

**Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen
an der Luft/Wasser-Grenzfläche**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Chem. Andreas Markus Kerth
geb. am 25. August 1970 in Worms

Gutachter:

1. Prof. Dr. Alfred Blume
2. Prof. Dr. Carsten Tschierske
3. Prof. Dr. Gerald Brezesinski

Halle (Saale), 17.04.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006414

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006414>]

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Blume für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit, die interessante Thematik und den mir gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. A. Gericke (Kent State University, USA, damals noch Halle/Saale) danke ich dafür, daß ich von ihm die IRRAS-Technik in Theorie und Praxis von der Pike auf erlernen konnte.

Für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Fluoreszenz-Mikroskopiemessungen sowie für die Durchführung von Röntgen-Reflektometriemessungen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Lösche und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe am Institut für Experimentelle Physik I der Universität Leipzig, insbesondere bei Frau U. Dietrich.

Herrn Dr. W. Hübner sei für die vielen Diskussionen über IR-Spektren gedankt. Herrn A. Erbe danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit an der IRRAS-Apparatur. Frau I. Schaller danke für die Durchführung von IR-spektroskopischen Messungen, als auch für Spektrenbearbeitungen und Frau B. Fölting für die Durchführung von DSC-Messungen.

Herrn Prof. Dr. K. Sandhoff (Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Bonn), Herrn Dr. K. Brandenburg (Forschungszentrum Borstel), Herrn Prof. Dr. B. Dobner (Institut für Pharmazeutische Chemie, Halle) und Frau Dr. M. Dathe (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) danke ich für die zur Verfügung gestellten Lipide, Peptide bzw. Proteine.

Den Mitarbeitern der Werkstätten der Universität Kaiserslautern, sowie den Herren U. Hoffmann, A. Lonitz, D. Reese, N. Schammelt, R. Schlosser und J. Wodke der MLU danke ich für das Anfertigen verschiedenster Bauteile und die Durchführung von Reparaturen.

Außerdem möchte ich den Herren W. Hartmann und F. Kuschine von der Firma Bruker (Leipzig) bei der Behebung technischer und programmiertechnischer Probleme mit den IR-Spektrometern danken.

Schließlich und endlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Arbeitskreises Blume für das sehr gute Arbeitsklima und die stets hilfreiche Zusammenarbeit bedanken:

Noch am Standort West in Kaiserslautern: Herr Dr. A. Elbert, Herr Dr. P. Garidel, Frau Dr. A. Giehl, Herr Dr. S. Hoffmann, Herr Dr. C. Johann, Herr Dr. M. Keller, Herr Dr. H. Pax, Frau Dr. M. Requero.

Jetzt am Standort Ost in Halle/Saale: Frau K. Beyer, Herr A. Erbe, Frau B. Fölting, Herr Dr. G. Förster, Herr Prof. Dr. A. Gericke, Frau K. Gutewort, Frau D. Hänsel, Herr Dr. A. Hauser, Frau C. Hillmann, Herr Dr. W. Hübner, Herr D. Leine, Herr A. Lonitz, Herr Dr. P. Majhi, Frau Dr. A. Meister, Frau G. Naumann, Frau I. Schaller, Herr M. Schiewek, Herr C. Schwieger, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Meinen Eltern danke ich, daß sie mir das spannende und erfolgreiche Studium der Chemie ermöglicht haben.

Meinem Vater gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Filmwaagemessungen	2
1.2	IR-Spektroskopie	4
1.3	Externe Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)	7
1.4	Zielsetzung und Fragestellung	8
2	Theorie	9
2.1	Molekulare Orientierung	9
2.2	IRRAS	11
2.2.1	Optisches Modell und mathematischer Formalismus	13
2.2.2	Berechnung der Reflektivität und der Reflexions-Absorption	18
2.2.2.1	Berechnung von Reflektivitäts- und Reflexions-Absorptionsspektren	18
2.2.2.2	Berechnung der einfallswinkelabhängigen Reflektivität und Reflexions-Absorption	20
2.2.3	Simulationen	21
2.2.3.1	Bandensimulation und Tiltwinkelberechnung	21
2.2.3.2	Basisliniensimulation	24
3	Ergebnisse und Diskussion	28
3.1	8-Cyanobiphenyl	28
3.2	Lipide	34
3.2.1	DPPC-Isomere	34
3.2.1.1	IRRAS	34
3.2.1.2	Untersuchung von Lipiddispersionen	38
3.2.1.3	Zusammenfassung	40
3.2.2	Sphingolipide	42
3.2.2.1	GM1	43
3.2.2.2	GM2	49
3.2.2.3	GM3	53
3.2.2.4	Ceramid, Glucosylceramid und Sphingomyelin	55
3.2.2.5	Zusammenfassung	55

3.2.3	Bis-(monoacylglycero)phosphate (BMP).....	58
3.2.3.1	C16-1-BMP	59
3.2.3.2	C14-1-BMP	63
3.2.3.3	C16-2-BMP	67
3.2.3.4	C18:1-1-BMP	71
3.2.3.5	Untersuchung von Lipiddispersionen	71
3.2.3.6	Zusammenfassung	72
3.3	Lipid/Peptid- bzw. Lipid/Protein-Wechselwirkung.....	75
3.3.1	Lipid A und Lactoferrin	75
3.3.1.1	Lipid A.....	76
3.3.1.2	Lactoferrin	77
3.3.1.3	Lipid A und Lactoferrin.....	78
3.3.1.4	Zusammenfassung	79
3.3.2	POPG und KLAL.....	80
3.3.2.1	KLAL.....	80
3.3.2.2	POPG und KLAL	81
3.3.2.3	Zusammenfassung	82
3.3.3	GM1 und GM2-Aktivatorprotein.....	84
3.3.3.1	GM2-Aktivatorprotein.....	85
3.3.3.2	DMPC-d ₅₄ /C16-1-BMP/GM1 3:1:1 und GM2-Aktivatorprotein.....	86
3.3.3.3	Zusammenfassung	87
4	Zusammenfassung	88
5	Experimenteller Teil.....	92
5.1	Materialien.....	92
5.1.1	Chemikalien	92
5.1.2	Lipide.....	92
5.1.3	Peptide und Proteine.....	92
5.1.4	Instrumentierung	93
5.2	Methoden	93
5.2.1	Filmwaagemessungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche	93
5.2.2	IRRAS an der Luft/Wasser-Grenzfläche.....	94
5.2.2.1	IRRAS-Druck/Flächen-Isothermen	95
5.2.2.2	Orientierungsmessungen	96
5.2.2.3	Zeitabhängige Messungen mit Peptiden/Proteinen	97

5.2.3	Transmissions-FT-IR-Spektroskopie	98
5.2.4	Fluoreszenz-Mikroskopie	98
5.2.5	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	99
6	Literatur	100
	Anhang	A1
A.1	Simulation der Ordnungsparameter S und D	A1
A.2	Simulation der Absorptionskoeffizienten $k_{i \max}$	A1
A.3	Normierung der Reflektivitätsspektren	A3
A.4	IRRAS-Simulation von CD_2 -Streckschwingungsbanden	A4
A.5	8-Cyanobiphenyl.....	A5
A.6	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	A7
A.7	IRRAS-Simulation der Amid-I-Bande einer α -Helix.....	A8
A.8	IRRAS-Simulation der Amid-Banden eines β -Faltblatts.....	A9
A.9	GM1 und GM2-Aktivatorprotein	A10

Abkürzungen

Substanzen:

Phospholipide:

BMP	Bis-(monoacylglycero)phosphat
Eigene Nomenklatur zur Unterscheidung der verwendeten BMP-Lipide:	
C16-1-BMP	Bis-(1-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-)phosphat
C16-2-BMP	Bis-(2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-)phosphat
C14-1-BMP	3-Myristoyl- <i>sn</i> -glycero-1-(1'-myristoyl- <i>sn</i> -glycero-3'-)phosphat
C18:1-1-BMP	3-Oleoyl- <i>sn</i> -glycero-1-(1'-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3'-)phosphat
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC-d ₆₂	1,2-Diperdeuteropalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
-d _{xx}	perdeuterierte Fettsäurekette (xx = Anzahl der Deuteriumatome)
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PS	Phosphatidylserin
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
P-d ₃₁ PPC	1-Perdeuteropalmitoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PP-d ₃₁ PC	1-Palmitoyl-2-perdeuteropalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin

Sphingolipide:

Cer	Ceramid
C18-Cer	D-erythro-2- <i>N</i> -Stearoylsphingosin
C18-GlcCer	Glucosyl-D-erythro-2- <i>N</i> -stearoylsphingosin
C18-SM	<i>N</i> -Stearoyl-D-Sphingomyelin
GM1, GM2, GM3	Ganglioside GM1, GM2, GM3
GM1	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal(3 \leftarrow 2 α NeuAc) β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GM2	GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal(3 \leftarrow 2 α NeuAc) β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GM3	NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-Galactosamin
Glc	Glucose
NeuAc	<i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure bzw. -Sialinsäure

Peptide und Proteine:

GM2-AP	GM2-Aktivatorprotein
Hex	β -Hexosaminidase
KLAL	Aminosäuresequenz: KLALKLALKALKKAALKLA
(h)Lf	(menschliches) Lactoferrin
SAP	Sphingolipid-Aktivatorprotein

Sonstige:

8CB	4-Cyano-4'-Octylbiphenyl, 8-Cyanobiphenyl
LPS	Lipopolysaccharid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

Methoden:

FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
DSC	Differential Scanning Calorimetry

Theorie:

S, f	Längs- oder Tiltordnungsparameter
D	Querordnungsparameter
θ	Tiltwinkel (Neigungswinkel) des Moleküls in bezug auf die Oberflächennormale
ψ	Twistwinkel des Moleküls in bezug auf die Moleküldirektorachse
ϕ	Tiltazimuth des Moleküls
α, β	Polarwinkel des Übergangsdipolmoments im Molekülkoordinatensystem
μ	Übergangsdipolmoment
\tilde{r}	komplexer Reflektionskoeffizient
R, R^{eff}	Reflektivität, effektive Reflektivität
RA, RA^{eff}	Reflexions-Absorption, effektive Reflexions-Absorption
F	Fresnel-Oberfläche
s, p	Abk. der Polarisationen der einfallenden Strahlung
Γ	Polarisatorgüte
φ_1	Einfallswinkel der Strahlung
$\tilde{\varphi}_2$	komplexer Winkel des gebrochenen Strahls
n_1	Brechungsindex von Luft
$\tilde{n}_x, \tilde{n}_y, \tilde{n}_z, \tilde{n}_2$	komplexe Brechungsindices des Films und des Wassers
n_o, n_{ao}	ordentlicher und außerordentlicher Brechungsindex des Films
n_i	richtungsabhängige Brechungsindices
k_i	richtungsabhängige Absorptionskoeffizienten
k_{max}	max. Absorptionskoeffizient
$k_{max\ as,s}$	max. Absorptionskoeffizient der antisymmetrischen bzw. symmetrischen Methylenstreckschwingung
c	Lichtgeschwindigkeit
λ	Wellenlänge
$\bar{\nu}$	Wellenzahl
$\bar{\nu}_0$	Wellenzahl des Maximums der Schwingungsbande
$\Delta\bar{\nu}_{1/2}$	Halbwertsbreite der Schwingungsbande
d	Schichtdicke

l, b Moleküllänge, Molekülbreite
 χ^2 Summe der kleinsten Fehlerquadrate

Infrarotmodenabkürzungen:

Typ_{Symmetrie}(Atomgruppe) (z.B.: $\nu_s(\text{CH}_2)$)

Typ:	Typ der Schwingung:
ν	Streck- oder Valenzschwingung
δ	Deformationsschwingung eines oder mehrerer Bindungswinkel in der Ebene der jeweiligen Bindungen
γ	Deformationsschwingung von Bindungen aus der Bindungsebene heraus
Symmetrie:	optionale Zusatzangaben
s	symmetrisch (z.B. bei Streckschwingungen)
as	antisymmetrisch (auch asymmetrisch bezeichnet)
w	Kippschwingung ("wagging mode"; γ -Deformationsschwingungen)
Atomgruppe:	in die Schwingung einbezogene Atome

Lipidphasen in Lösung:

L_α	lamellare, flüssig-kristalline Phase
L_β	Gelphase
$L_{\beta'}$	Gelphase mit geneigten Fettsäureketten
$P_{\beta'}$	"Ripple" Phase mit geneigten Fettsäureketten
L_c	kristalline Phase
L_c'	kristalline Phase mit geneigten Fettsäureketten
H_{II}	invers-hexagonale Phase

Lipidphasen an der Luft/Wasser-Grenzfläche:

G	gasanaloge Phase
LE	flüssig-expandierte Phase ("liquid expanded")
LC	flüssig-kondensierte Phase ("liquid condensed")
S	festanaloge Phase ("solid")

Sonstige:

A	Fläche pro Molekül / $\text{nm}^2 \cdot \text{Molekül}^{-1}$ (ältere Einheit: $\text{Å}^2 \cdot \text{Molekül}^{-1}$)
C_p	differentielle Wärmekapazität / $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
π	Oberflächendruck / $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$
γ	Oberflächenspannung / $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$
T_m	Phasenumwandlungstemperatur / $^\circ\text{C}$

1 Einleitung

Die Zelle, Grundeinheit des Lebens, ist durch die sie umhüllende Plasmamembran kompartimentiert. Bei Eukaryonten sind darüber hinaus viele subzelluläre Organellen wie Kern, Mitochondrien, Chloroplasten, endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Apparat durch Membranen begrenzt. Biologische Membranen sind hochorganisierte Aggregate von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten (Winter & Noll, 1998; Voet & Voet, 1992; Ringsdorf et al., 1988). Letztere sind typischerweise an Lipide (Glykolipide) oder Proteine (Glykoproteine) gebunden. Der Lipidgehalt liegt in der Regel zwischen 40 und 60 %, kann aber je nach Funktion der Membran beträchtlich variieren. Die Membranlipide setzen sich aus einer Reihe verschiedener amphiphiler Moleküle, wie Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterin, zusammen. In wäßriger Lösung bilden sie normalerweise Lipiddoppelschichten mit einer Dicke von 4 bis 5 nm, in die Proteine als integrale oder periphere Bestandteile eingelagert sind. Die Membranstruktur wird durch das Flüssig-Mosaik-Modell von Singer & Nicholson (1972) beschrieben, in dem die Lipiddoppelschicht als zweidimensionale Flüssigkeit betrachtet wird. Geometrische Packungsfaktoren sowie die Ladung der Kopfgruppe bestimmen wesentlich die Gestalt biologischer Molekülaggregate im Wasser (Israelachvili, 1991).

Die Phospholipide bilden den wichtigsten Lipidbestandteil biologischer Membranen. Sie bestehen meist aus einem Glycerinrückgrat (möglich ist auch ein Sphingosinrückgrat), welches mit einer phosphathaltigen Kopfgruppe und zwei Fettsäuren verestert ist. Ihre Einteilung erfolgt dabei nach der Struktur der Kopfgruppe (siehe Abb. 1.1).

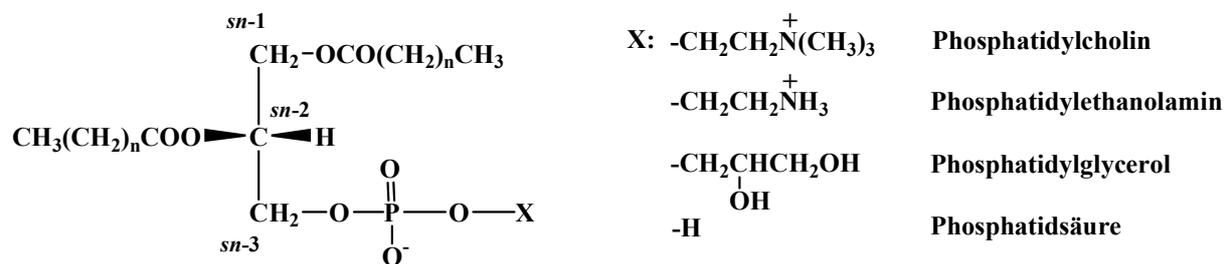


Abb. 1.1: Strukturen von Phospholipiden.

Natürlich vorkommende Fettsäuren enthalten zumeist eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen und eventuelle Doppelbindungen besitzen eine *cis*-Konformation. Die in der Natur vorkommenden Phospholipide sind in der Regel mit zwei unterschiedlichen Fettsäuren verestert, wobei ungesättigte Fettsäuren bevorzugt an der *sn*-2-Position des Glycerinrückgrats gebunden sind.

Beim Dispergieren in Wasser entstehen aufgrund des hydrophoben Effekts (Tanford, 1980) sphärische oder planare Strukturen aus Doppelschichten. Die Form der gebildeten Aggregate hängt neben dem Wassergehalt (lyotroper Polymorphismus) und der Temperatur (thermotroper Polymorphismus) von der Struktur des jeweiligen Amphiphils ab. Beispielsweise liegt DPPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; siehe Kap. 3.2.1) bei niedrigen Temperaturen in einer lamellaren, kristallinen Subgelphase mit geneigten Fettsäureketten (L_c) in einem orthorhombischen Gitter vor. Durch Temperaturerhöhung kommt es zu Phasenübergängen in die Gelphase (L_{β} , quasi-hexagonales Gitter), die „Ripple“-Phase (P_{β} , hexagonales Gitter) und die flüssigkristalline Phase (L_{α}) (Koynova & Caffrey, 1998; Winter & Noll, 1998). Die Ausbildung der Subgelphase erfordert Inkubationszeiten von

mehreren Tagen (Casal & Mantsch, 1984; Lewis & McElhaney, 1990; Le Bihan & Pezolet, 1998).

In der kristallinen Phase sind die Kohlenwasserstoffketten der Lipide in der freien Rotation stark eingeschränkt und liegen ebenso wie in der L_{β} - und P_{β} -Phase in einer gestreckten *all-trans*-Konformation vor. Die L_{α} -Phase ist durch eine hohe Beweglichkeit der Ketten gekennzeichnet, die auf die Bildung von *gauche*-Isomeren der Ketten zurückzuführen ist und daher oft auch als „geschmolzen“ bezeichnet wird. In dieser fluiden Phase ist die Dicke der Lipiddoppelschicht geringer als in den Gelphasen, was auf die Ausbildung von Rotationsisomeren mit *gauche-trans-gauche*-Kinken zurückzuführen ist (Winter & Noll, 1998).

Zum Studium der Phasenübergänge der Lipide und von Lipid/Protein-Wechselwirkungen werden unter anderem die Kalorimetrie (Blume & Garidel, 1999; McElhaney, 1986), Filmwaagemessungen (Kap. 1.1), die Infrarot-Spektroskopie (Kap. 1.2), sowie die Kombination aus beiden Methoden, die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (Kap. 1.3) verwendet. Daneben können auch verschiedene Fluoreszenzmethoden, Röntgen- und Neutronen-Diffraktion, Röntgen- und Neutronen-Reflektometrie, Kernresonanz- und Raman-Spektroskopie, Rasterkraft-Mikroskopie und Circular dichroismusmessungen angewendet werden (Winter & Noll, 1998).

1.1 Filmwaagemessungen

Monomolekulare Schichten, auch Langmuirfilme genannt, sind quasi-zweidimensionale Schichtsysteme, welche nur aus einer Moleküllage bestehen und sich z. B. durch Spreiten auf einer flüssigen Oberfläche bilden. Die polaren Kopfgruppen der amphiphilen Moleküle orientieren sich zur wässrigen Subphase hin, während der apolare Teil in die Luft gerichtet ist. Mit der Filmwaagentechnik läßt sich die verfügbare Fläche pro Molekül auf der Subphase kontinuierlich verändern und damit das Kompressionsverhalten der Monoschicht bestimmen. (Gaines, 1966; Möhwald, 1995). Der Oberflächendruck¹ π ist die Differenz der Oberflächenspannung γ_0 der reinen Subphase und der filmbedeckten Oberfläche γ : $\pi = \gamma_0 - \gamma$. An einem Langmuirfilm läßt sich die Ordnung in zwei Dimensionen studieren, wobei die Wasseroberfläche eine exzellente, glatte Oberfläche darstellt. Die thermodynamischen Parameter Temperatur und Druck lassen sich, ebenso wie z. B. der pH-Wert der Subphase, sehr gut einstellen. Die sich ausbildenden Phasenzustände werden nach der Nomenklatur von Adamson (1990) benannt (Abb. 1.2).

Mit einer Fläche von mehreren Quadratnanometern je Molekül liegt der Film als zweidimensionales Gas vor, in dem keine Wechselwirkung zwischen den Amphiphilen besteht. Mit zunehmender Flächenverringering kommt es zu einem Phasenübergang zur flüssig-expandierten Phase (LE), in der die Ketten wie in der Gasphase ungeordnet sind. In der flüssig-expandierten Phase kommt es zu einem erkennbaren Druckanstieg, bis die Phase sich bei einem konstanten Oberflächendruck in einem Phasenübergang erster Ordnung (Pallas & Petica, 1985; Hifeda & Rayfield, 1992; Lösche et al., 1983) in die flüssig-kondensierte Phase (LC) umwandelt. Der Knick deutet einen kontinuierlichen Übergang von der flüssig-kondensierten in die festanaloge Phase S an (Bibo et al., 1991; Kaganer et al., 1999).

Langmuirfilme bilden die Grundlage zur Herstellung von Langmuir-Blodgett-(LB)-Filmen. Von besonderer Bedeutung ist die Verwendung von Lipidmonoschichten zur Charakterisierung von Lipidmembran/Protein-Wechselwirkungen, denn Langmuirfilme

¹ Anmerkung: Wenn in dieser Arbeit der Begriff Druck verwendet wird, so ist damit im Zusammenhang mit Filmwaage-Messungen immer der Oberflächendruck π gemeint.

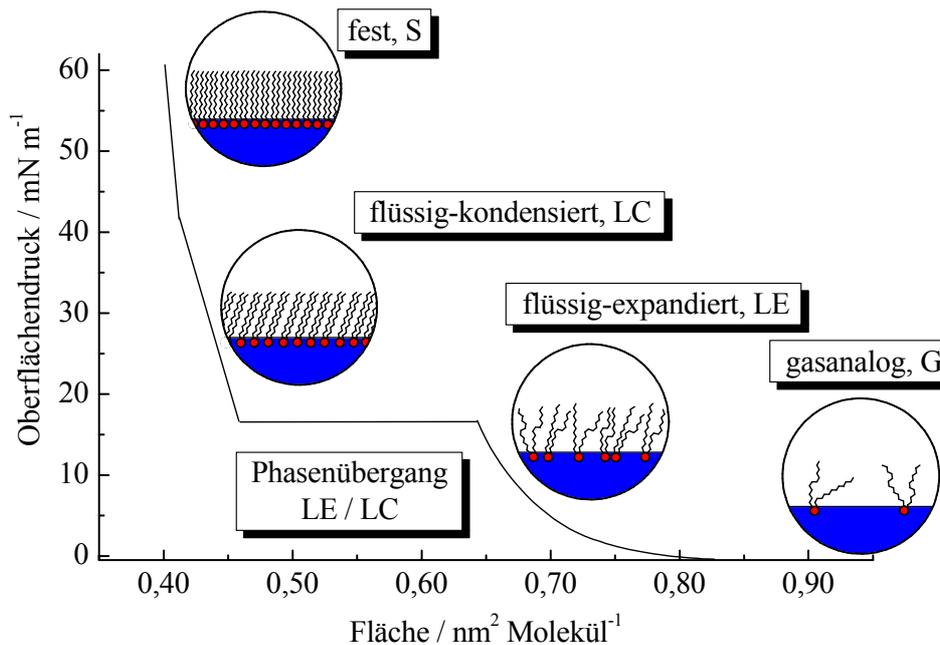


Abb. 1.2: Verallgemeinerte π/A -Isotherme eines Lipids mit zwei Acylketten.

können als eine Hälfte der sich aus zwei Monoschichten zusammensetzenden biologischen Membran betrachtet werden (Ahlers et al., 1990; Möhwald, 1990; Brockman, 1999). Die Wechselwirkungen hängen von der Stärke der Lipid/Protein-Wechselwirkung, der Gegenwart von Ionen in der Subphase, der Natur und Ladung der Lipidkopfgruppen, sowie der Länge, Sättigungsgrad und Packungsdichte der Acylketten ab. So kann die Adsorption von Peptiden an die Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten untersucht werden (Maget-Dana, 1999).

Von großem Interesse ist der Vergleich des Phasenzustandes in der Monoschicht und in der Lipiddoppelschicht in Volumenphasen. Bei Monoschichtmessungen ist ein flüssig-expandierter Zustand am ehesten mit den Orientierungs- und den Packungsverhältnissen in Doppelschichtsystemen in der L_a -Phase vergleichbar (Marsh, 1996). Ein Vergleich der Phasenübergänge in Mono- und Bilschichten ergab, daß die beste Übereinstimmung von Bilschichten mit Monoschichten bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m gegeben ist (Blume, 1979). Seelig (1987) verglich den Einbau von Amphiphilen in Monoschichten und Bilschichten und die Messungen bei einem Oberflächendruck von 30,7 – 32,5 mN/m entsprachen den Ergebnissen der Verteilungsexperimente in den Doppelschichten.

Die mikroskopische Visualisierung von Monoschichtdomänen einer Phasenumwandlung kann durch die Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgen (Lösche et al., 1983; Knobler, 1990; McConnell, 1991; Weis, 1991). Hierbei wird ein fluoreszierendes Amphiphil in die Monoschicht hinzugefügt. Durch die unterschiedliche Löslichkeit des Farbstoffs in den unterschiedlichen Phasen können koexistierende Phasen und Domänenstrukturen mit einem Mikroskop beobachtet werden. Aufgrund der geringen Verteilung des Fluoreszenzlabels in der flüssig-kondensierten Phase sind beim LE/LC-Phasenübergang die kondensierten Domänen schwarz. Sie sind gleichmäßig in der fluoreszierenden flüssig-expandierten Phase verteilt.

Neben der Fluoreszenz-Mikroskopie hat sich die Brewsterwinkel-Mikroskopie etabliert, die ebenfalls Domänenstrukturen visualisiert (Henon & Meunier, 1991; Hönig & Möbius, 1991). Die Zugabe eines Fluoreszenzlabels wird nicht benötigt, aber die optische Auflösung ist geringer.

Weiterhin sind zum Studium von Monoschichten Oberflächenpotentialmessungen, Röntgen-Diffraktion bzw. -Reflektometrie, Neutronen-Reflektometrie, IRRAS (Kap. 1.3), Ellipsometrie und Rasterkraft-Mikroskopie geeignet (Möhwald, 1995).

1.2 IR-Spektroskopie

Die FT-IR-Spektroskopie hat sich zu einer Standardmethode entwickelt, die es ermöglicht, routinemäßig das Verhalten von Lipidmodellmembranen und von Peptiden bzw. Proteinen zu untersuchen (Casal & Mantsch, 1984; Mendelsohn & Mantsch, 1986; Blume, 1996; Mantsch & Chapman, 1996; Tamm & Tatulian, 1997). Infrarotspektroskopische Untersuchungen in der Membranbiophysik bieten den Vorteil, daß sie nicht den Einsatz von Sondenmolekülen erfordern. Im IR-Spektrum treten eine Reihe charakteristischer Banden auf, aus deren Lage und Form Informationen über die Struktur des untersuchten Moleküls und seine Wechselwirkungen erhalten werden können.

Bei Modell- und Biomembranen können qualitative und zum Teil auch quantitative Aussagen über die Struktur und das Phasenverhalten gewonnen werden. Dabei können verschiedene Bereiche des Lipidmoleküls sowohl im hydrophoben Acylkettenbereich, als auch in der polar/apolar-Grenzschicht erfaßt werden (siehe Tab. 1.1). Ein Nachteil sind die starken Absorptionsbanden des Lösungsmittels Wasser (siehe Tab. 2.3), was durch die Variation des Lösungsmittels (H₂O bzw. D₂O) jedoch ausgeglichen werden kann.

Die CH-Streckschwingungen treten im spektralen Bereich von 3000 und 2800 cm⁻¹ auf, wobei die antisymmetrischen und symmetrischen Methylenstreckschwingungen bei 2920 bzw. 2850 cm⁻¹ beobachtet werden (Abb. 1.3). Die Frequenz dieser Schwingungen ist konformationsabhängig und kann vor allem bei Phasenumwandlungen zur qualitativen Abschätzung des *trans/gauche*-Verhältnisses innerhalb der Alkylketten herangezogen werden. Bei tiefen Temperaturen befinden sich die Methylengruppen in der *all-trans*-Konformation und die symmetrische CH₂-Streckschwingung tritt bei ca. 2849 cm⁻¹ auf. Kommt es durch

Zuordnung	Wellenzahl / cm ⁻¹	Symbol
Antisymmetrische CH ₂ -Streckschwingung	2916 – 2936	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
Symmetrische CH ₂ -Streckschwingung	2843 – 2863	$\nu_s(\text{CH}_2)$
Antisymmetrische CD ₂ -Streckschwingung	2190 – 2200	$\nu_{as}(\text{CD}_2)$
Symmetrische CD ₂ -Streckschwingung	2085 – 2095	$\nu_s(\text{CD}_2)$
C=O-Streckschwingung	1730 – 1740	$\nu(\text{C=O})$
Amid-I (vorwiegende C=O)	1650	Amid-I
Amid-II	1550	Amid-II
CH ₂ -Scherschwingung (hexagonal)	1467 – 1469	$\delta(\text{CH}_2)_n$
CH ₂ -Scherschwingung (triklin)	1471 – 1473	$\delta(\text{CH}_2)_n$
CH ₂ -Scherschwingung (orthorhombisch)	1465 und 1473	$\delta(\text{CH}_2)_n$
Antisymmetrische PO ₂ ⁻ -Streckschwingung	1200 – 1260	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
Symmetrische PO ₂ ⁻ -Streckschwingung	1085 – 1110	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
CD ₂ -Scherschwingung (hexagonal)	1088	$\delta(\text{CD}_2)_n$
CD ₂ -Scherschwingung (triklin)	1093	$\delta(\text{CD}_2)_n$
CD ₂ -Scherschwingung (orthorhombisch)	1083 und 1093	$\delta(\text{CD}_2)_n$

Tab. 1.1: Zuordnung wichtiger IR-aktiver Schwingungsbanden von Lipiden (Mendelsohn & Mantsch, 1986; Lewis & McElhaney, 1996).



Abb. 1.3: Antisymmetrische (links) und symmetrische (rechts) CH₂-Streckschwingungen.

Temperaturerhöhung zum Phasenübergang von der Gel- in die flüssigkristalline Phase so wird die Wellenzahl um ca. 2,5 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen verschoben. Durch das „Schmelzen“ der Alkylketten kommt es zu einer drastischen Erhöhung der Anzahl der *gauche*-Konformeren. Die Zunahme der Frequenz beim Phasenübergang ist zusätzlich noch mit einer Verbreiterung der Bande und einer Intensitätsabnahme verbunden (Snyder et al., 1978; Snyder et al., 1982; MacPhail et al., 1984).

Die Bande der CH₂-Scherschwingung ist von der Packung der Alkylketten und deren Konformation abhängig (siehe Tab. 1.1). Die Methylenkippschwingungen („wagging“-Schwingungen) zwischen 1370 und 1340 cm⁻¹ können zur quantitativen Konformationsanalyse der Alkylketten herangezogen werden, d. h. zur Berechnung des *gauche*-Konformeranteils in den Ketten (Mendelsohn & Senak, 1993).

Im Kopfgruppenbereich der Lipide ist die C=O-Streckschwingung der Estercarbonylgruppe die wichtigste Bande. Sie kann zur Untersuchung der Hydratationsverhältnisse an der polar/apolar-Grenzschicht verwendet werden (Blume et al., 1988). Die Lage der antisymmetrischen PO₂-Bande ist ebenfalls ein Indikator für Wasserstoffbrückenbindungen. Dies wird durch eine Verschiebung der Frequenz von 1250 cm⁻¹ im trockenen Zustand zu 1230 cm⁻¹ im hydratisierten Zustand gezeigt. Die Amid-I-Bande von Amidgruppen im Ceramidgrundgerüst von Sphingolipiden oder in der Kopfgruppe von Glykolipiden ist ebenfalls sehr sensitiv gegenüber Wasserstoffbrückenbindungen.

In Lipidmischungen zeigen die Spektren eine Mittelung des ganzen Systems und Informationen über die individuellen Komponenten gehen verloren. Um dieses Problem im Bereich der CH-Schwingungen zu umgehen, wurde eine Isotopensubstitution von ²H für ¹H in den Fettsäureketten der Lipide eingeführt (Mendelsohn et al., 1976; Mendelsohn & Koch, 1980). Das spektrale Fenster der CD-Streckschwingungen liegt in einem Bereich (2050 – 2250 cm⁻¹), der nicht oder kaum von anderen Lipidbanden oder den Banden anderer Komponenten betroffen ist. DPPC und DPPC-d₆₂ zeigen ein ähnliches Verhalten, das sich nur in einer um 5 °C reduzierten Phasenumwandlungstemperatur des DPPC-d₆₂ gegenüber dem DPPC unterscheidet. Die Substitution von Wasserstoff durch Deuterium führt zu einer Abschwächung der *van der Waals*-Wechselwirkungen zwischen den Ketten und damit zu einer Erniedrigung der entsprechenden T_m-Werte (Petersen et al., 1975; Gaber et al., 1978). In Mischungen von DPPC und DPPC-d₆₂ mit DPPE konnten ähnliche Phasendiagramme für beide DPPC-Isomere gefunden werden, was auf keine größeren Unterschiede in der Wechselwirkung mit DPPE hinweist (Mendelsohn & Koch, 1980). In einer Monoschichtarbeit mit IRRAS-Messungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche konnten thermodynamische Unterschiede zwischen den beiden DPPC-Isomeren in Phospholipidmischfilmen mit anderen Phospholipiden gefunden werden, so daß der Einsatz deuterierter Verbindungen nicht bedenkenlos erfolgen sollte (Baldyga & Dluhy, 1998).

Peptide bzw. Proteine weisen mehrere charakteristische Absorptionsbanden auf, von denen die aussagekräftigste die Amid-I-Bande ist (zwischen 1700 und 1600 cm⁻¹). Dieser Bande liegt im wesentlichen die C=O-Streckschwingung zugrunde mit geringen Beiträgen der CN-Streck- und der CCN-Deformationsschwingung. Die Frequenzlage und Bandenform

hängen empfindlich von der Sekundärstruktur des Peptids ab (siehe Tab. 1.2 und Abb. 1.4). Die Zuordnung der verschiedenen Sekundärstrukturen im Amid-I-Bereich basiert auf Normalkoordinatenanalysen und der Untersuchung synthetischer Polypeptide und Proteine bekannter Struktur (Krimm & Bandekar, 1986; Goormaghtigh et al., 1994). Die Amid-II-Bande resultiert hauptsächlich aus der NH-Biegeschwingung und der CN-Streckschwingung (zwischen 1580 und 1510 cm^{-1}). Bei Messungen in D_2O kommt es zu einem H/D-Austausch und die NH-Biegeschwingung wird zunehmend geringer auf Kosten der ND-Biegeschwingung, die bei tieferen Wellenzahlen absorbiert, so daß die Amid-II-Bande ebenfalls zu tieferen Frequenzen verschoben wird. Der H/D-Austausch hat nur einen relativ geringen Einfluß auf die Amid-I-Bande (siehe Tab. 1.2).

Sekundärstruktur	Amid-I-Bande / cm^{-1}		Amid-II-Bande / cm^{-1}
	H_2O	D_2O	H_2O
Turns/Schleifen	1672 (1662 – 1682)	1671 (1653 – 1691)	
α -Helix	1654 (1648 – 1657)	1652 (1642 – 1660)	1546 (1545 – 1550)
ungeordnet	1654 (1642 – 1657)	1645 (1639 – 1654)	
β -Faltblatt	1633 (1623 – 1641) 1684 (1674 – 1695)	1630 (1615 – 1638) 1679 (1672 – 1694)	1528 (1525 – 1532)

Tab. 1.2: Zuordnung der Amid-I- und Amid-II-Banden zu Sekundärstrukturen von Peptiden und Proteinen in H_2O bzw. D_2O ; in den Klammern sind extreme Frequenzwerte angegeben (Goormaghtigh et al., 1994).

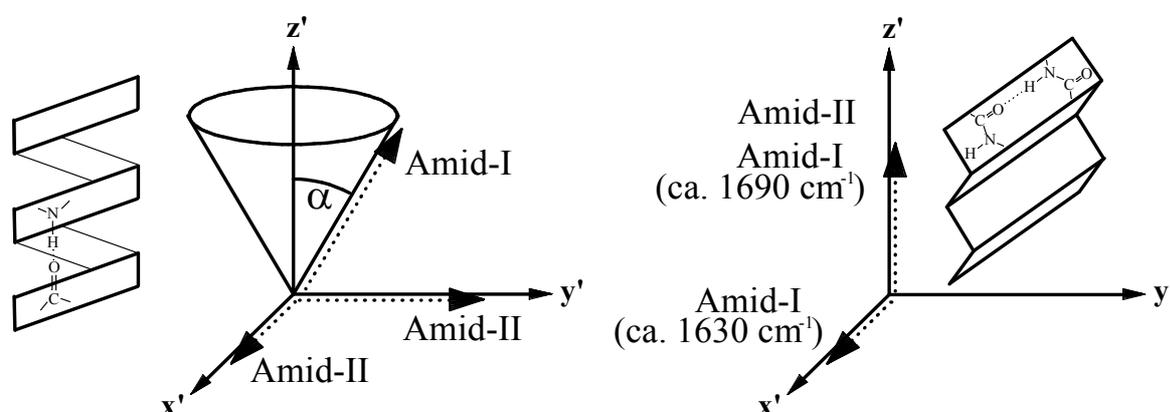


Abb. 1.4: Lage der Übergangsdipolmomente der Amid-I- bzw. Amid-II-Bande im Molekülkoordinatensystem (siehe Kap. 2.1) für eine α -Helix (links) bzw. ein β -Faltblatt (rechts) (nach Buffeteau et al., 2000).

Neben Transmissionsmessungen wurde eine Vielzahl anderer Techniken entwickelt, unter anderem Reflexionsmethoden, die z. B. den Aufwand bezüglich der Probenpräparation erheblich verringerten. Ein anderer Vorteil ist die meist zerstörungsfreie Untersuchung von Proben (Günzler & Heise, 1996). Insgesamt werden bei den Reflexionstechniken zwei Kategorien unterschieden. Bei der äußeren Reflexion wird z. B. vom Medium der Luft auf eine optisch dichtere Probe eingestrahlt (z. B. IRRAS; siehe Kap. 1.3), während bei der inneren Reflexion Wechselwirkungen der elektromagnetischen Strahlung an der Phasengrenze zwischen Probe und einem Medium mit höherem Brechungsindex beobachtet werden.

Eine der Standardmeßtechniken zur Untersuchung von Oberflächen ist die abgeschwächte Totalreflexion (ATR, attenuated total reflection). Trifft die Strahlung in einem Medium mit hohem Brechungsindex n_1 schräg auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium mit n_2 , so wird alle Strahlung in das dichtere Medium zurückreflektiert, wenn der Einfallswinkel φ_1 den Grenzwinkel der Totalreflektion übersteigt. Ein Teil der elektromagnetischen Energie dringt aber etwas in das optisch dünnere Medium ein. Wird diese Energie absorbiert, dann ergeben sich ähnliche spektrale Abhängigkeiten wie bei Transmissionsspektren. Die Eindringtiefe ist dabei abhängig von den beiden Brechungsindices, dem Einfallswinkel und der Wellenlänge der Strahlung. Verwendung als ATR-Kristall finden hierbei bestimmte Materialien, wie z. B. Germanium oder Zinkselenid mit entsprechend hohen Brechungsindices von $n = 4,0$ bzw. $n = 2,4$. Neben festen Proben können mit dieser Meßtechnik auch die optischen Konstanten von Flüssigkeiten bestimmt werden (hier im besonderen Fall von H_2O und D_2O ; Bertie et al., 1989).

Die Diffuse Reflexion wird häufig für Pulver und Oberflächen mit rauher Oberfläche verwendet. Die von der Probe diffus gestreute Strahlung wird in einem möglichst großen Raumwinkel gesammelt, wobei zwischen zwei Anteilen unterschieden wird: ein spiegelnd reflektierter Teil und ein Teil, der in die Probe eingedrungen ist, teilweise absorbiert wird und durch Streuprozesse im Innern wieder an die Oberfläche zurückkehrt. Diese beiden Reflexionseffekte sind experimentell meist nicht zu trennen.

1.3 Externe Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

Die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie, auch Reflexions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS) genannt, wurde zuerst für die Analyse von Adsorbaten auf Metalloberflächen verwendet (Horn, 1998). Dluhy & Cornell (1985) untersuchten erstmals mit der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie einen monomolekularen Oberflächenfilm an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Mendelsohn et al. (1995), Dluhy et al. (1995), sowie Mendelsohn & Flach (2002) beschreiben sowohl die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten als auch den theoretischen Hintergrund der Technik. Mit IRRAS können Informationen über die Konformation und die Orientierung von Lipidketten und die Wechselwirkungen der Lipidkopfgruppen erhalten werden. Außerdem können Sekundärstrukturen von Peptiden und Proteinen an der Luft/Wasser-Grenzfläche sowie deren Orientierung bestimmt werden.

In IRRAS-Spektren können Banden, wie in Transmissionsexperimenten, direkt mit molekularen Strukturen bzw. Konformationen korreliert werden. Die Bandenpositionen können ein wenig dazu verschoben sein, aber diese Effekte sind vernachlässigbar und sind meist anhand von Simulationen sogar nachvollziehbar (Mendelsohn et al., 1995). Die Technik erlaubt simultan die Aufnahme von IRRAS-Spektren und der π/A -Isotherme und damit die Korrelation von IR-spektroskopischen Beobachtungen mit Phasenübergängen oder Molekülflächen. Die im Verlauf der Kompression eines Lipidfilms gemessene Frequenzabnahme der konformationsempfindlichen Methylenstreckschwingungen ist direkt mit einer Zunahme der Ordnung in den Kohlenwasserstoffketten der Lipide verbunden (Mitchell & Dluhy, 1988; Hunt et al., 1989).

Durch die molekulare Ausrichtung der Moleküle an der Luft/Wasser-Grenzfläche gestattet der Einsatz von polarisierter IR-Strahlung die Bestimmung der Orientierung von Übergangsdipolmomenten in Bezug auf die Oberflächennormale.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Zielsetzung war die Etablierung und Optimierung der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) im Arbeitskreis. Dies betraf den Aufbau, die Justierung bzw. Kalibrierung des Reflexionszusatzes XA 511 der Firma Bruker. Dazu sollte eine Software zur Ansteuerung der Filmwaage und des IR-Spektrometers sowie zur Datenaufnahme entwickelt werden. Außerdem sollte das vorhandene Mathcad-Programm zur Simulation von IRRAS-Spektren und zur Berechnung von Schwingungsübergangsdipolmomenten verbessert und auf Visual Basic umgeschrieben werden, um eine Beschleunigung der Datenauswertung zu erreichen.

Mit Hilfe der IRRAS sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1.) An Mono- und Multischichten des thermotropen Flüssigkristalls 4-Cyano-4'-Octylbiphenyl (8CB) sollte der mathematische Formalismus und die experimentelle Genauigkeit der Orientierungsbestimmung überprüft werden. Dabei sollte die $C\equiv N$ -Bande ausgewertet werden, deren Übergangsmoment eindeutig parallel zur Biphenyleinheit liegt. Eine weitere Fragestellung bezog sich auf die Möglichkeit mit Hilfe der IRRAS Änderungen der Orientierungen von 8CB beim Monoschicht/Tripelschicht-Übergang festzustellen.

2.) Mit Hilfe der IRRAS sollten systematische Untersuchungen an Lipidmonoschichten durchgeführt werden und Kettenkonformation und Kettenorientierung als Funktion des Filmdrucks bzw. der Molekülfläche bestimmt werden.

3.) In Lipidgemischen sollte durch Isotopensubstitution der einen Komponente (Perdeuterierung der Ketten) es prinzipiell möglich sein, Konformation und Orientierung der Ketten beider Komponenten durch Analyse der CH_2 - bzw. der CD_2 -Banden zu bestimmen. Bei Transmissions- und ATR-Messungen ist diese Methode lange etabliert. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit diese Methode trotz der geringen CD_2 -Bandenintensitäten auch für Monoschichten anwendbar ist.

4.) Mit der IRRAS ist es möglich die Bindung von Proteinen an Monoschichten zu untersuchen. Es sollte an ausgesuchten Systemen geklärt werden, ob auch Informationen über Sekundärstrukturänderungen der Peptide bzw. Proteine quantifiziert werden können und ob winkelabhängige IRRAS-Spektren zur Aufklärung der Orientierung von Sekundärstrukturelementen herangezogen werden können.

5.) Ergänzend sollte die Fluoreszenz-Mikroskopie an der Luft/Wasser-Grenzfläche verwendet werden, mit der das makroskopische Phasenverhalten von Monoschichten beobachtet werden kann. Desweiteren sollten die Differential Scanning Calorimetry (DSC) und die Transmissions-FT-IR-Spektroskopie zur Untersuchung des Phasenverhaltens in Lösung eingesetzt werden.

2 Theorie

2.1 Molekulare Orientierung

In anisotropen Phasen ist der Zusammenhang zwischen makroskopisch meßbaren Größen und der Orientierung der Moleküle auf der mikroskopischen Ebene von besonderem Interesse. Wichtig sind die Orientierungsverteilungsfunktionen, die die Wahrscheinlichkeit beschreiben mit der ein Molekül eine bestimmte Orientierung bezüglich eines Koordinatensystems einnimmt. Diese Orientierung kann mit dem Ordnungsparameter S charakterisiert werden (Maier & Englert, 1960; Saupe & Maier, 1961):

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle, \quad (\text{Gl. 2.1})$$

wobei für alle drei Molekülachsen jeweils S_{xx} , S_{yy} und S_{zz} zugeordnet werden können, die zusammen die diagonalisierte Saupe-Ordnungsmatrix S_{ij} bilden. Der molekulare Tiltwinkel θ (siehe Abb. 2.1, links) ist definiert als Winkel zwischen der molekularen Direktorachse und der Oberflächennormalen (z -Achse). Die eckigen Klammern zeigen, daß der jeweils angegebene Winkel θ immer den Mittelwert einer Verteilung von Tiltwinkeln repräsentiert. Wenn S nicht indexiert ist, bezieht sich der Ordnungsparameter immer auf die lange Achse des Moleküls. Für den Fall der Zylindersymmetrie um die lange molekulare z' -Achse gilt $S_{xx} = S_{yy} = -S_{zz}/2$ und damit ist die Orientierung durch allein einen Ordnungsparameter bestimmt.

Eine Besonderheit von Ordnungsparametern ist, daß verschiedene Verteilungen denselben Wert für einen Ordnungsparameter ergeben können (siehe $S = 0$, Tab. 2.1).

Ordnungsparameter S	Tiltwinkel θ	Orientierung zur z -Achse
+1	0°	lange Molekülachse vollkommen parallel orientiert
-0,5	90°	lange Molekülachse vollkommen senkrecht orientiert
0	54,74°	isotrope Verteilung aller Tiltwinkel θ ODER die Orientierungsverteilung liegt um den „magischen“ Tiltwinkel 54,74°

Tab. 2.1: Zusammenhang zwischen Ordnungsparameter S , Tiltwinkel θ und Orientierung.

Betrachten wir den Fall einer nichtuniaxialen molekularen Orientierung innerhalb einer makroskopisch uniaxialen Phase, d. h. die Moleküle besitzen eine Abweichung von der axialen Symmetrie. Die makroskopische Uniaxialität bleibt durch eine Mittelung über die vorhandenen Domänenstrukturen erhalten (der Fall einer biaxialen Phase wie z. B. bei SmC-Phasen wird hier nicht behandelt). Es ergeben sich für die Komponenten des Ordnungsparametertensors $S_{xx} \neq S_{yy}$, wenn die Verteilungen der beiden kurzen Achsen (x' bzw. y') nicht identisch sind, was einer lokalen biaxialen Ordnung von Molekülachsen entspricht. Dies kann mittels eines zusätzlichen Ordnungsparameters, dem sogenannten Querordnungsparameter, ausgedrückt werden: $D = S_{xx} - S_{yy}$:

$$D = \left\langle \frac{3}{2} \sin^2 \theta \cos 2\psi \right\rangle. \quad (\text{Gl. 2.2})$$

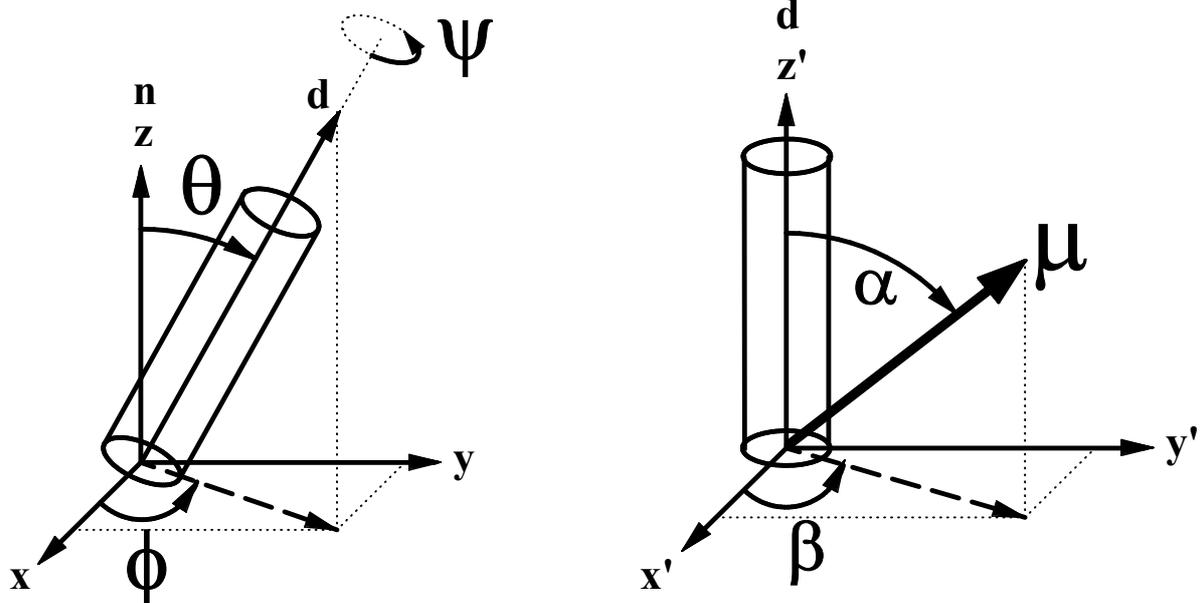


Abb. 2.1: Laborkoordinatensystem $\{x, y, z\}$ (links) und Molekülkoordinatensystem $\{x', y', z'\}$ (rechts) mit Tiltwinkel θ , Azimutwinkel ϕ und Twistwinkel ψ für den Moleküldirektor \mathbf{d} und die Polarwinkel α und β für das Übergangsdipolmoment μ .

Diese Orientierungsverteilungsfunktion hängt nun nicht nur vom Tiltwinkel θ sondern auch vom Twistwinkel ψ ab (siehe Abb. 2.1, links und Tab. 2.2). Der Einfluß des Tiltwinkels θ und des Twistwinkels ψ auf die Ordnungsparameter S und D ist im Anhang A.1 graphisch dargestellt.

Querordnungsparameter D	Twistwinkel ψ
$D > 0$	0°
$D < 0$	90°
$D = 0$	45°

Tab. 2.2: Zusammenhang zwischen Querordnungsparameter D und Twistwinkel θ .

Beide Ordnungsparameter S und D können zur Charakterisierung der Anisotropie verwendet werden. Sie können allerdings nicht aus einer einzigen Messung der makroskopischen Anisotropie gemeinsam bestimmt werden. Die Größe von D ist durch die Form des Moleküls bestimmt und beträgt normalerweise weniger als 10% von S . Lokale Biaxialität in Molekülen innerhalb einer uniaxialen Phase kann mittels spektroskopischer Techniken wie z. B. Lineardichroismus und NMR bestimmt werden (Dunmur & Toriyama, 1998).

In Lineardichroismusmessungen von Korte (1983) und Kiefer & Bauer (1989) wurde genauer auf den Querordnungsparameter (oder auch Biaxialitätsparameter) D eingegangen. Dabei konnte gezeigt werden, daß S und D durch die Analyse des Dichroismus zweier verschiedener Absorptionsbanden bestimmbar sind. Allerdings müssen die Orientierungen der einbezogenen Übergangsdipolmomente unterschiedlich und in ihrer Abhängigkeit zueinander bekannt sein.

2.2 IRRAS

Bei der verwendeten IRRAS-Apparatur (Abb. 2.2) handelt es sich um die Reflexionseinheit XA 511 von der Firma Bruker (Karlsruhe), die nach den Vorschlägen von Prof. Dr. A. Gericke (Kent, Ohio, USA, damals noch Halle/Saale) erweitert wurde. Die neuen Möglichkeiten gegenüber bisherigen IRRAS-Anlagen sind die computergesteuerte Variation des Einfallswinkels (zwischen 20 und 80°) und des Polarisators. Alle Einstellungen erfolgen dabei mit einer hohen Genauigkeit. Desweiteren wurde ein neues Filmwaagentrogkonzept umgesetzt. Mittels eines „Trog-Shuttles“ kann, ebenfalls computerkontrolliert, zwischen einem Referenz- und einem Probenrog gewechselt werden, so daß innerhalb kürzester Zeit Referenz- und Probenspektrum zur Verfügung stehen. Die beiden Tröge wurden mit Röhren miteinander gekoppelt, um in beiden eine gleiche Füllstandshöhe zu garantieren (Abb. 2.3). Weitere Einzelheiten zur Apparatur sind in Kap. 5.2.2 zu finden.

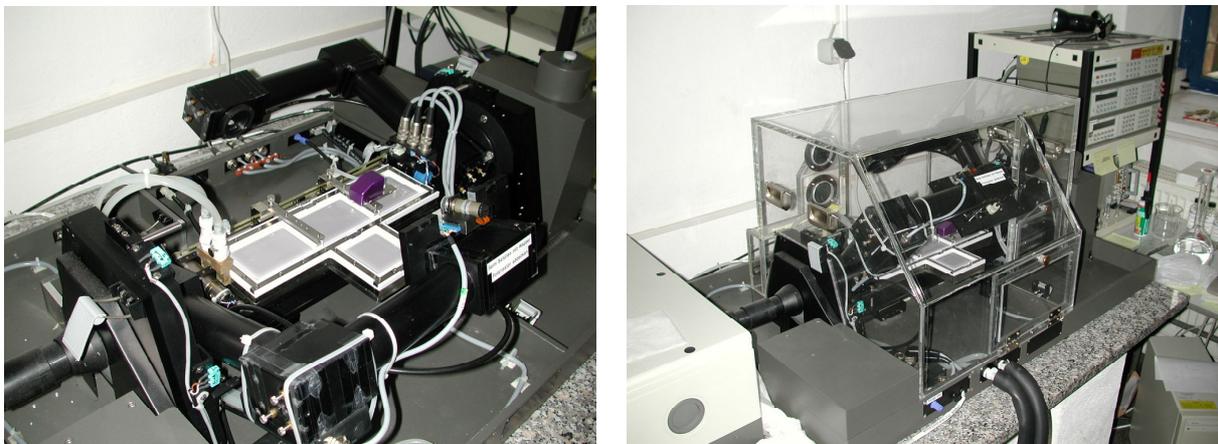


Abb. 2.2: Aufnahmen der IRRAS-Apparatur: von oben (links) und mit aufgesetztem Plexiglaskasten (rechts). In der Mitte ist das Langmuirtrogssystem auf seiner fahrbaren Bühne zu sehen. In den Bildern befindet sich links das IR-Spektrometer, von dem der IR-Strahl in die Reflexionseinheit eingekoppelt wird.

Die Intention hinter dieser „Trog-Shuttle“-Technik ist die Bewältigung der Wasserdampfproblematik in der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie. Eine kurze Berechnung mag dieses Problem verdeutlichen. Die optische Weglänge des IR-Strahles durch die Wasserdampf-atmosphäre oberhalb des Langmuirtroges ist ca. 30 cm mit einem Strahlquerschnitt von ca. 1 cm² (dies entspricht einem Volumen von ca. 30 cm³). Somit befinden sich bei Raumtemperatur ca. $1,3 \cdot 10^{19}$ Wassermoleküle im Strahlengang. Bei einer Auftrefffläche von ca. 1,5 cm² auf der Wasseroberfläche und einer Fläche pro Lipidmolekül von 65 Å² befinden sich ca. $2,3 \cdot 10^{14}$ Moleküle im Lichtfleck. Damit ergibt sich ein Verhältnis von ca. 60000 Wassermolekülen zu einem Lipidmolekül. Um die Absorptionslinien des Wasserdampfs zu eliminieren, kann man ein „Trog-Shuttle“ verwenden (Flach et al., 1994), bei dem durch die kurze zeitliche Abfolge zwischen Proben- und Referenzspektrum die Wasserdampfstörung minimiert wird. Eine andere Technik verwendet stattdessen einen Photoelastischen Modulators (PM-IRRAS, siehe Blaudez et al., 1993). Ein Optimum wäre eine Kombination aus beiden Techniken, was bei unserer Apparatur möglich wäre, aber bis jetzt nicht notwendig war.

Eine Besonderheit von IRRAS-Spektren an der Luft/Wasser-Grenzfläche sind die breiten Banden bei 3600 und 1660 cm⁻¹, die durch die unterschiedliche optische Reaktion auf die filmbedeckte und die freie Wasseroberfläche bedingt sind und auf Absorptionen von flüssigem Wasser und eventuell auch teilweise auf orientierte Wassermoleküle an der

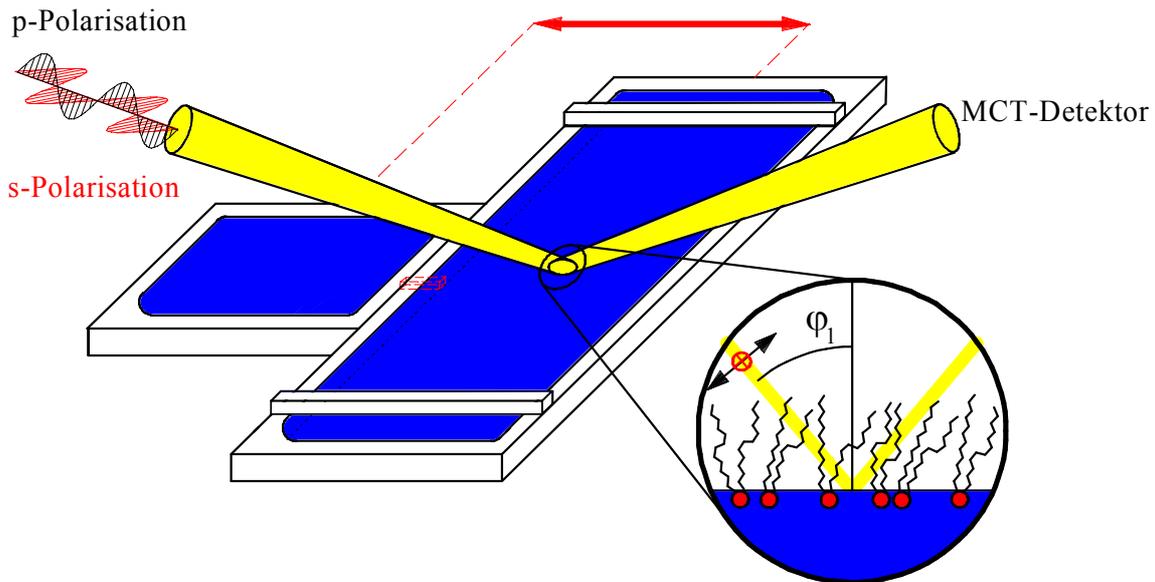


Abb. 2.3: Schema des IRRAS-Aufbaus.

Grenzfläche zurückzuführen sind (Blaudez et al., 1996; Buffeteau et al., 1999). Darauf wird in Kap. 2.2.3.2 und 3 zurückgekommen.

Um einen Einblick in diese Problematik zu bekommen ist eine genauere Auflistung der Wasserbanden, wie sie aus der ATR-Spektroskopie erhalten wurden, in Tab. 2.3 zusammengefaßt.

Um lokale Aufheizungsphänomene an der Auftrefffläche der IR-Strahlung auf die Luft/Wasser-Grenzfläche zu verhindern wurde der Einsatz von einem Bandpaßfilter vorgeschlagen (Sakai & Umemura, 1997). Dieser sollte die sehr starke Wasserabsorption oberhalb von 3000 cm^{-1} herausfiltern. Dieselben Autoren verzichteten 1 Jahr später wieder

Schwingungsmoden	H ₂ O	D ₂ O
Starke Absorptionsbande im Streckschwingungsbereich bestehend aus drei Komponenten:	3404 cm^{-1}	2504 cm^{-1}
Asymmetrische Streckschwingung ν_3	~3600 cm^{-1} (Schulter)	~2600 cm^{-1} (Schulter)
Symmetrische Streckschwingung ν_1	~3450 cm^{-1}	~2500 cm^{-1}
Oberton der Scherschwingung $2\nu_2$	~3250 cm^{-1} (Schulter)	~2400 cm^{-1} (Schulter)
Assoziationsschwingung ν_A : Kombinations- schwingung von Librations- und Scherschwingung $\nu_2 + \nu_L$	2127,5 cm^{-1}	1555,0 cm^{-1}
Scherschwingung ν_2	1643,5 cm^{-1}	1209,4 cm^{-1}
Librationen ν_L	500-800 cm^{-1}	
OH-Streckschwingung von HOD		3404 cm^{-1}
Scherschwingung von HOD		1462 cm^{-1}
Kombinationsbande $\nu_1 + \nu_2$		3840 cm^{-1}

Tab. 2.3: Zuordnung von Wasserbanden aus FT-IR-ATR-Messungen (bei 25°C, nach Venyaminov & Prendergast, 1997).

darauf, da ohne Filter ein größerer Wellenzahlbereich untersucht werden kann (Sakai & Umemura, 1998). Wen & Franses (2001) behandeln ebenfalls diese Problematik und kommen zu dem Schluß, daß ein Filter nicht relevant ist.

Bei dem Verschieben der Tröge kann auch Bewegung in den Film kommen, so daß der Film sehr wahrscheinlich nicht wieder an der gleichen Stelle bestrahlt wird wie vorher. Dies kann man auch sehen, wenn man sich Filme unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Trotz bester Abschirmung von äußeren Einflüssen ist meist noch „Bewegung“ im Film, d. h. die Domänen bewegen sich ständig auf der Oberfläche. Dies ist selbst in flüssig-kondensierten Filmen, wenn auch sehr stark eingeschränkt, beobachtet worden. Wird nun der Film durch ein „Shuttle“-System zusätzlich noch gestört, so ist es unwahrscheinlich, daß immer die gleichen Flächen des Films bestrahlt werden. So gesehen ist die Herausnahme des H₂O-Filters aus dem Strahlengang mitunter gerechtfertigt, da es nicht zu einer kontinuierlichen, lokalen Erwärmung an einer Stelle des Films kommen konnte.

2.2.1 Optisches Modell und mathematischer Formalismus

Um Informationen über Orientierungen von Molekülen in einer Monoschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu erhalten, muß eine genaue Betrachtung der Reflexions- und Absorptionseigenschaften der Strahlung an dem zugrundeliegenden Dreischichtensystem: Luft/homogener, anisotroper Film/isotrope, flüssige Subphase erfolgen (Abb. 2.4).

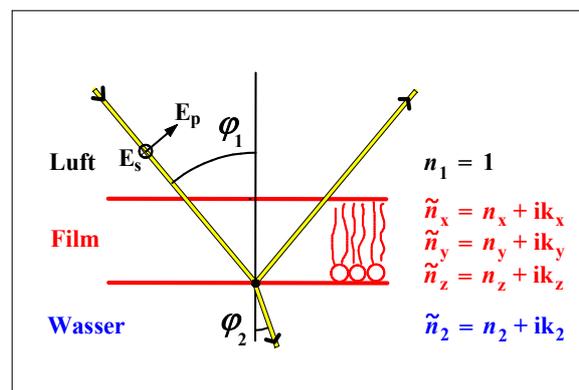


Abb. 2.4: Optische Konstanten des Dreiphasensystems: Luft, Film und Wasser.

Es gibt verschiedene optische Modelle zur Beschreibung von IRRAS-Bandenintensitäten (Mendelsohn et al., 1995), die alle ähnliche Ergebnisse liefern. In dieser Arbeit wird (wie z. B. auch bei Gericke et al., 1993 und Flach et al., 1997) auf das mathematische Modell von Kuzmin & Michailov (Kuzmin & Michailov, 1981; Kuzmin et al., 1992) zurückgegriffen.

Der komplexe Reflektionskoeffizient \tilde{r} an einer Grenzfläche zwischen 2 semiunendlichen, homogenen, isotropen Phasen, mit einer nichtabsorbierenden Phase 1 (Luft) und einer absorbierenden Phase 2 (Wasser), kann mit Hilfe der Fresnel-Gleichungen wie folgt beschrieben werden (siehe Abb. 2.4). Für s-Polarisation¹ gilt

¹ **Anmerkung:** Speziell bei der gerichteten Reflexion ist die Polarisation der elektromagnetischen Strahlung von großer Bedeutung. Zur Charakterisierung werden übereinkunftsgemäß die Buchstaben p und s eingesetzt. So befindet sich bei p-polarisierter Strahlung der elektrische Vektor in der Ebene, die von dem einfallenden und reflektierten Strahlenbündel definiert wird, und bei s-Polarisation senkrecht dazu. Wenn in dieser Arbeit der Begriff Polarisation verwendet wird, so ist damit im Zusammenhang mit IRRAS-Messungen immer die Polarisation der einfallenden IR-Strahlung gemeint (p oder s).

$$\tilde{r}_s^F = -\frac{\sin(\varphi_1 - \tilde{\varphi}_2)}{\sin(\varphi_1 + \tilde{\varphi}_2)}, \quad (\text{Gl. 2.3})$$

und für p-Polarisation

$$\tilde{r}_p^F = \frac{\tan(\varphi_1 - \tilde{\varphi}_2)}{\tan(\varphi_1 + \tilde{\varphi}_2)}, \quad (\text{Gl. 2.4})$$

mit

$$\tilde{\varphi}_2 = \arcsin \frac{\sin \varphi_1}{\tilde{n}_2}. \quad (\text{Gl. 2.5})$$

φ_1 ist der Winkel zwischen der Oberflächennormalen und dem einfallenden IR-Strahl, $\tilde{\varphi}_2$ der komplexe Winkel des gebrochenen Strahls und \tilde{n}_2 der komplexe Brechungsindex des Wassers (siehe Abb. 2.4). Die Indices F bezeichnen die Fresnel-Oberfläche, d. h. die filmfreie Wasseroberfläche. Wenn nun die Oberfläche mit einem dünnen anisotropen Film bedeckt ist, so ändert sich der Reflektionskoeffizient durch die zusätzliche Absorption des Films. Der Reflektionskoeffizient \tilde{r} berechnet sich jetzt zu:

$$\tilde{r}_s = -\frac{\sin(\varphi_1 - \tilde{\varphi}_2) - \frac{ik_0}{\tilde{n}_2} \tilde{I}_1 \sin \varphi_1}{\sin(\varphi_1 + \tilde{\varphi}_2) - \frac{ik_0}{\tilde{n}_2} \tilde{I}_1 \sin \varphi_1}, \quad (\text{Gl. 2.6})$$

$$\tilde{r}_p = \frac{\sin(\varphi_1 - \tilde{\varphi}_2) \cos(\varphi_1 + \tilde{\varphi}_2) - \frac{ik_0}{\tilde{n}_2} \sin \varphi_1 (\tilde{I}_1 \cos \varphi_1 \cos \tilde{\varphi}_2 - \tilde{I}_2 \sin \varphi_1 \sin \tilde{\varphi}_2)}{\sin(\varphi_1 + \tilde{\varphi}_2) \cos(\varphi_1 - \tilde{\varphi}_2) - \frac{ik_0}{\tilde{n}_2} \sin \varphi_1 (\tilde{I}_1 \cos \varphi_1 \cos \tilde{\varphi}_2 + \tilde{I}_2 \sin \varphi_1 \sin \tilde{\varphi}_2)}, \quad (\text{Gl. 2.7})$$

mit

$$k_0 = 2\pi / \lambda, \quad (\text{Gl. 2.8})$$

$$\tilde{I}_1 = (\tilde{n}_x^2 - \tilde{n}_2^2) d, \quad (\text{Gl. 2.9})$$

$$\tilde{I}_2 = \frac{(\tilde{n}_z^2 - \tilde{n}_2^2) d}{\tilde{n}_z^2}. \quad (\text{Gl. 2.10})$$

d ist die Schichtdicke, während \tilde{n}_x und \tilde{n}_z die komplexen Brechungsindices des Oberflächenfilms sind. Für den hier angenommenen Fall einer uniaxialen Schicht gilt zudem $\tilde{n}_x = \tilde{n}_y$.

Der Ansatz zur Berechnung der Schichtdicke d beinhaltet meist nur die Länge l des zugrundeliegenden Moleküls und seinen Tiltwinkel θ ($d = l \cos \theta$). Geht θ gegen 90° so geht die Schichtdicke gegen 0, da die Breite des Moleküls nicht berücksichtigt wurde. Darum wurde zur Berechnung von d die Breite b der Moleküle mit in die Betrachtung einbezogen. Eine Beschreibung als Kasten mit den Kantenlängen l und b wurde verworfen, da mit der Variation des Tiltwinkels zwischen 0° und 90° die Schichtdicke dabei ein Maximum durchläuft. Dies würde Probleme bei der anschließenden Tiltwinkelberechnung nach sich ziehen, da einer Schichtdicke zwei verschiedene Winkel θ zuzuordnen wären. Die Abrundung

des "Molekülrechtecks" (Abb. 2.5) bedeutet eine kontinuierliche Abnahme der Schichtdicke von l bis b mit zunehmenden Tiltwinkel θ von 0° bis 90° . Für die Schichtdicke d ergibt sich dadurch:

$$d = b + (l - b) \cos \theta . \quad (\text{Gl. 2.11})$$

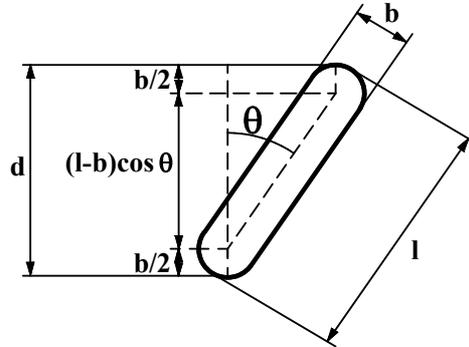


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Schichtdickenberechnung mittels der Länge l , der Breite b und des Tiltwinkels θ des Moleküls.

Die Reflektivität R_j (mit $j = s$ oder p) kann schließlich über die Multiplikation der jeweiligen Reflektionskoeffizienten \tilde{r} mit seiner komplex Konjugierten \tilde{r}^* erhalten werden:

$$R_j = \tilde{r}_j \tilde{r}_j^* . \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Für die tatsächlich gemessenen Reflektivitäten muß noch die Korrektur bezüglich der Polarisatorgüte Γ durchgeführt werden, die wellenzahlabhängig ist (Gericke et al., 1993):

$$R_p^{eff} = R_p + \Gamma(R_s - R_p), \quad (\text{Gl. 2.13})$$

$$R_s^{eff} = R_s + \Gamma(R_p - R_s), \quad (\text{Gl. 2.14})$$

mit

$$\Gamma = I_s / I . \quad (\text{Gl. 2.15})$$

Die Polarisatorgüte Γ ist das Verhältnis der Intensität der s-polarisierten Strahlung I_s zur Gesamtintensität I die den nichtidealen Polarisator passiert, wenn dieser auf p-Polarisation eingestellt ist. Damit kann die jeweilige Reflexions-Absorption RA berechnet werden:

$$RA_j^{eff} = -\log R_j^{eff} / R_j^{F,eff} . \quad (\text{Gl. 2.16})$$

Der vorliegende mathematische Formalismus kann zur Simulation eines IRRAS-Spektrums verwendet werden. Dazu bedarf es der folgenden Formeln zur Beschreibung der komplexen Brechungsindizes \tilde{n}_x und \tilde{n}_z des Films:

$$\tilde{n}_i = n_i + ik_i . \quad (\text{Gl. 2.17})$$

Der Verlauf der optischen Konstanten n_i und k_i für eine Lorentzabsorptionsbande als Funktion von $\bar{\nu}$ ist wie folgt definiert:

$$n_x(\bar{\nu}) = n_{x \max} - \frac{2\Delta k_{x \max} \gamma}{4\Delta^2 + \gamma^2}, \quad (\text{Gl. 2.18})$$

$$n_z(\bar{\nu}) = n_{z \max} - \frac{2\Delta k_{z \max} \gamma}{4\Delta^2 + \gamma^2}, \quad (\text{Gl. 2.19})$$

$$k_x(\bar{\nu}) = \frac{k_{x \max} \gamma^2}{4\Delta^2 + \gamma^2}, \quad (\text{Gl. 2.20})$$

$$k_z(\bar{\nu}) = \frac{k_{z \max} \gamma^2}{4\Delta^2 + \gamma^2}, \quad (\text{Gl. 2.21})$$

mit

$$\gamma = 2\pi c \Delta \bar{\nu}_{1/2}, \quad (\text{Gl. 2.22})$$

$$\Delta = 2\pi c (\bar{\nu} - \bar{\nu}_0). \quad (\text{Gl. 2.23})$$

c ist die Lichtgeschwindigkeit, $\bar{\nu}$ die Wellenzahl, $\bar{\nu}_0$ die Wellenzahl des Maximums der Schwingungsbande und $\Delta \bar{\nu}_{1/2}$ die Halbwertsbreite der Bande. Für die Brechungsindizes $n_{i \max}$ des Films gelten:

$$n_{x \max} = n_{ao} \sin^2 \theta + n_o \cos^2 \theta \quad (\text{Gl. 2.24})$$

$$n_{z \max} = n_{ao} \cos^2 \theta + n_o \sin^2 \theta \quad (\text{Gl. 2.25})$$

Der ordentliche und der außerordentliche Brechungsindex n_o bzw. n_{ao} sind jeweils senkrecht bzw. parallel zur Molekülachse ausgerichtet, die wiederum den Tiltwinkel θ mit der Oberflächennormalen einnimmt. Für die richtungsabhängigen Absorptionskoeffizienten $k_{i \max}$ gilt:

$$k_{\max} = k_{x \max} + k_{y \max} + k_{z \max}. \quad (\text{Gl. 2.26})$$

Der Wert des Absorptionskoeffizienten k_{\max} hängt von der Oszillatorstärke und von der Moleküldichte der Monoschicht ab; je mehr der Film komprimiert wird, um so mehr Moleküle befinden sich im IR-Strahlengang und um so größer ist k_{\max} . Bisher wurde mit dem zugrunde liegenden optischen Modell und der Verwendung der Formeln für die richtungsabhängigen Absorptionskoeffizienten nach Fraser & MacRae (1973) immer nur der Tiltwinkel θ (über den Ordnungsparameter S bzw. f) bestimmt (z. B. Flach et al., 1997). Nach dem Modell von Fraser & MacRae (1973) wird angenommen, daß die untersuchten Übergangsdipolmomente rotationssymmetrisch um die Moleküllängsachse und der Moleküldirektor rotationssymmetrisch um die Oberflächennormale verteilt sind (Beschreibung als uniaxiale Moleküle in einer uniaxialen Phase). Für die Absorptionskoeffizienten ergeben sich daraus folgende Ausdrücke (mit $k_x = k_y$):

$$k_{x \max} = k_{\max} \left(\frac{f}{2} \sin^2 \alpha + \frac{1-f}{3} \right), \quad (\text{Gl. 2.27})$$

$$k_{z \max} = k_{\max} \left(f \cos^2 \alpha + \frac{1-f}{3} \right), \quad (\text{Gl. 2.28})$$

wobei f gleichbedeutend mit dem Ordnungsparameter S ist. Der Polarwinkel α definiert das Übergangsdipolmoment μ der betrachteten Schwingung in bezug auf den Moleküldirektor (siehe Abb. 2.1, rechts).

Um das bestehende Modell zu verbessern wurde der Querordnungsparameter D eingefügt. Dadurch müssen die Absorptionskoeffizienten neu ermittelt werden und dazu wurde das Modell von Korte (1983) verwendet. Ausgehend von Koeffizienten, die von allen

drei Eulerschen Winkeln abhängig sind, wurde mit $k_x = k_y$ auf eine uniaxiale Phase approximiert. Daraus ergeben sich mitsamt den Ordnungsparametern S und D :

$$k_{x \max} = \frac{1}{3} k_{\max} \left[1 - S \left(1 - \frac{3}{2} \sin^2 \alpha \right) + \frac{1}{2} D \sin^2 \alpha \cos 2\beta \right], \quad (\text{Gl. 2.29})$$

$$k_{z \max} = \frac{1}{3} k_{\max} \left[1 + 2S \left(1 - \frac{3}{2} \sin^2 \alpha \right) - D \sin^2 \alpha \cos 2\beta \right]. \quad (\text{Gl. 2.30})$$

Die Polarwinkel α und β definieren das Übergangsdipolmoment μ der betrachteten Schwingung in bezug auf den Moleküldirektor (siehe Abb. 2.1, rechts). Für Methylenstretschwingungen in Alkylverbindungen beträgt α jeweils 90° , während für die symmetrische und die antisymmetrische Methylenstretschwingung $\beta = 0^\circ$ bzw. $\beta = 90^\circ$ ist. Für die Stretschwingung der Cyanogruppe in einem Flüssigkristall wie 4-Cyano-4'-Octylbiphenyl (8CB) ist $\alpha = 0^\circ$ und β ebenfalls 0° . In diesem Fall vereinfachen sich die Formeln (Gl. 2.29 und Gl. 2.30), da der Summand mit dem Querordnungsparameter D wegfällt ($\sin^2 \alpha = 0$) und die Gleichungen sich auf die von Fraser & MacRae reduzieren (Gl. 2.27 und Gl. 2.28).

Sind die Moleküle biaxial so ist der Anteil, den der Querordnungsparameter zu den Absorptionskoeffizienten beiträgt am größten, wenn das Übergangsdipolmoment senkrecht zur Molekülachse steht (wie z. B. bei den Methylenstretschwingungen).

Der Einfluß der Polarwinkel α und β , sowie des Tiltwinkels θ und des Twistwinkels ψ auf die Absorptionskoeffizienten $k_{i \max}$ ist im Anhang A.2 graphisch dargestellt.

Für einen Behensäuremethylesterfilm auf einer festen Unterlage konnten mittels der antisymmetrischen und der symmetrischen Methylenstretschwingungsbande Tiltwinkel von jeweils 27° bzw. 32° bestimmt werden (Pelletier et al., 2002). Die Autoren führen diesen Unterschied darauf zurück, daß die Annahme einer Zylindersymmetrie um die Kettenachse wahrscheinlich nicht korrekt ist. Eine getrennte Tiltwinkelbestimmung von Cadmiumarachidat, jeweils mittels der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ - bzw. $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ -Bande ergab nur einen kleinen Unterschied von $12,6^\circ \pm 0,5^\circ$ bzw. $11,6^\circ \pm 0,3^\circ$, wobei berücksichtigt werden sollte, daß die antisymmetrische Stretschwingung teilweise durch eine Fermi-Resonanz gestört ist und deswegen der letztere Wert genauer ist (Buffeteau et al., 1999). In einer anderen Arbeit der gleichen Gruppe wurde für Cadmiumarachidatmultischichten mittels PM-IRRAS ein Twistwinkel ψ von $46^\circ \pm 2^\circ$ gefunden (Blaudez et al., 1992). Ein Twistwinkel von 45° kann allerdings auch eine freie Rotation um die Molekülachse bedeuten (Zylindersymmetrie).

Eine uniaxiale Verteilung von Cadmiumarachidatmolekülen um die Oberflächennormale (z -Achse) konnte durch sich nicht verändernde polarisierte Transmissionspektren während der Rotation der Probe um die z -Achse nachgewiesen werden (Rabolt et al., 1983, Parikh & Allara, 1992). In einem uniaxialen Modell ist der Azimutwinkel ϕ nicht definiert und muß daher für Berechnungen auf 45° gesetzt. Wenn zum Beispiel die Packung orthorhombisch ist und die Ketten nahezu senkrecht zur Oberfläche stehen, ist es nicht möglich zwischen uniaxialer und biaxialer Orientierung zu unterscheiden (Rabolt et al., 1983). Desweiteren bringt die orthorhombische Struktur von n -Paraffinen mit zwei zueinander orthogonal stehenden Molekülen pro Einheitszelle einen mittleren Twistwinkel ψ von 45° mit sich (Tasumi & Shimanouchi, 1965).

In einer theoretischen Abhandlung über die Verwendung der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie zur Bestimmung der Orientierung der Moleküle wurde von Buontempo & Rice (1993) ebenfalls der Twistwinkel, zusätzlich zum Tiltwinkel, eingeführt und die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Intensitäten der antisymmetrischen und symmetrischen Methylenstretschwingungen simuliert.

Binder führte unter anderem für DPPC und Stearinsäure IR-Lineardichroismusmessungen über die Acylkettenordnung in lamellaren Strukturen unter Einbeziehung von Neigungswinkel und Biaxialität durch (Binder et al., 1996; Binder & Schmiedel, 1999; Binder & Kohlstrunk, 1999; Binder, 1999).

Auf dem Gebiet der „self-assembled monolayers“ (SAM) existieren viele Arbeiten, die sich mit der Beschichtung von metallischen Oberflächen, meist Gold oder Silber, mit n -Thioalkanen beschäftigen. Diese spontan aus der Lösung auf der Oberfläche gebildeten, orientierten Filme sind dicht gepackt und wurden vielfach mittels IRRAS-Techniken untersucht. Laibinis et al. (1995) fanden dabei Kettenorientierungen von ω -Alkoxy- n -alkanthiolaten mit einem Tiltwinkel θ von 26° und einem Twistwinkel ψ von 52° auf einer Goldoberfläche. Für Hexadecanthiol auf Gold wurden $\theta = 20^\circ \pm 2^\circ$ und $\psi = 49^\circ \pm 3^\circ$ bestimmt (Terril et al., 1998). Der Azimutwinkel ϕ geht dabei nicht in die Berechnungen ein, da die vorhandenen Domänen über der gesamten vorhandenen Strahlenfläche ausgemittelt werden.

2.2.2 Berechnung der Reflektivität und der Reflexions-Absorption

2.2.2.1 Berechnung von Reflektivitäts- und Reflexions-Absorptionsspektren

Die experimentellen IR-Reflektivitätsspektren $R_{\text{experimentell}}$ werden erhalten, indem das gemessene Reflektivitätsspektrum R_{Messung} durch ein Kalibrierungsspektrum R_{90° dividiert wird, das bei einem Einfallswinkel von 90° gemessen wurde (siehe Anhang A.3). Bei diesem Einfallswinkel befindet sich keine Probe im IR-Strahlengang und das Spektrum entspricht allein der optischen Antwort der optischen Komponenten des Spektrometers und der Reflexionseinheit (Meinders et al., 2001; Röseler, 1990). In Abb. 2.6 (oben) sind sowohl experimentelle IR-Reflektivitätsspektren von einem DPPC-Film (siehe Kap. 3.2.1) bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m an der Luft/Wasser-Grenzfläche als auch die Fresnelreflektivitätsspektren der reinen Wasseroberfläche dargestellt. Die Messungen wurden bei einem Einfallswinkel von 40° und mit s- bzw. p-Polarisation durchgeführt.

Es wurden Reflektivitätsspektren sowohl für eine filmbedeckte Oberfläche als auch für die Wasseroberfläche berechnet. Eine genauere Analyse des mathematischen Formalismus ergab, daß die Reflektivität des Films von der Schichtdicke des Films (definiert über die Moleküllänge l und den Neigungswinkel der Moleküle θ), den optischen Eigenschaften des Films (ordentlicher und außerordentlicher Brechungsindex n_o und n_{ao}) und dem komplexen Brechungsindex der Subphase abhängt (also sowohl dem Brechungsindex n_2 und dem Absorptionskoeffizienten k_2). Der Einfallswinkel φ_1 und die Polarisationsrichtung der Strahlung sind variierbare Parameter und die Polarisatorgüte Γ ist eine nicht beeinflussbare Größe. Da die Daten des komplexen Brechungsindex \tilde{n}_2 für Wasser bekannt sind, reduziert sich die Reflektivität der Monoschicht auf:

$$R_j(\varphi_1, \Gamma, \tilde{n}_2, \bar{\nu}) = f(d, n_o, n_{ao}, \theta). \quad (\text{Gl. 2.31})$$

Wenn zusätzlich die Absorption einer Schwingung berücksichtigt wird, kommen die Parameter hinzu, welche die Schwingungsbande charakterisieren. Für das Spektrum des Films in Abb. 2.6 (oben) wurde nur die antisymmetrische Methylenstretschwingungsbande bei 2920 cm^{-1} mit den für DPPC charakteristischen Parametern simuliert (siehe auch Tab. 3.1): Länge und Breite der Kohlenwasserstoffketten $l = 2,2 \text{ nm}$ bzw. $b = 0,5 \text{ nm}$; Tiltwinkel $\theta = 27^\circ$; Twistwinkel $\psi = 45^\circ$; Polarwinkel $\alpha = 90^\circ$; Absorptionskoeffizient $k_{\text{max}} = 0,6$; Halbwertsbreite der Bande $\Delta\bar{\nu}_{1/2} = 15 \text{ cm}^{-1}$. Die Brechungsindices $n_o = n_{ao} = 1,41$ (Flach et al., 1997) wurden für den gesamten Wellenzahlbereich verwendet und die Polarisatorgüte Γ wurde ebenfalls auf

den konstanten Wert 0,018 gesetzt. Für die Berechnung des Reflektivitätsspektrums des Films über den gesamten Wellenzahlbereich wurde statt der Länge der Kohlenwasserstoffketten die Moleküllänge $l = 3$ nm verwendet. Zu diesem Filmspektrum wurde die Methylenstreckschwingungsbande addiert.

Die experimentellen Spektren stimmen relativ gut mit den berechneten überein. Typisch für die Reflexionsspektroskopie sind die ableitungssähnlichen Spektrenformen im Bereich der

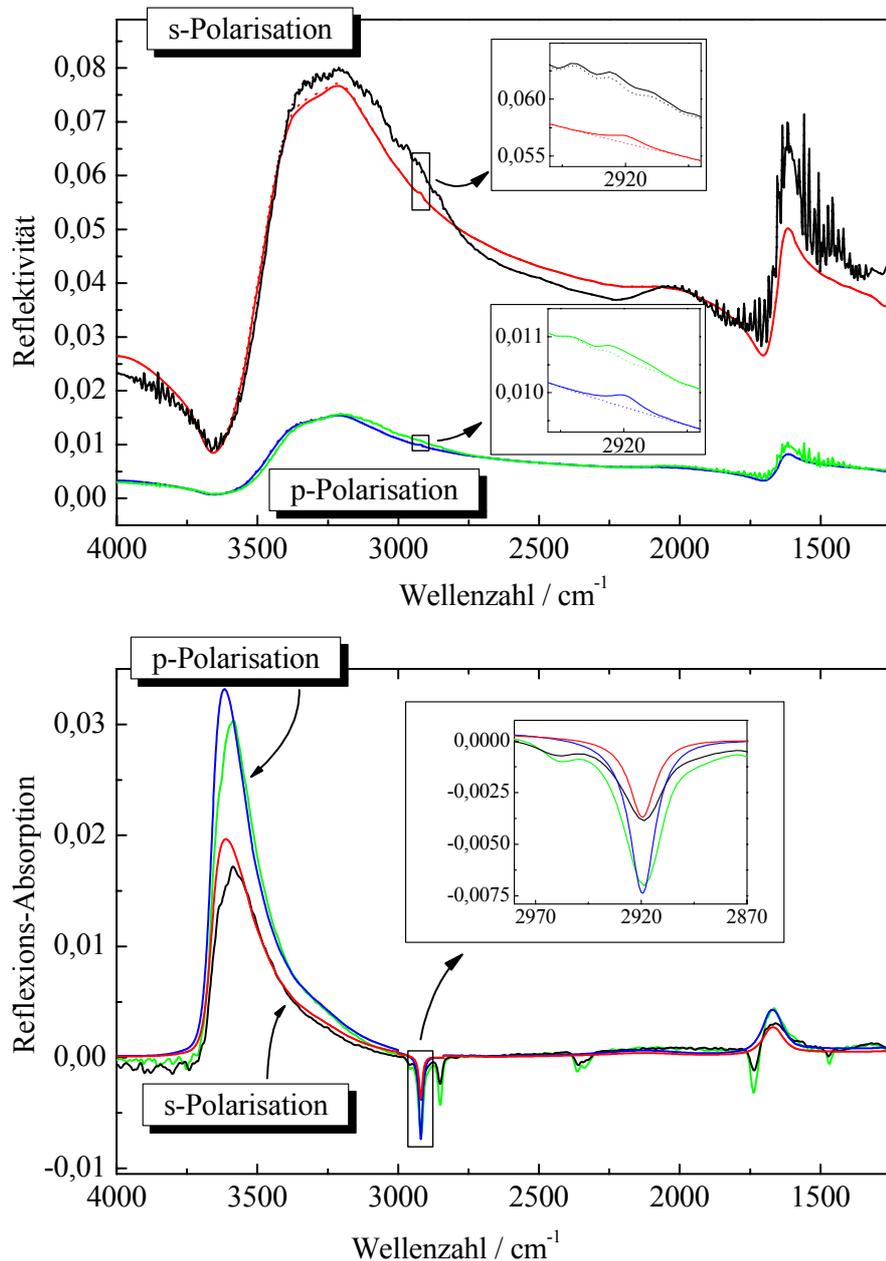


Abb. 2.6: Experimentelle und berechnete IR-Reflektivitätsspektren von DPPC und der reinen Wasseroberfläche (oben), sowie experimentelle und berechnete IRRAS-Spektren von DPPC auf H₂O (unten) bei einem Einfallswinkel von 40°. s-Polarisation: experimentelle (—) bzw. berechnete (—) Spektren. p-Polarisation: experimentelle (—) bzw. berechnete (—) Spektren. Für die berechneten Filmspektren wurde nur die $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Bande simuliert (siehe Text). Die jeweiligen Reflektivitätsspektren der reinen Wasseroberfläche sind gepunktet (····) gezeichnet. In den Insets wurde der Bereich der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Bande vergrößert dargestellt. Die CO₂-Banden in den experimentellen Reflektivitätsspektren wurden maskiert.

Wasserabsorption. Die Bande bei ca. 3500 cm^{-1} entspricht der OH-Streckschwingung und bei ca. 1650 cm^{-1} der H_2O -Scherschwungung des Wassers der Subphase. Die Spektren der Messungen mit s-Polarisation besitzen eine größere Intensität als die Spektren mit p-Polarisation. In den vergrößerten Ausschnitten ist die Erhöhung der Reflektivität im Bereich der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Bande im Vergleich zur Wasseroberfläche zu sehen.

Aus den Reflektivitätsspektren wurden die Reflexions-Absorptionsspektren mit $-\log(R/R_0)$ erhalten, wobei R die Reflektivität der filmbedeckten Wasseroberfläche und R_0 die Reflektivität der filmfreien Oberfläche ist (Abb. 2.6, unten). Während in den IR-Reflektivitätsspektren die Absorptionsbanden des Wasserdampfs sehr intensiv sind, werden diese in den Reflexions-Absorptionsspektren vollkommen eliminiert. Die OH-Streckschwingungsbande und die H_2O -Scherschwingungsbande in den experimentellen Spektren werden relativ gut durch die Simulation wiedergegeben und die experimentellen Methylenstreckschwingungsbanden stimmen sehr gut mit den simulierten Banden überein.

2.2.2.2 Berechnung der einfallswinkelabhängigen Reflektivität und Reflexions-Absorption

Trägt man die Intensität der Reflektivität bzw. der Reflexions-Absorption (z. B. der antisymmetrischen Methylenstreckschwingungsbande) gegen den Einfallswinkel φ_1 auf so erhält man die Darstellung in Abb. 2.7 (siehe Born, 1981). Die Reflektivität von p-polarisierter Strahlung hat ein Minimum beim Brewsterwinkel, der vom Brechungsindex der Subphase n_2 abhängt ($\varphi_1 = \arctan(n_2(\bar{\nu})/n_1)$). Bei jedem Polarisator kommt es zu einem kleinen, zusätzlichen Durchtritt von Strahlung mit unerwünschter Polarisation. Bei Messungen mit p-Polarisation in der Nähe des Brewsterwinkels ($\pm 15^\circ$) führt der Durchtritt

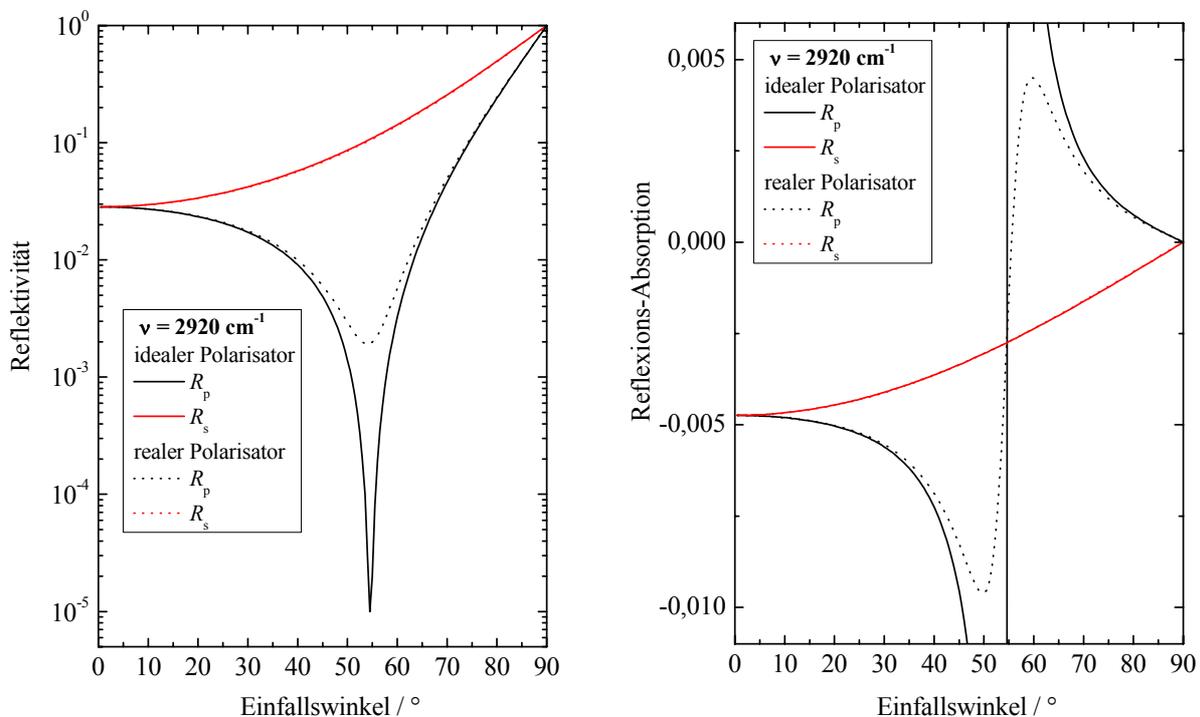


Abb. 2.7: Berechnete Reflektivität/Einfallswinkel- bzw. Reflexions-Absorption/Einfallswinkel-Diagramme (links bzw. rechts) mit p- und s-polarisierter Strahlung für die $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Bande bei $\nu = 2920\text{ cm}^{-1}$ auf H_2O ($\theta = 27^\circ$, $\psi = 45^\circ$, $\alpha = 90^\circ$, $k_{\text{max}} = 0,6$). Für die Kurven mit einem realen Polarisator wurde eine Polarisatorgüte $\Gamma = 0,018$, für einen idealen Polarisator $\Gamma = 0$ verwendet. Der Brewsterwinkel ist $\varphi_1 = \arctan(n_2/n_1) = \arctan(1,402/1) = 54,5^\circ$ (siehe Bertie et al., 1989).

von zusätzlicher s-polarisierter Strahlung zu einer starken Beeinflussung der gemessenen Intensitäten. Deshalb muß für alle Berechnungen die Güte des Polarisators Γ (siehe Gl. 2.15) mit einbezogen werden (Flach et al., 1997). In Abb. 2.7 (links, gestrichelte Reflektivitätskurven) ist die Reflektivität R mit der Polarisatorgüte $\Gamma = 0,018$ berechnet worden und deren Einfluß ist auch in der Reflexions-Absorption zu sehen (Abb. 2.7, rechts, gestrichelte Kurven).

Bei einer IRRAS-Bande kommt es in der Nähe des Brewsterwinkels bei Messungen mit p-Polarisation zu einem Intensitätsanstieg und bei dem Brewsterwinkel selbst zu einem Vorzeichenwechsel der Intensität (Abb. 2.7, rechts und Abb. 2.8). Aufgrund der großen Änderungen in diesem Bereich können hier am genauesten Informationen über die Orientierung der Moleküle erhalten werden, wobei zu beachten ist, daß aufgrund der sehr geringen Reflektivität (Abb. 2.7, links) auch das Rauschen in den Spektren zunimmt und damit die Meßunsicherheit steigt. Die Reflexions-Absorptionswerte können positiv oder negativ sein, je nach der Polarisation des einfallenden IR-Strahls, der Orientierung des Übergangsdipolmomentes der betrachteten Schwingung und der Relation zwischen Einfallswinkel und Brewsterwinkel.

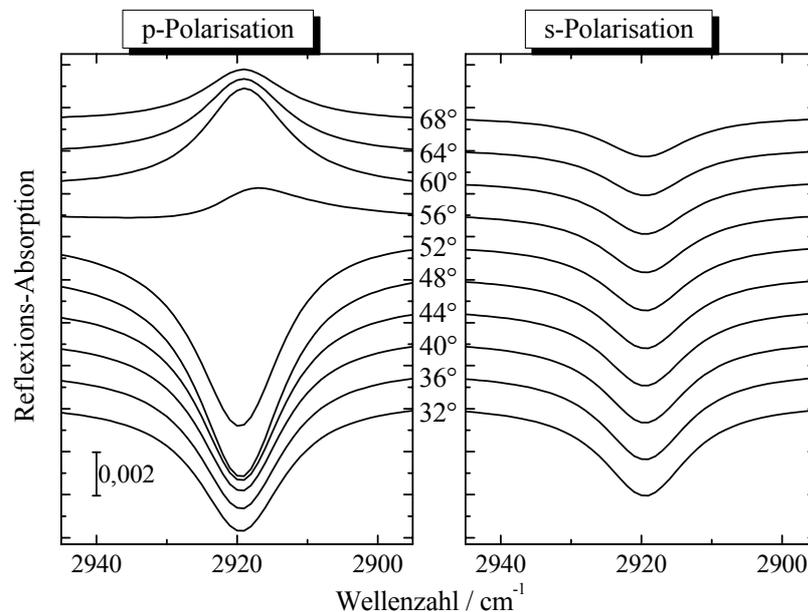


Abb. 2.8: Berechnete IRRAS-Spektren der $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ -Bande bei $\nu_0 = 2920 \text{ cm}^{-1}$ auf H_2O für verschiedene Einfallswinkel φ_1 (32° bis 68°) und p- bzw. s-Polarisation ($\theta = 27^\circ$; $\psi = 45^\circ$; $\alpha = 90^\circ$; $k_{\max} = 0,6$; $\Gamma = 0,018$). Die Spektren wurden zur besseren Übersicht gegeneinander verschoben.

2.2.3 Simulationen

2.2.3.1 Bandensimulation und Tiltwinkelberechnung

Der im vorigen Kapitel beschriebene mathematische Formalismus erlaubt es anhand von experimentellen Daten, die Orientierung von Molekülen an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu bestimmen. Es ist das Verhältnis der Intensitäten der Banden bei s- und p-Polarisation und im besonderen die Krümmung der Kurve der Bandenintensität mit p-Polarisation in Abhängigkeit vom Einfallswinkel φ_1 , die durch die Anisotropie der optischen Konstanten bestimmt sind und welche die Bestimmung der Orientierung ermöglichen.

Die experimentellen Daten (z. B. die Intensitäten der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ - und $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ -Banden bzw. $\nu_{\text{as}}(\text{CD}_2)$ - und $\nu_{\text{s}}(\text{CD}_2)$ -Banden) wurden mit berechneten IRRAS-Bandenintensitäten verglichen und die Abweichungen mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate minimiert, und somit die Orientierung der Moleküle bestimmt. Man erhält neben dem Tiltwinkel θ und dem Twistwinkel ψ auch die Absorptionskoeffizienten k_{max} der Schwingungen:

$$\chi^2(\theta, \psi, k_{\text{max}as}, k_{\text{max}s}, \Gamma) = \frac{1}{N_p + N_s} \sum_j^{N_p} \sum_j^{N_s} (RA_j^{\text{exp}} - RA_j^{\text{calc}})^2, \quad (\text{Gl. 2.32})$$

mit den fest vorgegebenen Werten von $\bar{\nu}_0$, $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$, l , b , α_{as} , β_{as} , α_{s} , β_{s} , den Brechungsindices n_2 , n_{ao} und n_o und den Absorptionskoeffizienten k_2 . Die Summe der kleinsten Fehlerquadrate χ^2 wurde auf die Gesamtanzahl ($N_p + N_s$) der verwendeten Spektren mit p- bzw. s-Polarisation normiert. Variiert wurden der Einfallswinkel φ_1 und der Polarisationszustand. Nachdem die optimalen Werte für Γ ermittelt wurden ($\Gamma(\nu(\text{CH}_2)) = 0,018$ bzw. $\Gamma(\nu(\text{CD}_2)) = 0,015$), konnten diese ebenfalls festgelegt werden. Wenn nur der Tiltwinkel θ berechnet werden sollte, wurde der Twistwinkel ψ auf 45° gesetzt.

Die Genauigkeit der erhaltenen Orientierungswinkel liegt für den Tiltwinkel θ und den Twistwinkel ψ zwischen $\pm 2^\circ$ bzw. $\pm 3^\circ$. Untersucht man allerdings Gemische von einem Lipid mit CH_2 -Ketten und einem anderen mit CD_2 -Ketten, so ist aufgrund der reduzierten, auswertbaren Intensitäten ein Fehler in den Orientierungswinkeln von mindestens $\pm 3^\circ$ zu veranschlagen. Insbesondere gilt für den Twistwinkel ψ , daß bei einer größeren Abweichung vom Winkel von 45° der Fehler auf $\pm 4^\circ$ bis $\pm 5^\circ$ ansteigen kann. Außerdem ist zu beachten, daß es bei kaum geneigten Molekülen ($\theta \rightarrow 0^\circ$) nicht mehr möglich ist, zwischen uniaxialer und biaxialer Orientierung zu unterscheiden (Rabolt et al., 1983).

Bei der Betrachtung der Orientierung der Acylketten von Lipiden ist zu berücksichtigen, daß je Molekül zwei Kohlenwasserstoffketten vorhanden sind. Dies bedeutet, daß die erhaltenen Parameter eine Mittelung über diese beiden Ketten sind. Dies gilt sowohl für den Tiltwinkel θ , als auch für den Twistwinkel ψ . Sollten die beiden Ketten z. B. gegeneinander um einen Winkel von 90° verdreht sein, wie es z. B. bei einer orthorhombischen Packung zu beobachten ist, dann würde die Simulation als eine Mittelung einen Twistwinkel ψ von 45° errechnen (siehe auch Blaudez et al., 1992). Dieser Wert kann allerdings auch bedeuten, daß die Acylketten eine zylindrische Rotationssymmetrie um ihre Moleküllängsachse besitzen. Eine Möglichkeit diese Mittelung zu umgehen, wäre die Substitution einer Acylkette mit einer perdeuterierten Acylkette, worauf in Kap. 3.2.1 näher eingegangen wird. Auch von Flach et al. (2001) wurde dieser Ansatz gewählt, im konkreten Fall mit einem gemischt substituierten Ceramid.

2.2.3.1.1 DPPC- d_{62}

Als Beispiel sei die Bestimmung der Orientierung der Fettsäureketten von DPPC- d_{62} (1,2-Diperdeuteropalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m angeführt (weitere Informationen über das Molekül sind in Kap. 3.2.1 zu finden). Nach der Messung von IRRAS-Spektren in s- und p-Polarisation in Abhängigkeit vom Einfallswinkel φ_1 wurden die maximalen Bandenintensitäten der symmetrischen und antisymmetrischen CD_2 -Methylenstretschwingungsbanden gegen den Einfallswinkel φ_1 aufgetragen. Das Simulationsprogramm berechnet anhand der vorgegebenen Parameter die Intensitäten der IRRAS-Banden als Funktion von Polarisationsrichtung und Einfallswinkel φ_1 (der Vergleich zwischen einigen experimentellen und berechneten Spektren ist im Anhang A.4 dargestellt). Dann werden die experimentellen und berechneten Bandenintensitäten miteinander verglichen. Das nach der Fehlerminimierung erhaltene Ergebnis ist in Abb. 2.9

zu sehen, mit den folgenden ermittelten Parametern: $\theta = 28^\circ$, $\psi = 43^\circ$, $k_{\max \text{ as}} = 0,307$ und $k_{\max \text{ s}} = 0,222$ ($\chi^2 = 4,03 \cdot 10^{-9}$). Der ermittelte Twistwinkel von 43° deutet an, daß der Ordnungsparameter D keinen großen Einfluß auf die Simulation hat, denn die Berechnung mit einem festgesetzten Twistwinkel auf 45° , was den Querordnungsparameter D eliminiert, ergab nur geringfügig veränderte Werte: $\theta = 28^\circ$, $k_{\max \text{ as}} = 0,303$ und $k_{\max \text{ s}} = 0,225$ ($\chi^2 = 4,11 \cdot 10^{-9}$).

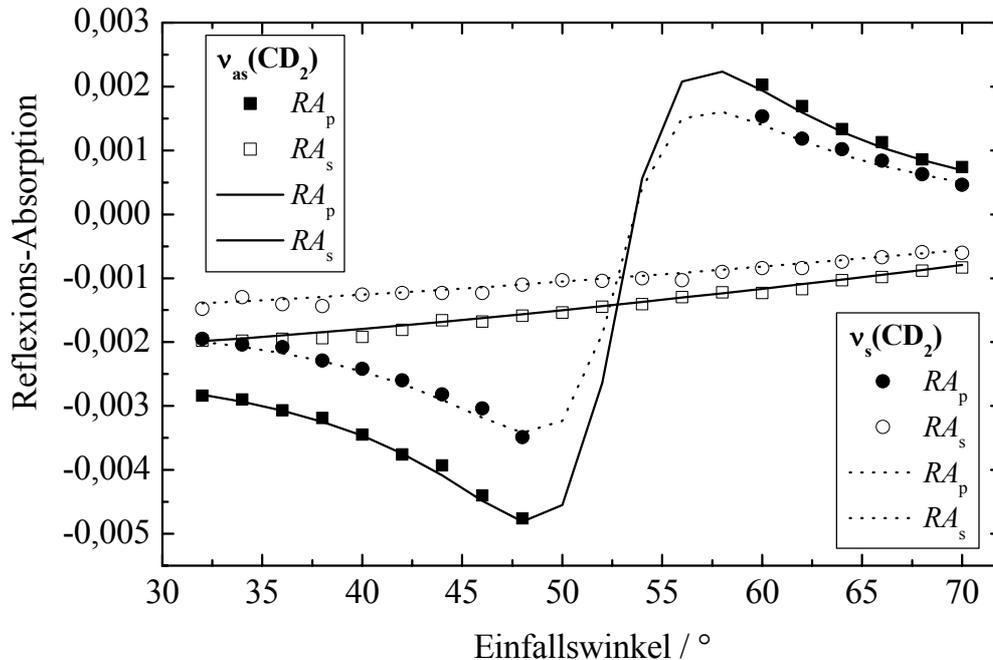


Abb. 2.9: Reflexions-Absorption/Einfallswinkel-Diagramm von DPPC-d₆₂, in dem die Punkte die experimentell ermittelten Bandenintensitäten sind und die durchgezogenen Linien die mit den am besten passenden Parametern berechneten Bandenintensitäten.

2.2.3.1.2 C16-1-BMP

Andere Ergebnisse erhält man für Bis-(1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-)phosphat (C16-1-BMP, siehe Kap. 3.2.3). Die Berechnung der Orientierungen ergibt hier für einen Film bei ca. 43,6 mN/m folgende Werte (siehe auch Abb. 2.10; gemittelte Daten mehrerer Filme sind in Tab. 3.7 dargestellt):

$$S_{\theta} \text{ und } D_{\theta\psi}: \quad \chi^2 = 3,65 \cdot 10^{-8} \quad \theta = 29^\circ \quad \psi = 61^\circ \quad k_{\max \text{ as}} = 0,697 \quad k_{\max \text{ s}} = 0,488$$

$$S_{\theta}: \quad \chi^2 = 5,59 \cdot 10^{-8} \quad \theta = 25^\circ \quad k_{\max \text{ as}} = 0,718 \quad k_{\max \text{ s}} = 0,401$$

Ist der Querordnungsparameter zugeschaltet, so erhält man für ψ einen Wert von 61° , was eine sehr große Abweichung zum rotationssymmetrischen Wert von 45° ist. Zugleich hat der Tiltwinkel einen um 4° höheren Wert, als in der Simulation ohne den Querordnungsparameter D . Auch das unterschiedliche Intensitätsverhältnis der antisymmetrischen bzw. symmetrischen Methylenstretschwingungsbande, hier charakterisiert durch die Absorptionskoeffizienten ist auffällig. Eine mögliche Erklärung ist, daß das Molekül beim Komprimieren des Films sich nicht weiter aufrichten kann, wodurch eine Verdrehung seiner Kohlenwasserstoffketten erzeugt wird.

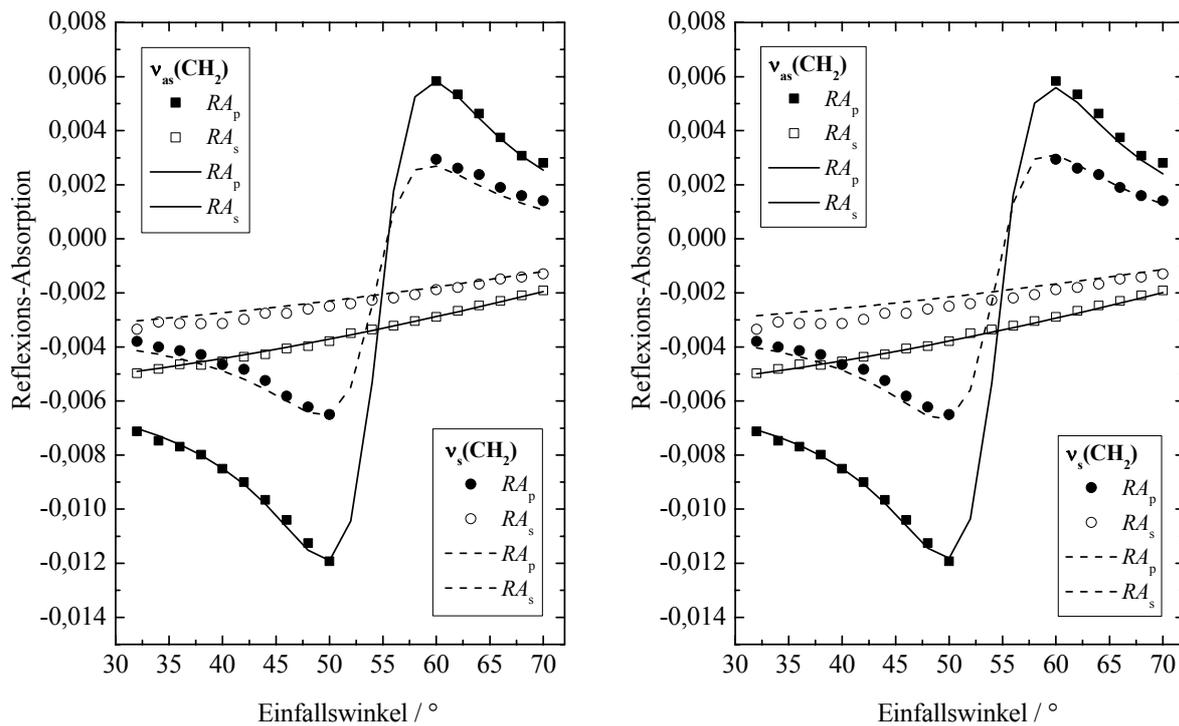


Abb. 2.10: Reflexions-Absorption/Einfallswinkel-Diagramm von C16-1-BMP mit experimentellen (Punkte) und simulierten (Linien) Bandenintensitätswerten. Tilt- und Twistwinkelanpassung: $\chi^2 = 3,65 \cdot 10^{-8}$, $\theta = 29^\circ$, $\psi = 61^\circ$, $k_{\max \text{ as}} = 0,697$ und $k_{\max \text{ s}} = 0,488$ (links); alleinige Tiltwinkelanpassung: $\chi^2 = 5,59 \cdot 10^{-8}$, $\theta = 25^\circ$, $k_{\max \text{ as}} = 0,718$ und $k_{\max \text{ s}} = 0,401$ (rechts).

2.2.3.2 Basisliniensimulation

Variiert man die optischen Konstanten des Films (n_o und n_{ao}) bei festem Einfallswinkel φ_1 , der Polarisation der IR-Strahlung, des Tiltwinkels θ , der Polarisatorgüte Γ und der Schichtdicke d , so erhält man deutlich unterscheidbare IRRAS-Spektren (Abb. 2.11, links). Erhöht man zudem noch die Schichtdicke sehr stark, so erhält die OH-Streckschwingungsbande eine dispersive Form, während die H₂O-Scherschwingungsbande keine Veränderung zeigt (Abb. 2.11, rechts). Ein ähnliches Verhalten wurde von Meinders et al. (2001) bei IRRAS-Untersuchungen von Filmen des Proteins β -Casein gefunden. Es wurde konzentrationsabhängig (und damit schichtdickenabhängig) eine Veränderung der OH-Streckschwingungsbande beobachtet, die mit einem Mehrschichtenmodell angepaßt wurde. Allerdings wurde von Meinders et al. (2001) nicht ein unlöslicher Grenzflächenfilm untersucht, sondern eine hochkonzentrierte Proteinlösung, so daß statt des komplexen Brechungsindex \tilde{n}_2 des Wassers, ein neuer für die Lösung gefunden werden mußte. Verwendeten die Autoren eine verdünnte Lösung, so hatte die Basislinie der IRRAS-Spektren wieder die normale Form, die mit einem monomolekularen Film auf einer homogenen Lösung angenähert wurde.

2.2.3.2.1 DPPC-d₆₂

Die weiteren Möglichkeiten der Basisliniensimulation seien anhand der IRRAS-Spektren von DPPC-d₆₂ demonstriert. Spektrale Parameter für die Berechnung waren dabei der Einfallswinkel ($\varphi_1 = 40^\circ$ bzw. 60°) die Polarisation der IR-Strahlung (p bzw. s), der Tiltwinkel ($\theta = 30^\circ$), der Twistwinkel ($\psi = 45^\circ$), die Gesamtlänge des Moleküls ($l = 3$ nm; hier ist nicht die Länge der Kohlenwasserstoffketten verlangt), die Subphase (H₂O: mit den

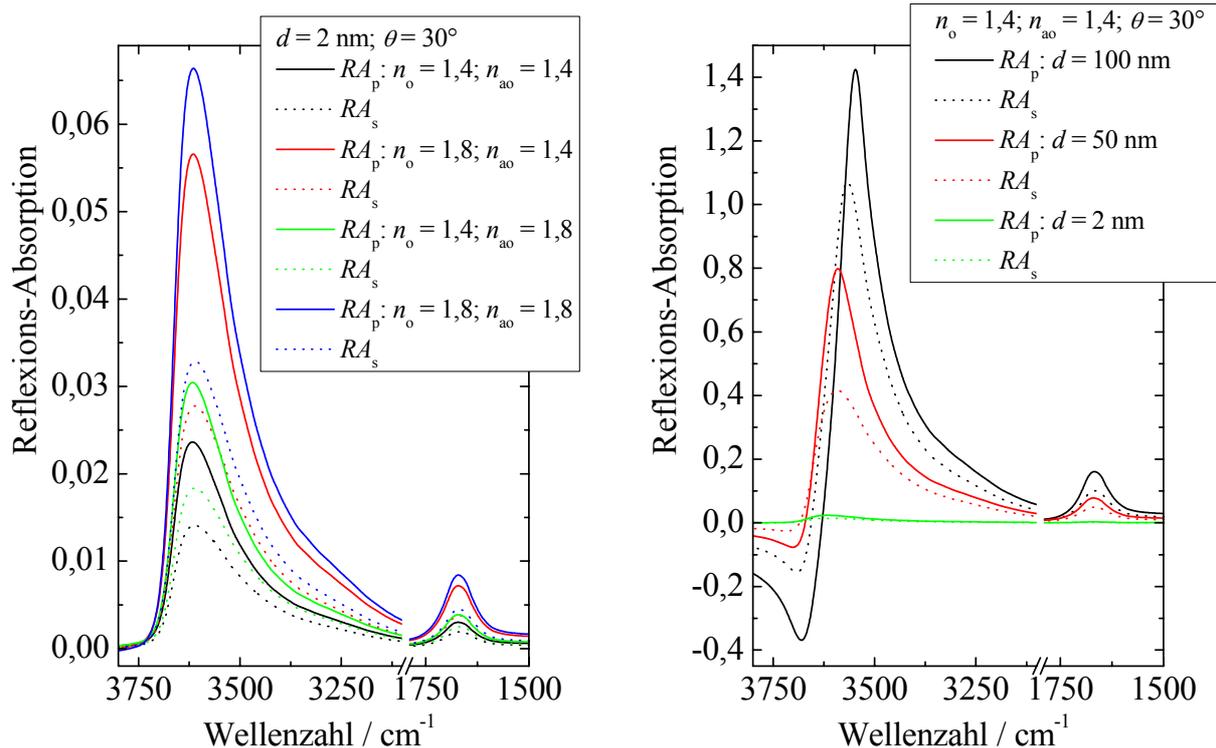


Abb. 2.11: Simulation von Reflexions-Absorptions-Spektren: Variation der Brechungsindizes n_o und n_{ao} (links), respektive Variation der Schichtdicke d (rechts) bei einem Einfallswinkel $\varphi_1 = 40^\circ$, p- bzw. s-Polarisation, einem Tiltwinkel $\theta = 30^\circ$ und einer angenommenen Polarisatorgüte $\Gamma = 0,017$.

dazugehörigen Brechungsindizes n_2 und Absorptionskoeffizienten k_2 über den gesamten Wellenzahlbereich; siehe Bertie et al., 1989) und die optischen Konstanten des Films ($n_{ao} = n_o = 1,41$; siehe Flach et al., 1997). Obwohl die Polarisatorgüte Γ eigentlich von der Wellenzahl abhängig ist, wurde sie hier auf 0,017 gesetzt. Die Simulation erfolgte für den Wellenzahlbereich von 1250 bis 4000 cm^{-1} . Die experimentellen IRRAS-Spektren wurden mit der jeweiligen simulierten Basislinie überlagert (Abb. 2.12). Anhand dieser Abbildung lassen sich mehrere Feststellungen machen, die generell auf alle IRRAS-Spektren übertragbar sind:

Alle Wasserbanden (die OH-Streckschwingung bei ca. 3600 cm^{-1} , die Assoziationsbande bei ca. 2140 cm^{-1} und die H₂O-Scherschwingung bei ca. 1650 cm^{-1}) wurden in den Simulationen sehr gut reproduziert (••••). Bei einem Einfallswinkel von 40° mit s-polarisierter Strahlung wurde noch eine weitere Basislinie (----) mit einer kleineren Schichtdicke simuliert. Dafür wurde eine Moleküllänge von 2,5 statt 3 nm angenommen und die Simulation zeigt im OH-Streckschwingungsbereich niedrigere Intensitätswerte als das entsprechende experimentelle IRRAS-Spektrum.

Bei den OH-Streckschwingungsbanden der experimentellen Spektren ist zu berücksichtigen, daß oberhalb von ca. 3500 cm^{-1} die zugrundeliegenden Reflektivitätsspektren einen sehr starken Intensitätsrückgang haben und daher die resultierenden IRRAS-Spektren von der Güte her abnehmen und das Signal/Rausch-Verhältnis abnimmt. Besonders gut kann man dies in Abb. 2.13 erkennen. Dort sind neben den ursprünglichen, experimentellen Spektren die um die Basislinie korrigierten IRRAS-Spektren dargestellt, die oberhalb von 3500 cm^{-1} starke Abweichungen von der eigentlich erwarteten Nulllinie zeigen. Allerdings könnten diese Abweichungen auch von dem Hydratwasser in den Lipidkopfgruppen herrühren, dessen spektroskopische Eigenschaften gegenüber dem des freien Wassers verändert sind.

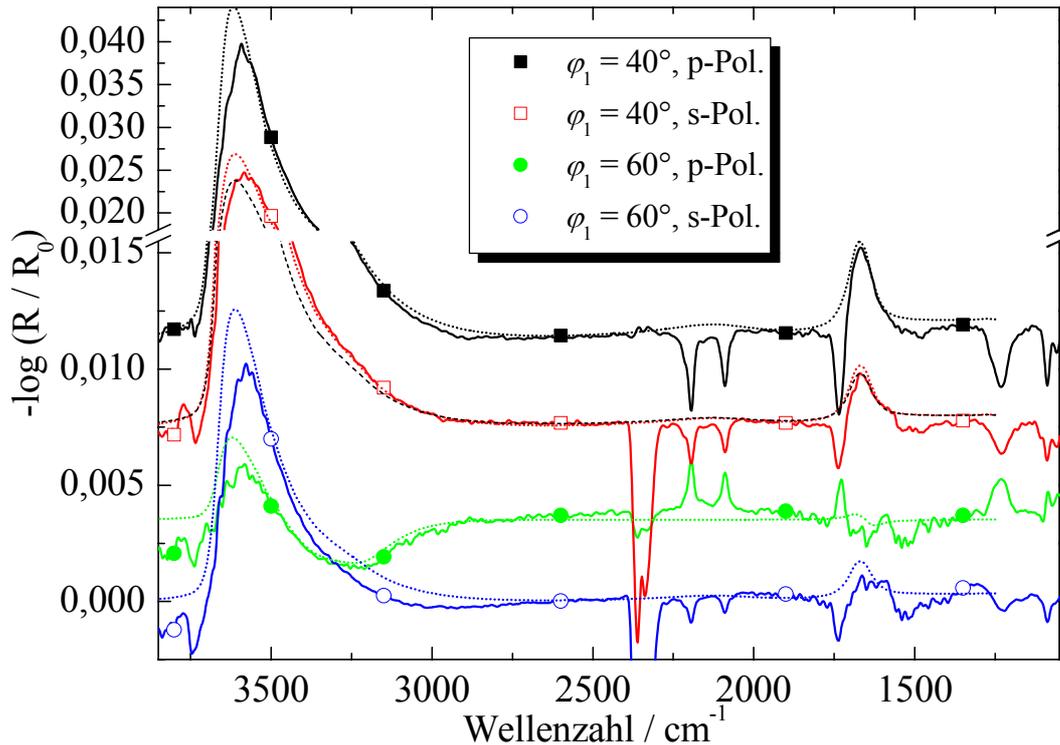


Abb. 2.12: Simulation von IRRAS-Basislinien an dem Beispiel DPPC-d₆₂: (—) experimentelle IRRAS-Spektren, (.....) berechneten Basislinien. Die Spektren sind vertikal gegeneinander verschoben, um sie besser vergleichen zu können. Bei den beiden Spektren mit einem 40°-Einfallswinkel und s-Polarisation ist noch eine weitere Basisliniensimulation (---) mit einer anderen effektiven Schichtdicke als Vergleich eingezeichnet (Einzelheiten dazu siehe Text).

Die Berücksichtigung der Assoziationsbande des Wassers bei ca. 2125 cm⁻¹ ist für die Auswertung von CD₂-Intensitäten wie hier für DPPC-d₆₂ sehr wichtig. Betrachtet man nämlich die um die Basislinie korrigierten IRRAS-Spektren im Vergleich zu den Originalen kann man deutlich einen Intensitätsunterschied ausmachen. Bei dem mit p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° gemessenen IRRAS-Spektrum (—) macht dies eine Intensitätszunahme für die korrigierte $\nu_{\text{as}}(\text{CD}_2)$ - bzw. $\nu_{\text{s}}(\text{CD}_2)$ -Bande von 8 bzw. 14 % aus. Die Basislinienkorrektur dieser Banden (und auch der $\nu(\text{CH}_2)$ -Banden) wurde deshalb standardmäßig vor der eigentlichen Intensitätsauswertung durchgeführt (siehe Kap. 5.2.2.2). Ähnliche Betrachtungen gelten auch für die Auswertung der Intensitäten der Carbonylbande (oder bei Peptiden: die Amid-I-Bande), weil hier die H₂O-Scherschwingungsbande überlagert ist.

In den Spektren selbst kann es zu Basislinienabweichungen kommen, wie in der Abbildung des mit s-Polarisation gemessenen IRRAS-Spektrums mit einem Einfallswinkel von 60° (—) oberhalb von 2750 cm⁻¹ zu sehen ist. Gerade im Hinblick auf eine eventuell quantitative Auswertung der OH-Streckschwingungsbande wäre hierauf in Zukunft besonders zu achten.

Bei den beiden unteren Spektren (—, —) ist im Bereich zwischen 1400 und 1800 cm⁻¹ als Auswirkung des immer präsenten Wasserdampfs dessen Rotationsschwingungsspektrum mit dem IRRAS-Spektrum überlagert. Dies läßt sich leider nicht immer vermeiden. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung der PM-IRRAS-Methode (Blaudez et al., 1993).

Eine Besonderheit von IRRAS-Spektren mit p-Polarisation und einem Einfallswinkel oberhalb des Brewsterwinkels ist deren Basislinienverlauf (—), da er von allen anderen

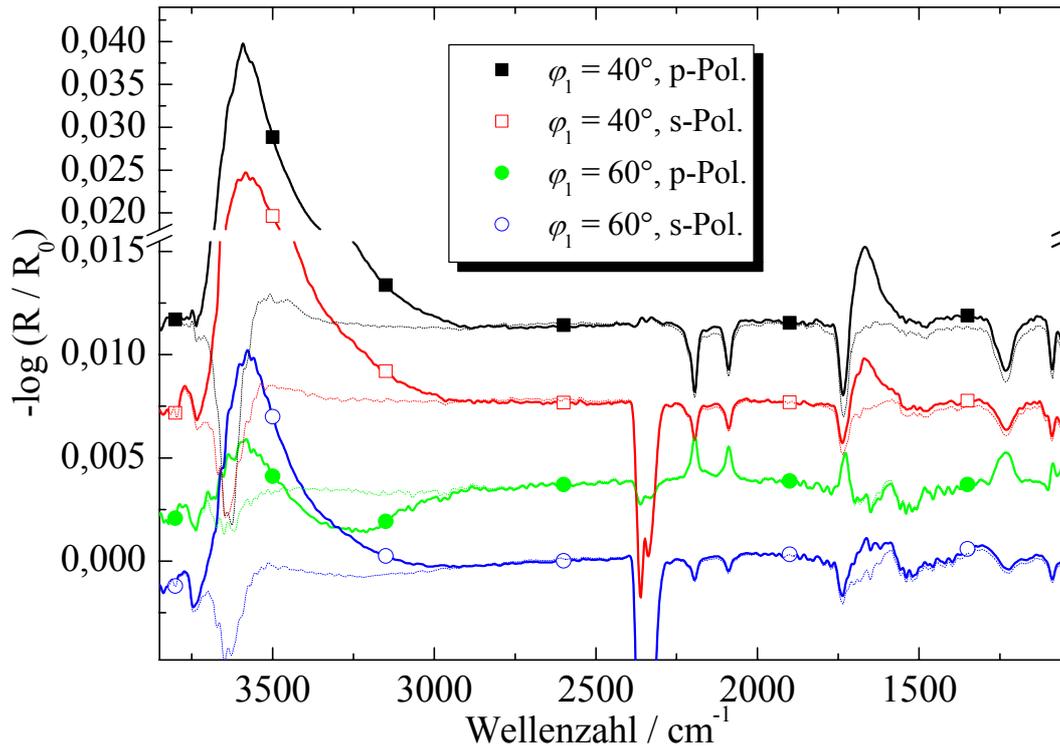


Abb. 2.13: Simulation von IRRAS-Basislinien an dem Beispiel DPPC-d₆₂: (—) experimentelle IRRAS-Spektren, (-----) die um die Basislinie korrigierten experimentellen Spektren. Die Spektren sind vertikal gegeneinander verschoben, um sie besser vergleichen zu können.

abweicht. Neben den Schwingungsbanden des Moleküls, die nun alle positiv sind, zeigt die Basislinie im Bereich der OH-Streckschwingung und der H₂O-Scherschwingung einen dispersiven Verlauf, der meist nur für die OH-Streckschwingung experimentell beobachtet werden kann.

Teilweise wurde in den experimentellen Spektren im Wellenzahlbereich unterhalb der H₂O-Scherschwingungsbande eine Verschiebung der Basislinie zu höheren Intensitätswerten gefunden. Auch dies konnte durch die Simulation bestätigt werden.

Zusammenfassend sei gesagt, daß die Auswertung der OH-Streckschwingungsbande Auskünfte über die Schichtdicke und die optischen Parameter des Films gibt. Allerdings muß dies noch in Kombination mit IR-Ellipsometrie (zur Detektion der beiden Brechungsindices des Films) und Methoden zur Schichtdickenbestimmung (Röntgenreflektometrie bzw. Ellipsometrie) komplementär dazu geprüft werden.

Es sei auch auf das nachfolgende Kapitel über 8-Cyanobiphenyl verwiesen, bei dem das Verhalten der OH-Streckschwingungsbande den Zugang zu dieser Problematik ermöglicht bzw. erleichtert hat.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 8-Cyanobiphenyl

Als Modellverbindung zur Testung der IRRAS-Methode wurde 4-Cyano-4'-Octylbiphenyl (8CB, Abb. 3.1) ausgewählt. Die Untersuchungen beziehen sich unter anderem auf die Orientierung und Phasenübergänge an der Luft/Wasser-Grenzfläche und das 8CB wurde verwendet, da es in der Literatur schon ausreichend charakterisiert wurde. Die an der Luft/Wasser-Grenzfläche erzeugbaren Langmuirfilme sind deshalb interessant, da aus ihnen Langmuir-Blodgett-Filme (LB-Filme) auf festen Oberflächen hergestellt werden können, die eine große Verbreitung in der Anwendungsforschung gefunden haben (Sensortechnik, Elektronik, Optoelektronik).

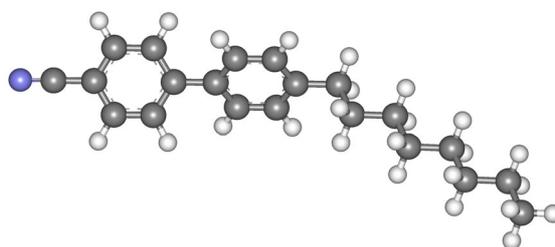


Abb. 3.1: Struktur von 4-Cyano-4'-Octylbiphenyl (8CB).

8CB zeigt drei Phasenumwandlungen bei 21,5 °C (cr → SmA), 33,5 °C (SmA → N) und 40,5 °C (N → is) (z. B.: Biensan et al., 1996), von denen die beiden letzten auch mit Transmissions-IR-Spektroskopie beobachtet wurden. Die Umwandlungen sind durch die Verschiebung der Schwingungsbande der Cyanogruppe $\nu(\text{CN})$ bei 2227 cm^{-1} und der Aromatenbande bei 1606 cm^{-1} zu detektieren. Die $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande zeigt stark streuende Bandenlagen und ist für die Bestimmung der Umwandlungstemperaturen nicht geeignet (Anhang Abb. A.5.1).

8CB ist ein stäbchenförmiges Molekül, das in Wasser unlöslich ist. Allerdings spreitet es zu einem stabilen Film an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Mittels der Brewsterwinkel-Spektroskopie konnte bei Kompression des Films ein Phasenübergang gefunden werden (siehe π/A -Isotherme in Abb. 3.2). Dabei wandelt sich eine anfängliche Monoschicht zu einer Tripelschicht um, wobei sich eine interdigitierte Bischicht auf der Monoschicht ausbildet (de Mul & Mann, 1994; Friedenberget al., 1994). Dieser Übergang wurde durch Oberflächenpotentialmessungen (Schmitz & Gruler, 1995), SHG-Messungen („Second Harmonic Generation“; Enderle et al., 1994), Ellipsometrie (Xue et al., 1992) und IRRAS (Biensan et al., 1996) untersucht und bestätigt. Dabei wurde z. B. der Tiltwinkel des Biphenylkerns bei einem Oberflächendruck von 2,1 mN/m (Monoschicht) zu $57,9^\circ$ bestimmt (Enderle et al., 1994), während andere Autoren einen etwas höheren Tiltwinkel fanden (Xue et al., 1992: 62°).

Bei einem anderen Cyanobiphenylderivat konnte in der Monoschicht ein Tiltwinkel von $\theta = 58 \pm 7^\circ$ aus der Schichtdicke abgeleitet werden. Die Bischichten oberhalb dieser Monoschicht besitzen Schichtdicken, die denen der smektischen Phase entsprechen. Dies wiederum impliziert ein ähnliches Packungsverhalten mit partieller Interdigitierung der aromatischen Kerne (Ibn-Elhaj et al., 1997).

Abb. 3.2 zeigt die π/A -Isothermen und die aus den IRRAS-Spektren ermittelten Frequenzen und Intensitäten der CN-Bande. Man erkennt, daß die Cyanobanden im Verlauf des Phasenübergangs in ihrer Frequenzlage zu tieferen Frequenzen verschoben werden. Da dies der Ausbildung einer interdigitierten Bilschicht zugeschrieben wird, kann man diese Frequenz mit den Volumenmessungen zumindest ansatzweise vergleichen (siehe Anhang Abb. A.5.1) denn dort wird eine ähnliche Frequenz von ca. 2227 cm^{-1} gefunden. Die erhöhte Frequenz bei großen Flächen ist der Wechselwirkung der Cyanogruppe mit der Wassersubphase zuzuschreiben (siehe auch Biensan et al., 1996). Interessant sind die Intensitäten der CN-Banden bei s-Polarisation und einem Einfallswinkel von 40° , die ein negatives Vorzeichen haben und bei Kompression zunehmend negativer werden. Bei der p-Polarisation dagegen findet man keine Veränderung der Intensitäten (Spektren nicht gezeigt). Zusätzlich wurden noch IRRAS-Spektren bei einem Einfallswinkel von 60° und mit p-Polarisation gemessen (Abb. 3.3). Hier beobachtet man eine Vorzeichenumkehr der CN-Bande bei Kompression des Films, wie es an den Spektren (Abb. 3.3, rechts) und Intensitäten (Abb. 3.3, links) zu sehen ist. Dieser Effekt wurde auch schon von Biensan et al. (1996) gefunden. Die Beiträge der CN-Bande der neu entstehenden Bilschicht sind also negativ und führen zu einer Bandenumkehr.

Bei ausgewählten Flächenwerten wurde die Orientierung der 8CB-Moleküle im Film bestimmt (siehe Kap. 2.2.3.1). Dazu wurden die Intensitäten der Cyanobanden ($\alpha(\nu(\text{CN})) = 0^\circ$) in Abhängigkeit von Einfallswinkel und Polarisation aufgetragen und angepaßt. Für die Simulation war die Kenntnis der Brechungsindices n_o und n_{ao} nötig, die aber für den infraroten Bereich nicht bekannt sind. Sie wurden mittels einer Extrapolation aus Werten in der nematischen Volumenphase zumindest näherungsweise zu $n_o = 1,49$ und $n_{ao} = 1,62$ bestimmt (siehe Anhang A.5: Abb. A.5.2 und Abb. A.5.3). Es wurde nur der Tiltwinkel θ bestimmt, da für den Twistwinkel ψ keine weitere adäquate Schwingungsbande auswertbar war. Die Methylenstreckschwingungsbanden sind nicht verwendbar, da sie von ungeordneten Kohlenwasserstoffketten stammen. Die Polarisatorgüte wurde von anderen Experimenten

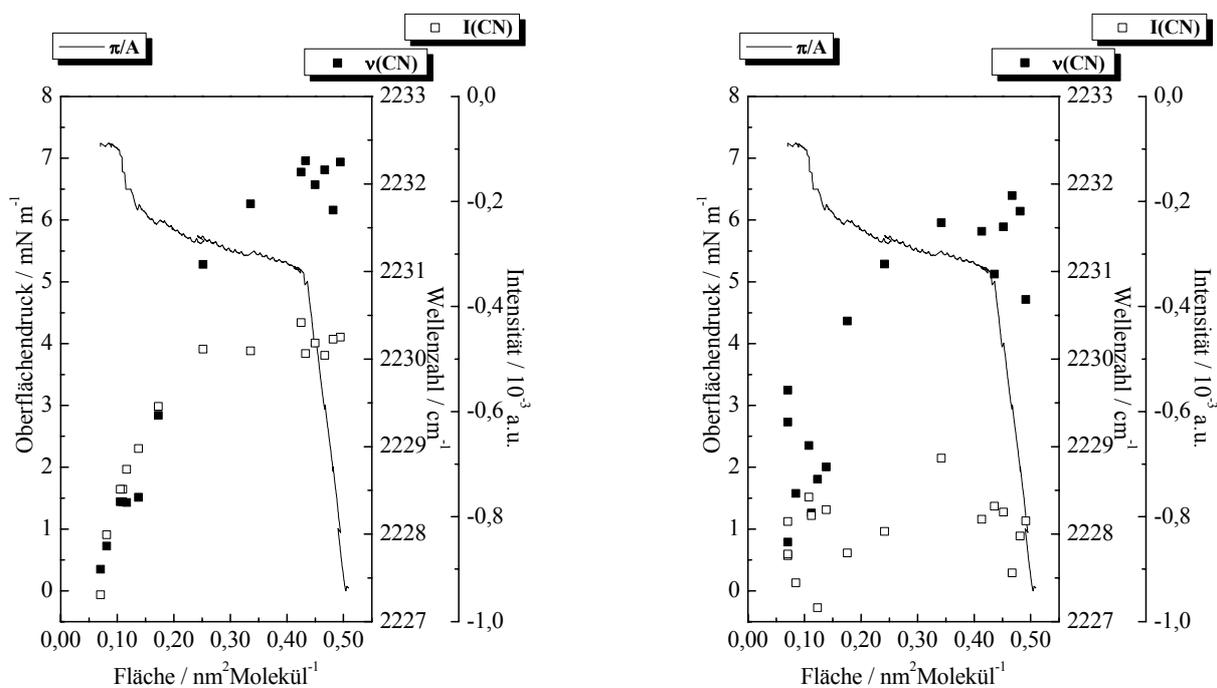


Abb. 3.2: IRRAS-Druck/Flächen-Isothermen von 8CB auf H_2O bei 20°C . Die Messungen erfolgten bei einem Einfallswinkel von 40° mit s-Polarisation (links) bzw. p-Polarisation (rechts). Zusätzlich zur Lage des Bandenzentrums der $\nu(\text{CN})$ -Schwingung wurde noch die Intensität diese Bande aufgetragen.

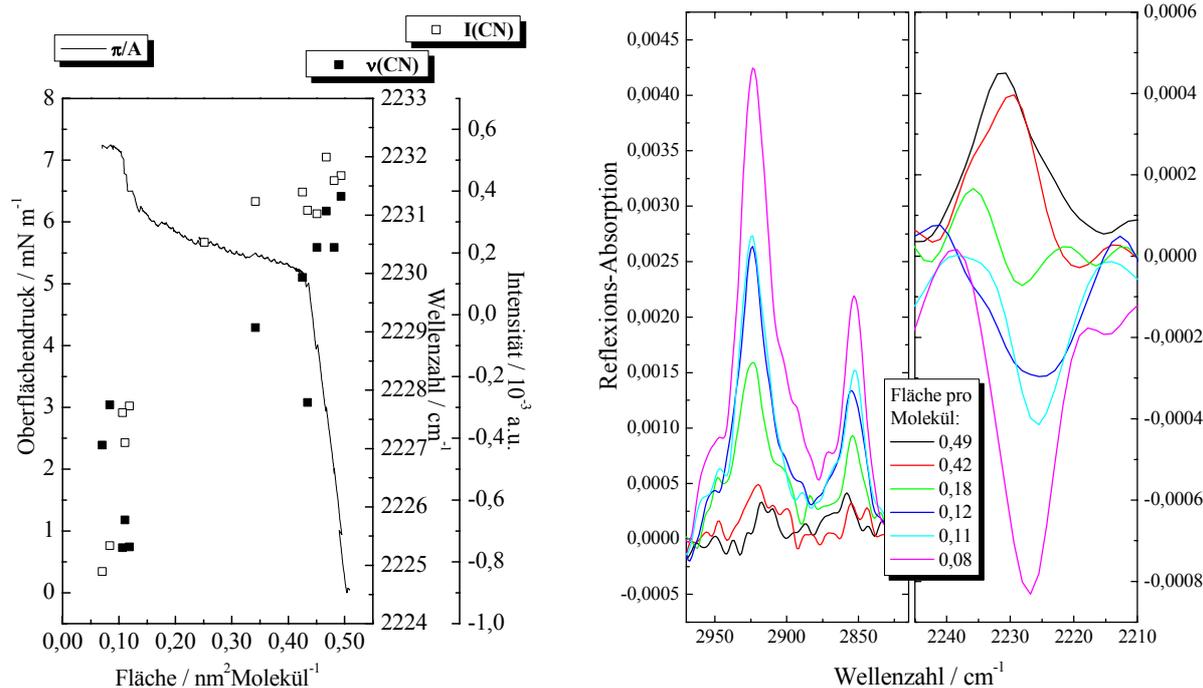


Abb. 3.3: IRRAS-Druck/Flächen-Isothermen von 8CB auf H₂O bei 20°C. Die Messungen erfolgten bei einem Einfallswinkel von 60° und p-Polarisation. Zusätzlich zur Lage des Bandenzentrums der $\nu(\text{CN})$ -Schwingung wurde noch die Intensität dieser Bande aufgetragen (links). Ausschnitte aus IRRAS-Spektren von $\nu(\text{CH}_2)$ - und $\nu(\text{CN})$ -Banden bei den jeweils angegebenen Flächenwerten, die während Kompression aufgenommen wurden (rechts).

übernommen (von den benachbarten $\nu(\text{CD}_2)$ -Banden: $\Gamma = 0,015$). Die Resultate sind in Abb. 3.4 (links) dargestellt. Man erkennt für den Monoschichtbereich (Druckanstiegsgebiet bis zum Beginn des Plateaus), daß ein Tiltwinkel θ_M von ca. $55^\circ \pm 3^\circ$ vorliegt. Der berechnete Winkel ist praktisch mit dem „magischen Winkel“ identisch, d. h. hier tritt der Fall ein, daß die Moleküle entweder isotrop verteilt sind, oder eine definierte Neigung mit einem Tiltwinkel von 55° haben. Dieser Winkel ist nur etwas kleiner als andere in der Literatur berichtete (Enderle et al., 1994: $57,9^\circ$; Xue et al., 1992: 62°). Ebenso wurde der Tiltwinkel der Moleküle in der Tripelschicht bestimmt, der allerdings einen Mittelwert über drei Schichten darstellt. Es wurde ein mittlerer Tiltwinkel θ_T von ca. $40^\circ \pm 3^\circ$ gefunden.

In Abb. 3.4 (rechts) sind für die Mono- und die Tripelschicht gemittelte experimentelle Daten der Intensitäten für s- und p-Polarisation gegen den Einfallswinkel aufgetragen. Bei der Monoschicht ist dabei im Falle der p-Polarisation ein Vorzeichenwechsel zu erkennen, der bei der Tripelschicht nicht mehr vorhanden ist. Hier ist zwar die Form des Kurvenverlaufes einigermaßen konserviert, aber alle Werte sind negativ. Die Intensitäten der Kurven für s-Polarisation zeigen für die Tripelschicht stärker negative Werte als für die Monoschicht. Trotz dieser ungewöhnlichen Kurvenwerte lassen sie sich alle anpassen.

Im Prinzip sollte es möglich sein, die Orientierung der Moleküle in der Bilschicht oberhalb des unteren Monolayers zu bestimmen. Die Intensitätswerte der Bilschicht wurden ermittelt, indem die Werte der Monoschicht von den Daten der Tripelschicht subtrahiert wurden. Die resultierenden Intensitäten wurden durch Variation der Parameter angepaßt und die Ergebnisse der Berechnungen sind in Abb. 3.4 (rechts) dargestellt. Es ergibt sich hier ein Tiltwinkel θ_B von ca. 30° . Da zur Berechnung der Intensitäten Differenzen benutzt wurden, vergrößert sich der Fehler in der Winkelbestimmung auf ca. $\pm 5^\circ$. Aus den Ergebnissen kann auf eine Anordnung der Moleküle innerhalb der Tripelschicht geschlossen werden, wie in

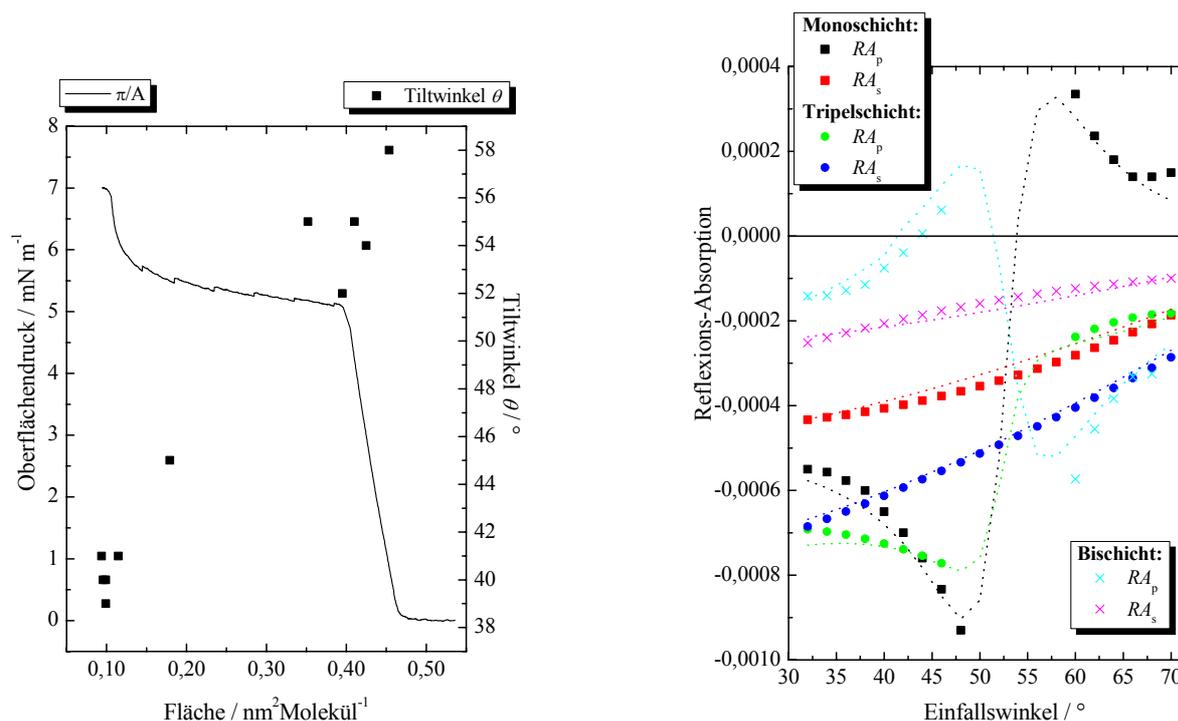


Abb. 3.4: Berechnete Tiltwinkel der 8CB-Filme anhand der Intensitäten der Cyanobande in Abhängigkeit des Flächenbedarfs (links); Reflexions-Absorption/Einfallswinkel-Diagramm von 8CB (rechts). Dargestellt sind gemittelte experimentelle Intensitäten aus mehreren Messungen für eine Monoschicht (um den Plateaubeginn, ■) und eine Tripelschicht (am Ende des Plateaus, ●). Die Werte für die Bilschicht (×) wurden aus der Differenz der Werte der Tripel- und Monoschicht erhalten und wurden ebenfalls rechnerisch angepaßt (.....).

Abb. 3.5 skizziert. Wichtig ist hier die Orientierung der Cyanogruppen und damit des Biphenylkerns. Die genaue Lage der Methyleneinheiten kann nicht bestimmt werden. Die Informationen aus den Streckschwingungsbanden besagen, daß die CH₂-Ketten ungeordnet sind und keine all-*trans*-Konformation aufweisen. Dies verhindert eine genaue Bestimmung der Orientierung der Übergangsdipolmomente der CH₂-Schwingungen. Die Kettenunordnung ist in Abb. 3.5 nicht berücksichtigt.

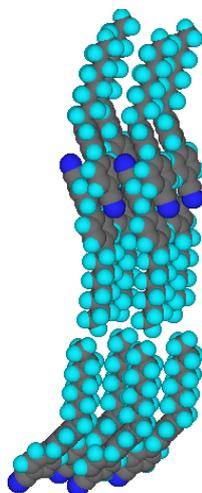


Abb. 3.5: Mögliche Anordnung der Moleküle der 8CB-Tripelschicht unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Orientierungen des Cyanobiphenylkerns in der Mono- respektive Bilschicht.

Eine besondere Beachtung bei den Untersuchungen am 8CB verdient die OH-Streckschwingungsbande bei ca. 3600 cm^{-1} . Es konnte gezeigt werden, daß diese Bande kaum durch strukturiertes Wasser unterhalb des Films beeinflusst ist. Diese Schlußfolgerung basiert auf Beobachtungen am Übergang von der Monoschicht zur Tripelschicht. Vor dem Erreichen des Plateaubereiches ändert sich die Intensität der Wasserbande kaum. Im Plateaubereich der Druck/Flächen-Isotherme dagegen kommt es zu einem annähernd linearen Anstieg der Bandenintensität (Abb. 3.6).

Dies steht in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung einer Bilschicht oberhalb der zuunterst liegenden Monoschicht. Da die Monoschicht kaum eine Änderung in ihrer Struktur erfährt, sollten eigentlich die Wasserbanden, die auf die Hydratation der Kopfgruppe zurückzuführen sind, nahezu unverändert bleiben. Daß die Monoschicht sich bei Überlagerung mit einer Bilschicht nicht ändert, wurde aus Röntgenreflektometriedaten von 8CB auf Silizium geschlossen (Bardon et al., 1999). Der Tiltwinkel in der Monoschicht betrug hier $57^\circ \pm 3^\circ$, und in der untersuchten Tripelschicht blieb dieser für die Monoschicht erhalten. Obwohl der Film nicht auf der Wasseroberfläche untersucht wurde, sprechen die Daten für eine mögliche Vergleichbarkeit.

Mit der Dreifachschichtausbildung steigt die Intensität der OH-Streckschwingungsbande besonders stark an und scheint direkt mit der Zunahme der Schichtdicke gekoppelt zu sein, was anhand der Normierungen ersichtlich ist. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß neben der Ausbildung einer strukturierten Wasserschicht unterhalb des Films ein zusätzlicher Effekt in Betracht gezogen werden muß, der den Hauptanteil zur Intensitätsänderung bildet. Obwohl die Intensität der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Streckschwingungsbande ebenfalls zunahm, konnte sie nicht mit der Schichtenbildung korreliert werden.

Um die Intensitätszunahme der OH-Bande zu erklären, wurden Basisliniensimulationen für die Mono- und die Tripelschicht durchgeführt. Dabei wurden die Basislinien der

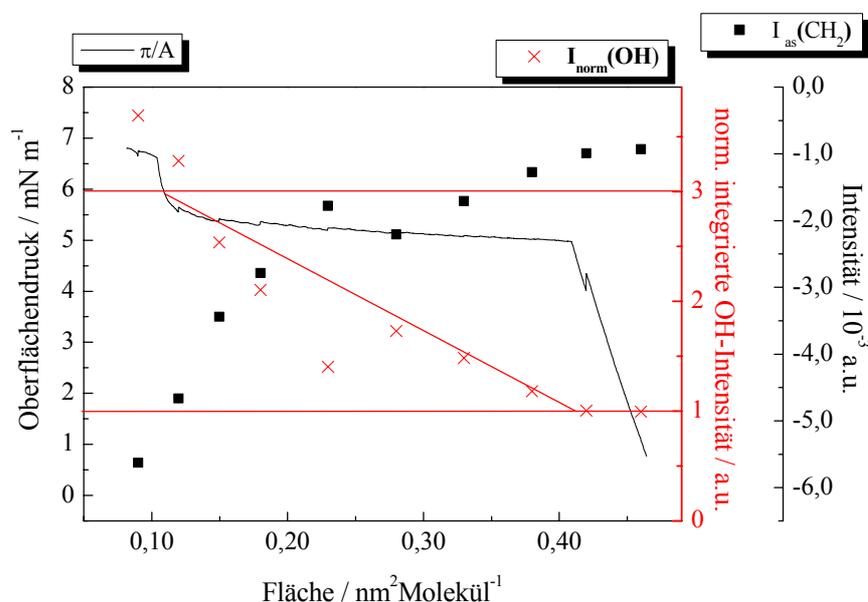


Abb. 3.6: IRRAS-Druck/Flächen-Isotherme von 8CB auf H_2O bei 20°C . IRRAS-Messungen erfolgten bei einem Einfallswinkel von 40° und s-Polarisation. Zusätzlich zur Intensität der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Schwingung wurde noch die Intensität der OH-Streckschwingungsbande aufgetragen. Diese wurde durch eine Integration über die Fläche zwischen 3000 und 3400 cm^{-1} erhalten und anschließend auf die Werte am Beginn des Plateaus auf 1 normiert. Die eingezeichneten Linien sind nur zur Verdeutlichung des Intensitätsanstiegs von der Wasserbande und der Intensitätswerte 1 (Monoschicht) und 3 (Tripelschicht).

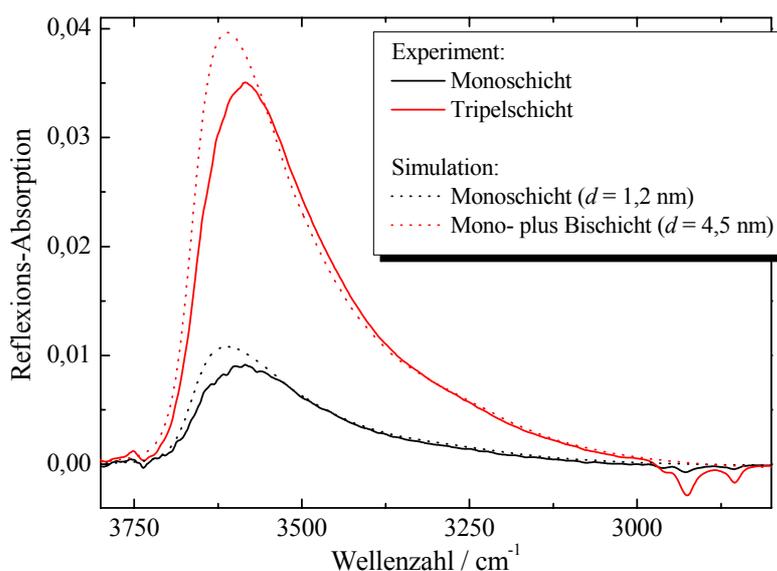


Abb. 3.7: Experimentelle Spektren von 8CB bei einem Einfallswinkel von 40° und s-Polarisation und Simulationen der IRRAS-Basislinien.

Monoschicht als auch der Bischoicht getrennt simuliert und anschließend zur Tripelschicht addiert. Als optische Parameter wurden die extrapolierten Brechungsindices des Films mit $n_o = 1,49$ und $n_{a0} = 1,62$ angenommen. Die Polarisatorgüte konnte hier nur näherungsweise geschätzt werden ($I = 0,017$). Als Schichtdicken wurden die Werte von Bardon et al. (1999) verwendet: $d_M = 1,2$ nm und $d_B = 3,3$ nm. Die Tiltwinkel stammen aus den eigenen Berechnungen: $\theta_M = 55^\circ$ und $\theta_B = 30^\circ$. In Abb. 3.7 sieht man, daß die Ergebnisse der Basisliniensimulation sehr gut mit den experimentellen Spektren übereinstimmen. Wie schon in Kap. 2.2.3.2.1 erwähnt, sollte nur der Wellenzahlbereich vor 3500 cm^{-1} in Betracht gezogen werden.

Buffeteau et al. (1999) simulierten ebenfalls die Wasserbanden in IRRAS-Spektren und zwar mit vorher in getrennten Experimenten bestimmten anisotropen optischen Konstanten eines Cadmiumarachidatfilms und den isotropen optischen Konstanten von Wasser mit einer vorgegebenen Schichtdicke. Ihre Schlußfolgerung war, daß die Wasserbanden hauptsächlich auf Absorptionseffekten von flüssigem Wasser beruhen und nur zu einem geringen Teil auf strukturiertem Wasser unterhalb des Films.

Tatsächlich variiert die Intensität der Wasserbanden mit der Schichtdicke des Films, d. h. die Intensität nimmt wie vorhergesagt mit zunehmender Schichtdicke des Films zu.

Abschließend läßt sich sagen, daß die Experimente von 8CB und die dazugehörigen Simulationen in sich geschlossen sind und ein homogenes Bild von einem Übergang von einer Monoschicht zu einer Tripelschicht ergeben. Dabei konnte für die Monoschicht ein Tiltwinkel der 8CB-Moleküle von $55^\circ \pm 3^\circ$ und für die darüberliegende Bischoicht ein Tiltwinkel von $30^\circ \pm 5^\circ$ bestimmt werden. Die Ergebnisse sind auch eine Bestätigung für die Anwendungsmöglichkeiten der Basisliniensimulationen.

3.2 Lipide

3.2.1 DPPC-Isomere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von DPPC und DPPC-d₆₂ der Phasenübergang von flüssig-expandiert nach flüssig-kondensiert an der Luft/Wasser-Grenzfläche untersucht, sowie die Tiltwinkel der Acylketten bestimmt. Der mathematische Formalismus ermöglicht neben der Tiltwinkel- auch die Twistwinkelberechnung der Ketten. Um für jeweils beide Fettsäureketten in einem Molekül den Tilt- und den Twistwinkel zu bestimmen wurden zwei DPPC-Isomere untersucht, in denen jeweils eine Fettsäure durch eine perdeuterierte Fettsäure substituiert ist: P-d₃₁PPC (1-Perdeuteropalmitoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) und PP-d₃₁PC (1-Palmitoyl-2-perdeuteropalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin). Zum direkten Vergleich wurde ebenfalls das 1:1-Gemisch von DPPC-d₆₂/DPPC untersucht, das eine ideale Mischung ausbildet (Elmore et al., 2002).

Die Struktur von DPPC kann anhand der Röntgenkristallstruktur von DMPC beschrieben werden, dessen Fettsäureketten nur um zwei Methylenheiten gegenüber dem DPPC verkürzt sind. In der molekularen Struktur von DMPC bildet das Glycerol zusammen mit der *sn*-1-Fettsäure eine antiplanare Zick-Zack-Kette und der Anfang der *sn*-2-Fettsäure steht senkrecht dazu ab. Die *sn*-2-Fettsäure biegt sich an ihrem zweiten Kohlenstoffatom zurück, so daß sie sich parallel zur *sn*-1-Kette ausrichtet (Pearson & Pascher, 1979; Abb. 3.8).

Das hydratisierte DPPC in der L_β-Phase besitzt einen Tiltwinkel von 30° ± 3° (Wiener et al., 1989). Der Tiltwinkel resultiert aus dem Unterschied zwischen den Querschnittsflächen der hydratisierten Cholinkopfgruppe und der Acylketten des DPPC-Moleküls (McIntosh, 1980).

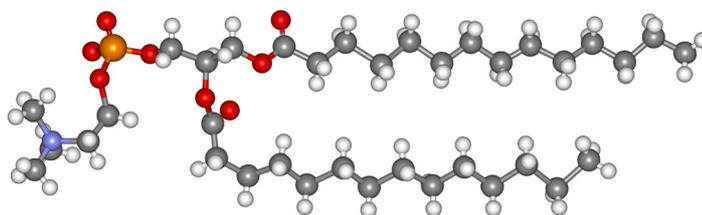


Abb. 3.8: Röntgenkristallstruktur des Moleküls 2 von DMPC in der Einheitszelle (Pearson & Pascher, 1979).

3.2.1.1 IRRAS

Die Druck/Flächen-Isothermen der verschiedenen Substitutionsisomere zeigen klar den Phasenübergang von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase (Abb. 3.9). Die Isothermen von P-d₃₁PPC, PP-d₃₁PC und dem Gemisch DPPC-d₆₂/DPPC 1:1 sind sehr ähnlich, was aufgrund des gleichen Deuteriumgehaltes und der idealen Mischbarkeit von DPPC-d₆₂ und DPPC auch zu erwarten ist. Der Oberflächendruck zu Beginn des Phasenübergangs für DPPC, P-d₃₁PPC (stellvertretend für die Filme mit 50 % Deuteriumgehalt) und DPPC-d₆₂ beträgt ca. 6,0, 10,0 respektive 13,6 mN/m. Der Unterschied in den Phasenübergangsdrukken von $\Delta\pi \approx 5$ mN/m bei 18 °C zwischen DPPC und DPPC-d₆₂ ist auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zurückzuführen, die im Volumensystem gefunden wurde und sich hier in dem bei 20 °C gemessenen $\Delta\pi$ widerspiegelt. Die Erhöhung des Phasenübergangsdrukkes bei deuterierten Verbindungen ist eine Folge der Reduktion der Dispersionswechselwirkung zwischen den Ketten (Vaknin et al.,

1991). In Volumenphasen findet man analog mit der Erhöhung des Deuteriumanteils eine Erniedrigung der Phasenumwandlungstemperaturen (siehe Kap. 3.2.1.2).

Neben den π/A -Isothermen zeigt Abb. 3.9 die aus den IRRAS-Spektren ermittelten Frequenzen der Methylenstreckschwingungsbanden als Funktion der Fläche. Eine Frequenzabnahme der konformationsempfindlichen Streckschwingungen ist direkt mit einer Zunahme der Ordnung in den Kohlenwasserstoffketten der Lipide korreliert (Mitchell & Dluhy, 1988; Hunt et al., 1989). Man erkennt, daß die CD_2 -Streckschwingungsbanden für alle Lipidfilme im Verlauf des Phasenübergangs eine ähnliche Frequenzverschiebung haben und im flüssig-kondensierten Phasenzustand mittlere Frequenzen von 2194,3 ($\nu_{as}(CD_2)$) bzw. 2089,0 cm^{-1} ($\nu_s(CD_2)$) besitzen. Die CH_2 -Streckschwingungsfrequenzen für DPPC im flüssig-kondensierten Zustand (2918,3 bzw. 2850,2 cm^{-1}) deuten auf eine hohe Ordnung innerhalb der Ketten hin. Auch die semisubstituierten DPPC-Isomere und das DPPC-Gemisch sollten in einem flüssig-kondensierten Phasenzustand sein. Allerdings sind die entsprechenden CH_2 -Streckschwingungsfrequenzen gegenüber denen des DPPC um fast 2 cm^{-1} größer, was eigentlich einer erhöhten Unordnung entsprechen sollte. Die beiden semisubstituierten DPPC-Lipide sollten aufgrund der antisymmetrischen Streckschwingungsfrequenzen eine größere Unordnung in ihrem Kettenbereich haben als das DPPC- d_{62} /DPPC-Gemisch (2920,4 cm^{-1} gegenüber 2920,0 cm^{-1}). Diese Interpretation ist jedoch zu einfach, wie sich auch aus der Untersuchung der Volumensysteme zeigt. In Kap. 3.2.1.3 wird dieses Problem erörtert werden.

P- d_{31} PPC wurde ebenfalls mit der IRRAS-Methode von Flach et al. (1999) untersucht. Bei einem Oberflächendruck von 28 ± 2 mN/m wurden für die antisymmetrischen Streckschwingungen $\nu_{as}(CH_2)$ bzw. $\nu_{as}(CD_2)$ mittlere Frequenzen von 2919,5 und 2193,9 cm^{-1} gefunden. Diese Frequenzen sind etwas kleiner als die in Abb. 3.9 gezeigten Werte. Sie sind allerdings auch höher als die Streckschwingungsfrequenzen des normalen DPPC in der flüssig-kondensierten Phase. Eine Analyse der Tiltwinkel konnte damals aufgrund des noch ungenügenden Signal/Rausch-Verhältnisses der IRRAS-Spektren nicht durchgeführt werden. Die π/A -Isothermen konnten mit dieser Arbeit nicht verglichen werden, da sie nicht dargestellt wurden.

In Tab. 3.1 sind für die verschiedenen DPPC-Isomere alle berechneten Tilt- und Twistwinkel aufgelistet. Außerdem sind die berechneten Absorptionskoeffizienten der antisymmetrischen und der symmetrischen Streckschwingungen aufgeführt. Die Vergleiche mit den in der Literatur gefundenen Tiltwinkeln für DPPC und DPPC- d_{62} belegen die Zuverlässigkeit der Orientierungsmessungen. Die Twistwinkel zwischen 40° und 45° lassen auf eine weitgehend rotationssymmetrische Anordnung der Ketten innerhalb der Moleküle schließen.

In den semisubstituierten DPPC-Verbindungen besitzen die deuterierten Fettsäureketten einen größeren Tiltwinkel als die nichtdeuterierten Ketten. Hier muß zwar mit einem größeren Fehler bei der Tiltwinkelberechnung von ca. 3° gerechnet werden, allerdings ist der Trend in der gesamten Tabelle zu sehen. Das perdeuterierte DPPC- d_{62} hat sowohl alleine als auch in der DPPC- d_{62} /DPPC-Mischung einen größeren Tiltwinkel als das DPPC. Die Literaturdaten, die mit einer anderen Methode ermittelt wurden (Röntgen- und Neutronenreflektivität an Monoschichten: Vaknin et al., 1991), unterstützen dies.

Flach et al. (2001) untersuchten mittels IRRAS ein Ceramid mit einer CH_2 - und einer CD_2 -Kette, wobei sie nur die Tiltwinkel- und keine Twistwinkel Anpassung verwendeten. Für die perdeuterierte Fettsäurekette fanden sie einen Tiltwinkel von 24° , während für die Sphingosinkette ein Tiltwinkel von 18° ermittelt wurde. Für das undeuterierte Ceramid ergab sich ein gemittelter Neigungswinkel von 20° . Es wurde postuliert, daß die Ketten des

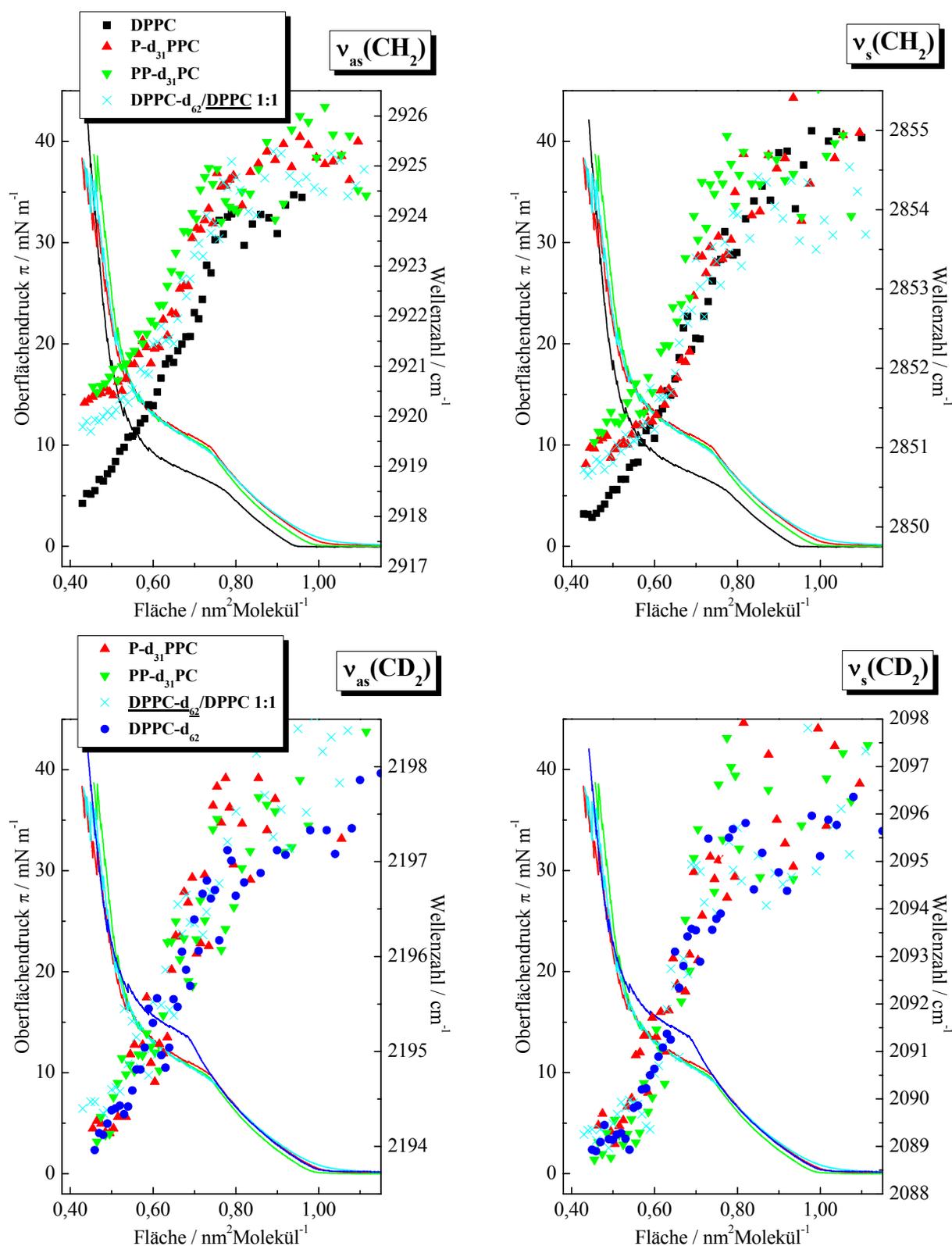


Abb. 3.9: IRAS- π/A -Isothermen von DPPC (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), P-d₃₁PPC (—, ▲), PP-d₃₁PC (—, ▼) DPPC-d₆₂/DPPC 1:1 (—, ×) und DPPC-d₆₂ (—, ●) auf H₂O bei 20 °C. Die Messungen erfolgten bei einem Einfallswinkel von 40° und mit s-Polarisation. Komplementär dazu sind das $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramm (oben links), $\bar{\nu}_s(\text{CH}_2)/A$ -Diagramm (oben rechts), $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramm (unten links) und $\bar{\nu}_s(\text{CD}_2)/A$ -Diagramm (unten rechts) dargestellt.

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
		$\nu_{as, s}(CD_2)$				$\nu_{as, s}(CH_2)$			
DPPC ^{a,1}	$39,8 \pm 0,6$					26 ± 2	43 ± 3	0,607	0,356
						27 ± 2		0,607	0,366
DPPC ^{b,2}	41,0					27			
DPPC ^{b,3}	40,0					27			
DPPC ^{a,4}	$28,0 \pm 2,0$					26		0,540	
P-d ₃₁ PPC ^{a,1}	$38,3 \pm 0,4$	30 ± 3	42 ± 5	0,173	0,116	24 ± 3	40 ± 5	0,288	0,164
		31 ± 3		0,171	0,120	24 ± 3		0,285	0,169
PP-d ₃₁ PC ^{a,1}	$38,8 \pm 0,3$	29 ± 3	41 ± 5	0,158	0,111	24 ± 3	36 ± 5	0,286	0,154
		30 ± 3		0,158	0,116	25 ± 3		0,283	0,164
DPPC-d ₆₂ / DPPC 1:1 ^{a,1}	$38,4 \pm 0,6$	28 ± 3	39 ± 5	0,148	0,103	24 ± 3	43 ± 5	0,287	0,164
		29 ± 3		0,146	0,108	25 ± 3		0,286	0,167
DPPC-d ₆₂ ^{a,1}	$39,7 \pm 0,6$	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				
DPPC-d ₆₂ ^{c,5}	42,0	33 ± 3							

Tab. 3.1: Tilt-, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten der verschiedenen DPPC-Isomeren bei einem annähernd konstanten Oberflächendruck von ca. 39 mN/m auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2). ^aIRRAS; ^bRöntgendiffraktion; ^cRöntgen- und Neutronenreflektivität; ¹Diese Arbeit; ²Brezesinski, 2002; ³Thoma et al., 1996; ⁴Gericke et al., 1997; ⁵Vaknin et al., 1991.

Ceramids sich in der Monoschicht nicht richtig packen können und deshalb Mikrodomänen ausbilden (Chen et al., 2001).

Die von Flach et al. (2001) gefundenen Werte für die drei Neigungswinkel haben eine ähnliche Tendenz wie die Werte von DPPC und den semisubstituierten DPPC-Molekülen: ausgehend von DPPC mit einem Tiltwinkel von 27°, resultiert die Substitution mit einer perdeuterierten Fettsäurekette (relativ unabhängig ob in *sn*-1- oder in *sn*-2-Position) in einem Tiltwinkel der deuterierten Kette von ca. 30° bis 31°, während die undeuterierte Kette einen Neigungswinkel von ca. 24° bis 25° hat. Im Rahmen der Fehlertoleranzen kann man die Tiltwinkel zwar als gleich annehmen, aber die Tendenzen in Tab. 3.1 sind doch eindeutig. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß in den DPPC-Isomeren zwei so unterschiedliche Kettenneigungen existieren. Den beobachteten Untersuchungen liegen Schwierigkeiten bei der Bandenanalyse der semisubstituierten Phosphatidylcholine zugrunde. Durch die Substitution nur einer Acylkette sind die Intensitäten der CH₂- bzw. CD₂-Schwingungsbanden halbiert, was zu einer Reduzierung des Signal/Rausch-Verhältnisses führt und damit den Fehler in der Intensitätsauswertung erhöht. Zum anderen sind die Absorptionskoeffizienten für die CD₂-Streckschwingungsmoden kleiner als die der CH₂-Banden, was insbesondere die Auswertung der Intensitäten der CD₂-Banden erschwert. Eventuell liegt auch ein unbekannter spektroskopischer Effekt zugrunde, der in den Berechnungen zu den unterschiedlichen Tiltwinkeln in den deuterierten und nichtdeuterierten Fettsäureketten führt.

3.2.1.2 Untersuchung von Lipiddispersionen

Vollständig hydratisiertes DPPC zeigt Phasenumwandlungen bei 18,8 °C (Subumwandlung T_s), 34,4 °C (Vorumwandlung T_p) und 41,3 °C (Hauptumwandlung T_m) (Koynova & Caffrey, 1998).

Die Einführung von zwei deuterierten Fettsäureketten in Phosphatidylcholine verschiebt die Hauptphasenumwandlungstemperatur von Bischoichtsystemen um 4 bis 5 °C zu tieferen Temperaturen und die Einführung von einer deuterierten Kette dementsprechend um 2 bis 3 °C (Petersen et al., 1975; Gaber et al., 1978; Klump et al., 1981; Casal et al., 1983). Dies konnte sowohl mit DSC- als auch mit Transmissions-FT-IR-Untersuchungen bestätigt werden, (Abb. 3.10, Abb. 3.11 und Tab. 3.2). Die Verschiebung der Umwandlungstemperatur konnte auch für die Vorumwandlung gefunden werden. Aufgrund der Präparationsmethode (siehe Kap. 5.2.5) wurde die kristalline Subphase L_c nicht ausgebildet.

In Abb. 3.11 sind für die verschiedenen DPPC-Isomere die aus den Transmissions-IR-Spektren ermittelten Frequenzen der Methylenstreckschwingungsbanden gegen die Temperatur aufgetragen. Der deutliche Anstieg der Wellenzahl bei der Hauptphasenumwandlungstemperatur ist auf das „Schmelzen“ der Acylketten des jeweiligen Lipids zurückzuführen. Unterhalb und oberhalb dieser Temperatur bleibt die Position der Methylenstreckschwingungsbanden nahezu konstant. DPPC zeigt in der Gelphase die höchste Ordnung, da im CH_2 -Streckschwingungsbereich Frequenzen von 2918,1 bzw. 2850,0 cm^{-1} erreicht werden. Aufgrund der Frequenzlage sollte das DPPC in dem DPPC- d_{62} /DPPC-Gemisch eine geringere Ordnung aufweisen, gefolgt von den beiden semisubstituierten DPPC-Isomeren mit Frequenzen von ca. 2920,4 bzw. 2851,3 cm^{-1} . Im Bereich der CD_2 -Streckschwingungen ist zu erkennen, daß aufgrund der niedrigen Frequenzen von 2193,3 bzw. 2088,3 cm^{-1} das DPPC- d_{62} in der Gelphase die höchste Ordnung besitzt. Die Wellenzahlen sind mit denen von Gericke et al. (1996) mit 2193,2 bzw. 2088,8 cm^{-1} vergleichbar. Bis auf die Frequenzen der symmetrischen CD_2 -Streckschwingungen des PP- d_{31} PC, die denen des DPPC- d_{62} ähneln, sind die CD_2 -Frequenzen der anderen Lipide zu höheren Werten verschoben. Dies deutet auf eine geringere Ordnung in den CD_2 -Ketten hin.

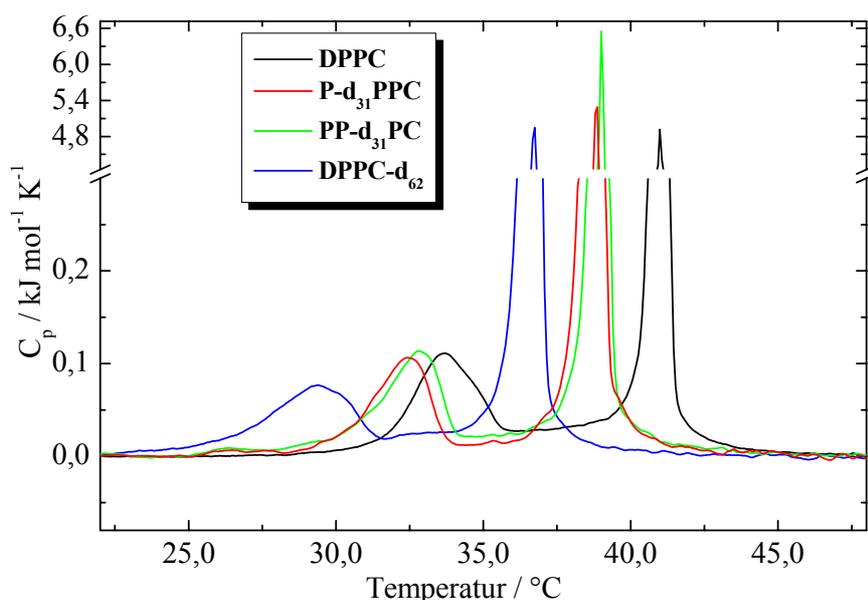


Abb. 3.10: Kalorigramme der verschiedenen DPPC-Isomere (Konzentration: 0,75 mM). Die thermodynamischen Daten sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

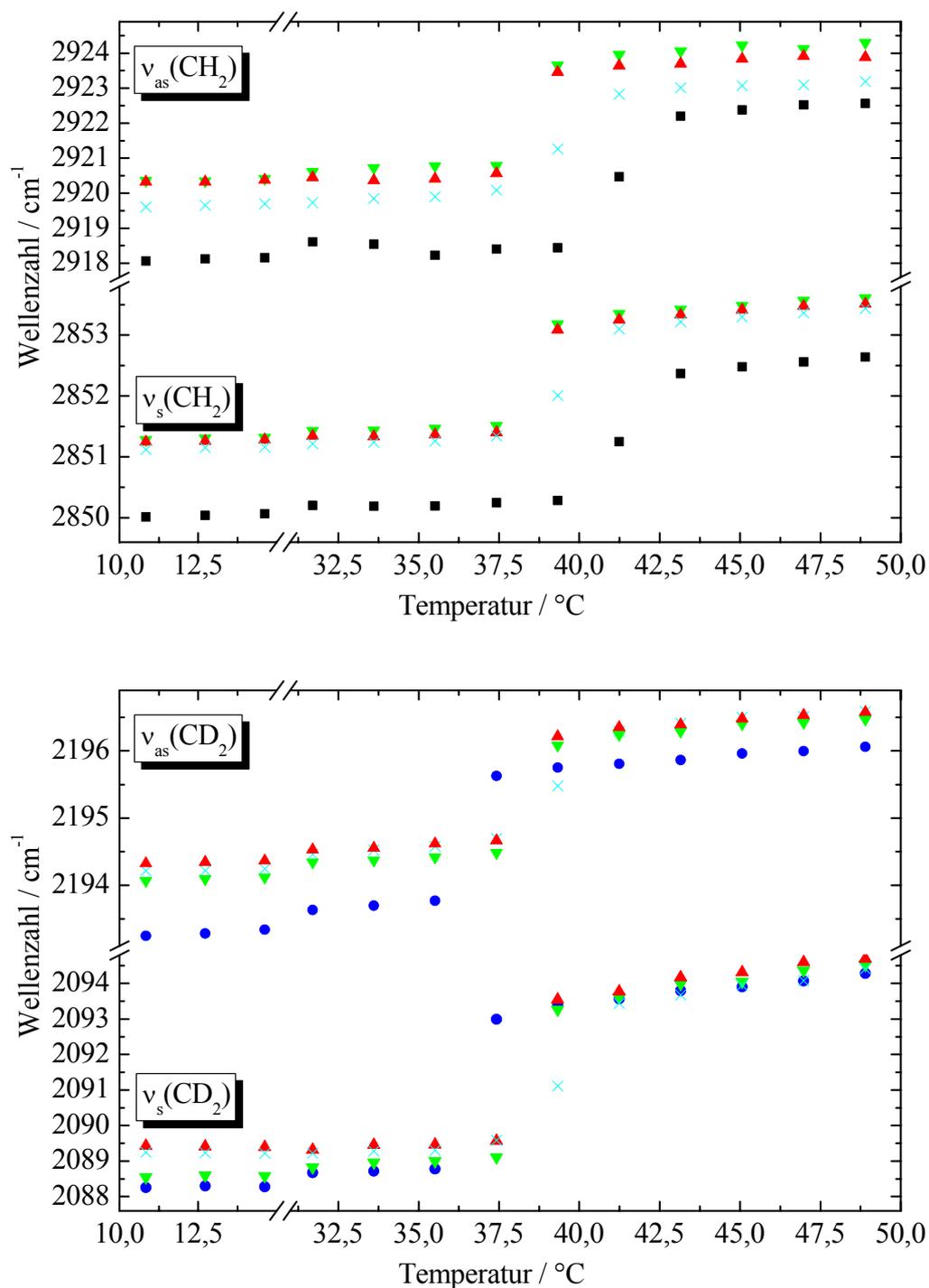


Abb. 3.11: $\bar{\nu}(\text{CH}_2)/T$ -Diagramm (oben) und $\bar{\nu}(\text{CD}_2)/T$ -Diagramm (unten) von DPPC (■), P-d₃₁PPC (▲), PP-d₃₁PC (▼) DPPC-d₆₂/DPPC 1:1 (×) und DPPC-d₆₂ (●). Aufgetragen wurden nur die Aufheizkurven; die Abkühlkurven verlaufen jedoch annähernd identisch. Die Umwandlungstemperaturen der Acylketten sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

Lipid	T _p / °C	ΔH / kJ mol ⁻¹	T _m / °C	ΔH / kJ mol ⁻¹
	Vorumwandlung		Hauptumwandlung	
DPPC ^{a,1}	33,7	7,1	41,0	36,7
DPPC ^{b,1}			41,6 (CH ₂)	
DPPC ^{a,2}			41,4	36,8
DPPC ^{a,3}	34,4	5,4	41,3	34,3
P-d ₃₁ PPC ^{a,1}	32,4	5,6	38,9	40,6
P-d ₃₁ PPC ^{b,1}			38,5 (CH ₂) 38,5 (CD ₂)	
P-d ₃₁ PPC ^{b,4}	30,6		39,1	
PP-d ₃₁ PC ^{a,1}	32,8	6,0	39,0	39,7
PP-d ₃₁ PC ^{b,1}			38,5 (CH ₂) 38,5 (CD ₂)	
PP-d ₃₁ PC ^{a,2}			39,1	40,2
PP-d ₃₁ PC ^{b,4}	30,5		39,5	
DPPC-d ₆₂ /DPPC 1:1 ^{a,1}	Nicht gemessen.			
DPPC-d ₆₂ /DPPC 1:1 ^{b,1}			39,6 (CH ₂) 39,6 (CD ₂)	
DPPC-d ₆₂ /DPPC 1:1 ^{a,2}			39,0	37,2
DPPC-d ₆₂ ^{a,1}	29,4	5,6	36,7	38,4
DPPC-d ₆₂ ^{b,1}			36,6 (CD ₂)	
DPPC-d ₆₂ ^{a,2}			37,3	45,6
DPPC-d ₆₂ ^{b,4}	29,6		37,5	

Tab. 3.2: Phasenumwandlungstemperaturen und -enthalpien der jeweiligen Lipidsuspensionen aus den DSC- und IR-Aufheizkurven. ^aDSC; ^bTransmissions-FT-IR; ¹Diese Arbeit; ²Klump et al., 1981; ³Koynova & Caffrey, 1998; ⁴Casal et al., 1983.

3.2.1.3 Zusammenfassung

Je nach Deuteriumgehalt wurden für die Lipidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche unterschiedliche Phasenumwandlungsdrücke bzw. für die Lipidbischichten unterschiedliche Phasenumwandlungstemperaturen in der Volumenphase gefunden. Die Umwandlungsgrößen hatten einen annähernd linearen Zusammenhang mit dem Deuteriumgehalt der Fettsäuren.

Bei infrarotspektroskopischen Messungen gilt generell, daß weniger geordnete Methylensegmente in der Nähe der Kettenenden bei deutlich höheren Wellenzahlen absorbieren (Gericke et al., 1996). Dies sollte für die *sn*-1-Kette ausgeprägter sein, da hier das Kettenende über die *sn*-2-Kette hinausragt (siehe Abb. 3.8). Die Ordnung für die *sn*-2-Kette sollte demnach höher sein als für *sn*-1-Ketten. Dem entgegen spricht jedoch, daß aufgrund des Knicks in der *sn*-2-Kette nach der Estergruppe die Ordnung in dieser Kette geringer sein sollte als in der *sn*-1-Kette. Eine genaue Einstufung des Ordnungsgrads der beiden Ketten ist dadurch erschwert. In der Monoschicht und der Bilschicht wurden für die Phasenumwandlungen der verschiedenen DPPC-Isomere unterschiedlich große Verschiebungen der antisymmetrischen und symmetrischen CH₂-Streckschwingungsfrequenzen gefunden. Die ausschließliche Korrelation der Frequenzänderungen mit konformationeller Ordnung, d. h. eine Erhöhung des Anteils an *gauche*-Konformeren in den CH₂-Ketten erscheint unbefriedigend. Die Frequenzverschiebungen zu größeren Werten der DPPC-Isomere im Vergleich zu reinem

DPPC, insbesondere der antisymmetrischen CH₂-Streckschwingung, ist auf den Einfluß der perdeuterierten Acylketten zurückzuführen. In Mischungen von CH₂- und CD₂-haltigen Alkylverbindungen nimmt mit zunehmender „Verdünnung“ der CH₂-Ketten durch eine Zunahme der CD₂-Ketten der Grad der intermolekularen Schwingungskopplung unter den CH₂-Ketten ab (DPPC, Hexadekan: Kodati et al., 1994; Stearinsäure: Binder & Schmiedel, 1999). Dies führt auch zu einer Veränderung in der Fermiresonanz im Gebiet der CH₂-Streckschwingungen, die neben der fundamentalen CH₂-Streckschwingung (ca. 2900 cm⁻¹) durch die CH₂-Scherschwingung beeinflusst wird (Snyder et al., 1978). Die Fermiresonanzbande selbst überlappt mit der $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ -Bande, so daß sich die Resonanzkopplung vor allem auf den Schwerpunkt dieser Bande auswirken sollte (Binder & Schmiedel, 1999). Obwohl die CD₂-Streckschwingungsfrequenzen durch die isotopische Verdünnung relativ unbeeinflusst bleiben sollten (Kodati et al., 1994; Binder & Schmiedel, 1999), wurden jedoch bei den Messungen in der Volumenphase im Vergleich zu DPPC-d₆₂ Verschiebungen zu höheren CD₂-Frequenzen gefunden. Die Auswirkung der intermolekularen Schwingungskopplung im Bereich der CD₂-Streckschwingung scheint also nicht immer vernachlässigbar zu sein. Die isotopischen Verdünnungseffekte sind in der Gelphase bzw. flüssig-kondensierten Phase stärker als in der jeweiligen fluiden bzw. flüssig-expandierten Phase (Kodati et al., 1994). Insgesamt resultiert, daß die Größe der Frequenzverschiebung der CH₂-Streckschwingungen neben der konformationellen Ordnung (*trans/gauche*-Verhältnis innerhalb der Alkylketten) auch mit dem Grad der Schwingungskopplung verbunden ist. Die isotopische Verdünnung hat keinen Einfluß auf die Beschreibung der konformationellen Ordnung durch die CH₂-Wagging-Banden (Kodati et al., 1994). Diese Methode zur quantitativen Bestimmung der konformationellen Zustände in Modellmembranen (siehe Mendelsohn & Senak, 1993) kann jedoch nicht auf Filme an der Luft/Wasser-Grenzfläche angewendet werden, obwohl erstmals sehr schwache Wagging-Banden in IRRAS-Spektren gefunden wurden (Pelletier et al., 2002). In den semisubstituierten DPPC-Isomeren sollte aufgrund der direkten Nachbarschaft der CD₂- zur CH₂-Kette im gleichen Molekül eine starke Entkopplung der CH₂-Schwingungen gegeben sein. Dieser Effekt sollte stärker sein als in einer Mischung von DPPC und DPPC-d₆₂, da in der Mischung nur eine statistische Verteilung der Moleküle angenommen werden kann. In den semisubstituierten Molekülen sollte also die größte Verschiebung der CH₂-Streckschwingungsbande zu größeren Frequenzen zu finden sein, was auch bestätigt werden konnte. Durch weitere Messungen von Mischungen der semisubstituierten DPPC-Isomere mit DPPC-d₆₂ sollten die Frequenzverschiebungen noch weiter verifiziert werden. Für die zunehmend isolierten CH₂-Ketten sollten neben der intramolekularen Kopplung zusätzlich die intermolekulare Kopplung der CH₂-Schwingungen weiter eingeschränkt werden.

Die Erkenntnisse dieses Kapitels wurden dahingehend berücksichtigt, daß die Frequenzverschiebungen der Streckschwingungsbanden im Verlauf einer π/A -Isothermen jeweils kritisch betrachtet wurden. Ein wichtiges Kriterium bildet hierbei auch die Mischbarkeit der untersuchten Lipide. Im vorliegenden Fall der DPPC-Isomere kann bei dem Gemisch DPPC-d₆₂/DPPC 1:1 von einer idealen Mischung ausgegangen werden. Wird DPPC-d₆₂ mit einem anderen nicht deuterierten Lipid gemischt und liegt eine Phasenseparation vor, so ist zu beachten, daß die CH₂-Ketten des undeuterierten Lipids, bis auf die Phasengrenzflächen, nicht in Kontakt mit CD₂-Ketten kommen und somit die intermolekulare Kopplung nicht so stark aufgehoben werden kann.

Die Berechnung der Tiltwinkel der deuterierten und nicht deuterierten Fettsäureketten an der Luft/Wasser-Grenzfläche ergibt für DPPC-d₆₂ einen um 2° bis 4° größeren Tiltwinkel als für DPPC. Diese Tendenz ist bei den semisubstituierten DPPC-Isomeren etwas stärker ausgeprägt (5° bis 6°).

3.2.2 Sphingolipide

In eukaryotischen Plasmamembranen sind Glykosphingolipide charakteristische Lipidmembranbestandteile. Eine spezielle Familie saurer Glykosphingolipide stellen die Ganglioside dar, die in Nervenzellen teilweise 10 - 15 % der gesamten Lipide stellen. Ihr Grundgerüst wird von Ceramid gebildet und sie besitzen eine hydrophile Oligosaccharidkette, die einen oder mehrere saure Zucker, die Sialinsäure, auch Neuraminsäure genannt, enthält (siehe Abb. 3.12). Neben der Funktion als Rezeptoren für Bakterien und Toxine (Wiegandt, 1985; Karlsson, 1989; Hara-Yokoyama et al., 1995; Sicchierolli et al., 1995) regulieren die Ganglioside sowohl die Neurotransmitterausschüttung und -aufnahme in Nervenzellen (Cumar et al., 1980; Maggio et al., 1981) als auch das Wachstum von Zellen (Schwarz et al., 1995). Außerdem wird postuliert, daß Gangliosid GM1 bei der β -Amyloid-Proteinumwandlung der Alzheimerkrankheit ein Kofaktor ist (Kakio et al., 2002). Die Bildung von Mikrodomänen („rafts“) aus Sphingolipiden (unter anderem Gangliosid GM1), Cholesterol und Phospholipiden soll im Rahmen der Signaltransduktion an Membranen eine wichtige Rolle spielen (Harder & Simons, 1997; Sorice et al., 1997; Brown & London, 1998).

Um die Funktion der Ganglioside zu gewährleisten, müssen Biosynthese, intrazellulärer Transport und Metabolismus der Lipide streng kontrolliert ablaufen. Ein Defekt im Abbau von Gangliosiden in Nervenzellen führt zu einer der vielen gut untersuchten Sphingolipidspeicherkrankheiten (Kolter & Sandhoff, 1999; Sandhoff et al., 2001), z. B. der GM2-Gangliosidose (Gravel et al., 2001) (siehe Kap 3.3.3).

Die große hydrophile Kopfgruppe führt zu einem ausgeprägten amphiphilen Verhalten und einer mizellaren Aggregation in wäßrigen Lösungen (Ganglioside mit einer größeren Komplexität als GM3) und zu Vesikeln und Doppelschichtsystemen (GM3 bzw. GM4) (Sonnino et al., 1994; Cantu et al., 1998; Hirai & Takizawa, 1998). Der pK_a -Wert der

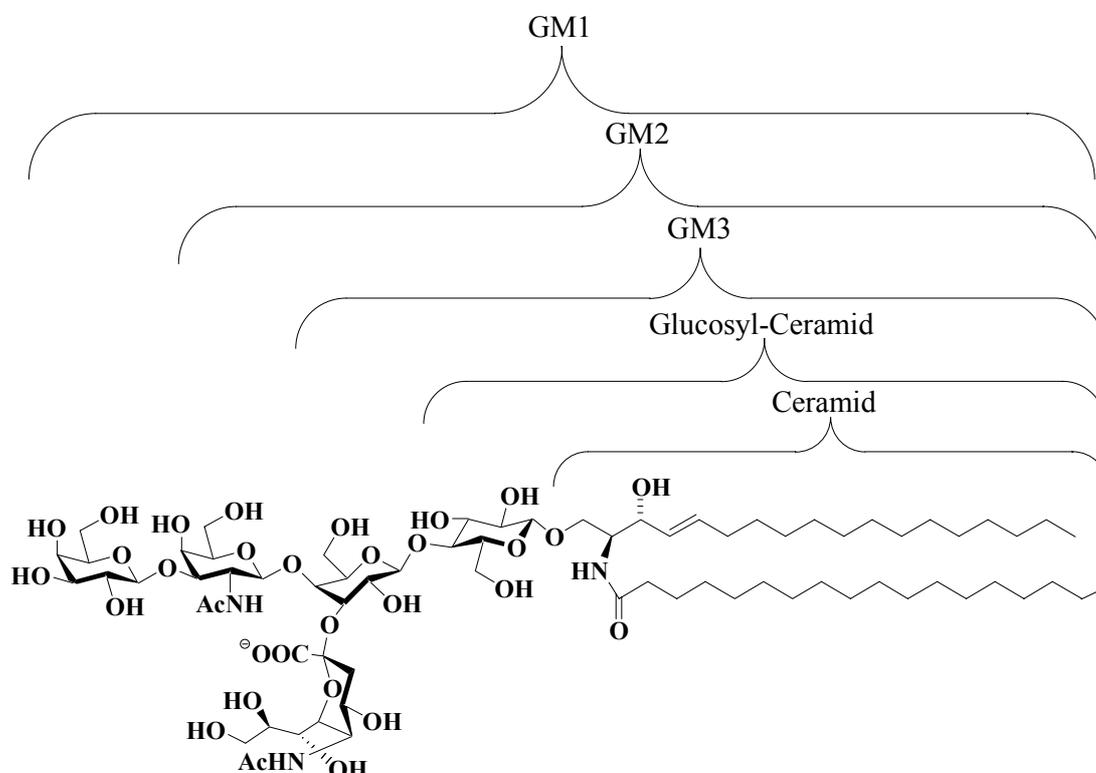


Abb. 3.12: GM1-Struktur: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}(3 \leftarrow 2 \alpha \text{NeuAc})\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$. Davon können weitere Strukturen von Gangliosiden und Ceramiden abgeleitet werden. Die Gangliosidnotation erfolgt nach Svennerholm (1963).

Sialinsäure beträgt 2,6 (Luckham et al., 1993a), so daß Lipide in dieser Arbeit in ihrer anionischen Form vorlagen.

Außer Ceramid gibt es noch weitere kohlenhydratfreie Sphingolipide wie z. B. das phosphocholinhaltige Sphingomyelin (SM, *N*-Acyl-sphingosyl-phosphocholin), das in den Membranen von Endosomen, Lysosomen und dem Golgi-Apparat auftritt. Neben seiner strukturellen Funktion in der Membran, ist es ein wichtiger Bestandteil im Cholesterin- und Phosphatidylcholinmetabolismus. Bei der Niemann-Pick-Krankheit (Typ A und B) kommt es zu einer massiven Anhäufung von SM in den Lysosomen (Linke et al., 2001). Neuerdings sind bestimmte Abbauprodukte von SM (z. B. Ceramid-1-phosphat) als wichtige Signalmoleküle in der Zellproliferation, der Zelldifferentiation und dem programmierten Zelltod identifiziert worden (Meyer zu Heringsdorf et al., 1997).

3.2.2.1 GM1

3.2.2.1.1 IRRAS

In Abb. 3.13 (links) sind für das Gangliosid GM1, das Phospholipid DPPC- d_{62} und den Mischfilm DPPC- d_{62} /GM1 4:1 typische IRRAS-Spektren mit p- bzw. s-Polarisation bei einem Oberflächendruck von ca. 28 mN/m an der Luft/Wasser-Grenzfläche abgebildet. Die Gangliosidspektren zeigen die charakteristischen CH_2 -Streckschwingungsfrequenzen und die Amid-II-Bande. Zwischen 1150 und 1000 cm^{-1} liegt der für Zucker charakteristische Bereich mit $\nu(\text{C-O})$ -Banden der COH- und COC-Gruppen (Brandenburg & Seydel, 1996). Wenn D_2O statt H_2O als Subphase verwendet wurde, um die H_2O -Deformationsbande bei ca. 1650 cm^{-1} zu vermeiden, konnte im Gebiet der Carbonylstreckschwingungen eine leicht asymmetrische Bande mit einem Minimum bei ca. 1612 cm^{-1} gefunden werden (Abb. 3.13, rechts). Da das verwendete D_2O einen pD-Wert von ca. 8 hatte, konnte diese Bande hauptsächlich der Carboxylatgruppe der Sialinsäure ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) zugeordnet werden (Müller & Blume, 1993; Müller et al., 1996; Khalil et al., 2000). Bei ca. 1630 cm^{-1} liegt die Amid-I-Bande als Schulter

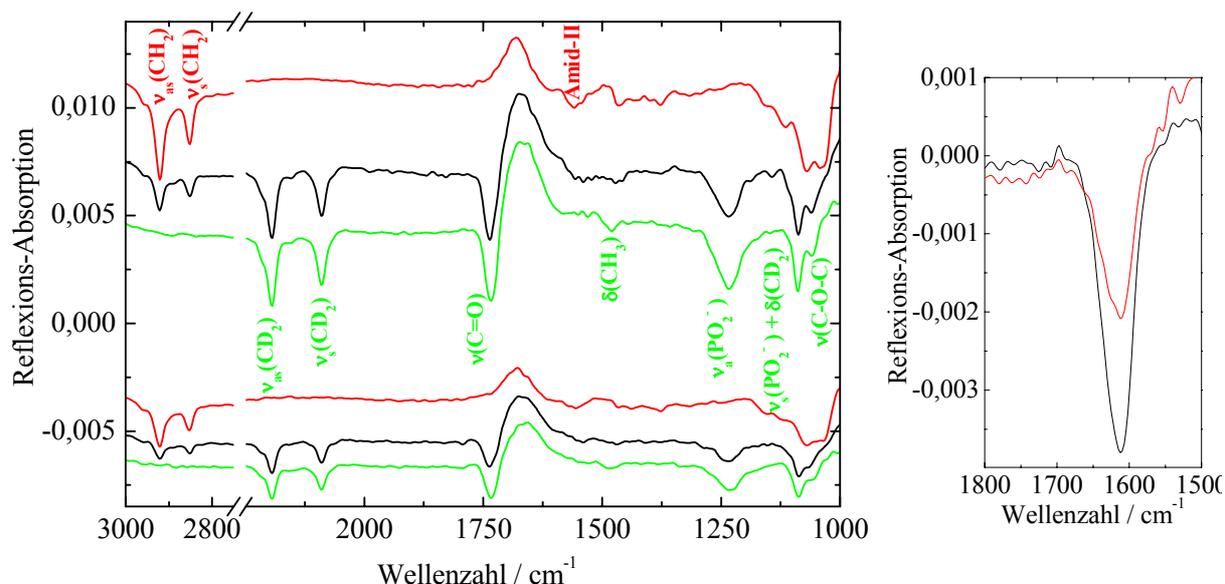


Abb. 3.13: IRRAS-Spektren von GM1 (—), DPPC- d_{62} /GM1 4:1 (—) und DPPC- d_{62} (—) bei 28 mN/m, auf H_2O bei 20 °C, p- bzw. s-Polarisation (obere bzw. untere Spektren), Einfallswinkel: 42° (links). IRRAS-Spektren von GM1 mit p-Polarisation (—) bzw. s-Polarisation (—) auf D_2O bei einem Einfallswinkel von 40° (rechts).

der Carboxylatbande vor, während keine $\nu(\text{COOD})$ -Bande zu sehen ist. Die Amid-II-Bande wurde durch H/D-Austausch in den Wellenzahlbereich unterhalb von 1500 cm^{-1} verschoben. Im Spektrum des DPPC- d_{62} sind neben den CD_2 -Streckschwingungsbanden vor allem die Estercarbonylstreckschwingung, sowie die antisymmetrische und symmetrische Phosphatstreckschwingung zu sehen. Über den Grad der Wasserstoffbrückenbindungen der $\nu(\text{C=O})$ -Bande läßt sich aufgrund der Überlagerung mit der H_2O -Deformationsbande und der daraus resultierenden Verschiebung der $\nu(\text{C=O})$ -Bande keine Aussage machen. Die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ - und die $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ -Banden liegen bei ca. 1234 cm^{-1} und 1088 cm^{-1} und sind gegenüber Messungen in Transmission um 4 cm^{-1} bzw. 3 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschoben (Müller & Blume, 1993; Müller, 1995; Khalil et al., 2000), was auf eine stärkere Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche hindeutet. Im Mischfilm DPPC- d_{62} /GM1 4:1 sind schließlich die charakteristischen Schwingungen beider Komponenten zu beobachten, wobei es im Bereich der $\nu(\text{PO}_2^-)$ - und $\nu(\text{C-O})$ -Banden zu Überlagerungen kommt.

Die π/A -Isothermen von GM1, DPPC- d_{62} , DMPC- d_{54} , DPPC- d_{62} /GM1 4:1, DMPC- d_{54} /GM1 4:1 auf H_2O sind in Abb. 3.14 dargestellt. Die Isotherme des Gangliosids GM1 ist vergleichbar mit bisherigen Ergebnissen, vor allem die Schulter bei ca. 20 mN/m , die einem Phasenübergang zugeordnet wird (Beitinger et al., 1989; Luckham et al., 1993a; Cheng & Stevens, 1997). Dabei kommt es zu einer Umorientierung innerhalb der polaren Oligosaccharidkopfgruppe (Probst et al., 1984) oder zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen (Luckham et al., 1993a). Im Gegensatz dazu finden Fidelio et al. (1991) eine rein flüssig-expandierte Phase für das GM1 über den gesamten Bereich der Isotherme nach zusätzlichen Reinigungsprozeduren des Gangliosids (Fidelio et al., 1986; Maggio et al., 1978a). Die π/A -Isotherme der DPPC- d_{62} /GM1-Mischung ist qualitativ mit Literaturdaten von DPPC/GM1-Filmen vergleichbar. Die Form der DPPC- d_{62} /GM1-Isotherme ähnelt der des reinen DPPC- d_{62} -Films. Der Phasenübergang erfolgt weniger scharf und bei einem niedrigeren Oberflächendruck, wie es auch für Mischungen mit DPPC gefunden wurde (Luckham et al., 1993a). Außerdem wurde eine negative Abweichung von der idealen, mittleren Molekülfläche nach der Oberflächenadditivitätsregel (Gaines, 1966) beobachtet, so daß DPPC- d_{62} und GM1 in Monoschichten mischbar sind. Um den kondensierenden Effekt zu erklären wurde postuliert, daß das Phosphatidylcholin durch Sialinsäure gebunden wird und zusammen mit dem Gangliosid einen Komplex oder zumindest eine komplementäre Packung bildet (Maggio et al., 1980; Luckham et al., 1993b). Die Isotherme des DMPC- d_{54} /GM1 4:1-Films zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Isotherme des reinen Phospholipids DMPC- d_{54} .

Außer den π/A -Isothermen zeigt Abb. 3.14 die Frequenzen der CH_2 - bzw. CD_2 -Methylenstreckschwingungsbanden von GM1, den Phospholipiden DPPC- d_{62} und DMPC- d_{54} und den Phospholipid/GM1-Filmen (4:1) als Funktion der molekularen Fläche. Das Gangliosid GM1 zeigt an der Schulter der π/A -Isotherme den Ansatz einer Phasenumwandlung, da ab dieser Molekülfläche bei weiterer Kompression die Methylenstreckschwingungsfrequenzen zu tieferen Wellenzahlen verschoben werden. Allerdings erreicht diese Frequenz bei dem höchstmöglichen Oberflächendruck nur einen Wert von ca. $2919,8\text{ cm}^{-1}$, was auf keine vollständige *all-trans*-Konformation der Ketten hindeutet. Die Gründe dafür könnten die *trans*-Doppelbindung im Sphingosinrückgrat oder ungesättigte Fettsäurereste sein.

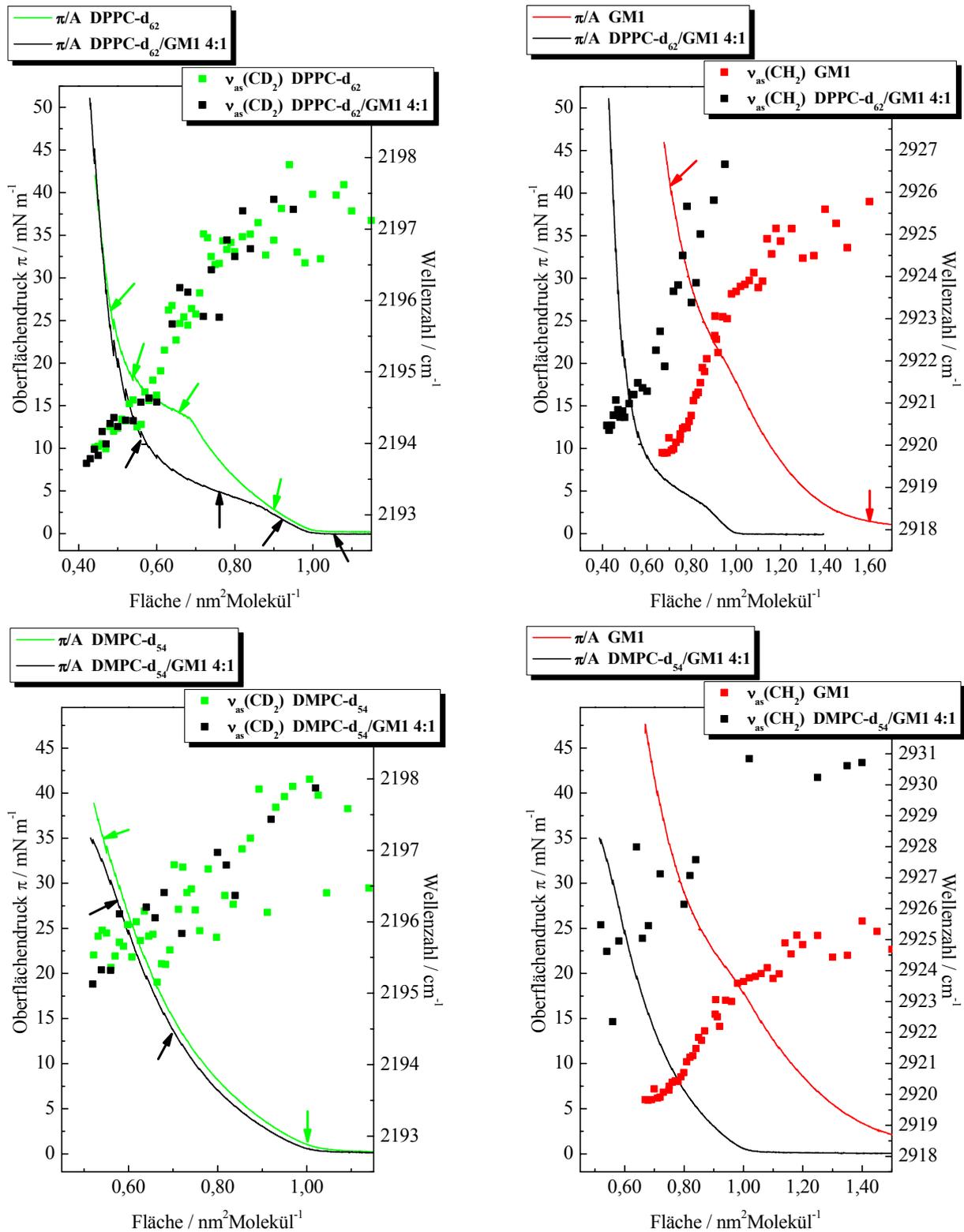


Abb. 3.14: IRRAS- π/A -Isothermen von DPPC-d₆₂ (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), GM1 (—, ■) und DPPC-d₆₂/GM1 4:1 (—, ■) (oben). IRRAS- π/A -Isothermen von DMPC-d₅₄ (—, ■), GM1 (—, ■) und DMPC-d₅₄/GM1 4:1 (—, ■) (unten). Komplementär dazu sind die $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramme (links) bzw. $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramme (rechts) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H₂O bei 20 °C. Die Pfeile zeigen die Punkte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen an (siehe Kap. 3.2.2.1.2).

Im Mischfilm mit DPPC-d₆₂ deutet die Frequenzlage der CH₂-Banden des Gangliosids auf einen weniger geordneten Zustand der Alkylketten hin, da nur eine Frequenz von ca. 2920,5 cm⁻¹ erreicht wird, während die Ordnung im Mischfilm mit DMPC-d₅₄ als ungeordnet angesehen werden kann. Die antisymmetrischen CH₂-Streckschwingungsbanden haben in diesem Film nur geringe Intensitäten, was die starke Streuung der beobachteten Frequenzen erklärt.

Die Orientierungen der Alkylketten des Gangliosids GM1 und des DPPC-d₆₂ bei bestimmten Oberflächendrücken sind in Tab. 3.3 aufgelistet. Die Tilt- und Twistwinkel des GM1 sind unter Vorbehalt zu betrachten, da die Alkylketten des Gangliosids nicht in einer vollkommenen *all-trans*-Konformation vorliegen. Man erkennt bei dem reinen Gangliosid und dem Phospholipid vergleichbare Tiltwinkel von ca. 32° bzw. 28° bei einem Oberflächendruck von ca. 30 bzw. 40 mN/m. Die Ketten richten sich mit zunehmender Kompression ein wenig auf und die Twistwinkel sind für beide Substanzen immer nahe an 45°, was auf eine annähernd rotationssymmetrische Anordnung der Alkylketten hindeutet. Im Mischfilm kommt es zu einer Aufrichtung der Ketten von beiden Lipiden zu Tiltwinkeln von ca. 24° bei größeren mittleren Molekülflächen. Bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m kommt es zu einer weiteren Aufrichtung der Acylketten des DPPC-d₆₂ zu einem Tiltwinkel von ca. 19° während sich beim Gangliosid der Tiltwinkel von 25° nicht ändert und sich stattdessen der Twistwinkel auf ca. 56° erhöht. Dies läßt sich eventuell mit der Ausbildung von GM1-Clustern in der flüssig-kondensierten DPPC-Matrix oder GM1-angereicherten Filamenten erklären (Yuan & Johnston, 2000). Eine Röntgen-Diffraktions- und Röntgen-Reflektometriestudie an GM1 und GM1/DPPE-Mischfilmen zeigte im Gegensatz zu den hier dargestellten Tiltwinkeln für das Gangliosid eine Ausrichtung senkrecht zur Luft/Wasser-Grenzfläche für alle Filmzusammensetzungen (Majewski et al., 2001).

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
		$\nu_{as, s}(CD_2)$				$\nu_{as, s}(CH_2)$			
GM1	28,7 ± 0,5					32 ± 2	45 ± 3	0,349	0,192
						32 ± 2		0,347	0,193
GM1	39,4 ± 0,5					28 ± 2	45 ± 3	0,399	0,223
						28 ± 2		0,398	0,224
DPPC-d ₆₂ / GM1 4:1	28,9 ± 0,4	23 ± 3	40 ± 5	0,252	0,179	25 ± 3	46 ± 5	0,126	0,072
		24 ± 3		0,250	0,184	25 ± 3		0,126	0,071
DPPC-d ₆₂ / GM1 4:1	39,8 ± 0,5	19 ± 3	46 ± 5	0,246	0,179	25 ± 3	56 ± 5	0,133	0,083
		19 ± 3		0,246	0,177	23 ± 3		0,136	0,076
DPPC-d ₆₂	28,8 ± 1,5	31 ± 2	43 ± 3	0,299	0,223				
		31 ± 2		0,294	0,227				
DPPC-d ₆₂	39,7 ± 0,6	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				

Tab. 3.3: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von GM1 und DPPC-d₆₂ auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

3.2.2.1.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Um Aussagen über das Phasenverhalten in Monoschichten zu erhalten wurde die Fluoreszenz-Mikroskopie angewendet. Aufgrund der geringeren Löslichkeit des Fluoreszenzlabels in flüssig-kondensierten Phasen werden beim LE/LC-Phasenübergang die kondensierten Domänen als schwarze Fläche detektiert. Für DPPC- d_{62} wurden analog zu DPPC für den Phasenübergang flüssig-expandiert/flüssig-kondensiert nieren- und propellerförmige Domänen gefunden (Abb. 3.15) (Krüger & Lösche, 2000). Das Phospholipid DMPC- d_{54} liegt bei 20 °C im gesamten Bereich der π/A -Isotherme als flüssig-expandierter Film vor, in dem der Fluoreszenzfarbstoff NBD-PC homogen verteilt ist (Anhang Abb. A.6.1). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Gangliosids GM1 ergaben keinen Hinweis auf eine Phasenumwandlung an der charakteristischen Schulter in der π/A -Isotherme. Die Fluoreszenzbilder zeigen die homogen fluoreszierende Oberfläche eines flüssig-expandierten Films (Anhang Abb. A.6.2).

Der Mischfilm DPPC- d_{62} /GM1 4:1 bildet bei der Filmkompression direkt nach dem Anstieg des Oberflächendrucks („lift-off“) kleine Domänen aus (Abb. 3.16 B), und zwar vor dem eigentlichen Beginn der Phasenumwandlung bei ca. 0,87 nm² (Abb. 3.14; Abb. 3.16 C, D). Die Domänen sind teilweise annähernd rund bzw. nehmen eine abgerundete, nierenförmige Form an. Eine laterale Phasenseparation bei kleinen Oberflächendrücken in unvermischbare, fluide Phasen wurde mit DPPC und Cholesterol gefunden (Worthman et al., 1997). Es entsteht eine den Farbstoff ausschließende Phase, die jedoch nicht mit der klassischen, flüssig-kondensierten Phase gleichzusetzen ist (Subramaniam & McConnell, 1987). Diese Phase ist höher geordnet als die flüssig-expandierte Phase und wurde flüssig-geordnet („liquid ordered“) genannt. Bei Studien an Phospholipid/GM1-Filmen wurde beobachtet, daß sich GM1 in einer phasenseparierten DOPC/DPPC-Matrix bevorzugt in der flüssig-kondensierten DPPC-Phase verteilt (Vie et al., 1998). In AFM-Aufnahmen von

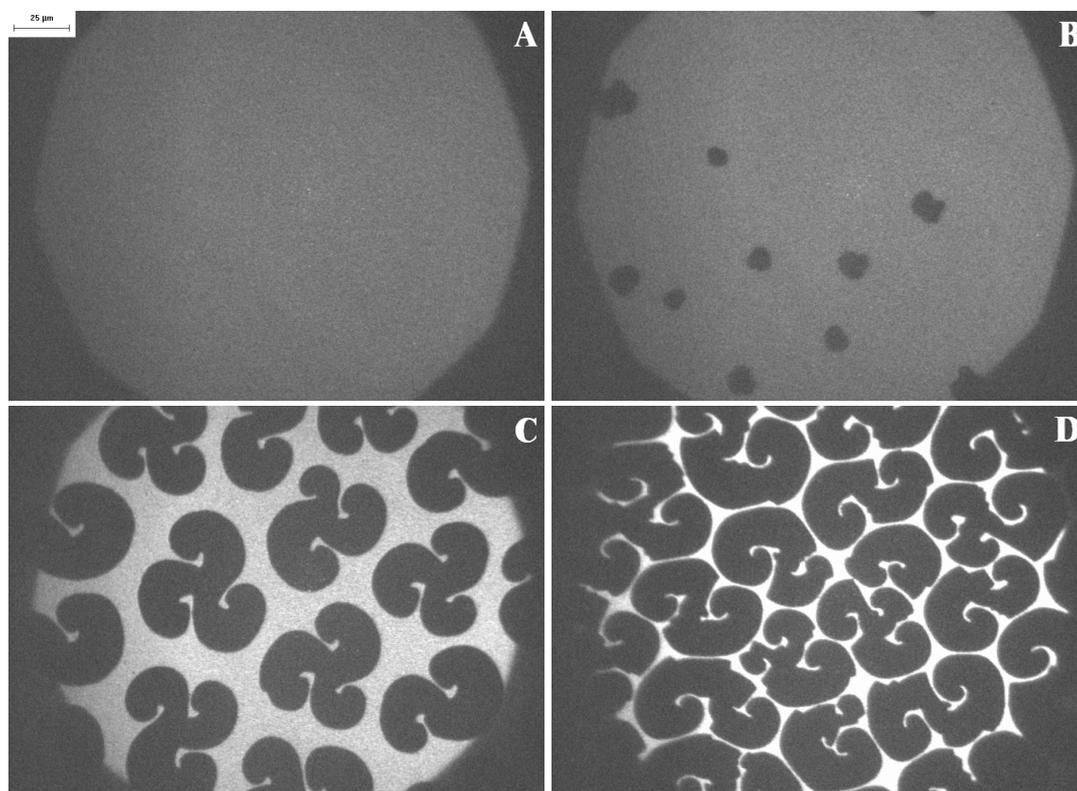


Abb. 3.15: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DPPC- d_{62} (Isotherme: Abb. 3.14 oben links; A: 0,90 nm²; B: 0,65 nm²; C: 0,55 nm²; D: 0,50 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μm.

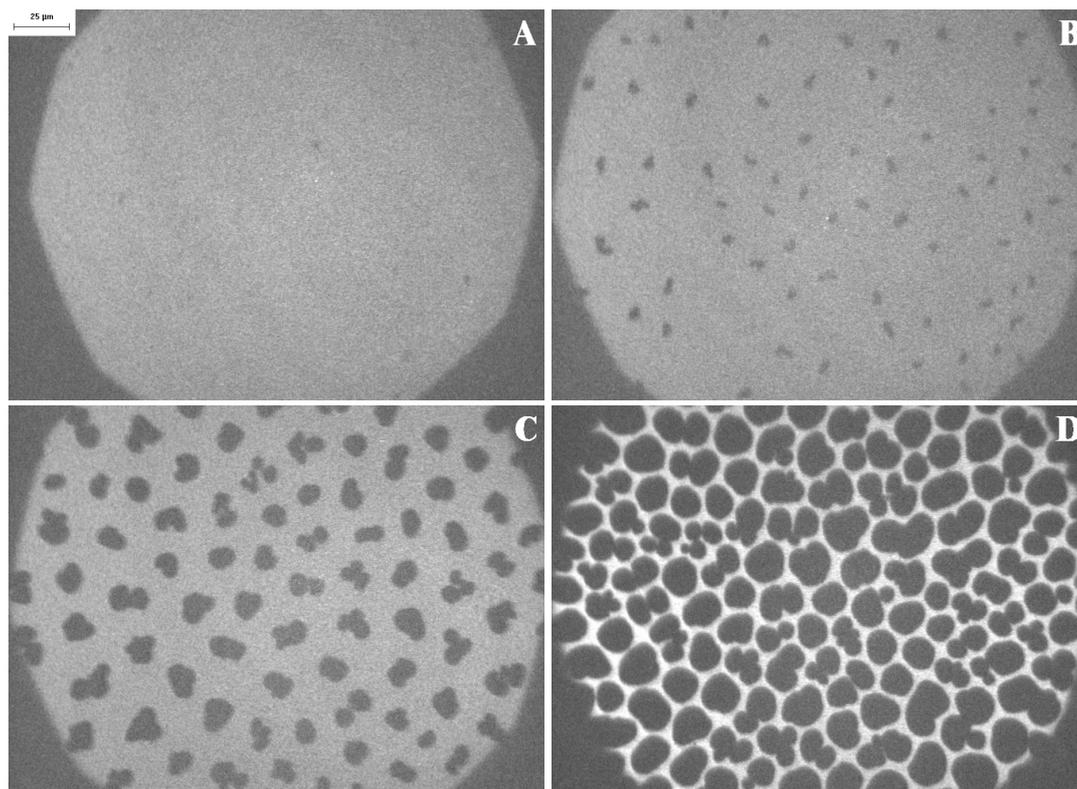


Abb. 3.16: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DPPC-d₆₂/GM1 4:1 (Isotherme: Abb. 3.14 oben links; A: 1,05 nm²; B: 0,92 nm²; C: 0,75 nm²; D: 0,55 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

DPPC/GM1-Mischungen wurden in den LC-Domänen kleine Flecken gefunden, die ca. 0,8 nm höher als die LC-Domänen waren. Diese Flecken waren GM1-Cluster, die sich auch am Rand der LC-Domäne zu Filamenten zusammenlagerten (Yuan & Johnston, 2000). Es wurde postuliert, daß kleine gangliosidreiche Mikrodomänen innerhalb größerer, geordneter Domänen sowohl in natürlichen als auch in Modellmembranen existieren (Yuan & Johnston, 2001).

Aus diesen Ausführungen könnte für den in dieser Arbeit untersuchten DPPC-d₆₂/GM1 4:1-Film geschlossen werden, daß die beobachteten Domänen (Abb. 3.16 B) an GM1 angereichert sind.

Die Fluoreszenz-Mikroskopie des DMPC-d₅₄/GM1 4:1-Films zeigt zu Beginn des π/A -Isothermenverlaufs eine homogen fluoreszierende Fläche einer flüssig-expandierten Phase (Abb. 3.17 A), während sich oberhalb eines Oberflächendruckes von 30 mN/m kleine, runde Domänen ausbilden (Abb. 3.17 B), die bis zum nahen Kollapspunkt nur noch geringfügig größer wurden. Holopainen et al. (2001) beobachteten, daß DMPC und das Ceramid C24:1-Cer (4:1) unterhalb von 15 mN/m ebenfalls keine Anzeichen einer Phasenseparation zeigten, ehe ein weiterer Druckanstieg zu einem LE/LC-Phasenübergang führte. Diese beiden Substanzen sind in der flüssig-expandierten und flüssig-kondensierten Phase teilweise mischbar und wie bei dem in dieser Arbeit untersuchten DMPC-d₅₄/GM1 4:1-Film war der Phasenübergang nicht allein an der π/A -Isotherme zu erkennen. Da der Phasenübergang sehr nahe am Kollapspunkt liegt, konnte auch anhand der CD₂-Methylenstretschwingungsfrequenzen des DMPC-d₅₄ kein Phasenübergang erkannt werden (im Gegensatz zu dem Mischfilm mit GM2; siehe Kap. 3.2.2.2).

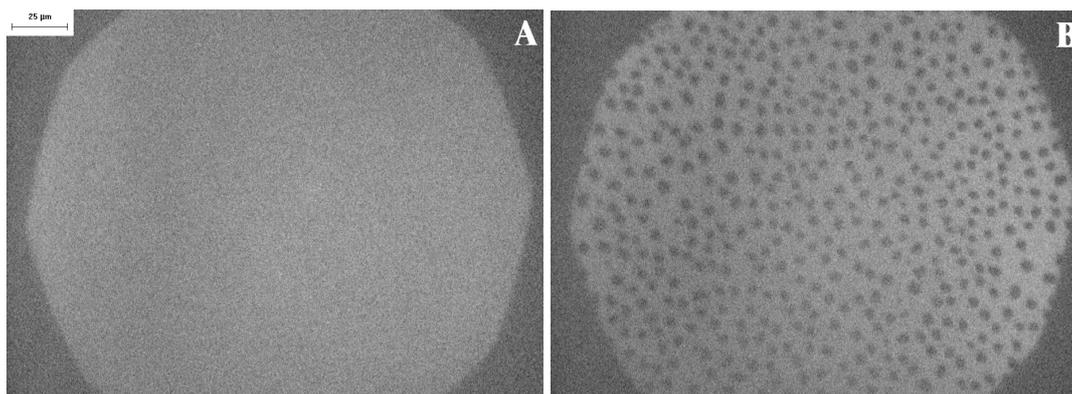


Abb. 3.17: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DMPC-d₅₄/GM1 4:1 (Isotherme: Abb. 3.14 unten links; A: 0,70 nm²; B: 0,60 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μm.

3.2.2.2 GM2

3.2.2.2.1 IRRAS

Die π/A -Isothermen von GM2, DPPC-d₆₂, DMPC-d₅₄, DPPC-d₆₂/GM2 4:1, DMPC-d₅₄/GM2 4:1 auf H₂O sind in Abb. 3.18 dargestellt. Der Isothermenverlauf des Gangliosids GM2 zeigt den einer flüssig-expandierten Phase (Fidelio et al., 1986; Maggio et al., 1978). Die beiden Mischfilme der Phospholipide DPPC-d₆₂ und DMPC-d₅₄ sind mit den Mischfilmen des GM1 vergleichbar. Der Phasenübergang des DPPC-d₆₂/GM2-Mischfilms erfolgt weniger scharf und bei einem niedrigeren Oberflächendruck.

Die Auswertung der CH₂-Methylenstreckschwingungsfrequenzen des GM2 zeigt, daß es zu einer zunehmenden Ordnung der Kohlenwasserstoffketten kommt, auch wenn die π/A -Isotherme keinen Phasenübergang anzeigt. Es wird eine leicht höhere Ordnung als bei dem Gangliosid GM1 erreicht, was durch die Frequenz von ca. 2919,6 cm⁻¹ angedeutet wird. Im Mischfilm ist das Verhalten der GM2-CH₂-Ketten vergleichbar mit dem des GM1 in seinen Mischungen. Bei einem erhöhtem Oberflächendruck liegen die Methylenstreckschwingungsfrequenzen über denen des reinen GM2 und zeigen eine verringerte Ordnung an. Die Acylketten des DPPC-d₆₂ im DPPC-d₆₂/GM2 4:1-Mischfilm zeigen ein ähnliches Verhalten wie die des reinen DPPC-d₆₂-Films. Bei dem DMPC-d₅₄ im Mischfilm kommt es ab einem Oberflächendruck von ca. 20 mN/m zu einer deutlichen Verschiebung der antisymmetrischen CD₂-Streckschwingungsbande zu tieferen Frequenzen, was im Gegensatz zum reinen DMPC-d₅₄ auf den Beginn einer Phasenumwandlung hindeutet. Diese Annahme wird durch die Fluoreszenz-Mikroskopie gestützt (siehe Kap. 3.2.2.2.2).

In Tab. 3.4 sind die Tilt- und Twistwinkel von GM2 und DPPC-d₆₂ in den separaten Filmen als auch im Mischfilm DPPC-d₆₂/GM2 4:1 bei Oberflächendrücken von ca. 30 und 40 mN/m dargestellt. Die Alkylketten in den reinen Monoschichtfilmen des Gangliosids GM2 sind gegenüber denen des DPPC-d₆₂ weniger stark geneigt (bei ca. 40 mN/m 25° gegenüber 28°). Der Twistwinkel des GM2 von annähernd 45° deutet wie beim GM1 auf eine rotationssymmetrische Verteilung der Übergangsdipolmomente um die Moleküllängsachse hin. Im DPPC-d₆₂/GM2 4:1-Film konnten nur die Tilt- und Twistwinkel des DPPC-d₆₂ bestimmt werden, da die maximalen $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ -Bandenintensitäten des GM2 aufgrund niedriger Intensitätswerte nicht exakt ausgewertet werden konnten. Die CD₂-Alkylketten im Mischfilm richten sich im Vergleich zu den Ketten im reinen DPPC-d₆₂-Film nur geringfügig auf.

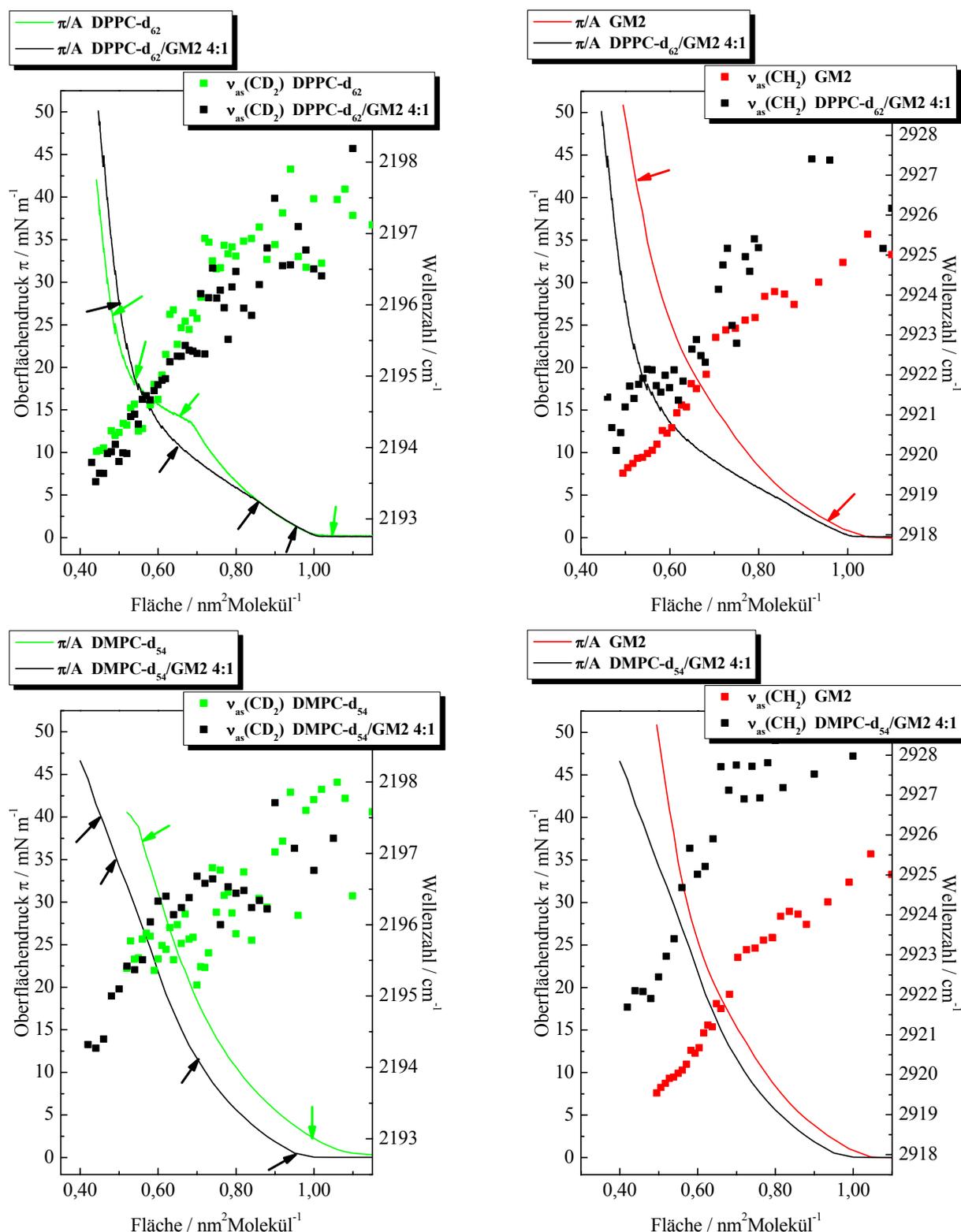


Abb. 3.18: IRRAS- π/A -Isothermen von DPPC- d_{62} (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), GM2 (—, ■) und DPPC- $d_{62}/\text{GM2}$ 4:1 (—, ■) (oben). IRRAS- π/A -Isothermen von DMPC- d_{54} (—, ■), GM2 (—, ■) und DMPC- $d_{54}/\text{GM2}$ 4:1 (—, ■) (unten). Komplementär dazu sind die $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramme (links) bzw. $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramme (rechts) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O bei 20°C . Die Pfeile zeigen die Punkte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen an (siehe Kap. 3.2.2.2.2; DPPC- d_{62} : Abb. 3.15; DMPC- d_{54} : Anhang Abb. A.6.1).

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
		$v_{as, s}(CD_2)$				$v_{as, s}(CH_2)$			
GM2	$30,6 \pm 0,3$					27 ± 2	46 ± 3	0,395	0,225
						27 ± 2		0,398	0,224
GM2	$38,9 \pm 0,9$					25 ± 2	45 ± 3	0,424	0,240
						25 ± 2		0,425	0,240
DPPC-d ₆₂ / GM2 4:1	$28,8 \pm 0,5$	27 ± 3	41 ± 5	0,273	0,188	-	-	-	-
		28 ± 3		0,269	0,194	-	-	-	-
DPPC-d ₆₂ / GM2 4:1	$37,9 \pm 0,5$	26 ± 3	43 ± 5	0,282	0,199	-	-	-	-
		26 ± 3		0,279	0,202	-	-	-	-
DPPC-d ₆₂	$28,8 \pm 1,5$	31 ± 2	43 ± 3	0,299	0,223				
		31 ± 2		0,294	0,227				
DPPC-d ₆₂	$39,7 \pm 0,6$	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				

Tab. 3.4: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von GM2 und DPPC-d₆₂ auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

3.2.2.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Gangliosids GM2 zeigen wie für das GM1 über die gesamte π/A -Isotherme eine homogen fluoreszierende Oberfläche einer flüssig-expandierten Phase (Anhang Abb. A.6.3). Im DPPC-d₆₂/GM2 4:1-Mischfilm konnte noch vor der eigentlichen LE/LC-Phasenumwandlung die Bildung kleiner, annähernd runder Domänen beobachtet werden (Abb. 3.19 A). Wie beim GM1 kommt es zu einer fluid/fluid-Phasenseparation. Im Verlauf der Phasenumwandlung sind auch einige abgerundete, nierenförmige Domänen zu sehen (Abb. 3.19 C).

Der DMPC-d₅₄/GM2 4:1-Film liegt bei großen, mittleren Molekülflächen als flüssig-expandierter Film vor. Dies zeigen die homogen fluoreszierenden Mikroskopbilder bis zu einem Oberflächendruck von ca. 20 bis 25 mN/m (Abb. 3.20 A, B). Bei höheren Drucken kommt es zur Ausbildung von kleinen, sternförmigen Domänen (Abb. 3.20 C, D), die sich bis zum Kollapsunkt des Films nur geringfügig vergrößern. Bei diesem Film ist der Beginn der LE/LC-Phasenumwandlung sowohl mit der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie, als auch mit der Fluoreszenz-Mikroskopie gut detektierbar.

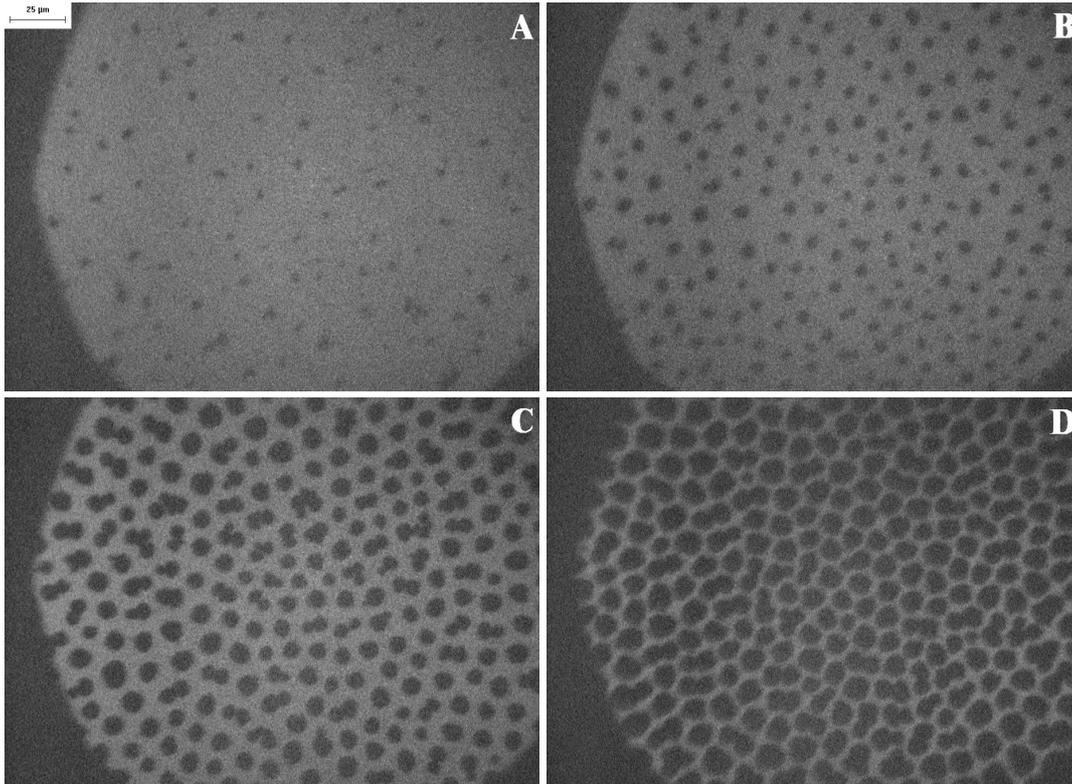


Abb. 3.19: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DPPC-d₆₂/GM2 4:1 (Isotherme: Abb. 3.18 oben links; A: 0,95 nm²; B: 0,85 nm²; C: 0,65 nm²; D: 0,52 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

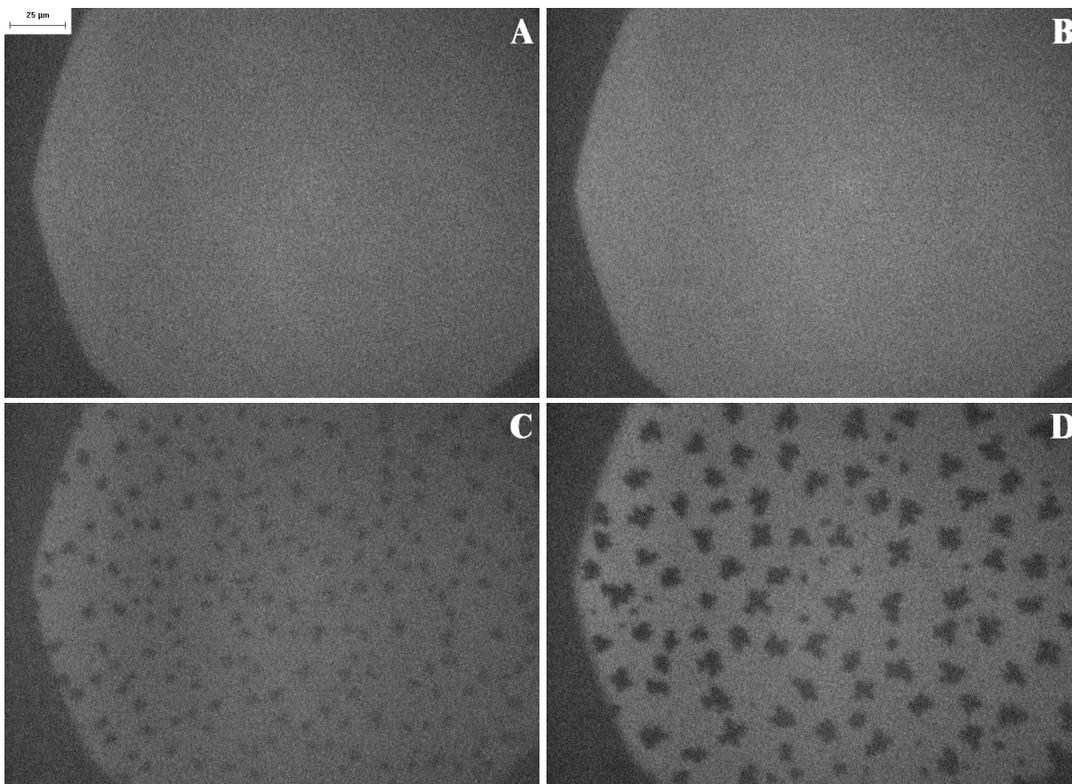


Abb. 3.20: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DMPC-d₅₄/GM2 4:1 (Isotherme: Abb. 3.18 unten links; A: 0,95 nm²; B: 0,70 nm²; C: 0,50 nm²; D: 0,45 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

3.2.2.3 GM3

3.2.2.3.1 IRRAS

Das Gangliosid GM3 zeigt bei 20 °C auf H₂O einen LE/LC-Phasenübergang (Maggio et al., 1978a; Fidelio et al., 1986), der allerdings in den π/A -Isothermen der eigenen Messungen nicht sehr scharf ausgeprägt ist (Beginn bei ca. 0,90nm² und 7 mN/m; Abb. 3.21). Die Isotherme des DPPC-d₆₂/GM3 4:1-Mischfilms zeigt ebenfalls einen Phasenübergang unterhalb von 5 mN/m. Wie im DMPC-d₅₄/GM3 4:1-Mischfilm sind die mittleren Molekülflächen bei einem bestimmten Oberflächendruck gegenüber den reinen Lipidfilmen zu kleineren Flächenwerten verschoben, was zumindest teilweise eine Mischbarkeit der jeweiligen Lipide andeutet (Abweichung von der idealen Mischbarkeit).

Aus der Frequenzverschiebung der CH₂-Streckschwingungsbanden erkennt man deutlich den LE/LC-Phasenübergang für das GM3. Die für den flüssig-kondensierten Phasenzustand beobachtete antisymmetrische Streckschwingungsfrequenz von ca. 2918,5 cm⁻¹ deutet auf eine hohe Ordnung innerhalb der CH₂-Ketten hin. Das Verhalten der Phospholipid/GM3-Mischfilme ist mit dem der GM2-Mischfilme vergleichbar.

Die Alkylketten des Gangliosids GM3 besitzen in einem reinem GM3-Film einen Tiltwinkel von 24° bzw. 22° bei Oberflächendrucken von ca. 30 bzw. 40 mN/m (Tab. 3.5). Sie sind weniger geneigt als die Ketten des DPPC-d₆₂ (31° bzw. 28°). In DPPC-d₆₂/GM3 4:1-Mischfilmen kommt es zu einer Angleichung der Tiltwinkel der beiden Lipide, d. h. die Ketten des GM3 neigen sich ein wenig stärker, während die Ketten des DPPC-d₆₂ sich ein wenig aufrichten (bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m haben sie einen Tiltwinkel von 26° für GM3 respektive 23° für DPPC-d₆₂). Die Twistwinkel beider Moleküle zeigen in allen Filmen ähnliche Werte von ca. 45°.

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
		$\nu_{as, s}(CD_2)$				$\nu_{as, s}(CH_2)$			
GM3	29,0 ± 0,5					24 ± 2	45 ± 3	0,525	0,298
						24 ± 2		0,525	0,298
GM3	40,2 ± 0,3					22 ± 2	44 ± 3	0,564	0,322
						22 ± 2		0,562	0,322
DPPC-d ₆₂ / GM3 4:1	27,9 ± 1,2	26 ± 3	41 ± 5	0,245	0,173	29 ± 3	44 ± 5	0,164	0,095
		26 ± 3		0,242	0,178	27 ± 3		0,156	0,089
DPPC-d ₆₂ / GM3 4:1	37,9 ± 0,6	23 ± 3	43 ± 5	0,250	0,177	26 ± 3	48 ± 5	0,164	0,098
		23 ± 3		0,248	0,178	26 ± 3		0,166	0,095
DPPC-d ₆₂	28,8 ± 1,5	31 ± 2	43 ± 3	0,299	0,223				
		31 ± 2		0,294	0,227				
DPPC-d ₆₂	39,7 ± 0,6	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				

Tab. 3.5: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von GM3 und DPPC-d₆₂ auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

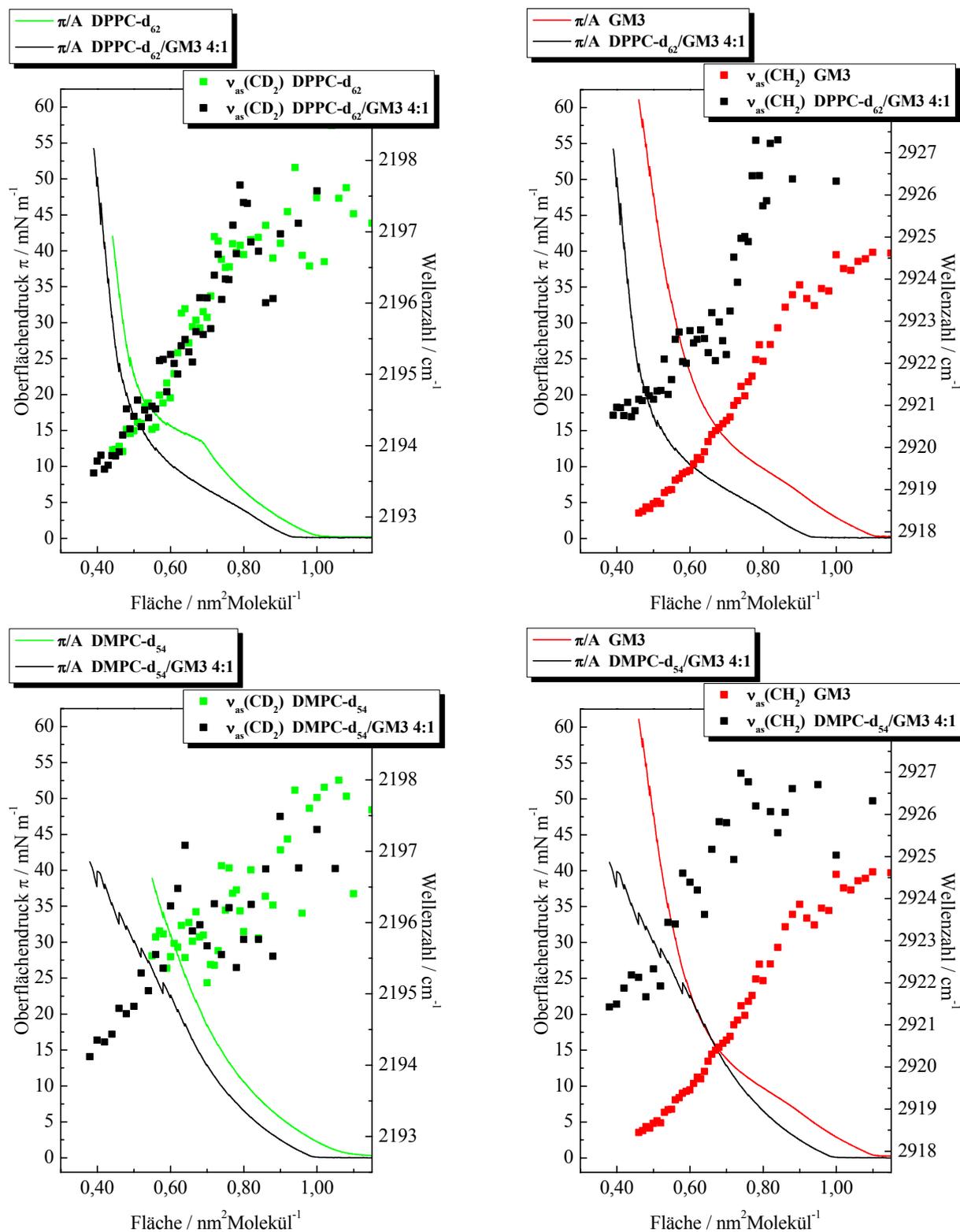


Abb. 3.21: IRRAS- π/A -Isothermen von DPPC-d₆₂ (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), GM3 (—, ■) und DPPC-d₆₂/GM3 4:1 (—, ■) (oben). IRRAS- π/A -Isothermen von DMPC-d₅₄ (—, ■), GM3 (—, ■) und DMPC-d₅₄/GM3 4:1 (—, ■) (unten). Komplementär dazu sind die $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramme (links) bzw. $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramme (rechts) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H₂O bei 20 °C.

3.2.2.4 Ceramid, Glucosylceramid und Sphingomyelin

Die in Abb. 3.22 dargestellten π/A -Isothermen zeigen, daß Ceramid und Glucosylceramid bei 20 °C als kondensierte Filme vorliegen (Maggio et al., 1978a; Vaknin & Kelley, 2000), während Sphingomyelin einen LE/LC-Phasenübergang zeigt (Beginn bei ca. 0,65 nm² und 5 mN/m; siehe auch Vaknin et al., 2001). Die Isotherme des Ceramids zeigt bei Flächen unterhalb von 0,60 nm² starke Oberflächendruckrelaxationen, die während der Kompression bei den einzelnen Haltepunkten zur Messung der IRRAS-Spektren auftreten.

Die aus den IRRAS-Spektren ermittelten Frequenzen der $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ -Banden zeigen für das Ceramid für den gesamten Isothermenverlauf Frequenzen von ca. 2917 cm⁻¹, was eine hohe konformationelle Ordnung der CH₂-Ketten anzeigt. Die CH₂-Streckschwingungsfrequenzen des Glucosylceramid von 2918,5 cm⁻¹ bei großen Molekülflächen und der Übergang zu 2917,5 cm⁻¹ während des Oberflächendruckanstiegs unterhalb von 0,45 nm² deuten ebenfalls auf hochgeordnete Alkylketten hin. Die zugrunde liegenden Phasen für das Ceramid bzw. das Glucosylceramid (flüssig-kondensiert oder festanalog) können mit IRRAS nicht bestimmt werden. Die Frequenzverschiebung der CH₂-Streckschwingungsbanden des Sphingomyelins auf ca. 2918,3 cm⁻¹ nach dem Phasenübergang zeigt relativ gut geordnete Ketten im flüssig-kondensierten Phasenzustand an.

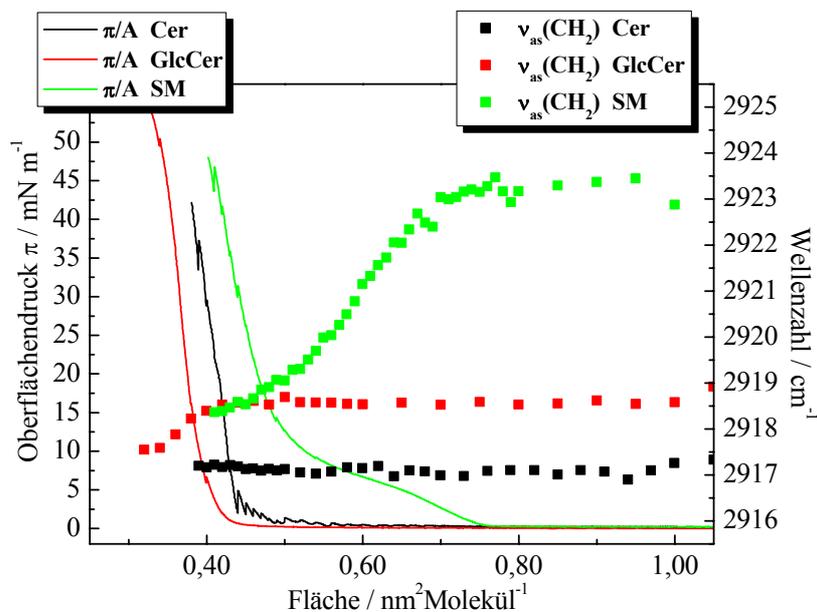


Abb. 3.22: IRRAS- π/A -Isothermen von Ceramid (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), Glucosylceramid (—, ■) und Sphingomyelin (—, ■). Komplementär dazu ist das $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramm dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H₂O bei 20 °C.

3.2.2.5 Zusammenfassung

Ceramid und Glucosylceramid bilden bei 20°C einen kondensierten Film, GM3 zeigt einen LE/LC-Phasenübergang und GM1 und GM2 sind flüssig-expandiert bzw. zeigen einen schwächer ausgeprägten LE/LC-Phasenübergang. Anhand der Fluoreszenz-Mikroskopie konnte in den DPPC-d₆₂/GM1 4:1- bzw. DPPC-d₆₂/GM2 4:1-Filmen vor dem eigentlichen Phasenübergang eine fluid/fluid-Phasenseparation beobachtet werden. In den entsprechenden Mischfilmen mit DMPC-d₅₄ konnte bei Oberflächendrücken oberhalb von ca. 20 bis 30 mN/m der Beginn eines LE/LC-Phasenübergangs gefunden werden.

Tab. 3.6 gibt einen Überblick über die berechneten Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten für die verschiedenen Sphingolipide.

Röntgen-Diffraktions- und Röntgen-Reflektometriemessungen an C18-Ceramid-Monoschichten ergaben senkrecht zur Wasseroberfläche angeordnete Ceramidketten ohne Neigung (bei einem Oberflächendruck π von ca. 36 mN/m: Vaknin et al., 2001), während eine andere IRRAS-Arbeit einen Neigungswinkel von 20° bestimmte ($\pi \approx 30$ mN/m: Flach et al., 2001). In der eigenen Arbeit wurde bei einem Druck von 37 mN/m ein Tiltwinkel von 9° ermittelt. Der Twistwinkel von 23° zeigt jedoch eine starke Verdrehung der CH₂-Ketten an.

Das Glucosylceramid besitzt eine größere Neigung von ca. 16° gegenüber der Oberflächennormalen, wobei der Twistwinkel ebenfalls einen Wert von 23° annimmt ($\pi \approx 42$ mN/m). Bei einem geringeren Oberflächendruck ($\pi \approx 32$ mN/m) sind die Ketten etwas stärker geneigt (18°) und weniger verdreht (37°).

Mit zunehmender Verlängerung der Oligosaccharidkette der Ganglioside von GM3 über GM2 zu GM1 ergibt sich bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m ein größer werdender Tiltwinkel von 22° über 25° zu 28° bei einem gleichbleibendem Twistwinkel von ca. 45°.

Das Sphingomyelin besitzt wegen seiner chemischen Verwandtschaft zu 1,2-Diacyl-Phosphatidylcholinen aufgrund der Cholinphosphatkopfgruppe auch ähnliche Eigenschaften an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m besitzt SM einen Neigungswinkel von ca. 23° (DPPC: 26°) und einen Twistwinkel von 40° (DPPC: 43°). Auch die Absorptionskoeffizienten der antisymmetrischen und symmetrischen CH₂-Streckschwingungenbanden sind vergleichbar, obwohl das hier verwendete Sphingomyelin eine Stearinfettsäurekette und das DPPC zwei Palmitinfettsäureketten besitzen ($k_{\max, as}$: 0,610 bzw. 0,607 und $k_{\max, s}$: 0,335 bzw. 0,356).

Lipid	Druck / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$	Druck / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
$v_{as, s}(CH_2)$										
GM1	28,7 ± 0,5	32±2	45±3	0,349	0,192	39,4 ± 0,5	28±2	45±3	0,399	0,223
		32±2		0,347	0,193		28±2		0,398	0,224
GM2	30,6 ± 0,3	27±2	46±3	0,395	0,225	38,9 ± 0,9	25±2	45±3	0,424	0,240
		27±2		0,398	0,224		25±2		0,425	0,240
GM3	29,0 ± 0,5	24±2	45±3	0,525	0,298	40,2 ± 0,3	22±2	44±3	0,564	0,322
		24±2		0,525	0,298		22±2		0,562	0,322
GlcCer	32,1 ± 0,5	18±2	37±3	0,740	0,410	42,1 ± 1,0	16±2	23±5	0,752	0,413
		21±2		0,748	0,434		20±2		0,757	0,446
Cer						37,0 ± 0,8	9±2	23±5	0,725	0,416
							8±2		0,710	0,418
SM	30,7 ± 0,3	27±2	44±3	0,612	0,345	40,0 ± 0,4	23±2	40±3	0,610	0,335
		27±2		0,609	0,347		24±2		0,606	0,348

Tab. 3.6: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von C18-Ceramidderivaten bei einem Oberflächendruck von ca. 30 bzw. 40 mN/m auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

In den DPPC-d₆₂/Gangliosid-Mischfilmen wurden neben der Orientierung der CD₂-Alkylketten immer die Tilt- und Twistwinkel der Ganglioside berechnet. Die Lage der CH₂-Streckschwingungsfrequenzen bei ca. 2921 cm⁻¹ bei erhöhten Oberflächendrücken deutet an, daß die Alkylketten einen gewissen Anteil an *gauche*-Konformeren enthalten. Aufgrund der Ergebnisse aus Kap. 3.2.1 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß aufgrund der vorhandenen CD₂-Ketten der Grad der intermolekularen Schwingungskopplung der CH₂-Ketten abnimmt. Die Ganglioside können also trotz erhöhter Frequenzen der CH₂-Streckschwingungsbanden eine gewisse konformationelle Ordnung besitzen, so daß die Berechnung der Tilt- und Twistwinkel legitimiert wäre. Für das DPPC-d₆₂ wird immer ein leichtes Aufrichten der Ketten beobachtet, während die Alkylketten der Ganglioside jeweils zwischen 2° bis 6° stärker als das Phospholipid geneigt sind (für GM1 und GM3; für GM2 konnte die Orientierung nicht bestimmt werden). Das GM3 wird gegenüber dem reinen Film stärker geneigt, während sich das GM1 aufrichtet.

3.2.3 Bis-(monoacylglycero)phosphate (BMP)

Dieses ungewöhnliche Lipid besteht aus zwei Monoacylglyceriden, die über eine Phosphodiestergruppe miteinander verbrückt sind. BMP besitzt eine *sn*-1-Konfiguration an seinem Glycerinrückgrat, im Gegensatz zu der für Lipide üblichen *sn*-3-Konfiguration. Es wird vermutet, daß sich die Acylketten vorwiegend an der *sn*-2- und *sn*2'-Position befinden (Heravi & Waite, 1999). Nach seiner Biosynthese ist das BMP in den Zellen relativ stabil und wird nur langsam abgebaut (Thornburg et al., 1991). Wichtig ist das Vorkommen des BMP in den Lysosomen und den späten Endosomen zur Regulation von deren Funktion und Struktur (Kobayashi et al., 1998), sowie zur Stimulation des Abbaus von Glykolipiden in den Lysosomen (siehe Kap. 3.3.3).

In Abb. 3.23 sind die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen BMP-Lipide¹ dargestellt: C16-1-BMP (Wilkening et al., 1998; Dang et al., 1982), C16-2-BMP (Dobner, 2000), C14-1-BMP und C18:1-1-BMP (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA).

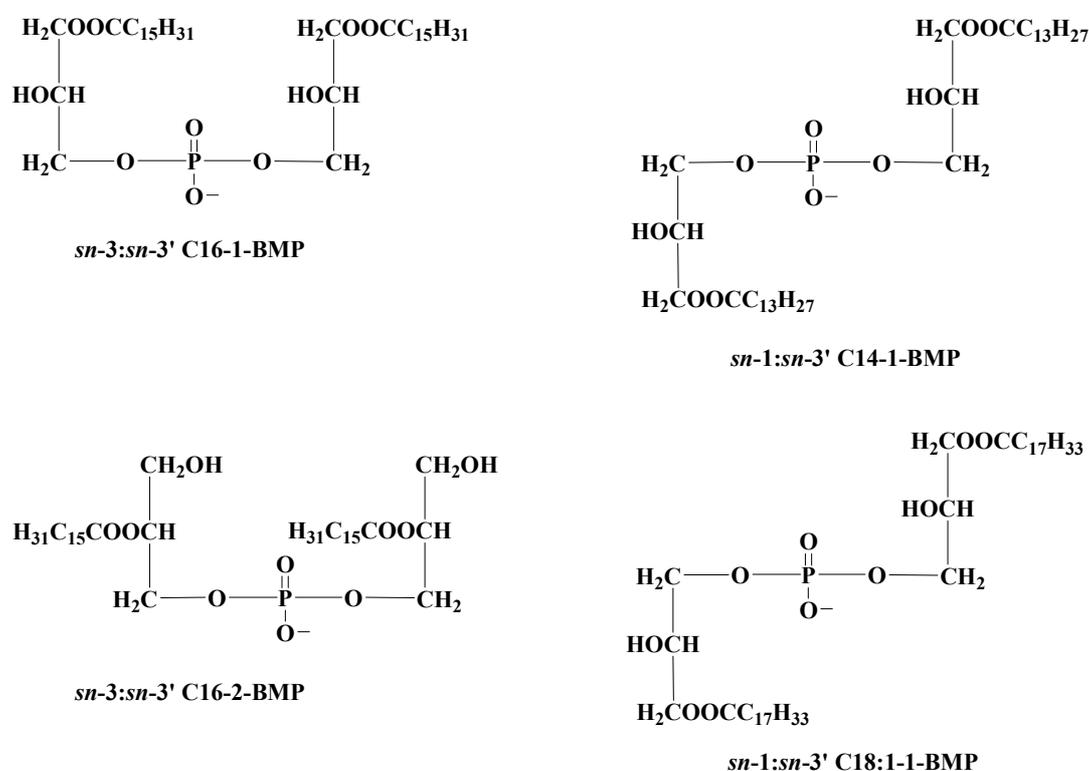


Abb. 3.23: Stereospezifische Strukturen von *sn*-3:*sn*-3' C16-1-BMP, *sn*-3:*sn*-3' C16-2-BMP, *sn*-1:*sn*-3' C14-1-BMP und *sn*-1:*sn*-3' C18:1-1-BMP.

¹ Eigene Nomenklatur zur Unterscheidung der verwendeten BMP-Lipide:

C16-1-BMP	Bis-(1-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-)phosphat
C16-2-BMP	Bis-(2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-)phosphat
C14-1-BMP	3-Myristoyl- <i>sn</i> -glycero-1-(1'-myristoyl- <i>sn</i> -glycero-3'-)phosphat
C18:1-1-BMP	3-Oleoyl- <i>sn</i> -glycero-1-(1'-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3'-)phosphat

3.2.3.1 C16-1-BMP

3.2.3.1.1 IRRAS

Die π/A -Isothermen von C16-1-BMP, DPPC-d₆₂, DMPC-d₅₄, DPPC-d₆₂/C16-1-BMP 4:1, DMPC-d₅₄/C16-1-BMP 4:1 auf H₂O sind in Abb. 3.24 dargestellt. Der Isothermenverlauf des C16-1-BMP zeigt den direkten Übergang von einer gasanalogen in eine flüssig-kondensierte oder festanaloge Phase an. Der DPPC-d₆₂/C16-1-BMP 4:1-Mischfilm zeigt keinen sichtbaren Phasenübergang wie das reine DPPC-d₆₂ und der DMPC-d₅₄/C16-1-BMP 4:1-Mischfilm ähnelt dem des DMPC-d₅₄. Die Auswertung der CH₂-Methylenstretschwingungsfrequenzen des C16-1-BMP zeigt, daß es schon in der gasanalogen Phase zu einer hohen Ordnung der Kohlenwasserstoffketten kommt, was durch die Frequenz von ca. 2918,8 cm⁻¹ angedeutet wird. Nach dem Beginn des Druckanstiegs in der kondensierten Phase kommt es zu einer weiteren Frequenzverschiebung zu tieferen Werten bis ca. 2917,7 cm⁻¹. Im DPPC-d₆₂/C16-1-BMP 4:1-Mischfilm erreichen die antisymmetrischen CD₂-Stretschwingungsfrequenzen im Verlauf der Kompression bei kleinen Flächen je Molekül ähnliche Werte wie das reine DPPC-d₆₂. Das C16-1-BMP dagegen zeigt Frequenzen von ca. 2921 cm⁻¹, was generell eine Zunahme der Unordnung in den Alkylketten gegenüber der reinen C16-1-BMP-Monoschichtmessung bedeutet. Mit den Ergebnissen aus Kap. 3.2.1 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch hier durch die CD₂-Ketten die intramolekulare Schwingungskopplung der CH₂-Ketten gestört wird und es dadurch zu einem Anstieg der $v_{as}(CH_2)$ -Wellenzahl kommt. Die Frequenz von ca. 2921 cm⁻¹ stellt dabei gewissermaßen einen oberen Grenzwert dar (Kap. 3.2.1), bei dem die Ketten noch als geordnet angesehen werden können. Im DMPC-d₅₄/C16-1-BMP 4:1-Mischfilm zeigen die Methylenstretschwingungsfrequenzen der beiden Komponenten eine flüssig-expandierte Phase an.

In Tab. 3.7 sind die Tilt- und Twistwinkel von C16-1-BMP und DPPC-d₆₂ in den

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{max, as}$	$k_{max, s}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{max, as}$	$k_{max, s}$
		$v_{as, s}(CD_2)$				$v_{as, s}(CH_2)$			
C16-1-BMP	10,7 ± 0,4					34 ± 2	50 ± 3	0,647	0,425
						33 ± 2		0,665	0,393
C16-1-BMP	22,3 ± 0,7					32 ± 2	55 ± 3	0,665	0,457
						30 ± 2		0,693	0,398
C16-1-BMP	31,2 ± 0,5					33 ± 2	58 ± 3	0,679	0,489
						29 ± 2		0,698	0,393
C16-1-BMP	44,4 ± 0,3					30 ± 2	63 ± 3	0,689	0,496
						26 ± 2		0,721	0,399
DPPC-d ₆₂ / C16-1-BMP 4:1	39,4 ± 0,5	25 ± 3	48 ± 5	0,260	0,195	28 ± 3	50 ± 5	0,143	0,082
		25 ± 3		0,262	0,190	27 ± 3		0,145	0,078
DPPC-d ₆₂	39,7 ± 0,6	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				

Tab. 3.7: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von C16-1-BMP und DPPC-d₆₂ auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

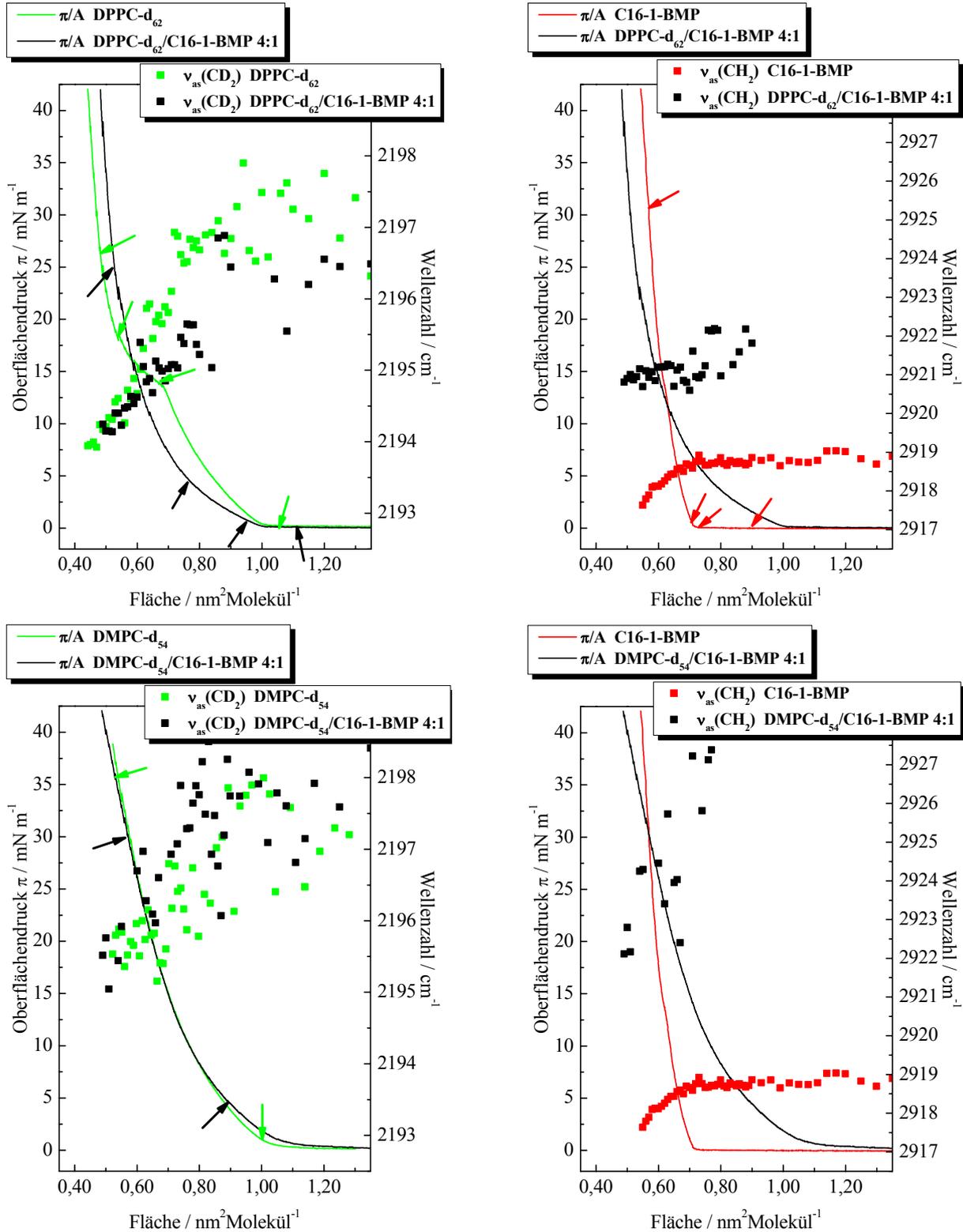


Abb. 3.24: IRRAS- π/A -Isothermen von DPPC- d_{62} (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), C16-1-BMP (—, ■) und DPPC- $d_{62}/\text{C16-1-BMP}$ 4:1 (—, ■) (oben). IRRAS- π/A -Isothermen von DMPC- d_{54} (—, ■), C16-1-BMP (—, ■) und DMPC- $d_{54}/\text{C16-1-BMP}$ 4:1 (—, ■) (unten). Komplementär dazu sind die $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramme (links) bzw. $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramme (rechts) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O bei 20°C . Die Pfeile zeigen die Punkte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen an (siehe Kap. 3.2.3.1.2; DPPC- d_{62} : Abb. 3.15; DMPC- d_{54} : Anhang Abb. A.6.1).

separaten Filmen sowie im Mischfilm DPPC-d₆₂/C16-1-BMP 4:1 bei verschiedenen Oberflächendrücken dargestellt. Mit zunehmenden Druck von ca. 10 bis 40 mN/m erkennt man, daß sich die Alkylketten des C16-1-BMP nur leicht aufrichten (θ : von 34° auf 30°), während es zusätzlich zu einer Verdrehung seiner Ketten kommt (ψ : von 50° auf 63°). Im Mischfilm der beiden Lipide bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m kommt es zu einer leichten Erniedrigung der Tiltwinkel von DPPC-d₆₂ und C16-1-BMP auf 25° bzw. 28°. Die Twistwinkel betragen ca. 50° in beiden Komponenten.

3.2.3.1.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des C16-1-BMP zeigen im Phasenübergangsbereich der gasanalogen zur festanalogen Phase große, abgerundete, dunkle Flächen, die mit zunehmender Kompression bis zum Beginn des Druckanstiegs verschwinden. Die schwarzen Flächen stellen die gasanaloge Phase dar, in der sich keine Lipide befinden (Abb. 3.25 A, B). Die festanaloge Phase besteht aus einer inhomogen fluoreszierenden Fläche, die aus dunklen Bereichen mit hochgeordneten BMP-Molekülen besteht. In den fluoreszierenden Bereichen wurde der Farbstoff zwischen den kondensierten Domänen konzentriert. Durch den weiteren Druckanstieg kommt es zu einer weiteren Kompression der Lipide und schließlich zu einer Auslöschung der Fluoreszenz (Abb. 3.25 C, D).

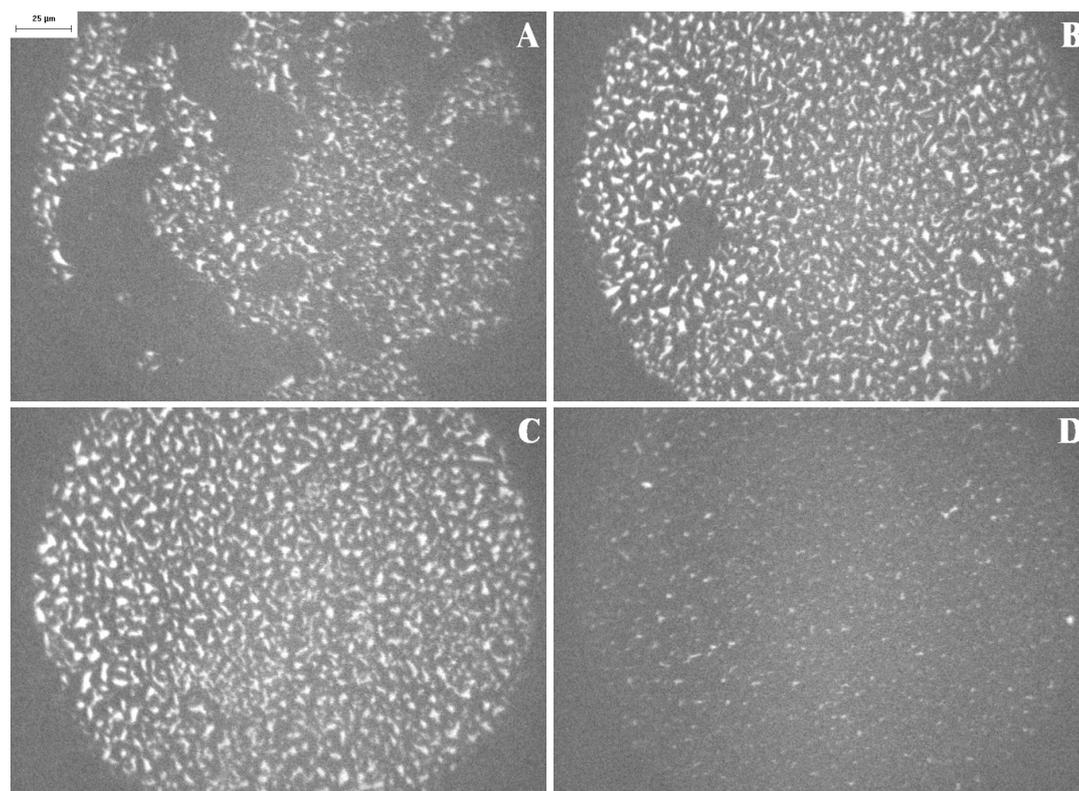


Abb. 3.25: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von C16-1-BMP (Isotherme: Abb. 3.24 oben rechts; A: 0,90 nm²; B: 0,72 nm²; C: 0,70 nm²; D: 0,60 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μm.

Im DPPC- d_{62} /C16-1-BMP 4:1-Mischfilm kommt es zu einer Phasenseparation. Es bilden sich rundliche Domänen, die miteinander in einem Netzwerk verbunden sind (Abb. 3.26 A, B). Teilweise kommt es zur Ausbildung von unterschiedlich hell fluoreszierenden Flächen (Abb. 3.26 C). Die kondensierten Domänen werden im Verlauf der Kompression kontinuierlich größer (Abb. 3.26 D).

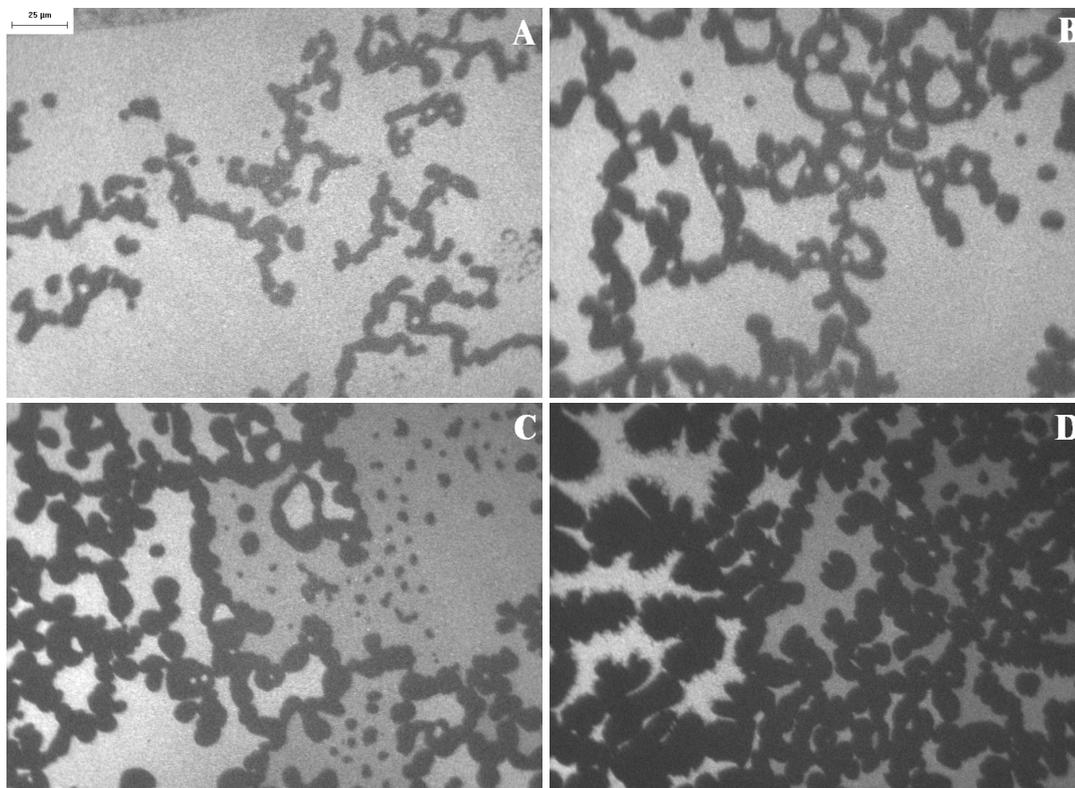


Abb. 3.26: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DPPC- d_{62} /C16-1-BMP 4:1 (Isotherme: Abb. 3.24 oben links; A: 1,10 nm²; B: 0,95 nm²; C: 0,75 nm²; D: 0,52 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

Der DMPC- d_{54} /C16-1-BMP 4:1-Film liegt bei großen, mittleren Molekülflächen als flüssig-expandierte Phase vor, was die homogen fluoreszierenden Mikroskopbilder bis zu einem Oberflächendruck von ca. 10 bis 15 mN/m zeigen (Abb. 3.27, A). Bei weiterer Kompression kommt es zur Ausbildung von kleinen fraktalen Domänen (Abb. 3.27, B). Der Beginn dieser Phasenumwandlung konnte mit der IRRAS-Methode nicht detektiert werden.

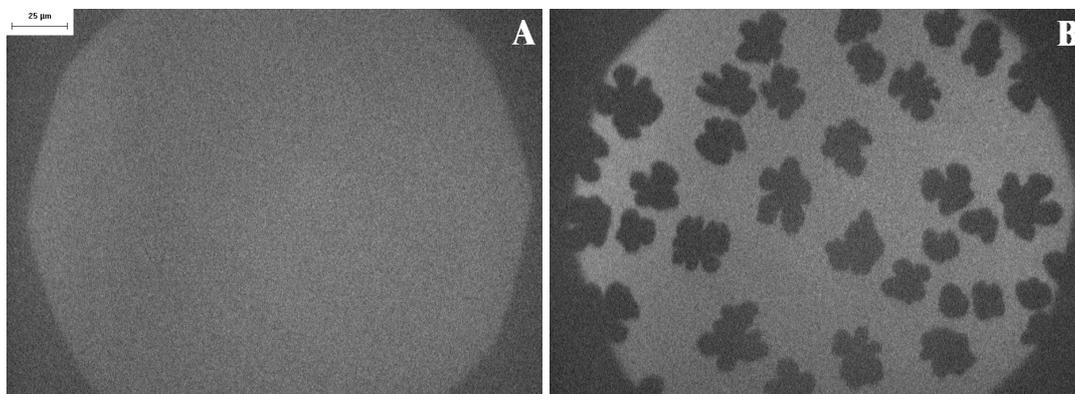


Abb. 3.27: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DMPC- d_{54} /C16-1-BMP 4:1 (Isotherme: Abb. 3.24 unten links; A: 0,90 nm²; B: 0,60 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

3.2.3.2 C14-1-BMP

3.2.3.2.1 IRRAS

Das C14-1-BMP zeigt an der Luft/Wasser-Grenzfläche bei 20 °C den Beginn eines LE/LC-Phasenübergangs bei ca. 0,80 nm² und 10 mN/m (Abb. 3.28). Die Isotherme des DPPC-d₆₂/C14-1-BMP 4:1-Mischfilms zeigt ebenfalls einen Phasenübergang, der bei einem niedrigeren Oberflächendruck beginnt (ca. 0,85 nm² und 6 mN/m). Der Verlauf des DMPC-d₅₄/C14-1-BMP-Mischfilms ähnelt dem des reinen DMPC-d₅₄.

Nach dem LE/LC-Phasenübergang des C14-1-BMP mit einer Frequenzverschiebung der CH₂-Streckschwingungsbande zu einer Wellenzahl von ca. 2918 cm⁻¹ besitzen die Alkylketten in der flüssig-kondensierten Phase eine hohe Ordnung. Der Mischfilm mit dem DPPC-d₆₂ zeigt im Bereich des Phasenübergangs für die CD₂-Streckschwingungsbande eine Verschiebung zu einer Wellenzahl von ca. 2193,7 cm⁻¹ an, was auf eine leicht höhere Ordnung des DPPC-d₆₂ gegenüber dem reinen DPPC-d₆₂-Film hinweist. Die antisymmetrische Streckschwingungsbande des C14-1-BMP des Mischfilms weist wie das C16-1-BMP (Kap. 3.2.3.1.1) nach dem Phasenübergang eine Frequenz von ca. 2921 cm⁻¹ auf. Im Gemisch mit DPPC-d₆₂ kann dem C14-1-BMP damit noch eine relativ gute Ordnung zugeordnet werden. Der DMPC-d₅₄/C14-1-BMP 4:1-Mischfilm zeigt ab einem Oberflächendruck von ca. 20 mN/m eine deutlichen Verschiebung der antisymmetrischen CD₂-Streckschwingungsbande zu tieferen Frequenzen, was auf den Beginn einer Phasenumwandlung hindeutet (siehe Fluoreszenz-Mikroskopie Kap. 3.2.3.2.2).

Die Alkylketten des C14-1-BMP besitzen im reinen C14-1-BMP-Film einen Tiltwinkel von ca. 29° bei Oberflächendrucken von ca. 30 bis 50 mN/m, während der Twistwinkel sich zunehmend von ca. 47° auf 59° erhöht (Tab. 3.8). Im DPPC-d₆₂/C14-1-BMP 4:1-Mischfilm mit bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m verändert sich die Orientierung des Phospholipids gegenüber dem reinen DPPC-d₆₂-Film kaum. Der Tiltwinkel des C14-1-BMP nimmt aber auf ca. 24° ab und der Twistwinkel erhöht sich auf ca. 67°.

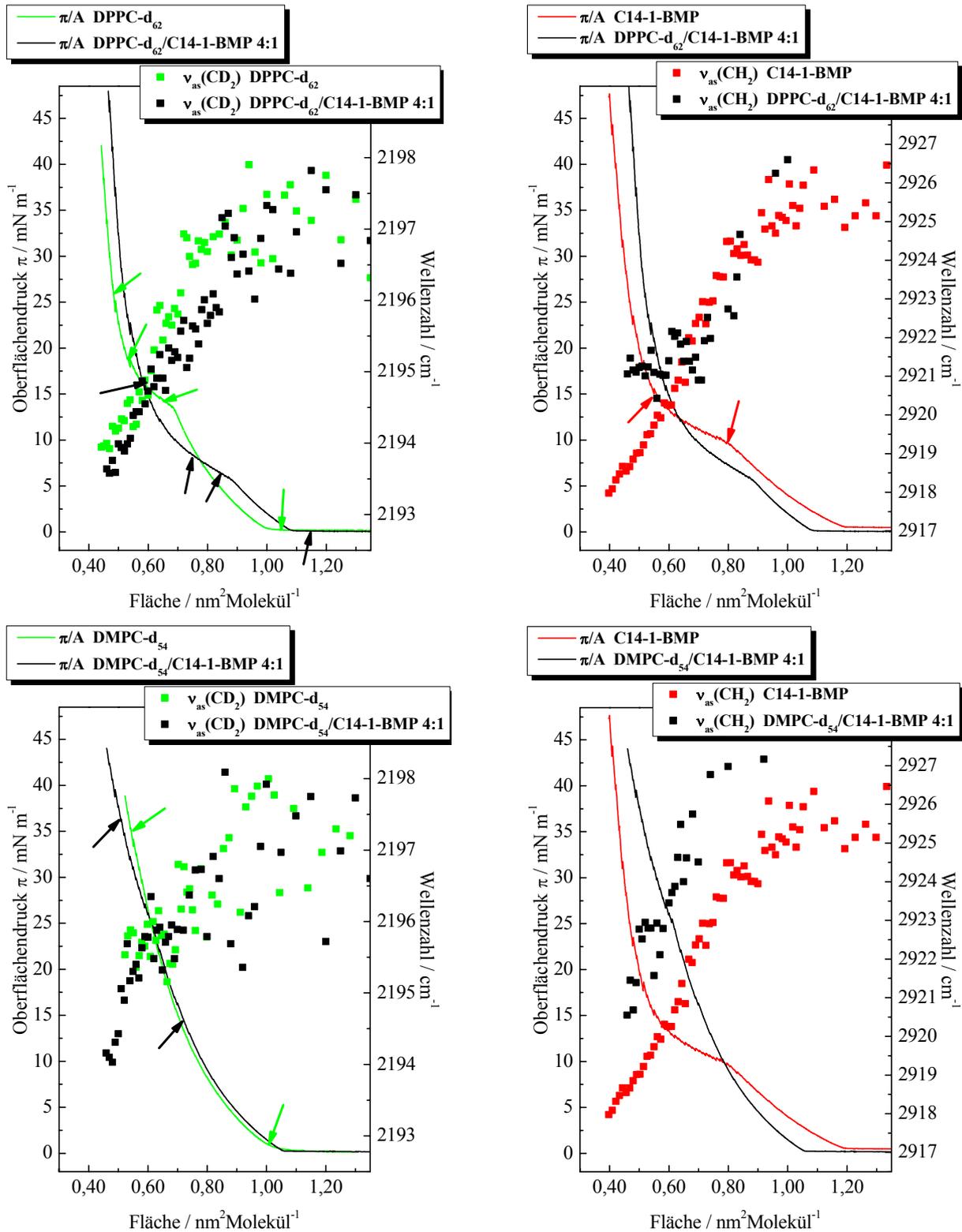


Abb. 3.28: IRRAS- π/A -Isothermen von DPPC-d₆₂ (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), C14-1-BMP (—, ■) und DPPC-d₆₂/C14-1-BMP 4:1 (—, ■) (oben). IRRAS- π/A -Isothermen von DMPC-d₅₄ (—, ■), C14-1-BMP (—, ■) und DMPC-d₅₄/C14-1-BMP 4:1 (—, ■) (unten). Komplementär dazu sind die $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramme (links) bzw. $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramme (rechts) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H₂O bei 20 °C. Die Pfeile zeigen die Punkte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen an (siehe Kap. 3.2.3.2.2; DPPC-d₆₂: Abb. 3.15; DMPC-d₅₄: Anhang Abb. A.6.1).

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
		$v_{as, s}(CD_2)$				$v_{as, s}(CH_2)$			
C14-1-BMP	$28,1 \pm 1,3$					30 ± 2	47 ± 3	0,577	0,358
						29 ± 2		0,579	0,349
C14-1-BMP	$40,6 \pm 0,8$					29 ± 2	50 ± 3	0,600	0,383
						28 ± 2		0,604	0,358
C14-1-BMP	$51,3 \pm 2,1$					29 ± 2	59 ± 3	0,607	0,430
						26 ± 2		0,630	0,366
DPPC-d ₆₂ / C14-1-BMP 4:1	$30,0 \pm 0,7$	29 ± 3	47 ± 5	0,270	0,200	23 ± 3	63 ± 5	0,103	0,067
		29 ± 3		0,270	0,195	23 ± 3		0,111	0,062
DPPC-d ₆₂ / C14-1-BMP 4:1	$39,0 \pm 0,5$	28 ± 3	48 ± 5	0,279	0,206	24 ± 3	67 ± 5	0,111	0,071
		28 ± 3		0,284	0,202	22 ± 3		0,116	0,063
DPPC-d ₆₂	$28,8 \pm 1,5$	31 ± 2	43 ± 3	0,299	0,223				
		31 ± 2		0,294	0,227				
DPPC-d ₆₂	$39,7 \pm 0,6$	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				

Tab. 3.8: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von C14-1-BMP und DPPC-d₆₂ auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

3.2.3.2.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Das C14-1-BMP zeigt während seinem LE/LC-Phasenübergang fraktale Domänen, die sich während der Filmkompression zunehmend vergrößern (Abb. 3.29 A, B).

Der DPPC-d₆₂/C14-1-BMP 4:1-Mischfilm bildet ab dem Beginn der Phasenumwandlung kleine Domänen aus (Abb. 3.30 A, B). Diese Domänen haben stark abgerundete, unregelmäßige Formen (vergleiche DPPC-d₆₂ in Abb. 3.15 C und Abb. 3.30 C).

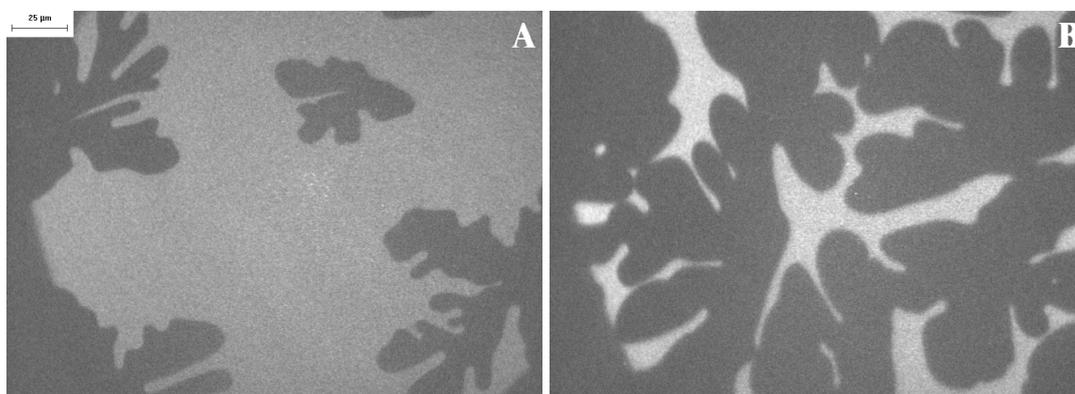


Abb. 3.29: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von C14-1-BMP (Isotherme: Abb. 3.28 oben rechts; A: 0,80 nm²; B: 0,55 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μ m.

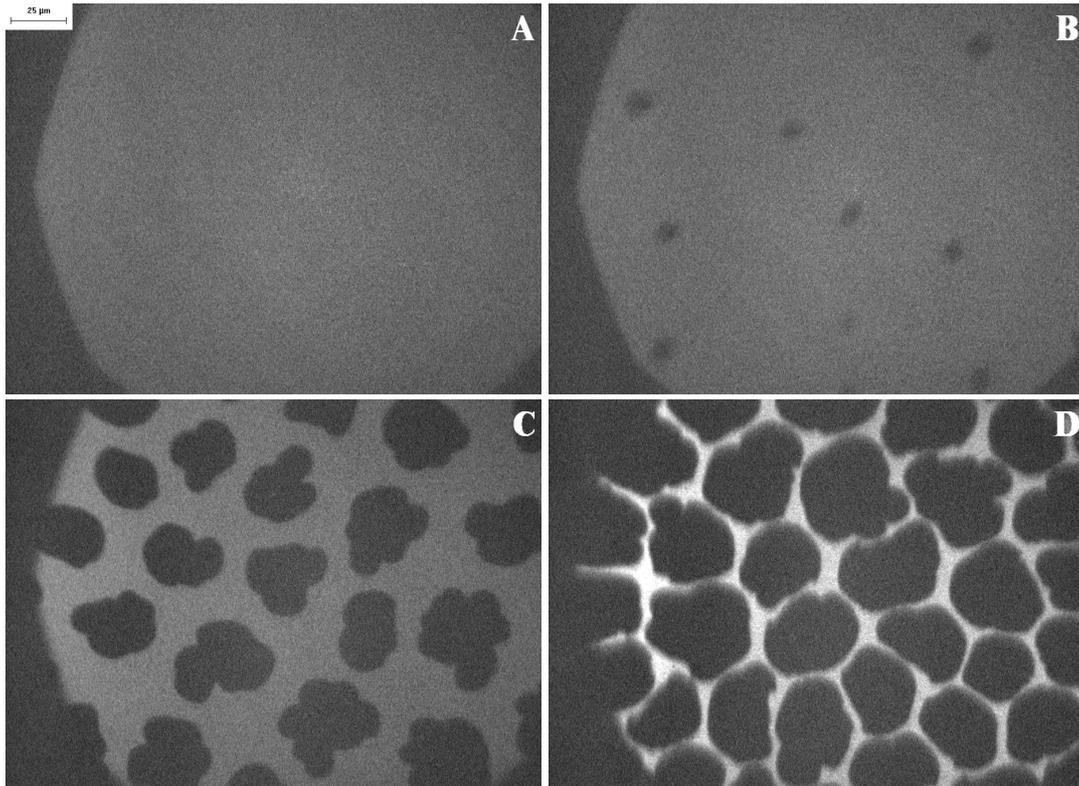


Abb. 3.30: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DPPC-d₆₂/C14-1-BMP 4:1 (Isotherme: Abb. 3.28 oben links; A: 1,15 nm²; B: 0,85 nm²; C: 0,75 nm²; D: 0,60 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

Der DMPC-d₅₄/C14-1-BMP 4:1-Film liegt zu Beginn des π /A-Isothermenverlaufs als flüssig-expandierte Phase vor (Abb. 3.31 A), während es ab einem Oberflächendruck von 20 mN/m zu einem Phasenübergang kommt (Abb. 3.31 B).

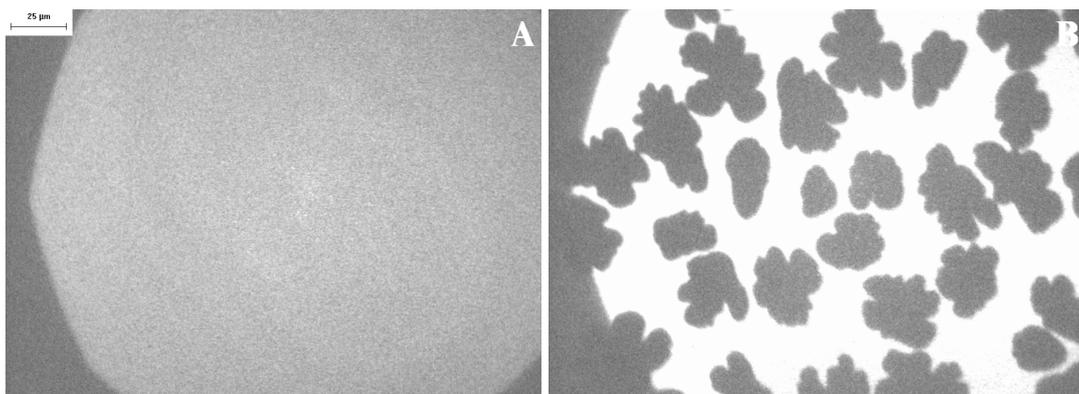


Abb. 3.31: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DMPC-d₅₄/C14-1-BMP 4:1 (Isotherme: Abb. 3.28 unten links; A: 0,70 nm²; B: 0,50 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

3.2.3.3 C16-2-BMP

3.2.3.3.1 IRRAS

In Abb. 3.32 sind die π/A -Isothermen von C16-2-BMP, DPPC-d₆₂, DPPC-d₆₂/C16-2-BMP 4:1, DMPC-d₅₄ und DMPC-d₅₄/C16-2-BMP 4:1 dargestellt. Obwohl der Isothermenverlauf des C16-2-BMP dem einer flüssig-expandierten Phase entspricht, zeigen die Ergebnisse der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie und der Fluoreszenz-Mikroskopie (Kap. 3.2.3.3.2) den Phasenübergang von einer expandierten in eine kondensierte Phase an. Die beiden Mischfilme zeigen ebenfalls eine flüssig-expandierte Phase an, wobei die Isotherme des DPPC-d₆₂-haltigen Mischfilms teilweise kleine Unstetigkeiten aufweist.

Neben den π/A -Isothermen zeigt Abb. 3.32 die flächenabhängig ermittelten Frequenzen der CH₂- bzw. CD₂-Methylenstreckschwingungsbanden der beiden Lipidkomponenten. C16-2-BMP besitzt im Gebiet der gasanalogen Phase relativ gut geordnete Alkylketten, was die Frequenz der Methylenstreckschwingungsbande von ca. 2920 cm⁻¹ andeutet. Über den gesamten Verlauf der Kompression nach dem Druckanstieg kommt es zu einer Verschiebung der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Bande zu tieferen Wellenzahlen (bis ca. 2917,8 cm⁻¹). Dies zeigt eine kontinuierliche Erhöhung des Ordnungsgrades der Alkylketten an. In den Phospholipid/C16-2-BMP-Mischfilmen kommt es bei erhöhten Oberflächendrücken zu einer Frequenzverschiebung der CH₂-Streckschwingungsbande des BMP-Lipids zu ca. 2921 cm⁻¹, was in diesen CD₂-haltigen Mischfilmen nicht zwangsläufig für ungeordnete CH₂-Alkylketten spricht. Die Frequenzen der Streckschwingungsbanden der CD₂-haltigen Phospholipide in den Mischfilmen bei diesen erhöhten Drücken zeigen für das DPPC-d₆₂ eine flüssig-kondensierte Phase und für das DMPC-d₅₄ den Beginn einer LE/LC-Phasenumwandlung an.

Die Orientierungen der Alkylketten des C16-2-BMP und des DPPC-d₆₂ bei bestimmten Oberflächendrücken sind in Tab. 3.9 aufgelistet. Für die Alkylketten des C16-2-BMP wurden bei Oberflächendrücken von ca. 10 bis 40 mN/m annähernd konstante Tiltwinkel von ca. 32° und Twistwinkel von ca. 46° bestimmt. Dagegen richten sich im DPPC-d₆₂/C16-2-BMP 4:1-Mischfilm bei ca. 40 mN/m die Alkylketten des BMP-Lipids etwas auf ($\theta = 23^\circ$ und $\psi = 47^\circ$). Das DPPC-d₆₂ zeigt ähnliche Tilt- und Twistwinkel wie das C16-2-BMP (25° bzw. 45°).

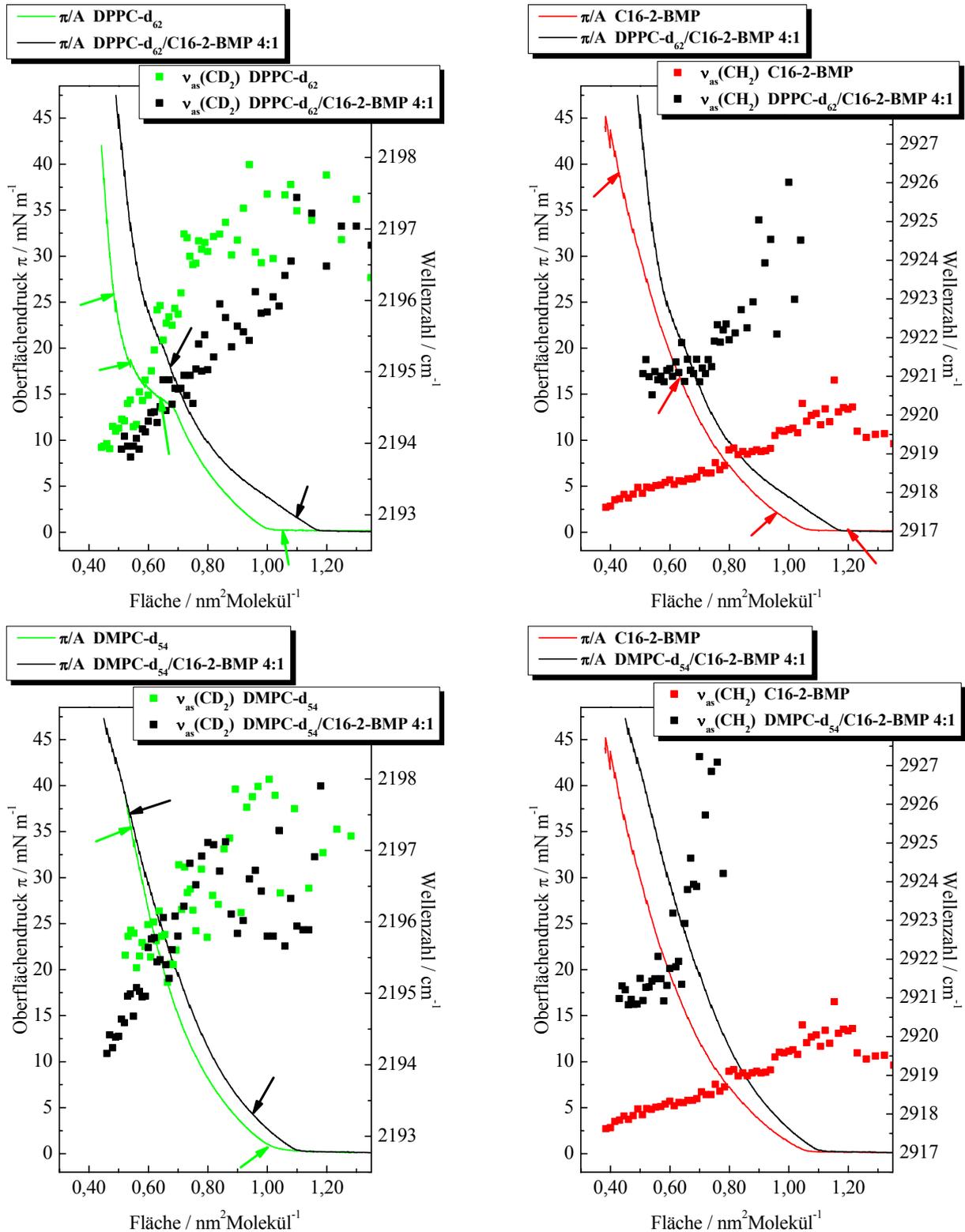


Abb. 3.32: IRRAS- π/A -Isothermen von DPPC-d₆₂ (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■), C16-2-BMP (—, ■) und DPPC-d₆₂/C16-2-BMP 4:1 (—, ■) (oben). IRRAS- π/A -Isothermen von DMPC-d₅₄ (—, ■), C16-2-BMP (—, ■) und DMPC-d₅₄/C16-2-BMP 4:1 (—, ■) (unten). Komplementär dazu sind die $\bar{\nu}_{as}(\text{CD}_2)/A$ -Diagramme (links) bzw. $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramme (rechts) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H₂O bei 20 °C. Die Pfeile zeigen die Punkte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen an (siehe Kap. 3.2.3.3.2; DPPC-d₆₂: Abb. 3.15; DMPC-d₅₄: Anhang Abb. A.6.1).

Lipid	Druck π / mN/m	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, \text{as}}$	$k_{\max, \text{s}}$	Tilt θ	Twist ψ	$k_{\max, \text{as}}$	$k_{\max, \text{s}}$
		$v_{\text{as, s}}(\text{CD}_2)$				$v_{\text{as, s}}(\text{CH}_2)$			
C16-2-BMP	$9,6 \pm 0,4$					31 ± 2	44 ± 3	0,473	0,276
						32 ± 2		0,479	0,285
C16-2-BMP	$20,3 \pm 0,5$					31 ± 2	45 ± 3	0,644	0,381
						31 ± 2		0,643	0,382
C16-2-BMP	$31,0 \pm 0,5$					30 ± 2	46 ± 3	0,732	0,443
						30 ± 2		0,738	0,439
C16-2-BMP	$38,3 \pm 0,6$					33 ± 2	49 ± 3	0,873	0,553
						32 ± 2		0,873	0,517
DPPC-d ₆₂ / C16-2-BMP 4:1	$30,6 \pm 0,5$	27 ± 3	43 ± 5	0,259	0,187	28 ± 3	54 ± 5	0,129	0,081
		27 ± 3		0,256	0,189	26 ± 3		0,131	0,073
DPPC-d ₆₂ / C16-2-BMP 4:1	$39,0 \pm 0,6$	25 ± 3	45 ± 5	0,268	0,193	23 ± 3	47 ± 5	0,133	0,075
		26 ± 3		0,270	0,195	22 ± 3		0,133	0,074
DPPC-d ₆₂	$28,8 \pm 1,5$	31 ± 2	43 ± 3	0,299	0,223				
		31 ± 2		0,294	0,227				
DPPC-d ₆₂	$39,7 \pm 0,6$	28 ± 2	44 ± 3	0,309	0,226				
		29 ± 2		0,308	0,228				

Tab. 3.9: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von C16-2-BMP und DPPC-d₆₂ auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

3.2.3.3.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Das C16-2-BMP weist über den gesamten Bereich der π/A -Isotherme einen kontinuierlichen Übergang zwischen einer expandierten und einer kondensierten Phase auf, der im Isothermenverlauf nicht zu erkennen ist (Abb. 3.33). Dabei kommt es zu einer Vernetzung von kleinen rundlichen Domänen.

Der Mischfilm DPPC-d₆₂/C16-2-BMP 4:1 bildet direkt nach dem Anstieg des Oberflächendrucks kleine, rundliche Domänen aus, die im Verlauf der Kompression immer größer werden (Abb. 3.34 A, B).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des DMPC-d₅₄/C16-2-BMP 4:1-Mischfilms zeigen bei großen Flächen je Molekül eine flüssig-expandierte Phase an (Abb. 3.35 A), ehe es oberhalb eines Druckes von 10 mN/m zu einem Phasenübergang kommt (Abb. 3.35 B).

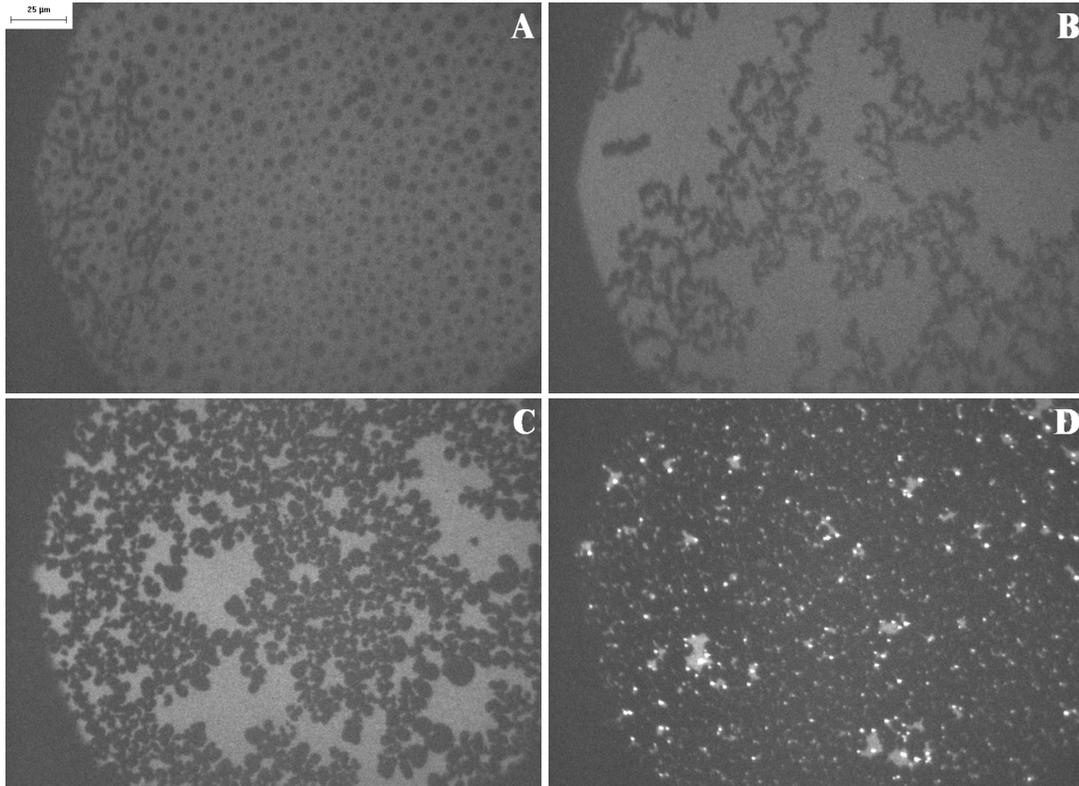


Abb. 3.33: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von C16-2-BMP (Isotherme: Abb. 3.32 oben rechts; A: 1,20 nm²; B: 0,95 nm²; C: 0,62 nm²; D: 0,42 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

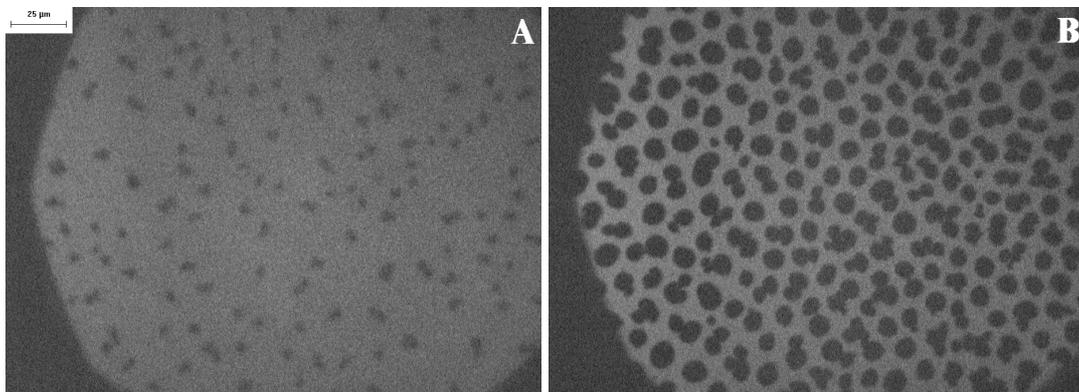


Abb. 3.34: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DPPC-d₆₂/C16-2-BMP 4:1 (Isotherme: Abb. 3.32 oben links; A: 1,10 nm²; B: 0,70 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

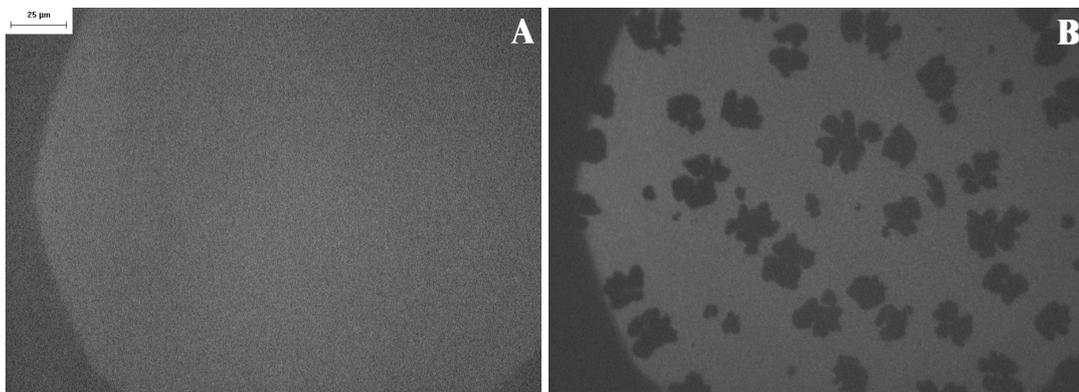


Abb. 3.35: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DMPC-d₅₄/C16-2-BMP 4:1 (Isotherme: Abb. 3.32 unten links; A: 0,95 nm²; B: 0,55 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 µm.

3.2.3.4 C18:1-1-BMP

Der Verlauf der π/A -Isotherme des C18:1-1-BMP mit ungesättigten Ölsäureketten ist charakteristisch für einen flüssig-expandierten Film (Abb. 3.36). Dieses Verhalten ist vergleichbar mit anderen Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren (z. B. POPC). Die aus den IRRAS-Spektren ermittelten Frequenzen der antisymmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande des Lipids von ca. 2924 cm^{-1} bei kleinen Flächen je Molekül zeigen, daß es zu keiner Phasenumwandlung kommt.

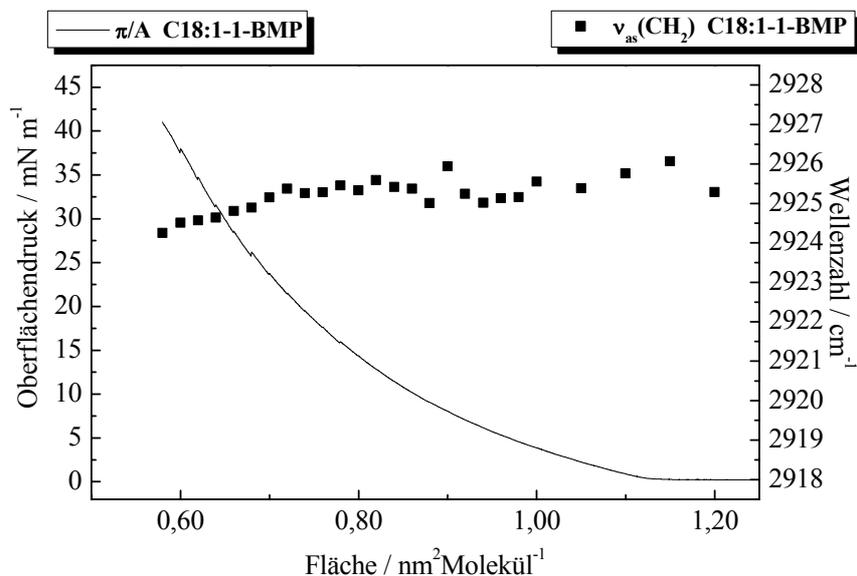


Abb. 3.36. IRRAS- π/A -Isotherme von C18:1-1-BMP (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■). Komplementär dazu ist das $\bar{\nu}_{as}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramm dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O bei 20°C .

3.2.3.5 Untersuchung von Lipiddispersionen

Die Untersuchung der Phasenumwandlungen der BMP-Lipidvesikel mittels DSC ergab für alle Lipide eine relativ hohe Hauptphasenumwandlungstemperatur im Vergleich zu DMPC und DPPC (Abb. 3.37, Tab. 3.10). Der T_m -Wert für C16-1-BMP (C14-1-BMP) liegt mit $54,5^\circ\text{C}$ ($41,7^\circ\text{C}$) zwischen den Werten von DPPS (DMPS) mit $52,0^\circ\text{C}$ ($36,0^\circ\text{C}$) bzw. DPPA (DMPA) mit $68,0^\circ\text{C}$ ($50,0^\circ\text{C}$), die beide ebenfalls negativ geladen sind (Cevc & Marsh, 1987: mit Ionenstärke $I = 0,1 \text{ M}$). Dies deutet auf eine verstärkte Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kopfgruppen hin. Beide BMP-Lipide besitzen eine Vorumwandlung unterhalb von 20°C , die derzeit Gegenstand von Röntgen-Diffraktionsuntersuchungen ist (Förster et al., 2002). Die Phospholipid/C16-1-BMP- bzw. Phospholipid/C14-1-BMP-Gemische (1:1) zeigen, daß die Lipide mischbar sind und daß jeweils beide Vorumwandlungen unterdrückt werden. Das C16-2-BMP zeigt ein unterschiedliches Verhalten über mehrere Aufheiz- und Abkühlkurven. Es sind wenigstens zwei größere Phasenumwandlungen bei ca. 47 und 80°C zu sehen. Über 5 Heiz- und Kühlzyklen nimmt die Umwandlungsenthalpie der ersteren zu, während die der zweiten Umwandlung abnimmt. Eine Bestimmung der Struktur der einzelnen Phasen ist noch nicht möglich. Wahrscheinlich wird zusätzlich zu einer L_β - und einer L_α -Phase eine invers-hexagonale H_{II} -Phase ausgebildet, wie sie z. B. für Phosphatidylethanolamine bei erhöhten Temperaturen beobachtet wird (Blume, 1991).

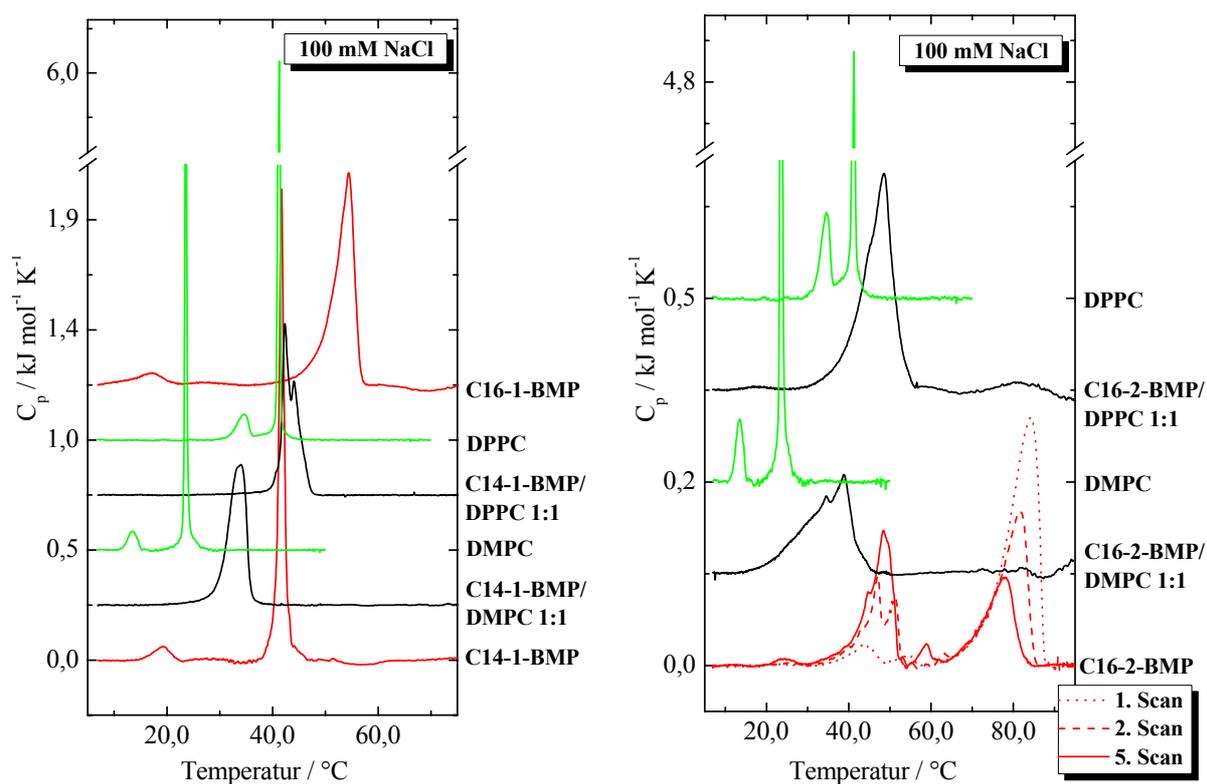


Abb. 3.37: Kalorigramme der verschiedenen BMP-Lipide, DPPC, DMPC und soweit möglich die entsprechenden BMP/Phospholipid 1:1-Gemische. Die Konzentration der Lipiddispersionen betrug 0,75 mM (C16-1-BMP: 0,3 mM).

Lipid	$T_p / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$
	Vorumwandlung		Hauptumwandlung	
C14-1-BMP	19,3	3,9	41,7	50,6
C16-1-BMP	17,2	6,3	54,5	75,6
	1. Umwandlung		2. Umwandlung	
C16-2-BMP – 1. Scan	44,3	4,5	84,1	52,7
C16-2-BMP – 2. Scan	47,0	14,8	81,6	31,3
C16-2-BMP – 5. Scan	48,5	22,2	78,1	18,2

Tab. 3.10: Phasenumwandlungstemperaturen und -enthalpien der jeweiligen BMP-Lipide.

3.2.3.6 Zusammenfassung

In Abb. 3.38 sind IRRAS-Spektren von C16-1-BMP, C14-1-BMP und C16-2-BMP sowie DPPC als Vergleichssubstanz im Bereich der CH_2 -Scherschwingungsbande und der Phosphatstretschwingungsbanden zu sehen. Die $\delta(\text{CH}_2)$ -Bande liegt bei allen Molekülen bei einer Frequenz von ca. 1469 cm^{-1} , was einer hexagonalen Packung der Alkylketten entspricht. Im Bereich der antisymmetrischen Phosphatstretschwingungsbande kommt es im Vergleich zu DPPC (ca. 1228 cm^{-1}) zu einer Frequenzverschiebung zu ca. 1212 cm^{-1} (C16-2-BMP), 1210 cm^{-1} (C16-1-BMP) bzw. 1205 cm^{-1} (C14-1-BMP), was auf eine Ausbildung von starken

Wasserstoffbrückenbindungen zur Phosphatgruppe hindeutet. Es dürften auch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu den OH-Gruppen der Glycerinreste existieren, wie sie für Phosphatidylglycerole und Cardiolipin beobachtet wurden (Hübner & Blume, 1998). Die symmetrische Phosphatstretschwingungsbande der BMP-Lipide bei 1088 cm^{-1} (DPPC: 1090 cm^{-1}) ist dagegen nur schwach ausgebildet und die $\nu(\text{CO-O})$ -Bande ist nur als Schulter zu erkennen. Die Bande bei ca. 1050 cm^{-1} wird der Phosphatester-Stretschwingung $\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$ zugeordnet, die normalerweise bei ca. 1070 cm^{-1} zu sehen ist (Hübner & Blume, 1998). Diese Bande eignet sich zur Unterscheidung zwischen BMP-Lipiden, die in 1- oder 2-Position mit dem Glycerinrest verestert sind. Für das *sn*-2-substituierte C16-2-BMP ist diese Bande im Vergleich zu C16-1-BMP bzw. C14-1-BMP kaum ausgeprägt.

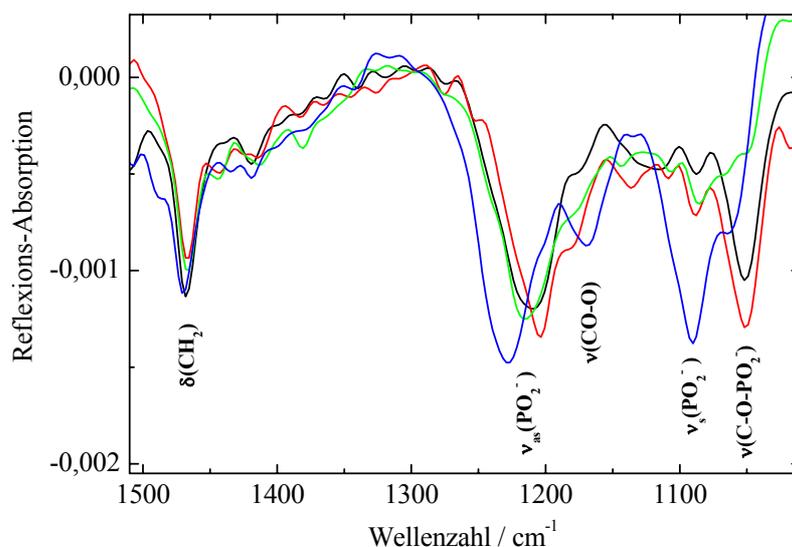


Abb. 3.38: IRRAS-Spektren im Bereich der $\delta(\text{CH}_2)$ - und $\nu(\text{PO}_2^-)$ -Moden von C16-1-BMP (—), C14-1-BMP (—), C16-2-BMP (—) und DPPC (—) bei ca. 30 bis 40 mN/m. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O bei 20°C .

Das Monoschichtverhalten der untersuchten BMP-Lipide zeigt deutliche Unterschiede je nach Art der Acylkette und der Position der Acylkettenveresterung. Alle BMP-Lipide bis auf das C18:1-1-BMP können kondensierte Phasen ausbilden, so daß es möglich war mittels der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie die Orientierung der Kohlenwasserstoffketten zu bestimmen (Tab. 3.11). Man kann erkennen, daß die Tiltwinkel des C16-2-BMP bei verschiedenen Oberflächendrücken annähernd konstant bei 32° liegen. Die Twistwinkel von ca. 46° zeigen eine rotationssymmetrische Verteilung der CH_2 -Übergangsdipolmomente um die Moleküllängsachse an. Wenn sich die Palmitinfettsäureketten in 1-Position befinden (C16-1-BMP), richten sich die Acylketten mit zunehmender Kompression des Films leicht auf (von 34° auf 30°) und es kommt zusätzlich zu einer Verdrehung der Ketten (von 50° auf 63°). C14-1-BMP zeigt dagegen mit zunehmendem Oberflächendruck nur eine Verdrehung der CH_2 -Ketten (von 47° auf 59°) bei einem annähernd konstanten Tiltwinkel von 29° . In den Mischfilmen mit DPPC- d_{62} kommt es im Vergleich zu den reinen Monoschichten immer zu einer leichten Aufrichtung der Alkylketten der beiden Lipidkomponenten.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen für DPPC- d_{62} -Mischfilme mit den C16-BMP-Molekülen direkt nach dem Beginn des Druckanstiegs eine fluid/fluid-Phasenseparation. Der DPPC- d_{62} /C14-1-BMP 4:1-Mischfilm bildet jedoch erst mit dem Beginn des Phasenübergangs Domänen aus. In den Mischfilmen mit DMPC- d_{54} konnte bei Oberflächendrücken oberhalb von ca. 10 bis 20 mN/m der Beginn eines LE/LC-Phasenübergangs gefunden werden.

Für die beiden palmitinsäurehaltigen BMP-Lipide C16-1-BMP und C16-2-BMP wurden anhand einer MM2-Energieoptimierung in der Gasphase Strukturvorschläge berechnet (Abb. 3.39; CS Chem3D Pro). Die Kopfgruppe des C16-1-BMP bildet eine durchgängige „Schleife“ aus. Das C16-2-BMP zeigt eine vergrößerte Kopfgruppenquerschnittsfläche, was auf die nach außen stehenden CH₂OH-Reste der Glycerine zurückzuführen ist. Die freien Hydroxylgruppen, die unterschiedlich gut zugänglich sind, sind der Grund für das differenzierte Verhalten der beiden BMP-Lipide.

Lipid v(CH ₂)	C16-2-BMP				C16-1-BMP				C14-1-BMP							
	Tilt θ	Twist ψ	k _{max,} as	k _{max,} s	Tilt θ	Twist ψ	k _{max,} as	k _{max,} s	Tilt θ	Twist ψ	k _{max,} as	k _{max,} s				
ca. 10	31±2	44±3	0,473	0,276	34±2	50±3	0,647	0,425								
	32±2		0,479	0,285	33±2		0,665	0,393								
ca. 20	31±2	45±3	0,644	0,381	32±2	55±3	0,665	0,457								
	31±2		0,643	0,382	30±2		0,693	0,398								
ca. 30	30±2	46±3	0,732	0,443	33±2	58±3	0,679	0,489					30±2	47±3	0,577	0,358
	30±2		0,738	0,439	29±2		0,698	0,393					29±2		0,579	0,349
ca. 40	33±2	49±3	0,873	0,553	30±2	63±3	0,689	0,496	29±2	50±3	0,600	0,383				
	32±2		0,873	0,517	26±2		0,721	0,399	28±2		0,604	0,358				
ca. 50									29±2	59±3	0,607	0,430				
									26±2		0,630	0,366				

Tab. 3.11: Tiltwinkel, Twistwinkel und Absorptionskoeffizienten von BMP-Derivaten bei verschiedenen Oberflächendrücken zwischen ca. 10 bzw. 50 mN/m auf H₂O bei 20 °C. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

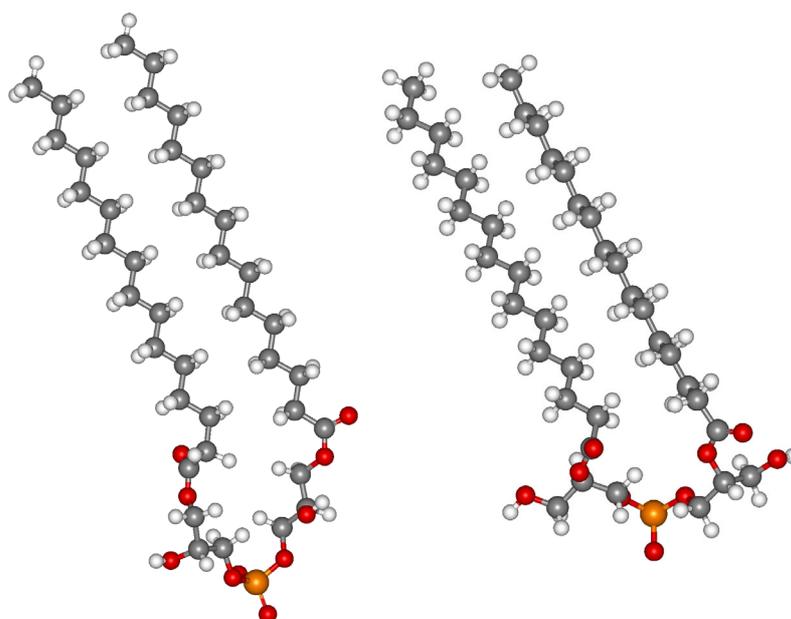


Abb. 3.39: Strukturvorschläge für C16-1-BMP (links) und C16-2-BMP (rechts).

3.3 Lipid/Peptid- bzw. Lipid/Protein-Wechselwirkung

3.3.1 Lipid A und Lactoferrin

Lipopolysaccharide (LPS) sind die Hauptkomponenten der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Sie werden Endotoxine genannt und spielen eine große Rolle bei bakteriellen Infektionen, insbesondere beim septischen Schock, bei dem es zu einer unkontrollierten Überproduktion von Cytokinen durch Immunzellen kommt. Die LPS bestehen aus einer Polysaccharidhälfte und einer membranverankerten Lipidhälfte, dem Lipid A. Da das Lipid A für die biologische Aktivität verantwortlich ist, wird es das endotoxische Prinzip der Lipopolysaccharide genannt (Zähringer et al., 1994). Lipid A besteht meistens aus einem bisphosphorylierten Diglucosaminrückgrat, an dem normalerweise sechs gesättigte Acylketten über Ester- oder Amidbindungen angebonden sind (Abb. 3.41, links).

Lactoferrin (Lf) ist ein eisenbindendes Glykoprotein (80 kDa) im exokrinen Sekret von Säugetieren (Milch, Speichel, Galle, Pankreasflüssigkeit und Tränen). Es wird postuliert, daß Lf eines der Schlüsselmoleküle ist, das den Entzündungsprozess moduliert. Einige dieser Aktivitäten werden mit der Fähigkeit des Lf zur Bindung von Lipopolysacchariden (LPS) begründet. Lf beeinflusst den Entzündungsprozeß indem es die Freisetzung von Cytokinen verhindert und die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen reguliert. Eisen ist ein essentieller Nährstoff für viele pathologische Mikroorganismen. In biologischen Sekreten freigesetztes Lf ist normalerweise schwach eisengesättigt (ca. 7%). Dieses ungesättigte Lf (apo-Lf) trägt zur Hemmung des Bakterienwachstums bei, indem es freies Eisen bindet. Neben dieser bakteriostatischen Aktivität hat Lf auch eine bakterizide Wirkung, die auf der Wechselwirkung mit der äußeren Membran von verschiedenen gram-negativen Bakterien beruht. *In vivo*-Experimente haben gezeigt, daß Lf als Therapeutikum gegen den septischen Schock verwendet werden kann (Baveye et al., 1999; Brandenburg et al., 2001).

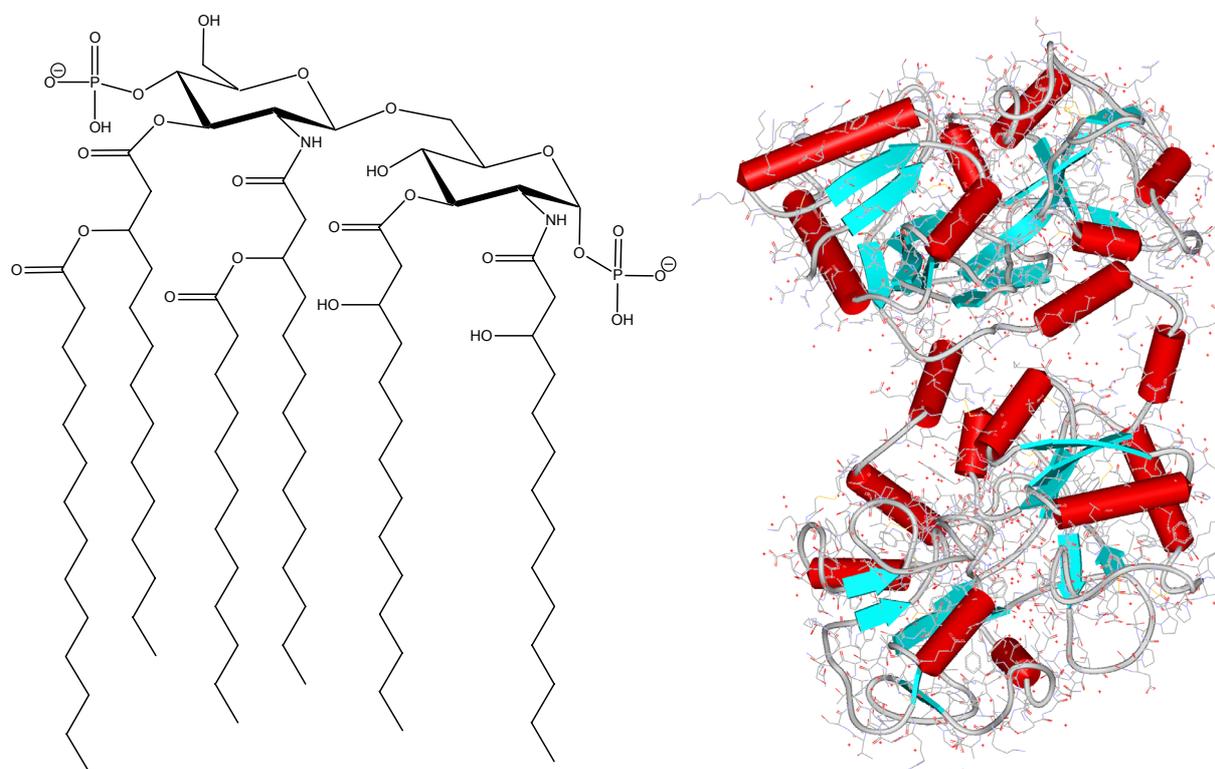


Abb. 3.41: Chemische Struktur von Bisphosphorylhexaacyl Lipid A (links). Röntgenkristallstruktur von hLf (rechts: Sun et al., 1999).

Menschliches Lf (hLf) besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette aus 692 Aminosäuren (Abb. 3.41, rechts). Es ist in zwei homologe N- und C-terminale Lappen gefaltet, die miteinander durch eine α -Helix verbunden sind. Diese Lappen sind jeweils wieder in zwei Domänen untergliedert, zwischen denen sich die Eisenbindungsstellen befinden. Die Aminosäuresequenzen 1-5 und 28-34 am N-Terminus werden für die Bindung von Lipopolysacchariden verantwortlich gemacht. Die Struktur wurde röntgenkristallographisch gelöst (Baker et al., 1998; Sun et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die Bindung bzw. Wechselwirkung von hLf an Lipid A an der Luft/Wasser-Grenzfläche untersucht. Dabei wurde sowohl auf die Acylkettenordnung und auf den Kopfgruppenbereich des Lipids, als auch auf die Sekundärstruktur des hLf eingegangen.

3.3.1.1 Lipid A

Der Verlauf der π/A -Isotherme des Lipid A (Abb. 3.42) zeigt zwei Unstetigkeiten und damit zwei möglich Phasenübergänge an (bei ca. $1,55 \text{ nm}^2$ und 6 mN/m bzw. $1,34 \text{ nm}^2$ und 11 mN/m). Brandenburg et al. (2000) fanden nur einen Phasenübergang, der bei größeren Flächenwerten beginnt (ca. $1,75 \text{ nm}^2$ und 6 mN/m). Bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m ermittelten sie eine Fläche pro Molekül von ca. $1,23 \text{ nm}^2$, während bei den eigenen Messungen nur ein Wert von ca. $1,03 \text{ nm}^2$ gemessen wurde. Die aus den IRRAS-Spektren ermittelten Wellenzahlen der antisymmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande des Lipids zeigen zwischen $1,75$ und $1,35 \text{ nm}^2$ pro Molekül eine leichte Abnahme und bei noch kleineren Flächen pro Molekül eine stärkere Abnahme der Frequenzen. Dabei kommt es zur Ausbildung der *all-trans*-Konformation der Alkylketten, was die Frequenz von $2918,5 \text{ cm}^{-1}$ der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ -Bande andeutet. Bei Oberflächendrücken von ca. 31 bzw. 38 mN/m sind die Alkylketten von Lipid A senkrecht zur Wasseroberfläche ausgerichtet (Tab. 3.12).

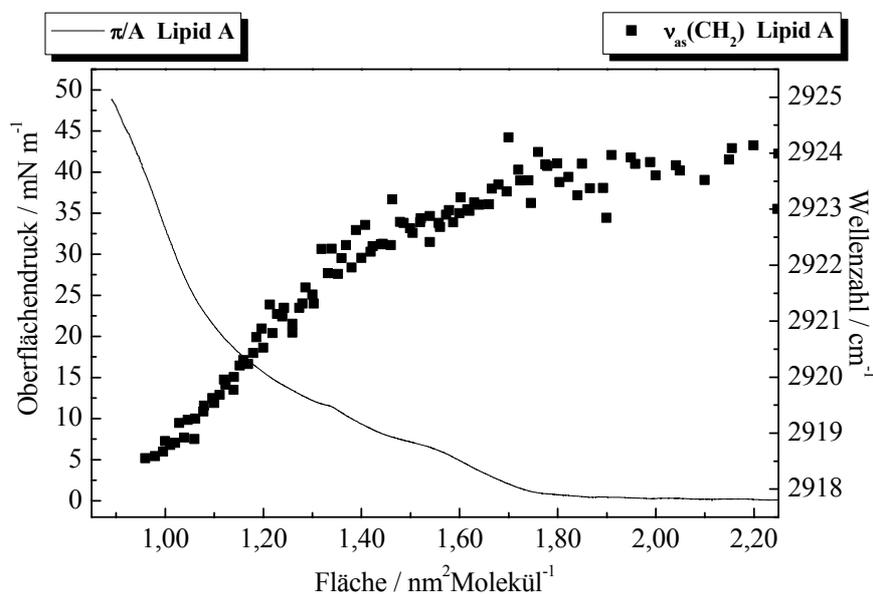


Abb. 3.42: IRRAS- π/A -Isotherme von Lipid A (Oberflächendruck: —, Wellenzahl: ■). Komplementär dazu ist das $\bar{\nu}_{\text{as}}(\text{CH}_2)/A$ -Diagramm dargestellt. Die Messungen erfolgten mit s-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O (5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl , $\text{pH } 7,0$) bei 20°C .

3.3.1.2 Lactoferrin

Nach der Injektion des Lactoferrin in die wässrige Lösung (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,0) adsorbierte das Protein an die Luft/Wasser-Grenzfläche. Nach ca. 4 bis 5 Stunden wurde ein Oberflächendruck von ca. 11 mN/m erreicht. Die Lage der Minima der Amid-I-Bande in den IRRAS-Spektren bei ca. 1659 cm⁻¹ zeigt eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur an (Abb. 3.43). Bei allen Spektren ist zu beachten, daß die Amidbanden noch von der H₂O-Scherschwingungsbande überlagert sind. In den IRRAS-Spektren, die mit p-Polarisation bei einem Einfallswinkel oberhalb des Brewsterwinkels aufgenommen wurden, läßt sich die Verschiebung der Lage der Amidbandenmaxima zu tieferen Frequenzen anhand von Spektrensimulationen nachvollziehen (siehe z. B. Anhang Abb. A.7.1, unten rechts). Anhand der Amid-I- und Amid-II-Bande läßt sich erkennen, daß ein nicht unerheblicher Anteil an β -Faltblattstrukturen vorhanden ist (bei ca. 1630 bzw. 1530 cm⁻¹). Dies ist auch aus der Röntgenkristallstruktur des Proteins ersichtlich (Abb. 3.41, rechts) und wurde auch IR-spektroskopisch bestimmt (38 % α -Helix- und 25 % β -Faltblattgehalt: Brandenburg et al., 2001). Die α -Helices der Sekundärstruktur des Proteins besitzen keine Vorzugsrichtung, so daß die Bestimmung der Orientierung des Moleküls anhand der Orientierung der α -Helices nicht sinnvoll ist. Eine Betrachtung von simulierten IRRAS-Spektren der Amid-I-Bande für eine α -Helix (Anhang Abb. A.7.1) ergibt jedoch für die vorliegenden experimentellen IRRAS-Daten, daß eine eventuelle Vorzugsrichtung der α -Helixachsen entweder nicht existiert ($\theta = 54,7^\circ$, Anhang Abb. A.7.1, unten links) oder parallel zur Luft/Wasser-Grenzfläche ausgerichtet ist ($\theta = 70^\circ$, Anhang Abb. A.7.1, unten rechts). Für den Winkel des Übergangsdipolmomentes in Bezug auf die Helixachse wurde $\alpha = 36^\circ$ angenommen (Buffeteau et al., 2000).

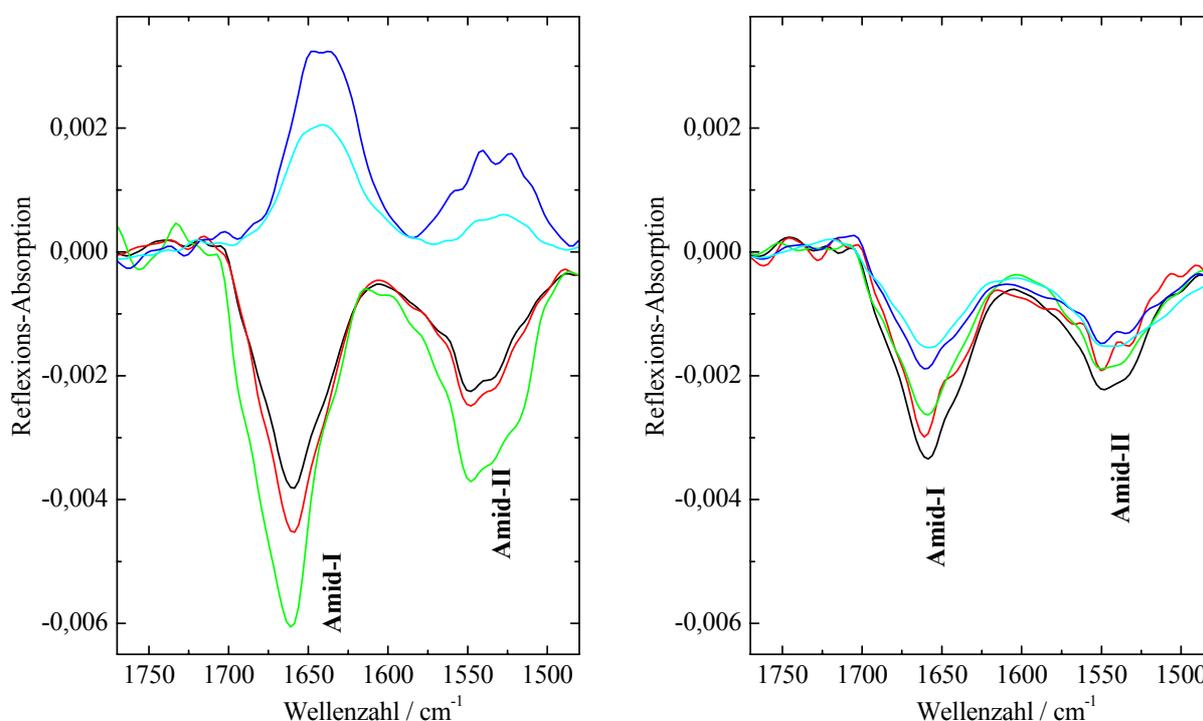


Abb. 3.43: IRRAS-Spektren von Lactoferrin im Bereich der Amid-I- und Amid-II-Moden. Die Messungen erfolgten mit p- bzw. s-Polarisation (links bzw. rechts) bei einem Einfallswinkel von 32° (—), 40° (—), 48° (—), 60° (—) und 64° (—) bei ca. 11 mN/m auf H₂O (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,0) bei 20 °C.

3.3.1.3 Lipid A und Lactoferrin

Die Injektion von hLf in die Subphase unter einen reinen Lipid A-Film (Abb. 3.44 a) führte nur zu einem geringen Druckanstieg von 29,1 auf 30,2 mN/m. In den IRRAS-Spektren ist die Adsorption durch die Ausbildung der Amid-I- und Amid-II-Bande zu erkennen (Abb. 3.44 b). Außerdem nimmt die Intensität der vorhandenen OH-Streckschwingungsbande des Wassers zu. Dieser Anstieg ist hauptsächlich mit der Zunahme der Schichtdicke korreliert. Ein Differenzspektrum aus IRRAS-Spektren nach und vor der Injektion beschreibt allein das adsorbierte Protein, wie es im Lipid/Protein-Film vorliegt (Abb. 3.44 c). Die Subtraktion kann unter der Annahme erfolgen, daß das Lipid sich kaum verändert. Dies ist gerechtfertigt, da die Methylstreckschwingungsbanden und die Carbonylstreckschwingungsbande durch die Differenzbildung eliminiert werden. Außerdem ändert sich der Tiltwinkel der Alkylketten von Lipid A durch die Proteinwechselwirkung nicht (Tab. 3.12). Ein Vergleich des Differenzspektrums mit dem IRRAS-Spektrum des reinen Lactoferrinfilms zeigt, daß die beiden Spektren nahezu identisch sind, sowohl im Amid-, als auch im OH-Streckschwingungsbereich.

Brandenburg et al. (2001) fanden mit Transmissions-FTIR-Messungen keine Änderung der Sekundärstruktur des Lactoferrins aufgrund der Bindung des Proteins an Lipid A. Die Ordnung der Alkylketten des Lipid A wurde dagegen sowohl in der L_β - als auch in der L_α -Phase erhöht. In der Kopfgruppenregion wurden mit FTIR-ATR-Messungen eine Aufspaltung der antisymmetrischen Phosphatbande gefunden. Neben der Bande bei 1260 cm^{-1} wurde nach der Zugabe des hLf bei 1229 cm^{-1} eine weitere Bande gefunden, die durch eine zunehmende Hydratation der Phosphatgruppe erklärt wurde.

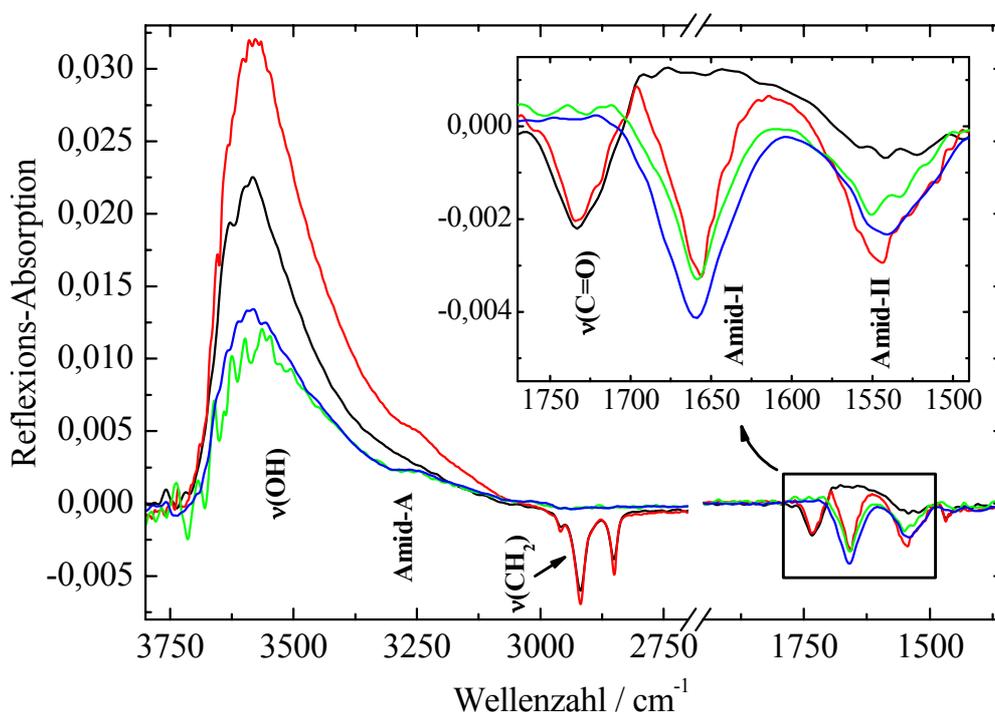


Abb. 3.44: IRRAS-Spektren: a) Lipid A (29,1 mN/m; —). b) Lipid A/hLf nach Injektion von hLf in die Subphase von a) ($[\text{hLf}] = 1\ \mu\text{M}$; nach 2,5 Stunden; 30,2 mN/m; —). c) Differenzspektrum von b) und a) (—). d) Adsorption von hLf an die Luft/Wasser-Grenzfläche ($[\text{hLf}] = 1\ \mu\text{M}$; nach 4,5 Stunden; 11 mN/m; —). Die Messungen erfolgten mit p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O (5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl , pH 7,0) bei 20°C .

Lipid	Druck π / N/m	Tilt θ	$k_{\max, as}$	$k_{\max, s}$
			$\nu_{as, s}(CH_2)$	
Lipid A	$37,7 \pm 1,6$	0 ± 5	0,395	0,234
Lipid A	$31,4 \pm 0,5$	0 ± 5	0,375	0,220
Lipid A/hLf	$31,3 \pm 0,2$	0 ± 5	0,370	0,215

Tab. 3.12: Tiltwinkel und Absorptionskoeffizienten von Lipid A. Die Daten wurden aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen erhalten (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2).

In den IRRAS-Spektren von Lipid A sind die für das Diglucosamin charakteristischen Schwingungsbanden bei 1170, 1085 und 1045 cm^{-1} sowie die unterschiedlich stark hydratisierten antisymmetrischen Phosphatstreckschwingungsbanden bei 1259 und 1236 cm^{-1} zu sehen (Spektren nicht gezeigt; Brandenburg et al., 1997; Fukuoka et al., 2001). Bemerkenswert ist, daß die Frequenzlage der $\nu_{as}(PO_2^-)$ -Bande bei 1259 cm^{-1} eine sehr starke Dehydratisierung der Phosphatgruppe anzeigt. In den IRRAS-Spektren sind nach der Adsorption des Lactoferrins an das Lipid A keine Veränderungen zu erkennen. Die Orientierung des Diglucosaminrückgrats in Bezug auf die Membranoberfläche ist direkt mit der biologischen Wirksamkeit gekoppelt und mit zunehmender Neigung steigt die endotoxische Aktivität (Seydel et al., 2000). Aufgrund der im Kopfgruppenbereich stark schwankenden Basislinie kann anhand der IRRAS-Banden jedoch keine Orientierung des Diglucosaminrückgrats an der Luft/Wasser-Grenzfläche bestimmt werden.

3.3.1.4 Zusammenfassung

Das globuläre Protein Lactoferrin ist oberflächenaktiv und adsorbiert sowohl unspezifisch an die Luft/Wasser-Grenzfläche als auch spezifisch an Lipid A. Eine Wechselwirkung mit dem Lipidfilm oder gar ein Einbau in den Kopfgruppen- oder Kettenbereich kann nicht festgestellt werden. Dafür spricht, daß keine Veränderung im CH_2 -Streckschwingungsbereich der Acylketten und im Kopfgruppenbereich des Lipids gefunden werden. Ebenso wird die Sekundärstruktur des Proteins nicht verändert. Die adsorptionsbedingte Zunahme der Intensität der OH-Streckschwingungsbande ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Intensität dieser Bande mit der Schichtdicke des untersuchten Films korreliert werden kann (siehe Kap. 2.2.3.2 und 3.1).

Es existiert ein Lactoferrin-Peptid (Lactoferricin) mit einem breiten Spektrum antibakterieller Wirksamkeit gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, Hefe und Schimmel, das aus menschlichem und Rinder-Lf (hLf bzw. bLf) isoliert wurde (Tomita et al., 1994). Dieses Peptid (Aminosäurereste 1-47 von hLf bzw. 17-41 von bLf) wäre für weitere Studien interessant, da besonders dieser Sequenzbereich für die hohe Affinität von LPS zu Lf verantwortlich gemacht wird (Baveye et al., 1999). Damit sollten spezifischere Aussagen bezüglich einer Orientierung des Peptids möglich sein. Für das Lactoferrin als globuläres Protein, in dem die Sekundärstrukturelemente (meist α -Helices) nicht in einer bestimmten Vorzugsrichtung orientiert sind, ist dies nicht möglich.

3.3.2 POPG und KLAL

Im Abwehrsystem von Insekten, Amphibien und Säugetieren kommen bestimmte Peptide vor, die eine antimikrobielle Wirkung besitzen. Eindringende Mikroorganismen werden abgetötet, indem ihre Zellmembranen durch die Peptide zunehmend durchlässig gemacht werden und schließlich aufgelöst werden (Lyse). Die Peptide sind meist aus 12 bis 45 Aminosäuren aufgebaut. Sie sind stark basisch (kationisch), da sie viele Lysin- und/oder Argininreste besitzen und bilden amphipatische Sekundärstrukturen aus (α -Helix und β -Faltblatt) (Bechinger, 1999; Dathe & Wieprecht, 1999; Matsuzaki, 1999). Die bemerkenswerte antibakterielle Selektivität hat diese speziellen Peptide zu potentiellen Kandidaten für die Entwicklung von neuen Antibiotika gemacht.

Zur Erforschung der elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen von Peptiden mit Lipidmembranen haben Dathe et al. (1996) verschiedene Modellpeptide synthetisiert, von denen in dieser Arbeit das Peptid KLAL mit der Sequenz KLALKLALKALKAAKLKA untersucht wurde, das die Aminosäuren Lysin (K), Leucin (L) und Alanin (A) enthält. Die 5 Lysinreste sind die Träger der positiven Ladungen, während neben den Alaninresten vor allem die Leucinreste für die Hydrophobizität des Peptids verantwortlich sind. Der Aufbau der KLAL-Aminosäuresequenz sollte in der angestrebten α -helikalen Anordnung des Peptids zu einer räumlichen Trennung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren führen, wie es in Abb. 3.45 (oben) dargestellt ist. Abb. 3.45 (unten) zeigt die Struktur eines KLAL-Einzelstrangs in einer β -Faltblattanordnung, die aufgrund der Kürze der Aminosäuresequenz nur intermolekular möglich ist.

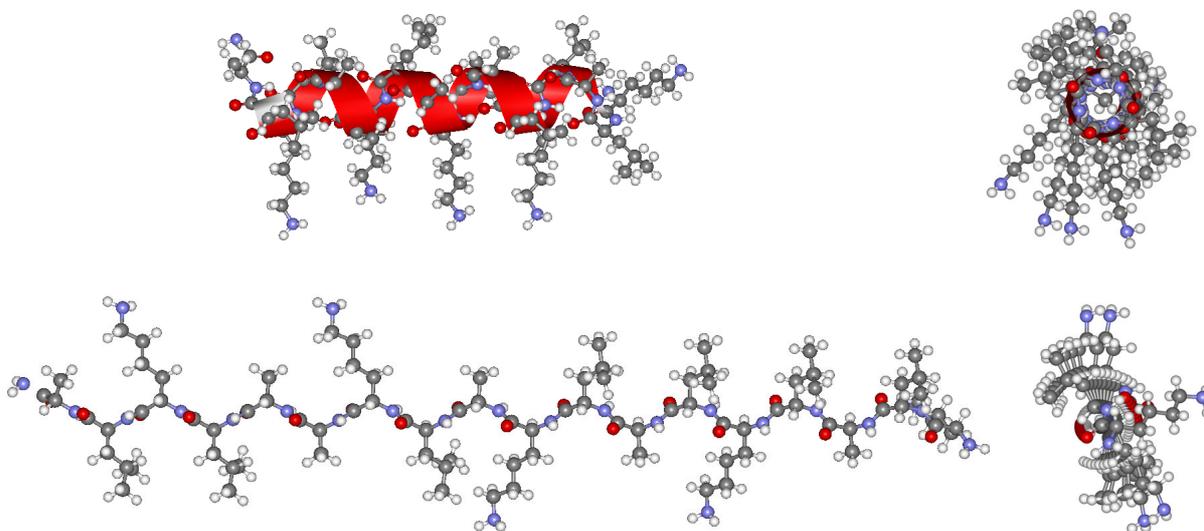


Abb. 3.45: Strukturvorschläge (links: Seitenansicht; rechts: Querschnitt) für KLAL für eine α -Helix (oben) und einen einzelnen Strang eines β -Faltblatts (unten).

3.3.2.1 KLAL

Die Injektion des KLAL-Peptids in reines Wasser erzeugte auch nach Stunden keinen meßbaren Druckanstieg. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Melittin beobachtet (Blaudez et al., 1996). Erst die Verwendung einer wässrigen Pufferlösung mit einer bestimmten Ionenstärke führte zu einer Erhöhung der Oberflächenaktivität. Nach der Injektion adsorbierte das KLAL sofort mit einem Oberflächendruck von ca. 20 mN/m an die Luft/Wasser-Grenzfläche. Die IRRAS-Spektren zeigen für die Amid-I-Bande eine Hauptkomponente bei

ca. 1620 cm^{-1} und eine schwache Nebenkomponente bei ca. 1693 cm^{-1} (Abb. 3.46). Die Hauptkomponente der Amid-II-Bande liegt bei 1535 cm^{-1} , während sich eine schwächere Komponente bei ca. 1550 cm^{-1} befindet. Diese Frequenzen können einer β -Faltblattstruktur zugeordnet werden (Goormaghtigh et al., 1994). Die Asymmetrie der Amid-I-Bande zu höheren Frequenzen hin, sowie die kleinere Amid-II-Komponente deuten einige Anteile an α -helikalen Strukturelementen an. Eine Simulation von IRRAS-Spektren mit allen 3 Amidbanden ergibt, daß das KLAL- β -Faltblatt flach auf der Wasseroberfläche liegt, denn nur für diese Anordnung besitzen alle 3 Amidbanden ein negatives Vorzeichen (siehe Anhang Abb. A.8.1, oben links; sowie Abb. 1.4 und Abb. 2.1).

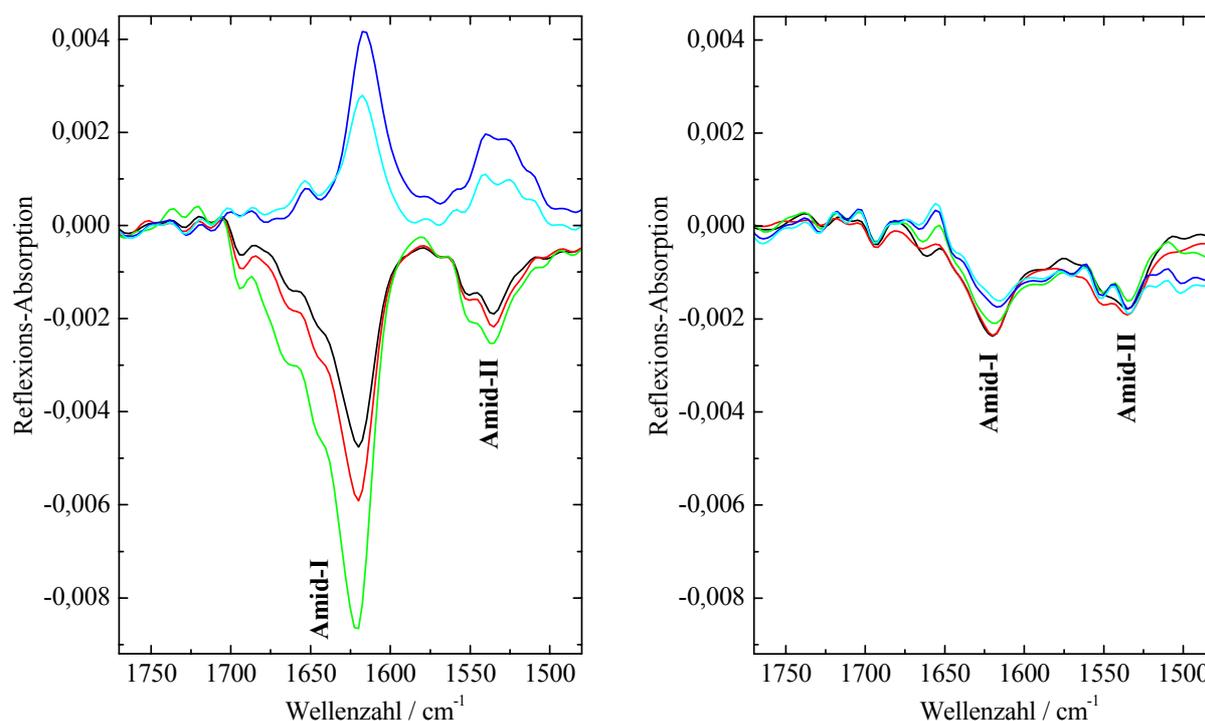


Abb. 3.46: IRRAS-Spektren von KLAL im Bereich der Amid-I- und Amid-II-Moden. Die Messungen erfolgten mit p- bzw. s-Polarisation (links bzw. rechts) bei einem Einfallswinkel von 32° (—), 40° (—), 48° (—), 60° (—) und 64° (—) bei ca. 19 mN/m auf H_2O (10 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 7,4) bei 20°C .

3.3.2.2 POPG und KLAL

Um die Wechselwirkung des KLAL mit einer negativ geladenen Lipidmonoschicht zu untersuchen, wurde das Peptid in die Subphase unter einen POPG-Film injiziert. Der Oberflächendruck stieg von ca. 23 mN/m innerhalb einer Stunde auf ca. 40 mN/m an. Mit dem Druckanstieg ist direkt die Intensitätszunahme der Amid-I-Bande in den entsprechenden IRRAS-Spektren korreliert (Abb. 3.47 a bzw. b). Im Vergleich zu dem reinen KLAL-Film (Abb. 3.46) liegt die Amid-I-Bande nun im Bereich der α -helikalen Sekundärstruktur (ca. 1660 cm^{-1}). In dem entsprechenden Differenzspektrum des KLAL aus dem POPG/KLAL-Film sind alle Lipidbanden ($\nu(\text{CH}_2)$ bzw. $\nu(\text{C}=\text{O})$) eliminiert, was auf keine großen Veränderungen für die POPG-Moleküle durch die Lipid/Peptid-Wechselwirkung hindeutet (Abb. 3.47 c). Neben der veränderten Sekundärstruktur des KLAL kommt es im OH-Streckschwingungsbereich des IRRAS-Spektrums zu einer geringen Intensitätszunahme der $\nu(\text{OH})$ -Bande. Da diese Bande mit der Schichtdicke des Oberflächenfilms korreliert, kommt es nur zu einer geringen Zunahme der Schichtdicke während der Peptidadsorption.

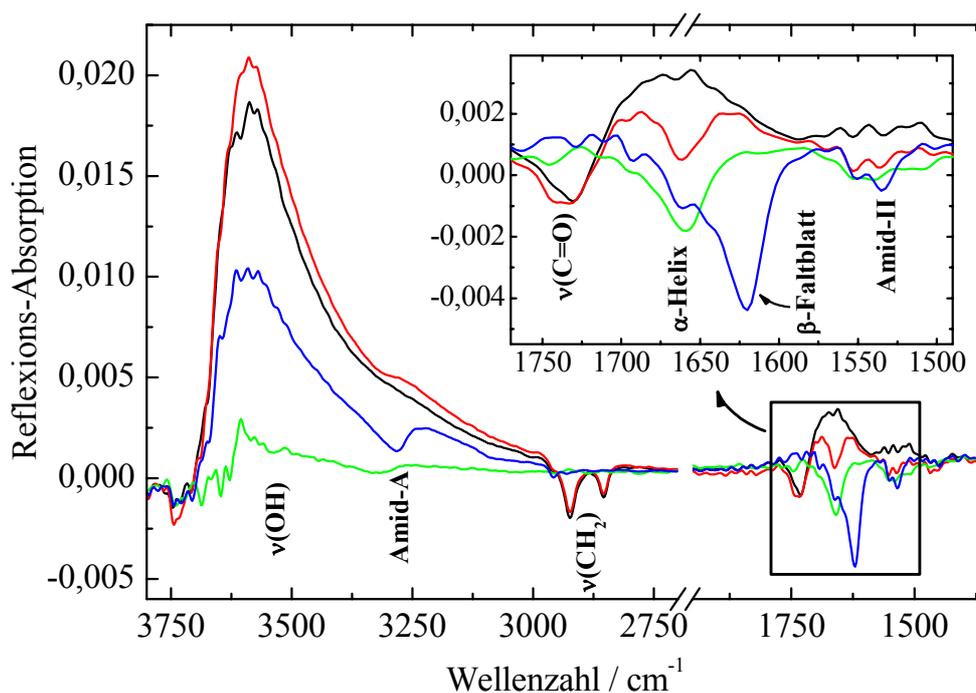


Abb. 3.47: IRRAS-Spektren: a) POPG (23 mN/m; —). b) POPG/KLAL nach Injektion von KLAL in die Subphase von a) ([KLAL] = 2,25 μ M; nach 1 Stunde; 40 mN/m; —). c) Differenzspektrum von b) und a) (—). d) Adsorption von KLAL an die Luft/Wasser-Grenzfläche ([KLAL] = 2,25 μ M; 20 mN/m; —). Die Messungen erfolgten mit p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf H_2O (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) bei 20°C .

3.3.2.3 Zusammenfassung

Das oberflächenaktive Peptid KLAL bildet an der Luft/Wasser-Grenzfläche intermolekulare β -Faltblattstrukturen aus. Weitergehende Messungen wurden von Erbe (2001) durchgeführt, der bei sehr großen Flächen pro Molekül α -helikale Strukturen nachweisen konnte. Die Bindung an anionische Lipidmonoschichten (POPG) erfolgt als α -Helix, wobei ein sehr starker Druckanstieg beobachtet wurde. Die Orientierung der α -Helix im POPG/KLAL-Film wurde aus polarisations- und einfallswinkelabhängigen IRRAS-Messungen der Amid-I-Bande berechnet (siehe Kap. 2.2.3.1 und 5.2.2.2). Die Helix ist annähernd parallel zur Grenzfläche ausgerichtet (Tiltwinkel $\theta \geq 54^\circ$; Erbe, 2001). Der geringe Intensitätsanstieg der OH-Streckschwingungsbande während des Oberflächendruckanstiegs deutet auf eine sehr geringe Zunahme der Filmschichtdicke hin. Aufgrund dieser Beobachtungen kann auf den Einbau des Peptids in den Lipidfilm geschlossen werden. Sowohl die Druckzunahme, die nicht nur auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen kann, als auch der Tiltwinkel des Moleküls und die annähernd konstante Schichtdicke lassen auf das in Abb. 3.48 dargestellte Modell schließen.

Weitergehende Messungen wurden von Erbe (2001) durchgeführt. Dabei wurden weitere KLAL-Peptidanaloga untersucht. Außerdem wurde die Ladungszusammensetzung der Lipidmonoschicht variiert, indem das zwitterionische POPC zugemischt wurde. Ein interessanter Effekt konnte während der Vergrößerung der Filmoberfläche eines KLAL/POPG-Films entdeckt werden. Dazu wurden die Barrieren des Langmuirtropes auseinandergedrückt. Aufgrund der größeren Fläche pro Molekül konnte weiteres KLAL an die Grenzfläche gelangen, das zusätzlich zur vorhandenen α -helikalen Struktur eine β -Faltblattstruktur ausbildete. Durch erneute Kompression des Films wurden die

β -Faltblattstrukturen reversibel zurückgebildet, bis das KLAL wieder in seiner α -helikalen Form vorlag.

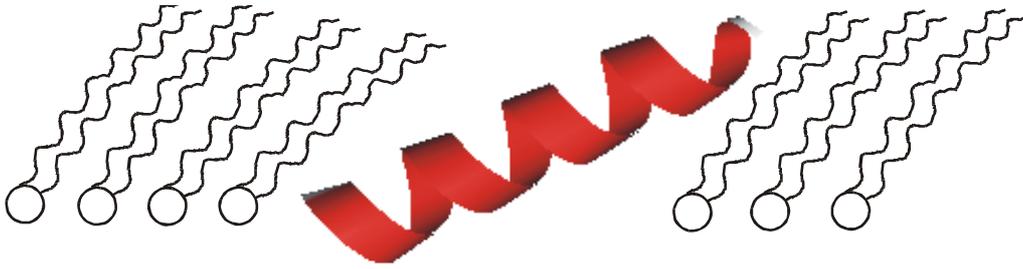


Abb. 3.48: Mögliche Anordnung der amphipatischen α -Helix des KLAL-Peptids in einem POPG-Film.

3.3.3 GM1 und GM2-Aktivatorprotein

Für den lysosomalen Abbau der Ganglioside werden Exohydrolasen benötigt, die sequentiell die Zucker vom hydrophilen Ende zum Ceramid-Grundgerüst entfernen. Der Weg der Ganglioside von der Plasmamembran zu den Lysosomen wird im allgemeinen durch endocytotische Prozesse über das frühe und späte Endosom beschrieben. Beim Abbau von membran- oder vesikelgebundenen Glykosphingolipiden mit kurzen Oligosaccharidketten benötigen die Exohydrolasen kleine Glykoprotein-Kofaktoren, sogenannte Sphingolipidaktivatorproteine (SAP). Es sind fünf SAPs bekannt, SAP A - D und das GM2-Aktivatorprotein (GM2-AP). Das GM2-AP unterstützt die Hydrolyse von terminalen GalNAc-Einheiten durch β -Hexosaminidase (Hex A). Ein Defekt in einem Enzym oder SAP führt zu einer Anreicherung von Glykosphingolipiden in den Lysosomen und damit zu einer der zahlreichen Varianten der Sphingolipidspeicherkrankheiten (Gravel et al., 2001; Sandhoff et al., 2001). Die sterische Hinderung der β -Hexosaminidase bei der Hydrolyse von membrangebundenem GM2 wird durch den GM2-Aktivator überwunden, der mit GM2 einen Komplex bildet, der als Substrat für die Hydrolyse geeignet ist. Nach bestehenden Modellvorstellungen könnte es die Aufgabe des GM2-Aktivatorproteins sein, das Gangliosid GM2 vollständig aus der Membran zu ziehen, um es Hex A zu präsentieren oder das Protein hebt das Gangliosid ein wenig an, um Hex A eine bessere Angriffsmöglichkeit zu verschaffen (siehe Anhang Abb. A.9.1; Fürst & Sandhoff, 1992; Meier et al., 1991). Der enzymatische Abbau von membrangebundenem GM1 durch saure β -Galactosidase benötigt die Aktivatorproteine SAP-B und GM2-AP, sowie anionische Lipide, wie z. B. Bis-(monoacylglycero)phosphat (BMP) oder Phosphatidylinositol (PI) (Wilkening et al., 2000). Beim GM2-Abbau werden ebenfalls anionische Lipide und der GM2-Aktivator benötigt (Werth et al., 2001). Generell stimulieren anionische Lipide wie BMP, PI oder Dolicholphosphat, die im Inneren von Lysosomen vorkommen, den Abbau von Sphingolipiden: GM1 durch saure β -Galactosidase und SAP-B und GM2-AP (Wilkening et al., 2000), GM2 durch β -Hexosaminidase und GM2-AP (Werth et al., 2001), Glucosylceramid durch Glucocerebrosidase und SAP-C (Wilkening et al., 1998), Sphingomyelin durch saure Sphingomyelinase und SAP-C (Linke et al., 2001).

Das GM2-Aktivatorprotein besteht aus 162 Aminosäuren und trägt an Asn32 eine Kohlenhydratkette. Die Röntgenkristallstruktur des GM2-Aktivatorproteins zeigt eine tassenförmige antiparallele β -Faltblattstruktur, die aus 8 Einzelsträngen aufgebaut ist (Abb. 3.49; Schubert-Wright et al., 2000). Der zentrale hydrophobe Hohlraum könnte eine C18-Lipidacylkette aufnehmen.

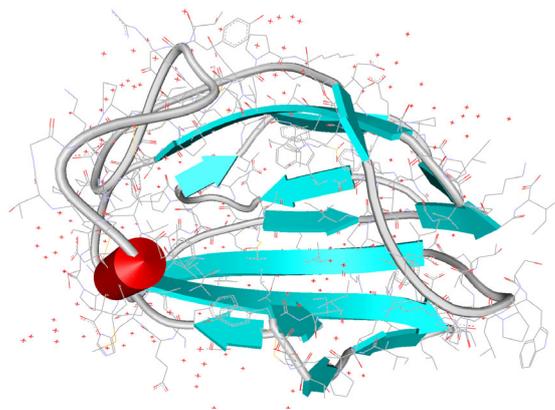


Abb. 3.49: Röntgenkristallstruktur des GM2-AP; Blick in die offene hydrophobe Bindungstasche (Schubert-Wright et al., 2000).

Giehl et al. (1999) haben Filmwaage- und DSC-Messungen zur Untersuchung der Wechselwirkung des GM2-Aktivatorproteins mit Phospholipid/Gangliosid-Gemischen durchgeführt. Die Filmwaageuntersuchungen ergaben, daß das Protein nur bei einem Oberflächendruck unterhalb von 25 mN/m in eine Monoschicht eingebaut werden konnte. Für gangliosidhaltige Filme lag dieser kritische Druck noch tiefer (15 mN/m bei DMPC/GM2 6:1). Das Protein kann anscheinend die Ganglioside nicht aus dem Film herausziehen. Stattdessen verhindern die Ganglioside, daß GM2-AP die Luft/Wasser-Grenzfläche erreicht.

3.3.3.1 GM2-Aktivatorprotein

Das GM2-Aktivatorprotein wurde direkt auf die Oberfläche einer wässrigen Subphase (10 mM Citratpuffer, 100 mM NaCl, pD 4,0) gespreitet, so daß die Oberflächenkonzentration 1 mg/m^2 betrug. Anschließend wurde der Proteinfilm komprimiert (π/A -Isotherme siehe Anhang Abb. A.9.2). In den IRRAS-Spektren liegt die Amid-I-Bande bei ca. 1625 cm^{-1} (Abb. 3.50), was auf eine β -Faltblattstruktur des Proteins hindeutet. Diese Sekundärstruktur wurde auch durch die Injektion des Proteins ($0,1 \text{ }\mu\text{M}$) in die wässrige Lösung und die nachfolgende Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche erzeugt. Das Protein adsorbierte innerhalb von ca. 30 Minuten an die Luft/Wasser-Grenzfläche und erreichte einen Oberflächendruck von ca. 15 mN/m, der nach ca. 5 Stunden noch auf ca. 20 mN/m anstieg. Die β -Faltblattstruktur des GM2-Aktivatorproteins wurde auch von Giehl (1997) in FT-IR-Transmissionsmessungen gefunden.

Aus der Röntgenkristallstruktur (Abb. 3.49) ist ersichtlich, daß die meisten der β -Faltblatteinzelstränge parallel zueinander ausgerichtet sind. Zusammen mit der Amid-II-Bande auf H_2O (mit p-Polarisation und bei einem Einfallswinkel von 40° ist diese Bande negativ; Spektrum nicht gezeigt) ergibt sich eine annähernd parallele Ausrichtung der β -Faltblattstrukturen an der Luft/Wasser-Grenzfläche (siehe auch Anhang Abb. A.8.1, oben links).

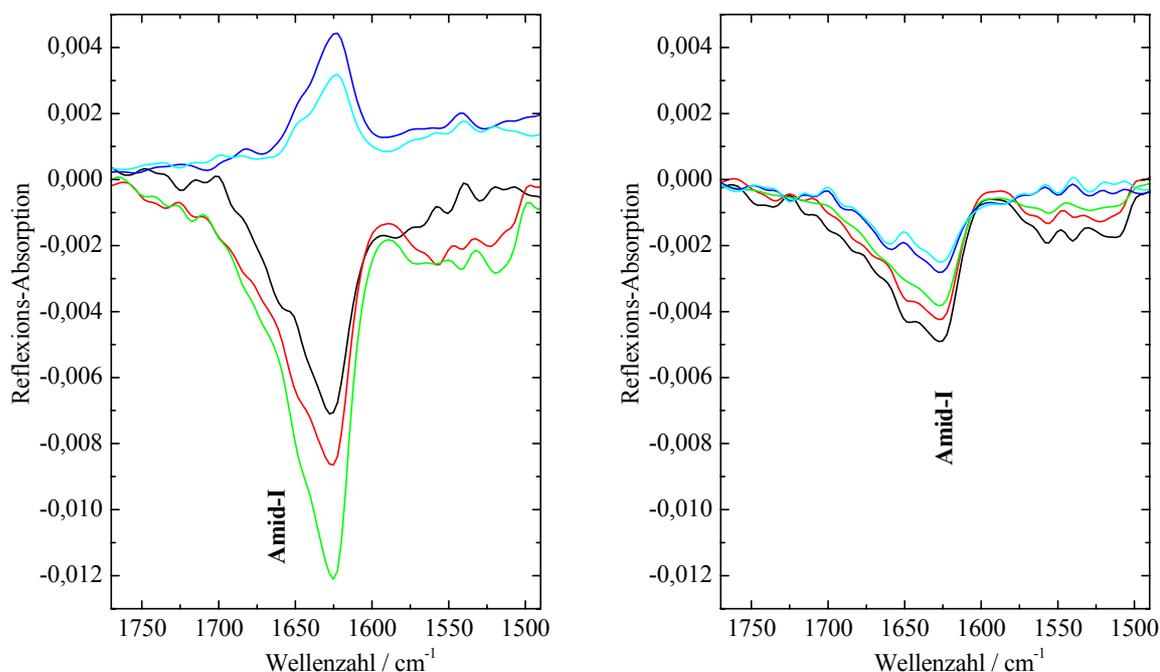


Abb. 3.50: IRRAS-Spektren von GM2-AP im Bereich der Amid-I-Bande. Die Messungen erfolgten mit p- bzw. s-Polarisation (links bzw. rechts) bei einem Einfallswinkel von 32° (—), 40° (—), 48° (—), 60° (—) und 64° (—) bei ca. 32 mN/m auf D_2O (10 mM Citratpuffer, 100 mM NaCl, pD 4,0) bei 20°C .

3.3.3.2 DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1 und GM2-Aktivatorprotein

Um die Wechselwirkungen des GM2-Aktivatorproteins mit Gangliosiden zu untersuchen, können sowohl GM1 als auch GM2 verwendet werden, da GM2-AP auch an GM1 gut bindet und außerdem leichter erhältlich ist (Wilkening, et al., 2000; Werth et al., 2001).

Das Gangliosid GM1 wurde zusammen mit dem anionischen C16-1-BMP in einem DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1-Film auf neutralem (D₂O-Phosphatpuffer, pD 6,8) bzw. saurem Medium (D₂O-Citratpuffer, pD 4,0) vorgelegt. Bei einem Oberflächendruck von ca. 30 mN/m ist in den IRRAS-Spektren der Lipidfilme jeweils die Carboxylatgruppe der Sialinsäure des GM1 bei ca. 1612 cm⁻¹ und die Amid-I-Bande als Schulter bei ca. 1630 cm⁻¹ zu sehen (siehe auch Kap. 3.2.2.1.1). Die Amid-II-Bande wurde durch den H/D-Austausch zu tieferen Frequenzen verschoben (Abb. 3.52 a; pD 6,8: links; pD 4,0: rechts). Die Injektion von GM2-Aktivatorprotein in die wässrige Subphase mit neutralen pD-Wert unter den GM1-haltigen Film führte zu einem leichten Oberflächendruckabfall von 30 auf 28 mN/m, während die Proteininjektion in das saure Medium einen leichten Druckanstieg des Lipidfilms von 30 auf 31 mN/m bewirkte. In den entsprechenden IRRAS-Spektren konnte in beiden Fällen keine Änderung im Amid-I-Bereich beobachtet werden. Erst durch eine Vergrößerung der Molekülfläche durch die Expansion der Filme, kam das GM2-Aktivatorprotein an die Grenzfläche und konnte anhand seiner Amid-I-Bande bei ca. 1630 cm⁻¹ detektiert werden. Bei dem Lipidfilm auf der sauren Subphase konnte bei einem Oberflächendruck von 10 mN/m und einer Fläche pro Molekül von 1,0 nm² die Amid-I-Bande des Proteins beobachtet werden (Abb. 3.52 b, rechts). Die Expansion wurde nicht weiter fortgesetzt und deshalb ist die

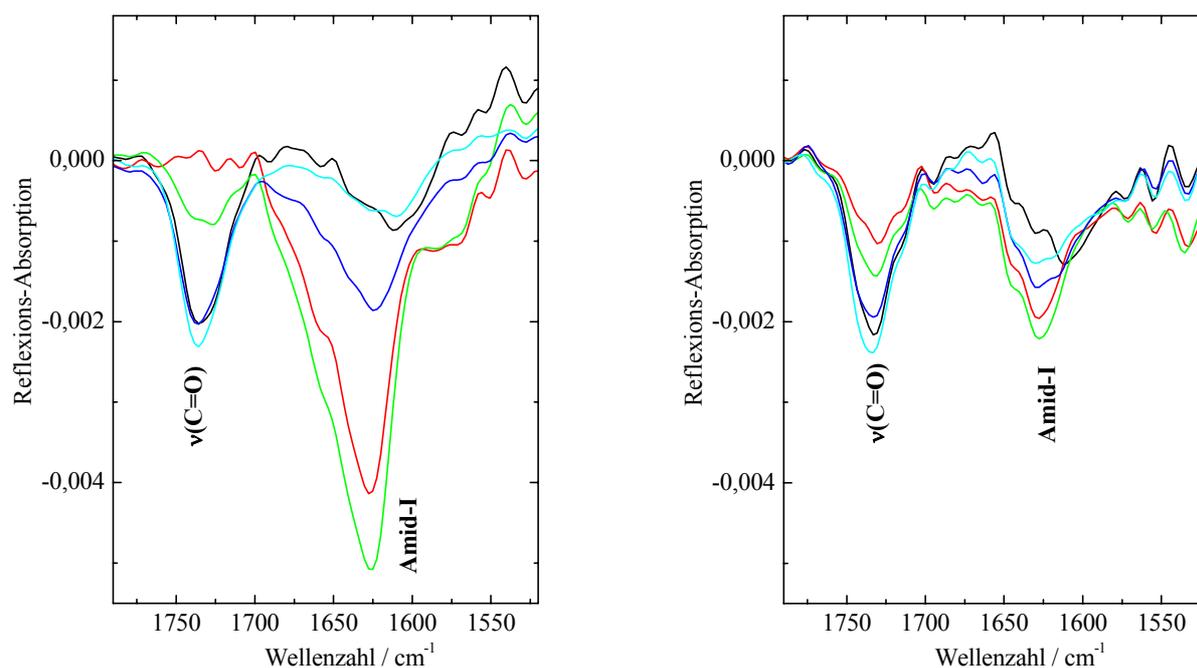


Abb. 3.52.: IRRAS-Spektren (links): a) DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1 bei 29 mN/m (—). b) DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1 nach Injektion von GM2-AP ([GM2-AP] = 0,1 μM) bei 29 mN/m und Expansion des Films auf 11 mN/m (—). c) Rekompensation des Films auf 35 mN/m (—), 40 mN/m (—) und 43 mN/m (—). Die Messungen erfolgten mit p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf D₂O (10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, pD 6,8) bei 20 °C. IRRAS-Spektren (rechts): a) DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1 bei 30 mN/m (—). b) DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1 nach Injektion von GM2-AP ([GM2-AP] = 0,1 μM) bei 30 mN/m und Expansion des Films auf 10 mN/m (—). c) Rekompensation des Films auf 29 mN/m (—), 35 mN/m (—) und 44 mN/m (—). Die Messungen erfolgten mit p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° auf D₂O (10 mM Citratpuffer, 100 mM NaCl, pD 4,0) bei 20 °C.

Amid-I-Bande nicht sehr intensiv. Der Film auf der neutralen Subphase wurde vollständig expandiert ($1,5 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1}$). Aufgrund der großen zur Verfügung stehenden Fläche, konnte bei diesem Film das GM2-AP verstärkt an die Oberfläche gelangen, was die sehr starke Amid-I-Bande erklärt (Abb. 3.52 b, links). Nach der Adsorption des GM2-AP wurden beide Filme wieder komprimiert. Auf dem neutralen Medium wurde das Protein bis zum Erreichen des Oberflächendrucks von ca. 43 mN/m wieder in die Subphase verdrängt (Abb. 3.52 c, links). Auf der sauren Subphase blieb trotz der Kompression bis in die Nähe des Kollapspunktes bei 44 mN/m ein kleiner Teil des Proteins an den Film gebunden (Abb. 3.52 c, rechts).

3.3.3.3 Zusammenfassung

Die β -Faltblattstruktur des oberflächenaktiven GM2-Aktivatorproteins liegt annähernd flach an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Die offene hydrophobe Bindungstasche des Proteins sollte sich dabei zur Luft hin ausrichten.

Um die Wechselwirkungen des Proteins an GM1-haltige Monolagen zu untersuchen, wurde ein DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1-Film bei einem Oberflächendruck von ca. 30 mN/m vorgelegt. Durch das DMPC-d₅₄ wurde ein flüssig-expandierter Phasenzustand und durch den Kofaktor C16-1-BMP die negative Oberflächenladung erzeugt. Neben einer annähernd pH-neutralen Subphase (pD 6,8) wurde eine saure Subphase (pD 4,0) gewählt, wie sie in den Lysosomen vorkommt.

Bei anfänglichen Oberflächendrücken von ca. 30 mN/m konnte bei keiner Messung eine Wechselwirkung des Proteins mit dem Lipidfilm beobachtet werden, d. h. es wurde keine Proteinbande in den Spektren gesehen. Dies wurde auch bei DPPC-d₆₂-, DMPC-d₅₄- und DMPC-d₅₄/GM1 4:1-Monoschichten beobachtet. Alle Filme wurden expandiert und bei Oberflächendrücken zwischen 10 und 15 mN/m konnte jeweils die Amid-I-Bande des Proteins detektiert werden. Dies bestätigt die von Giehl et al. (1999) gemessenen kritischen Oberflächendrücke, oberhalb derer sich kein Protein in den Lipidfilm einbauen kann. Durch erneute Kompression des Lipid/Protein-Films wurde das GM2-AP meist vollständig in die Subphase abgegeben. Der DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1-Film auf der sauren Subphase konnte einen Teil des angelagerten Proteins auch bei erhöhtem Oberflächendruck in der Monoschicht binden.

Das Protein scheint Gangliosidmoleküle nicht aus der Monoschicht herauszuziehen. Ein Mechanismus bei dem die Hydrolysereaktion mit der β -Hexosaminidase an der Grenzfläche abläuft scheint damit wahrscheinlicher zu sein als die andere vorgeschlagene Alternative.

4 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung von Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurde die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie im Arbeitskreis etabliert. Mit dieser Methode können Informationen über die molekulare Struktur der filmbildenden Amphiphile erhalten werden. Im Falle von Lipiden lassen sich Aussagen über die Konformation der Kohlenwasserstoffketten und über die Kopfgruppenstruktur, insbesondere deren Hydratisierung, erhalten. Für geordnete Alkylketten ist es außerdem möglich deren Orientierung zu bestimmen. Von Peptiden und Proteinen läßt sich sowohl an der Luft/Wasser-Grenzfläche als auch in Wechselwirkung mit Lipidmonoschichten die Sekundärstruktur untersuchen. Teilweise ist es möglich die Orientierung dieser Sekundärstrukturen zu bestimmen.

Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie

Nach Aufbau und Justierung wurde die IRRAS-Einheit vollständig über eine selbstentwickelte Computersoftware automatisiert. Das Programm gliedert sich in mehrere Module. Zum einen erlaubt es die einfache Messung von Druck/Flächen-Isothermen von Langmuirfilmen. Desweiteren ist es möglich sowohl die Reflexionseinheit als auch das IR-Spektrometer über das Programm zu kontrollieren. Somit können mittels eines Ablaufprotokolls IRRAS-Spektren an vorher festgesetzten Flächen oder Oberflächendrucken über den kompletten Verlauf der Druck/Flächen-Isotherme eines Films aufgenommen werden.

Außerdem wurde ein Programm zur Simulation von IRRAS-Spektren und zur Berechnung der Orientierung von Molekülschwingungen geschrieben. Um den Tiltwinkel θ des Moleküldirektors zur Oberflächennormalen berechnen zu können, benötigt man die Intensitäten einer Schwingungsbande (z. B. die antisymmetrische CH_2 -Streckschwingungsbande), die bei verschiedenen Einfallswinkeln φ_1 und mit s- bzw. p-polarisierter Strahlung gemessen wurden. Das Programm vergleicht die experimentellen mit den berechneten IRRAS-Bandenintensitäten und die Abweichungen werden mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate minimiert. Um außerdem den Twistwinkel ψ des Moleküldirektors bestimmen zu können, müssen zusätzlich die Intensitätsdaten einer anderen IRRAS-Bande (im obigen Fall z. B. die symmetrische CH_2 -Streckschwingungsbande) in die Kalkulation miteinbezogen werden.

Mit dem vorgestellten mathematischen Formalismus war es möglich neben einzelnen IRRAS-Schwingungsbanden auch erstmals die Basislinie über den gesamten Wellenzahlbereich des IRRAS-Spektrums zu berechnen. Als charakteristische Filmparameter gehen die Schichtdicke, die Brechungsindices des Films n_o und n_{a0} und der Tiltwinkel θ in die Berechnung ein. Zur Auswertung der experimentellen Daten in Hinsicht auf eine Filmdickebestimmung eignet sich vor allem die OH-Streckschwingungsbande des Wassers, die nur zu einem geringen Teil durch strukturiertes Wasser unterhalb des Films beeinflusst wird.

8-Cyanobiphenyl

Für 8CB wird an der Luft/Wasser-Grenzfläche bei Kompression ein Übergang von einer Monoschicht zu einer Tripelschicht beobachtet. Die sich neu ausbildende Bilschicht oberhalb der Monoschicht sollte einer smektischen Phase entsprechen. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der IRRAS-Methode anhand der Cyanostreckschwingungsbande die Orientierung des Cyanobiphenylkerns bestimmt werden. In der Monoschicht besitzt der Kern einen Tiltwinkel von $\theta_M = 55^\circ \pm 3^\circ$, während für die Tripelschicht ein mittlerer Tiltwinkel von $\theta_T = 40^\circ \pm 3^\circ$ berechnet wurde. Die direkt nicht meßbaren IRRAS-Bandenintensitäten der Bilschicht wurden

ermittelt, indem die Werte der Monoschicht von den Daten der Tripelschicht subtrahiert wurden. Damit konnte der Tiltwinkel der Bisschicht mit $\theta_B = 30^\circ \pm 5^\circ$ bestimmt werden. Die Simulation der Basislinien für die Mono- und die Tripelschicht mit den berechneten Tiltwinkeln stimmt sehr gut mit den experimentellen Spektren überein.

DPPC-Isomere

Die Untersuchung der verschiedenen DPPC-Isomere mit unterschiedlich deuterierten Acylketten ergab, daß Frequenzverschiebungen der Methylenstretschwingungsbanden durch unterschiedliche Effekte bewirkt werden können, wenn sowohl CH_2 - als auch CD_2 -substituierte Acylketten verwendet werden. Die Verschiebung der antisymmetrischen CH_2 -Stretschwingungsbande zu höheren Frequenzen ist nicht nur auf eine Zunahme von *gauche*-Konformeren in den CH_2 -Ketten zurückzuführen. Im Falle der semisubstituierten DPPC-Isomere verschiebt sich die antisymmetrische CH_2 -Bande in geordneten Phasen um ca. 2 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen auf ca. $2920,3 \text{ cm}^{-1}$ gegenüber dem reinen DPPC. Eine zunehmende „Verdünnung“ der CH_2 -Ketten durch einen erhöhten Anteil an CD_2 -Ketten führt zu einer verringerten intermolekularen Schwingungskopplung unter den CH_2 -Ketten (Kodati et al., 1994). Über die dazugehörige Fermiresonanzbande resultiert dies in einer Verschiebung der antisymmetrischen CH_2 -Methylenstretschwingungsbande. Diese Verschiebung ist also neben der konformationellen Ordnung auch mit dem Grad der intermolekularen Schwingungskopplung verbunden. Dieser Befund ist wichtig für die später untersuchten Phospholipid/Sphingolipid- bzw. Phospholipid/BMP-Mischfilme, in denen die Phospholipide deuterierte Fettsäureketten besitzen.

Sphingolipide

Die Ganglioside GM1 und GM2 besitzen einen schwach ausgeprägten LE/LC-Phasenübergang, der allerdings in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht zu sehen ist. Das Gangliosid GM3 zeigt dagegen in seiner IRRAS- π /A-Isotherme einen deutlich ausgeprägten LE/LC-Phasenübergang. Anhand der Fluoreszenz-Mikroskopie konnte in den DPPC- d_{62} /GM1 4:1- bzw. DPPC- d_{62} /GM2 4:1-Mischfilmen vor dem eigentlichen Phasenübergang eine fluid/fluid-Phasenseparation beobachtet werden. In den entsprechenden Mischfilmen mit DMPC- d_{54} konnte bei Oberflächendrücken oberhalb von ca. 20 bis 30 mN/m der Beginn eines LE/LC-Phasenübergangs gefunden werden.

Bei einem Oberflächendruck von ca. 40 mN/m steigen mit der zunehmenden Größe der Oligosaccharidkopfgruppe der Ganglioside GM3, GM2 und GM1 die entsprechenden Tiltwinkel der Alkylketten von 22° über 25° auf 28° . Der Twistwinkel von ca. 45° bei allen Gangliosiden deutet auf eine freie Rotation um die Moleküllängsachse hin. In den Mischfilmen mit DPPC- d_{62} kommt es immer zu einer leichten Aufrichtung der Ketten des Phospholipids, während die Alkylketten des Gangliosids jeweils zwischen 2° bis 6° stärker als das Phospholipid geneigt sind (für GM1 und GM3; für GM2 konnte die Orientierung nicht bestimmt werden). Das GM3 wird gegenüber dem reinen Film stärker geneigt, während sich das GM1 aufrichtet.

Das Ceramid und das Glucosylceramid liegen an der Luft/Wasser-Grenzfläche als kondensierte Filme vor. Die Neigungswinkel der Alkylketten bei 40 mN/m betragen 9° bzw. 16° . Allerdings deutet der Twistwinkel von 23° für beide Moleküle auf eine starke Verdrehung der Alkylketten hin.

Das Sphingomyelin zeigt sowohl in der IRRAS- π /A-Isotherme als auch bei den berechneten Tiltwinkeln seine nahe Verwandtschaft zu DPPC.

Bis-(monoacylglycero)phosphate

Die hohen Phasenumwandlungstemperaturen der BMP-Moleküle in den kalorimetrischen Messungen deuten auf starke Wasserstoffbrückenbindungen hin. Das C16-2-BMP besitzt vermutlich noch eine invers-hexagonale H_{II} -Phase.

In den IRRAS-Spektren zeigt die antisymmetrische Phosphatstreckschwingungsbande ebenfalls eine starke Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an, da sie im Vergleich zu DPPC von ca. 1228 cm^{-1} für die verschiedenen BMP-Moleküle zu ca. 1205 bis 1212 cm^{-1} verschoben ist.

Bis auf das ungesättigte C18:1-1-BMP, das in einem flüssig-expandierten Phasenzustand vorliegt, bilden alle anderen BMP-Moleküle an der Luft/Wasser-Grenzfläche kondensierte Phasen. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen für DPPC- d_{62} -Mischfilme mit den beiden palmitinsäurehaltigen BMP-Lipiden direkt nach dem Beginn des Druckanstiegs eine fluid/fluid-Phasenseparation. Dagegen wird für den DPPC- d_{62} /C14-1-BMP 4:1-Mischfilm erst mit dem LE/LC-Phasenübergang die Bildung von Domänen beobachtet. In den Mischfilmen mit DMPC- d_{54} konnte bei Oberflächendrücken oberhalb von ca. 10 bis 20 mN/m der Beginn eines LE/LC-Phasenübergangs gefunden werden.

In den kondensierten Phasen besitzen die Kohlenwasserstoffketten der BMP-Moleküle einen Tiltwinkel von ca. 30° über den gesamten kondensierten Oberflächendruckbereich. Der Twistwinkel des C16-2-BMP beträgt ca. 45° , während sich bei den beiden in 1-Position substituierten BMP-Molekülen der Twistwinkel mit steigendem Oberflächendruck von ca. 50° auf 60° erhöht. In den Mischfilmen mit DPPC- d_{62} kommt es im Vergleich zu den reinen Filmen immer zu einer leichten Aufrichtung der Alkylketten der beiden Lipidkomponenten.

Der Hauptgrund für das differenzierte Verhalten der in 1- bzw. 2-Position substituierten Moleküle scheint die unterschiedliche Zugänglichkeit der freien Hydroxylgruppen an den Glycerinresten zu sein.

Lipid A und Lactoferrin

Das globuläre Protein Lactoferrin ist oberflächenaktiv und adsorbiert spezifisch an Lipid A, das bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m als kondensierter Film vorliegt. Eine Wechselwirkung mit dem Lipidfilm oder gar ein Einbau in den Kopfgruppen- oder Kettenbereich kann nicht festgestellt werden. Eine Änderung der hauptsächlich α -helikalen Sekundärstruktur konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Die adsorptionsbedingte Zunahme der Intensität der OH-Streckschwingungsbande ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Intensität dieser Bande mit der Schichtdicke des untersuchten Films korreliert werden kann.

POPG und KLAL

Das oberflächenaktive Peptid KLAL bildet an der Luft/Wasser-Grenzfläche intermolekulare β -Faltblattstrukturen und mit der Bindung an anionisches POPG eine α -Helix. Der geringe Intensitätsanstieg der OH-Streckschwingungsbande während der Bindung deutet auf eine sehr geringe Zunahme der Filmschichtdicke hin. Die starke Oberflächendruckzunahme während der Adsorption, die nicht nur auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen kann, die relativ parallele Ausrichtung der α -Helix zur Grenzfläche und die annähernd konstante Schichtdicke lassen auf einen Einbau des Peptids in den Lipidfilm schließen.

GM1 und GM2-Aktivatorprotein

Die β -Faltblattstruktur des oberflächenaktiven GM2-Aktivatorproteins liegt annähernd flach an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Die offene hydrophobe Bindungstasche des Proteins richtet sich dabei wahrscheinlich zur Luft hin aus. Bei anfänglichen Oberflächendrücken von ca. 30 mN/m konnte keine Wechselwirkung des Proteins mit DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1-, DMPC-d₅₄/GM1 4:1-, DMPC-d₅₄- bzw. DPPC-d₆₂-Monoschichten beobachtet werden. Erst durch die Expansion der Filme zu Oberflächendrücken zwischen 10 und 15 mN/m konnte die Amid-I-Bande des Proteins detektiert werden. Durch erneute Kompression des Lipid/Protein-Films wurde das GM2-AP meist vollständig in die Subphase abgegeben. Der DMPC-d₅₄/C16-1-BMP/GM1 3:1:1-Film auf der sauren Subphase konnte einen Teil des angelagerten Proteins auch bei erhöhtem Oberflächendruck noch in der Monoschicht binden.

Das Aktivatorprotein scheint Gangliosidmoleküle nicht aus der Monoschicht herauszuziehen. Der membrangebundene Mechanismus der GalNAc-Hydrolyse durch die β -Hexosaminidase und das Aktivatorprotein scheint damit wahrscheinlicher zu sein als die Komplexbildung des Gangliosids mit dem GM2-Aktivatorprotein in Lösung und die anschließende Hydrolyse durch die Hexosaminidase.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungsmittel und Substanzen waren zumindest vom Reinheitsgrad pro analysi und wurden, wenn nicht anders vermerkt, ohne weitere Reinigung verwendet. Das Wasser wurde ausschließlich aus der Reinstwasseranlage bezogen. Die Leitfähigkeit betrug $\leq 0,55 \mu\text{S}/\text{cm}$ bzw. $\geq 18,2 \text{ M}\Omega$.

5.1.1 Chemikalien

8CB (8-Cyanobiphenyl): Aldrich, Steinheim.

Chloroform und Methanol (HPLC- bzw. ACS-grade): Sigma-Aldrich, Deisenhofen bzw. Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

Anorganische Salze und Puffer: Merck, Darmstadt bzw. Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

Deuteriumoxid D_2O (99,9 Atom% D): Isotec Inc. (über Campro Scientific, Veenendaal, Niederlande).

5.1.2 Lipide

DPPC: Sygena, Liestal, Schweiz bzw. Lipoid GmbH, Ludwigshafen.

DPPC- d_{62} , DMPC- d_{54} , P- d_{31} PPC und PP- d_{31} PC: Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA.

Stearoyl-Ceramid (C18-Cer): Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA.

Stearoyl-Sphingomyelin (C18-SM), Stearoyl-Glucosylceramid (C18-GlcCer): Larodan, Malmö, Schweden.

Die Ganglioside GM1 (vorwiegend *N*-C18), GM2 (ca. 90% *N*-C18) und GM3 (vorwiegend *N*-C18; Fidia Research Laboratories, Abano, Italien) wurden von Prof. Dr. K. Sandhoff (Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Bonn) zur Verfügung gestellt.

Bis-(1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-)-phosphat (C16-1-BMP) wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. K. Sandhoff synthetisiert (Wilkening, 1998; Dang, 1982).

Prof. Dr. B. Dobner (Institut für Pharmazeutische Chemie, Halle) überließ uns das von ihm hergestellte Bis-(2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-)-phosphat (C16-2-BMP).

3-Myristoyl-*sn*-glycero-1-(1'-myristoyl-*sn*-glycero-3'-)-phosphat (C14-1-BMP) und 3-Oleoyl-*sn*-glycero-1-(1'-oleoyl-*sn*-glycero-3'-)-phosphat (C18:1-1-BMP): Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA.

Lipid A wurde durch Azetatpufferbehandlung von LPS F515 isoliert, gereinigt und in sein Triethylaminsalz umgewandelt. Lipid A wurde uns von Dr. K. Brandenburg (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt.

POPG: Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA.

5.1.3 Peptide und Proteine

Das Lactoferrin aus menschlicher Milch stammte von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und wurde von Dr. K. Brandenburg (Forschungszentrum Borstel) gestellt.

Das KLAL (KLALKLALKALKAALKLA) wurde mit der für Peptide gängigen Fmoc-Schutzgruppentechnik synthetisiert und über RP-HPLC gereinigt. Für unsere Messungen

wurde uns von Dr. M. Dathe (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) das entsprechende Hydrochloridsalz zur Verfügung gestellt. Zur Durchführung der IRRAS-Messungen verwendeten wir dementsprechend eine Subphase von 10 mM Tris-Puffer und 154 mM NaCl mit pH 7,4.

Das GM2-Aktivatorprotein (GM2-AP) in einer glykosylierten Version (exprimiert in einem Bacculo-System) wurde uns ebenfalls von Prof. Dr. K. Sandhoff zur Verfügung gestellt. Wir erhielten das Protein sowohl in einem Phosphatpuffer pH 6,8 als auch in einem Citratpuffer pH 4,0 (beide Lösungen enthielten je 0,02% Azid).

5.1.4 Instrumentierung

Dosierspritzen mit Gewindekolben: Hamilton Deutschland GmbH, Darmstadt.

Reinstwassersystem Clear-UV plus mit 2 vorgeschalteten SG Ionenaustauschern: SG Wasseraufbereitung u. Regenerierstation GmbH, Hamburg-Barsbüttel.

Filmwaagentröge samt Ansteuerungselektronik: Riegler & Kirstein GmbH, Berlin.

FT-IR-Spektrometer Equinox 55 in Verbindung mit der Reflexionseinheit XA 511: Bruker, Karlsruhe.

FT-IR-Spektrometer Vector 22: Bruker, Karlsruhe.

FT-IR-Spektrometer IFS66v/S mit Mikroskop IRscope II: Bruker, Karlsruhe; in Verbindung mit einer temperierbaren Küvettenhalterung Eurotherm: Bruker, Karlsruhe.

VP-DSC: MicroCal Inc., Northampton, MA, USA.

Ultraschallbad Transsonic 310/H: Elma, Singen.

pH-Meter pMX 3000/pH: WTW, Weilheim.

Thermostaten N3, F3 und F6: Haake, Karlsruhe.

5.2 Methoden

5.2.1 Filmwaagemessungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Alle Experimente wurden mit Wilhelmy-Filmwaagen durchgeführt, bei denen ein Filterpapierstück als Wilhelmyplättchen dient. Die IRRAS-Filmwaage besteht aus einem Proben- ($300 \times 60 \times 3 \text{ mm}^3$) und einem Referenztrög ($60 \times 60 \times 3 \text{ mm}^3$) aus Teflon, die durch 3 kleine Röhren miteinander verbunden sind. Dies ermöglicht einen gleich hohen Flüssigkeitsstand in beiden Trögen, was sehr wichtig für die IRRAS-Messungen ist. Die Breite garantiert, daß der IR-Strahlengang bei allen Einfallswinkeln auf eine waagrechte Oberfläche gelangt und der Meniskus am Trogrand keine Rolle spielt. Die beiden Teflonbarrieren des Probentröges sind computergesteuert und bewegen sich symmetrisch aufeinander zu (siehe Abb. 2.3 und Abb. 5.1).

Beide Tröge wurden, je nach Bedarf, mit einer Detergenzlösung (Tickopur R33, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gereinigt und dann mehrfach mit Reinstwasser gespült. Danach wurde die Subphase eingefüllt und die Temperatur mit einem Thermostaten auf $20^\circ \pm 0,5^\circ \text{C}$ eingestellt. Vor der eigentlichen Messung wurde die Reinheit der Wasseroberfläche durch mehrmaliges Komprimieren und Expandieren der Schubbarrieren kontrolliert. Dabei durfte der Oberflächendruck π sich nicht um mehr als $0,1 \text{ mN/m}$ ändern. Für die Messungen auf D_2O konnten diese optimalen Bedingungen nicht ganz eingehalten werden, da das käufliche D_2O nicht mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage vergleichbar ist. Für Messungen auf einer D_2O -haltigen Subphase bei einem bestimmten pD-Wert wurde die folgende Umrechnung aus den pH-Einheiten eines konventionellen pH-Meters verwendet: $\text{pD} = \text{pH} + 0,4$ (Jackson, 1989). Nach Füllen der Tröge wurden zwischen 15 und 50 μl der gewünschten Lösung mittels

einer Dosierspritze vorsichtig und tröpfchenweise auf die Oberfläche des Probentrogs aufgetragen. Die Lipidlösungen hatten Konzentrationen zwischen 0,5 und 1 mM und als Lösungsmittel diente eine Chloroform/Methanol-Mischung (meist 9:1, v/v), wobei darauf geachtet wurde, daß ein möglichst geringer Anteil an Methanol verwendet wurde, da dies ein Abtauchen der Substanz in die Subphase begünstigt. Nach einer Äquilibrierungszeit von mindestens 15 Minuten zur Verflüchtigung des Lösungsmittels wurden die Druck/Flächen-Isothermen (π/A -Isothermen) mit einer Kompressionsgeschwindigkeit von 0,02 nm²/Molekül und Minute mit einem selbstgeschriebenen Programm aufgezeichnet. Die Reproduzierbarkeit der Messungen lag in einem Intervall von $\pm 0,02$ nm²/Molekül bei vorgegebenen Druck.

5.2.2 IRRAS an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Die externe Reflexionseinheit XA 511 der Firma Bruker (Karlsruhe) befindet sich unter einer Plexiglasbox, um den Film auf der Luft/Wasser-Grenzfläche vor Umgebungseinflüssen zu schützen und um die Luftfeuchtigkeit im Strahlengang konstant zu halten.

Als Spektrometer dient ein Equinox 55 FT-IR-Spektrometer (Bruker) mit schmalbandigen (sehr empfindlichen) MCT-Detektor (siehe Abb. 5.1). Der IR-Strahl wird dabei aus dem Spektrometer ausgekoppelt und über ein System von planaren Spiegeln in einen im Einfallswinkel verstellbaren Arm (in Abb. 2.2 zu erkennen) eingekoppelt. Der letzte Spiegel, der den Strahl auf die Wasseroberfläche fokussiert hat eine Brennweite von 250 mm. Die Fokussierung erhöht die reflektierte Intensität und die große Brennweite minimiert den Fehler im Einfallswinkel. Die Einstellung der Arme und damit der Einfallswinkel erfolgt computergesteuert zwischen 20 und 80°. Das letzte optische Element vor der Luft/Wasser-Grenzfläche ist ein KRS-5-Polarisator mit einer besonders hohen Güte der linearen Polarisation (> 98 %). Er ist deshalb an dieser Stelle montiert, um eine Depolarisation der elektromagnetischen Strahlung an den Spiegeln zu vermeiden. Der Polarisator ist über den Computer per Schrittmotor einstellbar (4 Umdrehungen pro Grad). Außerdem ist noch optional ein photoelastischer Modulator (PEM) an dieser Position einsetzbar.

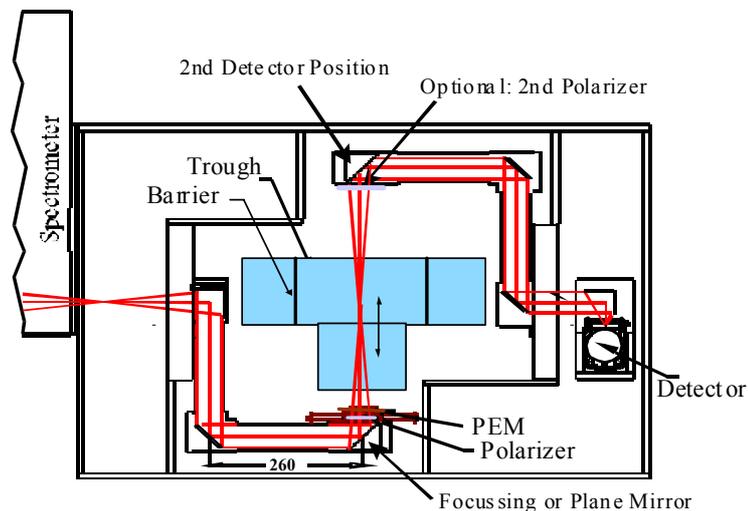


Abb. 5.1: Schematischer Aufbau der IRRAS-Apparatur.

Nach der Reflexion an der Luft/Wasser-Grenzfläche wird der IR-Strahl über ein analog aufgebautes System von Spiegeln in einem zweiten Arm, der die gleiche Winkeleinstellung wie der erste Arm hat, zu einem externen MCT-Detektor geführt. Der mit flüssigem Stickstoff gekühlte Detektor ist außerhalb der Plexiglasverkleidung der gesamten Reflexionseinheit positioniert. Somit kann während einer Meßreihe der Stickstoff ohne Probleme in den

Detektor nachgefüllt werden, ohne daß der Film die unweigerlich dabei auftretenden Temperaturabsenkungen in der Umgebung des Detektors erfährt.

Das in Kap. 5.2.1 beschriebene Trogsystem ist in der Reflexionseinheit auf einer fahrbaren Bühne montiert („Trog-Shuttle“). Damit können beide Tröge abwechselnd in den IR-Strahlengang geschoben werden. Wegen des geringen zeitlichen Abstandes zwischen Messung und Hintergrundmessung sind dadurch auch Beobachtungen im Bereich der Rotationsschwingungsbanden des Wasserdampfes möglich (zwischen 1400 und 1800 cm^{-1}). Die Verwendung eines „Shuttles“ wurde zum ersten Mal von Flach et al. (1994) erwähnt. Bei der Einrichtung der Motorensteuerung wurde darauf geachtet, daß zu Beginn der Bewegung der Motor langsam anfährt, ehe er innerhalb von 3 Sekunden seine Endgeschwindigkeit erreicht ($1,7\text{ mm/s}$).

Der gesamte Aufbau ist zum Zwecke der Schwingungsdämpfung auf einem massiv gemauerten Tisch im Keller des Gebäudes unterbracht.

Nachfolgend werden die drei hauptsächlich verwendeten Meßmethoden beschrieben:

5.2.2.1 IRRAS-Druck/Flächen-Isothermen

Zur Aufnahme von Druck/Flächen-Isothermen (π/A -Isothermen) wurde neben der Barrierenansteuerung ein Programm benötigt, das mit dem Spektrometer kommuniziert. Dabei mußten sowohl spektroskopische Parameter, als auch die Punkte in der Druck/Flächen-Isotherme, an denen gemessen werden sollte, übertragen werden, was in einem speziellen Programmmodul verwirklicht wurde. Dieses erlaubt während oder im Anschluß an IRRAS-Druck/Flächen-Isothermen die Durchführung von Orientierungsmessungen bei bestimmten Drucken bzw. Flächen pro Molekül (nachfolgendes Kap. 5.2.2.2).

Nachdem eine reine Druck/Flächen-Isotherme für eine Substanz (z. B. DPPC) gemessen wurde, wurde anhand dieser Daten das spezifische IRRAS-Meßprogramm entworfen. Die Festlegung der anzufahrenden Flächenwerte, an denen dann ein IRRAS-Spektrum gemessen werden sollte, orientierte sich an dieser Vorlage. Im gasanalogen Zustand wurde z. B. bei jeder Messung ein Hintergrundspektrum von der reinen Subphase im Referenztrogs aufgenommen, wobei die Schrittweite zwischen den anzufahrenden Flächen entsprechend groß gewählt wurde, da die Spektren meist nur einen geringen Informationsgehalt besaßen. Im flüssig-expandierten Zustand wurde die Schrittweite zwischen den einzelnen Flächen reduziert und nur noch bei jeder zweiten Messung wurde ein neues Hintergrundspektrum aufgenommen. Bei einem Phasenübergang von flüssig-expandiert nach flüssig-kondensiert und im flüssig-kondensierten Zustand wurde meist eine Schrittweite von $0,01\text{ nm}^2$ gewählt und nur für jedes dritte bzw. fünfte Spektrum ein neues Hintergrundspektrum gemessen. Daß nicht jedes Mal ein neues Referenzspektrum aufgenommen wird, ist deswegen von Vorteil, weil bei erhöhtem Oberflächendruck ein Stop der Filmwaagebarrieren eine verstärkte Druckrelaxation des Filmes zur Folge hat.

Folgendes Meßprotokoll wurde verwendet: Nachdem die Barrieren gestoppt wurden, erfolgte ein Wechsel des „Trog-Shuttles“ zum Referenztrogs. Nachdem dieser erreicht war, wurde noch 10 Sekunden gewartet und dann das Reflektivitätsspektrum R_0 der reinen Subphase aufgenommen. Danach wurde zum Film auf dem Probenrog zurückgefahren, wieder 10 Sekunden gewartet und das Probenspektrum R gemessen.

Beide Einkanalspektren wurden normalerweise bei einem Einfallswinkel von 40° und mit s-polarisiertem Licht gemessen. Es wurden 1000 Scans mit einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen und als Apodisierungsfunktion diente die Blackman-Harris 4-Term-Funktion mit einem Zerofilling-Faktor von 2. Die Aquisitionszeit für ein Spektrum samt Hintergrundaufnahme betrug ca. 4,5 Minuten. Die IRRAS-Spektren und damit die

Reflexions-Absorption RA errechnen sich nun daraus durch: $-\log(R/R_0)$. Der „cut-off“-Filter ($> 3000 \text{ cm}^{-1}$) zur Minderung von Aufheizeffekten wurde selten verwendet (siehe Kap. 2.2).

Wenn von diesen Bedingungen abgewichen wurde, ist dies bei dem entsprechenden Film vermerkt. Z. B. war es sinnvoll mit p-polarisiertem Licht zu messen, wenn eine große Änderung der Orientierung erwartet wurde.

Die Position der interessierenden $\nu(\text{CH}_2)$ - bzw. $\nu(\text{CD}_2)$ -Banden wurde unter Verwendung des von Cameron et al. (1982) entwickelten mathematischen Verfahrens zur Berechnung des Schwerpunktes ("center of gravity") einer Bande ermittelt. Danach wurden diese Bandenlagen gegen die zugehörige Fläche pro Molekül zusätzlich zur π/A -Isotherme in einem gemeinsamen Diagramm aufgetragen.

5.2.2.2 Orientierungsmessungen

Zur Bestimmung der Orientierung von Molekülen in einem Film an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurden IRRAS-Spektren sowohl mit p-, als auch mit s-polarisierter Strahlung bei Einfallswinkeln von 32 bis 70° in Schritten von 2° gemessen.

Nachdem der gewünschte Filmdruck bzw. die gewünschte Fläche pro Molekül erreicht wurde, wurde 15 Minuten gewartet. Dann wurden zunächst bei einem Einfallswinkel von 32° mit p-polarisierter Strahlung je Referenz- und Probenreflektivitätsspektrum 4000 Interferogramme addiert. Die Auflösung betrug bei diesen Messungen 8 cm^{-1} , die restlichen Parameter blieben unverändert. Bei einem Einfallswinkel von 68° wurde die Intensität der reflektierten Strahlung zu groß, so daß per Filterrad im Spektrometer eine den Strahlquerschnitt verkleinernde Apertur dazwischengeschaltet werden mußte. Diese wurde auch für die sich anschließenden Messungen mit s-polarisierter Strahlung beibehalten, da diese generell eine höhere Reflektivität als p-polarisierte Strahlung hat. Für die Einkanalpektren mit s-Polarisation konnte die Scan-Anzahl auf 2000 halbiert werden. Eine Messung mit p-polarisierter Strahlung dauerte ca. 9 Minuten, eine mit s-polarisierter ca. 6 Minuten. Insgesamt brauchte das Programm für einen kompletten Zyklus ca. 4,5 Stunden.

Für die Auswertung mußte die Intensität der Banden in Abhängigkeit vom Einfallswinkel bestimmt werden. Darum wurden die Peakhöhen und nicht die integrierten Intensitäten verwendet, um eventuell überlappende spektrale Beiträge zu minimieren (siehe z. B. Gericke et al., 1997). Zuerst wurden sämtliche Spektren basislinienkorrigiert. Dies erfolgte mit der spektrometereigenen Software OPUS von Bruker (Karlsruhe). Es wurde die Gummibandmethode (Polylinie) mit mehreren, umliegenden Stützpunkten verwendet. Damit konnte bei den $\nu(\text{CH}_2)$ -Banden der Anstieg der Basislinie bei höheren Wellenzahlen korrigiert werden (die veränderte Basislinie ist durch die $\nu(\text{OH})$ -Bande des Wassers der Subphase bedingt). Dies gilt für Spektren mit p-Polarisation unterhalb des Brewsterwinkels und für alle Spektren mit s-Polarisation. Für Spektren mit p-Polarisation oberhalb des Brewsterwinkels fiel dagegen die Basislinie bei höheren Wellenzahlen ab und wurde dementsprechend korrigiert. Bei den $\nu(\text{CD}_2)$ -Banden wurde die Assoziationsbande des Wassers der Subphase durch die Korrektur eliminiert. Danach konnten die Intensitäten der Banden wieder mit der schon im vorigen Kapitel erwähnten Software bestimmt werden. Anschließend wurden diese Intensitäten nach Polarisation und zugehörigem Einfallswinkel gegeneinander aufgetragen. Nicht verwendet wurden dabei Intensitäten von Banden, die nicht korrekt ausgewertet werden konnten. Bei den CH_2 -Methylenstretschwingungen waren dies meist die Messungen bei p-Polarisation mit einem Einfallswinkel zwischen 52° und 58° und bei den CD_2 -Banden die entsprechenden Intensitäten zwischen 50° und 56° . Hier ist aufgrund der geringen Reflektivität ein sehr starkes Rauschen in den Spektren vorhanden. Außerdem wurden Banden mit zu geringer Intensität verworfen.

Anhand dieses Zusammenhangs konnten dann die Orientierungen der Moleküle bestimmt werden (siehe Kap. 2.2.3.1).

5.2.2.3 Zeitabhängige Messungen mit Peptiden/Proteinen

Reine Peptidmonoschichten wurden durch direkte Injektion der wäßrigen Peptidstammlösung unter die Wasseroberfläche erzeugt. Anschließend wurde kontinuierlich der Druckanstieg aufgezeichnet, während gleichzeitig IRRAS-Spektren akkumuliert wurden. Zum Studium von Lipid/Peptid-Wechselwirkungen wurden zuerst zwei Schläuche durch die Verbindungen zwischen Referenz- und Probenzrog hindurch im Probenzrog verlegt (siehe Abb. 5.2). Im vorderen Teil am Schlauchausgang befand sich nur reine Subphasenlösung, um ein vorzeitiges Hinausdiffundieren der Peptide zu verhindern. Dann wurde die Subphase eingefüllt, der Lipidfilm präpariert und zu dem gewünschten Oberflächendruck komprimiert (siehe Kap. 5.2.1). Vor der Injektion wurden vom reinen Lipidfilm IRRAS-Spektren für spätere Vergleiche aufgenommen. Anschließend erfolgte die Peptidinjektion, die ohne den Lipidfilm zu stören und ohne die Plexiglasverkleidung abnehmen zu müssen durchgeführt werden konnte. Nach der Injektion erfolgte eine kontinuierliche Spektrenaufnahme. Es wurden Spektren mit einer Auflösung von 8 cm^{-1} aufgenommen, und zwar mit s- als auch mit p-Polarisation. Die restlichen Parameter wurden ähnlich gewählt wie im vorigen Kapitel dargelegt. Je nach Verlauf des Experimentes wurden eventuell Orientierungsmessungen gemacht, oder der Lipid/Peptid-Film wurde weiter komprimiert oder expandiert.

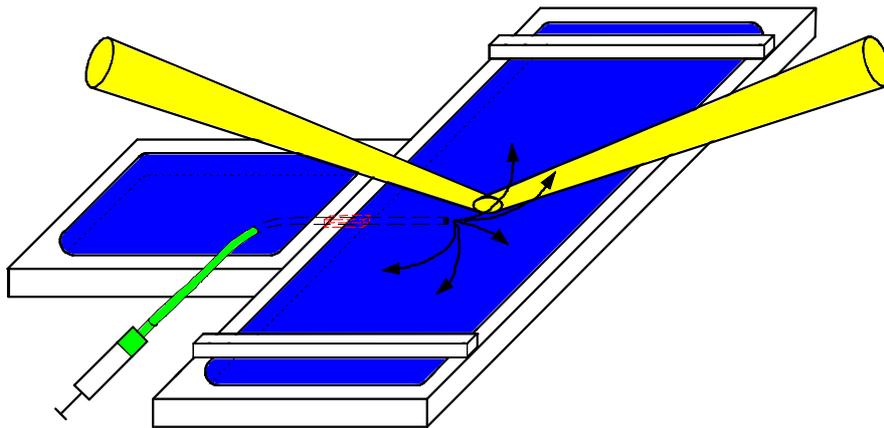


Abb. 5.2: Schema des IRRAS-Aufbaus für zeitabhängige Lipid/Peptid-Wechselwirkungsstudien.

Ein Problem, das bei allen in der Subphase gelösten Proteinen existiert, ist die Diffusion dieser Substanzen vom Probenzrog in den angeschlossenen Referenzzrog. Durch Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche im Referenzzrog werden im Referenzspektrum ebenfalls Absorptionsbanden erscheinen, die dazu führen, daß die Absorptionsbanden im IRRAS-Spektrum an Intensität verlieren oder sogar ihr Vorzeichen wechseln. Ein weiteres Problem tritt durch die Verwendung von D_2O als Subphase auf. Im Laufe eines Experiments kommt es zu einem H/D-Austausch zwischen der D_2O -Subphase und H_2O -haltigem Wasserdampf in der Atmosphäre. Wegen der freien Oberfläche kommt es vor allem im Referenzzrog zur Bildung von HOD. Die HOD-Scherschwingungsbande bei ca. 1460 cm^{-1} wird aufgrund der ungleichen Bildung von HOD in den beiden Trögen sehr groß und stört zunehmend die Basislinie. Außerdem kommt es bei länger dauernden Experimenten zu einem Flüssigkeitsverlust in der Subphase durch Verdampfung (im Referenzzrog mehr als im Probenzrog).

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurden die entsprechenden Experimente zeitlich auf ca. 5 bis 8 Stunden begrenzt.

5.2.3 Transmissions-FT-IR-Spektroskopie

Alle Lipidgemische wurden analog der unter Kap. 5.2.5 beschriebenen Methode hergestellt. Allerdings wurde eine Konzentration der Lipiddispersionen von 10 Gew.-% verwendet. Nach der Homogenisierung der Suspension wurde sie in eine Küvette mit CaF₂-Fenstern und einer Schichtdicke von 56 µm gefüllt. Die Messung der Temperaturabhängigkeit erfolgte zwischen 10 und 50 °C in Schritten zu 2 °C. Bei jeder neuen Temperatur wurde eine Äquilibrationszeit von 8 Minuten eingehalten. Die Messungen wurden mit dem FT-IR-Spektrometer Vector 22 mit DTGS-Detektor durchgeführt, wobei je 32 Scans mit einer Auflösung von 2 cm⁻¹ aufgenommen. Als Apodisierungsfunktion wurde die Blackman-Harris 3-Term-Funktion mit einem Zerofill-Faktor von 2 verwendet. Die Spektren wurden noch auf ein Hintergrundspektrum S_0 referenziert ($-\log(S/S_0)$), welches bei der gleichen Temperatur mittels eines Probenwechslers aufgenommen wurde. Dies diente zur Minderung der Wasserdampfbanden im resultierenden Spektrum.

Vor der Auswertung wurden von den Lipidspektren die bei der entsprechenden Temperatur gemessenen Spektren von reinem Wasser subtrahiert. Anschließend wurde wieder mit der schon in Kap. 5.2.2 erwähnten Software die Lage des Absorptionsmaximums der $\bar{\nu}_s(\text{CH}_2)$ - bzw. $\bar{\nu}_s(\text{CD}_2)$ -Bande ermittelt und gegen die Temperatur aufgetragen. Aus den Wendepunkten dieser $\bar{\nu}_s/T$ -Diagramme wurden die entsprechenden Umwandlungstemperaturen T_m bestimmt.

IR-Mikroskopie:

Die flüssigkristalline Verbindung 8CB wurde in Transmission mit dem IR-Mikroskop untersucht, da hier neben den IR-Messungen zusätzlich noch die visuelle Betrachtung des Probenbereichs und der entsprechenden Phasenumwandlungen möglich waren. Für die visuelle Verfolgung im sichtbaren Wellenlängenbereich wurden gekreuzte Polarisatoren benutzt, in Analogie zu einem konventionellen Polarisationsmikroskop.

8CB wurde zwischen zwei NaCl-Fenster ohne einen Spacer gepreßt und mittels der externen Temperierung der elektrisch heizbaren Küvette zuerst in den isotropen Phasenzustand gebracht. Danach wurde die Probe sukzessiv abgekühlt und bei den gewünschten Temperaturen die entsprechenden IR-Spektren aufgenommen. Pro Messung wurden 64 Interferogramme addiert, mit einer Blackman-Harris 3-Term-Funktion apodisiert und die Anzahl der Datenpunkte anschließend vor der Fourier-Transformation durch das Anhängen von Nullen verdoppelt. Die Geräteauflösung betrug dabei 2 cm⁻¹. Anschließend wurde wieder auf ein entsprechendes Hintergrundspektrum (nur die Küvettenfenster) referenziert, das in einer anderen Meßreihe ebenfalls temperaturabhängig aufgenommen wurde. Die Auswertung erfolgte analog zur konventionellen Transmissions-FT-IR-Spektroskopie.

5.2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Als Mikroskop wurde ein Auflichtmikroskop vom Typ AxioTech Vario der Firma Carl Zeiss Jena verwendet. Zur Anregung der Fluoreszenz diente eine 50 W Quecksilberhochdrucklampe mit den geeigneten Filtern. Der Film wurde mittels einer Restlichtkamera beobachtet (SIT camera C2400-08, Hamamatsu, Japan). Die Empfindlichkeit der Kamera erlaubte eine Farbstoffkonzentration von weniger als 1 Molekül pro 200 nm² (z.B. NBD in einer Phospholipidmatrix: 0.5 mol%). Die aufgenommenen Bilder wurden direkt in einen Computer über einen digitalen Bildprozessor (Argus 20, Hamamatsu, Japan) übernommen, ohne daß eine analoge Speicherung zwischen Kamera und Computer notwendig war. Die digitale Auflösung der Bilder war besser als drei Pixel pro Mikrometer;

die optische war etwas unterhalb von einem Mikrometer. Der ausgeleuchtete Spot auf der Wasseroberfläche hatte einen Durchmesser von ca. 6 bis 7 mm.

Der Filmwaagetrog hatte eine Breite von 120 mm, der Abstand zwischen den aufeinander zufahrenden Barrieren konnte zwischen 195 mm und 28 mm variiert werden. Es wurde ein symmetrischer Barrierenaufbau benutzt, um eine erhöhte Filmstabilität auch während der Kompression zu erhalten. Der Trog wurde durch eine Reihe von Peltierelementen temperiert und die Temperaturstabilität war besser als 0,2 °C. Die Filmwaage war auf einem x-y-Tisch (Maerzhaeuser, Deutschland) montiert. Dadurch konnten einzelne Gebiete des Filmes aufgesucht werden und damit ein Ausbleichen des Farbstoffs verhindert werden. Außerdem konnte so kleineren noch vorhandenen Filmdriften entgegengesteuert werden. Der gesamte Aufbau war zusätzlich durch eine aktive Schwingungsisolierung vom Gebäude entkoppelt (Sandercock, Schweiz).

Als fluoreszenzmarkiertes Lipid diente 1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] dodecanoyl]-*sn*-glycero-3-phosphocholin (kurz: NBD-PC, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Der Anteil des Fluoreszenzlabels an der gesamten eingesetzten Lipidstoffmenge betrug 0,5 %.

Die Präparation der Lipidfilme erfolgte analog zu Kap. 5.2.1.

5.2.5 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Vor der Suspendierung lagen alle Lipide entweder als Feststoff oder als Film vor. Die Filme wurden für Lipidgemische hergestellt indem entsprechende Volumina der jeweiligen Stammlösungen zusammenpipettiert und das Lösungsmittel (Chloroform und Methanol) durch anschließendes Abblasen unter einem Stickstoffstrom entfernt wurde. Anschließend wurden die Proben über Nacht in einem Vakuumtrockenschrank bei 40 °C vollständig getrocknet.

Vor Beginn der Messung wurden die Lipidproben mit 0,8 bis 1 ml Reinstwasser versetzt (0,75 mM Lipidprobe), 5 Minuten ca. 10 °C oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur inkubiert und ca. 1 Minute mechanisch geschüttelt. Diese Prozedur wurde noch mindestens zweimal wiederholt bis zur vollständigen Homogenisierung der Probe. Teilweise mußten die Proben noch im Ultraschallbad behandelt werden, um die komplette Dispergierung zu erreichen. Danach wurden die Lipidprobe und die entsprechende Referenzlösung noch ca. 5 Minuten unter leichtem Vakuum entgast.

Die Untersuchung der Probe im DSC-Gerät erfolgte mit einer Heizrate von 60 °C/h. Für jede Probe wurden drei Aufheiz- und die entsprechenden Abkühlkurven aufgenommen.

Für die Auswertung wurden das entsprechende DSC-Modul des Programms ORIGIN herangezogen. Dabei wurden die zweite bzw. dritte Aufheizkurve verwendet. Nach Abzug der Basislinie wurde die Kurve durch Eingabe der Konzentration der Lösung normiert. Die Umwandlungstemperaturen wurden durch Extremwertsuche ermittelt und entsprachen den Maxima der C_p/T -Kurven. Die molare Enthalpie ΔH entsprach der Fläche unter dem Umwandlungspeak.

6 Literatur

- Adamson, A. W. 1990. *Physical Chemistry of Surfaces*. 5. Ausgabe. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Ahlers, M., W. Müller, A. Reichert, H. Ringsdorf und J. Venzmer. 1990. Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten - Wege zur Simulation von Biomembranprozessen. *Angew. Chem.* 102:1310-1327.
- Averyanov, E. M., V. A. Shuikov, V. F. Shabanov und P. V. Adomenas. 1982. *Kristallografija*. 27:333.
- Baker, E. N., B. F. Anderson, H. M. Baker, R. T. A. MacGillivray, S. A. Moore, N. A. Peterson, S. C. Shewry und J. W. Tweedie. 2001. Three-dimensional structure of lactoferrin. Implications for function, including comparisons with transferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:1-14.
- Baldyga, D. D. und R. A. Dluhy. 1998. On the use of deuterated phospholipids for infrared spectroscopic studies of monomolecular films: a thermodynamic analysis of single and binary component phospholipid monolayers. *Chem. Phys. Lipids*. 96:81-97.
- Bardon, S., R. Ober, M. P. Valignat, F. Vandenbrouck, A.M. Cazabat und J. Daillant. 1999. Organization of cyanobiphenyl liquid crystal molecules in prewetting films spreading on silicon wafers. *Phys. Rev. E*. 59:6808-6818.
- Baveye, S., E. Elass, J. Mazurier, G. Spik und D. Legrand. 1999. Lactoferrin: A Multifunctional Glycoprotein Involved in the Modulation of the Inflammatory Process. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37:281-286.
- Bechinger, B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1462:157-183.
- Beitinger, H., F. Schifferer, M. Sugita, S. Araki, M. Satake, D. Möbius und H. Rahmann. 1989. Comparative Monolayer Investigations of Surface Properties of Negatively Charged Glycosphingolipids from Vertebrates (Gangliosides) and Invertebrates (SGL-II, Lipid IV). *J. Biochem.* 105:664-669.
- Bertie, J. E., M. K. Ahmed und H. H. Eysel. 1989. Infrared Intensities of Liquids. 5. Optical and Dielectric Constants, Integrated Intensities, and Dipole Moment Derivatives of H₂O and D₂O at 22°C. *J. Phys. Chem.* 93:2210-2218.
- Bibo, A. M., C. M. Knobler und I. R. Peterson. 1991. A monolayer phase miscibility comparison of long-chain fatty acids and their ethyl esters. *J. Phys. Chem.* 95:5591-5599.
- Biensan, C., B. Desbat und J. M. Turllet. 1996. Molecular orientation of a cyanobiphenyl liquid crystal in freely suspended films and at the air-water interface. *Thin Solid Films*. 284-285:293-296.
- Binder, H., H. Schmiedel, G. Lantzsch, C. Cramer und G. Klose. 1996. Molecular ordering in microconfined liquid crystals: An infrared linear dichroism study. *Liq. Cryst.* 21:415-426.
- Binder, H. und H. Schmiedel. 1999. Infrared dichroism investigations on the acyl chain ordering in lamellar structures: I. Order parameter formalism and its application to polycrystalline stearic acid. *Vibr. Spectrosc.* 21:51-73.

- Binder, H. und B. Kohlstrunk. 1999. Infrared dichroism investigations on the acyl chain ordering in lamellar structures: II. The effect of diene groups in membranes of dioctadecadienoylphosphatidylcholine. *Vibr. Spectrosc.* 21:75-95.
- Binder, H. 1999. Infrared dichroism investigations on the acyl chain ordering in lamellar structures: III. Characterization of the chain tilt and biaxiality in the solid phases of dipalmitoylphosphatidylcholine as a function of temperature and hydration using molecular order parameters. *Vibr. Spectrosc.* 21:151-163.
- Blaudez, D., T. Buffeteau, B. Desbat, M. Orrit und J. M. Turllet. 1992. Characterization of Langmuir-Blodgett monolayers using polarization modulated FTIR spectroscopy. *Thin Solid Films.* 210-211:648-651.
- Blaudez, D., T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet und J. M. Turllet. 1993. Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. *Appl. Spectrosc.* 47:869-874.
- Blaudez, D., J.-M. Turllet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau und B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 92:525-530.
- Blume, A. 1979. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 557:32-44.
- Blume, A., W. Hübner und G. Messner. 1988. Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phospholipids. Hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry.* 27:8239-8249.
- Blume, A. 1991. Biological calorimetry: membranes. *Thermochim. Acta.* 193:299-347.
- Blume, A. 1996. Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies. *Curr. Op. Colloid Interface Sci.* 1:64-77.
- Blume, A. und P. Garidel. 1999. Lipid Model Membranes and Biomembranes. In *The Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. From Macromolecules to Man.* Vol. 4. Kemp, R.B., Hrsg. Elsevier, Amsterdam. S. 109-173.
- Born, M. 1981. *Optik: Ein Lehrbuch der elektromagnetischen Lichttheorie.* 3. Ausgabe. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Brandenburg, K. und U. Seydel. 1996. Fourier transform infrared spectroscopy of cell surface polysaccharides. In *Infrared Spectroscopy of Biomolecules.* Mantsch, H.H. und D. Chapman, Hrsg. Wiley-Liss, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. S. 203-237.
- Brandenburg, K., S. Kusumoto und U. Seydel. 1997. Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1329:183-201.
- Brandenburg, K., B. Lindner, A. Schromm, M. H. J. Koch, J. Bauer, A. Merkli, C. Zbaeren, J. G. Davies und U. Seydel. 2000. Physicochemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM-174 in relation to biological activity. *Eur. J. Biochem.* 267:3370-3377.
- Brandenburg, K., G. Jürgens, M. Müller, S. Fukuoka und M. H. J. Koch. 2001. Biophysical Characterization of Lipopolysaccharide and Lipid A Inactivation by Lactoferrin. *Biol. Chem.* 382:1215-1225.
- Brezesinski, G., A. Dietrich, B. Struth, C. Böhm, W. G. Bouwman, K. Kjaer und H. Möhwald. 1995. Influence of ether linkages on the structure of double-chain phospholipid monolayers. *Chem. Phys. Lipids.* 76:145-157.

- Brezesinski, G. 2002. Persönliche Mitteilung: langjähriger Mittelwert aus GIXD-Messungen und Brezesinski et al., 1995.
- Brockman, H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Op. Struct. Biol.* 9:438-443.
- Brown, D. A. und E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
- Buffeteau, T., D. Blaudez, E. Pere und B. Desbat. 1999. Optical Constant Determination in the Infrared of Uniaxially Oriented Monolayers from Transmittance and Reflectance Measurements. *J. Phys. Chem. B.* 103:5020-5027.
- Buffeteau, T., E. Le Clavez, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez und J. Dufourcq. 2000. Anisotropic Optical Constants of α -Helix and β -Sheet Secondary Structure in the Infrared. *J. Phys. Chem. B.* 104:4537-4544.
- Buontempo, J. T. und S. A. Rice. 1993. Infrared external reflection spectroscopy of adsorbates on dielectric substrates: determining adsorbate orientation in langmuir monolayers. *J. Chem. Phys.* 98:5825-5834.
- Cameron, D. G., J. K. Kauppinen, D. J. Moffatt und H. H. Mantsch. 1982. Precision in Condensed Phase Vibrational Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 36:245-250.
- Cantu, L., M. Corti, E. Del Favero, M. Dubois und T. N. Zemb. 1998. Combined Small-Angle X-ray and Neutron Scattering Experiments for Thickness Characterization of Ganglioside Bilayers. *J. Phys. Chem.* 102:5737-5743.
- Casal, H. L., H. H. Mantsch, D. G. Cameron und B. P. Gaber. 1983. On the Subtransitions of Deuterated Derivatives of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Chem. Phys. Lipids.* 33:109-112.
- Casal, H. L. und H. H. Mantsch. 1984. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 779:381-401.
- Cevc, G. und D. Marsh. 1987. Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models. Wiley, New York.
- Chen, H.-C., R. Mendelsohn, M. E. Rerek und D. J. Moore. 2001. Effect of cholesterol on miscibility and phase behaviour in binary mixtures with synthetic ceramide 2 and octadecanoic acid. Infrared studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:345-356.
- Cheng, Q. und R. C. Stevens. 1997. Monolayer properties of monosialoganglioside in the mixed diacetylene lipid films on the air/water interface. *Chem. Phys. Lipids.* 87:41-53.
- Cumar, F. A., B. Maggio und R. Caputto. 1980. Neurotransmitter movement in nerve endings. *Biochim. Biophys. Acta.* 597:174-182.
- Dang, Q. Q., P. Rogalle, R. Salvayre und B. Douste. 1982. Synthesis and identification of bis(diacylglycero)phosphoric acid and bis(monoacylglycero)phosphoric acid. *Lipids.* 17:798-802.
- Dathe, M., M. Schürmann, T. Wieprecht, A. Winkler, M. Beyermann, E. Krause, K. Matsuzaki, O. Murase und M. Bienert. 1996. Peptide Helicity and Membrane Surface Charge Modulate the Balance of Electrostatic and Hydrophobic Interactions with Lipid Bilayers and Biological Membranes. *Biochemistry.* 35:12612-12622.
- Dathe, M. und T. Wieprecht. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:71-87.

- de Mul, M. N. G. und J. A. Mann. 1994. Multilayer formation in thin films of thermotropic liquid crystals at the air-water interface. *Langmuir*. 10:2311-2316.
- Dluhy, R. A. und D. G. Cornell. 1985. In Situ Measurements of the Infrared Spectra of Insoluble Monolayers at the Air-Water Interface. *J. Phys. Chem.* 89:3195-3197.
- Dobner, B. 2000. Unveröffentlichte Ergebnisse.
- Dunmur, D. A. und K. Toriyama. 1998. Physical Properties. In Handbook of Liquid Crystals. Vol. 1: Fundamentals. Demus, D., J.W. Goodby, G.W. Gray, H.-W. Spiess und V. Vill, Hrsg. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto. S. 189-252.
- Elmore, D. L., S. Shanmukh und R. A. Dluhy. 2002. A Study of Binary Phospholipid Mixtures at the Air-Water Interface Using Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy and 2D IR $\beta\nu$ Correlation Analysis. *J. Phys. Chem. A*. 106:3420-3428.
- Enderle, T., A. J. Meixner und I. Zschokke-Gränacher. 1994. Phase transitions in mixed Langmuir films of 8CB and stearic acid. *J. Chem. Phys.* 101:4365-4372.
- Erbe, A. 2001. Sekundärstruktur eines Modellpeptids an Grenzflächen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale.
- Fidelio, G. D., B. Maggio und F. A. Cumar. 1986. Molecular parameters and physical state of neutral glycosphingolipids and gangliosides in monolayers at different temperatures. *Biochim. Biophys. Acta*. 854:231-239.
- Flach, C. R., J. W. Brauner, J. W. Taylor, R. C. Baldwin und R. Mendelsohn. 1994. External Reflection FTIR of Peptide Monolayer Films at the Air/Water Interface: Experimental Design, Spectra-Structure Correlations, and Effects of Hydrogen-Deuterium Exchange. *Biophys. J.* 67:402-410.
- Flach, C. R., A. Gericke und R. Mendelsohn. 1997. Quantitative Determination of Molecular Chain Tilt Angles in Monolayer Films at the Air/Water Interface: Infrared Reflection/Absorption Spectroscopy of Behenic Acid Methyl Ester. *J. Phys. Chem. B*. 101:58-65.
- Flach, C. R., A. Gericke, K. M. W. Keough und R. Mendelsohn. 1999. Palmitoylation of lung surfactant protein SP-C alters surface thermodynamics, but not protein secondary structure or orientation in 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine langmuir films. *Biochim. Biophys. Acta*. 1416:11-20.
- Flach, C. R., Z. Xu, X. Bi, J. W. Brauner und R. Mendelsohn. 2001. Improved IRRAS Apparatus for Studies of Aqueous Monolayer Films: Determination of the Orientation of Each Chain in a Fatty-Acid Homogeneous Ceramide 2. *Appl. Spectrosc.* 55:1060-1066.
- Förster, G., A. Kerth und A. Blume. 2002. Zu veröffentlichende Ergebnisse.
- Fraser, R. D. B. und T. P. MacRae. 1973. Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides. Academic Press, New York.
- Friedenberg, M. C., G. G. Fuller, C. W. Frank und C. R. Robertson. 1994. Formation of Bilayer Disks and Two-Dimensional Foams on a Collapsing/Expanding Liquid-Crystal Monolayer. *Langmuir*. 10:1251-1256.
- Fukuoka, S., K. Brandenburg, M. Müller, B. Lindner, M. H. J. Koch und U. Seydel. 2001. Physico-chemical analysis of lipid A fractions of lipopolysaccharide from *Erwinia carotovora* in relation to bioactivity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1510:185-197.

- Fürst, W. und K. Sandhoff. 1992. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1126:1-16.
- Gaber, B. P., P. Yager und W. L. Peticolas. 1978. Conformational nonequivalence of chains 1 and 2 of Dipalmitoylphosphatidylcholine as observed by Raman Spectroscopy. *Biophys. J.* 24:677-688.
- Gaines, G.L. 1966. Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.
- Gallant, J., B. Desbat, D. Vaknin und C. Salesse. 1998. Polarization-Modulated Infrared Spectroscopy and X-Ray Reflectivity of Photosystem II Core Complex at the Gas-Water Interface. *Biophys. J.* 75:2888-2899.
- Gericke, A., A. V. Michailov und H. Hühnerfuss. 1993. Polarized external infrared reflection-absorption spectrometry at the air/water interface: comparison of experimental and theoretical results for different angles of incidence. *Vibr. Spectrosc.* 4:335-348.
- Gericke, A., D. J. Moore, R. K. Erukulla, R. Bittman und R. Mendelsohn. 1996. Partially deuterated phospholipids as IR structure probes of conformational order in bulk and monolayer phases. *J. Mol. Struct.* 379:227-239.
- Gericke, A., C. R. Flach und R. Mendelsohn. 1997. Structure and Orientation of Lung Surfactant SP-C and L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholine in Aqueous Monolayers. *Biophys. J.* 73:492-499.
- Giehl, A. 1997. FT-IR-Spektroskopie, Differential Scanning Calorimetry und Filmwaagemessungen zur Untersuchung von Gangliosid/Phospholipid-Modellmembranen und deren Wechselwirkung mit dem GM2-Aktivatorprotein. Dissertation. Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Giehl, A., T. Lemm, O. Bartelsen, K. Sandhoff und A. Blume. 1999. Interaction of the GM2-activator protein with phospholipid-ganglioside bilayer membranes and with monolayers at the air-water interface. *Eur. J. Biochem.* 261:650-658.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux und J.-M. Ruyschaert. 1994. Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. III. Secondary Structures. In *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes*. Hilderson, H.J. und G.B. Ralston, Hrsg. In *Sucellular Biochemistry*. Vol. 23. Plenum Press, New York. S. 405-450.
- Gravel, R. A., J. T. R. Clarke, M. M. Kaback, D. Mahuran, K. Sandhoff und K. Suzuki. 2001. The GM2-gangliosidosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver, C., A. Beaudet, L. Sly, S. William und D. Valle, Hrsg. Vol. 8. David Mc Graw Hill, New York. S. 3827-3877.
- Günzler, H. und H. M. Heise. 1996. IR-Spektroskopie, Eine Einführung. 3. Ausgabe. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- Hara-Yokoyama, M., Y. Hirabayashi, F. Irie, B. Syuto, K. Moriishi, H. Sugoya und S. Furuyama. 1995. Identification of Gangliosides as Inhibitors of ADP-ribosyltransferases of Pertussis Toxin and Exoenzyme C3 from *Clostridium botulinum*. *J. Biol. Chem.* 270:8115-8121.
- Harder, T. und K. Simons. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Op. Cell Biol.* 9:534-542.
- Henon, S. und J. Meunier. 1991. Microscope at the Brewster angle: direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* 62:936-939.

- Heravi, J. und M. Waite. 1999. Transacylase formation of bis(monoacylglycerol)phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1437:277-286.
- Hifeda, Y. F. und G. W. Rayfield. 1992. Evidence for First-Order Phase Transitions in Lipid and Fatty Acid Monolayers. *Langmuir.* 8:197-200.
- Hirai, M. und T. Takizawa. 1998. Intensive Extrusion and Occlusion of Water in Ganglioside Micelles with Thermal Reversibility. *Biophys. J.* 74:3010-3014.
- Holopainen, J. M., H. L. Brockman, R. E. Brown und P. K. J. Kinnunen. 2001. Interfacial Interactions of Ceramide with Dimyristoylphosphatidylcholine: Impact of the N-Acyl Chain. *Biophys. J.* 80:765-775.
- Hönig, D. und D. Möbius. 1991. Direct Visualization of Monolayers at the Air-Water Interface by Brewster Angle Microscopy. *J. Phys. Chem.* 95:4590-4592.
- Horn, A. 1998. Infrared Spectroscopic Techniques for the Study of Thin Interfacial Films. In Spectroscopy for Surface Science. Clark, R. J. H. und R. E. Hester, Hrsg. In Advances in Spectroscopy. Vol. 26. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore. S. 273-339.
- Hübner, W. und A. Blume. 1998. Interactions at the lipid-water interface. *Chem. Phys. Lipids.* 96:99-123.
- Hunt, R., M. L. Mitchell und R. A. Dluhy. 1989. The interfacial structure of phospholipid monolayer films: An infrared reflectance study. *J. Molec. Struct.* 214:93-109.
- Ibn-Elhaj, M., H. Riegler, H. Möhwald, M. Schwendler und C. A. Helm. 1997. X-ray reflectivity study of layering transitions and the internal multilayer structure of films of three-block organosiloxane amphiphilic smectic liquid crystals at the air-water interface. *Phys. Rev. E.* 56:1844-1852.
- Israelachvili, J. N. 1991. Intermolecular and Surface Forces. 2. Ausgabe. Academic Press, London.
- Jackson, M., P. I. Haris und D. Chapman. 1989. Conformational transitions in poly(L-lysine): studies using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 998:75-79.
- Kaganer, V. M., H. Möhwald und P. Dutta. 1999. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Rev. Mod. Phys.* 71:779-819.
- Kakio, A., S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutsumi und K. Matsuzaki. 2002. Interactions of Amyloid β -Protein with Various Gangliosides in Raft-Like Membranes: Importance of GM1 Ganglioside-Bound Form as an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid. *Biochemistry.* 41:7385-7390.
- Karat, P. P. und N. V. Madhusudana. 1976. Elastic and Optical Properties of Some 4'-n-Alkyl-4-Cyanobiphenyls. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 36:51-64.
- Karlsson, K.A. 1989. Animal Glycosphingolipids as Membrane Attachment Sites for Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 58:309-350.
- Khalil, M. B., M. Kates und D. Carrier. 2000. FTIR Study of the Monosialoganglioside GM1 in Perdeuterated Dimyristoylglycerophosphocholine (DMPC-d₅₄) Multilamellar Bilayers: Spectroscopic Evidence of a Significant Interaction between Ca²⁺ Ions and the Sialic Acid Moity of GM1. *Biochemistry.* 39:2980-2988.
- Kiefer, R. und G. Baur. 1989. Molecular Biaxiality in Nematic Liquid Crystals as Studied by Infrared Dichroism. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 174:101-126.

- Klump, H. H., B. P. Gaber, W. L. Peticolas und P. Yager. 1981. Thermodynamic Properties of Mixtures of deuterated and undeuterated Dipalmitoyl Phosphatidylcholines. *Thermochim. Acta.* 48:361-366.
- Knobler, C. M. 1990. Seeing Phenomena in Flatland: Studies of Monolayers by Fluorescence Microscopy. *Science.* 249:870-874.
- Kobayashi, T., E. Stang, K. S. Fang, P. de Moerloose, R. G. Parton und J. Gruenberg. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature.* 392:193-197.
- Kolter, T. und K. Sandhoff. 1999. Sphingolipide - ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen. *Angew. Chem.* 111:1632-1670.
- Korte, E. H. 1983. Influence of the Order Parameter D on the Linear Dichroism of Nematic Liquid Crystals. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 100:127-135.
- Koynova, R. und M. Caffrey. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376:91-145.
- Krimm, S. und J. Bandekar. 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38:181-363.
- Krüger, P. und M. Lösche. 2000. Molecular chirality and domain shapes in lipid monolayers on aqueous surfaces. *Phys. Rev. E.* 62:7031-7043.
- Kuzmin, V. L. und A. V. Mikhailov. 1981. Molecular theory of light reflection and applicability limits of the macroscopic approach. *Opt. Spectrosc. (USSR).* 51:383-385.
- Kuzmin, V. L., V. P. Romanov und A. V. Michailov. 1992. Reflection of light at the boundary of liquid systems and structure of the surface layer: A review. *Opt. Spectrosc.* 73:1-26.
- Laibinis, P. E., C. D. Bain, R. G. Nuzzo und G. M. Whitesides. 1995. Structure and Wetting Properties of ω -Alkoxy- n -alkanethiolate Monolayers on Gold and Silver. *J. Phys. Chem.* 99:7663-7676.
- Lakowicz, J. R. 1983. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenumverlag, New York.
- Le Bihan, T. und M. Pezolet. 1998. Study of the structure and phase behaviour of dipalmitoylphosphatidylcholine by infrared spectroscopy: characterization of the pretransition and subtransition. *Chem. Phys. Lipids.* 94:13-33.
- Lewis, R. N. A. H. und R. N. McElhaney. 1990. Subgel Phases of n -Saturated Diacylphosphatidylcholines: A Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Study. *Biochemistry.* 29:7946-7953.
- Lewis, R. N. A. H. und R. N. McElhaney. 1996. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes. *In Infrared Spectroscopy of Biomolecules.* Mantsch, H. H. und D. Chapman, Hrsg. Wiley-Liss, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. S. 159-202.
- Lewis, R. N. A. H. und R. N. McElhaney. 1998. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids.* 96:9-21.
- Linke, T., G. Wilkening, S. Lansmann, H. Moczall, O. Bartelsen, J. Weisgerber und K. Sandhoff. 2001. Stimulation of Acid Sphingomyelinase Activity by Lysosomal Lipids and Sphingolipid Activator Proteins. *Biol. Chem.* 382:283-290.

- Lösche, M., E. Sackmann und H. Möhwald. 1983. A Fluorescence Microscopic Study Concerning the Phase Diagram of Phospholipids. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 87:848-852.
- Luckham, P., J. Wood, S. Froggatt und R. Swart. 1993a. The Surface Properties of Gangliosides: I. Monolayer Properties. *J. Colloid Interface Sci.* 156:164-172.
- Luckham, P., J. Wood und R. Swart. 1993b. The Surface Properties of Gangliosides: II. Direct Measurement of the Interaction between Bilayers deposited on Mica Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 156:173-183.
- MacPhail, R. A., H. L. Strauss, R. G. Snyder und C. A. Elliger. 1984. C-H Stretching Modes and the Structure of *n*-Alkyl Chains. 2. Long, All-Trans Chains. *J. Phys. Chem.* 88:334-341.
- Maget-Dana, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:109-140.
- Maggio, B., F. A. Cumar und R. Caputto. 1978a. Surface behaviour of gangliosides and related glycosphingolipids. *Biochem. J.* 171:559-565.
- Maggio, B., F. A. Cumar und R. Caputto. 1978b. Interactions of gangliosides with phospholipids and glycosphingolipids in mixed monolayers. *Biochem. J.* 175:1113-1118.
- Maggio, B., F. A. Cumar und R. Caputto. 1980. Configuration and interactions of the polar head group in gangliosides. *Biochem. J.* 189:435-440.
- Maggio, B., F. A. Cumar und R. Caputto. 1981. Molecular behaviour of glycosphingolipids in interfaces. Possible participation in some properties of nerve membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 650:69-87.
- Maier, W. und G. Englert. 1960. Ordnungsgradbestimmungen an kristallinflüssigen Schichten durch Messungen des Infrarotdichroismus. *Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. physik. Chem.* 64:689-694.
- Majewski, J., T. L. Kuhl, K. Kjaer und G. S. Smith. 2001. Packing of ganglioside-phospholipid monolayers: An X-ray diffraction and reflectivity study. *Biophys. J.* 81:2707-2715.
- Mantsch, H. H. und D. Chapman. 1996. Infrared Spectroscopy of Biomolecules. Wiley-Liss, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Marsh, D. 1996. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1286:183-223.
- Marsh, D. 1998. Nonaxiality in Infrared Dichroic Ratios of Polytopic Transmembrane Proteins. *Biophys. J.* 75:354-358.
- Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:1-10.
- McConnell, H. 1991. Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 42:171-195.
- McElhaney, R. N. 1986. Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 864:361-421.
- McIntosh, T. J. 1980. Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model. *Biophys. J.* 29:237-246.

- McIntosh, T. J., A. D. Magid und S. A. Simon. 1989. Cholesterol Modifies the Short-Range Repulsive Interactions between Phosphatidylcholine Membranes. *Biochemistry*. 28:17-25.
- Meier, E. M., G. Schwarzmann, W. Fürst und K. Sandhoff. 1991. The Human GM2 Activator Protein. *J. Biol. Chem.* 266:1879-1887.
- Meinders, M. B. J., G. G. M. van den Bosch und H. H. J. de Jongh. 2001. Adsorption properties of proteins at and near the air/water interface from IRRAS spectra of protein solutions. *Eur. Biophys. J.* 30:256-267.
- Mendelsohn, R., S. Sunder und H. J. Bernstein. 1976. Deuterated fatty acids as raman spectroscopic probes of membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 443:613-617.
- Mendelsohn, R. und C. Koch. 1980. Deuterated phospholipids as raman spectroscopic probes of membrane structure. Phase diagrams for the dipalmitoyl phosphatidylcholine (and its d_{62} derivative)-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine system. *Biochim. Biophys. Acta.* 598:260-271.
- Mendelsohn, R. und H. H. Mantsch. 1986. Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction. *In Progress in Protein-Lipid Interactions*. Vol. 2. Watts, A. und J. J. H. H. M. de Pont, Hrsg. Elsevier Science, Amsterdam, New York, Oxford. S. 103-146.
- Mendelsohn, R. und L. Senak. 1993. Quantitative determination of conformational disorder in biological membranes by FTIR spectroscopy. *In Biomolecular Spectroscopy, Part A*. Clark, R. J. H. und R. E. Hester, Hrsg. *In Advances in Spectroscopy*. Vol. 20. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. S. 339-380.
- Mendelsohn, R., J. W. Brauner und A. Gericke. 1995. External Infrared Reflection Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air-Water Interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 46:305-334.
- Mendelsohn, R. und D. J. Moore. 1998. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids.* 96:141-157.
- Mendelsohn, R. und C. R. Flach. 2002. Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy of Lipids, Peptides, and Proteins in Aqueous Monolayers. *In Peptide-Lipid Interactions*. Vol. 52. Simon, S.A. und T.J. McIntosh, Hrsg. *In Current Topics in Membranes*. Fambrough, D.M. und D.J. Benos, Hrsg. Elsevier Science, San Diego. S. 57-88.
- Meyer zu Heringsdorf, D., C. J. van Koppen und K. H. Jakobs. 1997. Molecular diversity of sphingolipid signalling. *FEBS Lett.* 410:34-38.
- Mitchell, M. L. und R. A. Dluhy. 1988. In Situ FT-IR Investigation of Phospholipid Monolayer Phase Transitions at the Air-Water Interface. *J. Am. Chem. Soc.* 110:712-718.
- Möhwald, H. 1990. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41:441-476.
- Möhwald, H. 1995. Phospholipid Monolayers. *In Structure and Dynamics of Membranes. From Cells to Vesicles*. Vol. 1A. Lipowsky, R. und E. Sackmann, Hrsg. North Holland, Amsterdam. S. 161-211.
- Müller, E. und A. Blume. 1993. FTIR spectroscopic analysis of the amide and acid bands of ganglioside GM1, in pure form and in mixtures with DMPC. *Biochim. Biophys. Acta.* 1146:45-51.
- Müller, E. 1995. FT IR-spektroskopische und kalorimetrische Untersuchungen von DMPC/GM1 Membranen. Dissertation. Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.

- Müller, E., A. Giehl, G. Schwarzmann, K. Sandhoff und A. Blume. 1996. Oriented 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine/Ganglioside Membranes: A Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopic Study. Band assignments; Orientational, Hydrational, and Phase Behaviour; and Effects of Ca²⁺ Binding. *Biophys. J.* 71:1400-1421.
- Pallas, N. R. und B. A. Pethica. 1985. Liquid-Expanded to Liquid-Condensed Transitions in Lipid Monolayers at the Air/Water Interface. *Langmuir.* 1:509-513.
- Parikh, A. N. und D. L. Allara. 1992. Quantitative determination of molecular structure in multilayered thin films of biaxial and lower symmetry from photon spectroscopies. I. Reflection infrared vibrational spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 96:927-945.
- Pearson, R. H. und I. Pascher. 1979. The molecular structure of lecithin dihydrate. *Nature.* 281:499-501.
- Pelletier, I., H. Bourque, T. Buffeteau, D. Blaudez, B. Desbat und M. Pezolet. 2002. Study by Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films of Behenic Acid Methyl Ester on Solid Substrates and at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem. B.* 106:1968-1976.
- Petersen, N. O., P. A. Kroon, M. Kainosho und S. I. Chan. 1975. Thermal Phase Transitions in Deuterated Lecithin Bilayers. *Chem. Phys. Lipids.* 14:343-349.
- Probst, W., D. Möbius und H. Rahmann. 1984. Modulatory effects of different temperatures and Ca²⁺ concentrations on gangliosides and phospholipids in monolayers at air/water interfaces and their possible functional role. *Cell. Molec. Neurobiol.* 4:157-176.
- Rabolt, J. F., F. C. Burns, N. E. Schlotter und J. D. J. Swalen. 1983. Anisotropic orientation in molecular monolayers by infrared spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 78:946-952.
- Ringsdorf, H., B. Schlarb und J. Venzmer. 1988. Molekulare Architektur und Funktion von polymeren orientierten Systemen - Modelle für das Studium von Organisation, Oberflächenerkennung und Dynamik bei Biomembranen. *Angew. Chem.* 100:117-162.
- Röseler, A. 1990. Infrared Spectroscopic Ellipsometry. Akademie-Verlag, Berlin. S. 103-107.
- Sakai, H. und J. Umemura. 1997. Effect of Infrared Radiation and Air Flow on Fourier Transform Infrared External Reflection Spectra of Langmuir Monolayers. *Langmuir.* 13:502-505.
- Sakai, H. und J. Umemura. 1998. Molecular Orientation in Langmuir Films of 12-Hydroxystearic Acid Studied by Infrared External-Reflection Spectroscopy. *Langmuir.* 14:6249-6255.
- Sandhoff, K., T. Kolter und K. Harzer. 2001. Sphingolipid activator proteins. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver, C., A. Beaudet, L. Sly, S. William und D. Valle, Hrsg. Vol. 8. David Mc Graw Hill, New York. S. 3371-3389.
- Saupe, A. und W. Maier. 1961. Methoden zur Bestimmung des Ordnungsgrades nematischer kristallinflüssiger Schichten. *Z. Naturforschg.* 16a:816-824.
- Schmitz, P. und H. Gruler. 1995. Phase Transitions of Liquid-Crystal Films at the Air-Water Interface detected by Surface Potential Measurements. *Europhys. Lett.* 29:451-456.
- Schubert-Wright, C., S.-C. Li und F. Rastinejad. 2000. Crystal Structure of Human GM2-Activator Protein with a Novel beta-Cup Topology. *J. Mol. Biol.* 304:411-422.
- Schwarz, A., E. Rapaport, K. Hirschberg und A. H. Futerman. 1995. A Regulatory Role for Sphingolipids in Neuronal Growth. *J. Biol. Chem.* 270:10990-10998.

- Seelig, A. 1987. Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 899:196-204.
- Seydel, U., M. Oikawa, K. Fukase, S. Kusumoto und K. Brandenburg. 2000. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur. J. Biochem.* 267:3032-3039.
- Sicchierolli, S. M. und A. M. Carmona-Ribeiro. 1995. Incorporation of the Cholera Toxin Receptor in phospholipid-covered Polystyrene Microspheres. *Colloids Surf. B.* 5:57-61.
- Singer, S. J. und G. L. Nicolson. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science.* 175:720-731.
- Snyder, R. G., S. L. Hsu und S. Krimm. 1978. Vibrational spectra in the C-H stretching region and the structure of the polymethylene chain. *Spectrochim. Acta.* 34A:395-406.
- Snyder, R. G., H. L. Strauss und C. A. Elliger. 1982. C-H Stretching Modes and the Structure of *n*-Alkyl Chains. 1. Long, Disordered Chains. *J. Phys. Chem.* 86:5145-5150.
- Sonnino, S., L. Cantu, M. Corti, D. Acquotti und B. Venerando. 1994. Aggregative properties of gangliosides in solution. *Chem. Phys. Lipids.* 71:21-45.
- Sorice, M., I. Parolini, T. Sansolini, T. Garofalo, V. Dolo, M. Sargiacomo, T. Tai, C. Peschle, M. R. Torrisi und A. Pavan. 1997. Evidence for the existence of ganglioside-enriched plasma membrane domains in human peripheral lymphocytes. *J. Lipid Res.* 38:969-980.
- Subramaniam, S. und H. M. McConnell. 1987. Critical Mixing in Monolayer Mixtures of Phospholipid and Cholesterol. *J. Phys. Chem.* 91:1715-1718.
- Sun, X. L., H. M. Baker, S. C. Shewry, G. B. Jameson und E. N. Baker. 1999. Structure of recombinant human lactoferrin expressed in *Aspergillus awamori*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55:403.
- Svennerholm, L. 1963. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* 10:613-623.
- Tamm, L. K. und S. A. Tatulian. 1997. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Quat. Rev. Biophys.* 30:365-429.
- Tanford, C. 1980. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. John Wiley and Sons, New York.
- Tasumi, M. und T. Shimanouchi. 1965. Crystal Vibrations and Intermolecular Forces of Polymethylene Crystals. *J. Chem. Phys.* 43:1245-1258.
- Terrill, R. H., T. A. Tanzer und P. W. Bohn. 1998. Structural Evolution of Hexadecanethiol Monolayers on Gold during Assembly: Substrate and Concentration Dependence of Monolayer Structure and Crystallinity. *Langmuir.* 14:845-854.
- Thoma, M., M. Schwendler, H. Baltes, C. A. Helm, T. Pfohl, H. Riegler und H. Möhwald. 1996. Ellipsometry and X-ray Reflectivity Studies on Monolayers of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine in Contact with *n*-Dodecane, *n*-Hexadecane, and Bicyclohexyl. *Langmuir.* 12:1722-1728.
- Thornburg, T., C. Miller, T. Thuren, L. King und M. Waite. 1991. Glycerol Reorientation during the Conversion of Phosphatidylglycerol to Bis(monoacylglycerol)phosphate in Macrophage-like RAW 264.7 Cells. *J. Biol. Chem.* 266:6834-6840.
- Tomita, M., M. Takase, H. Wakabayashi und W. Bellamy. 1994. Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357:209-218.

- Vaccaro, A. M., M. Tatti, F. Ciaffoni, R. Salvioli, A. Barca und C. Scerch. 1997. Effect of Saposins A and C on the Enzymatic Hydrolysis of Liposomal Glucosylceramide. *J. Biol. Chem.* 272:16862-16867.
- Vaknin, D., K. Kjaer, J. Als-Nielsen und M. Lösche. 1991. Structural properties of phosphatidylcholine in a monolayer at the air/water interface. Neutron reflection study and reexamination of x-ray reflection measurements. *Biophys. J.* 59:1325-1332.
- Vaknin, D. und M. S. Kelley. 2000. The structure of D-Erythro-C18 Ceramide at the Air-Water Interface. *Biophys. J.* 79:2616-2623.
- Vaknin, D., M. S. Kelley und B. M. Ocko. 2001. Sphingomyelin at the Air-Water Interface. *J. Chem. Phys.* 115:7697-7704.
- Venyaminov, S. Y. und F. G. Prendergast. 1997. Water (H₂O and D₂O) Molar Absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions. *Anal. Biochem.* 248:234-245.
- Vie, V., N. van Mau, E. Lesniewska, J. P. Goudonnet, F. Heitz und C. Le Grimellec. 1998. Distribution of Ganglioside GM1 between Two-Component, Two-Phase Phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir.* 14:4574-4583.
- Voet, D. und J. G. Voet. 1992. Biochemie. Maelicke, A. und W. Müller-Esterl, Hrsg. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Weis, R. M. 1991. Fluorescence microscopy of phospholipid monolayer phase transitions. *Chem. Phys. Lipids.* 57:227-239.
- Wen, X. und E. I. Franses. 2001. Role of Subsurface Particulates on the Dynamic Adsorption of Dipalmitoylphosphatidylcholine at the Air/Water Interface. *Langmuir.* 17:3194-3201.
- Werth, N., C. G. Schuette, G. Wilkening, T. Lemm und K. Sandhoff. 2001. Degradation of Membrane-bound Ganglioside GM2 by β -Hexosaminidase A. *J. Biol. Chem.* 276:12685-12690.
- Wiegandt, H. 1985. Gangliosides. In Glycolipids. Wiegandt, H., Hrsg. Elsevier Science Publisher. S. 199-260.
- Wiener, M. C., R. M. Suter und J. F. Nagle. 1989. Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys. J.* 55:315-325.
- Wilkening, G., T. Linke und K. Sandhoff. 1998. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J. Biol. Chem.* 273:30271-30278.
- Wilkening, G., T. Linke, G. Uhlhorn-Dierks und K. Sandhoff. 2000. Degradation of Membrane-bound Ganglioside GM1. Stimulation by Bis(monoacylglycero)phosphate and the Activator Proteins SAP-B and GM2-AP. *J. Biol. Chem.* 275:35814-35819.
- Winter, R. und F. Noll. 1998. Methoden der Biophysikalischen Chemie. Elschenbroich, C., F. Hensel und H. Hopf, Hrsg. B. G. Teubner, Stuttgart.
- Worthman, L.-A. D., K. Nag, P. J. Davis und K. M. W. Keough. 1997. Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy. *Biophys. J.* 72:2569-2580.
- Wu, S.-T. 1987. Infrared markers for determining the order parameters of uniaxial liquid crystals. *Appl. Optics.* 26:3434-3440.
- Xue, J., C. S. Jung und M. W. Kim. 1992. Phase Transitions of Liquid-Crystal Films on an Air-Water Interface. *Phys. Rev. Lett.* 69:474-477.

- Yuan, C. und L. J. Johnston. 2000. Distribution of Ganglioside GM1 in L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Monolayers: A Model for Lipid Rafts. *Biophys. J.* 79:2768-2781.
- Yuan, C. und L. J. Johnston. 2001. Atomic Force Microscopy Studies of Ganglioside GM1 Domains in Phosphatidylcholine and Phosphatidylcholine/Cholesterol Bilayers. *Biophys. J.* 81:1059-1069.
- Zähringer, U., B. Lindner und E. T. Rietschel. 1994. Molecular Structure of Lipid A, the Endotoxic Center of Bacterial Lipopolysaccharides. *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 50:211-276.

Anhang

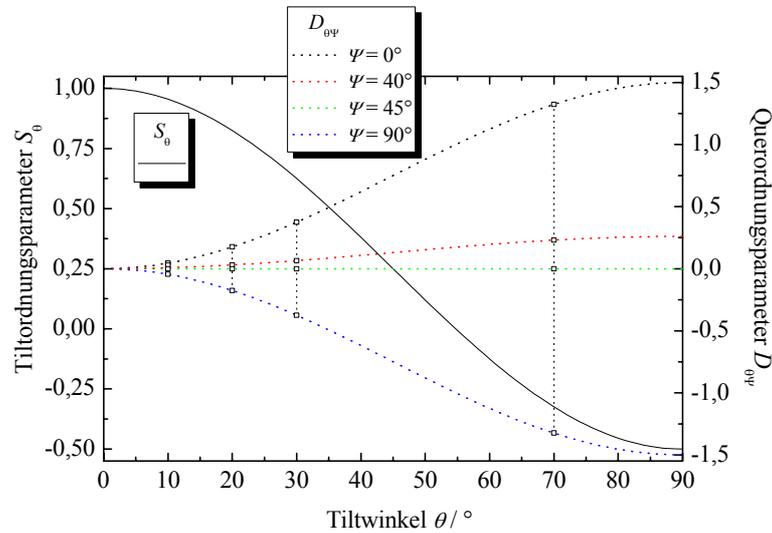
A.1 Simulation der Ordnungsparameter S und D 

Abb. A.1.1: Simulation des Tiltordnungsparameters S_0 und des Querordnungsparameters $D_{0\psi}$ in Abhängigkeit vom Tiltwinkel θ für verschiedene Twistwinkel ψ . Bei bestimmten Tiltwinkeln θ (10° , 20° , 30° und 70°) wurden die Resultate zur besseren Vergleichbarkeit mit Kästchen markiert und vertikal verbunden.

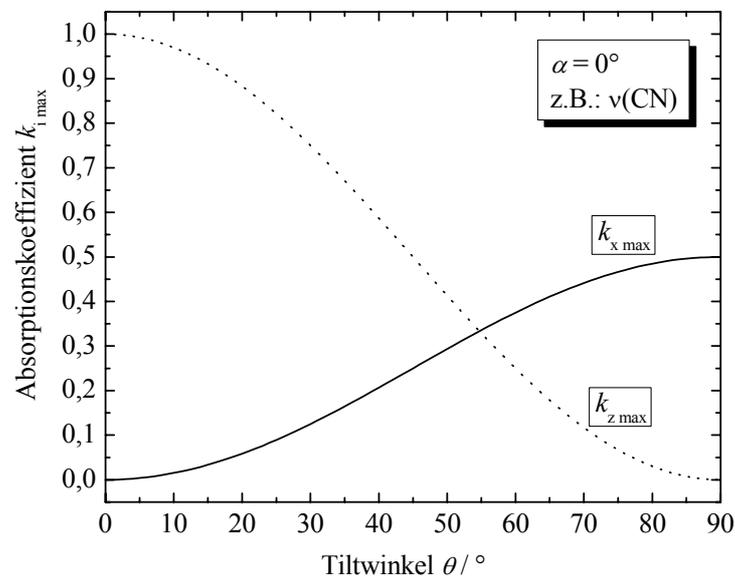
A.2 Simulation der Absorptionskoeffizienten $k_{i \max}$ 

Abb. A.2.1: Simulation der Absorptionskoeffizienten $k_{i \max}$ in Abhängigkeit vom Tiltwinkel θ mit $k_{x \max} + k_{y \max} + k_{z \max} = k_{\max} = 1$ ($k_{x \max} = k_{y \max}$; k_{\max} wurde willkürlich auf 1 gesetzt). Das Übergangsdipolmoment μ hat die Polarwinkel $\alpha = 0^\circ$ und $\beta = 0^\circ$ (z. B.: v(CN)).

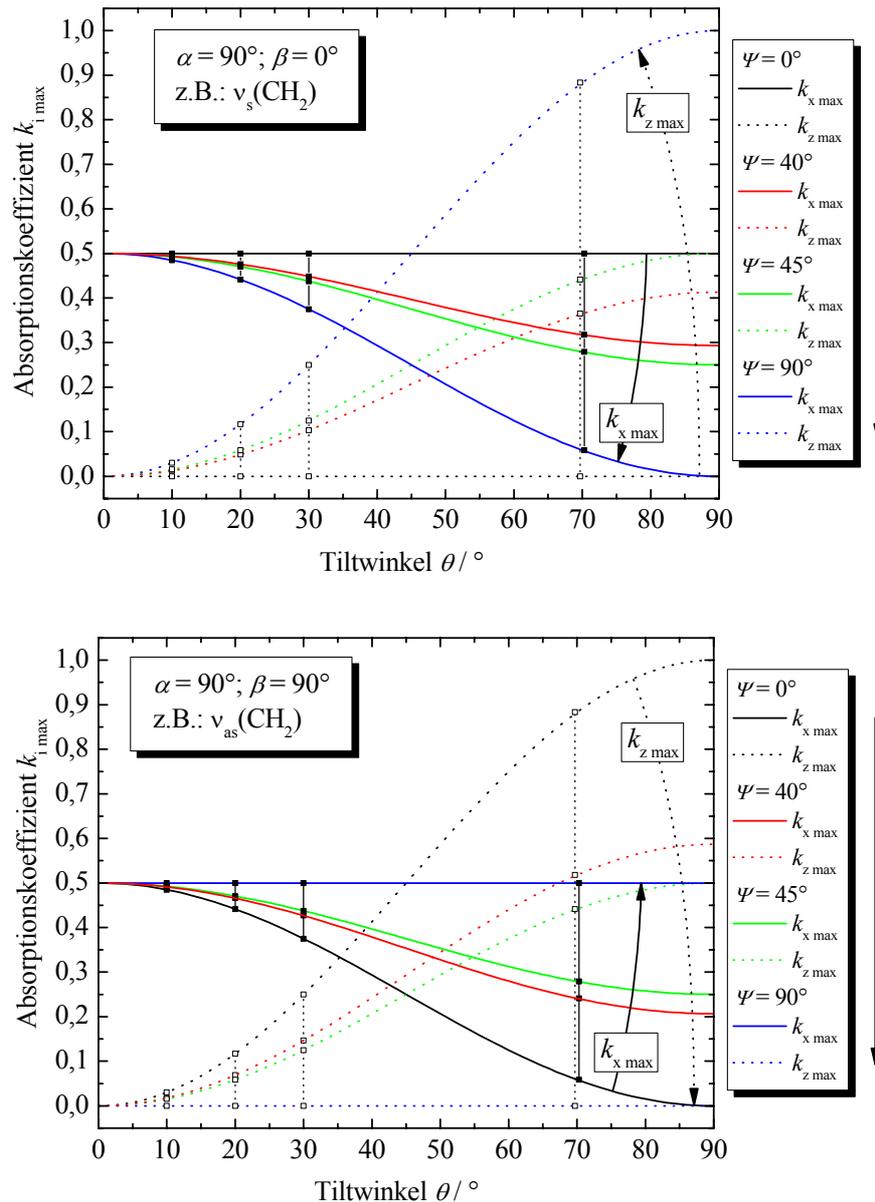


Abb. A.2.2: Simulation der Absorptionskoeffizienten $k_{i,max}$ in Abhängigkeit vom Tiltwinkel θ und für verschiedene Twistwinkel ψ mit $k_{x,max} + k_{y,max} + k_{z,max} = k_{max} = 1$ ($k_{x,max} = k_{y,max}$; k_{max} wurde willkürlich auf 1 gesetzt). Das Übergangsdipolmoment μ hat die Polarwinkel $\alpha = 90^\circ$ und $\beta = 0^\circ$ (OBEN; z. B.: $v_s(\text{CH}_2)$) bzw. $\beta = 90^\circ$ (UNTEN; z. B.: $v_{as}(\text{CH}_2)$). Die Pfeile verdeutlichen die Variation des Twistwinkels zwischen den Extremwerten 0 und 90° für die resultierenden Absorptionskoeffizienten. Bei bestimmten Tiltwinkeln θ (10, 20, 30 und 70°) wurden die Resultate zur besseren Vergleichbarkeit mit Kästchen markiert und vertikal verbunden.

Vergleicht man in Abb. A.2.2 die Absorptionskoeffizienten $k_{x,max}$ bzw. $k_{z,max}$ ausgehend vom Fall der Rotationssymmetrie ($\psi = 45^\circ$), so erkennt man, daß eine leichte Verdrillung ($\psi = 40^\circ$) der Moleküle bei kleinen Tiltwinkeln nur geringfügige Veränderungen bedingt. Bei großen Tiltwinkeln sind Änderungen des Twistwinkels ohne Probleme meßbar.

A.3 Normierung der Reflektivitätsspektren

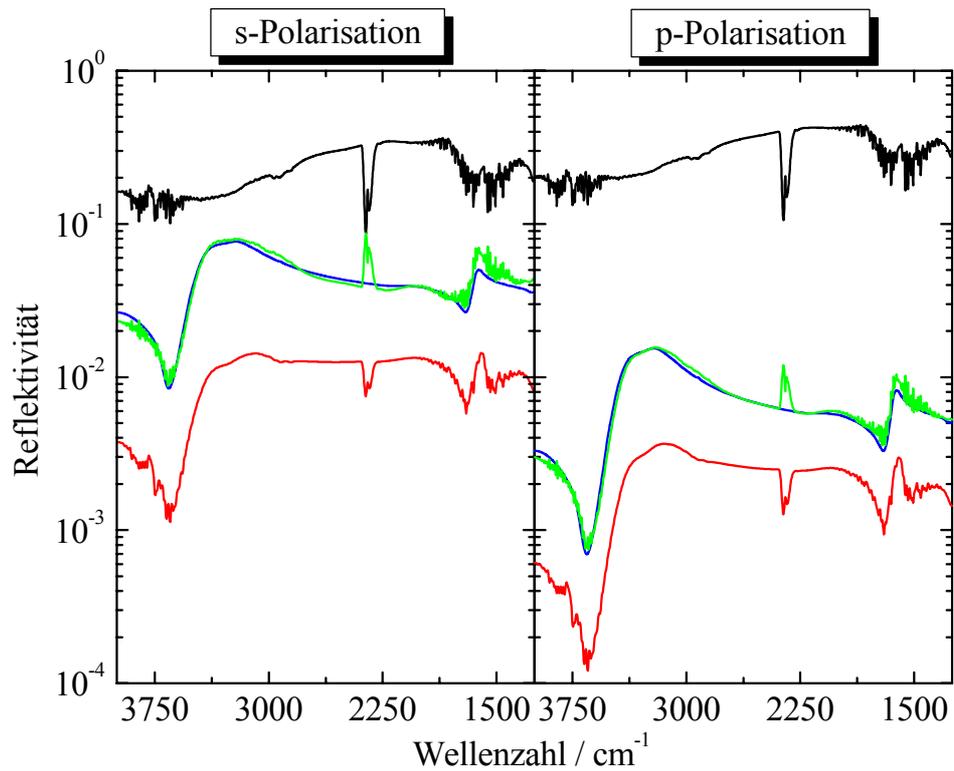


Abb. A.3.1: Kalibrierungsspektren R_{90° ohne Probe im Strahlengang bei einem Einfallswinkel von 90° (—), gemessene Reflektivitätsspektren R_{Messung} von Wasser (—), experimentelle Reflektivitätsspektren $R_{\text{experimentell}} = R_{\text{Messung}} / R_{90^\circ}$ (—) und simulierte Reflektivitätsspektren (—) für s- bzw. p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° .

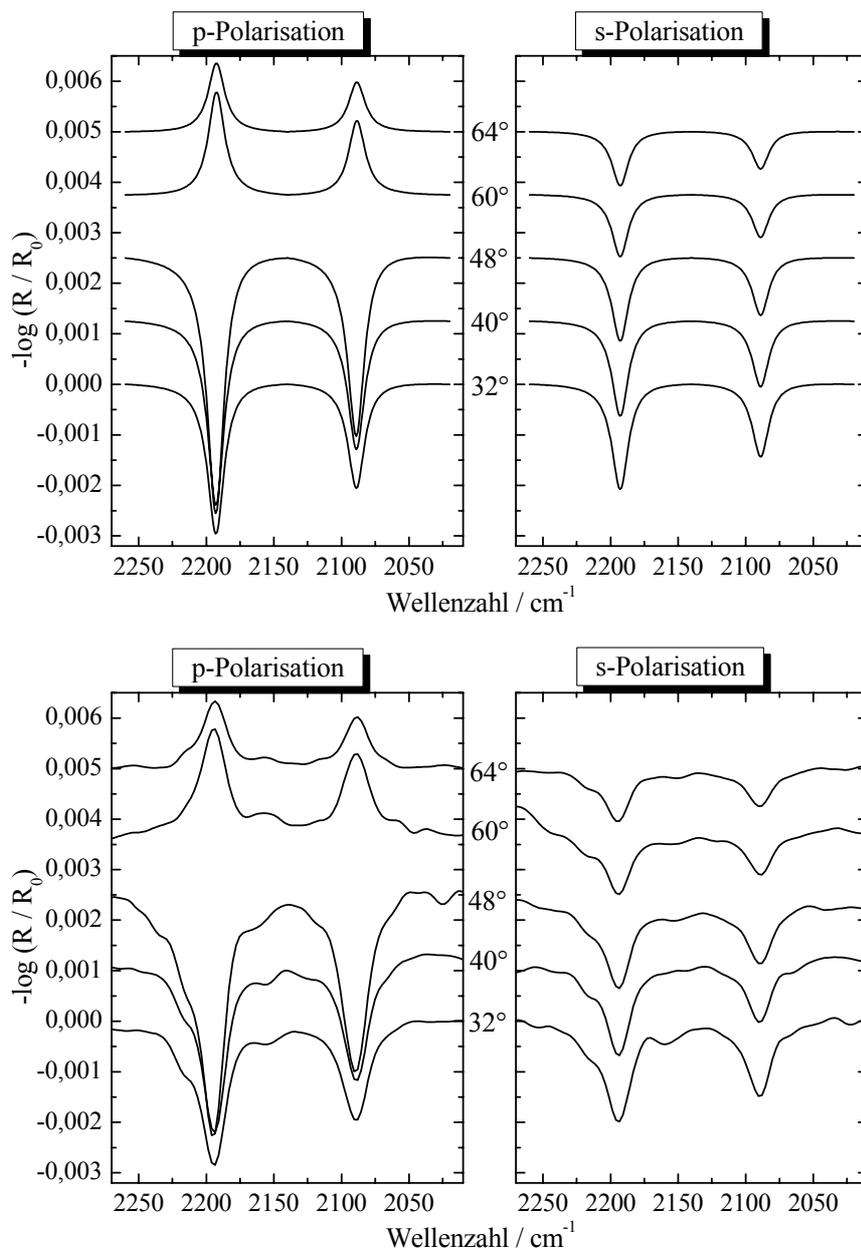
A.4 IRRAS-Simulation von CD_2 -Streckschwingungsbanden

Abb. A.4.1: Simulierte (oben) und experimentelle (unten) IRRAS-Spektren der $\nu(\text{CD}_2)$ -Banden von DPPC- d_{62} bei den jeweils angegebenen Einfallswinkeln und entsprechender Polarisation. Die berechneten Spektren gehören zu dem Parametersatz, mit dem die experimentellen Daten am besten angepaßt werden konnten (siehe Abb. 2.9: $\theta = 28^\circ$, $\psi = 43^\circ$, $k_{\text{max as}} = 0,307$ und $k_{\text{max s}} = 0,222$).

A.5 8-Cyanobiphenyl

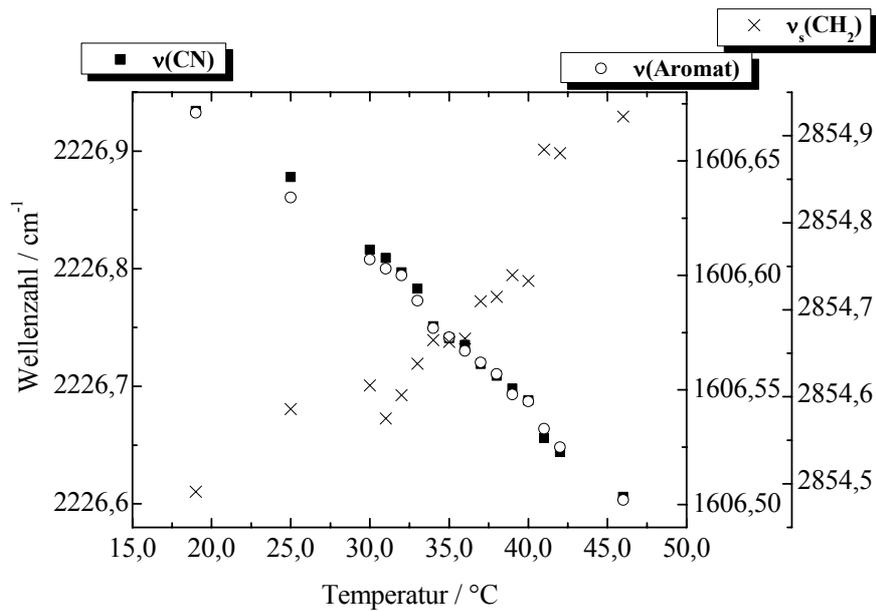


Abb. A.5.1: $\bar{\nu}(\text{CN})$ -, $\bar{\nu}(\text{Aromat})$ - und $\bar{\nu}_s(\text{CH}_2)$ /T-Diagramm von 8CB aus Transmissions-FT-IR-Messungen am IR-Mikroskop.

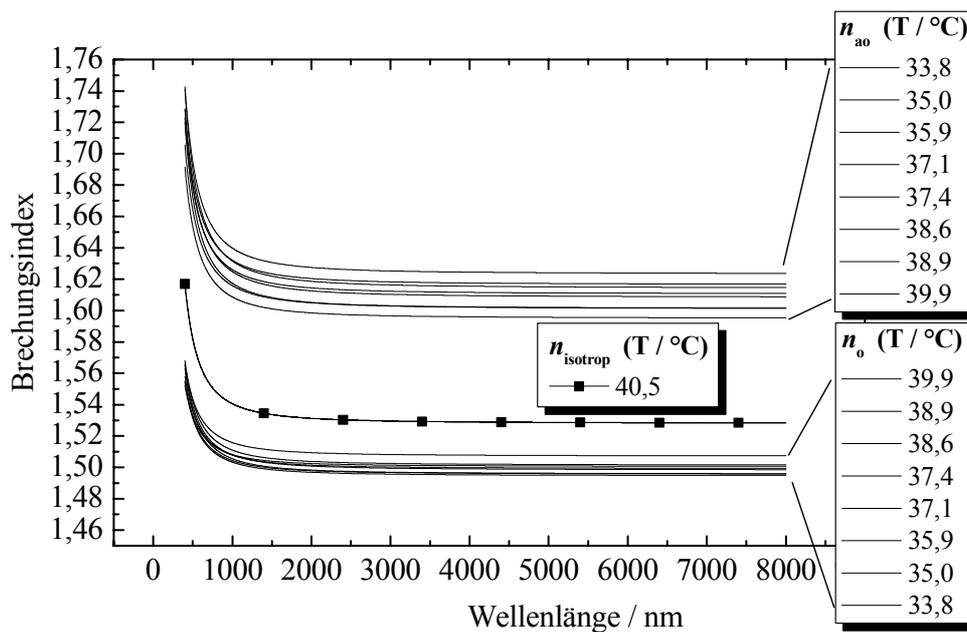


Abb. A.5.2: Extrapolation des ordentlichen und außerordentlichen Brechungsindex n_o bzw. n_{ao} von 8CB in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei den angegebenen Temperaturen.

Die Originaldaten wurden refraktometrisch bei $\lambda = 546, 589$ und 633 nm temperaturabhängig gemessen (Karat & Madhusudana, 1976). Diese Werte wurden an die empirische Dispersionsgleichung angepaßt (Averyanov et al., 1982; Wu, 1987; Binder et al., 1996):

$$n_{o,ao}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{A_{o,ao}(T) \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - B_{o,ao}(T)}} \quad (\text{Gl. A.5.1})$$

Von den erhaltenen temperaturabhängigen Koeffizienten $A_{o,ao}(T)$ und $B_{o,ao}(T)$ ist im mittleren Infrarot $B_{o,ao}(T)$ vernachlässigbar, so daß sich die Gleichung vereinfacht zu:

$$n_{o,ao}(\lambda) = \sqrt{1 + A_{o,ao}(T)}. \quad (\text{Gl. A.5.2})$$

$A_{o,ao}(T)$ wurde dafür aus den einzelnen Anpassungen in Abb. A.5.2 entnommen und man erhält:

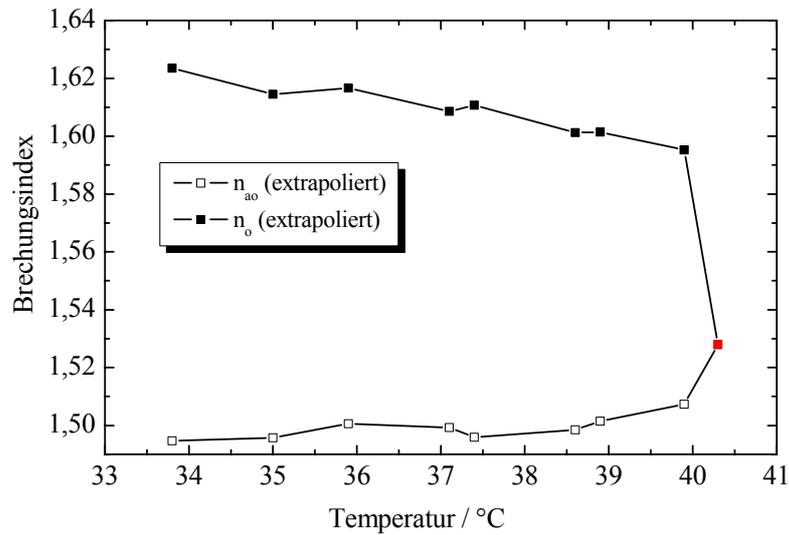


Abb. A.5.3: Extrapolierte Brechungsindices n_o bzw. n_{ao} von 8CB in Abhängigkeit von der Temperatur.

A.6 Fluoreszenz-Mikroskopie

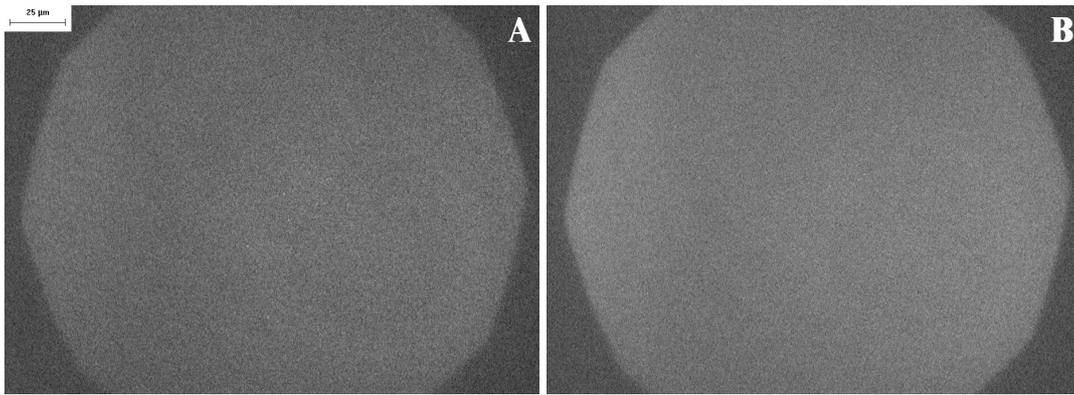


Abb. A.6.1: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von DMPC-d₅₄ (Isotherme: Abb. 3.14 unten links; A: 1,00 nm²; B: 0,55 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μm.

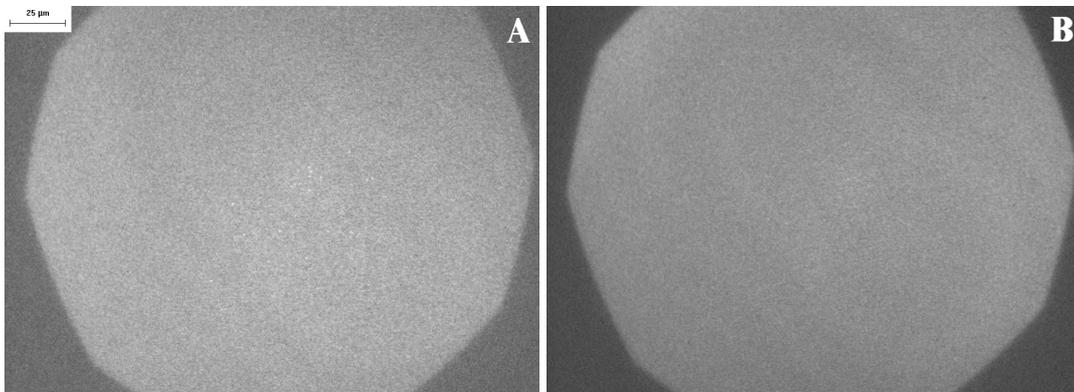


Abb. A.6.2: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von GM1 (Isotherme: Abb. 3.14 oben rechts; A: 1,60 nm²; B: 0,70 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μm.

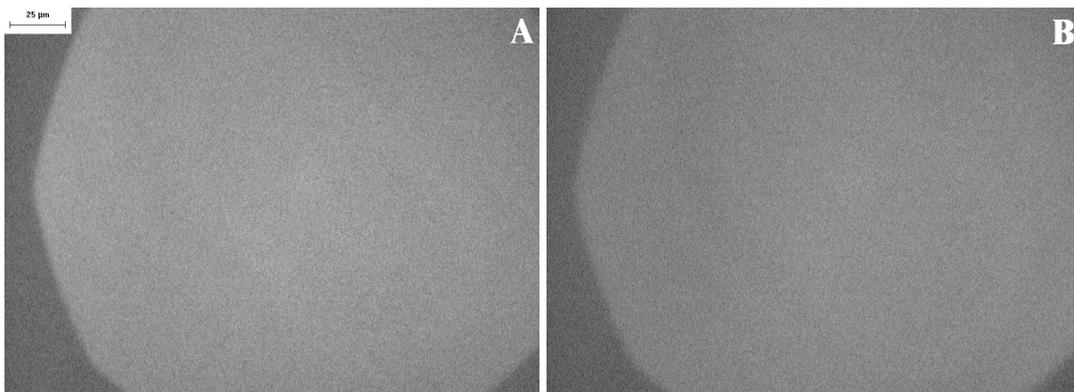


Abb. A.6.3: Fluoreszenz-Mikroskopiebilder von GM2 (Isotherme: Abb. 3.18 oben rechts; A: 0,95 nm²; B: 0,52 nm²) auf H₂O bei 20 °C. Skalierungsbalken: 25 μm.

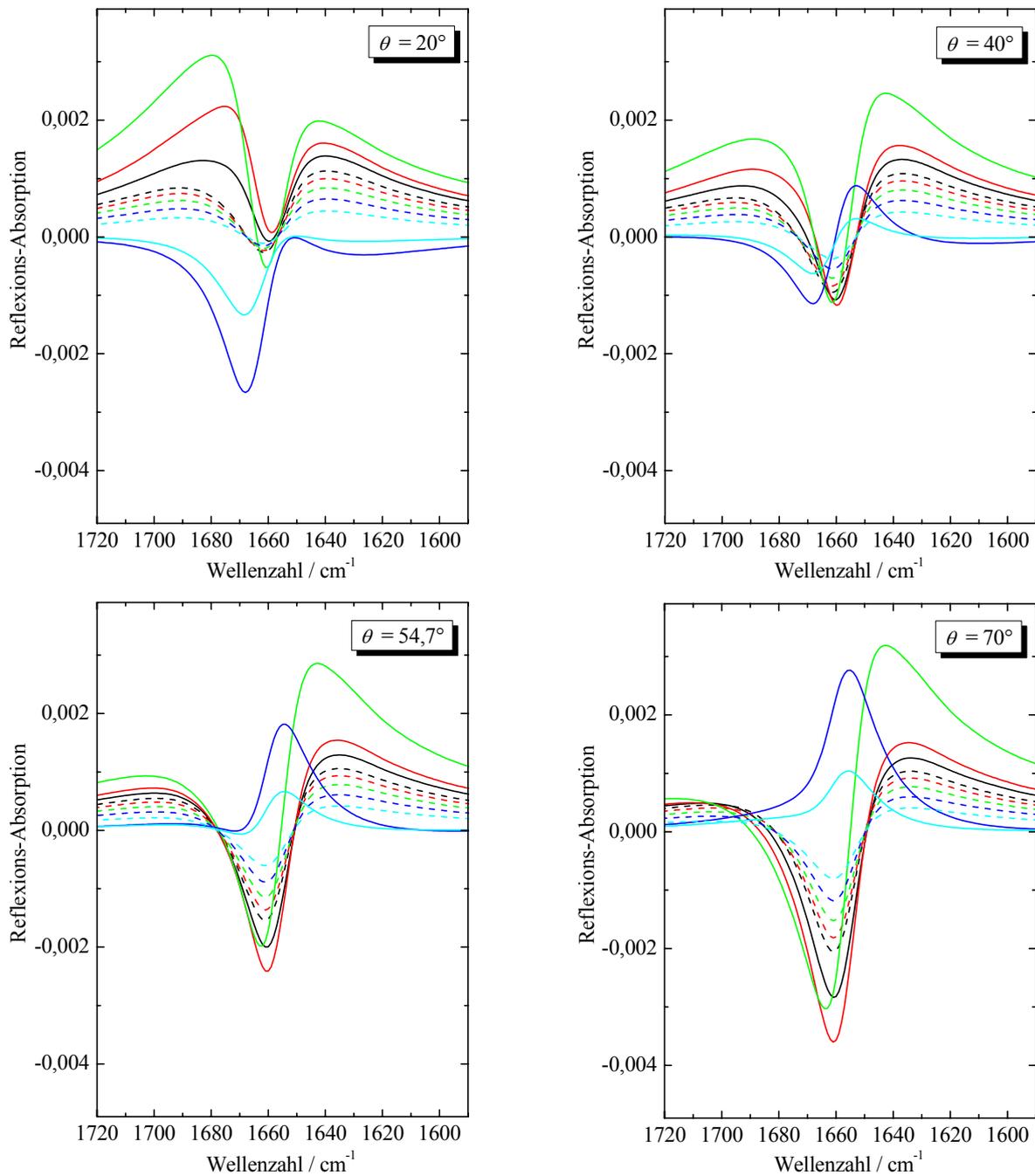
A.7 IRRAS-Simulation der Amid-I-Bande einer α -Helix

Abb. A.7.1: IRRAS-Simulation der Amid-I-Bande einer beliebigen α -Helix auf H_2O ($\nu_0 = 1659 \text{ cm}^{-1}$, $\alpha = 36^\circ$, $k_{\text{max}} = 1$) für einen Tiltwinkel θ der Helixachse zur Oberflächennormalen von 20° (oben links), 40° (oben rechts), $54,7^\circ$ (unten links) und 70° (unten rechts). Die Simulationen erfolgten für p- bzw. s-Polarisation (durchgezogen bzw. gestrichelt) bei einem Einfallswinkel φ_1 von 30° (—), 40° (—), 50° (—), 60° (—) und 70° (—).

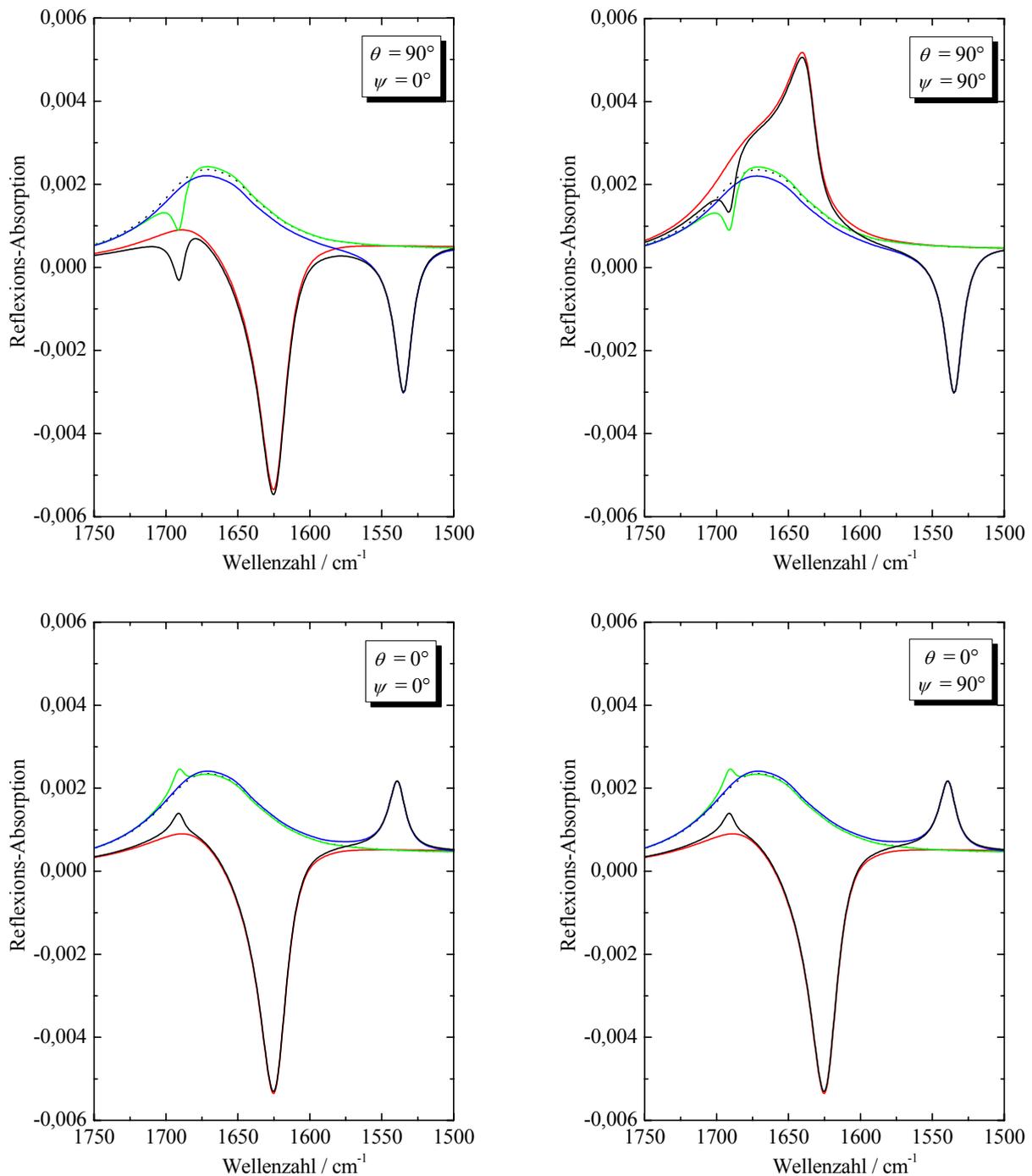
A.8 IRRAS-Simulation der Amid-Banden eines β -Faltblatts

Abb. A.8.1: IRRAS-Simulation der Amid-I- bzw. Amid-II-Banden eines beliebigen β -Faltblatts auf H_2O ($\nu_0 = 1625 \text{ cm}^{-1}$, $\alpha = 90^\circ$, $k_{\text{max}} = 1$ (—); $\nu_0 = 1690 \text{ cm}^{-1}$, $\alpha = 0^\circ$, $k_{\text{max}} = 0,1$ (—); $\nu_0 = 1535 \text{ cm}^{-1}$, $\alpha = 0^\circ$, $k_{\text{max}} = 0,5$ (—)). Die Simulationen erfolgten für p-Polarisation bei einem Einfallswinkel φ_1 von 40° für die jeweils angegebenen Tilt- und Twistwinkel θ und ψ (siehe auch Abb. 1.4 und Abb. 2.1). Zusätzlich sind die zugehörige Basislinie (····) und die Einhüllende (—) für alle 3 Amidbanden dargestellt.

A.9 GM1 und GM2-Aktivatorprotein

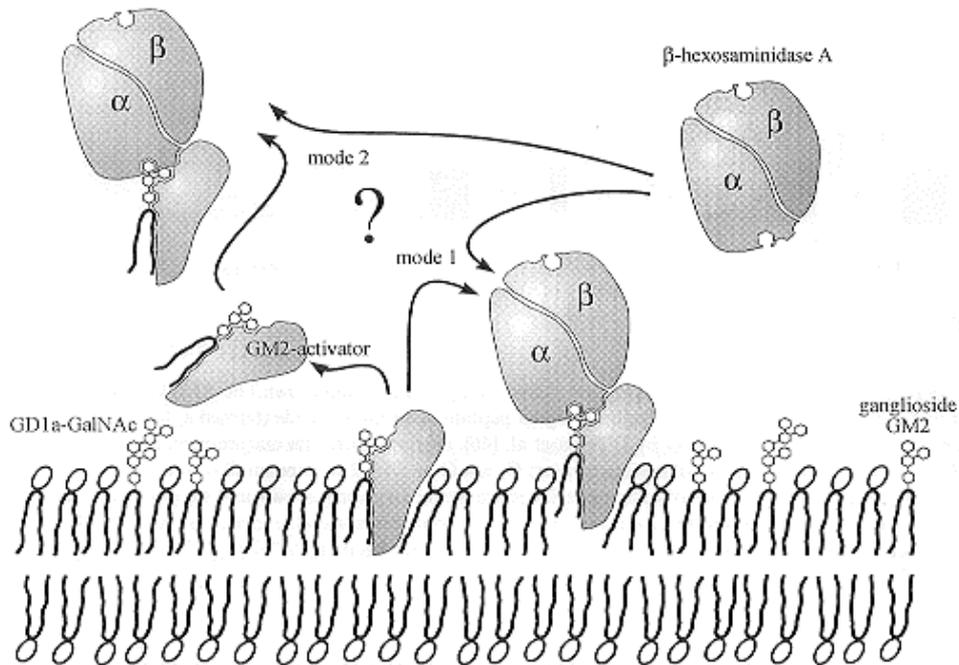


Abb. A.9.1: Modell zur Funktion des GM2-Aktivatorproteins bei der Hydrolyse des GalNAc von GM2 durch β -Hexosaminidase A (Fürst & Sandhoff, 1992).

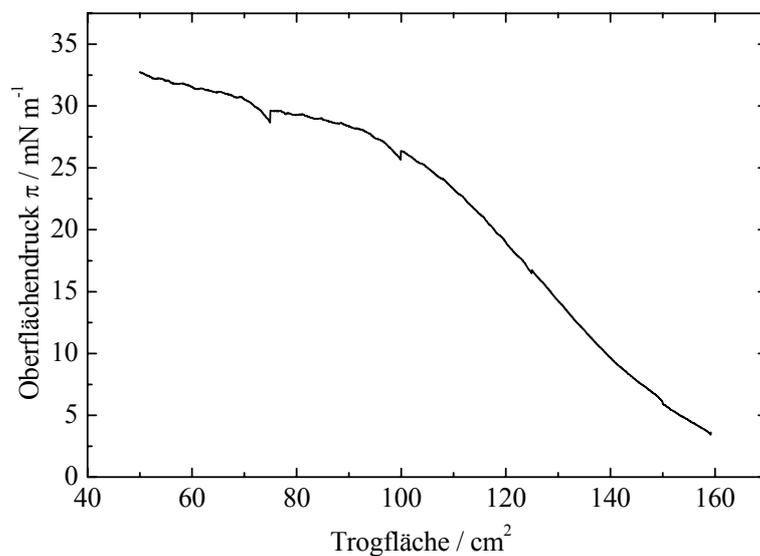


Abb. A.9.2: π/A -Isotherme von gespreitetem GM2-AP auf D₂O (10 mM Citratpuffer, 100 mM NaCl, pD 4,0) bei 20 °C. Die Spreitmenge ergab zu Beginn der Kompression eine Oberflächenkonzentration von 1 mg/m².

Lebenslauf

Persönliches: Andreas Markus Kerth
geboren am 25.08.1970 in Worms/Rhein

Schulbildung:

1977 – 1981 Grundschule Osthofen
1981 – 1990 Gauß-Gymnasium Worms/Rhein
05/1990 Abschluß: Abitur

Zivildienst:

06/1990 – 08/1991 Amt für Grünanlagen, Naherholung und Umweltschutz in Mainz

Hochschulbildung:

10/1991 – 03/1997 Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern
03/1997 Abschluß: Diplom-Chemiker

Berufliche Tätigkeit:

seit 05/1997 Promotion in Physikalischer Chemie bei Prof. Dr. A. Blume
Begonnen an der Universität Kaiserslautern
09/1997 Umzug mit dem Arbeitskreis an das Institut für Physikalische Chemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Max-Planck-Arbeitsgruppe
„Flüssigkristalline und mizellare Systeme“
Stipendiat nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-
Anhalt
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 197 „Lipidorganisation und
Lipid-Protein-Wechselwirkungen in Bio- und Modellmembranen“ und
im DFG-Projekt „Lipid-Detergens-Wechselwirkungen“

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit habe ich an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle/Saale, Dezember 2002