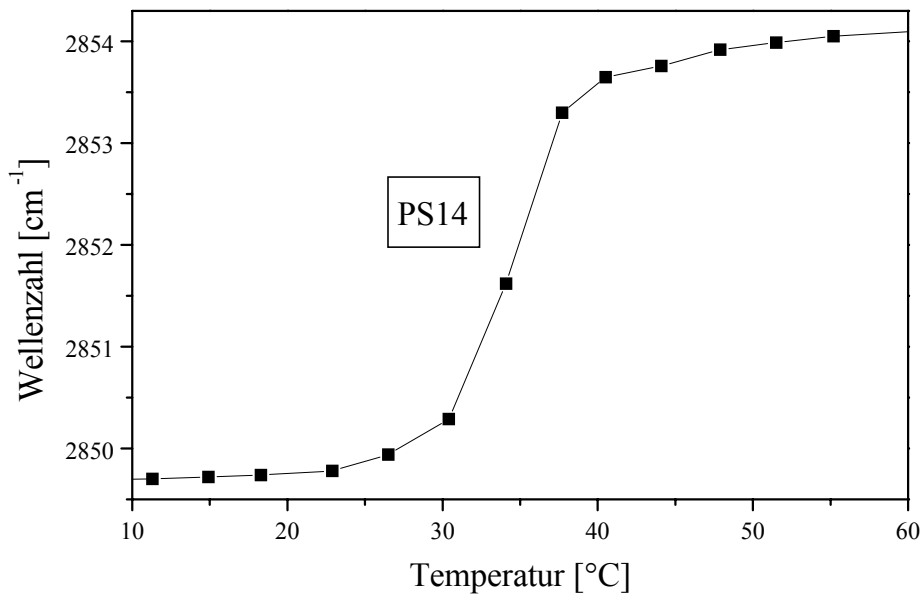


Abbildung 3.2.10-3: Temperaturabhängigkeit der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung von PS14.

Abbildung 3.2.10-4 veranschaulicht den Spektralbereich von 1800-1660 cm⁻¹ oberhalb und unterhalb T_m. Im Gegensatz zu DSPC verschob sich das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve mit dem Übergang in die LC-Phase um 10 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen (1743 cm⁻¹), doch war die Lage der Bandenmaxima der Hüllkurven vor und nach dem Phasenübergang vergleichbar. Eine Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Spektren in der LC-Phase konnte durch die Vorgabe von drei statt zwei Einzelbanden erzielt werden

Die Zunahme der Hydratation im Carbonylbereich mit dem Übergang in die LC-Phase äußerte sich in einer Zunahme der integralen Intensität der Banden 2 (1726 cm⁻¹) und 3 (1711 cm⁻¹) auf Kosten der Bande 1 (1743 cm⁻¹).

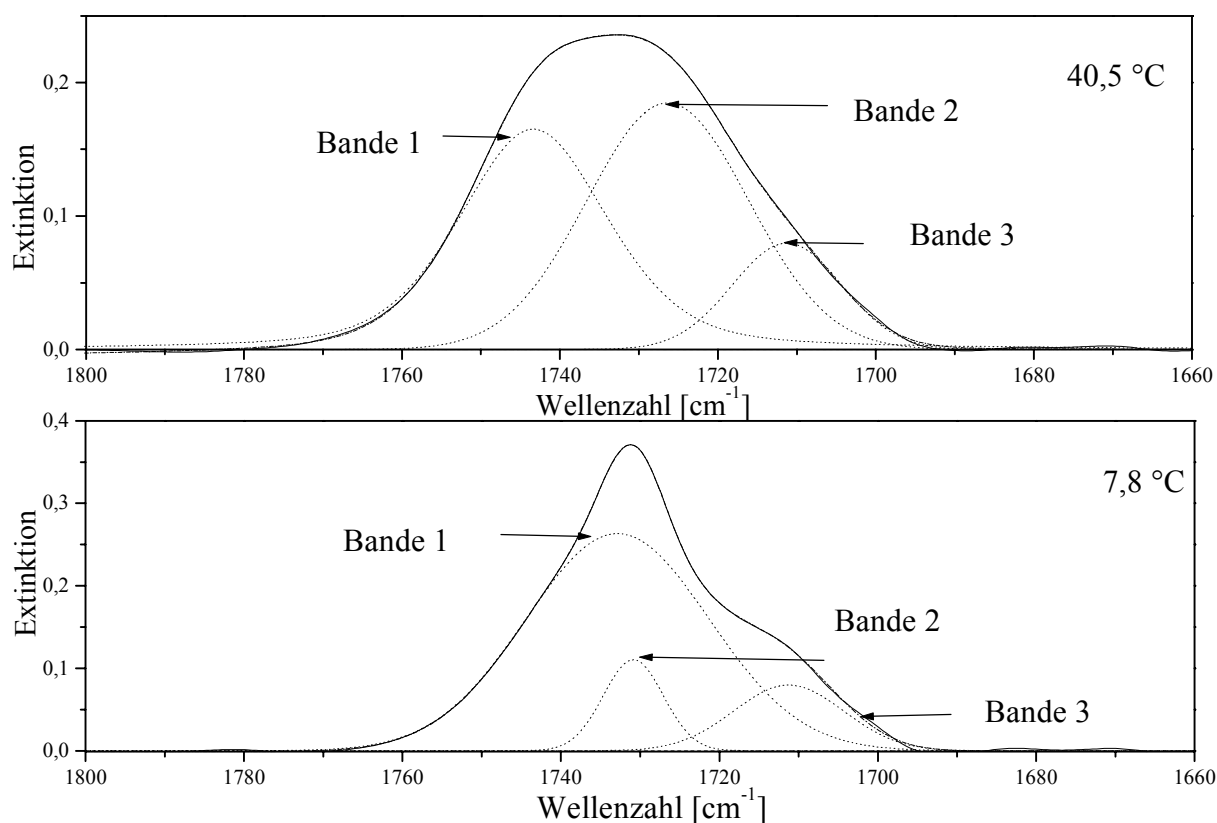


Abbildung 3.2.10-4: Carbonylbanden von PS14 bei pH 7 (PS14⁻) oberhalb und unterhalb von T_m (32,6 °C). Durchgezogene Linien: experimentelle Spektren; strich-punktierte Linien: simulierte Spektren; punktierte Linien: simulierte Einzelbanden; gestrichelte Linie: Differenz zwischen experimentellen und simulierten Spektren.

Abbildung 3.2.10-5 zeigt IR-Spektren von PS14 im Wellenzahlbereich von 1500 bis 1000 cm^{-1} . Die vollständige Zuordnung der Banden findet sich in Tabelle 3.2.10-2. Bei 1471 cm^{-1} war die intensive Bande der CH_2 -Scherschwingung der Fettsäureketten zu finden. Die Progressionen der Kippschwingungen („wagging progression“) der Fettsäureketten schlossen sich ab 1305 bis 1225 cm^{-1} in der Tieftemperaturphase an. Nur in den Spektren der LC-Phase erschien wie bei PG14 eine ungewöhnliche Bande bei 1262 cm^{-1} (möglicherweise PO_2^- dehydratisiert) und eine weitere ungewöhnliche Bande als Schulter bei 1116 cm^{-1} . Die Bande bei 1044 cm^{-1} wurde den Schwingungen der P-O-(C^K)- oder C^K-O-(P) Gruppe zugeordnet (Casal, H.L. *et al.*, 1987b).

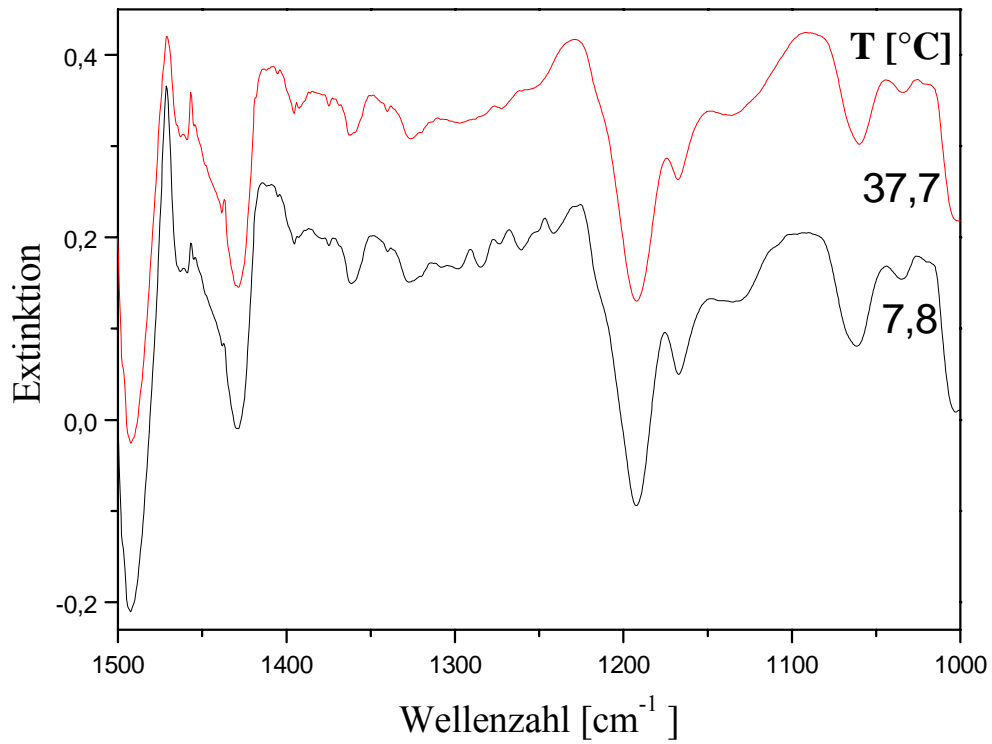


Abbildung 3.2.10-5: IR-Spektren von PS14 in NaCl-Lösung, pH 7 (PS14⁻) im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm⁻¹.

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Bemerkung
1471	$\delta(\text{CH}_2)_n$	
1457	$\delta(\text{C}^{\text{G}}\text{H}_2)$	Schulter
1436		Schulter, nicht zugeordnet
1414	$\delta(\alpha\text{-CH}_2)$	Schulter
1409	$\nu_s(\text{COO}^-)$ von EDTA	EDTA Reste aus Synthese
1420	$\nu_s(\text{COO}^-)$ Serin	
1385	$\delta_s(\text{CH}_3)$	Schulter
1338	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	eg Konformation
1305-1225	$\gamma(\text{CH}_2)_n$	5 Progressionsbanden
1262		kommt $>T_m$, möglicherweise PO_2^- dehydratisiert
1229	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	hydratisiertes Lipid, temperaturunabhängig, von Progression überlagert
1175	$\nu_{as}(\text{CO-O-C})$	Schulter
1116		Schulter, nur $< T_m$, möglicherweise $\nu(\text{C}^{\text{G}}\text{-O-(P)})$ -Gruppe
1093	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	
1083	$\nu_s(\text{CO-O-C})$	durch $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ überlagert
1044	$\nu(\text{P-O-(C}^{\text{K}}))$ od. $\nu(\text{C}^{\text{K}}\text{-O-(P)})$	

Tabelle 3.2.10-2: Absorptionsbanden von PS14 in D₂O-NaCl-Lösung, pH 7 im Wellenzahlbereich von 1500 - 1000 cm⁻¹.

Röntgenbeugung

Abbildung 3.2.10-6 und Abbildung 3.2.10-7 zeigen ausgewählte Röntgenstreu曲ven im Klein- und Weitwinkelbereich, die die auftretenden Phasen charakterisieren. Im Kleinwinkelbereich wurde eine lamellare Überstruktur gefunden. Die Kleinwinkelreflexe $s_1 : s_2 : s_3 = 1 : 2 : 3$ konnten über den gesamten Temperaturbereich bis zur dritten Ordnung nachgewiesen werden, wobei in der flüssigkristallinen Phase die 2. und 3. Ordnung stärker ausgeprägt waren.

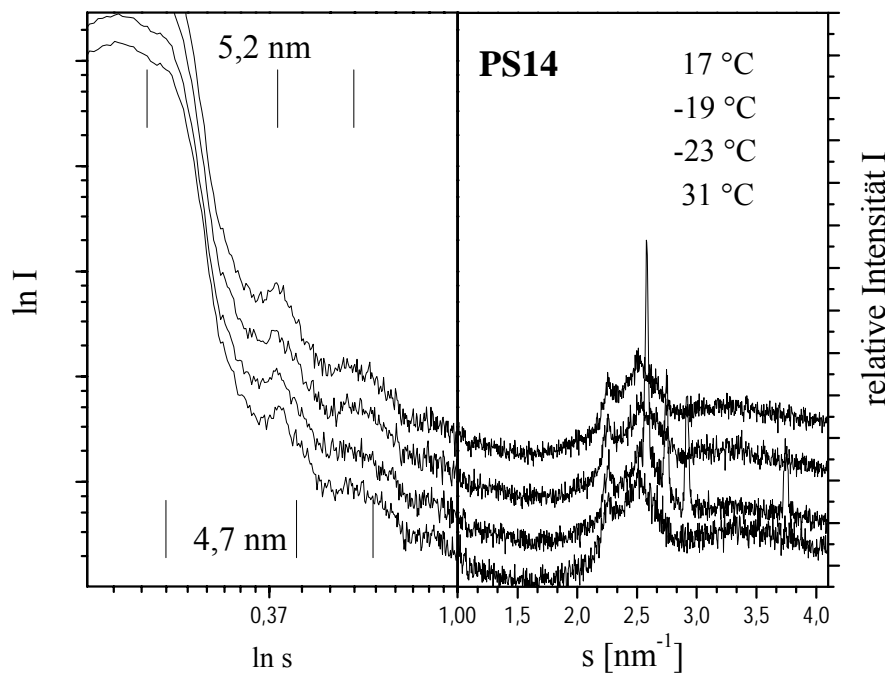


Abbildung 3.2.10-6: Ausgewählte Streukurven 1. Aufheizens und des 1. Abkühlens von PS14.

Im Weitwinkelbereich war eine Subgelstruktur G_x andeutungsweise zu erkennen, der Schichtabstand von 5,2 nm war undeutlich ausgeprägt (breite 2. und 3. Ordnung). Selbst nach Ausfrieren des Wassers verbesserte sich die laterale Ordnung der Ketten nicht und ergab keine Änderung in $d = 5,2$ nm. (Abbildung 3.2.10-6) Beim Erwärmen auf 95 °C fand eine irreversible Veränderung statt (siehe Abbildung 3.2.10-7). Es kam zu einem scheinbaren „Schmelzen“ der Ketten, was die Freiheit für Änderungen im Kopfgruppenbereich lieferte. Dies äußerte sich in einer Zunahme der Schärfe der Ordnungen im Kleinwinkelbereich (siehe Abbildung 3.3.10-7). Gleichzeitig vollzog sich eine Rekristallisation im Kettenbereich mit anderer Kettenpackung (L_β), was sich darin zeigte, daß sich bei $s = 2,54$ nm^{-1} und $s = 2,27$ nm^{-1} scharfe Reflexe herausbildeten. Die Abnahme der Schichtabstände in der LC-Phase auf 4,7 nm deutet

auf einen geringen Wassergehalt zwischen den Bilayern und auf starke Wechselwirkungen zwischen den Serin-Kopfgruppen hin. Dies führte schließlich zur Bildung einer irreversiblen Veränderung in der Bilschichtstruktur. Auch beim erneuten Abkühlen auf 20 °C ergab sich keine Veränderung der lamellaren und lateralen Struktur.

Es konnte auch bei der Verbindung PS14 ausgeschlossen werden, daß es sich um eine L_{β} -Phase wie beim DSPC handelt, da die lamellaren Abstände im Weitwinkelbereich keine Temperaturabhängigkeit zeigten (siehe Abbildung 3.2.10-8, vgl. Kapitel 3.2.3.3). Es ergibt sich somit folgendes Phasenverhalten: $G_x + \text{Eis} (-10 \text{ °C}) \rightarrow G_x (\text{ca. } 40 \text{ °C}) \rightarrow L_{\beta}$.

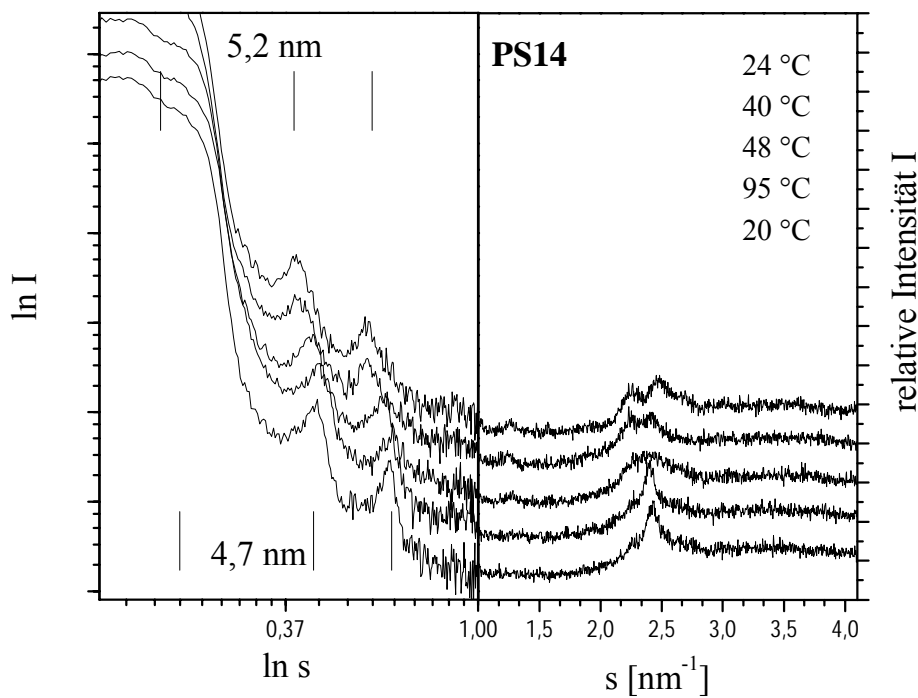


Abbildung 3.2.10-7: Ausgewählte Streukurven des 2. Abkühlens und 2. Aufheizens von PS14.

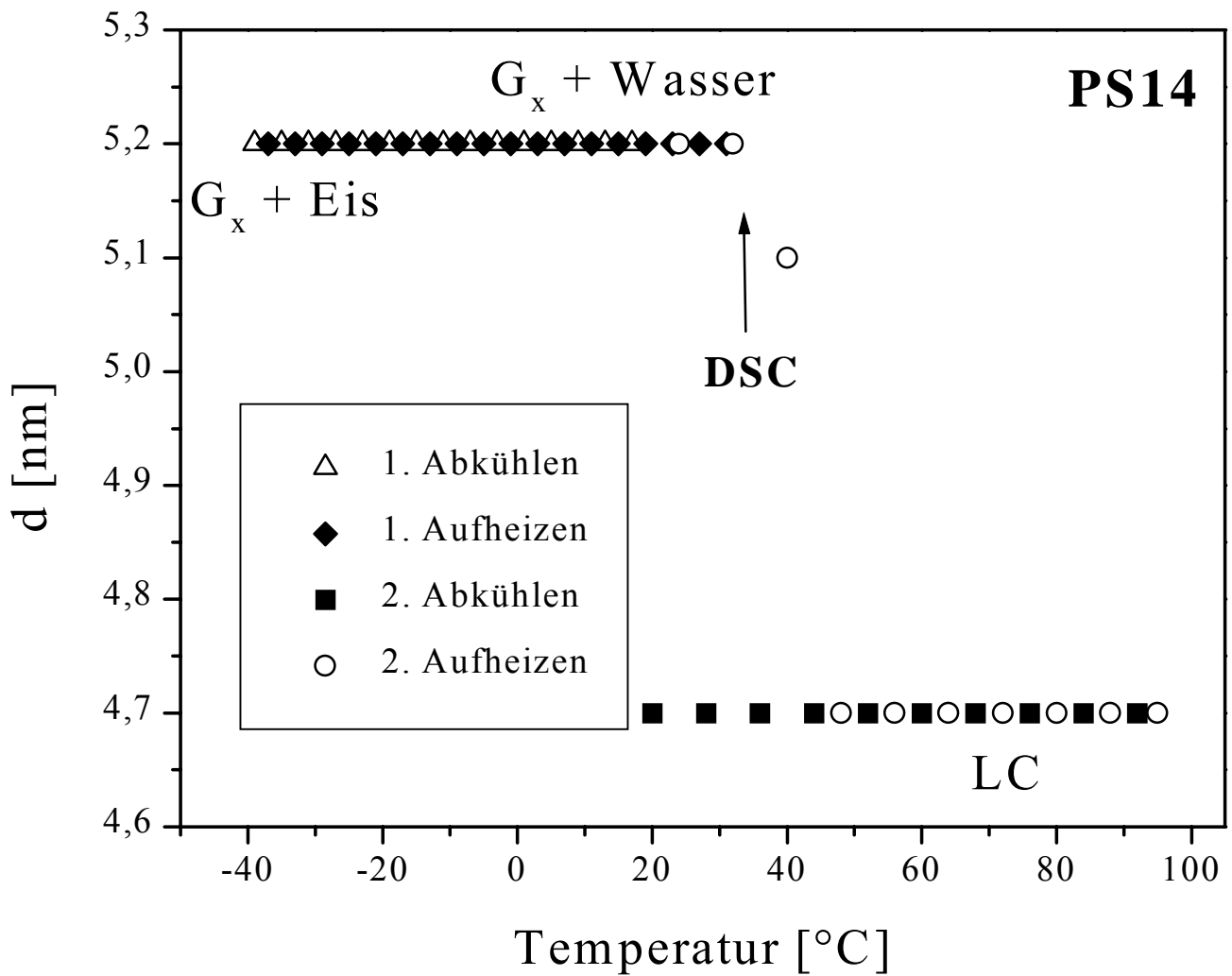


Abbildung 3.2.10-8: Temperaturabhängigkeit des Bilschichtabstands von PS14 beim wiederholten Aufheizen und Abkühlen.

3.2.11 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamin (**1c**)

Kalorimetrie

Tabelle 3.2.11-1 und Abbildung 3.2.11-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter. Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**1c**) ergab einen breiten Umwandlungspeak mit Schulter unterhalb T_m .

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H(T_m)$ [kJ / mol]
PE4	36,0	-	47,1
DSPC	54,7	51,4	46.1

Tabelle 3.2.11-1: Phasenumwandlungsparameter von PE4 und DSPC.

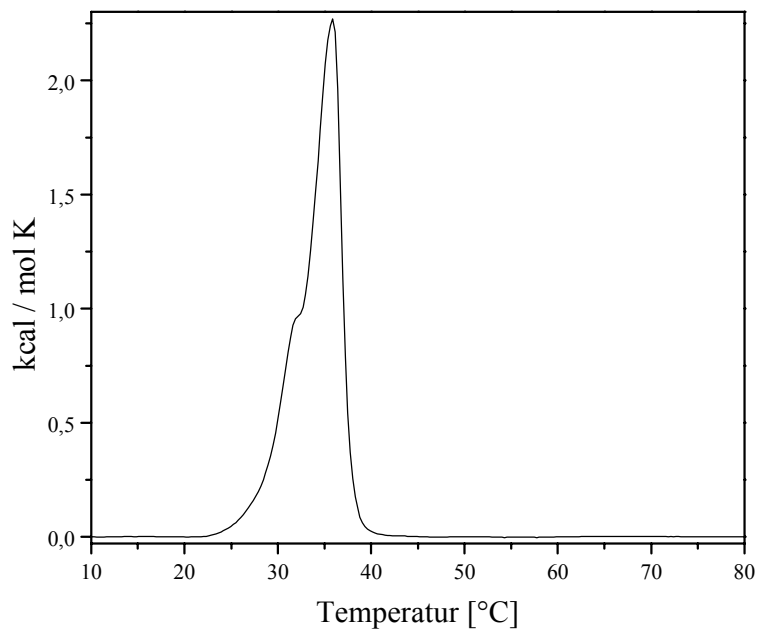


Abbildung 3.2.11-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PE4.

Röntgenbeugung

Abbildung 3.2.11-3 zeigt ausgewählte Streudiagramme von PE4, die die auftretenden Phasen charakterisieren.

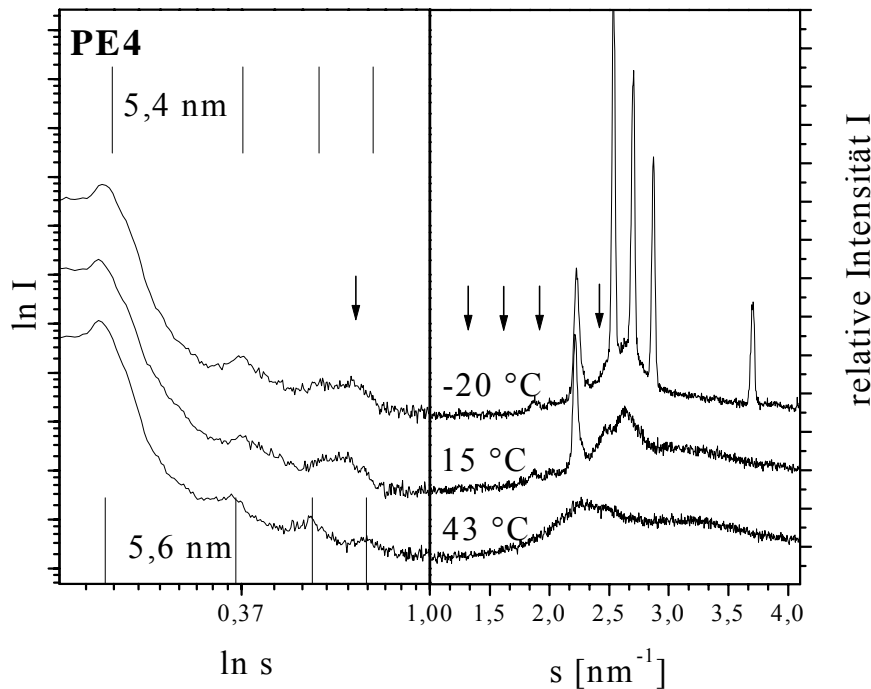


Abbildung 3.2.11-2: Charakteristische Streudiagramme der Phase SG2+Eis (oben), SG2 (Mitte), L_α (unten) von PE4.

Im Kleinwinkelbereich wurden Reflexe unterhalb T_m bis zur dritten Ordnung, oberhalb T_m sogar bis zur vierten Ordnung beobachtet, die im Verhältnis $s_1 : s_2 : s_3 : s_4 = 1 : 2 : 3 : 4$ vorlagen, was die Existenz einer hochgeordneten lamellaren Überstruktur beweist. Das Gefrieren des Wassers hatte auf den Bishichtabstand keine Auswirkungen, was bedeutet, daß der Kopfgruppenbereich kaum hydratisiert ist. Beim „Schmelzen“ der Ketten stieg der d -Wert von 5,4 nm auf 5,6 nm an. In Analogie zu DPPC kann man für PE4 daraus schließen, daß die Verringerung der Bishichtdicke beim Schmelzen der Ketten dadurch überkompensiert wird, daß zwischen die Schichten eine große Wassermenge zur Hydratisierung eingelagert wird (Janiak, M.J. *et al.*, 1980). Mit Hilfe einer Übersicht über das Streuverhalten im Klein- und Weitwinkelbereich (siehe Abbildung 3.3.11-3) lassen sich Aussagen über das Phasenverhalten machen.

Unterhalb 39 °C existierte eine geordnete Phase, die durch zusätzliche Reflexe eines Molekülgitters gekennzeichnet war. Neben den Reflexen des Gitters der Fettsäureketten mit

einem scharfen Reflex bei $s = 2,22 \text{ nm}^{-1}$ und einem breiten bei $s = 2,64 \text{ nm}^{-1}$ traten die Zusatzreflexe bei $s = 0,87 \text{ nm}^{-1}$, $0,86 \text{ nm}^{-1}$, $1,24 \text{ nm}^{-1}$, $1,86 \text{ nm}^{-1}$ und $2,45 \text{ nm}^{-1}$ auf. PE4 bildete somit anstatt einer Gelphase eine Subgelphase aus, die jedoch nicht mit der L_c Phase des DSPC nach (Stümpel, J., 1981) identisch ist. Die Lage der Reflexen unterscheiden sich voneinander. Es wird daher die Bezeichnung SG2 (Subgelphase 2) gewählt. Die Kettenreflexe gingen mit dem Übergang in die LC-Phase bei 39 °C in eine diffuse Streubande über und die des Molekülgitters verschwanden. Beim Phasenübergang wurde deutlich, daß der 1. Reflex des Molekülgitters zwischen der 3. und 4. Ordnung der lateralen Reflexe lag. Zusammenfassend kann das Phasenverhalten folgendermaßen beschrieben werden:

SG2+Eis (nicht gemessen) \rightarrow SG2 (39 °C) \rightarrow L_α (siehe Abbildung 3.2.11-4).

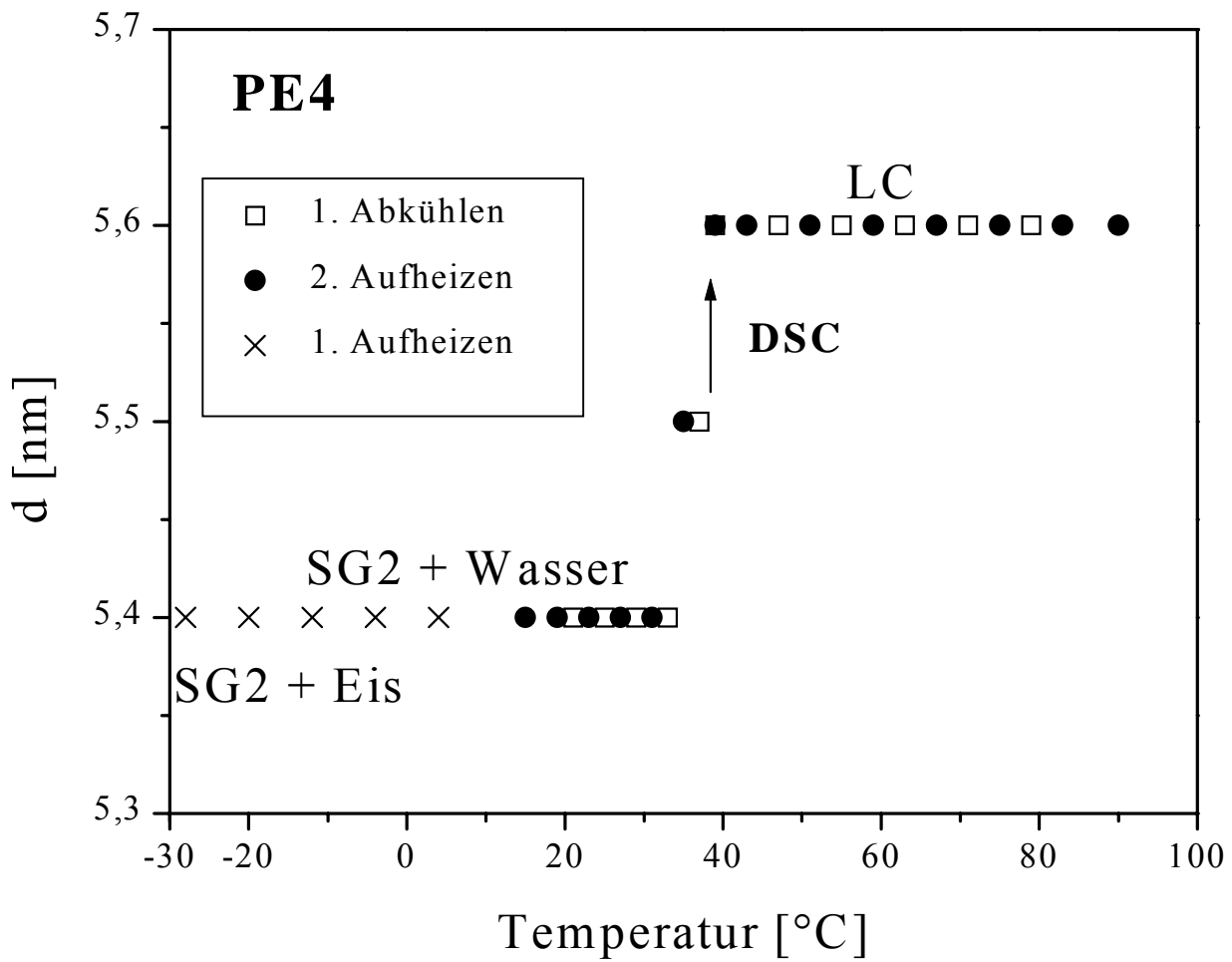


Abbildung 3.2.11-3: Temperaturabhängigkeit des Bilschichtabstands von PE4 beim mehrmaligen Aufheizen und Abkühlen.

3.2.12 Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamin (**2c**)

Kalorimetrie

Tabelle 3.2.12-1 und Abbildung 3.2.12-1 geben einen Überblick über die Phasenumwandlungsparameter. Die DSC-Aufheizkurve von Verbindung (**2c**) ergab einen breiten Umwandlungspeak. Der T_m -Wert von PE14 war erwartungsgemäß mit dem Wert von PE4 vergleichbar. Die Umwandlungsenthalpie war jedoch sehr niedriger.

	T_m [°C]	T_v [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
PE14	39,0	-	35,4
DSPC	54,7	51,4	46,1

Tabelle 3.2.12-1: Phasenumwandlungsparameter von PE14 und DSPC.

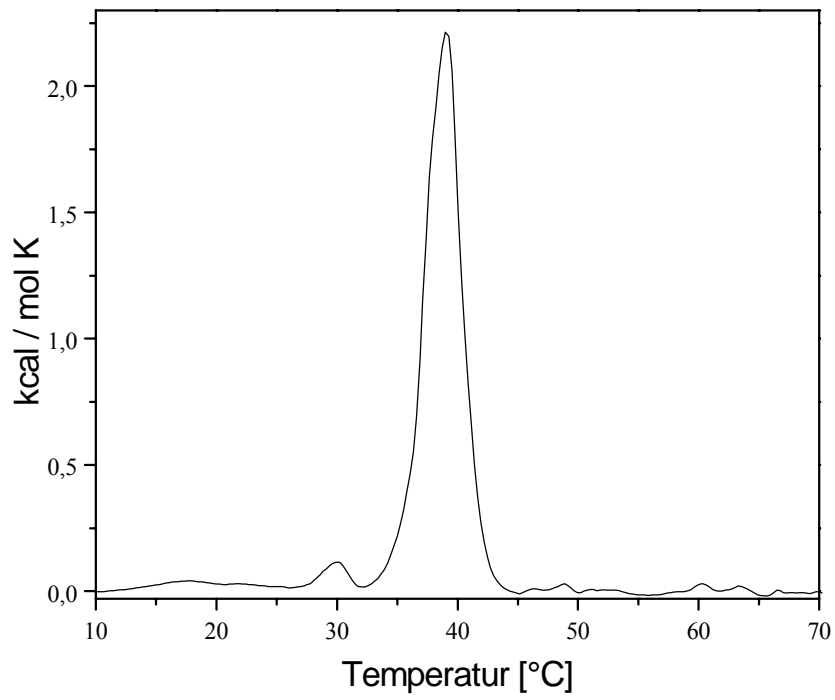


Abbildung 3.2.12-1: Normierte DSC-Aufheizkurve von PE14.

3.2.13 Vergleichende Diskussion über das spezifische Verhalten der acetylenischen Phospholipide

Kalorimetrie

Die Temperatur des Phasenübergangs von der Gel- bzw. Subgelphase in die flüssigkristalline Phase ist zum einen von der Natur der Phospholipid-Kopfgruppe abhängig. Drei Kräfte spielen dabei eine Rolle: der sterischer Anspruch der Kopfgruppe, die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen. Vergleicht man die neutralen Phospholipide PE und PC bei neutralem pH-Wert, so liegt der T_m -Wert von PE um ca. 20 °C höher als bei den entsprechenden PC-Analoga, da die unsubstituierte quarternäre Ammonium-Gruppe von PE Wasserstoffbrückenbindungen zu Nachbarmolekülen in der Membran ausbilden kann. Wie PE besitzt auch PA eine kleine Kopfgruppe, die bei neutralen pH nur ein Proton trägt (PA^-) und somit Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, was zu einer Erhöhung der Temperatur des Hauptphasenübergangs führt, welche mit PE vergleichbar ist. Im Gegensatz dazu führt die räumlich anspruchsvolle Glycerin-Kopfgruppe in Verbindung mit der elektrostatischen Abstoßung zwischen den unprotonierten PO_2^- -Gruppen bei pH 7 zu T_m -Werten, die mit denen der PC-Analoga vergleichbar sind. PS nimmt unter den besprochenen Phospholipiden eine Zwischenstellung ein. Bei pH 7 liegen die Phosphatgruppen wie bei PG deprotoniert vor, die elektrostatische Abstoßung wird in der zwitterionischen Kopfgruppe jedoch kompensiert (PS ist bei pH 7 einfach negativ geladen), doch auch bei PS bewirkt die große Kopfgruppe eine Absenkung von T_m im Vergleich zu PE und PA. Bei den acetylenischen Lipiden machte sich der Effekt der Kopfgruppe in der gleichen Weise wie bei den gesättigten Analoga bemerkbar. So ließen sich folgende Tendenzen bei den untersuchten Verbindungen bezüglich der Größe des T_m -Wertes feststellen: $PC_{14} < PG_{14} < PC_4 < PG_4 < PS_{14} < PS_4 < PE_4 < PA_{14} < PE_{14} < PA_4$. Einen Überblick über die T_m -Werte der acetylenischen Phospholipide und Verbindungen mit gesättigten Ketten vermittelt Tabelle 3.2.13-1.

Phospholipid	Acylketten	T _m [°C]	ΔH [KJ / mol]
DMPC	C14	24,0	27,2
DSPC	C18	51,4	46,1
DEPC	C18:1 (trans-Doppelbindung)	12-13	-
DOPC	C18:1 (cis-Doppelbindung)	-20	-
DMPG ^a	C14	24,0	28,4
DSPG	C18	54,5	43,8
DMPS	C14	36,0	28,8
DSPS	C18	68,0	46,0
DMPE	C14	49,9	27,6
DSPE	C18	74,1	45,6
DMPA PH 7)	C14	50,0	23,0
PC4	C18, Dreifachbindung	25,8	56,5
PC14	C18, Dreifachbindung	23,2	53,3
PG4	C18, Dreifachbindung	31,3	51,1
PG14	C18, Dreifachbindung	23,8	44,3
PS4	C18, Dreifachbindung	33,7	44,7
PS14	C18, Dreifachbindung	32,6	57,1
PE4	C18, Dreifachbindung	36,0	47,1
PE14	C18, Dreifachbindung	39	35,1
PA4 (pH 7)	C18, Dreifachbindung	44,6	70,8
PA14 (pH7)	C18, Dreifachbindung	38,9	64,8

Tabelle 3.2.13-1: Temperaturen der Hauptumwandlung (T_m) und der Enthalpie des Hauptübergangs ΔH von (1,2)-Diacyl-phospholipiden in Abhängigkeit von der Natur der Kopfgruppe und den Fettsäureketten (Nuhn, O. *et al.*, 1986), (Blume, A., 1991).

^a Ionenstärke I = 0,1 M.

Die Umwandlungstemperatur wird außerdem durch die Länge der Kohlenwasserstoffketten und deren Sättigungsgrad beeinflusst. Längere Ketten führen zu einer Erhöhung des T_m-Werts (siehe Tabelle 3.2.13-1). Ungesättigte Bindungen stören die Kettenpackung. So lagen die Hauptphasenumwandlungstemperaturen der untersuchten Verbindungen mit Dreifachbindungen in den Ketten unterhalb der gesättigten Analoga. Untersuchungen an isomeren 1,2-Di-

(octadecin)-phosphatidylcholinen ergaben, daß die Umwandlungstemperatur von der Position der Dreifachbindung in den Fettsäureketten abhängt. So setzt eine Störung in der Mitte der Kette T_m sehr viel stärker herab als eine Störung an einem der Kettenenden (Rürup, J., 1994). Gleiches Verhalten wurde auch bei Methylverzweigungen in verschiedenen Positionen der Acylkette (Nuhn, O. *et al.*, 1986) und bei einer Reihe von Phosphatidylcholinen, die in beiden C-18-Ketten eine *cis*-Doppelbindung haben (Barton, P.G. *et al.*, 1975), festgestellt. Die *trans*-Doppelbindung wirkt auf die Hauptphasenumwandlungstemperatur ungefähr halb so stark wie die Doppelbindung in *cis*-Konfiguration in korrespondierender Position (Cevec, G., 1991), da sich die Ketten mit *trans*-Konfiguration an der Doppelbindung in linearer Konfiguration anordnen lassen, die den gesättigten Ketten fast genau entspricht. Die *cis*-Doppelbindung bewirkt eine Krümmung der Kettenachse, wodurch sich eine stärkere Störung in der Bilayerpackung ergibt (Morrison, R.T. *et al.*, 1986). Es zeigte sich, daß ein wichtiger Faktor, durch den die Umwandlungstemperatur bestimmt wird, die effektive Kettenlänge darstellt (Cevec, G., 1991). Unter effektiver Kettenlänge versteht man die Länge des längsten Kettensegments, das durch die Trennung der Kette durch die ungesättigte Bindung in zwei Teile entsteht. So bewiesen gesättigte Phosphatidylcholine gleiches Verhalten, wie die mit *cis*-Doppelbindung ungesättigten Analoga gleicher effektiver Kettenlänge (Cevec, G., 1991). Die Wirkung der Dreifachbindung war für die in dieser Arbeit untersuchten Lipide mit den Kopfgruppen Cholin, L-Serin und Glycerin analog. So lag der T_m -Wert von PC14, PG14 und PS14 bei dem des Phospholipids mit C-14-Ketten (DMPC, DMPG und DMPS) und beide waren jeweils mit dem T_m -Wert der entsprechenden 4-in-Verbindung PC4, PG4 und PS4 vergleichbar wobei der T_m -Wert von PG4 um 5°C höher lag als der von PG14 (siehe Tabelle 3.2.13-1). Die IR-spektroskopisch ermittelte Hauptumwandlungstemperatur von PG4 betrug jedoch 26 °C. Die Abweichung könnte durch restliche Ca^{2+} -Ionen in der DSC-Probe zustande gekommen sein, die durch Ausschütteln mit EDTA-Lösung nicht vollständig entfernt wurden. Zweiwertige Kationen bewirken eine Absättigung der negativen Kopfgruppenladung, wodurch die elektrostatische Abstoßung verringert, und der T_m -Wert erhöht wird. Eine höhere Ionenstärke in der IR-Probe, verursacht durch eine konzentriertere Lösung ist eine weitere Erklärung für die Abweichung der T_m -Werte. Die T_m -Werte von PE14 und PE4 waren ebenfalls miteinander vergleichbar, doch waren sie zwischen 11-13 °C niedriger als die der gesättigten Verbindung DMPE. Durch die kleine Ethanolamin-Kopfgruppe besaß diese Lipidklasse möglicherweise weniger Spielraum, die Störung in der Packung der Fettsäureketten durch die Dreifachbindung, die zu einer Vergrößerung des Kettenquerschnitts führt, in der Packung der Moleküle auszugleichen. Die gleiche Beobachtung traf auf die Lipide PA4 und PA14 zu, deren T_m -Werte nicht nur von der

Verbindung DMPA, sondern auch untereinander erheblich abwich. Die Dreifachbindung in Position 14 der C-18-Kette rief hier wahrscheinlich die höhere Unordnung in der Kettenpackung hervor.

Nur bei der Verbindung PC4 wurde eine Gelphase in einem engen Temperaturbereich unterhalb der Hauptumwandlungstemperatur beobachtet. Sie wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen als modifizierte Ripplephase identifiziert (Mannova, M., 1995). Bei den Verbindungen **1b-1e** und **2a-2e** trat keine Gelphase mehr auf und die Ausbildung einer Subgelphase wurde begünstigt. Auch die Verbindungen DOPC und DEPC können keine Gelphase ausbilden. Die Umwandlungsenthalpie der Verbindungen PC4 und PC14 war um über 20 kJ höher als die in einer früheren Arbeit bestimmten Werte (Rürup, J., 1994) und übertraf somit die Umwandlungsenthalpie des gesättigten Lipids DSPC. Auch in der Literatur findet man voneinander abweichende Meßergebnisse. So wurden zum Beispiel für das Lipid DPPC ΔH -Werte von 28,8-40,5 kJ/mol angegeben. Das mag zum einen am jeweiligen Meßinstrument liegen, hängt aber auch mit der Reinheit und der thermischen Vorbehandlung der Probe zusammen. Auch ist die Positionierung der Basislinie zur Bestimmung von ΔH nicht immer eindeutig durchführbar (Blume, A., 1991). Mit Ausnahme von PE14 waren die Phasenübergangsenthalpien der acetylenischen Lipide höher als die der analogen gesättigten Verbindung. Das zeigt, daß das acetylenische Kettensegment zwar eine mehr oder weniger große Störung für das Lipid bedeutet (niedrigere T_m -Werte), eine energetisch günstige Packung der Moleküle in der Membran jedoch möglich ist.

FT-IR-Spektroskopie

Die Auftragung der Lage des Bandenmaximums der symmetrischen Methylenstreckschwingung in Abhängigkeit der Temperatur erlaubt nicht nur die Ermittlung der Phasenumwandlungstemperaturen, sondern stellt auch erste Ansatzpunkte dar, die Einflüsse von Molekülflächen, Kopfgruppenladung und Hydratation auf das Phasenverhalten von Phospholipiden auf molekularer Ebene zu interpretieren. Die Lage der Maxima der Absorptionsbanden wird dabei mit der konformationellen Ordnung und der Packungsdichte der Fettsäureketten korreliert (Casal, H.L. *et al.*, 1984; Casal, H.L. *et al.*, 1987a; Dluhy, R.A. *et al.*, 1983; Jackson, M. *et al.*, 1989; Tuchtenhagen, J., 1990; Wallach, D.F.H. *et al.*, 1979).

PC4 und DSPC verhielten sich sehr ähnlich bezüglich der Lage der CH_2 -Streckschwingungsbande. Der große Unterschied in den T_m -Werten deutet darauf hin, daß die vergleichbare konformationelle Ordnung der Fettsäureketten der beiden Lipide eher zufällig war. Obwohl bei gleicher Größe der Kopfgruppe die Molekülfläche der Fettsäureketten bei PC4 eher größer sein dürfte, wirkte sich dieser Unterschied nicht auf die CH_2 -Valenzschwingungen aus.

Im Gegensatz zu PC4 war bei PC14 das Bandenmaximum der symmetrischen CH₂-Streckschwingung unterhalb T_m um 1,4 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen verschoben. Durch die Position der Dreifachbindung am Kettenende bei PC14 konnte der störende Einfluß durch dieses Strukturelement anscheinend nicht mehr durch entsprechende Isomerisierungen der Kettenglieder ausgeglichen werden. Bei allen untersuchten Lipiden waren die Bandenmaxima der 4-in-Verbindungen bei tieferen Wellenzahlen zu finden als die der 14-in-Verbindungen. Die Packungsdichte der Fettsäureketten der 14-in-Verbindungen war somit niedriger bzw. der *gauche*-Anteil höher. Dies korreliert mit den niedrigeren T_m-Werten der 14-in-Verbindungen im Vergleich zu den entsprechenden 4-in-Analoga (siehe Tabelle 3.2.13-1). Im Vergleich zu den 14-in Lipiden und DSPC erschien die Methylstreckschwingung aller 4-in Verbindungen als ungewöhnlich scharfe, intensive Bande die zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben war. Dies deutet zusätzlich auf eine dichte Kettenpackung hin, bei der die Methylgruppen engen Kontakt haben, so daß sich die Änderung des Dipolmoments durch intermolekulare Wechselwirkungen verstärkt. Dagegen war das Bandenmaximum der Methylstreckschwingung der 14-in-Verbindungen zu tieferen Wellenzahlen verschoben im Vergleich zu DSPC. Die Dreifachbindung an Position 14 schien eine Ordnung am Kettenende zu erschweren.

Lipid	v _s (CH ₂) [cm ⁻¹]
DSPC	2849
PC4	2848,9
PC14	2850,3
PG4	2849
PG14	2850,4
PA4	2847,5
PA14	2849
PS14	2849,5

Tabelle 3.2.13-2: Bandenmaxima der symmetrischen CH₂-Streckschwingung acetylenischer Lipide im Vergleich zu DSPC unterhalb T_m.

PG4 bzw. PG14 und PS14 besaßen unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine negative Kopfgruppenladung. Die Auswirkungen der bereits großen Kopfgruppe wurden durch die elektrostatische Abstoßung verstärkt. Dies führt zu einer Vergrößerung der Molekülflächen, welche im Bereich der Fettsäureketten durch *trans-gauche*-Isomerisierungen ausgenutzt werden

könnte, was eine weniger dichte Packung der Fettsäureketten zur Folge hätte. Trotzdem besaßen diese Lipide eine mit PC4 bzw. PC14 vergleichbare Bandenlage bei tiefen Wellenzahlen. Die Dreifachbindung könnte den Platzbedarf der Acylketten ebenfalls erhöhen, doch sie führt nicht wie eine *cis*-Doppelbindung zu einer Richtungsänderung der Kettenachse, sondern nur zu einem Versatz der Kettenrichtung, wodurch eine dichte Anordnung der Ketten wieder ermöglicht wird. Trotz des Raumbedarfs der Fettsäureketten bei kleiner Kopfgruppe besaß PA4 die dichteste Packung der Fettsäureketten von allen untersuchten Lipiden einschließlich DSPC. Bei PA14 war der Ordnungsgrad zwar geringer als bei PA4, doch mit dem von DSPC vergleichbar. Diese Beobachtung findet sich auch in den kalorimetrischen Daten wieder. Die Aufspaltung der antisymmetrischen Methylenstretschwingung, die bei allen untersuchten acetylenischen Lipiden beobachtet wurde, trat bei den Phospholipiden mit der Dreifachbindung an Position 14 der Acylkette verstärkt auf.

Die Hydratationsverhältnisse an der polaren-apolaren Grenzfläche der Phospholipidmembran und die konformationelle Ordnung im Bereich der Fettsäureketten sollten sich miteinander korrelieren lassen. Die Umwandlung von der Gel-Phase in die LC-Phase äußert sich in einer lateralen Expansion bei gleichzeitiger Abnahme der Dicke der Doppelschicht. Insgesamt tritt eine Volumenzunahme um circa 4 % auf (Cevec, G. *et al.*, 1987). Die Dicke der Lipiddoppelschicht ist im wesentlichen durch die Länge der Fettsäureketten vorgegeben. Verstärkte *trans-gauche*-Isomerisierungen beim Übergang in die LC-Phase führen zu einer Verkürzung der Fettsäureketten bezüglich der Projektion auf die Membrannormale sowie einem größeren lateralen Raumbedarf. Diese Expansion ermöglichte eine verstärkte Kopfgruppenhydratation. Hierbei können Wassermoleküle sogar bis in hydrophobe Membranbereiche vordringen (Tuchtenhagen, J., 1990). Zudem sind von diesen Veränderungen auch alle intermolekularen Wechselwirkungen wie zum Beispiel elektrostatische Abstoßung oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Lipidkopfgruppen betroffen.

Im Gegensatz zu DSPC war das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve aller untersuchten Lipide mit Ausnahme von PS14 und PA14 unterhalb T_m bei sehr tiefen Wellenzahlen lokalisiert (ca. 1720 cm^{-1}), um sich mit dem Übergang in die LC-Phase zu höheren Wellenzahlen zu verschieben. Dieses Verhalten zeigen Lipide, die eine partiell dehydratisierte Gelphase bzw. Subgelphase besitzen. Unterhalb T_m war die Halbwertsbreite der Bande der „zweifach hydratisierten“ Carbonylgruppen ungewöhnlich gering. Dies spricht für einen hohen Ordnungsgrad in der Hydratationssphäre. Ob es sich hierbei tatsächlich um die Wechselwirkung einer C=O-Gruppe mit zwei Wassermolekülen handelte, oder ob diese Bande auf eine besonders starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen C=O-Gruppe und H_2O (lineare Anordnung)

zurückzuführen ist, bleibt ungeklärt. Eine lineare Anordnung der Wasserstoffbrückenbindung wäre zwar sterisch anspruchsvoller als eine gewinkelte Anordnung, würde die dazugehörige Carbonylbande zu deutlich tieferen Wellenzahlen verschieben und die Bandenlage entspräche der der „zweifach hydratisierten“ Carbonylfunktion. Anders als bei DSPC und den übrigen acetylenischen Lipiden nahm bei PC4 und PA4 die integrale Intensität der simulierten Bande 2 bzw. Bande 2 und 3 zu Gunsten der simulierten Bande 1 mit dem Übergang in die LC-Phase ab. Dies könnte in einer geometrischen Umorientierung der Hydrathülle und nicht in einer Abnahme der Hydratation an der polaren-apolaren Grenzfläche begründet sein. Dafür spricht auch, daß sich eine Zunahme der Hydratation in der Temperaturabhängigkeit der symmetrischen Methylenstretschwingung manifestiert hat (vergleiche Kapitel 3.2.3). Die Auswertung der simulierten Bande 1 von PC4 und PA4 gestaltete sich jedoch schwierig, da diese stark verbreitert war. Bei den übrigen Lipidpräparationen trat bei der Phasenumwandlung eine Zunahme der Hydratation an der polaren-apolaren Grenzfläche auf, die analog zur Abnahme der konformationellen Ordnung der Fettsäureketten verlief. Wie aus den Bandenlagen der symmetrischen Methylenstretschwingungen ersichtlich war (siehe Tabelle 3.2.13-2), war der Ordnungsgrad der Fettsäureketten unterhalb T_m bei den 14-in-Verbindungen geringer als bei den 4-in-Verbindungen. Bei der simulierten Bande 1 der 14-in Verbindungen war eine deutliche Verschiebung von normalerweise ca. 1740 cm^{-1} („nicht hydratisierte“ C=O-Gruppe) nach deutlich niedrigeren Wellenzahlen zu beobachten, was auf eine „einfach hydratisierte“ C=O-Gruppe hindeuten könnte. Durch eine lateral expandierte Membran könnte ein erweitertes Eindringen von Wassermolekülen in die Membran erfolgt sein.

Lipid	T [°C]	Bandenmaximum	Bandenmaximum
		Hüllkurve	Bande 1
DSPC	< T _m	1734	1740
	> T _m	1731	1740
PC4	< T _m	1726	1739
	> T _m	1738	1742
PC14	< T _m	1721	1729
	> T _m	1732	1743
PG4	< T _m	1723	1740
	> T _m	1737	1745
PG14	< T _m	1718	1731
	> T _m	1732	1745
PA4	< T _m	1722	1747
	> T _m	1742	1746
PA14	< T _m	1730	1731
	> T _m	1729	1744
PS14	< T _m	1731	1733
	> T _m	1733	1743

Tabelle 3.2.13-3. Übersicht über Bandenmaxima der Estercarbonylschwingungen der untersuchten Phospholipide.

Die Phosphatbanden der untersuchten wäßrigen Lipiddispersionen zeigten, daß die Phosphatgruppen hydratisiert waren. Innerhalb der Gruppe der Lipide mit Phosphorsäureestergruppierungen ergab sich für die Bandenlage der antisymmetrischen Phosphatstretschwingung folgende Tendenz:

$v_{as}(PC4) > v_{as}(PC14)$, $v_{as}(PS14) > v_{as}(DMPC)^* > v_{as}(PG4) > v_{as}(PG14)$, *(Tuchtenhagen, J., 1994).

Die Verschiebung dieser Phosphatbande innerhalb einer Lipidgruppe (z.B. PC) ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Hydratation, bedingt durch die unterschiedliche Fähigkeit der Kopfgruppen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, zurückzuführen.

Die „wagging“-Progressionen bieten eine Möglichkeit, die konformationelle Ordnung der Fettsäureketten der Phospholipide in der Gelphase IR-spektroskopisch zu bestimmen. Erste qualitative Untersuchungen dieser Art an Modellmembranen (Cameron, D.G. *et al.*, 1980; Fringeli, U.G. *et al.*, 1981) gehen auf die grundlegenden Arbeiten von (Snyder, R.G. *et al.*, 1963) an festen Alkanen und Polyethylen zurück. Im Gegensatz zu Alkanen zeigen Phospholipide eine relativ hohe Intensität der Banden der „wagging“-Progressionen, da diese Schwingungen im Falle der Phospholipide mit der Streckschwingung der stark polaren Carbonylgruppe koppeln. Da bei den acetylenischen 4-in-Phospholipiden die Methylenkette am C4-Atom durch die Dreifachbindung unterbrochen ist, war diese Kopplung nicht möglich und es konnten keine Progressionsbanden beobachtet werden. Bei den acetylenischen 14-in-Phospholipiden lag eine ununterbrochene Methylenkette mit 12 C-Atomen, so daß die Voraussetzung für eine Kopplung der Kippschwingungen der CH₂-Gruppen untereinander und mit der Streckschwingung der Carbonylgruppe erfüllt war. Da die 14-in-Phospholipide die gleiche Zahl ununterbrochener CH₂-Segmente besitzen wie Phospholipide mit Dimyristoyl-Fettsäureketten, trat auch hier die erste Bande bei ca. 1205 cm⁻¹ auf (Senak, L. *et al.*, 1992).

Diese Intensitätserhöhung der „wagging“-Banden scheint zudem nur möglich zu sein, wenn die Carbonylgruppe eine geeignete Orientierung bezüglich der *all-trans*-Kette besitzt (Fringeli, U.G. *et al.*, 1981). Die Röntgenstrukturanalysen von kristallinen PCs und PEs (Hauser, H. *et al.*, 1981) zeigen eine zur Membrannormalen parallele Orientierung des Glycerinrückgrats. Um eine parallele Anordnung der *sn*-1- und *sn*-2-Ketten im Inneren der Membran zu ermöglichen, tritt in der *sn*-2-Kette ein „Knick“ auf. Geht man auch in der Gelphase wäßriger PC- und PE-Dispersionen von gleichen Verhältnissen aus, so ergibt sich für die *sn*-2-Kette nicht nur eine reduzierte Zahl von *trans*-Segmenten, sondern auch eine ungünstige Stellung der C=O-Gruppe bezüglich des *all-trans*-Abschnitts der Fettsäurekette. Das bedeutet, daß die „wagging“-Progressionen der Lipide mit Phosphorsäurediestergruppierungen wahrscheinlich nur von Kippschwingungen der *sn*-1-Methylengruppen verursacht werden, während die entsprechenden Absorptionen der *sn*-2-Kette zu intensitätsarm sind. Die hohe Intensität der Banden der „wagging“-Progressionen von PA14 im Vergleich zu den anderen 14-in-Phospholipiden und DMPC kann somit auf zwei Effekte zurückgeführt werden. Zum einen wäre eine perfekte *all-trans*-Orientierung der Methylengruppen des 12-C-Atome zählenden Segments der Fettsäureketten als Erklärung denkbar. Zum anderen würde aber auch eine Orientierung des Glycerinrückgrats senkrecht zur Membrannormalen, wie dies auch bei andern PAs der Fall ist (Pascher, I. *et al.*, 1992), eine geeignete Konformation der C1-C2- und C2-C3-Segmente beider Fettsäureketten ermöglichen, so daß die „wagging“-Progressionen beider Fettsäureketten durch

Kopplung mit der Carbonylschwingung intensiviert würden. Da bei den Verbindungen PC14, PG14 und PS14 eine „wagging“-Progression auftrat, die in der Intensität mit DMPC vergleichbar war, kann bei diesen Verbindungen von einer Anordnung des Glycerinrückgrats parallel zur Membrannormalen ausgegangen werden.

Die CH₂-Scherschwingung zeigte bei allen untersuchten Lipiden keine Aufspaltung, so daß auf eine parallele Packung der Acylketten geschlossen werden kann, wobei die scharfe und intensive Ausprägung dieser Bande bei PC4, PG4 und PG14 auf eine dichtere Packung mit höherer konformationeller Ordnung schließen läßt.

In den H₂O-Spektren der acetylenischen Phospholipide traten ungewöhnliche Absorptionen auf, die in den Spektren der entsprechenden Phospholipide mit gesättigten Ketten nicht beobachtet wurden (vergleiche z.B. (Casal, H.L. *et al.*, 1987a; Tuchtenhagen, J., 1994). Einen Überblick über diese Banden vermittelt Tabelle 3.2.13-4.

Phospholipid	Bande 1	Bande 2	Bande 3
PC4	1262 < T _m	1159 < T _m 1162 > T _m	1129 < T _m
PC14	-	-	1139 < T _m
PG4	1262 < T _m	1158 < T _m 1162 > T _m	1128 < T _m
PG14	1262 > T _m	-	1112 < T _m
PA14	-	-	1112 < T _m
PS14	1262 > T _m	-	1116 < T _m , Schulter

Tabelle 3.2.13-4: „Ungewöhnliche“ Banden in den H₂O-Spektren der acetylenischen Lipide.

Um ca. 1120 cm⁻¹ sind normalerweise Skelett-Vibrationen der ν(C^G-O-(P))-Gruppe zu finden, die von der Natur der Kopfgruppe unabhängig sind und mit dem Übergang in die LC-Phase intensitätsärmer werden (Rudolph, A.S. *et al.*, 1987; Tuchtenhagen, J., 1994). Die Banden der acetylenischen Lipide, die in der Tabelle der Spalte „Bande 3“ zugeordnet wurden, wurden möglicherweise durch solche Skelett-Vibrationen verursacht. Doch bliebe deren Verschiebung zu tieferen und höheren Wellenzahlen als bei (Tuchtenhagen, J., 1994), erklärungsbedürftig. Die Banden bei 1159 cm⁻¹ die bei den Verbindungen PC4 und PG4 nur unterhalb T_m auftreten weisen möglicherweise auf ein Kopfgruppengitter hin, wobei bei PC14 die Bande bei 1139 cm⁻¹ in diese Überlegung mit einzubeziehen wäre. Bei den 4-in-Verbindungen trat nur in den Spektren unterhalb T_m eine Absorption bei 1262 cm⁻¹ auf. Dagegen war diese Absorption bei den 14-in-Verbindungen nur in der LC-Phase zu beobachten. Diese Bande könnte von einer dehydratisierten PO₂⁻-Gruppe stammen, und ihre Temperaturabhängigkeit scheint mit der Position der Dreifachbindung in den Fettsäureketten zusammenzuhängen.

Röntgenbeugung

Abbildung 3.2.12-1 zeigt eine Übersicht über die Streudiagramme der acetylenischen Verbindungen in der Tieftemperaturphase ohne Eis. Charakteristisch für die Subgelphase sind zwei deutlich auseinanderliegende Weitwinkelreflexe s₁ und s₂ (Abbildung 3.2.13-1, Pfeile nach oben und Tabelle 3.2.12-5), wobei s₁ sehr scharf ist und s₂ je nach Lipid unterschiedlich breit erscheint. Ihre Winkellage ist praktisch unabhängig von der Meßtemperatur. Die Zusatzreflexe

zwischen $0,8 \text{ nm}^{-1} - 2,8 \text{ nm}^{-1}$ kennzeichnen die Subgelphase mit ihrem Molekülgitter (Abbildung 3.2.13-1, Pfeile nach unten und Tabelle 3.2.13-5).

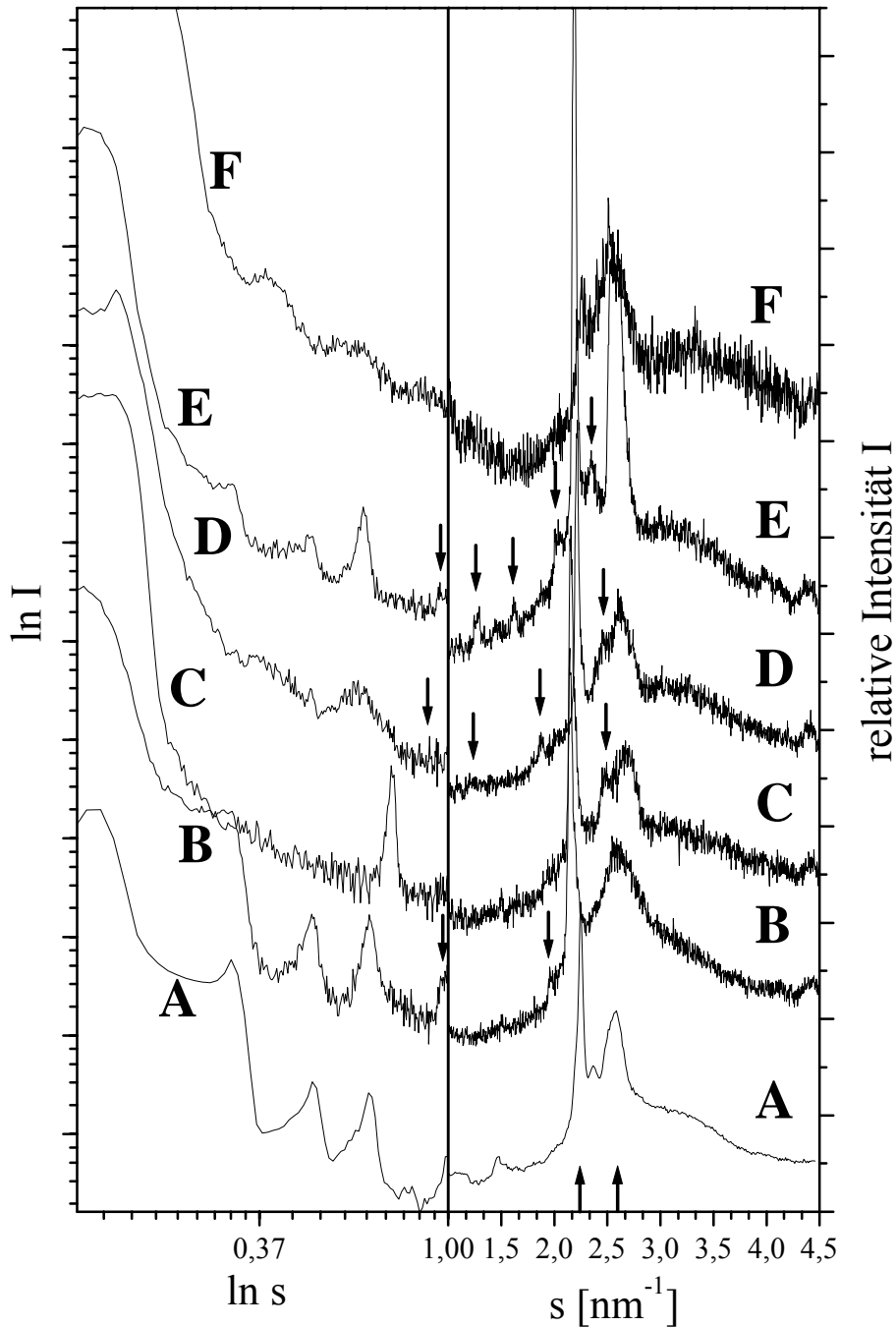


Abbildung 3.2.13-1: Charakteristische Streudiagramme der untersuchten acetylenischen Phospholipide unterhalb T_m mit **A:** L-DPPC, **B:** PC14, **C:** PG14, **D:** PE4, **E:** PA14, **F:** PS14.

PA14, PE4 und PC14 besaßen eine Subgelphase, die sich deutlich von der Subgelphase L_c' des DPPC nach (Chen, S.C. *et al.*, 1980) unterscheidet. Sie wurde in dieser Arbeit mit Subgelphase SG bezeichnet. Auch entsprach die Gelphase der acetylenischen Lipide PS14 und PG14 nicht der L_β' Phase, da der Schichtabstand nicht mit steigender Temperatur zunahm (Sun, W.J. *et al.*, 1996).

s_1	s_2	Zusatzreflexe	Lipid	Phase
2,13	2,56	0,97, 1,93	PC14	SG1
2,17	2,70	(2,49)	PG14	G_x
2,22	2,64	0,87, 1,24, 1,86, 2,45	PE4	SG2
-	-	-	PS14	G_x
2,18	2,59	0,95, 1,27, 1,61, 2,01, 2,35	PA14	SG3
-	-	-	PC	L_c' (Stümpel, J., 1981)

Tabelle 3.2.13-5: Übersicht über die Weitwinkelreflexe s_1 , s_2 und den Zusatzreflex s der Subgelphase.

Die Lage und Intensitäten der lamellaren Reflexe im Kleinwinkelbereich waren für jedes Lipid unterschiedlich, da sie von folgenden Faktoren abhängen: 1) von dem chemischen Bau der Kopfgruppe, 2) von der Konformation der Kopfgruppe, die die Verteilung der Elektronendichte bestimmt, 3) von der Menge des eingelagerten Wassers („trapped water“) und 4) von Veränderungen im Neigungswinkel der Lipide. Breite Reflexe sind ein Hinweis auf eine schlechte lamellare Schichtung. Dies trifft besonders auf die Verbindung PS14 in G_x zu, die erst nach dem Erhitzen auf 90 °C eine gute lamellare Schichtung zeigt, dabei aber in eine Phase L_β übergegangen ist. Die Substanzen PC14 in der Phase SG1 und PG14 in der Phase G_x zeigen Veränderungen im Schichtabstand beim Abkühlen, die mit dem Modell in Übereinstimmung stehen, daß beim Kristallisieren des überschüssigen Wassers das leicht gebundene „trapped water“ aus dem Kopfgruppenbereich herausgezogen wird (Förster, G. *et al.*, 1989a). Ungewöhnlich verhielt sich PA14, das durch das Ausfrieren des Wassers eine Vergrößerung des Schichtabstands zeigte, was mit einem Aufrichten der dehydratisierten Lipide erklärt wurde. Tabelle 3.2.13-6 zeigt einen Vergleich der Schichtabstände d der Phospholipide mit Dreifachbindung mit DSPC.

Die acetylenischen Lipide enthielten in der Tieftemperaturphase wenig Kopfgruppenwasser („trapped water“) da sonst der Bishichtabstand d nach dem Ausfrieren von Eis abnehmen würde. Dies war nicht der Fall, obwohl Streudiagramme über einen weiten Temperaturbereich aufgenommen wurden. Dies konnten auch die IR-Spektren dieser Verbindungen bestätigen. Die Carbonylbanden waren typisch für eine dehydratisierte Phase.

Lipid	Tieftemperaturphase +Eis	Subgelphase	Gelphase	L_{α}
DSPC	-	6,5 nm (L_c')*	6,8 nm (L_{β}')*	7,1 nm*
PC4	6,3 nm (L_c') ⁺	6,8 nm (L_c') ⁺	7,4 nm (P_{β}') ⁺	6,8 nm ⁺
PC14	5,6 nm (SG1) 5,9 nm ⁺	6,1 nm (SG1) 6,3 nm (L_c') ⁺	-	6,5 nm 7,4 nm ⁺
PA14	6,1 nm (SG3)	6,0 nm (SG3)	-	5,75 nm
PE4	5,4 nm (SG2)	5,4 nm (SG2)	-	5,6 nm
PG14	5,1 nm (G_x)	-	5,4 nm (G_x)	4,9 nm
PS14	5,2 nm (G_x)	5,2 nm (G_x)	4,7 (L_{β})	-

Tabelle 3.2.13-6: Vergleich der Bishichtabstände d der Phospholipide mit Dreifachbindung mit DSPC. ⁺(Mannova, M., 1995), * (Stümpel, J., 1981)

In der Übersicht über die Bishichtabstände fällt auf, daß diejenigen Lipide, deren Kopfgruppen die Fähigkeit zur Wasserstoff-Brückenbindung besitzen (PE4, PG14) oder andere spezifische Wechselwirkungen ausbilden können (PS14), kein Wasser in den Kopfgruppenbereich einlagern. Außerdem zeigen sie geringe Bishichtabstände, selbst im fluiden Zustand. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß die starke laterale Vernetzung der Kopfgruppe eine Ausrichtung parallel zur Oberfläche bewirkt, was bei großen Kopfgruppen (PS14) z.B. durch eine Vergrößerung des Neigungswinkels unterstützt werden könnte. Das Verhalten von PA14 nimmt in diesem Vergleich eine Mittelstellung ein. Ausgeprägt ist das Verhalten von den Phosphatidylcholinen. Sie bilden einen Quellzustand in der Oberfläche aus, der eine ungeordnete räumliche Lage der Kopfgruppe und die Einlagerung von „trapped water“ einschließt.

Eine charakteristische Eigenart der Hybridszellen ist die Ausbildung von Molekülgittern. Am Beispiel der Verbindung PA14 wurden 3 Varianten für eine laterale Packung berechnet. Dabei wurden die in der Natur existierenden Subzellen (Abrahamsson, S. *et al.*, 1978) und eine O||-Subzelle, die aus einer aufgeweiteten T||-Packung (DMPA·Na, (Sundell, S., 1994)) abgeleitet

wurde, zugrundegelegt. Für jede Packung wurden für die beiden intensivsten Kettenreflexe Netzebenenabstände bestimmt und Gitterparameter berechnet. Eine Indizierung mit den rückgerechneten Abständen ergab, daß die gemessenen Reflexe am besten dem Modell einer O||-Subzelle entsprachen. Die aufgeweitete Subzelle ist in der Lage wie bei DPPC Moleküle im Gitter aufzunehmen. Bei DPPC sind die zick-zack-Ebenen der Ketten unter einem Winkel zueinander angeordnet, und in der *sn2*-Acylkette tritt ein Knick auf, um eine Parallellagerung und Kontakte mit der *sn1*-Acylkette zu gewährleisten. Dadurch ist ein energieärmerer Zustand erreicht, bei der die Elliptizität niedrig ist. Die Dreifachbindung ordnet sich in einer *all-trans* konfigurierten Kette exakt in zick-zack-Ebene, erhöht aber ihre Elliptizität. Das hilft zu verstehen, daß PA14 im Vergleich zu DPPA ein aufgeweitetes Gitter aufwies. Die drei Modelle sind jetzt daraufhin zu bewerten, wie diese veränderte Elliptizität in dem Molekülgitter unterzubringen ist (Abbildung 3.2.8-14). Eine parallele Ausrichtung und die Positionen auf Lücke bieten im Modell O|| die besten Voraussetzungen für einen energiereicheren Zustand. Tabelle 3.2.13-7 ermöglicht einen Vergleich der Gitterkonstanten verschiedener Lipide.

Lipid	a [nm]	b [nm]	γ [°]
DSPC*	0,84	1,04	90
PC4, HS1*	0,82	1,07	90
PC14, HS1*	0,82	1,12	90
PA14, HS1 (O \perp)	1,14	0,77	90
PA14, HS2 (O \perp)	0,96	0,94	102,2
PA14 O	0,85	0,99	90
DPPE, HS1**	1,03	0,776	90
DMPA·Na***	0,426	0,525	96

Tabelle 3.2.13-7: Vergleich der Gitterkonstanten verschiedener Subzellen und Hybridszellen. *(Mannova, M., 1995), **(Abrahamsson, S. *et al.*, 1978), *** (Sundell, S., 1994).

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß das Einbringen einer Dreifachbindung in die Ketten gegenüber der analogen gesättigten Verbindung starke Änderungen in Phasen- und Struktureigenschaften hervorruft. Die Dreifachbindung bewirkt eine erhöhte Ordnung im hydrophoben Molekülbereich. In dieser Arbeit wurden acetylenische Lipide untersucht, bei denen die Dreifachbindung entweder in „oberen“ Bereich der Kette, d.h. in der Nähe der polaren Carbonylregion (PL4) oder im „unteren“ Bereich (PL14) der Kette lokalisiert war. Die

Ordnungstendenz der Dreifachbindung in Position 4 ist stärker als in Position 14 der Acylkette, da in der Mitte der Bilschicht die Unordnung ohnehin zunimmt. In dieser Arbeit wurde auch der Einfluß unterschiedlicher Kopfgruppen untersucht. Eine Fragestellung, die sich daraus ergab, war, wie sich die beiden Einflüsse ergänzen würden. Anhand der röntgenographischen Untersuchungen lassen sich erste Aussagen über bestehende Zusammenhänge machen.

So zeigten die durchgeführten Untersuchungen, daß die Größe der Kopfgruppe das polymorphe Verhalten der acetylenischen Lipide beeinflusst.

Das gesättigte Lipid DPPC existiert in vier abgegrenzten lamellaren Phasen, die mit abnehmender Temperatur in folgender Reihenfolge vorkommen: L_{α} , $P_{\beta'}$, $L_{\beta'}$, L_c' . Die Subgelphase L_c' ist wie die Gelphase $L_{\beta'}$ durch eine 2D-Ordnung der Fettsäureketten in den Bilayern charakterisiert. In der Subgelphase kommt jedoch ein weiteres Ordnungsprinzip, nämlich eine periodische Anordnung der ganzen Moleküle hinzu. Beim Übergang von der Gelphase in die Subgelphase wird zusätzlich zum Kettengitter ein Molekülgitter ausgebildet, bei dem auch die Kopfgruppe streut. So wurden in der Subgelphase neben den normalerweise beobachteten Klein- und Weitwinkelreflexen Zusatzreflexe beobachtet. Ketten- und Molekülgitter beim DPPC entsprechen einander dadurch, daß das Molekülgitter 2 mal so groß ist wie das Kettengitter, und die Moleküle sind lageversetzt (Raghunathan, V.A. *et al.*, 1995). Bei DPPG verhält es sich so, daß das Kettengitter der Gelphase in der Subgelphase durch ein Molekülgitter abgelöst wird, wobei die Gitter der beiden Monolayer, die einen Bilayer ausbilden miteinander korrelieren (Blaurock, A.E. *et al.*, 1986).

Eine kleine Kopfgruppe zusammen mit dem ordnenden Einfluß der Dreifachbindung wie bei den Lipiden PA14, PE4 führt bei Temperaturen unterhalb T_m zu einer direkten Ausbildung einer Subgelphase SG, ohne daß sich Spuren einer Gelphase nachweisen lassen. Im Vergleich dazu kann sich die Subgelphase bei dem gesättigten Lipid DPPC erst nach langem Temperieren bei tiefen Temperaturen ausbilden (54,4 °C) (Raghunathan, V.A. *et al.*, 1995). Bei den acetylenischen Lipiden PC4 (Mannova, M., 1995) und PC14, die wie DPPC eine große Kopfgruppe besitzen, macht sich der ordnende Einfluß der Dreifachbindung und die Abhängigkeit dieses Einflusses von der Position der Dreifachbindung anschaulich bemerkbar. Während PC4 beim Abkühlen nach der L_c' -Phase in einem kurzen Temperaturintervall eine Ripple-Phase $P_{\beta'}$ ausbildet, um dann sofort in die Subgelphase L_c' überzugehen, bildet sich bei PC14 eine Subgelphase SG1 aus, die sich von der Phase L_c' des DPPC unterscheidet (Stümpel, J., 1981).

Am Beispiel der acetylenischen Lipide PS14 und PG14 wurde deutlich, daß eine große Kopfgruppe gegen den ordnenden Einfluß der Dreifachbindung im hydrophoben Kettenbereich

arbeitet, so daß sich bei Temperaturen unterhalb T_m nur eine Gelphase G_x ausbilden konnte. Dieser destruktive Effekt, der einen hohen Ordnungsgrad in der Membran verhindert, kann für die Natur eine essentielle Bedeutung sein. Finden sich im hydrophoben wie hydrophilen Molekülbereich ordnende Einflüsse, wie bei den acetylenischen Lipiden PE4 und PA14 so würde das in der Natur in diesem Membranbereich den „Tod“ bedeuten. (Förster, G. *et al.*, 1995) kam bei einem Vergleich der Phaseneigenschaften von Lecithinen mit verzweigten Fettsäuren und der Referenzverbindung DPPC zu dem Schluß, daß DPPC vielleicht deshalb als eine der Hauptkomponenten biologischer Membranen vorkommt, weil (i) die Kopfgruppengröße, (ii) die Bedingungen für die Membranoberfläche und (iii) die Kettenmatrix-Multiplizität keine optimalen Kristallisationsbedingungen gewährleisten.

3.3 Einsatz der Phospholipide zur Stabilisierung von Membranproteinen

In den Abschnitten 3.1 und 3.2 der vorgelegten Arbeit wurde die Synthese und physikochemische Charakterisierung von acetylenischen Phospholipiden behandelt. In diesem Kapitel wird nun ihre Wirkung auf die Aktivität eines Membranproteinen des steroidogenen Stoffwechsels besprochen. Dabei handelt es sich um das mitochondriale P450_{SCC} aus Rind.

3.3.1 Rekonstitution und Aktivitätsstimulierung von Cytochrom P450_{SCC} aus Rind

Lipide können entsprechend ihrem Einfluß auf die katalytische Aktivität von P450_{SCC} in zwei Gruppen eingeteilt werden: Lipide, die die Aktivität von P450 anregen („activator lipids“) und Lipide die nahezu keine Steigerung der Aktivität bewirken („nonactivator lipids“) (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a). Phosphatidylcholine, die gesättigte Fettsäureketten enthalten (im besonderen DMPC), gehören zu den „nonactivator lipids“, und werden oft als „host lipids“ für die Bildung von Proteoliposomen verwendet, um den Einfluß von ungewöhnlichen Lipiden auf die katalytische Aktivität von P450_{SCC} zu untersuchen (Kisselev, P. *et al.*, 1998b; Lambeth, J.D., 1990). In der vorgelegten Arbeit wurden Phospholipid-Vesikel verwendet, die aus einer Mischung von DMPC („nonactivator lipid“) mit dem jeweiligen acetylenischen Phospholipid bzw. DOPC („activator lipid“) im Verhältnis 2:1 bestanden (w/w). Die Phospholipide trugen die Kopfgruppen Phosphat (PA), Cholin (PC), Ethanolamin (PE), Glycerin (PG) und L-Serin (PS). Die Fettsäureketten hatten jeweils am Kohlenstoffatom 4 bzw. 14 eine Dreifachbindung. Mit den Lipiden PC4 und PC14 wurden dabei auch Messungen in reinen Vesikeln ohne DMPC durchgeführt. Die Cholesterol Konzentration der Liposomen-Membran betrug 10 mol % des Gesamtlipidgehalts und entspricht damit in etwa dem Cholesterol-Gehalt von Mitochondrienmembranen (Cheng, B. *et al.*, 1983). Da sogar kleine Mengen an Verunreinigungen, wie zum Beispiel Detergentien, und unterschiedliche Vesikelgrößen zu einer Aktivitätsstimulierung und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können (Dhariwal, M.S. *et al.*, 1989), wurden die Liposomen durch Extrudieren durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm hergestellt. Diese Technik führte zu reproduzierbaren Daten und homogenen Partikelgrößen für die Lipidvesikel unterschiedlicher Zusammensetzung, die vergleichbar waren und damit als Ursache für eine Aktivitätsstimulierung ausgeschlossen werden konnten. Der mittlere Liposomendurchmesser der Vesikel wurde durch Lichtstreuung bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1.1). Die Messungen ergaben einen mittleren Vesikeldurchmesser zwischen 94-126 nm.

Die Rekonstitution von P450_{SCC} erfolgte nach einer Methode von (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a) und (Sybert, D.W. *et al.*, 1979). Dabei wurden die zuvor hergestellten Vesikel (0,5 mM

Endkonzentration Gesamtlipidgehalt) zusammen mit P450_{SCC} (0,5 µM Endkonzentration) 5 min bei 37 °C inkubiert. (Sybert, D.W. *et al.*, 1979) konnte zeigen, daß P450_{SCC} mit vorgefertigten Vesikeln in Abwesenheit von Detergens assoziiert, wobei im Gegensatz zu anderen Membranproteinen (Eytan, G.D. *et al.*, 1976) die Anwesenheit von negativ geladenen Phospholipiden nicht notwendig ist. Untersuchungen in Systemen mit unterschiedlichen Ionenstärken ergaben, daß die Assoziation von P450_{SCC} mit Phosphatidylcholin Vesikeln hauptsächlich hydrophober Natur ist, was darauf hindeutet, daß das Protein in die apolare Region der Phospholipidmembran eingebettet ist. Die Inkorporation von P450_{SCC} in Phospholipidvesikel resultiert nach (Seybert, D.W. *et al.*, 1979) in einer spezifischen Orientierung des rekonstituierten Proteins, wobei die Adrenodoxin Bindungsstelle des Enzyms zur wäßrigen Umgebung hin exponiert ist. Dies könnte eine allgemeine Eigenschaft von Membranproteinen sein, die in Abwesenheit von Detergentien oder physikalischen Methoden (Ultraschall) in intakte Vesikel eingebettet werden. Die Ursache dafür resultiert aus der Tatsache, daß eine Oberfläche oder Domäne des Proteins hydrophober ist als der Rest und so zuerst in die Membrandoppelschicht eingefügt wird (Eytan, G.D. *et al.*, 1975).

Für die vorgelegte Arbeit bedeutet dies, daß die gemessene Aktivität von P450_{SCC} auf die Gesamtkonzentration des eingesetzten Proteins zurückzuführen ist, das in der korrekten Orientierung vorliegt.

Lichtstreuung an Lipid-Cholesterol Vesikeln

Der hydrodynamische Radius der Liposomen wurde durch Lichtstreuung an einer Laserquelle bestimmt. Dabei wurde die jeweilige Wasserviskosität in Abhängigkeit der Temperatur mit 0,1 K Genauigkeit in die verwendete Software übernommen. Für jede Probe wurden 30 Messungen durchgeführt und der arithmetische Mittelwert \bar{x} der Meßreihe gebildet. Die Standardabweichung s ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte x_i um den Mittelwert \bar{x} und beschreibt das Ausmaß der Präzision einer Mehrfachmessung. Der hier auftretende maximale Wert der Standardabweichung ergab sich zu $s = 3,5$ nm (bezogen auf den Radius).

Tabelle 3.3.2-1 gibt einem Überblick über den Mittelwert \bar{x} des hydrodynamischen Radius aus den Meßreihen und die aufgetretene Standardabweichung s .

Lipid	Mittelwert \bar{x} [nm]	Standardabweichung s [nm]
DMPC	60	2,4
DOPC	63	1,6
PA4	50	3,5
PA14	47	3,3
PC4 rein	63	2,2
PC14 rein	61	3,4
PC4	63	1,6
PC14	62	1,8
PE4	73	1,7
PE14	56	2,9
PG4	69	2,3
PG14	55	2,2

Tabelle 3.3.1-1: Hydrodynamischer Radius und Standardabweichung s der Cholesterol Lipid-Vesikel.

Aus den Mittelwerten des Radius ergaben sich Vesikeldurchmesser von 94-146 nm. Dies ist eine relative enge Verteilung und es konnte ausgeschlossen werden, daß die Liposomengröße der verschiedenen acetylenischen Lipide in unterschiedlicher Weise die Aktivitätsstimulierung von P450_{SCC} beeinflusst.

Effekt von isomeren acetylenischen Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen auf die katalytische Aktivität von P450_{SCC} in DMPC Vesikeln

In diesem Kapitel wird nun der Einfluß von acetylenischen Phospholipiden auf die Aktivität von P450_{SCC} im Vergleich zu DMPC und DOPC im Hinblick auf folgende Gesichtspunkte untersucht: die Ergebnisse demonstrieren zum einen den Effekt der Kopfgruppe, des hydrophilen Bereichs des Lipidmoleküls, zum anderen den Einfluß der Fettsäureketten, dem hydrophoben Segment auf die Aktivität von P450_{SCC}. Zusätzlich könnten noch die strukturellen Eigenschaften der Lipid-Doppelschicht eine Rolle spielen.

Abbildung 3.3.1-1 zeigt den prozentualen Umsatz von Cholesterol nach einer Reaktionszeit von 12 min, wobei die untersuchten Vesikel aus Mischungen der acetylenische Phospholipide (oder DOPC) mit DMPC (1:2) sowie aus reinem DMPC bestanden.

Unabhängig von der Natur der Fettsäureketten ergab sich eine eindeutige Steigerung des Umsatzes von Cholesterol für die anionischen Lipide mit den Kopfgruppen Phosphat (PA4,

PA14) und L-Serin (PS4, PS14) im Vergleich zu DMPC und DOPC, einem bekannten „activator lipid“ (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a).

Die Phosphatidylcholine PC4 und PC14 in reinen Vesikeln sowie in Mischungen mit DMPC zeigten sich als „nonactivator lipids“ (vgl. Abbildung 3.3.1-1). Die Lipide mit den Kopfgruppen Ethanolamin und Glycerin waren in Abhängigkeit der Position der Dreifachbindung entweder „nonactivator“ (PE4, PG14) oder „activator“ (PE14, PG4) Lipide, wobei die Position der Dreifachbindung bei PG4 den größten Einfluß ausübte, da Cholesterol in PG4-Vesikeln mit 26 % den höchsten Umsatz erfuhr.

Vergleicht man den hydrophoben Teil der Lipidmoleküle, dann erkennt man, daß die Aktivität der Monooxygenase von der Position der Dreifachbindung abhängt. Unabhängig von der Natur der Kopfgruppe bewirkt die Dreifachbindung am Kohlenstoffatom 14 eine höhere Stimulation der Aktivität als die Dreifachbindung in Position 4 der Acylketten, ausgenommen PG4 und PG14, wo die Verhältnisse umgekehrt waren.

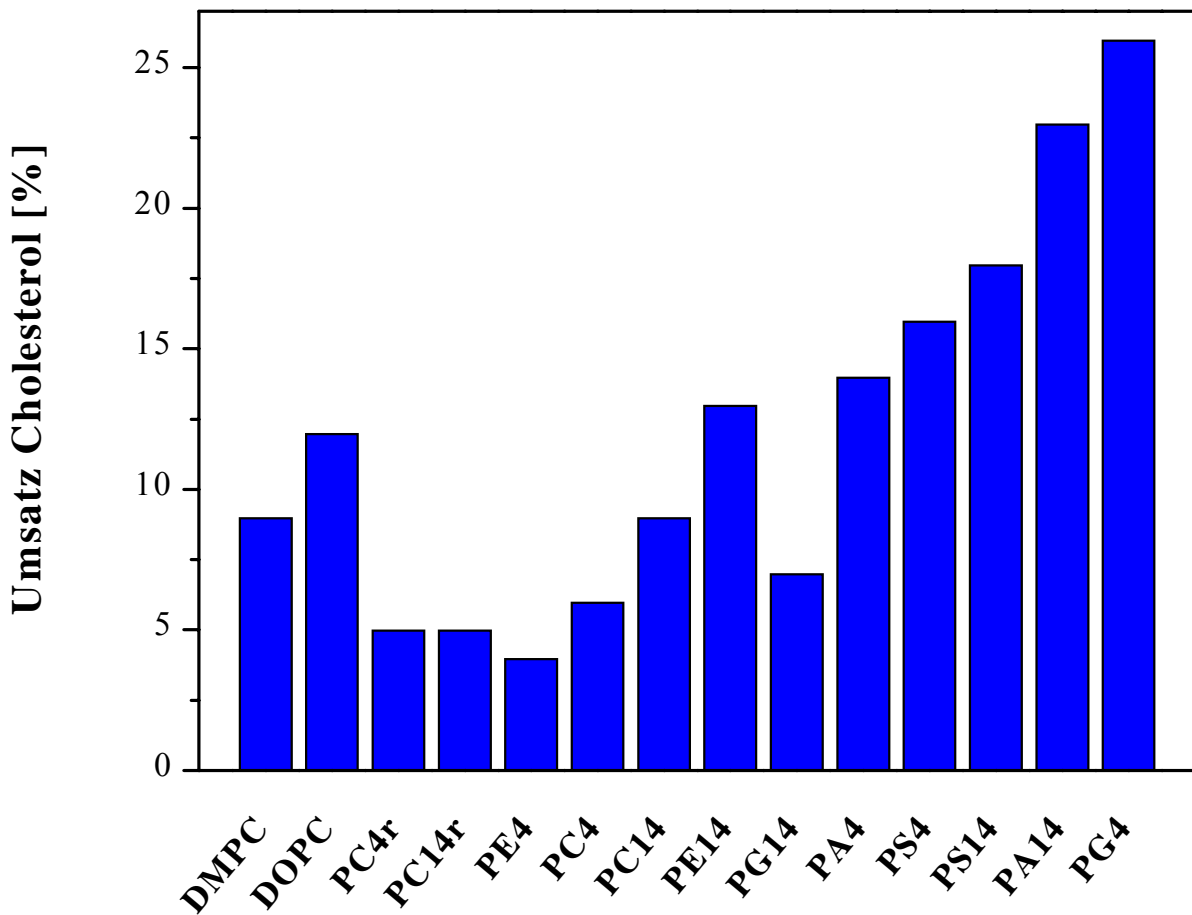


Abbildung 3.3.1-1: Prozentualer Umsatz von Cholesterol mit P450_{SCC} nach 12 min Reaktionszeit in Mischungen acetylenischer Phospholipide in DMPC Vesikeln mit einem Mischungsverhältnis DMPC:acetylenischem Phospholipid von 2:1 (w/w).

Zusätzlich zu Mischungen von DMPC mit einem einzigen acetylenischen Phospholipid wurden im Anschluß daran Mischungen von DMPC mit zwei unterschiedlichen acetylenischen Phospholipiden getestet. Das Experiment liegt in der Tatsache begründet, daß die Mitochondrienmembran bezüglich der Natur der Kopfgruppen bzw. der Fettsäureketten ein inhomogenes Gebilde darstellt. Es wurden Phospholipid-Vesikel verwendet, die aus einer Mischung von DMPC mit den jeweiligen acetylenischen Phospholipiden im Verhältnis 2:1 (w/w) bestanden, wobei die beiden acetylenischen Phospholipide im Verhältnis 1:1 (w/w)

vorlagen. Abbildung 3.3.1-2 zeigt den prozentualen Umsatz von Cholesterol nach einer Reaktionszeit von 12 min. Die Daten zeigen, daß Mischungen des „nonactivator lipids“ PC4 mit PE4 bzw. PS4 keine Stimulierung des Enzyms im Vergleich zu DMPC-Vesikel bewirkten, während eine Mischung von PC4 mit den anionischen Lipiden PA4 bzw. PG4 zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung bezüglich der Aktivität in PC4 / DMPC-Vesikeln führte. Umgekehrt sank die Aktivität bezüglich des Umsatzes in PG4- oder PS4- / DMPC-Vesikeln, wobei in gemischten PC4 / PA4 – DMPC-Vesikeln die ursprüngliche Aktivität von P450_{SCC} erhalten blieb.

Die Mischung der Phospholipide PA14 und PG4, jeweils in DMPC als „host Lipid“, die zuvor die höchste Stimulierung des Umsatzes von Cholesterol verursachten, ergaben keine Verdopplung des Effekts, wobei sich der Einfluß von PA4 und PS4 auf die Aktivität von P450_{SCC} addierte.

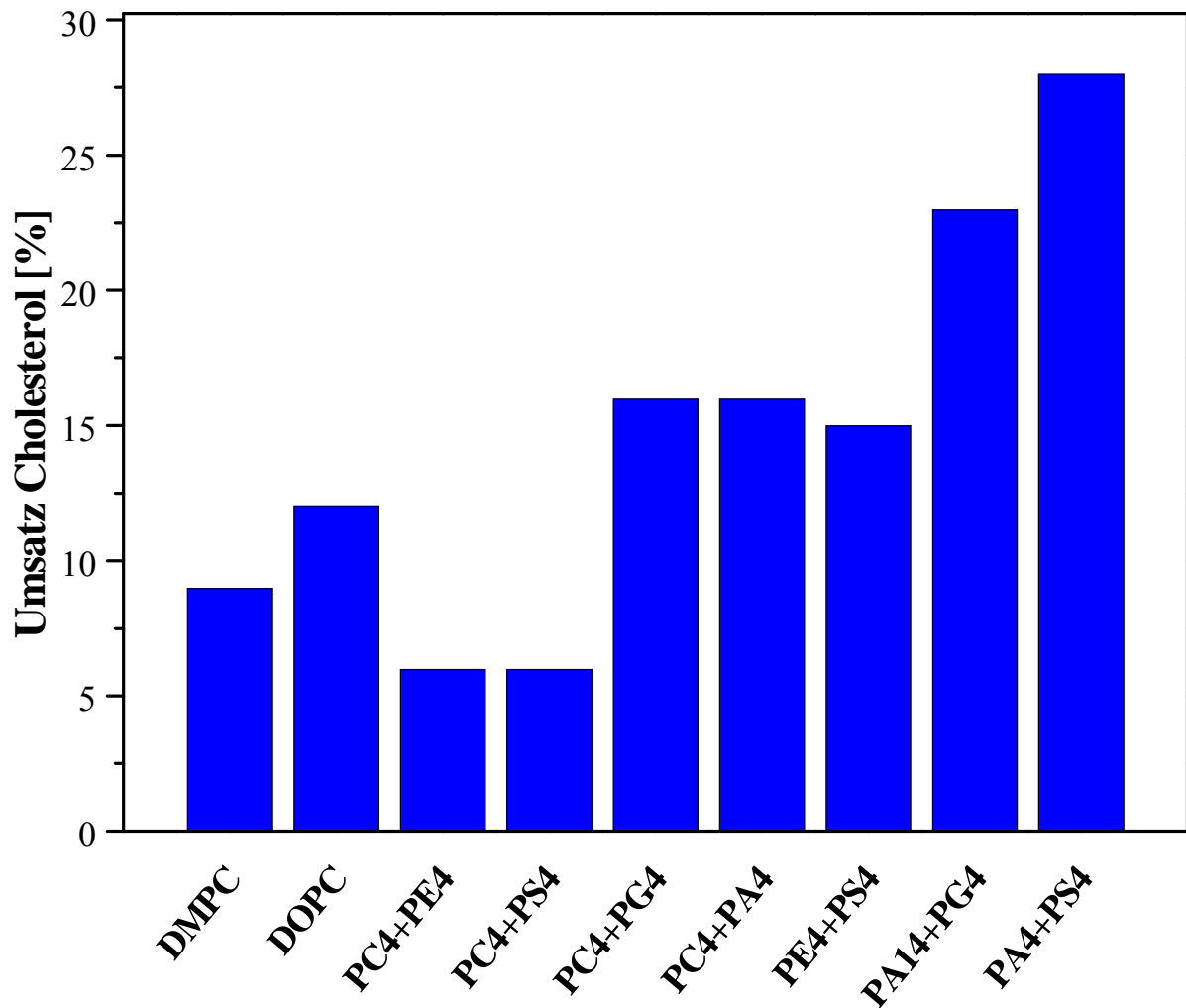


Abbildung 3.3.1-2: Prozentualer Umsatz von Cholesterol mit P450_{SCC} nach 12 min Reaktionszeit in Mischungen acetylenischer Phospholipide (jeweils 1:1, w/w) in DMPC Vesikeln mit einem Mischungsverhältnis DMPC:acetylenischem Phospholipid von 2:1 (w/w).

Zeitverlauf der Bildung von Pregnenolon in Vesikeln aus Mischungen verschiedener acetylenischer Phospholipide mit DMPC.

Der Zeitverlauf spiegelt die Inaktivierung von P450_{SCC} in allen Vesikeln mit Mischungen aus DMPC mit acetylenischen Phospholipiden wieder. Unabhängig von der Natur des acetylenischen Phospholipids war die Inaktivierung des Enzyms nach ca. 60 min vollständig. In Liposomen mit der Lipidmischung PA4+PS4 lag die höchste Umsatzrate von Cholesterol vor, was in Abbildung 3.3.1-3 deutlich wird.

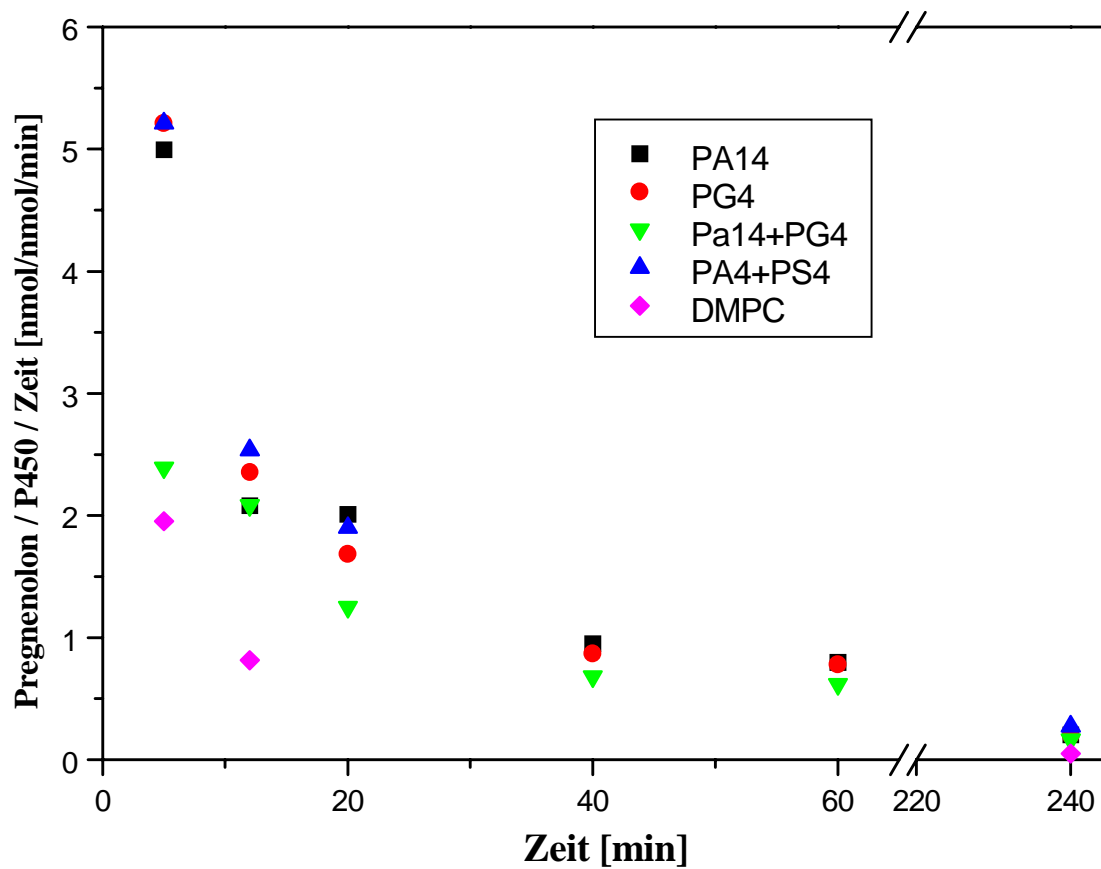


Abbildung 3.3.1-3: Zeitverlauf der Reaktionsgeschwindigkeit in verschiedenen acetylenischen Phospholipid-DMPC Vesikeln mit einem Mischungsverhältnis DMPC:acetylenischem Phospholipid von 2:1 (w/w).

Abbildung 3.3.1-4 veranschaulicht, daß nach einer Reaktionszeit von 60 min keine Aktivitätszunahme mehr nachweisbar war.

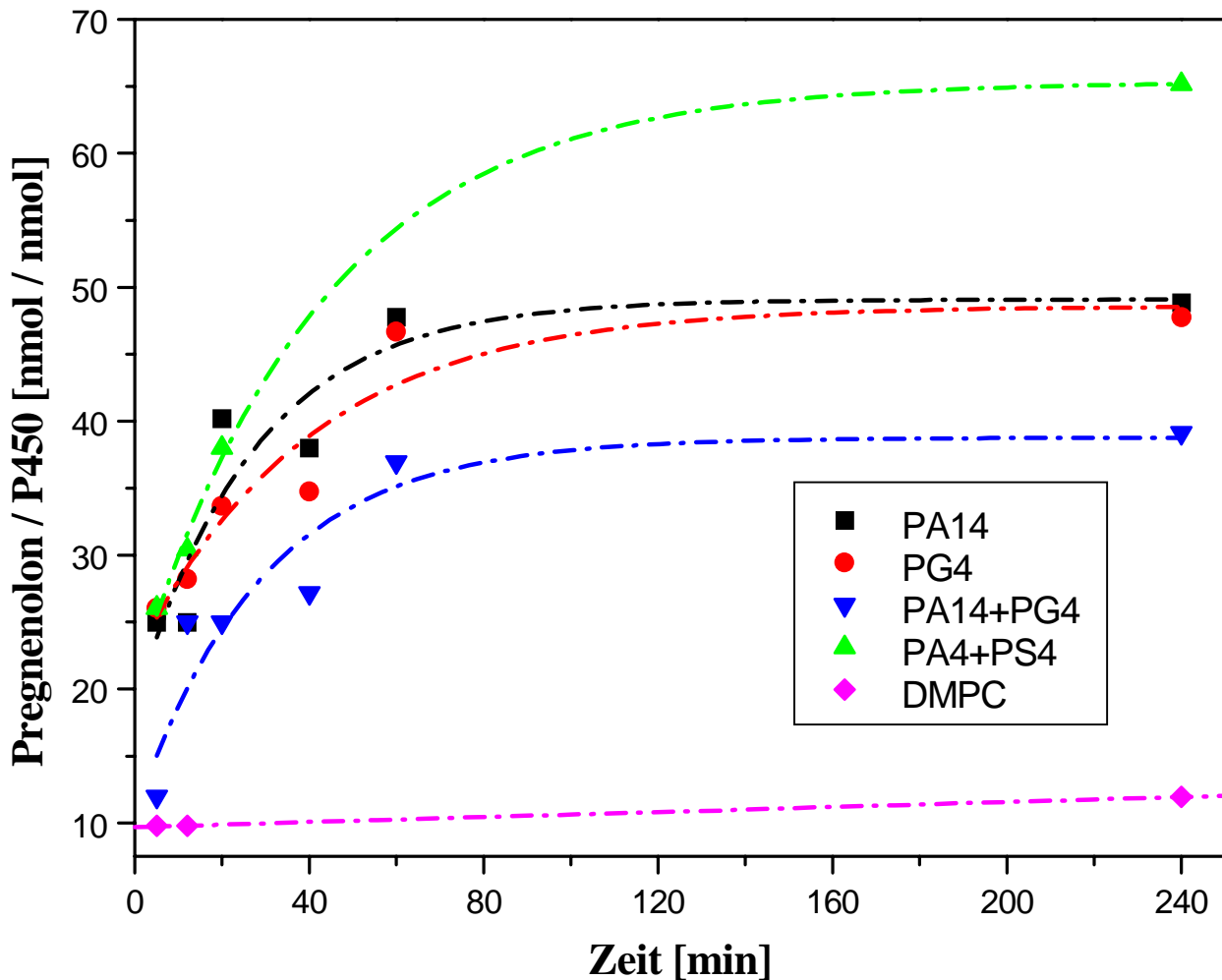


Abbildung 3.3.1-4: Zeitverlauf der Bildung von Pregnenolon in verschiedenen acetylenischen Phospholipid-DMPC Vesikeln mit einem Mischungsverhältnis DMPC:acetylenischem Phospholipid von 2:1 (w/w).

Einfluß des Anteils acetylenischer Phospholipide auf die Aktivität von P450_{SCC} in Vesikeln in Mischungen mit DMPC.

Ziel der Untersuchungen war es, den Effekt des Membrangehalts acetylenischer Phospholipide in DMPC-Vesikeln auf die Aktivitäts Stimulierung von P450_{SCC} zu ermitteln. Dazu wurden Versuchsreihen am Beispiel der beiden Lipide PA14 und PG4 durchgeführt. Der

Gesamtlipidgehalt (in Gew. %) des Systems blieb dabei konstant. Abbildung 3.3.1-5 zeigt den Umsatz von Cholesterol in Abhängigkeit des Anteils von PA14 und PG4 in DMPC Vesikeln. Schon bei einem Lipid/DMPC Verhältnis von 1:10 erfolgte eine Aktivierung des Enzyms im Vergleich zu reinen DMPC-Vesikeln. Mit steigendem PG4-Gehalt in den DMPC Vesikeln stieg der Umsatz von 15 % auf 47 %, wobei ein logarithmischer Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wurde. Dies entspricht einer 5,2-fachen Aktivitätsstimulierung. Für PA14 fand ein starker Anstieg des Substratumsatzes bis zu einem Lipid/DPMC Verhältnis von 1:2 auf 23 % statt, um dann wieder geringfügig abzunehmen. Mit zunehmendem PA14-Gehalt der DMPC Vesikel wurde eine Trübung der Liposomensuspension beobachtet, jedoch nicht bei Vesikeln mit PG4-Zusatz. Eine Trübung deutet auf das Auftreten nicht-lamellarer Strukturen hin (Cullis, P.R. *et al.*, 1979) und wurde auch schon bei Untersuchungen mit DOPC/DMPC Vesikeln beobachtet (Lambeth, J.D., 1981), wo eine Trübung oberhalb eines DOPC/DMPC Verhältnis von 1:1 auftrat.

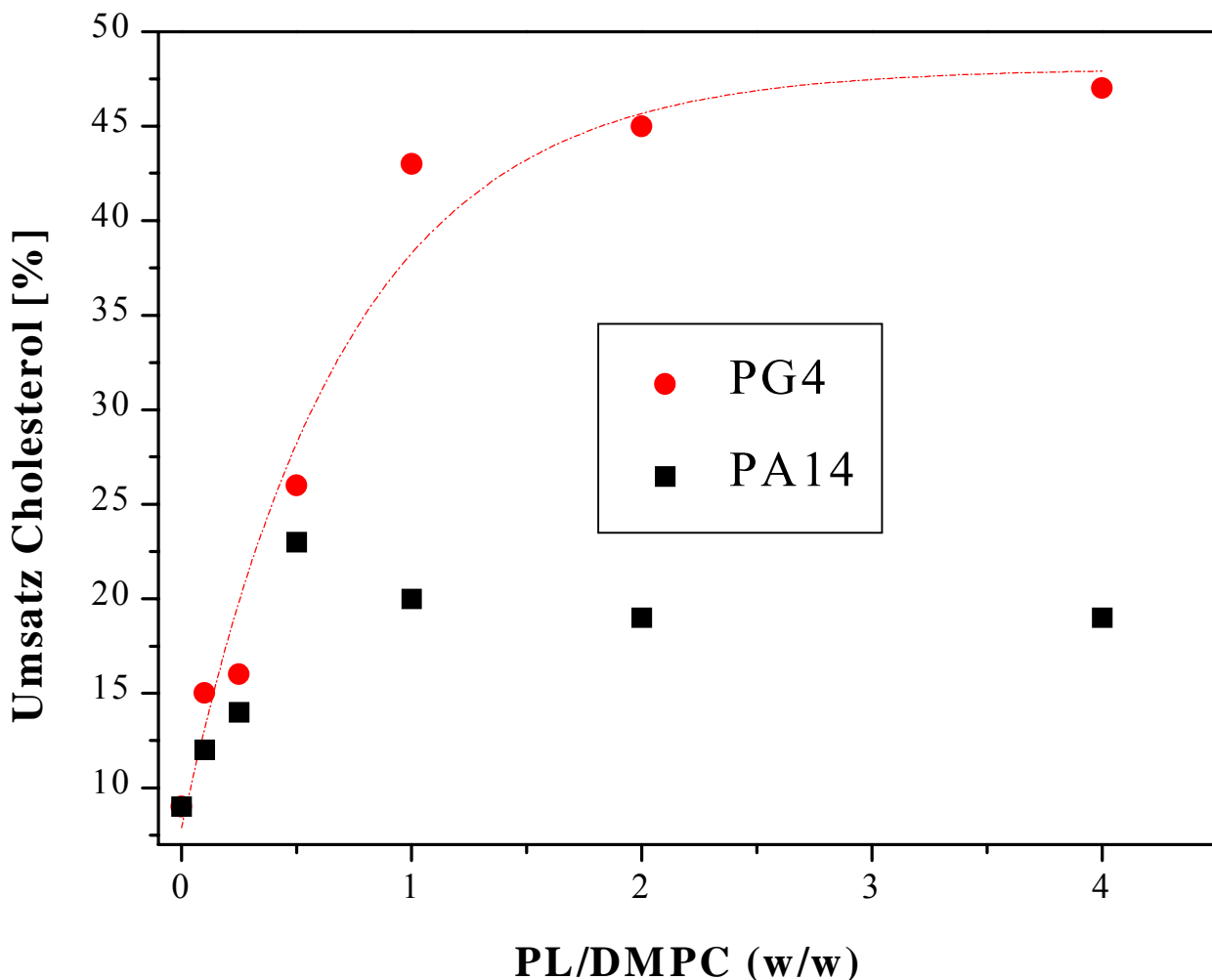


Abbildung 3.3.1-5: Prozentualer Umsatz von Cholesterol in Abhängigkeit vom Anteil von PG4 und PA14 in DMPC Vesikeln nach einer Reaktionszeit von 12 min.

Einfluß des Cholesterol-Lipid Verhältnisses auf die Aktivität von P450_{SCC}.

„Activator“ Lipide erreichen eine Aktivitäts Stimulierung von P450_{SCC} indem sie eine erhöhte Affinität von Cholesterol zum Enzym-Lipid-Komplex bewirken (Kowluru, R.A. *et al.*, 1983; Lambeth, J.D., 1981; Pember, S.O. *et al.*, 1983). In der Literatur gibt es für die Ursache dieser gesteigerten Affinität zwei grundsätzlich verschiedene Interpretationen, die in Kapitel 3.3.2 diskutiert werden.

Beim Einbau von Cholesterol in die Phospholipid-Membran erfolgt die Bindung an das Cytochrom sehr schnell und wird von einer Verschiebung der Soretbande im optischen Spektrum von einem „low spin“ oder L-Typ Spektrum zu einem „high spin“ oder H-Typ Spektrum begleitet (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a). Der Anteil des Hämoproteins in der „high spin“ Form ist

eine Funktion des Cholesterol:Lipid-Verhältnisses. Diese Tatsachen legen den Schluß nahe, daß Cholesterol mit dem Cytochrom über das hydrophobe Phospholipid-Milieu in Wechselwirkung tritt und nicht über die hydrophile wäßrige Phase (Sybert, D.W. *et al.*, 1979).

Um eine maximale Aktivitäts Stimulierung von P450_{SCC} zu erreichen, muß in Abhängigkeit der Phospholipidzusammensetzung der Membran ein verändertes Cholesterol:Phospholipid Verhältnis eingesetzt werden. In Vesikeln mit DMPC wurden für die Lipide PA14, PG4 und die Mischungen PA4+PS4 und PA14+PG4, die im Kapitel 3.3.1.2 die höchste Aktivitätstimulierung bewirkten, Messungen des Cholesterolumsatzes bei Cholesterol:Phospholipid-Verhältnissen von 0,028; 0,055; 0,11; 0,22; 0,55 und 1,1 durchgeführt. Reine DMPC-Vesikel wurden nicht untersucht, da die Aktivität von P450_{SCC} dort sehr gering ist und K_m für Cholesterol in diesem Lipid so hoch ist, daß keine Sättigung mit Cholesterol erreicht werden kann, wobei ein maximal erreichbares Verhältnis von Cholesterol:Phospholipid bei 1:1 liegt. Die Bestimmung von V_{max} -Werten wird dadurch fast unmöglich. In Abbildung 3.3.1-6 ist der Einfluß des Cholesterol:Phospholipid-Verhältnisses auf die Aktivität von P450_{SCC} in einer Lineweaver-Burk Auftragung dargestellt. Die Cholesterolabhängigkeit zeigte bei den untersuchten Phospholipiden nur bei niedrigen bis mittleren Substratkonzentrationen ein normales Michaelis-Menten Sättigungsverhalten. Bei allen eingesetzten Lipidvesikeln wurde die maximale Aktivitätstimulierung des Enzyms bei einem Cholesterol Verhältnis von 0,11 erreicht, bei höheren Substratkonzentrationen ergab sich eine zweite Phase. Im Gegensatz zu einem sehr hohen Cholesterolgehalt der Vesikel bewirkte ein sehr niedriger Cholesterolanteil dagegen einen geringeren Aktivitätsverlust. In der Natur findet man in Mitochondrien ähnlich niedrige Cholesterol:Lipid-Verhältnisse von 0,11 bis zu 0,33 vor (Asworth, L.A.E. *et al.*, 1966), wobei nur in der Plasmamembran der Leber ein höheres Verhältnis von 0,83 gefunden wurde (Dorling, P.R. *et al.*, 1973).

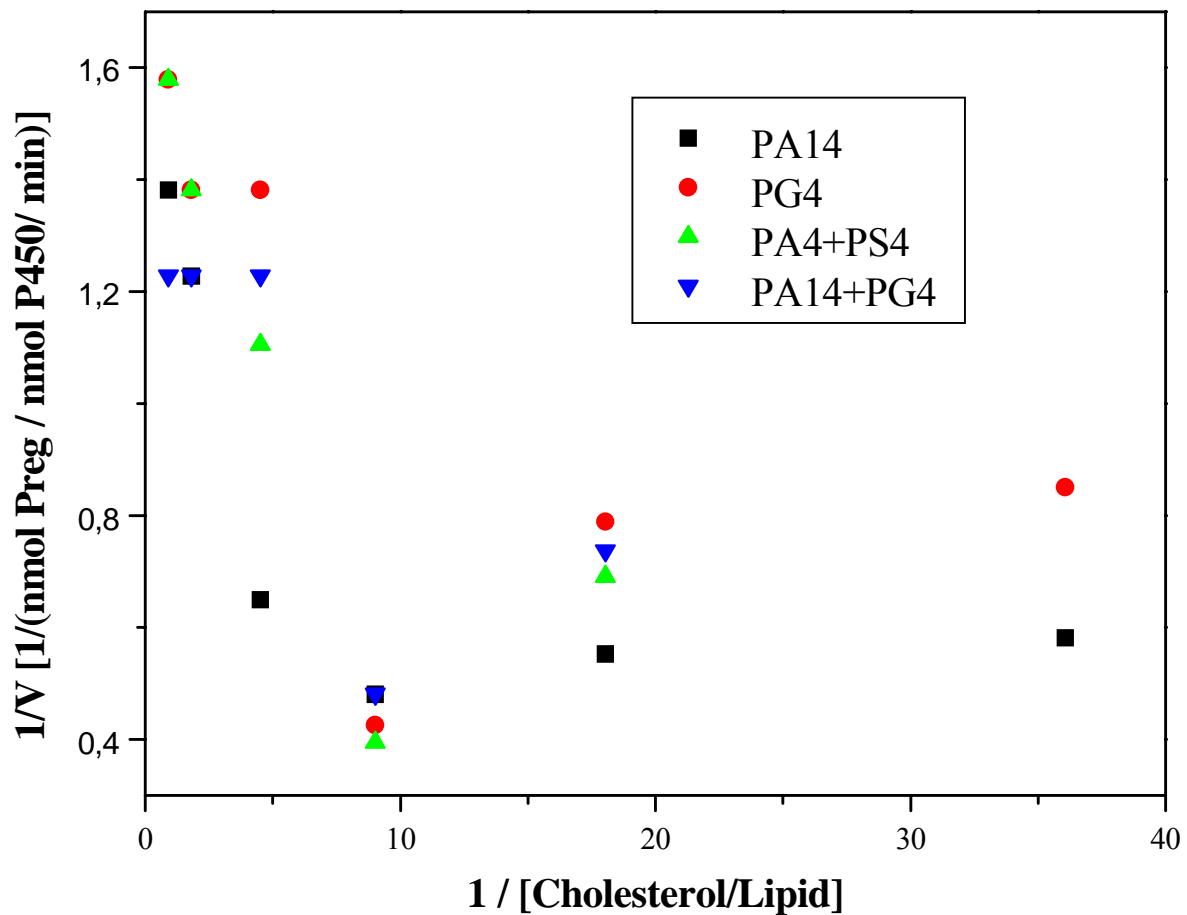


Abbildung 3.3.1-6: Lineweaver-Burk-Diagramm der Bildung von Pregnenolon mit P450_{SCC} in Abhängigkeit vom Cholesterol:Lipid Verhältnis.

Effekt der Adrenodoxin-Konzentration auf die Aktivität von P450_{SCC}.

Adrenodoxin (ADX) dient als mobiler Ein-Elektronen Shuttle zwischen Adrenodoxin-Reduktase und Cytochrom P450_{SCC} (Lambeth, J.D. *et al.*, 1979). In Mitochondrien von Rindern liegt ADX in einem 3:8 Verhältnis zu Cytochrom P450_{SCC} vor, während es in einem dreifachen Überschuss zur Adrenodoxin-Reduktase vorkommt (Hanukoglu, I. *et al.*, 1986). Analysen der Kinetik der Reduktion von Adrenodoxin, zusammen mit der Untersuchung von Salzeffekten ergaben, daß die Dissoziation von reduziertem ADX von der Adrenodoxin-Reduktase essentiell für die katalytische Aktivität ist. Durch einen Überschuss von ADX wird eine Reassoziaton des reduzierten Adrenodoxins an die Reduktase verhindert, da bei mittleren Ionenstärken die

Gleichgewichtsassoziationskonstante K_a des reduzierten ADX kleiner ist, als die des oxidierten ADX (Lambeth, J.D. *et al.*, 1979).

Ziel des Versuchs war die Ermittlung eines optimalen $P450_{SCC}$ (P450-Reduktase):ADX Verhältnisses. Dazu wurden reine DMPC-Vesikel und die Lipide PA14, PG4 sowie eine Mischung aus PA4+PS4 in DMPC-Vesikeln untersucht. Die Experimente wurden mit einem äquimolaren Verhältnis zwischen vesikel-gebundenem $P450_{SCC}$ und Adrenodoxin-Reduktase in Abhängigkeit von zugesetztem Adrenodoxin durchgeführt. Das Verhältnis von acetylenischen Phospholipiden zu DMPC betrug 1:2 (w:w). Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 3.1.1-7 dargestellt. In Abhängigkeit der acetylenischen Phospholipide resultierte ein unterschiedliches Stimulationsverhalten des Enzyms. In reinen DMPC-Vesikeln ergab sich erwartungsgemäß keine erhöhte Enzymaktivität mit steigender Adrenodoxin Konzentration. Unterhalb eines Verhältnisses ADX:P450 von 20:1 bewirkten alle Systeme eine ähnlich hohe Stimulierung der Aktivität. Bei PA14 ergab sich schon bei einem 20-fachen Überschuss von ADX ein Umsatz von 44 %, der beim System PG4/DMPC erst ab einem 80-fachen Überschuss von ADX erreicht wurde. In DMPC-Vesikeln mit einer Mischung von PA4+PS4 wurde der Umsatz von Cholesterin in viel geringerem Maße durch die Adrenodoxin Konzentration beeinflusst. So wurde hier nur ein Umsatz von 36 % bei 80-fachem ADX Überschuss erreicht. Die unterschiedliche Stimulierung der Enzymaktivität bei gleichen ADX Konzentrationen kann durch die Annahme erklärt werden, daß verschiedene acetylenische Phospholipide eine zusätzliche Wirkung auf $P450_{SCC}$ ausüben, indem sie nicht nur zu einer verstärkten Bindung von Cholesterin führen sondern auch zusätzlich die Bindung von ADX an das Enzym erhöhen.

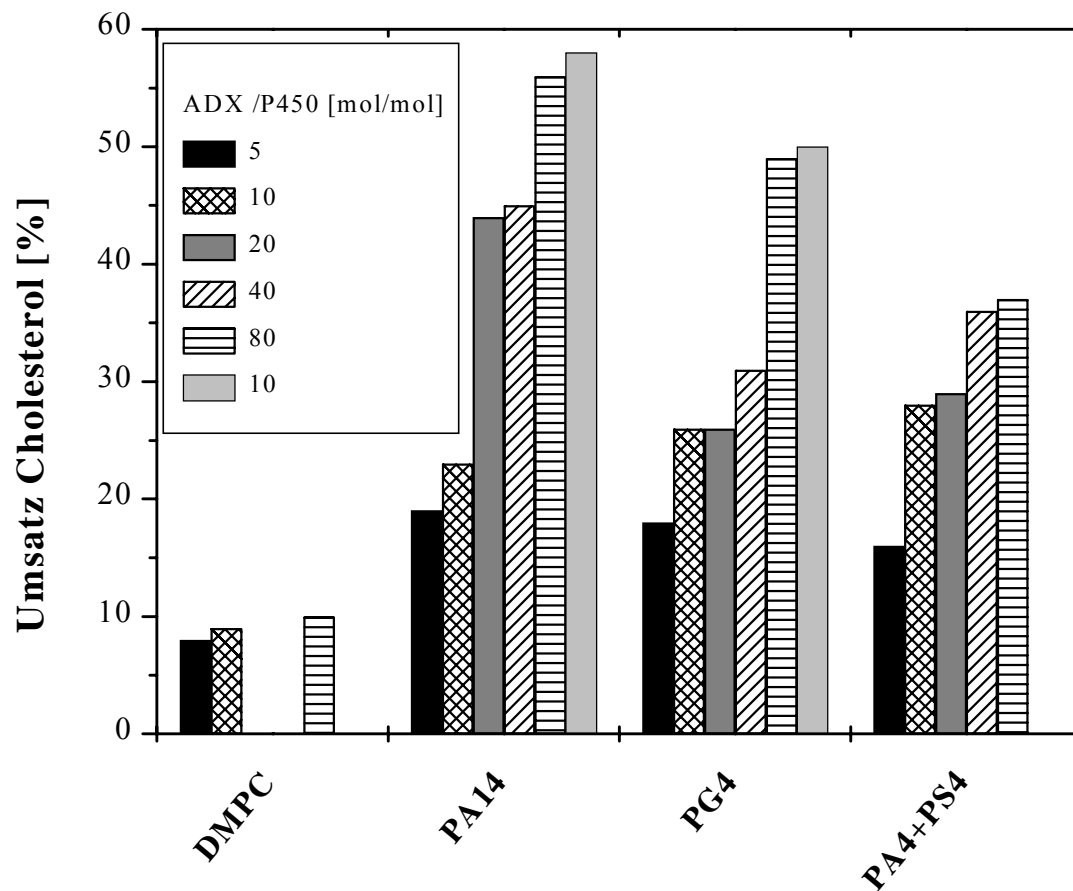


Abbildung 3.3.1-7: Umsatz von Cholesterol als Funktion der ADX Konzentration.

Effekt von isomeren acetylenischen Phospholipiden auf die katalytische Aktivität von P450_{SCC} in Tween 20 Lösungen.

In Detergenlösungen wird der Einfluß der strukturellen und der fluiden Eigenschaften der Membrandoppelschicht auf die Aktivität des Enzyms ausgeblendet. Hier wird eine Aktivitätsstimulierung allein durch die Natur der Fettsäureketten und die Größe und Ladung der Kopfgruppen der Phospholipidmoleküle bewirkt. Aus diesem Grunde wurden Experimente in einem gemischten Detergens (Tween 20)-Lipid-System mit den Lipiden DOPC, PA4, PA14, PC4, PC14, PG4, PG14, PE4 und PE14 durchgeführt.

Abbildung 3.3.1-9 zeigt den prozentualen Umsatz von Cholesterol nach einer Reaktionszeit von 10 min. In Abhängigkeit der Natur der Fettsäureketten ergab sich eine eindeutige Steigerung des Umsatzes von Cholesterol für die Lipide, die eine Dreifachbindung am Kohlenstoffatom C4

ihrer Acylkette aufwiesen. Eine Ausnahme stellte PA14 dar, hier bewirkte der Einfluß der anionischen Kopfgruppe eine Umkehr des Verhaltens.

Vergleicht man den hydrophilen Teil der Lipidmoleküle, dann erkennt man, daß die anionischen Phospholipide die Aktivität der Monooxygenase stärker stimulierten, als die zwitterionischen Lipide. Zusammenfassend betrachtet, erwiesen sich mit Ausnahme von PC14 und PE14 alle acetylenischen Phospholipide als „activator lipids“ wobei die negativ geladenen Phospholipide die aktivierende Wirkung von DOPC übertrafen.

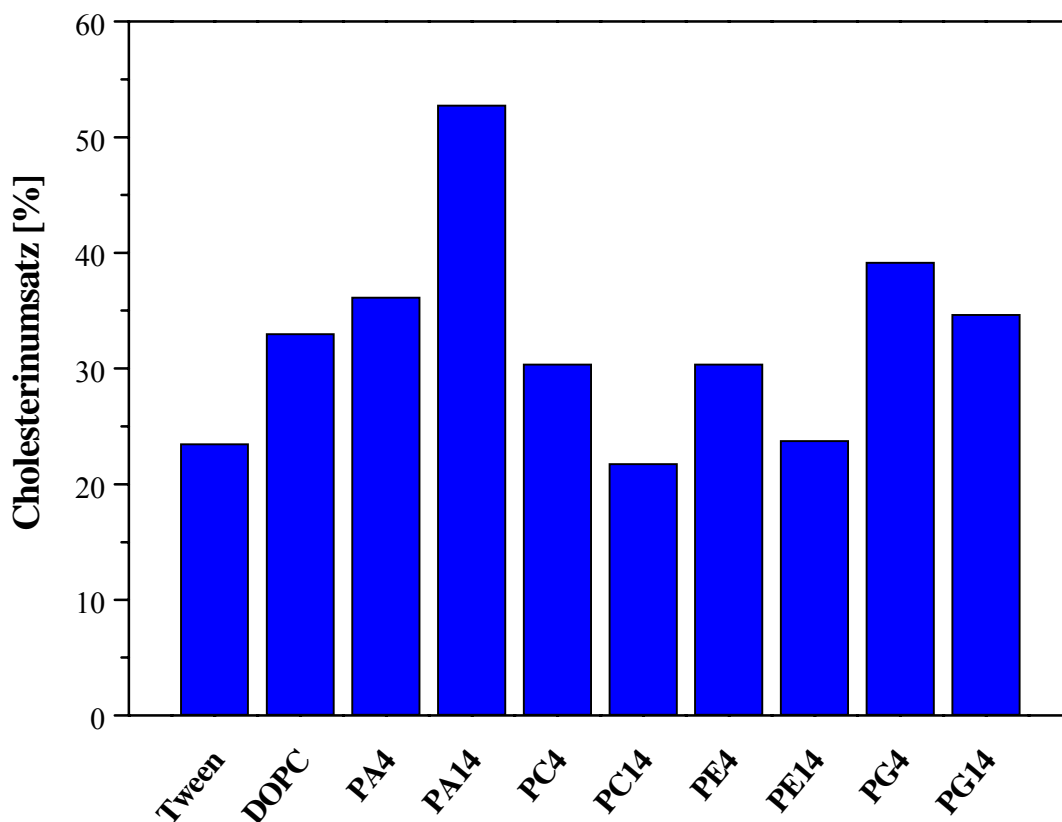


Abbildung 3.3.1-8: Prozentualer Umsatz von Cholesterol nach 10 min Reaktionszeit in Abhängigkeit von Mischungen acetylenischer Phospholipide und DOPC in Tween 20 Micellen.

3.3.2 Diskussion

Durch die Möglichkeit P450_{SCC} in Phospholipid-Vesikel rekonstituieren zu können, hat man ein ausgezeichnetes System erhalten, um Effekte von Lipiden auf die Struktur und Funktion dieses

membranständigen Enzyms untersuchen zu können, das ein Schlüsselenzym im steroidogenen Metabolismus darstellt (Lambeth, J.D., 1990).

Es hat sich herausgestellt, daß Phospholipide die Aktivität einer Reihe von membran-assoziierten Enzymen und Transportproteinen beeinflussen (Fourcans, B. *et al.*, 1974). In vielen Fällen ist nur die Anwesenheit unspezifischer Lipide notwendig wie zum Beispiel Ca^{2+} -abhängige ATPase (Dean, W.L. *et al.*, 1977; Dean, W.L. *et al.*, 1978) während spezifische Phospholipide für die Aktivität einiger Enzyme wie β -Hydroxybutyrat Dehydrogenase erforderlich sind (Gazzotti, P. *et al.*, 1975; Grover, A.K. *et al.*, 1975).

In der vorgelegten Arbeit wurde nun das Strukturelement der Dreifachbindung in den Fettsäureketten und die Rolle der Kopfgruppe hinsichtlich der Stimulation der P450_{SCC} Aktivität untersucht. Es wurden Phospholipide mit den Kopfgruppen Cholin, Glycerin, L-Serin, Ethanolamin und Phosphatidsäure synthetisiert, die entweder 4-Octadecinsäure oder 14-Octadecinsäure in Positionen *sn1* und *sn2* des Glycerinrückgrats besitzen. Die Untersuchungen wurden mit Vesikeln durchgeführt, die vor der Rekonstitution mit P450_{SCC} extrudiert wurden, wodurch eine enge Streuung der Vesikelgrößen erreicht wurde. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß beobachtete Effekte durch unterschiedliche Liposomengrößen herbeigeführt wurden.

Der Einfluß von Phospholipiden auf die Aktivität von P450_{SCC} ist während der letzten 25 Jahre Gegenstand der Untersuchungen einer Reihe von Arbeitsgruppen gewesen.

So wurde deutlich, daß die Stimulation der Aktivität von P450_{SCC} durch Lipide mit einer Zunahme der Bindung von Cholesterol an das Enzym zusammenhängt, wobei eine vermehrte Bindung von Cholesterol den Anteil des Enzyms in der high spin Form erhöht. Dabei ergaben das spezifische mitochondriale Phospholipid Cardiolipin sowie andere Phospholipide mit Fettsäureketten, die Doppelbindungen enthalten, die effektivste Stimulation von P450_{SCC} (Igarashi, Y. *et al.*, 1986; Lambeth, J.D. *et al.*, 1980b; Lambeth, J.D. *et al.*, 1982; Pember, S.O. *et al.*, 1983; Seybert, D.W. *et al.*, 1979).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit einem niedrigen Verhältnis von 0,5 von acetylenischen Phospholipid zum "host" Lipid DMPC ergaben, daß die Aktivitätstimulierung von P450_{SCC} von der Natur der Kopfgruppe abhängt, wobei Phospholipide mit einer negativ geladenen Kopfgruppe die höchste Aktivierung des Enzyms bewirkten. Die maximal erreichte Aktivierung in DMPC/PG4 Vesikeln war dabei doppelt so hoch wie in DMPC-Vesikeln mit dem anerkannten "activator" Lipid DOPC. DMPC Vesikel mit einer äquimolaren Mischung der beiden anionischen Lipide PA4 und PS4 ergaben im Vergleich dazu sogar eine 2,2 fach höhere Aktivitätssteigerung. Die Position der Dreifachbindung übte zudem einen Einfluß auf die Stärke

der Stimulation des Enzyms aus, wobei mit Ausnahme von PG die Dreifachbindung in Position 14 der Acylkette eine höhere Aktivität der Seitenkettenspaltung erzielte (siehe Abbildung 3.1.1-1 und 3.1.1-2).

Diese Ergebnisse stehen nicht in Einklang mit der Schlußfolgerung, daß allgemein Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren eine erhöhte steroidogene Aktivität besitzen. (Igarashi, Y. *et al.*, 1986) beobachteten unabhängig von der Natur der Kopfgruppe eine starke Korrelation der Aktivität von P450_{SCC} mit dem Grad von Unsättigung in den Fettsäureketten. Die acetylenischen Lipide mit den Kopfgruppen Cholin, sowie PE4 und PG14 führten wie das gesättigte Lipid DMPC in der vorgelegten Arbeit nur zu einer sehr niedrigen Stimulation der P450_{SCC} Aktivität. Zudem zeigten Mischungen aus den aktivitätssteigernd wirkenden Lipiden PA4, PS4 und PG4 mit den "non activator" Lipiden PC4 und PE4 in DMPC Vesikeln maximal die durch das anionische Lipid bewirkte Aktivitätsteigerung von P450_{SCC}.

Inzwischen gibt es Untersuchungen, die zeigen, daß gesättigte Phospholipide mit verzweigten Fettsäureketten zu einer sehr hohen Stimulation der P450_{SCC} Aktivität führen (Schwarz, D. *et al.*, 1996), die sogar mit der Aktivierung durch Cardiolipin aus Bakterienmembranen vergleichbar ist (Lambeth, J.D., 1981). So wird deutlich, daß die Bedeutung von ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden einschließlich Cardiolipin für die Aktivität des Enzyms noch nicht schlüssig geklärt werden konnte.

Nach (Pember, S.O. *et al.*, 1983) und (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980b) können drei Klassen von Mechanismen in Betracht gezogen werden, über die Fettsäureketten von Lipiden die Bindung von Cholesterol an P450_{SCC} beeinflussen. Erstens, physikalische Eigenschaften der Lipidphase oder der Membran wie zum Beispiel Fluidität, Nichtbilayer Phasen, und die Temperatur des Phasenübergangs. Da in dieser Arbeit nur Mischungen und nur im Fall von PC4 und PC14 das reine Lipidsystem untersucht wurden ist es nicht möglich, diesen Fall schlüssig in Betracht zu ziehen.

Der zweite Mechanismus nimmt für jedes Lipid eine spezifische Affinität gegenüber Cholesterol an, wodurch eine Konkurrenz zur Bindung von Cholesterol an P450_{SCC} bestehen würde. Diese Möglichkeit wurde ausgeschlossen, da der Grad der Affinität verschiedener Phospholipide für Cholesterol nicht invers mit der Affinität von P450_{SCC} mit Cholesterol zusammenfällt (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980b).

Eine dritte Möglichkeit legt nahe, daß die Stimulation der Cholesterol Bindung an P450_{SCC} durch Phospholipide auf einer direkten Bindung des (der) Lipidmoleküls (e) an Effektor Bindungsstellen des Enzyms beruht. Die Stimulation der P450_{SCC} Aktivität durch Lipide mit ungesättigten Fettsäuren wurde bisher entsprechend diesem dritten Mechanismus erklärt

(Igarashi, Y. *et al.*, 1986; Lambeth, J.D., 1981; Lambeth, J.D. *et al.*, 1980b; Lambeth, J.D. *et al.*, 1982; Pember, S.O. *et al.*, 1983; Seybert, D.W. *et al.*, 1979). Es ist möglich, die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse entsprechend des dritten Mechanismus zu interpretieren, als hoch spezifische bzw. unspezifische Bindung des Lipids an eine Effektorbindungsstelle von P450_{SCC} was eine Stabilisierung der optimalen Bindungskonfiguration von P450_{SCC} für Cholesterol zur Folge hätte.

Inzwischen gibt es jedoch Untersuchungen, die diesem allosterischen Bindungsmodell widersprechen. Die Erkenntnisse wurden aus Untersuchungen mit Phosphatidylcholinen gewonnen, die verzweigte Acylketten besitzen und so dem hydrophoben Bereich von Cardiolipin ähneln (Schwarz, D. *et al.*, 1996). Diese verzweigten Lipide führten zu einer höheren Aktivitätssteigerung der Aktivität von P450_{SCC} im Vergleich zu ungesättigten Lipiden wie DOPC. Die Tendenz der Lipidmembran Hexagonale Phasen zu bilden, ist nach (Schwarz, D. *et al.*, 1997) ein wichtiger Faktor für eine Aktivitätsstimulierung des Enzyms.

Cardiolipin, Lipide wie PE (Cullis, P.R. *et al.*, 1983) und die verzweigten Lipide gehören zu einer Lipidklasse, den sogenannten polymorphen Lipiden, die eine große Neigung besitzen, Nichtbilayer Strukturen unter bestimmten Bedingungen anzunehmen (Brezesinski, G. *et al.*, 1987). Zur Zeit gibt es experimentelle Anstrengungen und Diskussionen über die möglichen Funktionen der polymorphen Lipide in biologischen Membranen. Zur Zeit herrschen zwei allgemeine Ansichten hinsichtlich der Rolle nichtlamellarer Lipide in biologischen Membranen. Nach (Gruner, S.M. *et al.*, 1985) und (Hui, S.-W. *et al.*, 1989) kann „curvature strain“ (Krümmungsstress) bei polymorphen Lipiden die Aktivität von einigen Membranproteinen verändern. Es wurde auch berichtet, daß die Vesikelgröße, die den „curvature strain“ bestimmt, einen großen Einfluß auf die Aktivität hat (Dhariwal, M.S. *et al.*, 1989). Es ist erwähnenswert, daß PE zusammen mit Cardiolipin $\geq 50\%$ des Lipidgehalts der inneren Mitochondrienmembran ausmacht.

Die Neigung von Nichtbilayer Lipiden Hexagonale Phase zu bilden wurde auf der Basis der „molecular shape“ Theorie von Cullis (Cullis, P.R. *et al.*, 1986) und der „self-assembly“ Theorie von Israelachvili (Israelachvili, J.N. *et al.*, 1980) erklärt (siehe Kapitel 3.2.3). Ein nur kleiner Anstieg oder eine Abnahme im hydrophoben Bereich des Moleküls destabilisiert die lamellare Phase. So könnte es diese physikalische Eigenschaft der Membran sein, die durch ein ansteigendes hydrophobes Volumen - verursacht durch Kettenverzweigungen sowie durch ungesättigte Gruppen - eine Aktivierung von P450_{SCC} auslöst. Im gesamten ist die Form des Lipidmoleküls ausschlaggebend. Diese hängt nicht nur von der chemischen Struktur sondern

ebenso von der Hydratation, der ionischen Umgebung des Moleküls und der Bewegungsdynamik der Acylketten ab (Tate, M.W. *et al.*, 1991).

Unsättigung kann dem System entweder durch das „host“ Lipid oder durch ein „activator“ Lipid zur Verfügung gestellt werden. Untersuchungen der vorgelegten Arbeit mit einen steigenden Membrangehalt der Lipide PG4 und PA14 in DMPC-Vesikeln konnten zeigen, daß schon ab einem PG4 (PA14):DMPC Verhältnis von 0,1 ein Anstieg der P450_{SCC} Aktivität stattfand.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit können somit nicht zufriedenstellend mit einem allosterischen Bindungsmodell, basierend auf der Forderung nach ungesättigten Acylketten, erklärt werden. In der Literatur wurde über ein Stimulationsverhalten einiger Phospholipide berichtet, die nicht mit der Anzahl der Doppelbindungen übereinstimmte (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a). Dies könnte auf die entscheidende Rolle der Lipid Konformation in Verbindung mit einer höheren Neigung dieser Lipide, Nichtbilayer Phasen einzunehmen, hinweisen.

Wie in Kapitel 3.2 deutlich wurde, besitzen die synthetisierten Lipide veränderte physikalisch chemische Eigenschaften verglichen mit ihren gesättigten Analoga. Durch das Strukturelement der Dreifachbindung liegt ein erweitertes hydrophobes Volumen vor, das im Hinblick auf gesättigte Ketten eine veränderte Packung der Acylketten und der Kopfgruppe erfordert. Die flüssigkristalline Phase ist gegenüber der Tieftemperaturphase destabilisiert, wobei nur bei PA14 ab einer Temperatur oberhalb 60 °C das Auftreten einer Nichtbilayer Phase beobachtet wurde. Für die Bedeutung der Struktur der Lipidmembran sprechen auch die durchgeführten Untersuchungen von acetylenischen Phospholipiden in Tween 20 Micellen, wo die strukturellen Eigenschaften der Membrandoppelschicht nicht zur Wirkung kommen. Die anionischen Phospholipide zeigten sich im micellaren System ebenfalls als effektivere Stimulatoren der P450_{SCC} Aktivität, doch die Lipide mit der Dreifachbindung in Position 4 des Glycerinrückgrats bewirkten mit Ausnahme von PA4 eine höhere Aktivität als die Lipide mit der Dreifachbindung in Position 14.

Es wurden jedoch keine physikalischen Untersuchungen des gemischten Systems DMPC/acetylenisches Phospholipid durchgeführt, wobei zu erwarten wäre, daß die acetylenischen Lipide durch ihre Dreifachbindung einen störenden Einfluß auf die Bilayermembran von DMPC ausüben. Dadurch könnte es auch vermehrt mit einem Anstieg des Anteils von acetylenischen Lipiden zu einer Phasentrennung und zur Bildung von Domänen kommen, die mehr oder weniger an den jeweiligen Komponenten angereichert sind. Deshalb kann auch eine Phasentrennung als weiterer Grund für die Aktivierung von P450_{SCC} in gemischten Lipidsystemen nicht ausgeschlossen werden.

Um den Einfluß des Cholesterol:Lipid Verhältnisses auf die Aktivität von P450_{SCC} zu ermitteln, wurden Meßreihen mit einem steigenden Cholesterolgehalt mit den Lipiden PA14, PG4, PA4+PS4 und PA14+PG4 in DMPC als „host“ Lipid durchgeführt. Ein linearer Anstieg der Umsatzrate von Cholesterol fand jedoch nur bis zu einem Cholesterol:Lipidverhältnis von 0,11 statt, um dann wieder in allen Systemen stark abzunehmen. Es ist wahrscheinlich, daß dies auf strukturelle Veränderungen in der Lipidmembran durch den Einbau von Cholesterol zurückzuführen ist. Die steht in Einklang mit Beobachtungen in der Literatur, wo optimale Umsatzraten von Cholesterol je nach eingesetztem Lipidsystem bei unterschiedlichen Phospholipid:Cholesterol Verhältnissen erreicht wurden (Kisselev, P. *et al.*, 1998a; Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a; Seybert, D.W. *et al.*, 1979). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bei verschiedenen ADX Konzentrationen konnten in Übereinstimmung mit bisherigen Arbeiten zeigen, daß Phospholipide nicht nur die Bindung von Cholesterol an das Enzym regeln. Es ergab sich in Abhängigkeit der eingesetzten acetylenischen Lipide eine unterschiedliche Stimulation der P450_{SCC} Aktivität bei gleicher ADX Konzentration, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die Lipide ebenfalls die Bindung von ADX an das Enzym beeinflussen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen den potentiellen Nutzen von P450_{SCC} Vesikeln für Studien des Effekts acetylenischer Phospholipide auf die biologische Aktivität membran-gebundener Enzyme. Zusammenfassend ist zu Bemerkem, daß die in dieser Arbeit durchgeführten Studien einige Eigenschaften von P450_{SCC} in Vesikel Systemen identifiziert und charakterisiert haben, die durch acetylenische Phospholipide beeinflußt werden.

Es ist erwähnenswert, daß die hoch gekrümmte Vesikel Struktur der inneren Mitochondrienmembran und ihre Induktion durch eine erhöhte P450_{SCC} Synthese schon lange bekannt ist (Farkash, Y. *et al.*, 1986; Nussdorfer, G.G., 1986). Die P450_{SCC}-Membran-Wechselwirkung ist sicherlich komplexer als das klassische Konzept der Phospholipide als Co-Faktoren, die spezifisch an das Enzym binden. Zusätzlich zur negativen Ladung anionischer Phospholipide sind die physikalischen Eigenschaften der Membran von großer Bedeutung für die Kontrolle der P450_{SCC} Konformation, der Inkorporation des Enzyms in die Membran sowie für den Zugang von Cholesterol zum aktiven Zentrum. Diese physikalischen Eigenschaften umfassen die Neigung der Membran Nicht-Bilayer Phasen zu bilden (Gruner, S.M. *et al.*, 1985; Hui, S.-W. *et al.*, 1989; Schwarz, D. *et al.*, 1997) sowie die laterale Verteilung nicht mischbarer Membran Komponenten. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, daß die Rolle der Lipide in der Regulation der Funktion von membran-gebundenen Proteinen nur verstanden werden kann, wenn alle Faktoren in Betracht gezogen werden (Mosior, M. *et al.*, 1996).

4 Zusammenfassung

Natürliche Membranen befinden sich bei physiologischen Temperaturen im fluiden Zustand. Die Wahl der Phospholipide für den Aufbau von künstlichen Membranen mit neuen biologischen Eigenschaften muß diese Tatsache berücksichtigen. Eine Voraussetzung für die Verwendung von Phospholipiden für die Rekonstitution von Membranproteinen ist daher ein T_m -Wert im physiologischen Bereich.

1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (PC4) und 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (PC14) erfüllten diese Anforderungen mit einem T_m -Wert um 23°C (Rürup, J., 1994). Die Synthese der Phospholipide mit den Kopfgruppen Glycerin, Ethanolamin, Phosphat, L-Serin erschien deshalb sinnvoll. Dies erfolgte durch Transphosphatidylierung der oben genannten acetylenischen Phosphatidylcholone mit Phospholipase D.

Die Methode zur Darstellung der Phosphatidylcholone nach (Rürup, J. *et al.*, 1994) wurde modifiziert, so daß eine Verdopplung der Ausbeute erreicht wurde. GPC wurde anstatt in Chloroform in Dichlormethan suspendiert und unter basischer Katalyse von DBU mit Fettsäureimidazolid in 24 h acyliert. Das Phospholipid wurde durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton:Chloroform (9:1) und Fällern bei -20 °C mit Ausbeuten zwischen 92 % und 98% erhalten.

Optimal für die Darstellung der Phospholipide **1b-1e** und **2b-2e** aus den Verbindungen PC4 (**1a**) und PC14 (**1b**) war die Reaktion in dem Zweiphasensystem Chloroform-Wasser (1:1,5) bei 40 °C und pH 5,6 mit PLD aus *Streptomyces antibioticus*. Hier ergaben sich mit allen Nukleophilen hohe Umsätze. Die Reinigung der Lipide erfolgte über präparative HPLC durch ein Elutionsgemisch aus Chloroform / Methanol mit abgestuftem Gradienten. Die Ausbeuten lagen zwischen 74% – 91% bezogen auf GPC.

Die physikochemische Charakterisierung der acetylenischen Phospholipide wurde mit Hilfe von kalorimetrischen, FT-IR-spektroskopischen und röntgenographischen Untersuchungen durchgeführt.

Die Temperatur des kalorimetrisch ermittelten Hauptphasenübergangs war empfindlich von der Natur der Phospholipid-Kopfgruppe abhängig, wobei die Dreifachbindung die Kettenpackung des Bilayers störte und so eine Erniedrigung der Umwandlungstemperatur um ca. 30 °C im

Vergleich zur Verbindung mit gesättigten Fettsäureketten bewirkte. So ließen sich folgende Tendenzen bei den untersuchten Verbindungen bezüglich der Höhe des T_m -Wertes feststellen:

$$23,2\text{ °C} = \text{PC14} < \text{PG14} < \text{PC4} < \text{PG4} < \text{PS14} < \text{PS4} < \text{PE4} < \text{PA14} < \text{PE14} < \text{PA4} = 44,6\text{ °C}.$$

Der T_m -Wert des Phospholipids mit der Dreifachbindung an Position C4 der Fettsäurekette unterschied sich nur geringfügig von dem der isomeren Verbindung mit der Dreifachbindung am C14-Kohlenstoffatom.

Die FT-IR-Spektren der Phospholipide weisen eine Reihe von Absorptionsbanden auf, die geeignet sind den Einfluß der Natur der Kopfgruppe sowie eine Veränderung im hydrophoben Molekülbereich auf das Phasenverhalten der Modellmembran zu charakterisieren. Im Bereich der Phasenumwandlung führt die Zunahme der konformationellen Unordnung zu einer Verschiebung der Lage des Bandenmaximums der CH_2 -Streckschwingung um $3 - 5\text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen. Die Lage der CH_2 -Streckschwingungsbanden kann somit als qualitatives Maß für die konformationelle Ordnung der Fettsäureketten und die damit verknüpfte Dichte der Packung der Lipidmoleküle angesehen werden. Bei den untersuchten Lipiden PC14, PC4, PA14, PA4, PG14, PG4, PS14 waren die Bandenmaxima der 4-in-Verbindungen bei tieferen Wellenzahlen zu finden als die der 14-in-Verbindungen. Die Packungsdichte der Fettsäureketten der 14-in-Verbindungen war somit geringer und die Hydratation höher. Darauf deutet auch die ungewöhnlich scharfe, intensive Bande der Methylstreckschwingung hin, die bei allen 4-in-Verbindungen zu niedrigeren Wellenzahlen im Vergleich zu den 14-in Lipiden und DSPC verschoben war. Die negativ geladenen Lipide PG4 bzw. PG14 und PS14 besaßen eine mit PC4 bzw. PC14 vergleichbare Bandenlage. Trotz des Raumbedarfs der Fettsäureketten bei kleiner Kopfgruppe besaß PA4 die dichteste Packung der Fettsäureketten und somit den niedrigsten Hydratisierungsgrad von allen untersuchten Lipiden einschließlich DSPC. Bei PA14 war der Ordnungsgrad zwar geringer als bei PA4, doch mit dem von DSPC vergleichbar. Diese Beobachtung fand sich auch in den kalorimetrischen Daten wieder. Die Aufspaltung der antisymmetrischen Methylenstreckschwingung, die bei allen untersuchten acetylenischen Lipiden beobachtet wurde, trat bei den Phospholipiden mit der Dreifachbindung an Position 14 der Acylkette verstärkt auf.

Die Hydratation der Modellmembran an der polaren-apolaren Grenzfläche läßt sich anhand der IR-Banden der Estercarbonylfunktion abschätzen. Verglichen mit DSPC war das Bandenmaximum der experimentellen Hüllkurve aller untersuchten Lipide mit Ausnahme von PS14 und PA14 unterhalb T_m bei sehr tiefen Wellenzahlen lokalisiert, um sich mit dem

Übergang in die LC-Phase zu höheren Wellenzahlen zu verschieben. Dieses Verhalten zeigen Lipide, die eine dehydratisierte Gelphase bzw. Subgelphase besitzen. Unterhalb T_m war die Halbwertsbreite der Bande der „zweifach hydratisierten“ Carbonylgruppen ungewöhnlich gering. Dies spricht für einen hohen Ordnungsgrad in der Hydratationssphäre. Bei allen Lipiddispersionen außer bei PC4 und PA4 führte der Übergang in die LC-Phase zu einer eindeutigen Zunahme der Hydratation. Bei PC4 und PA4 nahm die integrale Intensität der simulierten Bande 2 bzw. Bande 2 und 3 zu Gunsten der simulierten Bande 1 mit dem Übergang in die LC-Phase ab. Dies könnte in einer geometrischen Umorientierung der Hydrathülle und nicht in einer Abnahme der Hydratation an der polaren-apolaren Grenzfläche begründet sein.

In den IR-Spektren der Glycerophospholipide tritt im Wellenzahlbereich von $1500 - 900 \text{ cm}^{-1}$ eine Vielzahl von Absorptionsbanden auf, welche zum großen Teil überlagert sind. Die Phosphatbanden der untersuchten wäßrigen Lipiddispersionen zeigten, daß die Phosphatgruppen hydratisiert waren. Die Absorptionen der R-O-P-O-R' waren meist nur als Schultern zu erkennen. Durch Vergleich mit Spektren von Lipiden aus der Literatur, konnten die beobachteten Banden den Schwingungen einzelner Gruppierungen zugeordnet werden (Casal, H.L. *et al.*, 1984; Casal, H.L. *et al.*, 1987a; Tuchtenhagen, J., 1994). Die „wagging“-Progressionen bieten eine Möglichkeit, die konformationelle Ordnung der Fettsäureketten der Phospholipide in der Gelphase IR-spektroskopisch zu bestimmen. Da bei den acetylenischen 4-in-Phospholipiden die Methylenkette am C4-Atom durch die Dreifachbindung unterbrochen ist, konnten keine Progressionsbanden beobachtet werden. Die in den Spektren der acetylenischen 14-in-Phospholipide unterhalb T_m auftretenden Banden der „wagging“-Progressionen belegen, daß die Fettsäureketten in der Tieftemperaturphase eine *all-trans* Anordnung einnehmen. Neben einer *all-trans* Anordnung ist für die Intensität der „wagging“-Banden die Kopplung dieser Schwingung mit der C=O-Streckschwingung entscheidend, wobei die Carbonylgruppen eine geeignete Orientierung bezüglich den Acylketten besitzen müssen. Für PA14 waren beide Bedingungen in der Tieftemperaturphase am besten erfüllt. In den H_2O -Spektren der acetylenischen Phospholipide traten ungewöhnliche Absorptionen auf, die in den Spektren der entsprechenden Phospholipide mit gesättigten Ketten nicht beobachtet wurden (siehe Tabelle 3.2.13-4).

Die in dieser Arbeit durchgeführten röntgenographischen Studien zum termotropen Verhalten der acetylenischen Lipide PC14, (PC4: (Manova, M., 1995)), PA14, PS14, PG14 und PE4 führten zu den folgenden Ergebnissen. Das Phasenverhalten der acetylenischen Lipide unterschied sich von den bekannten Systemen DSPC und DPPC und kann durch folgendes Schema wiedergegeben werden:

1. **DPPC, DSPC**, (Stümpel, J., 1981) : $L_c' \leftrightarrow L_{\beta'} \leftrightarrow P_{\beta'} \leftrightarrow L_{\alpha}$
2. **PC4**, (Mannova, M., 1995): $L_c' \leftrightarrow P_{\beta'} \leftrightarrow L_{\alpha}$
3. **PC14**: $SG1+Eis (0\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow SG1 (22\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow L_{\alpha}$
4. **PS14**: $G_x \leftrightarrow L_{\beta}$
5. **PG14**: $C (31\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow L_{\alpha}; G_x+Eis (-4\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow G_x (30\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow L_{\alpha}$
6. **PA14**: $SG3+Eis (-10\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow SG3 (40\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow L_{\alpha}$
7. **PE4**: $SG2+Eis (\text{nicht gemessen}) \leftrightarrow SG2 (39\text{ }^{\circ}C) \leftrightarrow L_{\alpha}$

Bei den acetylenischen Lipiden PC4 (Mannova, M., 1995) und PC14, die wie DPPC eine große Kopfgruppe besitzen, macht sich der ordnende Einfluß der Dreifachbindung und die Abhängigkeit dieses Einflusses von der Position der Dreifachbindung anschaulich bemerkbar. Während PC4 beim Abkühlen nach der LC-Phase in einem kurzen Temperaturintervall eine Ripple-Phase $P_{\beta'}$ ausbildet, um dann sofort in die Subgelphase L_c' überzugehen, bildet sich bei PC14 eine Subgelphase SG1 aus, die sich von der Phase L_c' des DPPC unterscheidet (Stümpel, J., 1981). Am Beispiel der acetylenischen Lipide PS14 und PG14 wurde deutlich, daß eine große Kopfgruppe gegen den ordnenden Einfluß der Dreifachbindung im hydrophoben Kettenbereich arbeitet, so daß sich bei Temperaturen unterhalb T_m nur eine Gelphase G_x ausbilden konnte. Dieser destruktive Effekt, der einen hohen Ordnungsgrad in der Membran verhindert, kann für die Natur eine essentielle Bedeutung sein. Finden sich im hydrophoben wie hydrophilen Molekülbereich ordnende Einflüsse, wie bei den acetylenischen Lipiden PE4 und PA14 so würde das in der Natur in diesem Membranbereich den „Tod“ bedeuten.

Es hat sich herausgestellt, daß Phospholipide die Aktivität einer Reihe von membran-assoziierten Enzymen und Transportproteinen beeinflussen. In der vorgelegten Arbeit wurde das Strukturelement der Dreifachbindung in den Fettsäureketten von Phospholipiden und die Rolle der Kopfgruppe hinsichtlich der Wirkung auf die Aktivität einer mitochondrialen P450-Monooxygenase des steroidogenen Stoffwechsels — P450_{SCC} (CYP11A1) aus Rind — untersucht. Lipide können entsprechend ihrem Einfluß auf die katalytische Aktivität von P450_{SCC} in zwei Gruppen eingeteilt werden: Lipide, die die Aktivität von P450_{SCC} anregen („activator lipids“) und Lipide die nahezu keine Steigerung der Aktivität bewirken („non activator lipids“). Phosphatidylcholine, die gesättigte Fettsäureketten enthalten (im besonderen DMPC), gehören zu den „non activator lipids“, und werden oft als „host lipids“ für die Bildung von Proteoliposomen verwendet. In der vorgelegten Arbeit wurden Phospholipid-Vesikel verwendet, die aus einer Mischung von DMPC („non activator lipid“) mit dem jeweiligen acetylenischen

Phospholipid bzw. DOPC („activator lipid“) im Verhältnis 2:1 bestanden (w/w). Die Cholesterol Konzentration der Liposomen-Membran betrug 10 mol % des Gesamtlipidgehalts. Die Rekonstitution von P450_{SCC} erfolgte nach einer Methode von (Lambeth, J.D. *et al.*, 1980a) und (Seybert, D.W. *et al.*, 1979). Dabei wurden die zuvor hergestellten Vesikel zusammen mit P450_{SCC} 5 min bei 37 °C inkubiert.

Die Untersuchungen wurden mit Vesikeln durchgeführt, die vor der Rekonstitution von P450_{SCC} extrudiert wurden, wodurch eine enge Streuung der Vesikelgrößen erreicht wurde. Die Vesikel selbst wurden durch Gefrieren der wäßrigen Lipiddispersion in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen auf Temperaturen oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur (T_m) hergestellt. Diese Methode ergab nach fünf maligem Wiederholen eine homogene Vesikeldispersion.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experiment mit einem niedrigen Verhältnis von 0,5 von acetylenischen Phospholipid zum „host“ Lipid DMPC ergaben, daß die Aktivitätstimulierung von P450_{SCC} von der Natur der Kopfgruppe abhängt, wobei Phospholipide mit einer negativ geladenen Kopfgruppe die höchste Aktivierung des Enzyms bewirkten. Die maximal erreichte Aktivierung in DMPC/PG4 Vesikeln war dabei doppelt so hoch wie in DMPC Vesikeln mit dem anerkannten „activator“ Lipid DOPC. DMPC-Vesikel mit einer äquimolaren Mischung der beiden anionischen Lipide PA4 und PS4 ergaben im Vergleich dazu sogar eine 2,2 fach höhere Aktivitätssteigerung. Die Position der Dreifachbindung übte zudem einen Einfluß auf die Stärke der Stimulation des Enzyms aus, wobei mit Ausnahme von PG die Dreifachbindung in Position 14 der Acylkette eine höhere Aktivität der Seitenkettenspaltung erzielte. Untersuchungen mit einem steigenden Membrangehalt der Lipide PG4 und PA14 in DMPC-Vesikeln konnten zeigen, daß schon ab einem PG4 (PA14):DMPC Verhältnis von 0,1 ein Anstieg der P450_{SCC} Aktivität stattfand.

Um den Einfluß des Cholesterol:Lipid Verhältnisses auf die Aktivität von P450_{SCC} zu ermitteln, wurden Meßreihen mit einem steigenden Cholesterolgehalt mit den Lipiden PA14, PG4, PA4+PS4 und PA14+PG4 in DMPC als „host“ Lipid durchgeführt. Ein linearer Anstieg der Umsatzrate von Cholesterol fand jedoch nur bis zu einem Cholesterol:Lipid-Verhältnis von 0,11 statt um dann wieder in allen Systemen stark abzunehmen.

Experimente bei verschiedenen ADX Konzentrationen konnten in Übereinstimmung mit bisherigen Arbeiten zeigen, daß Phospholipide nicht nur die Bindung von Cholesterol an das Enzym regeln. Es ergab sich in Abhängigkeit der eingesetzten acetylenischen Lipide eine unterschiedliche Stimulation der P450_{SCC} Aktivität bei gleicher ADX Konzentration, was

wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die Lipide ebenfalls die Bindung von ADX an das Enzym beeinflussen.

Schließlich erfolgten Untersuchungen von acetylenischen Phospholipiden in Tween 20 Micellen, wo die strukturellen Eigenschaften der Membrandoppelschicht nicht zur Wirkung kommen. Die anionischen Phospholipide zeigten sich im micellaren System ebenfalls als effektive Stimulatoren der P450_{SCC} Aktivität, doch die Lipide mit der Dreifachbindung in Position 4 des Glycerinrückgrats bewirkten mit Ausnahme von PA4 eine höhere Aktivität als die Lipide mit der Dreifachbindung in Position 14.

Aus den durchgeführten Untersuchungen geht hervor, daß die P450_{SCC}-Membran Wechselwirkung sicherlich komplexer ist, als das klassische Konzept der Phospholipide als Co-Faktoren, die spezifisch an das Enzym binden. Zusätzlich zur negativen Ladung anionischer Phospholipide sind die physikalischen Eigenschaften der Membran von großer Bedeutung für die Kontrolle der P450_{SCC} Konformation, der Inkorporation des Enzyms in die Membran sowie für den Zugang von Cholesterol zum aktiven Zentrum.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

HPLC (analytisch), Sykam, Pumpe S1100, Programmgeber S2000, Sykam GmbH, Gilching, Deutschland.

Lichtstredetektor Sedex45, S.E.D.E.R.E., Vitry / Seine, Frankreich

HPLC Säule 250x4 mm I.D., unmodifiziertes Nucleosil, 5 µm, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland

HPLC (präparativ), Sykam Prep., Pumpe S1100, Programmgeber S2000, Sykam GmbH, Gilching, Deutschland

Pulver-Diffractometer HZG 4, VEB Präzisionsmechanik, Freiberg, Deutschland

Spektrophotometrischer Detektor, Linear Instruments, Fremont, CA, USA

HPLC Säule 250x40 mm I.D., unmodifiziertes Nucleosil, 5 µm, Crom, Herrenberg, Deutschland

BioRad FTS 165 Fourier Transform Infrarot Spektrometer, Krefeld, Deutschland

Grams Software, Krefeld, Deutschland

NMR-Spektrometer AM 300, Bruker, Karlsruhe, Deutschland

Microcalorimeter MC-2, MicroCal, Inc., Northhampton, MA, USA

Iatroscan MK-5, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan

Integrator C-R3A, Shimadzu, Kyoto, Japan

Phosphorimager Storm 860, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland

Phosphor Screen, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland

Software, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland

Expositionskassette, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland

Ultraschallbad Sonorex Super RK, Bardelin, Berlin, Deutschland

Phosphorimager-Software, Image Quant 4.1, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland

Extruder, Avestin Inc., Ottawa, Kanada

Polycarbonatmembranen 100 nm, Avestin Inc., Ottawa, Kanada

pH-Stat System, Metrohm, Herisau, Schweiz

Thermostat, RMS, MGW Lauda, Deutschland

Linear Analyzer LB284, Berthold, Deutschland

Eppendorf Thermomixer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Photomultiplier Thorn EMI Modell 9865A

Spannungsversorgung PM 28B, Thorn EMI Gencom Inc.

Verstärker PM-PD, ALV GmbH, Langen, Deutschland

Autokorrektor ALV 300, ALV GmbH, Langen, Deutschland

Argon-Ionen Laser Innova 70-4, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA

Küvette 101 OS, Hellma GmbH & Co, Mühlheim, Deutschland

Hamiltonspritze, Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Gefriertrocknungsanlage Lyovac, Finn Aqua Santasalo-Sohlberg GmbH, Hürth, Deutschland

Dispenser, Adapter für Rotiszintcocktail, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Liquid Scintillation Analyzer, Packard Canberra Company, Frankfurt/Main, Deutschland

5.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle organischen Lösungsmittel, die in der folgenden Liste nicht aufgeführt sind, wurden von der Firma Riedel-de-Haen, Hannover, Deutschland, bezogen.

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

L-Serin, Phosphormolybdänsäure, Ethanolamin, Cholesterol, Pregnenolon, CDI, DBU, HEPES, KCl, DTT, NADPH

Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerin, Kieselgel 60, DC-Fertigplatten 60_{F254}

Lukas Meyer AG, Hamburg, Deutschland

GPC

Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland

Phosphatidylglycerin aus Eigelb, DMPC, DSPC, DSPE, DPPA, PS aus Schweinehirn

Amersham Life Sciences, Little Chalfont, UK

[¹⁴C]Cholesterol

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Rotiszint eco plus

5.1.3 Enzyme

P450_{SCC}, Adrenodoxin und Adrenodoxin Reduktase wurden aus Rinderherz Mitochondrien isoliert und gereinigt (Chashchin, V.L. *et al.*, 1984).

PLD aus *Streptomyces antibioticus* wurde von Prof. T. Yamane, Nagoya, Japan, zur Verfügung gestellt.

5.2 Methoden

5.2.1 Physikochemische Methoden

Kalorimetrie-DSC

Die Phasenumwandlungstemperaturen und die damit verbundenen Enthalpieänderungen ΔH wäßriger Dispersionen von 1,2-Diacyl-phospholipiden wurden mit einem kalibrierten MC-2 Mikrokalorimeter (MicroCal, Inc., Northhampton, MA, USA) bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit einem vom Gerätehersteller gelieferten Softwarepaket OriginTM. Vor der Herstellung der Vesikel wurden die Lipide 6 Std im Hochvakuum getrocknet. Die gewogenen Proben wurden anschließend im jeweiligen Puffer dispergiert und schließlich 3 min bei Temperaturen oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur (T_m) durch Ultraschallbehandlung in einem Branson Ultraschallbad homogenisiert. Die Lipidkonzentrationen lagen zwischen 0,7 mg ml⁻¹ und 2 mg ml⁻¹. Probe und Referenz wurden im Vakuum unter Rühren entgast und mit einer Hamiltonspritze in die entsprechende Zelle gefüllt.

Die Scanrate für alle Proben betrug 60 °C Std⁻¹ und die Wartezeit vor jedem Upscan 90 min.

Als Meßkurve wurde die überschüssige, spezifische Wärme in cal/°C als Funktion der Temperatur erhalten. Die Meßdaten wurden mit dem Lipidgehalt der Proben normiert und als überschüssige molare Wärmekapazität ΔC_m in kJ/mol °C als Funktion der Temperatur dargestellt. Die Umwandlungstemperatur wurde im Kurvenmaximum abgelesen. Durch Integration der gemessenen ΔC_m (T)-Funktion erhielt man die Enthalpiedifferenzen ΔH in kJ/mol.

DSC-Probenpuffer:

Zur Herstellung des Puffers wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet und der pH-Wert wurde mit Hilfe einer pH-Elektrode bestimmt.

0,1 M NaCl-Lösung: PC4, PC14, PE4, PE14, PG4 (pH 7), PG14 (pH 7), PS4 (pH 7), PS14 (pH 7).

0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4: PA4, PA14.

FT-IR-Spektroskopie

Zur Analyse der CH₂-Streckschwingungsbanden sowie C=O-Streckschwingungsbanden und allgemein des Bereichs von 3000 – 1500 cm⁻¹ wurden Spektren entsprechender Lipid-Dispersionen in 0,1M NaCl in D₂O-Lösung benutzt. Der spektrale Bereich von 1500 – 1000 cm⁻¹ war aus Spektren von Lipid-Dispersionen in 0,1M NaCl-Lösung zugänglich. Die Lipidkonzentrationen betragen 5–10 Gewichtsprozent. Die Proben wurden auf ca. 10 °C oberhalb T_m erhitzt und durch Behandlung (1 min) in einem Ultraschallbad und mehrmaligem Gefrieren und Tauen homogenisiert. Der pH-Wert der Proben wurde durch Tüpfeln auf pH-Papier kontrolliert, wobei sich ein pH-Wert von 7 ergab.

Die IR-Spektren wurden mit einem BioRad FTS 165 Fourier Transform Infrarot Spektrometer (Biorad, Krefeld, Deutschland) aufgenommen, und die Spektren mit der Software von Grams (BioRad, Krefeld, Deutschland) ausgewertet.

Die Lipid-Dispersionen wurden in Küvetten (50µm) mit CaF₂-Fenstern eingefüllt. 512 Interferogramme wurden addiert, mit Dreiecksfunktionen apodisiert und mit einem Zerofilling-Faktor von 2 Fourier-transformiert. Die Auflösung betrug 2 cm⁻¹. Die Temperatur wurde über einen Computer-kontrollierten Thermostaten geregelt und in unmittelbarer Nähe der Probe mit einem Pt-100-Thermowiderstand gemessen.

Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurden Referenzspektren von 0,1M NaCl-D₂O und H₂O-Lösungen gemessen und von den Spektren der Lipide subtrahiert. Die Basislinien der Carbonyl- und Phosphat-Region waren nicht vollständig flach. Deswegen wurde eine lineare Basislinie mit konstanter Neigung im betreffenden Spektralbereich abgezogen. Nach einer Splineinterpolation und Glättung wurden die resultierenden Spektren mit einer gemischten Gauß-Lorenz Funktion „gefittet“. Dazu wurde eine zuvor (Ziegler, W. *et al.*, 1995) entwickelte Software angewandt. Das Programm benutzt den Levenberg-Marquart Algorithmus für eine nicht lineare „least square“ Anpassung. Banden Intensitäten, Bandbreiten und das Gauß zu Lorenz-Verhältnis der einzelnen Banden wurden durch Iteration durch das Programm bestimmt.

Röntgenbeugung

Die Proben wurden im Vakuum getrocknet und mit 50 Gew. % bidestilliertem Wasser versetzt, durch mechanische Schwingungen homogenisiert und mittels einer Kanüle in eine dünnwandige Glaskapillare mit einem Durchmesser von 1,5 nm und einer Wandstärke von 10⁻² nm eingefüllt, die danach zugeschmolzen wurde. Die Messungen wurden in einem Pulver-Diffractometer HZG 4 (VEB Präzisionsmechanik, Freiberg, Deutschland) in Transmission durchgeführt.

Partikelgrößenbestimmung der Liposomen

Eine Küvette (Helma) wurde mit der Liposomen-Dispersion befüllt und im Laserstrahl ausgerichtet. Der Laserstrahldurchmesser betrug ca. 160 μm in der Küvettenmitte. Der Laser wurde bei einer Wellenlänge von 457,9 nm mit 100 mV betrieben. Die vom Photomultiplier gemessenen Signale wurden über den Autokorrelator mit Hilfe der dazugehörigen Software ODIL (ALV GmbH) in den hydrodynamischen Radius umgerechnet. Die dazugehörige Wasserviskosität wurde in Abhängigkeit der Temperatur mit 0,1 K Genauigkeit von Hand eingegeben. Es wurden für jede Probe 30 Messungen durchgeführt.

5.2.2 Analytische Methoden

Dünnschichtchromatographie zur Lipidcharakterisierung

Für die Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichte Aluminiumplatten, Schichtdicke 0,25 mm, der Firma Merck verwendet. Als mobile Phase wurde eine Lösung aus Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) verwendet. Die Phospholipide wurden durch Besprühen mit einer Phosphormolybdänsäurelösung (10% in Ethanol w/v) visualisiert.

Analytische Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Anlage bestand aus einem Sykam HPLC System, Pumpentyp S1100, Programmgeber S2000 gekoppelt mit einem Lichtstreuendetektor Sedex 45. Die Analysen erfolgten auf einer 250 x 4 mm Säule (Macherey-Nagel), gepackt mit unmodifiziertem Nucleosil 5 μm . Die Elution erfolgte mit einem linear ansteigenden Gradienten zweier Lösungsmittel A (2-Propanol/Isohexan, 4:3) und B (2-Propanol/Isohexan/Wasser, 8:6:1,5) (beginnend mit 1 % Lösungsmittel A zu 100 % Lösungsmittel B) über einen Zeitraum von 20 min. Anschließend wurde die Elution mit 100 % des Lösungsmittels B über einen Zeitraum von 20 min fortgesetzt. Die Flußrate betrug 1 ml/min.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren erfolgte auf dem Gerät AM-300 der Firma Bruker.

Für die ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren wurde Deuteriochloroform (CDCl_3) als Lösungsmittel verwendet. Die chemischen Verschiebungen wurden in Einheiten der δ -Skala relativ zu Tetramethylsilan angegeben.

Für die Aufnahme der ^{31}P -NMR-Spektren wurden die Phospholipide (2 mg) in 1 ml Chloroform gelöst, das mit 5 % Benzol- d_6 versetzt war. Diese Lösung wurde in ein NMR-Röhrchen überführt. Dann wurden 0,5 ml einer Lösung Methanol/CsEDTA (0,2 M aq., pH 6) (4:1 v/v) zugegeben und die Lösungen wurden sorgfältig vermischt.

Zur Kennzeichnung der Signale wurden folgende Abkürzungen gewählt:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppelt Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben.

Phospholipase D-Aktivitätstest mittels pH-Stat-Assay

Die pH-Stat-Methode beruht auf der Phospholipase-katalysierten Hydrolyse von Phospholipiden in Phosphatidsäure und den entsprechenden Alkohol. Gegen die freiwerdende Säure wird mit Natronlauge titriert, um den pH-Wert konstant zu halten. Aus dem Verbrauch an Natronlauge pro Zeit wurde die Aktivität in Units ($\mu\text{mol}/\text{min}$) berechnet. Als Substrat diente 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin. Es wurde auf einen pH-Wert von 5,6 titriert und bei einer Temperatur von 40 °C gearbeitet.

Hierzu wurden in das thermostatierte Reaktionsgefäß 14 ml Wasser, 1,2 ml einer 1 M CaCl_2 -Lösung, 7 ml Diethylether und 10 mg PC14 gegeben. Diese Lösung wurde mit 0,005 M HCl auf pH 5,6 eingestellt. Anschließend wurde eine bestimmte Menge Phospholipase D in 1 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,6 gelöst, zentrifugiert und der Überstand in das Reaktionsgefäß pipettiert.

Für die Phospholipase D aus *Streptomyces sp.* wurde eine Aktivität von 282 U/g und für die Phospholipase D aus *Streptomyces antibioticus* eine Aktivität von 48 U/g bestimmt.

Konzentrationsbestimmungen der P450_{SCC}-Monooxygenase, Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase

Die Konzentration von P450_{SCC} wurde über ein CO-Differenzspektrum nach der Methode von (Omura, T. *et al.*, 1964) bestimmt. Dazu wurde ein Differenz-Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}$ für die Absorption bei A_{450} minus A_{490} verwendet. Die Konzentrationen von Adrenodoxin und der Adrenodoxin-Reduktase wurden über Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 10,9 \text{ mM}^{-1}$ bei 450 nm und $\epsilon = 11 \text{ mM}^{-1}$ bei 415 nm errechnet.

5.2.3 Allgemeine Methoden

Präparative Hochauflösende-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Anlage bestand aus einem Sykam Prep HPLC System, Pumpentyp S1100, Programmgeber S2000 gekoppelt mit einem Spektrophotometrischen Detektor (Linear Instruments). Die Analysen erfolgten auf einer 250 x 40 mm Säule (Crom), gepackt mit unmodifiziertem Nucleosil 5 μm . Die Elution erfolgte wie unter Kapitel 3.1.3 beschrieben. Die Flußrate betrug 20 ml/min.

Liposomempräparation zur Partikelgrößenbestimmung

0,67 mg DMPC (1 mg bei reinen DMPC-Liposomen) und 0,33 mg des entsprechenden acetylenischen Phospholipids und Cholesterol (10 mol % des Gesamtlipidgehalts) wurden in 2

ml Chloroform gelöst und das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Die Probe wurde im Hochvakuum getrocknet und mit 1 ml Standard-P450_{SCC}-Reaktionspuffer (20 mM HEPES pH 7,3, 50 mM KCl, 0,1 mM DTT) hydratisiert und homogenisiert.

Die Lipiddispersion wurde 5 min in einem Bardelin Ultraschallbad oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur (T_m) homogenisiert.

Ein Gefrieren der Dispersion in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen auf Temperaturen oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur (T_m) ergab nach fünf maligem Wiederholen eine Dispersion aus unilamellaren Vesikeln.

Die so erhaltenen Liposomen wurden schließlich durch eine Polycarbonatmembran (Avestin) mit einem Durchmesser von 100 nm 21 mal in einem Extruder extrudiert.

Dialyse der Enzyme

P450_{SCC}, Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase aus Rinderherz-Mitochondrien wurden durch spezifische Affinitätschromatographie (Chashchin, V.L. *et al.*, 1984) gereinigt. Sie wurden bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in relativ hoch konzentrierter Form in 50 mM Phosphatpuffer, der 1 M NaCl, 0,3 % Natriumcholat, 1mM EDTA und 20 % (v/v) Glycerin enthielt, aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurden die Enzyme in Standard-P450_{SCC}-Reaktionspuffer (20 mM HEPES, pH 7,3, 50 mM KCl, 0,1 mM DTT) dialysiert, in kleinen Mengen aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren. Die Aktivität der Aliquots blieb über mehrere Wochen konstant.

5.2.4 Chemoenzymatische Synthesen der Phospholipide

Die Synthese der 4-Octadecinsäure (**1**) und 14-Octadecinsäure (**2**) erfolgte nach einer Methode, die in (Pisch, S. *et al.*, 1997) beschrieben wurde. Die Synthese der entsprechenden 1,2-Di-(Octadecin)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (**1a**, **2a**) erfolgte nach dem Verfahren von (Rürup, J. *et al.*, 1994), jedoch wurde die Aktivierung der Fettsäuren mit Imidazol und deren Umsetzung mit *sn*-Glycero-Phosphatidylcholin (GPC) (**3**) anstatt in Chloroform in Dichlormethan als Lösungsmittel durchgeführt (Pisch, S. *et al.*, 1997). Auf eine Reinigung durch präparative HPLC wurde verzichtet, die Reinigung erfolgte durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton : Chloroform (9:1). Die Ausbeuten lagen bei 92-98%.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der 1,2-Di-(Octadecin)-phospholipide

Die 1,2-Di-(Octadecin)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (**1a**) bzw. (**2a**) wurde in einem 250 ml Zweihalskolben mit Rückflußkühler vorgelegt und mit 60 ml Chloroform versetzt.

Anschließend wurde zu 89 ml der Standardpufferlösung (0,1 M Calciumchlorid, 0,1 M Natriumacetat pH 5,6) das entsprechende Nukleophil gegeben (mit Ausnahme der Synthese von Phosphatidsäure). Im Falle von Ethanolamin als Nukleophil wurde der pH-Wert mit Natronlauge

erneut auf pH = 5,6 eingestellt. Dazu wurde Ethanolamin zu nur 80 ml Puffer gegeben und der Rest Puffer wurde erst nach Einstellung des pH-Werts zugegeben.

Die Nukleophil-Standardpufferlösung wurde zur organischen Lipidphase gegeben und das Reaktionsgemisch auf 40 °C erhitzt und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml der Enzym-Standardpufferlösung gestartet. Das Zweiphasengemisch wurde sorgfältig 1 Std gerührt und der Verlauf der Reaktion über DC kontrolliert.

Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 40 ml Folchlösung (Chloroform : Methanol, 2:1) versetzt und die organische Phase abgetrennt.

Die wäßrige Phase wurde dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit je 80 ml 0,1 M EDTA-Lösung (pH 7,4) und dreimal mit je 80 ml Wasser gewaschen. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Lipid im Hochvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch präparative HPLC (siehe Kapitel 6.2.3.1) gereinigt, mit 12 ml Wasser versetzt und im Ultraschallbad homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei -20 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidsäure (1b)

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**1b**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**1a**) durch Einsatz von 8,1 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,09 g⁻¹). Das Rohprodukt von (**1b**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit R_t=13,5 min wurde gesammelt, im Vakuum eingengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 406 mg (0,58 mmol, 91 %) (**1b**) als wachsartige Substanz.

Ausbeute: 91 %, R_t=13,5 min

³¹P-NMR: 0,11

¹H-NMR: δ=0,88 (t, J=6,9 Hz, 6H, CH₃), 1,1-1,42 (m, 40H, CH₂-Ketten), 1,45-1,545 (4H, C7-2CH₂), 2,05-2,18 (m, 4H, C6-2CH₂), 2,4-2,5 (m, 4H, C3-2CH₂), 2,5-2,6 (m, 4H, C2-2CH₂), 3,85-4,05 (m, 2H, Glycerin-C3-H_{a,b}), 4,05-4,15 (m, 1H, Glycerin-C1-H_b), 4,41 (dd, ²J=10,5 Hz, 1H, Glycerin-C1-H_a), 5,1-5,2 (m, 1H, Glycerin-C2).

1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamin (1c)

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**1c**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**1a**) durch Einsatz von 4,5 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,05 g⁻¹) und 18 g Ethanolamin (**4**) als Nukleophil. Das Rohprodukt von (**1c**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit

$R_t=15,1$ min wurde gesammelt, im Vakuum eingengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 372 mg (0,48 mmol, 75,3 %) (**1c**) als feinflockige, wachsartige Substanz.

Ausbeute: 75,3 %, $R_t=15,1$ min

$^{31}\text{P-NMR}$: 1,35

$^1\text{H-NMR}$: $\delta=0,81$ (t, $J=7.0$ Hz, 6H, CH_3), 1,0-1,30 (m, 40H, CH_2 -Ketten), 1,35-1,45 (4H, C7-2 CH_2), 2,0-2,1 (m, 4H, C6-2 CH_2), 2,3-2,4 (m, 4H, C3-2 CH_2), 2,4-2,5 (m, 4H, C2-2 CH_2), 3,1-3,2 (m, 2H, CH_2N), 3,85-3,95 (m, 2H, Glycerin-C3- $\text{H}_{a,b}$), 3,95-4,05 (m, 2H, POCH_2), 4,05-4,15 (m, 1H, Glycerin-C1- H_b), 4,32 (dd, $^2J=14,5$ Hz, $^3J=2,8$ Hz, 1H, Glycerin-C1- H_a), 5,1-5,2 (m, 1H, Glycerin-C2).

1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (1d**)**

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**1d**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (**1a**) durch Einsatz von 18 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,2 gl^{-1}) und 18 g Glycerin (**5**) als Nukleophil. Das Rohprodukt von (**1d**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit $R_t=17,1$ min wurde gesammelt, im Vakuum eingengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 421 mg (0,53 mmol, 85,5 %) (**1d**) als feinflockige, wachsartige Substanz.

Ausbeute: 85,5 %, $R_t=17,1$ min

$^{31}\text{P-NMR}$: 1,77

$^1\text{H-NMR}$: $\delta=0,81$ (t, $J=7.0$ Hz, 6H, CH_3), 1,0-1,30 (m, 40H, CH_2 -Ketten), 1,35-1,45 (4H, C7-2 CH_2), 2,0-2,1 (m, 4H, C6-2 CH_2), 2,3-2,4 (m, 4H, C3-2 CH_2), 2,4-2,5 (m, 4H, C2-2 CH_2), 3,5-3,7 (m, 2H, Kopf-C3- CH_2), 3,7-4,0 (m, 5H, Glycerin-C3, Kopf-C1- CH_2 , Kopf-C2- CH), 4,1-4,2 (m, 1H, Glycerin-C1- H_b), 4,32 (dd, $^2J=10.7$ Hz, 1H, Glycerin-C1- H_a), 4,75 (bs, 1H, Kopf-C3-OH), 5,15-5,2 (m, 1H, Glycerin-C2), 5,5 (bs, 1H, Kopf-C2-OH).

1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylserin (1e**)**

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**1e**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-4-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (**1a**) durch Einsatz von 12,6 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,14 gl^{-1}) und 18 g L-Serin (**6**) als Nukleophil. Das Rohprodukt von (**1e**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit $R_t=20,1$ min wurde gesammelt, im Vakuum eingengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 424 mg (0,53 mmol, 83,5 %) (**1e**) als feinflockige, wachsartige Substanz.

Ausbeute: 83,5 %, $R_t=20,1$ min

$^{31}\text{P-NMR}$: 0,45

$^1\text{H-NMR}$: $\delta=0,83$ (t, $J=7,0$ Hz, 6H, CH_3), 1,05-1,35 (m, 40H, CH_2 -Ketten), 1,35-1,45 (4H, C7-2 CH_2), 2,0-2,1 (m, 4H, C6-2 CH_2), 2,25-2,4 (m, 4H, C3-2 CH_2), 2,4-2,5 (m, 4H, C2-2 CH_2), 3,35-4,4 (m, 7H), 5,0-5,15 (m, 1H, Glycerin-C2).

1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidsäure (2b)

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**2b**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (**2a**) durch Einsatz von 8,1 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,09 g l^{-1}). Das Rohprodukt von (**2b**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit $R_t=13,1$ min wurde gesammelt, im Vakuum eingengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 406 mg (0,58 mmol, 90 %) (**2b**) als wachsartige Substanz.

Ausbeute: 90 %, $R_t=13,1$ min

$^{31}\text{P-NMR}$: 0,13

$^1\text{H-NMR}$: $\delta=0,96$ (t, $J=7,3$ Hz, 6H, CH_3), 1,1-1,4 (m, 32H, CH_2 -Ketten), 1,4-1,55 (8H, C12-2 CH_2 , C17-2 CH_2), 1,55-1,65 (m, 4H, C3-2 CH_2), 2,1-2,2 (m, 8H, C13-2 CH_2 , C16-2 CH_2), 2,2-2,35 (m, 4H, C2-2 CH_2), 3,85-4,0 (m, 2H, Glycerin-C3- $\text{H}_{a,b}$), 4,15-4,25 (m, 1H, Glycerin-C1- H_b), 4,41 (dd, $^2J=9,1$ Hz, Glycerin-C1- H_a), 5,25-5,35 (m, 1H, Glycerin-C2).

1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (2c)

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**2c**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (**2a**) durch Einsatz von 4,5 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,05 g l^{-1}) und 18 g Ethanolamin (**4**) als Nukleophil. Das Rohprodukt von (**2c**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit $R_t=15,0$ min wurde gesammelt, im Vakuum eingengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 372 mg (0,48 mmol, 74,3 %) (**2c**) als feinflockige, wachsartige Substanz.

Ausbeute: 74,3 %, $R_t=15,0$ min

$^{31}\text{P-NMR}$: 1,26

$^1\text{H-NMR}$: $\delta=0,96$ (t, $J=7,3$ Hz, 6H, CH_3), 1,2-1,4 (m, 32H, CH_2 -Ketten), 1,4-1,55 (8H, C12-2 CH_2 , C17-2 CH_2), 1,55-1,65 (m, 4H, C3-2 CH_2), 2,05-2,2 (m, 8H, C13-2 CH_2 , C16-2 CH_2), 2,25-2,3 (m, 4H, C2-2 CH_2), 3,1-3,2 (m, 2H, CH_2N), 3,9-4,0 (m, 2H, Glycerin-C3- $\text{H}_{a,b}$), 4,05-4,2 (m,

3H, POCH₂, Glycerin-C1-H_b), 4,38 (dd, ²J=11,3 Hz, ³J=4 Hz, 1H, Glycerin-C1-H_a), 5,15-5,25 (m, 1H, Glycerin-C2), 8,54 (m, 1H, RNH₃⁺).

1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerin (2d)

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**2d**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**2a**) durch Einsatz von 18 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,2 gl⁻¹) und 18 g Glycerin (**5**) als Nukleophil. Das Rohprodukt von (**2d**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit R_t=16,9 min wurde gesammelt, im Vakuum eingeengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 431 mg (0,55 mmol, 83,5 %) (**2d**) als feinflockige, wachsartige Substanz.

Ausbeute: 83,5 %, R_t=16,9 min

³¹P-NMR: 0,91

¹H-NMR: δ=0,91 (t, J=7,3 Hz, 6H, CH₃), 1,1-1,35 (m, 32H, CH₂-Ketten), 1,4-1,56 (m, 12H, C12-2CH₂, C17-2CH₂, C3-2CH₂), 2,05-2,15 (m, 8H, C13-2CH₂, C16-2CH₂), 2,2-2,35 (m, 4H, C2-2CH₂),), 3,5-3,7 (m, 2H, Kopf-C3-CH₂), 3,7-4,0 (m, 5H, Glycerin-C3, Kopf-C1-CH₂, Kopf-C2-CH), 4,1-4,25 (m, 1H, Glycerin-C1-H_b), 4,32 (dd, ²J=10.8 Hz, 1H, Glycerin-C1-H_a), 5,0 (bs, 1H, Kopf-C3-OH), 5,15-5,2 (m, 1H, Glycerin-C2), 5,5 (bs, 1H, Kopf-C2-OH).

1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylserin (2e)

Nach allgemeiner Arbeitsvorschrift erhielt man (**2e**) aus 500 mg (0,64 mmol) 1,2-Di-(octadec-14-inoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (**2a**) durch Einsatz von 12,6 mg PLD aus *Streptomyces antibioticus* (0,14 gl⁻¹) und 18 g L-Serin (**6**) als Nukleophil. Das Rohprodukt von (**2e**) wurde in Chloroform aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Fraktion mit R_t=19,1 min wurde gesammelt, im Vakuum eingeengt, in 12 ml Wasser homogenisiert und im Lyophilisator getrocknet. Man erhielt 424 mg (0,53 mmol, 82,7 %) (**2e**) als feinflockige, wachsartige Substanz.

Ausbeute: 82,7 %, R_t=19,1 min

³¹P-NMR: 1,34

¹H-NMR: δ=0,91 (t, J=7.4 Hz, 6H, CH₃), 1,05-1,3 (m, 32H, CH₂-Ketten), 1,3-1,45 (8H, C12-2CH₂, C17-2CH₂), 1,45-1,55 (m, 4H, C3-2CH₂), 2,0-2,15 (m, 8H, C13-2CH₂, C16-2CH₂), 2,15-2,3 (m, 4H, C2-2CH₂), 3,3-4,4 (m, 7H), 5,05-5,15 (m, 1H, Glycerin-C2).

5.2.5 Einsatz der Phospholipide zur Stabilisierung von Membranproteinen- Aktivitätsstimulierung der P450-Monooxygenase P450_{SCC} aus Rinderherz

Allgemeines

Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf Standardreaktionsbedingungen. Um die Abhängigkeit der Aktivitätsstimulierung der Monooxygenase von verschiedenen Faktoren wie Adrenodoxinkonzentration, Lipid/Cholesterol-Verhältnis, etc. zu untersuchen, wurden die jeweiligen Faktoren verändert. Die Werte sind in Kapitel 3.3.1 gegeben.

Präparation von Phospholipid-Vesikeln

0,67 mg DMPC (1 mg bei reinen DMPC-Liposomen) und 0,33 mg des entsprechenden acetylenischen Phospholipids bzw. DOPC (Gesamtlipidgehalt 1,47 mM bezogen auf DMPC, die Lipide wurden jeweils einer Chloroform-Maßlösung entnommen) und Cholesterol (10 mol % des Gesamtlipidgehalts, Cholesterol wurde einer Ethanol-Maßlösung entnommen) wurden in ein 5 ml Glasröhrchen pipettiert und das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Die Probe wurde im Hochvakuum getrocknet und mit 4400 cpm [¹⁴C] Cholesterol (in absolutem Ethanol) versetzt. Das Ethanol wurde durch Einblasen von N₂ verdampft und mit 1 ml Standard-P450_{SCC}-Reaktionspuffer (20 mM HEPES pH 7,3, 50 mM KCl, 0,1 mM DTT) hydratisiert.

Die Lipiddispersion wurde 10 min in einem Bardelin Ultraschallbad oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur (T_m) temperiert und anschließend 5 min homogenisiert.

Ein Gefrieren der Dispersion in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen auf Temperaturen oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur (T_m) ergab nach fünf maligem Wiederholen eine homogene Vesikeldispersion.

Die so erhaltenen Liposomen wurden schließlich durch eine Polycarbonatmembran (Avestin) mit einem Durchmesser von 100 nm 21 mal extrudiert. Die resultierende Aktivität von [¹⁴C] Cholesterol wurde in einem Scintillationszähler (Packard) mit dem Scintillationscocktail Rotiszint eco plus (Roth) bestimmt und so auf den Gesamtlipidgehalt geschlossen. Als Standard wurde die nicht extrudierte Liposomenpräparation mit einer spezifischen Radioaktivität von 55,0 mCi/mmol eingesetzt.

Rekonstitution von P450_{SCC} und enzymatischer Aktivitäts-Assay

Die Aktivität von P450_{SCC} wurde über die Aktivität des Enzyms gegenüber der Spaltung der Seitenkette von Cholesterol zu Pregnenolon bestimmt.

Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 250 µl durchgeführt.

Die Rekonstitution von P450_{SCC} in den zuvor hergestellten Vesikeln erfolgte durch Inkubation (10 min bei 37°C) der Vesikel (0,5 mM Endkonzentration Gesamtlipidgehalt) und Cholesterol (10 mol % des Gesamtlipidgehalts) mit P450_{SCC} (0,5 µM Endkonzentration für die

Standardreaktion oder bei einem variierten Lipid/Enzym-Verhältnis). Vor der Inkubation wurde Adrenodoxin in das Eppendorfreaktionsgefäß (5µM Endkonzentration für die Standardreaktion) zugegeben.

Nach 10 min Inkubation wurde die Adrenodoxin-Reduktase (0,5 µM Endkonzentration) zugefügt und die Reaktion durch Zugabe von NADPH (250 µM Endkonzentration) gestartet.

Nach einer Standardreaktionszeit von 12 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,5N HCl gestoppt. Das nicht umgesetzte Substrat und das Produkt wurden zweimal mit 0,75 ml Methylenchlorid extrahiert und das Lösungsmittel durch Einblasen von N₂ verdampft. Der Rückstand wurde in 50 µL Ethylacetat aufgenommen.

Substrat und Produkt wurden durch Dünnschichtchromatographie auf 0,25 mm, 20x20 Kieselgelplatten getrennt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus n-Hexan/Diethylether/Essigsäure, (60:60:4).

Die ¹⁴C-Radioaktivität des Substrates und Produktes wurde mittels Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) quantifiziert. Hierzu wurde der Screen direkt auf die Kieselgelplatte aufgelegt und für drei Tage exponiert. Die quantitative Auswertung im Phosphorimager erfolgte mittels Software von Molecular Dynamics.

Jede Analyse wurde zweimal durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit mit einem Standardfehler von weniger als 10 % zu gewährleisten.

Enzymatischer Aktivitäts-Assay von P450 in Tween 20-Micellen

Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 250 µl durchgeführt.

50 µM (Endkonzentration) DOPC oder des acetylenischen Phospholipids, 50 µM Cholesterol (Endkonzentration) und 4400 cpm [¹⁴C] Cholesterol wurden in ein 10 ml Reagenzglas mit Schliff pipettiert und das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Die Probe wurde im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand in einer 0,1 % Tween 20-Standardpufferlösung durch Vortexen solubillisiert. Anschließend wurden die Micellen 2 min bei 30 °C im Ultraschallbad homogenisiert. Die Aktivität von [¹⁴C] Cholesterol wurde in einem Scintillationszähler (Packard) mit dem Scintillationscocktail Rotiszint eco plus (Roth) bestimmt. Die Rekonstitution von P450_{SCC} erfolgte durch Inkubation (5 min bei RT, 5 min bei 37°C) der Micellen mit P450_{SCC} (0,5 µM Endkonzentration) und Adrenodoxin (5µM Endkonzentration).

Nach 10 min Inkubation wurde die Adrenodoxin-Reduktase (0,5 µM Endkonzentration) zugefügt und die Reaktion durch Zugabe von NADPH (500 µM Endkonzentration) gestartet.

Nach einer Standardreaktionszeit von 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,5N HCl gestoppt. Das nicht umgesetzte Substrat und das Produkt wurden zweimal mit 1,5 ml

Methylenchlorid extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 μ L Ethylacetat aufgenommen.

Substrat und Produkt wurden durch Dünnschichtchromatographie auf 0,25 mm, 20x20 Kieselgelplatten getrennt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus n-Hexan/Diethylether/Essigsäure, (60:60:4). Produkt und Substrat wurden mittels Linear Analyzer detektiert (Linear Analyzer LB284, Berthold, Deutschland).

6 Literatur

- Abrahamsson, S., Dahlen, B., Löfgren, H. und Pascher, I. (1978) *Prog. Chem. Fats other Lipids* **16**, 125-.
- Akwa, Y., Young, J., Kabbadi, K., Sancho, M.J., Zucman, D., Vourc'h, C., Jung-Testas, I., Hu, Z.Y., Le Cosacogne, C., Jo, D.H., Corpechot, C., Simon, P., Baulieu, E.E. und Robel, P. (1991) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **40**, 71-.
- Allgyer, T.T. und Wells, M.A. (1979) *Biochemistry* **24**, 5348-.
- Andersson, T. und Förlin, L. (1992) *Aquatic Toxicology* **24**, 1-.
- Archakov, A.I. und Bachmanova, G.I. (1990) Cytochrome P-450 and Active Oxygen, in: (Hrsg: Taylor & Francis, London.
- Archakov, A.I. und Zhukov, A.A. (1989) *Frontiers in Biotransformation* **1**, 151-.
- Arinc, E. (1993) in: Cytochrome P450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- Arnaud, A. (1892) *Bull. soc. chim. France* **7**, 233-.
- Asworth, L.A.E. und Green, C. (1966) *Science* **151**, 210-.
- Axelrod, J. (1955) *J. Pharmacology* **114**, 430-.
- Backes, W.L. (1993) in: Cytochrome P450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- Barratt, G. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **862**, 153-.
- Barton, P.G. und Gunstone, F.D. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4470-.
- Bassett, M.H., McCarthy, J.L., Waterman, M.R. und Sliter, T.J. (1997) *Moll. Cell Endocrinol.* **131**, 39-.
- Basti, M.M. und La Planche, L.A. (1990) *Chem. Phys. Lipids* **54**, 99-.
- Bayer, E., Hill, H.A.O., Röder, A. und Williams, R.J.P. (1969) *Chemical Communications* **57**, 109-.
- Bernhardt, R., Kraft, R., Otto, A. und Ruckpaul, K. (1988) *Biomedica et Biophysica Acta* **47**, 581-.
- Billah, M.M. und Anthes, J.C. (1990) *Biochem. J.* **269**, 282-.
- Birrell, G.B. und Griffith, O.H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 455-.
- Blaurock, A.E. und McIntosh, T.J. (1986) *Biochemistry* **25**, 299-.
- Bloom, M., Evans, E. und Mouritsen, O.G. (1991) *Quart. Rev. Biophys.* **24**, 293-.
- Blume, A. (1983) *Biochemistry* **22**, 5436-.
- Blume, A. (1988) in: Physical properties of biological membranes and their functional implications, (Hrsg.: Hidalgo, C.), Plenum Publishing Corporation, New York.

- Blume, A. (1991) *Thermochimica Acta* **193**, 299-.
- Blume, A. (1996) *Colloid & Interf. Sci.* **1**, 64-.
- Blume, A., Hübner, W. und Messner, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 8239-.
- Bohlmann, F. und Mannhardt, H.J. (1957) in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe., (Hrsg.: Springer-Verlag, Wien.
- Braun-Falco, O. und Korting, H.C. (1992) in: Griesbach Konferenz: Liposome Dermatics, (Hrsg.: Springer Verlag, Berlin.
- Brenton, L. und Serkiz, B. (1989) *J. Chromatogr.* **497**, 243-.
- Brezesinski, G., Dobner, B., Doerfler, H.D., Fischer, M., Haas, S. und Nuhn, P. (1987) *Chem. Phys. Lipids* **43**, 257-.
- Brodie, B., Axelrod, J., Cooper, J.R., Gaudette, L., La Du, B.N. und Mitoma, C. (1955) *Science* **121**, 603-.
- Bryant, C. (1993) *Biologist* **40**, 58-.
- Buckland, B.C. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 815-.
- Buddecke, E. (1985) Grundriss der Biochemie, in: **7. Auflage** (Hrsg: Walter de Gruyter, Berlin.
- Bu'Lock, J.D. (1956) *Quart. rev. Chem. Soc.* **10**, 371-.
- Bu'Lock, J.D., Jones, E.R.H. und Leeming, P.R. (1955) *J. Chem. Soc.* **1092**, 4270-.
- Burstein, S., Middleditch, B.S. und Gut, M. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 9028-.
- Cameron, D.G., Casal, H.L. und Mantsch, H.H. (1980) *Biochemistry* **19**, 3665-.
- Casal, H.L. und Mantsch, H.H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 381-.
- Casal, H.L., Mantsch, H.H. und hauser, H. (1987a) *Biochemistry* **26**, 4408-.
- Casal, H.L., Mantsch, H.H., Paltauf, F. und Hauser, H. (1987b) *Biochim. Biophys. Acta* **919**, 275-.
- Cevec, G. (1991) *Biochemistry* **30**, 7186-.
- Cevec, G. und Marsh, D. (1987) Physical Principles and Models, in: Phospholipid Bilayers, (Hrsg: John Wiley and Sons, New York.
- Chapman, D. (1973) in: Biological Membranes, **2** (Hrsg.: Chapman, D. und Wallach, D.F.H.), Academic Press, New York.
- Chapman, D., Williams, R.M. und Ladbroke, B.D. (1967) *Chem. Phys. Lipids* **1**, 445-.
- Chashchin, V.L., Vasilevski, V.I., Shkumatov, V.M. und Akhrem, A.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 27-.
- Chen, S.C., Sturtevant, J.M. und Gaffney, B.J. (1980) *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 5060-.
- Cheng, B. und Kimura, T. (1983) *Lipids* **18**, 577-.
- Cheour, F., Arul, J., Makhlof, J. und Willemot, C. (1992) *Plant Physiol.* **100**, 1656-.

- Chetal, S. und Wagle, D.S. (1989) *Biochem. Biophysiol. Pflanzen* **177**, 92-.
- Christie, W.W. (1985) *J. Lipid Res.* **26**, 507-.
- Churchill, P.F., De Alvara, L.R. und Kimura, T. (1978a) *J. Biol. Chem.* **253**, 4924-.
- Churchill, P.F., De Alvara, L.R. und Kimura, T. (1978b) *J. Biol. Chem.* **253**, 4924-.
- Coon, M.J. und White, R.E. (1980) in: *Metal Ion Activation of Dioxygen*, (Hrsg.: Spiro, T.G.), Wiley, New York.
- Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. und Estabrook, R.W. (1965) *Science* **147**, 400-.
- Cullis, P.R. und De Kruijff, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 399-.
- Cullis, P.R., DeKruijff, B., Hope, M.J., Verkleij, A.J., Nayar, R., Farren, S.B., Tilcock, C., Madden, T.D. und Bally, M.B. (1983) *Membrane Fluidity in Biology*, in: **1** (Hrsg: Academic Press, New York.
- Cullis, P.R., Hope, M.J. und Tilcock, C.P.S. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **40**, 127-.
- Da Silva, J.J.R.F. und Williams, R.J.P. (1991) *The Biological Chemistry of the Elements*, in: (Hrsg: Clarendon, Oxford.
- D'Arrigo, P., De Ferra, L., Piergianni, V., Selva, A., Servi, S. und Strini, A. (1996) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 2651-.
- Davis, J.H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 117-.
- Dean, W.L. und Tanford, C. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 3551-.
- Dean, W.L. und Tanford, C. (1978) *Biochemistry* **17**, 1683-.
- Desnuelle, P. (1961) *Adv. Enzymol.* **23**, 129-.
- Dhariwal, M.S. und Jefcoate, C.R. (1989) *Biochemistry* **28**, 8397-.
- Diehl, H., Capalna, S. und Ullrich, V. (1969) *FEBS Letters* **4**, 99-.
- Dluhy, R.A., Cameron, D.G., Mantsch, H.H. und Mendelsohn, R. (1983) *Biochemistry* **22**, 6318-.
- Dorling, P.R. und Le Page, R.N. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 33-.
- Dorset, D.L. (1974) *Chem. Phys. Lipids* **13**, 133-.
- Dowell, L.A., Moline, S.W. und Rinfret, A.P. (1961) *Biochem. Biophys. Acta* **59**, 158-.
- Durst, F. (1991) *Frontiers in Biotransformation* **4**, 191-.
- Eibl, H. (1984) *Angew. Chem.* **96**, 247-.
- Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. und O., R. (1963) *Biochemische Zeitschrift* **338**, 741-.
- Eytan, G.D., Matheson, M.J. und Racker, E. (1975) *FEBS Lett.* **57**, 121-.
- Eytan, G.D., Matheson, M.J. und racker, E. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 6831-.
- Farkash, Y., Timberg, R. und Orly, J. (1986) *Endocrinology* **118**, 1353-.

- Feyereisen, R. (1993) in: Cytochrome P450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer Verlag, Berlin.
- Förster, G. und Brezesinski, G. (1989a) *Liquid Crystals* **5**, 1659-.
- Förster, G. und Brezesinski, G. (1989b) *Liquid Cryst.* **5**, 1659-.
- Förster, G., Brezesinski, G. und Dobner, B. (1995) Lecithins with short and long branched fatty acids: X-Ray Diffraction and Miscibility of Different Gel Phases,
- Fourcans, B. und Jain, M.K. (1974) *Adv. Lipid Res.* **12**, 147-.
- Fringeli, U.G. und Günthard, H.S. (1981) in: Molecular Biology, Chemistry and Biophysics, **31** (Hrsg.: Grell, E.), Springer-Verlag, Berlin.
- Garfinkel, D. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 493-.
- Gazzotti, P., Bock, H.G. und Fleischer, S. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 5782-.
- Gellermann, J.L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **388**, 277-.
- Goni, F.M. und Arrondo, J.L.R. (1986) *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 1-.
- Gonzalez, F.J. und Gelboin, H.V. (1994) *Drug Metabolism Reviews* **26**, 165-.
- Gonzalez, F.J. und Nebert, D.W. (1990) *Trends in Genetics* **6**, 182-.
- Gosh, R. und Seelig, J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **691**, 151-.
- Griffin, B.W. und Peterson, J.A. (1972) *Biochemistry* **11**, 4740-.
- Grover, A.K., Slotboom, A.J., de Hass, G.H. und Hammes, G. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 31-.
- Gruner, S.M., Cullis, P.R., Hope, M.J. und Tilcock, C.P.S. (1985) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **14**, 211-.
- Guengerich, F.P. (1983) *Biochemistry* **22**, 2811-.
- Guengerich, F.P. (1993a) *American Scientist* **81**, 440-.
- Guengerich, F.P. (1993b) in: Cytochrome P450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- Hanson, V. und Park, J.Y. (1980) *J. Chromatogr.* **13**, 34-.
- Hanukoglu, I. (1992a) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**, 779-.
- Hanukoglu, I. (1992b) in: Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics, (Hrsg.: Archakov, A.I. und Bachmanova, G.I.), INCO-TNC, Moscow.
- Hanukoglu, I. und Hanukoglu, Z. (1986) *Eur. J. Biochem.* **157**, 27-.
- Hanukoglu, I., Suh, B.S., Himmelhoch, S. und Amsterdam, A. (1990) *J. Cell. Biol.* **111**, 1373-.
- Hashimoto, Y., Yamano, T. und Mason, H.S. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3843-.
- Hauser, H., Pacher, I., Pearson, R.H. und Sundell, S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 21-.
- Hayaishi, O., Katagiri, M. und Rothberg, S. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5450-.
- Heller, M. (1978) *Adv. Lipid Res.* **16**, 267-.

- Heller, M., Mozes, N., Peri, I. und Maes, E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **369**, 397-.
- Herman, E.M. (1980) *Plant Physiol* **66**, 1001-.
- Hill, H.A.O., Röder, A. und Williams, R.J.P. (1970) *Structure and Bonding* **8**, 123-.
- Hirschmann, H. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 2762-.
- Hollis, B.W. und Grey, R.W. (1993) in: Cytochrome P450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H. (1982) Biophysik, in: (Hrsg: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Horii, S. (1986) *J. Med. Chem.* **29**, 1038-.
- Hostetler, K.Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11714-.
- Hui, S.W., Parsons, D.F. und Cowden, M. (1974) *Prog. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 5068-.
- Hui, S.-W. und Sen, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5825-.
- Hume, R. und Boyd, G.S. (1978) *Biochem. Soc. Trans.* **6**, 893-.
- Humphries, M.J. (1986) *Cancer Res.* **46**, 5215-.
- Igarashi, Y. und Kimura, T. (1986) *Biochemistry* **25**, 6461-.
- Immamura, S. und Horiuti, Y. (1979) *J. Biochem.* **85**, 79-.
- Ingelman-Sundberg, M. (1986) in: Cytochrome P-450, (Hrsg.: Ortiz de Montellano, P.R.), Plenum, New York.
- Israelachvilli, J.N., Marcelja, S. und Horn, R.G. (1980) *Q. Reviews Biophys.* **13**, 121-.
- Jackson, M., Haris, P.I. und Chapman, D. (1989) *J. Mol. Struct.* **214**, 329-.
- Janiak, M.J., Small, D.M. und Shipley, G.G. (1980) *Biochemistry* **15**, 4575-.
- Jefcoate, C.R., McNamara, B.C., Artemenko, I. und Yamazaki, T. (1992) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**, 751-.
- Jiang, R.T., Shyy, Y.T. und Tsai, M.D. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **23**, 1661-.
- Juneja, L.R., Hibi, N., Inagaki, N. und Yamane, T. (1987) *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 350-.
- Juneja, L.R., Kazuoka, T., Yamane, T. und Shimizu, S. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **969**, 334-.
- Juneja, L.R., Yamane, T. und Shimizu, S. (1989) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 714-.
- Jungalwala, F.B. und Evans, J.E. (1976) *Biochem J.* **155**, 55-.
- Jungalwala, F.B. und Hayssen, V. (1979) *J. Lipid Res.* **20**, 579-.
- Kaminsky, L.S. und Fasco, M.J. (1992) *Critical Rev. Toxicology* **21**, 407-.
- Kannan, R., Subbaram, M.R. und Achaya, K.T. (1974) *Fette, Seife, Anstrichm.* **76**, 344-.
- Kappus, H. (1993) in: Cytochrome P-450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, J.), Springer-Verlag, Berlin.
- Katagiri, M., Ganguli, B.N. und Gunsalus, I.C. (1968) *J. Biol. Chem* **243**, 3543-.

- Kaupinnen, J.K., Moffatt, D.J., Matsch, H.H. und Cameron, D.G. (1981) *Appl. Spectr.* **35**, 271-.
- Keller, M., Blöchl, E., Wächterhäuser, G. und Stetter, K.O. (1994) *Nature* **368**, 836-.
- Kimura, S. und Suzuki, K. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 373-.
- Kimura, T. und Suzuki, K. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 485-.
- Kisselev, P., Wessel, R., Pisch, S., Bornscheuer, U. und Schmid, R.D. (1998a) *J. Biol. Chem.* **273**, 1380-.
- Kisselev, P., Wessel, R., Pisch, S., Bornscheuer, U., Schmid, R.D. und Schwarz, D. (1998b) *J. Biol. Chem.* **273**, 1380-.
- Kiuchi, K. und Ohta, F. (1977) *J. Chromatogr.* **133**, 226-.
- Klibanov, A.M. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1351-.
- Klingenberg, M. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376-.
- Kokusho, Y., Tsundoda, A. und Kato, S. (1993) *Biosc. Biotech. Biochem.* **57**, 1302-.
- Kotyk, A. und Janacek, K. (1977) Membrane Transport, in: (Hrsg: Plenum Press, New York.
- Kovatchev, S. und Eibl, H. (1978) *Adv. Exp. Med. Biol.* **101**, 221-.
- Kowluru, R.A., George, R. und Jefcoate, C.R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8053-.
- Kukis, A. (1978) in: Handbook of Lipid Research, **1** (Hrsg.: Plenum Press, New York.
- Kupfer, D. (1980) *Pharmacology and Therapeutics* **11**, 469-.
- Laane, c., Boeren, S., Vos, K. und Verger, C. (1987) *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-.
- Lambeth, J.D. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4757-.
- Lambeth, J.D. (1990) in: Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application, **3** (Hrsg.: K. Ruckpaul, H.R.), Akademie Verlag, Berlin.
- Lambeth, J.D., Kamin, H. und Seybert, D.W. (1980a) *J. Biol. chem.* **255**, 8282-.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W. und Kamin, H. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 7255-.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W. und Kamin, H. (1980b) *J. Biol. Chem.* **255**, 4667-.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W., Lancater, J.R., Salerno, J.C. und Kamin, H. (1982) *Molec. Cell. Biochem.* **45**, 13-.
- Lambeth, J.D. und Stevens, V.L. (1985) *Endocrine Res.* **10**, 283-.
- Lammers, J.G., Liefkens, T.J., Bus, J. und van der Mer, J. (1978) *Chem. Phys. Lipids* **22**, 293-.
- Lee, M.H. (1989) *Plant Sci.* **59**, 35-.
- Lehninger, A.L. (1985) Biochemie, in: **2. auflage** (Hrsg: VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim.
- Levine, Y.K. (1973) *Prog. Surf. Sci.* **3**, 279-.
- Lewis, D., F.V. und Moereels, H. (1992) *J. Computer-Aided Molecular Design* **6**, 235-.
- Lewis, D.F.V. (1992) *Reviews in Computational Chemistry* **3**, 173-.

- Lewis, D.F.V. (1996) Cytochromes P450, in: (Hrsg: Taylor & Francis, London.
- Lewis, D.F.V., Ioannides, C. und Parke, D.V. (1995) *Biochemical Pharmacology* **50**, 619-.
- Lighthelm, S.P., Sschwartz, H.M. und van Holdt, M.M. (1952) *J. Chem. Soc.* **1088**, 529-.
- Longo, V., Mazzaccaro, A., Naldi, F. und Gervasi, P.G. (1991) *J. Biochem. Toxicology* **6**, 123-.
- Lu, A.Y.H. und Coon, M.J. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 1331-.
- Lu, A.Y.H., Junk, K.W. und Coon, M.J. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 3714-.
- Luzatti, V. (1968) in: Biological Membranes, (Hrsg.: Chapman, D.), Acad. Press, London.
- Malkin, T. (1952) in: Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, **1** (Hrsg.: Holman, R.T., Lindberg, W.O. und Malkin, T.), Pergamon Press, London.
- Mangold, H.K. (1961) *J. Am. Oil. chem. Soc.* **38**, 708-.
- Mannova, M. (1995) Dissertation: Einfluß der Variationen in der molekülstruktur auf das Phasen-, Struktur- und Monoschichtverhalten der Phosphatidylcholine, Institut für physikalische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Mason, H.S., Fowlks, W.L. und Peterson, E. (1955) *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **77**, 2914-.
- Mendelsohn, R. und Senak, L. (1993) in: Advances in spectroscopy, **20** (Hrsg.: Clarc, R.J.H. und Hester, R.E.), Wiley, New York.
- Mikolajczak, K.L. (1964) *J. Org. Chem.* **29**, 318-.
- Mitani, F., Shimizu, T., Ueno, R., Ishimura, Y., Izumi, S., Komatsu, N. und Watanabe, K. (1982) *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 1066-.
- Monier, S., Van Luc, P., Kreibich, G., Sabatini, D.D. und Adesnik, M. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 457-.
- Morohashi, K., Yoshioka, H., Gotoh, O., Okada, T., Yamamoto, K., Miyata, T., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. und Omura, T. (1987) *J. Biochem.* **102**, 559-.
- Morrison, R.T. und Boyd, R.N. (1986) Lehrbuch der organischen Chemie, in: (Hrsg: VCH, Weinheim.
- Mosior, M., Golini, E.S. und Epan, R.M. (1996) *Proc. Natal. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1907-.
- Mukhtar, H. und Khan, W.A. (1989) *Drug Metabolism Rev.* **20**, 657-.
- Müller, A. (1932) *Prog. Roy. Soc. London* **138**, 414-.
- Murray, M. (1992) *Clinical Pharmacokinetic Concepts* **23**, 132-.
- Mushayakarara, E. und Levin, I.W. (1982) *J. Phys. Chem.* **86**, 2324-.
- Nakajima, J. (1994) *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1193-.
- Nakanishi, E. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 533-.
- Nebert, D.W. und Feyereisen, R. (1994) in: Cytochrome P-450 Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, (Hrsg.: Lecher, M.C.), Libbey, Paris.

- Nebert, D.W. und Nelson, D.R. (1991a) *Methods Enzymol.* **206**, 3-.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Looper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. und Waxman, D.J. (1991b) *DNA Cell Biol.* **10**, 1-.
- Nef, P., Heldman, J., Lazard, D., Margalit, T., Jaye, M., Hanukoglu, I. und Lancet, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 457-.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K. und Nebert, D.W. (1993) *DNA Cell Biol.* **12**, 1-.
- Nelson, D.R. und Strobel, H.W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6038-.
- New, R.R.C. (1990) in: *Liposomes, a practical approach*, (Hrsg.: New, R.R.C.), Oxford University Press, New York.
- Nuhn, O., Brezesinski, G., Dobner, B., Förster, G., Gutheil, M. und Dörfler, H.-D. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **39**, 221-.
- Nussdorfer, G.G. (1986) *Int. Rev. Cytol.* **98**, 1-.
- Odham, G. und Valeur, A. (1988) *J. Chromatogr.* **434**, 31-.
- Ohkawa, H., Tsujii, H., Shimoji, M., Imajuku, Y. und Imaishi, H. (1999) *J. Pesticide Sci.* **24**, 197-.
- Okuda, K., Ogishima, T. und Noshiro, M. (1993) in: *Cytochrome P450*, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- O'Malley, B.W. und Strott, C.A. (1991) in: *Reproductive Endocrinology*, (Hrsg.: Yen, S.S.C. und Saunders, W.B.), Philadelphia.
- Omura, T. und Sato, R. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1375-.
- Omura, T. und Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-.
- Orme-Johnson, N.R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 213-.
- Ortiz de Montellano, P.R. (1986) in: *Cytochrome P-450*, (Hrsg.: Ortiz de Montellano, P.R.), Plenum, New York.
- Ozols, J. (1989) *Drug Metabolism Reviews* **20**, 497-.
- Paine, A.J. (1981) *Essays in Biochemistry* **17**, 85-.
- Paliyath, G., Lynch, D.V. und Thompson, J.E. (1987) *Physiol. Plant* **71**, 303-.
- Pasanen, M. und Pelkonen, O. (1989) *Drug Metabolism Rev.* **21**, 427-.
- Pascher, I., Lundmark, M., Nyholm, P.G. und Sundell, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 339-.
- Pax, H. und Blume, A. (1993) *Chem. Phys. Lipids* **66**, 33-.

- Pember, S.O., Powell, G.L. und Lambeth, J.D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3198-.
- Pesce, A.J., Rosen, C.-G. und Pasby, T.L. (1971) Fluorescence Spectroscopy, in: (Hrsg: Marcel Dekker, New York.
- Pisch, S., Bornscheuer, U.T., Meyer, H.H. und R.D., S. (1997) *Tetrahedron* **53**, 14627-.
- Porter, T.D. und Coon, M.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-.
- Poulos, T.L. (1985) The 2.2 Å crystal structure of cytochrome P-450_{cam}, 4th International Symposium on Comparative Biochemistry, Belgium
- Raghunathan, V.A. und Katsaras, J. (1995) *Phys. Rev. Lett.* **74**, 4456-.
- Rahmelow, K. und Hübner, W. (1996) *Applied Spec.* **50**, 795-.
- Ransac, S. und Gargouri, Y. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 395-.
- Rein, H. und Jung, C. (1993) in: Cytochrome P-450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- Reitsema, R.H. (1954) *Anal. Chem.* **26**, 960-.
- Rimpler, M. und Gerull, A. (1987) *Z. Anal. Chem.* **327**, 37-.
- Ruckpaul, K. und Rein, H. (1984) Cytochrome P-450, in: (Hrsg: Akademie-Verlag, Berlin.
- Ruckpaul, K., Rein, H., Blanck, J., Ristau, O. und Coon, M.J. (1982) *Acta Biol. Med. Germanica* **41**, 193-.
- Ruckpaul, K., Rein, H. und Blank, J. (1989) *Frontiers in Biotransformation* **1**, 1-.
- Rudolph, A.S. und Burke, T.G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **902**, 349.359-.
- Rürup, J. (1994) Dissertation: Synthese und Charakterisierung der (1,2)-Diacyl-*sn*-glycerophosphocholine isomerer Octadecinsäuren., Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- Rürup, J., Manova, M., Brezesinski, G. und Schmid, R.D. (1994) *Chem. Phys. Lipids* **70**, 187-.
- Ryman, B.E. und Tyrell, D.A. (1980) in: Essays in Biochemistry, **16** (Hrsg.: Academic Press, New York.
- Saini, R.S. und Chawla, H.K.L. (1990) *Biol. Plant* **32**, 313-.
- Sale, M.F.O., Cestaro, B., Mascherpa, A., Monti, D. und Masserini, M. (1989) *Chem. Phys. Lipids* **50**, 135-.
- Sarda, L. und Desnuelle, P. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 513-.
- Sariaslani, F.S. (1991) *Adv. in Applied Microbiol.* **36**, 133-.
- Sawyer, D.T. (1987) *Comments on Inorganic Chemistry* **6**, 103-.
- Schenkman, J.B. (1970) *Biochemistry* **9**, 2081-.
- Schenkman, J.B. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 1023-.

- Schenkman, J.B. und Griem, H. (1993) Cytochrome P450, in: (Hrsg: Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schenkman, J.B., Remmer, H. und Estabrook, R.W. (1967) *Mol. Pharmacol.* **3**, 113-.
- Schmid, R.D. (1987) *Fat Sci. Technol.* **64**, 582-.
- Schmid, R.D. und Werdelmann, B.W. (1982) *JAOCs* **84**, 563-.
- Schulte, K.E. und Reisch, J. (1960) *Pharmazeutische Zeitung* **105**, 678-.
- Schwarz, D., Kisselev, P., Wessel, R., Jueptner, O. und Schmid, R.D. (1996) *J. Biol. Chem.* 12840-.
- Schwarz, D., Kisselev, P., Wessel, R., Pisch, S., Bornscheuer, U. und Schmid, R.D. (1997) *Chem. Phys. Lipids* **5**, 91-.
- Schwarz, D., Krüger, V., Chernoglov, A.A., Usanov, S.A. und Stier, A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 889-.
- Schwarz, D. und Pirrwitz, J. (1990a) *Experimentelle Technik der Physik* **38**, 347-.
- Schwarz, D., Pirrwitz, J., Meyer, H.W., Coon, M.J. und Ruckpaul, K. (1990b) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **171**, 175-.
- Seddon, J.M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 1-.
- Senak, L., Moore, D. und Mendelsohn, R. (1992) *J. Phys. Chem.* **96**, 2749-.
- Seybert, D.W., Lancaster, J.R.J., Lambeth, J.D. und Kamin, H. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 12088-.
- Shikita, M. und Hall, P. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 5605-.
- Shimbo, K., Yano, H. und Miyamoto, Y. (1989) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3083-.
- Shinitzky, M. und Baranholz, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 367-.
- Shiraki, H. und Guengerich, F.P. (1984) *Archs. Biochem. Biophys.* **235**, 86-.
- Singer, S.G. und Nicolson, G.L. (1972) *Science* **173**, 720-.
- Sirota, E.B., Smith, G.S., Safinya, C.R., Plano, R.J. und Clark, N.A. (1988) *Science* **242**, 1406-.
- Skipiski, V.P. und Peterson, R.F. (1964) *Biochem. J.* **90**, 374-.
- Sligar, S.G., Gelb, M.H. und Heimbroke, D.C. (1984) *Xenobiotica* **14**, 63-.
- Smith, B.R., Plummer, J.L., Wolf, C.R., Philpot, R.M. und Bend, J.R. (1982) *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics* **223**, 736-.
- Smith, G.S., Sirota, E.B., Safinya, C.R. und Clark, N.A. (1988) *Phys. Rev. Lett.* **60**, 813-.
- Snyder, R.G. (1960) *J. Molec. Spec.* **4**, 411-.
- Snyder, R.G. und Schachtschneider, J.H. (1963) *Spectrochim. Acta* **19**, 85-.
- Snyder, R.G., Strauss, H.L. und Ellinger, C.A. (1982) *J. Phys. Chem.* **86**, 5145-.
- Sørensen, N.A. und Sterne, J. (1941) *Liebigs Ann. Chem.* **549**, 80-.

- Sorithos, N. und Thörngren, C. (1985) *J. Chromatogr.* **331**, 313-.
- Stayton, P.S. und Sligar, S.G. (1990) *Biochemistry* **29**, 7381-.
- Steger, A. und van Loon, J. (1937) *Fette und Seifen* **44**, 243-.
- Stier, A. (1976) *Biochem. Pharmacol.* **25**, 109-.
- Stryer, L. (1991) Biochemie, in: (Hrsg: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Stubbs, C.D. (1983) in: *Essays in Biochemistry*, **19** (Hrsg: Academic Press, New York.
- Stümpel, J. (1981) Dissertation: Kalorimetrie und Röntgenstrukturanalyse an Lecithin-Modellmembranen, Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- Sun, W.J., Suter, R.M., Knewtson, M.A., Worthington, C.R., Tristram-Nagle, S., Zhang, R. und Nagle, J.F. (1994) *Phys. Rev. E* **49**, 4665-.
- Sun, W.J., Tristram-Nagle, S., Suter, R.M. und Nagle, J.F. (1996) *Biophysical Journal* **71**, 885-.
- Sundell, S. (1994) *Chem. Phys. Lipids* **34**, 115-.
- Suzuki, K. und Kimura, T. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 340-.
- Sybert, D.W., Lancaster, J.R., Lambeth, J.D. und Kamin, H. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 12088-.
- Takami, M. und Suzuki, Y. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2136-.
- Tanford, C. (1973) The hydrophobic effect, in: (Hrsg: John Wiley and Sons, New York.
- Tardieu, A., Luzzati, V. und Reman, F.C. (1973) *J. Mol. Biol.* **75**, 711-.
- Tate, M.W., Ekenberry, E.F., Turner, D.C., Shyamsunder, E. und Gruner, S.M. (1991) *Chem. Phys. Lipids* **57**, 147-.
- Ter-Minassian-Saraga, L., Okamura, E., Umemura, J. und Takenaka, T. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 517-.
- Tilcock, C.P.S. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **4**, 109-.
- Träuble, H. (1971) *Naturwissenschaften* **58**, 277-.
- Tsakabi, M., Iwamoto, Y., Hiwatashi, A. und Ichikawa, Y. (1989) *Biochemistry* **28**, 6899-.
- Tuchtenhagen, J. (1990) Diplomarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Kaiserslautern.
- Tuchtenhagen, J. (1994) Dissertation: Kalorimetrische und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen an Phospholipidmembranen., Institut für Physikalische Chemie, Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Tyson, C.A., Tsai, R.L., Lipscomb, J.D. und Gunsalus, I.C. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5777-.
- Vainshtein, B.K. (1963) *Sov. Phys. Cryst.* **8**, 127-.
- Van Deenen, L.L.M. und De Gier, J. (1974) The red Blood Cell, in: (Hrsg: Academic Press, New York.
- Van Tilbeurgh, A. (1993) *Nature* **362**, 814-.

- Van Wijk, G.M.T. (1992) *Biochemistry* **31**, 5912-.
- Veitch, N.C. und Williams, R.J.P. (1992) *Frontiers in Biotransformation* **7**, 279-.
- Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. und Coon, M.J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 266-.
- Wagner, H. und Hörhammer, L. (1961) *Biochem. Z.* **334**, 175-.
- Wailes, P.C. (1956) *Pure and Appl. Chem.* **6**, 61-.
- Walker, B.D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9229-.
- Wallach, D.F.H., Verma, S.P. und Fookson, J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 153-.
- Wang, P. (1993) *Am. Chem. Soc* **115**, 10487-.
- Warner, M. und Gustafsson, J.-A. (1993) in: Cytochrome P450, (Hrsg.: Schenkman, J.B. und Griem, H.), Springer-Verlag, Berlin.
- Waterman, M.R. (1992) *Current Opinion Structural Biol.* **2**, 384-.
- Watkins, P.B. (1990) *Seminars in Liver Disease* **10**, 235-.
- Willemot, C. (1983) *Phytochemistry* **22**, 861-.
- Witt, W., Yelnosky, G. und Mayer, T.R. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 164-.
- Woese, C.R. (1987) *Microbiol. Rev.* **51**, 221-.
- Yamamoto, I., Konto, A. und Handa, T. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1233**, 21-.
- Yoshida, S. (1979) *Plant Physiol.* **64**, 241-.
- Ziegler, W. und Blume, A. (1995) *Spectrochim. Acta Part A* **51**, 1763-.
- Zimniak, P. und Waxman, D.J. (1993) in: Cytochrome P450, **123-144** (Hrsg.: Schenkman, J.B. und H., G.), Springer-Verlag, Berlin.

Lebenslauf

Name: Sandra Pisch-Heberle

Geburtsdatum: 30.12.69
Geburtsort: Stuttgart
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

07/76-07/80 Grundschole Ludwigsburg
09/80-06/89 Mörike Gymnasium Ludwigsburg,
05/89 Abitur

Studium

10/89-02/96 Studium der Chemie, Universität Stuttgart
07/92 Vordiplom
07/95 Diplomhauptprüfung
09/95-02/96 Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart:
„Synthese von Phospholipiden ungewöhnlicher Fettsäuren durch
Transphosphatidylierung mit Phospholipase D.“

Promotion

04/96-04/2000 Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart:
„Untersuchungen zur Stabilisierung von Membranproteinen mit
ungewöhnlichen Phospholipiden.“
02/97-04/99 Forschungsaufenthalte am
- Institut für Physikalische Chemie der Universität Kaiserslautern,
- Institut für Physikalische Chemie der Universität Halle,
- Max Delbrück Center für Molekulare Medizin, Berlin-Buch
DAAD Stipendium für einen Forschungsaufenthalt an der
Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Kobe, Japan
28.04.00 Promotionsprüfung