

Die Permeation kleiner polarer Moleküle durch Phospholipidmodellmembranen

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
“Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D 386)

von

Armin Elbert

Betreuer: Prof. Dr. A. Blume

Kaiserslautern 1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. C. G. Kreiter

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. A. Blume

2. Berichterstatter:

Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 27.08.1999

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 1995 bis August 1999 im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Blume im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern und im Institut für Physikalische Chemie der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg.

Herrn Prof. Dr. A. Blume danke ich herzlich für die interessante Thematik, die wohlwollende Unterstützung und den mir gewährten Freiraum während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr.-Ing. S. Ernst danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. C. G. Kreiter möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Biologische Membranen	1
1.2 Hydrophober Effekt	2
1.3 Phospholipide	3
2. Problemstellung	9
3. Modelle zur Beschreibung der Permeation von kleinen Molekülen durch Lipidmembranen	12
3.1 Permeationsmodelle	11
3.1.1 Löslichkeitsdiffusionsmodell	12
3.1.2 Das Vier-Regionen-Modell einer Lipiddoppelschicht	15
3.1.3 Freies-Volumen-Modell	17
3.1.4 Porenmodell	20
3.2 Transportmechanismen durch die Lipiddoppelschicht	22
3.2.1 Diffusionskontrollierte Wasserpermeation	22
3.2.1.1 Bestimmung der diffusionskontrollierten Wasserpermeation mittels der $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschmethode	23
3.2.1.2 Bestimmung der diffusionskontrollierten Permeation von anderen kleinen Molekülen	23
3.2.2 Osmotische Wasserpermeation	28
3.2.2.1 Bestimmung der osmotischen Wasserpermeation	30
3.3 Bestimmung der Größe von Poren in Phospholipiddoppelschichten	32
3.3.1 Berechnung von makroskopischen Poren	32
3.3.2 Berechnung der Porengröße nach dem "Single-File" Modell	33
3.3.2.1 Diffusionskontrollierter Wassertransport durch die Lipidmembran	34
3.3.2.2 Osmotischer Wassertransport durch die Lipidmembran	35

4. Methoden	38
4.1 Vesikelpräparation	38
4.1.1 Herstellung der Lipidproben	39
4.1.2 Aufbau und Verwendung des Liposofast-Extruders	41
4.2 Größenbestimmung der Vesikel mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)	42
4.2.1 Allgemeine Grundlagen	42
4.2.2 Durchführung der Messung und Auswertung	46
4.3 Kinetische Messungen	47
4.3.1 Stopped-Flow Methode	48
4.3.2 Bestimmung der Totzeit der Stopped-Flow Apparatur	49
4.3.3 Durchführung der Stopped-Flow Messung	50
4.3.4 Messung der diffusiven Wasserpermeabilität	51
4.3.5 Messung der Permeabilität von kleinen Molekülen	51
4.3.6 Messung der osmotischen Wasserpermeabilität	52
5. Ergebnisse	53
5.1 Diffusive und osmotische Wasserpermeation	54
5.1.1 DMPC und DMPA	54
5.1.2 Gemische von DMPC und DMPA	57
5.1.3 Zusammenfassung	61
5.2 Wasser- und Harnstoffpermeation durch DMPC-Vesikel in	
Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten von Harnstoff	63
5.2.1 Methode der osmotischen Wasser- und Harnstoffpermeation	63
5.2.2 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k für die H_2O -Permeation von der Harnstoffkonzentrationsdifferenz	66
5.2.3 Temperaturabhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten	68
5.2.3.1 Osmotische Wasserpermeation	68
5.2.3.2 Diffusive Harnstoffpermeation	72
5.2.4 Permeation im Phasenumwandlungsbereich	77
5.2.5 Zusammenfassung	78

5.3 Osmotische Wasserpermeation durch Bilayer aus Gemischen von Phosphatidylcholinen und Phosphatidsäuren	80
5.3.1 Permeabilität von Vesikeln aus den Phosphatidsäuren DMPA und DPPA bzw. den Phosphatidylcholinen DMPC und DPPC	80
5.3.2 Permeation durch DMPC/DPPC und DMPA/DPPA-Membranen	84
5.3.3 Wasserpermeation durch Membranen aus Lipidgemischen von Phosphatidsäuren und Phosphatidylcholinen	88
5.3.3.1 Untersuchung der binären Lipidgemische DMPC/DMPA und DPPC/DPPA	88
5.3.3.2 Untersuchung der binären Lipidgemische DMPC/DPPA und DPPC/DMPA	93
5.3.4 Zusammenfassung	96
5.4 Permeation von anderen kleinen Molekülen durch die Doppelschicht	99
5.4.1 Permeationseigenschaften der Moleküle	101
5.4.2 Zusammenfassung	109
5.5 Einfluß der Lipid-Detergens-Wechselwirkung auf die Permeation von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht	113
5.5.1 Detergentien	113
5.5.2 Untersuchung des Einflusses von Octylglucosid auf die Permeabilität von Lipidmembranen	116
5.5.3 Zusammenfassung	121
6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)	123
6.1 Allgemeines und Problemstellung	123
6.2 Durchführung der Messung	126
6.2.1 Probenvorbereitung	126
6.2.2 Aufnahme der Kalorigramme	127
6.2.3 Auswertung der Kalorigramme	127

6.3 Ergebnisse und Diskussion der DSC-Messungen	128
6.3.1 Einfluß der Konzentration von Harnstoff auf das Phasenumwandlungs- verhalten der DMPC-Vesikel	128
6.3.2 Stabilität der Vesikel	134
6.3.3 Einfluß des Lösungsmittels auf die Phasenumwandlung	135
6.4 Zusammenfassung	136
7. Diskussion der Ergebnisse	138
8. Materialien und Geräte	153
8.1 Materialien	153
8.1.1 Chemikalien	153
8.1.2 Lipide	153
8.2 Geräte	154
9. Literatur	155

Abkürzungen

Lipide

DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DMPA	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidsäure
DPPA	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholine
PA	Phosphatidsäure

Detergens

OG	n-Octyl- β -D-glucoopyranosid (Octylglucosid)
----	---

Phasen

H _I	hexagonale Phase
H _{II}	invertierte hexagonale Phase
L _{α}	flüssig-kristalline Phase
L _{β}	Gelphase
L _{β'}	Gelphase mit geneigten Fettsäureketten
P _{β'}	“Ripple Phase“ mit geneigten Fettsäureketten
L _c	kristalline Phase
L _{c'}	kristalline Phase mit geneigten Fettsäureketten

Methoden

DSC	Differential Scanning Calorimetry
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie

Stopped-Flow Messung

P _f	Permeabilitätskoeffizient für die osmotische Wasserpermeation
P _d	Permeabilitätskoeffizient für die diffusive Permeation der Moleküle
T _m	Hauptphasenumwandlungstemperatur Gelphase → flüssig-kristalline Phase
k	Geschwindigkeitskonstante der Permeation
E _A	molare Aktivierungsenergie

DSC

c_{diff}	differentielle Molwärme
c. u.	kooperative Einheit
ΔH_{cal}	Enthalpie, kalorimetrisch bestimmt
ΔH_{m}	Enthalpie der Hauptumwandlung
ΔH_{v}	Enthalpie der Vorumwandlung
ΔH_{vH}	van't Hoff Enthalpie
T_{v}	Vorumwandlungstemperatur
T_{m}	Hauptphasenumwandlungstemperatur

Vesikeldeklaration

SUV	Small Unilamellar Vesicles
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MLV	Multilamellar Vesicles

Sonstige

AKF	Autokorrelationsfunktion
DCIP	1,6-Dichlorophenolindophenol
R	Gaskonstante
T	Temperatur
cmc	kritische Mizellbildungskonzentration
L	Lipidkonzentration
D_{e}	Detergenkonzentration in der Lipiddoppelschicht
D_{w}	Detergenmonomerkonzentration im wässrigen Medium
D_{t}	Gesamtdetergenkonzentration
W	Wasserkonzentration
R_{e}	Verhältnis Detergens zu Lipid in den Aggregaten
$R_{\text{e}}^{\text{SAT}}$	Zusammensetzung der an Detergens gesättigten Vesikel
$R_{\text{e}}^{\text{SOL}}$	Zusammensetzung der an Lipid gesättigten Mizellen
x_{e}	Molenbruch des Detergens in der Lipiddoppelschicht
x_{w}	Molenbruch des Detergens in Wasser
P	Verteilungskoeffizient
sn	stereospezifische Numerierung

1. Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen sorgen für eine semipermeable Abgrenzung aller lebenden Zellen untereinander und verleihen ihnen dadurch ihre Individualität. Eine Besonderheit biologischer Membranen liegt in der Tatsache, daß ihre Struktur im wesentlichen durch nicht-kovalente Bindungen (van-der-Waals-Kräfte, Coulomb-Wechselwirkungen) zusammengehalten werden. Das Grundgerüst aller biologischen Membranen bildet die Lipiddoppelschicht. Sie wird häufig in Modellen als flüssig-kristalline Matrix beschrieben, in welche z. B. Proteine integral eingebettet oder peripher an der Oberfläche angelagert sind (Singer und Nicolson, 1972).

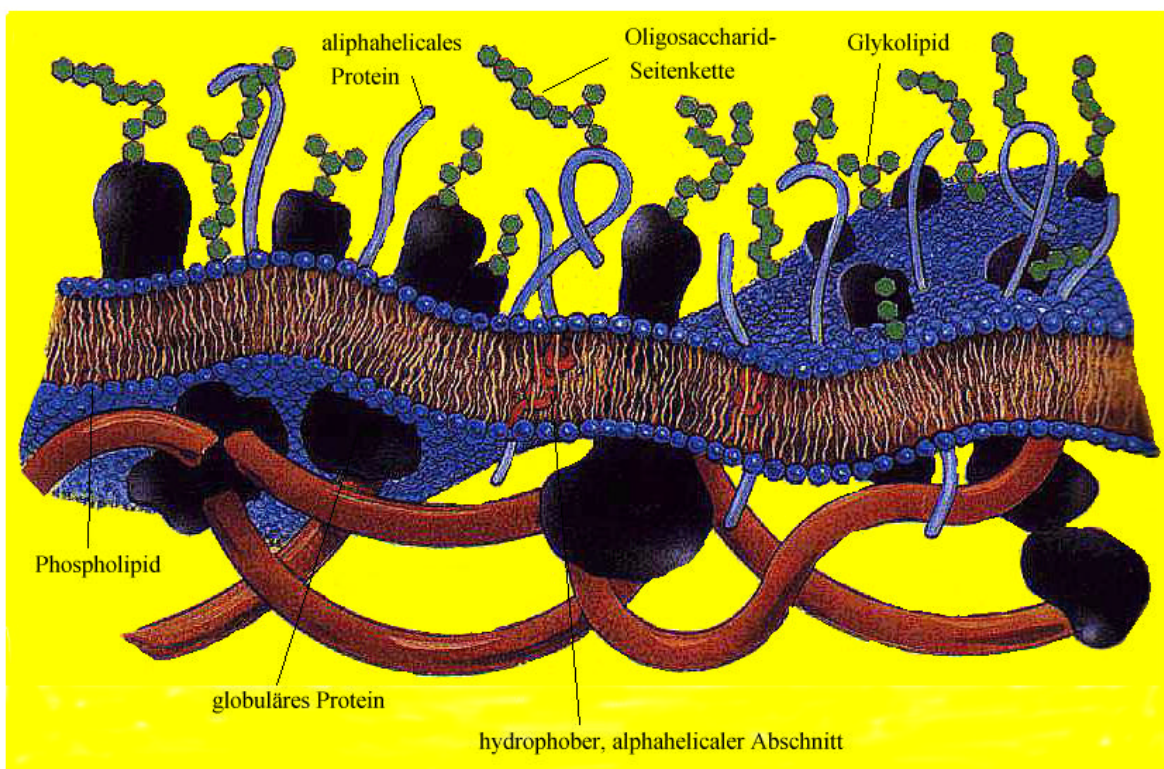


Abbildung 1.1: “Fluid mosaic“ Modell einer biologischen Membran (Bloom und Mouritsen, 1992).

In ihrer Funktionalität sind Membranen hochselektive Permeabilitätsschranken, welche die Zusammensetzung des intrazellulären Mediums sowie den Stoffaustausch zwischen den Zellen und ihrer Umgebung regulieren. Sie sind somit selektive Membranen, durch die bestimmte Moleküle frei permeieren, während andere mit Hilfe von Transportsystemen in die Zelle geschleust werden (erleichterte Diffusion oder aktiver Transport).

Wegen der Komplexität der biologischen Membranen erfolgen physikalisch-chemische Untersuchungen zur Struktur und Dynamik an Modellmembranen, deren Zusammensetzung genauestens bekannt sind. Die dabei am häufigsten verwendeten Lipide werden aus biologischen Materialien isoliert oder sind synthetischer Natur. Die Triebkraft der Selbstaggregation unpolarer Moleküle zu Membranen im wässrigen Medium bildet der hydrophobe Effekt (Tanford, 1980).

1.2 Hydrophober Effekt

Das Bestreben der Selbstaggregation der unpolaren Stoffe in Wasser zu größeren Aggregaten wird als hydrophober Effekt bezeichnet, wobei der Zusammenhalt der Moleküle nicht chemischer, sondern physikalischer Natur ist. Die geringe Löslichkeit unpolarer Substanzen in Wasser ist lange Zeit auf abstoßende Wechselwirkungen zwischen dem polaren Wasser und den unpolaren Substanzen bzw. auf attraktive Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Substanzen zurückgeführt worden. Es stellte sich aber heraus, daß die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Molekülteilchen nur eine untergeordnete Rolle bei der Erklärung des hydrophoben Effektes spielen. Tatsächlich ist der ungünstige Entropieverlust beim Lösungsvorgang für die Selbstassoziation der unpolaren Substanz verantwortlich. Die Modellvorstellung vergleicht das Einbringen des unpolaren Moleküls mit einer Hohlraumbildung in der Wasserstruktur. Die Wasserstruktur wird an dieser Stelle aufgebrochen und führt zu einer Neu- und Umorientierung der Wassermoleküle, wobei möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Wassermoleküle, die auf der Hohlraumoberfläche liegen, bilden im Vergleich zu Wassermolekülen im Inneren der Wasserstruktur weniger Wasserstoffbrückenbindungen aus, sind aber durch ihre exponierte Lage stärker geordnet als vor dem Einbringen des unpolaren Stoffes.

Die Erhöhung des Ordnungsgrades ist mit einer ungünstigen Entropieabnahme gleichzusetzen.

Die Assoziation unpolarer Stoffe im polaren Medium zu Aggregaten ist auf das Bestreben zurückzuführen, die Kontaktflächen zwischen polaren und unpolaren Molekülen so klein wie möglich zu halten. Damit wird versucht, den Entropieverlust bei Raumtemperatur zu minimieren. Bei Raumtemperatur ist der Entropieterm $T\Delta S$ dominant und wird mit steigender Temperatur betragsmäßig immer geringer. Bei höheren Temperaturen gewinnt der Enthalpieterm an Bedeutung und die treibenden Kräfte sind die sogenannten London-Dispersionswechselwirkungen zwischen den unpolaren Molekülen.

1.3 Phospholipide

Phospholipide sind amphiphile Substanzen, d.h. die Moleküle besitzen polare, hydrophile als auch unpolare, hydrophobe Strukturbereiche. Die wichtigsten in Membranen vorkommenden Lipide können in drei Hauptklassen unterteilt werden: Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin. Die dominierende Lipidfraktion bilden die Phospholipide. Sie weisen ein breites Spektrum an strukturellen Möglichkeiten auf.

Allen Phospholipiden gemeinsam ist das Glycerinrundgerüst, das in der Regel in *sn*-1- und *sn*-2-Position mit hydrophoben Kohlenwasserstoffketten (Fettsäuren) verestert ist. An der dritten Position ist eine hydrophile Kopfgruppe (kurzkettiger, phosphorylierter Alkohol) ankondensiert. Die Fettsäureketten variieren in Länge, Verzweigung und Sättigungsgrad.

Die meisten in der Natur vorkommenden Fettsäuren sind in der Regel mit 2 unterschiedlichen Fettsäuren verestert. Sie enthalten fast alle geradzahlige Kohlenstoffketten mit 12 bis 24 Kohlenstoffatomen, die Doppelbindungen besitzen *cis*-Konformation und werden bevorzugt an der *sn*-2-Position des Glycerinrundgerüsts verestert.

Die Klassifizierung der Phospholipide erfolgt nach ihrer Kopfgruppenstruktur.

In Abbildung 1.2 sind die wichtigsten Vertreter dargestellt.

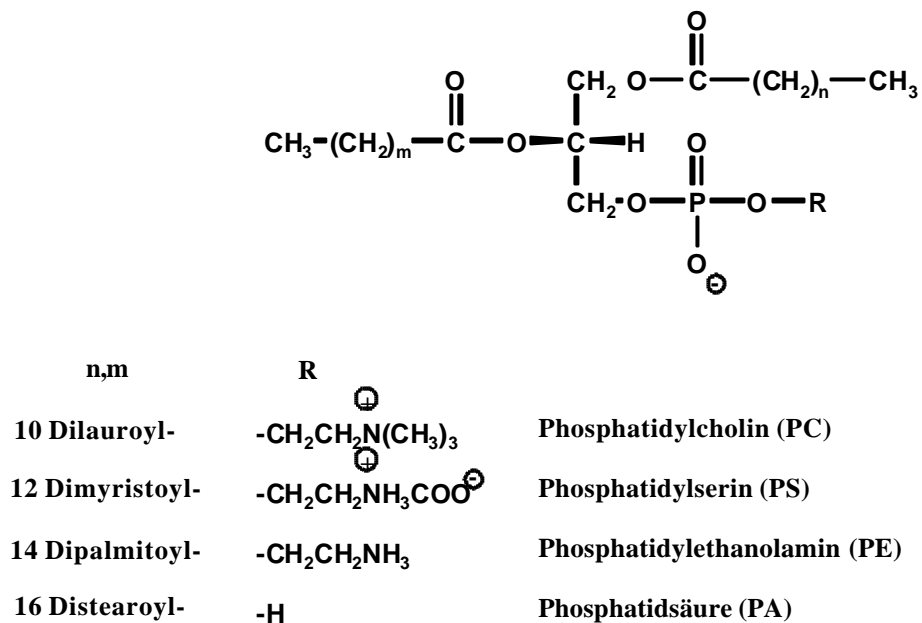


Abbildung 1.2: Strukturen von Phospholipiden.

Wie erstmals von Bangham et al. (1965) gezeigt wurde, entstehen beim Dispergieren reiner Lipide oder Lipidgemische in Wasser spontan geschlossen sphärische oder planare Strukturen aus Doppelschichten.

Die Phospholipidmoleküle ordnen sich in diesen Doppelschichten so an, daß die polaren Kopfgruppen die Grenzfläche zwischen dem hydrophoben Teil (Fettsäure) und der wässrigen Phase bilden, wobei die vom polaren Medium abgegrenzten Acylketten eine eigene apolare Phase ausbilden.

Abbildung 1.3 zeigt den Aufbau von Vesikeln mit unterschiedlicher Größe und Lamellari-
tät, die durch Dispergieren bzw. Beschallen von Lipiden in Wasser entstehen können. Die
bimolekulare Schichtdicke beträgt ca. 5 nm.

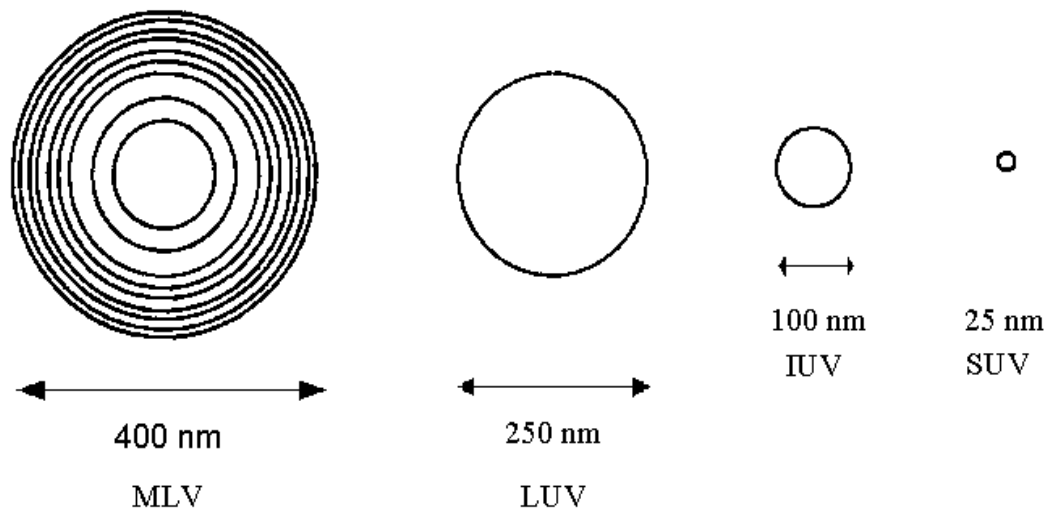


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von Vesikeln mit unterschiedlicher Größe.

MLV: multilamellares Vesikel

LUV: großes unilamellares Vesikel

IUV: mittleres unilamellares Vesikel

SUV: kleines unilamellares Vesikel.

Phosphatidylcholine bilden bei einem Wassergehalt zwischen 5 und 25% lyotrope, lamellare Phasen aus gestapelten Doppelschichten aus. Bei höherem Wassergehalt (>95Gew.%) entstehen multilamellare Vesikel MLV (Abbildung 1.3), die durch Beschallung in unilamellare Vesikel LUV überführt werden können (Huang, 1966). Diese multi- oder unilamellaren Vesikel schließen ein wässriges Kompartiment ein und werden als Modelle für biologische Membranen benutzt.

Neben diesen, den sogenannten lamellaren Phasen, können sich auch noch andere, wie zum Beispiel mizellare, kubische oder hexagonale Phasen bilden (Abbildung 1.4). So bilden die Phosphatidylethanolamine und Phosphatidsäuren bei bestimmten Wassergehalten invertierte hexagonale Phasen (H_{II} -Phase) aus. Eine normale hexagonale Phase (H_I -Phase) wird bei den in Abbildung 1.2 vorgestellten Phospholipiden nicht beobachtet.

Die unterschiedlichen Phasen können durch Variation des Wassergehaltes zum Teil ineinander überführt werden (lyotroper Mesomorphismus). Das Phasenverhalten von Phospholipiden wird eingehend von Seddon und Cevc (1993) bzw. Cevc und Marsh (1987) behandelt.

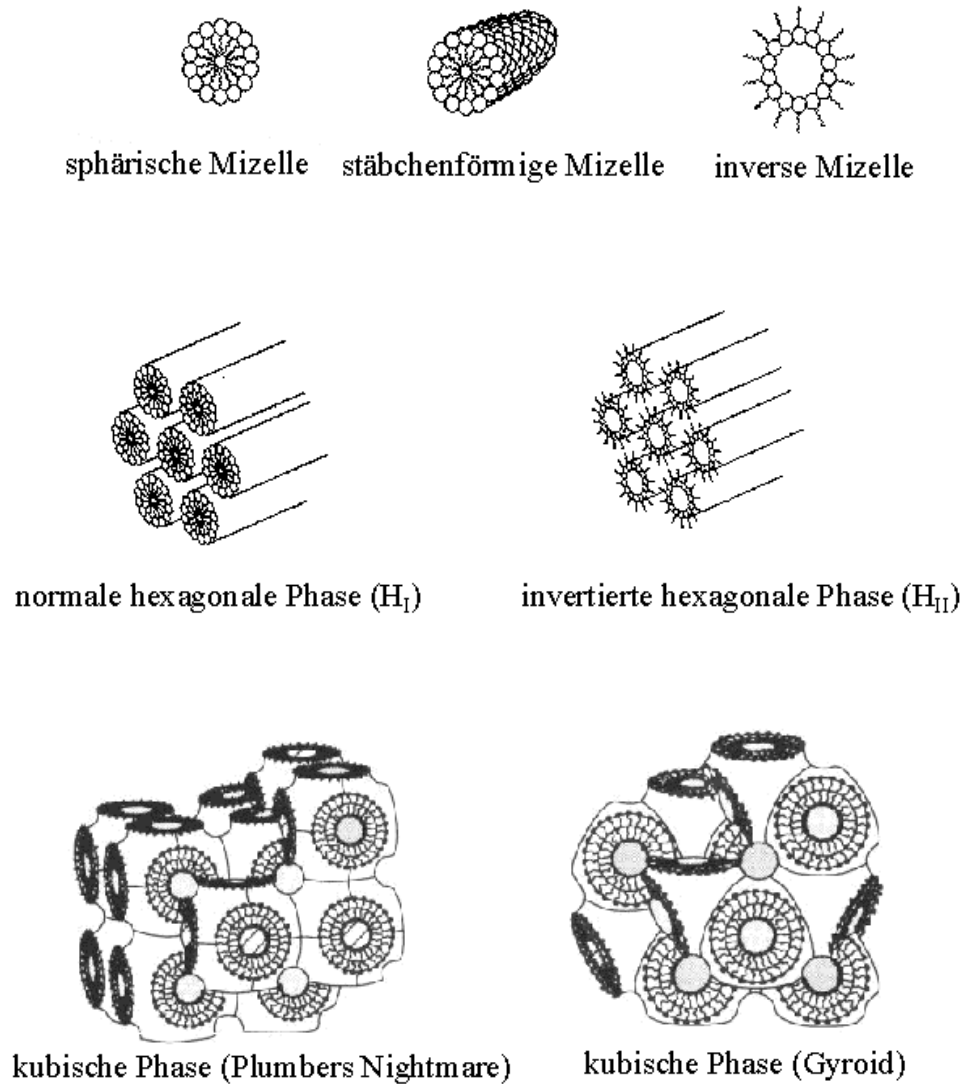


Abbildung 1.4: **Obere Reihe:** **verschiedene Formen von Mizellen.**
Mittlere Reihe: **hexagonale Phasen (H_I und H_{II}).**
Untere Reihe: **kubische Phasen.**

Neben der Abhängigkeit vom Wassergehalt (lyotroper Polymorphismus) zeichnen sich Phospholipide auch noch durch verschiedene, durch Temperaturveränderung erzeugbare Phasen (thermotroper Polymorphismus) aus. Chapman et al. (1967) konnten mittels Diffe-

rentialkalorimetrie an hydratisierten Doppelschichten nachweisen, daß bei Phospholipiden bei Temperaturänderungen reversible und kooperative Übergänge von verschiedenen Phasen der Lipiddoppelschicht stattfinden. Dabei wurden Übergänge von quasikristallinen Gelphasen (L_{β} -Phasen) in flüssig-kristalline Phasen (L_{α} -Phasen) beobachtet. In der L_{α} -Phase besitzen die Kohlenwasserstoffketten eine wesentlich höhere Beweglichkeit.

Mittels kalorimetrischer Messungen (Chapman et al., 1967) und Kristallstrukturanalysen (Luzatti, 1968) wurden bei Phosphatidylcholinen drei thermotrope Phasenübergänge beobachtet. Bei einem Wassergehalt von mehr als 30 Gew% sind diese Umwandlungstemperaturen konstant. Die Phasenumwandlungstemperatur hängt sowohl von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Acylketten (je kürzer die Kohlenwasserstoffketten sind und je mehr Doppelbindungen sie enthalten, desto tiefer liegt die Umwandlungstemperatur), als auch von den Wechselwirkungen im Kopfgruppenbereich ab. Bei geladenen Phospholipiden spielen Ionenstärke als auch der pH-Wert eine Rolle. Durch Mischen von Lipiden mit verschieden langen Kohlenwasserstoffketten und unterschiedlichen Kopfgruppen lassen sich Modellmembranen mit beliebigen Umwandlungstemperaturen herstellen.

In der Gelphase ordnen sich die Acylketten in einer quasihexagonalen Struktur an und liegen in einer all-trans-Konformation vor. Je nach Phospholipid sind diese zur Membranoberfläche hin geneigt (PC und PG) und nehmen einen bestimmten Winkel ein oder stehen senkrecht zur Membrannormalen (PE).

Bei Phosphatidylcholin sind die Ketten um ca. 35° gegen die Membranoberfläche geneigt, es liegt bei tieferen Temperaturen eine L_{β} -Phase vor (in der Nomenklatur wird die Abwinkelung der Acylketten durch das Apostroph am tiefgestellten Index berücksichtigt). Oberhalb der Vorumwandlungstemperatur T_v gelangt man zur P_{β} -Phase, für die eine „Ripple“-Struktur mit periodischer Wellung der Oberfläche und definierter Amplitude charakteristisch ist (Janiak et al., 1976). Die Acylketten sind hier hexagonal gepackt. Der Hauptphasenübergang von der Gelphase P_{β} in die flüssig-kristalline L_{α} -Phase findet bei der Temperatur T_m statt. Dieser wird durch einen sprunghaften Anstieg von gauche Isomeren begleitet, wodurch die Mobilität der Acylketten erhöht wird.

Beim Phasenübergang expandiert die Lipiddoppelschicht lateral, was mit einer Erhöhung des Volumenbedarfs einer gauche-trans-gauche-Kinke erklärt werden kann. Dabei nimmt die Dicke der hydrophoben Schicht ab und es entstehen freie Volumina in der Membran. Solch freies Volumen ist für den Einbau von Fremdmolekülen in die Lipiddoppelschicht sehr bedeutsam.

Mit zunehmender Temperatur nimmt die Häufigkeit solcher Defektstellen zu. Die Zahl der gebundenen Wassermoleküle pro Lipidmolekül steigt bei der Phasenumwandlung an (McIntosh und Simon, 1986).

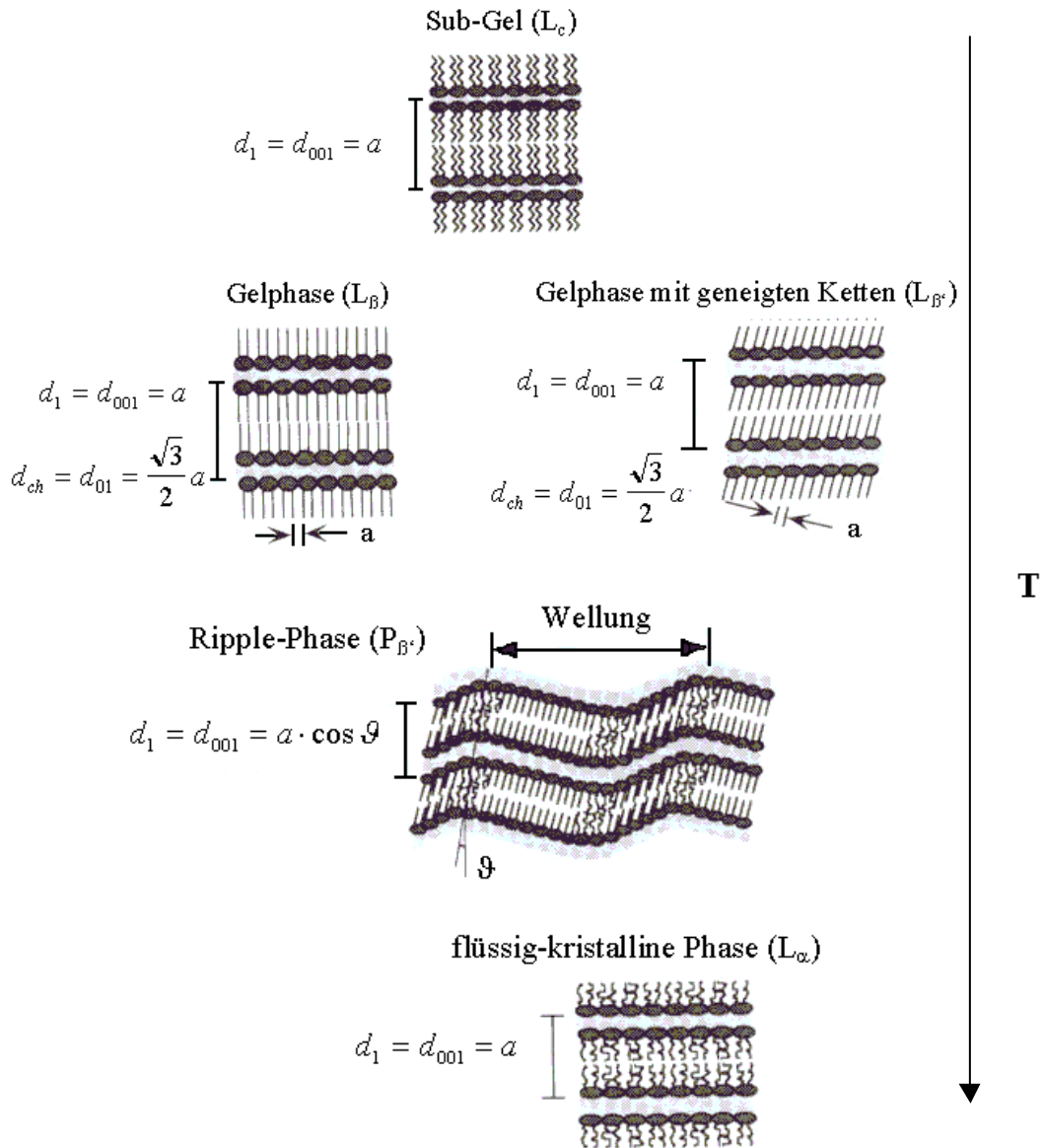


Abbildung 1.5: Mögliche lamellare Phasen von Phospholipiden, ihre Nomenklatur und die Beziehung zu Abständen in Diffraktogrammen (Caffrey und Cheng, 1995).

Einige Phospholipidsysteme bilden bei längerem Aufbewahren bei niedrigen Temperaturen eine kristalline Phase (L_c bzw. L_c') aus (Lewis und McElhaney, 1993). Der Unterschied zur Gelphase liegt in einer dichteren Packung der Acylketten, es wird eine orthorhombische Subzelle gebildet.

2. Problemstellung

Die Eigenschaften von biologischen Membranen sind in den letzten Jahrzehnten systematisch untersucht worden. Gegenstand intensiver Forschung wurde vor allem das Permeationsverhalten von kleinen Molekülen durch Modellmembranen. Besonders großes Interesse bestand darin, zu klären, wie diese Moleküle die Membran durchqueren. Es ist bekannt, daß Wasser und Protonen sehr viel schneller durch Lipidmembranen permeieren können als Ionen (Nozaki und Tanford, 1981) oder andere kleine polare Moleküle (Chakrabarti und Deamer, 1992). Desweiteren wurde festgestellt, daß die Ladung und Größe der Ionen einen starken Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit ausübt (Paula et al., 1998). Im Bereich der Phasenumwandlung konnte bei Ionenpermeabilitätsmessungen ein Maximum beobachtet werden (Antonov et al., 1980). Diese Phänomene legen die Vermutung nahe, daß es unterschiedliche Permeationsvorgänge gibt, mit deren Hilfe die Teilchen durch die Lipiddoppelschicht gelangen können.

Um das Permeationsverhalten von Wasser zu klären, wurden systematische Untersuchungen der osmotischen und der diffusionskontrollierten Wasserpermeation an Phospholipidgemischen durchgeführt. Dabei wurde auch die Permeationsgeschwindigkeit im Phasenumwandlungsbereich untersucht. Die diffusionskontrollierte Wasserpermeation wird mit Hilfe des $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschverfahrens gemessen. Auf Grund des geringfügig unterschiedlichen Brechungsindex von H_2O und D_2O ergeben sich Änderungen der Lichtstreuintensität. Bei osmotischen Messungen erzeugt man einen Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extravasikulärem Raum. Durch einströmendes bzw. ausströmendes Wasser (abhängig von Präparation) vergrößern bzw. verkleinern die Vesikel ihr Volumen und der Brechungsindex im Vesikel verändert sich, was durch eine Änderung der Lichtstreuintensität der Probe beobachtet werden kann.

Um den Einfluß des Konzentrationsgradienten auf die Permeation näher zu untersuchen, wurden osmotische Messungen mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen durchgeführt.

Zur Aufklärung des Permeationsverhaltens von kleinen Molekülen wurden Messungen der diffusionskontrollierten Permeation von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht vorgenommen.

Desweiteren war von Interesse, ob die Detergenzkonzentration einen meßbaren Einfluß auf die Permeationseigenschaften der Moleküle ausübt. Es ist bekannt, daß sich die physikalischen Eigenschaften der Membran durch den Einbau von Detergens in die Lipiddoppelschicht ändern.

Mit Hilfe der gewonnen Daten sind Rückschlüsse auf den Mechanismus der Permeation von kleinen Molekülen durch biologische Membranen möglich.

Die kinetischen Messungen erfolgten in einer Stopped-Flow-Meßapparatur, wobei die entstandenen Vesikel sowohl vor als auch nach dem Experiment auf ihre Größe hin untersucht wurden. Bei der Stopped-Flow-Methode muß gewährleistet sein, daß es sich bei den Vesikeldispersionen um unilamellare Vesikel handelt.

3. Modelle zur Beschreibung der Permeation von Molekülen durch Lipidmembranen

Die Kenntnis der Transportmechanismen von polaren und unpolaren Molekülen durch biologische Membranen ist notwendig für das Verständnis von vielen biologischen Vorgängen (Finkelstein, 1987). Unpolare Moleküle gehorchen mehr oder weniger der von Overton (1895) gefundenen Gesetzmäßigkeit, daß die Permeabilitätskoeffizienten proportional zu ihren Verteilungskoeffizienten zwischen unpolaren Lösungsmitteln (langkettige Kohlenwasserstoffe) und Wasser sind (Finkelstein, 1987; Overton, 1895). Dennoch zeigen einige kleine Moleküle ein Permeationsverhalten, das nicht mit der Regel von Overton erklärt werden kann. Walter und Gutknecht (1986) vermuteten deshalb, daß die Membranbarriere ein Verhalten aufweist, das mehr einem 'soft-polymer' entspricht als einem langkettigen Kohlenwasserstoff.

Eine andere mögliche Erklärung der hohen Permeabilität von kleinen Molekülen (insbesondere von Wasser) durch die Lipiddoppelschicht ist, daß die Permeation auf zwei unterschiedlichen Wegen durch die Membran erfolgt: Zum einen durch transiente Poren in der Lipiddoppelschicht (Weaver et al., 1984) und zum anderen durch thermisch fluktuierende Defekte bzw. laterale Dichtefluktuationen in der Membran (Deamer and Bramhall, 1986; Lawaczeck, 1988; Jansen und Blume, 1995). Bei $T > T_m$ könnten die Membrandefekte eine große Auswirkung auf das Permeationsverhalten haben. Nagle und Scott (1978) sahen eine Verbindung zwischen der temperaturabhängigen Permeationsrate von Molekülen und dem lateralen Lipidabstand. Da bei T_m die laterale Kompressibilität am größten ist, müßte dies zu einem Permeationsmaximum führen.

Der Permeationsmechanismus von kleinen polaren Molekülen scheint nicht genau erklärt werden zu können. Eine besonders hohe Permeabilität von kleinen Molekülen im Phasenumwandlungsbereich deutet auf eine Permeation durch Domänengrenzen zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase hin (Tsong et al., 1977; Kanehisa und Tsong, 1978).

Mittlerweile gibt es zahlreiche Modellvorstellungen zur Permeation von Molekülen durch die Lipiddoppelschicht, wobei drei besonders in der Literatur diskutiert werden:

- das Löslichkeitsdiffusionsmodell,
- das Freie-Volumen-Modell und
- der Transport durch makroskopische Poren und "Single-File" Poren bzw. thermisch induzierte Membrandefekte.

Diese drei Modelle basieren auf unterschiedlichen Vorstellungen, mit denen eine Lipiddoppelschicht beschrieben werden kann. Beim Löslichkeitsdiffusionsmodell wird die Lipiddoppelschicht als Öl- oder Wachsschicht betrachtet wodurch die Löslichkeit des permeierenden Stoffes im hydrophoben Bereich entscheidend ist. Neuere Untersuchungen mit Hilfe der Molekulardynamik Simulation teilen die Lipiddoppelschicht in vier Regionen auf, das sogenannte "Vier-Regionen-Modell" (Marrink und Berendsen, 1994; Tieleman et al., 1997).

Die Permeabilität beim Diffusionsmodell (Freies-Volumen-Modell) von Xiang und Anderson (1993, 1997, 1998), hängt besonders von der Ordnung der Acylketten und der hieraus entstehenden freien Volumina zwischen den Lipidmolekülen ab.

Beim Porenmodell wird die Permeabilität durch die Anzahl und Größe der Poren und der Defektstellen bestimmt.

3.1 Permeationsmodelle

3.1.1 Löslichkeitsdiffusionsmodell

Das Modell geht von einer Membran in Form einer homogenen Lipiddoppelschicht aus, welche die Eigenschaften einer Öl- oder Wachsschicht besitzt, in der Wasser und andere kleine Moleküle nur in sehr geringen Mengen löslich sind. Die Konzentration der Moleküle in der Lipiddoppelschicht ist so gering, daß während des Permeationsvorgangs keine Moleküle in der Membran aufeinander treffen.

Die Löslichkeit von kleinen Molekülen in der Doppelschicht kann mit dem Verteilungskoeffizienten K_p der Moleküle zwischen Wasser und apolaren langkettigen Kohlenwasserstoffen verglichen werden (Walter und Gutknecht, 1986) (Gleichung 3-1).

Als langkettiger Kohlenwasserstoff wird häufig n-Hexadecan verwendet.

$$K_p = \frac{X_w(\text{Ölphase})}{X_w(\text{Wasserphase})} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

K_p ist der Verteilungskoeffizient von kleinen Molekülen zwischen Wasser und dem langkettigen Kohlenwasserstoff n-Hexadecan. Der Verteilungskoeffizient für Wasser beträgt $K_p = 4,2 \cdot 10^{-5}$ (Finkelstein, 1976a).

Nach dem Löslichkeitsdiffusionsmodell werden die osmotische und die diffusive Permeation als reine Diffusionsvorgänge aufgefaßt (Finkelstein, 1987). Geht man vom Fick'schen Diffusionsgesetz aus, erhält man identische Ergebnisse für den osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f und den diffusiven Permeabilitätskoeffizienten P_d (Gleichung 3-2).

$$P_d = P_f = \frac{D_w \cdot K_w \cdot V_w}{d \cdot V_{\text{Lipid}}} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

D_w = Diffusionskoeffizient von Wasser im hydrophoben Teil der Doppelschicht; K_w = Verteilungskoeffizient von Wasser (Molekül) zwischen dem hydrophoben Teil der Membran und der Wasserphase; V_w = Molvolumen von Wasser; d = Dicke der Lipiddoppelschicht; V_{Lipid} = Molvolumen der Lipidphase.

Die Dicke der Lipiddoppelschicht ($d \approx 4 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$ cm) ist für verschiedene Lipidsysteme annähernd konstant (Fettiplace et al., 1980). Dadurch wird der Permeabilitätskoeffizient P_d und P_f direkt proportional abhängig von $D_w \cdot K_w$ (Benz und Zimmermann, 1981). Finkelstein (1987) zeigte, daß der Diffusionskoeffizient eines Moleküls nahezu umgekehrt proportional der dritten Wurzel seines Molekulargewichtes ist. Daraus folgt, daß sich der Diffusionskoeffizient von Wasser in verschiedenen Lipiddoppelschichten nur geringfügig unterscheiden sollte. Änderungen von P_d und P_f sind daher einer Größenänderung von K_w proportional.

Das Ergebnis $P_f/P_d = 1$ aus Gleichung (3-2) bedeutet, daß die Wasserpermeation durch Lipiddoppelschichten unabhängig von einem durch ein nicht permeierendes Molekül erzeugten Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extravasikulärem Medium ist und

die Wassermoleküle im hydrophoben Bereich der Doppelschicht keine kooperativen Bewegungen ausführen können.

Der Diffusionsvorgang eines Moleküls durch eine Lipiddoppelschicht läßt sich in drei Teilprozesse unterteilen.

- a) Übergang der Moleküle von der wässrigen in die Lipidphase („Lösen der Moleküle im hydrophoben Teil des Bilayers“).
- b) Diffusion durch den hydrophoben Abschnitt der Membran.
- c) Übergang der Moleküle aus der Lipidphase in das wässrige Medium.

Wie Abbildung 3.1 verdeutlichen soll, vollzieht das Molekül während der Diffusion durch die Lipiddoppelschicht Potentialsprünge, welche jeweils in einem Energieminimum enden. Lieb und Stein (1969) brachten die Vorstellung ein, daß es sich bei den Potentialmulden dieses Modells um freie Volumina zwischen den Acylketten der Fettsäuren handelt. 1971 entwickelte Träuble das Konzept der 'Kinks', wobei es sich um mobile trans/gauche-Isomerisierungen handelt, welche sich entlang der Acylketten fortpflanzen. Deren Existenz konnte von Seelig und Seelig (1974) experimentell nachgewiesen werden. In diesen "hydrophoben Taschen" findet dann der diffusive Transport statt.

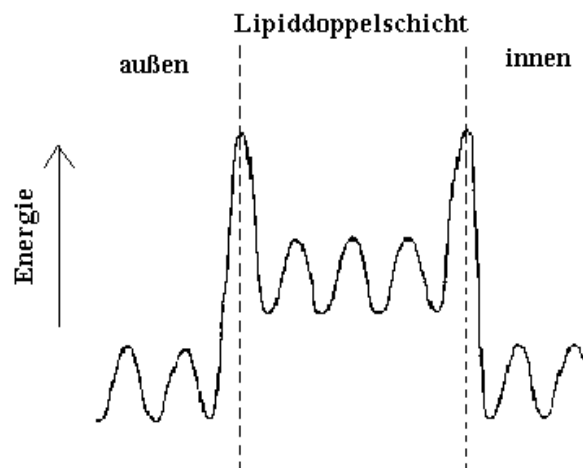


Abbildung 3.1: Hypothetisches Energieschema des Diffusionsvorganges im Rahmen des Löslichkeitsdiffusionsmodells.

Enthalten die Lipide ungesättigte Fettsäureketten, so wird das Voranschreiten der 'Kinken' an den C-C-Doppelbindungen blockiert. Die Kinkenbildung wird unterdrückt durch Temperaturerniedrigung unterhalb T_m .

3.1.2 Das Vier-Regionen-Modell einer Lipiddoppelschicht

Dieses Modell basiert auf einer Molekulardynamik-Simulation der Wasser-Phospholipid-doppelschichten. Das ursprünglich in der Literatur oft beschriebene zwei Phasen-Modell (Löslichkeitsdiffusionsmodell) schien als nicht geeignet, den Permeationsprozeß zu erklären (Marrink und Berendsen, 1994). Deshalb scheint es besser, den Permeationsvorgang der Moleküle durch die Membranstruktur mit Hilfe des "Vier-Regionen-Modells" zu beschreiben, welches die ganze Inhomogenität der Membran berücksichtigt. Dieses Modell splittet die Membran in vier Regionen auf, wobei jede ihre eigene spezielle Charakteristik besitzt. Die ersten beiden Regionen gehören zur Schnittstelle der Lipidmembran mit dem wässrigen Medium und die beiden anderen beschreiben das Innere der Membran.

Abbildung 3.2 gibt einen schematischen Überblick über die Struktur von DPPC im Zusammenhang mit dem vier Regionen Modell (Tielemann et al., 1997).

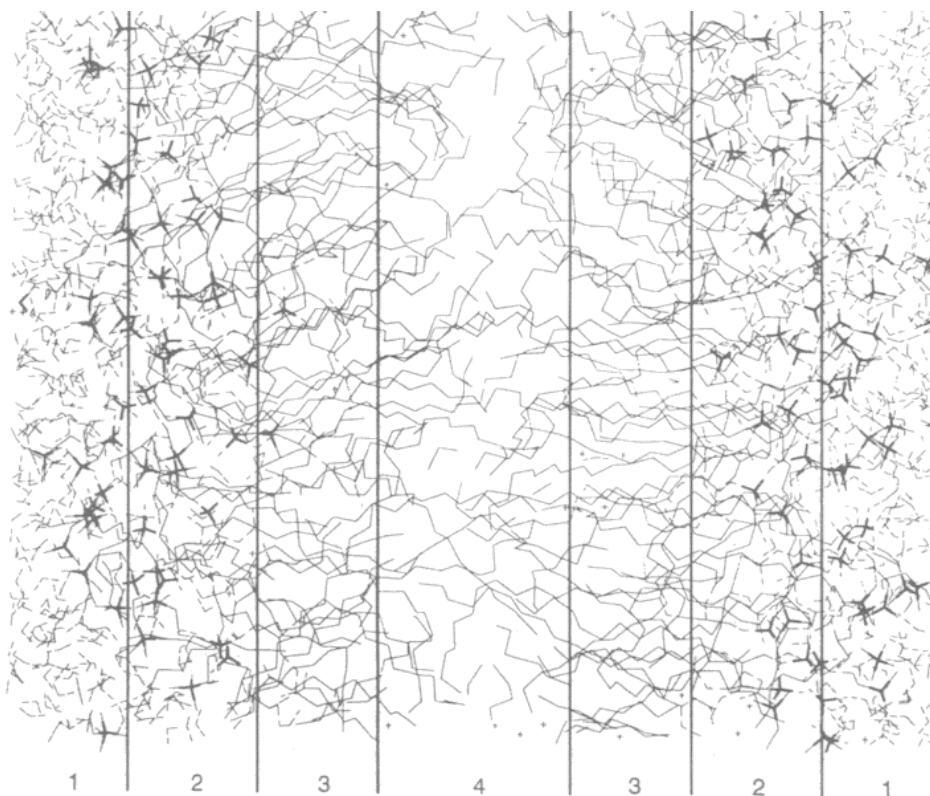


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Struktur der Doppelschicht mit Hilfe des "Vier-Regionen-Modells" (Tielemann et al., 1997).

In Abbildung 3.2 ist die graphische Repräsentation und die exakte Lage der vier Regionen dargestellt.

Nachfolgend wird der schematische Aufbau und die Eigenschaften der einzelnen Regionen aufgezeigt.

Region 1: Geringe Kopfgruppendichte;

Die erste Region findet ihren Anfang da, wo die Wassermoleküle die Anwesenheit der Kopfgruppe spüren und reicht bis dorthin, wo Lipiddichte und Wasserdichte vergleichbar sind. Diese Region ist wahrscheinlich die Bedeutendste in Bezug auf Wechselbeziehungen mit anderen Membranen oder Proteinen. Auf den Permeationsprozeß hat sie aber kaum einen Einfluß.

Region 2: Hohe Kopfgruppendichte;

Die zweite Region ist ungefähr 0,7-0,8 nm dick. Die Anzahl der Wassermoleküle geht gegen Null und die Lipiddichte erreicht ihr Maximum. Diese Region besitzt die größte Dichte in dem System, da alle Kopfgruppenatome und Teile der Methylengruppen der Acylketten sich in ihr aufhalten. Alle vorhandenen Wassermoleküle in dieser Region sind Teile der Hydratationsschale der Kopfgruppen der Phospholipide. Der Diffusionskoeffizient von Wasser und anderen kleinen Molekülen, sowie das freie Volumen sind in diesem Teil am kleinsten.

Region 3: Hohe Acylkettendichte;

Diese Region wird auch oft als "Soft-Polymer" bezeichnet.

Sie ist charakterisiert durch eine hohe Dichte der Acylketten und ist ca. 0,8 nm breit. Sie besteht aus geordneten Ketten und wird oft in ihrer Eigenschaft und Dichte mit einem Polymer verglichen. Die Region startet bei den Carbonylgruppen und endet, wo die Acylketten eine Dichte erreichen, die vergleichbar mit flüssigem Hexadecan ist. Es sind keine Wassermoleküle in dieser Region mehr vorhanden. Sie stellt die Hauptbarriere für die Permeation von Wasser und kleinen Molekülen dar.

Region 4: Geringe Acylkettendichte;

In dieser Region ist die Dichte der Acylketten sehr viel geringer als in Region 3. Die Kohlenwasserstoffketten weisen eine hohe Unordnung auf, was zur Bildung von freien Volumina führt, in die sich Wassermoleküle einlagern können. Der Diffusionsprozeß ist charakterisierbar wie in einer Flüssigkeit mit geringer Viskosität. Deshalb ist in dieser Region

die Diffusion von Wassermolekülen und anderen kleinen Molekülen schneller als in Region 3.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß Region 1 anscheinend für die Wechselbeziehung zwischen Membran und Wassermolekülen verantwortlich ist und daß Region 3 die Permeation von Molekülen durch die Phospholipidmembran am stärksten beeinflusst.

3.1.3 Freies-Volumen-Modell

Die Dichte der Defekte der CH_2 -Kette bestimmt die Ordnung der Lipidschicht. Der einfachste Defekt ist die in Abbildung 3.3 dargestellte *gtg*-Kinke. Dabei befinden sich zwei benachbarte CH_2 -Gruppen in einer *gauche*-Konfiguration. Dies hat zur Folge, daß die an die Kinke anschließenden Kettenteile gegeneinander parallel verschoben sind und sich dadurch die Gesamtlänge der Kette um $1,3 \text{ \AA}$ verkürzt.

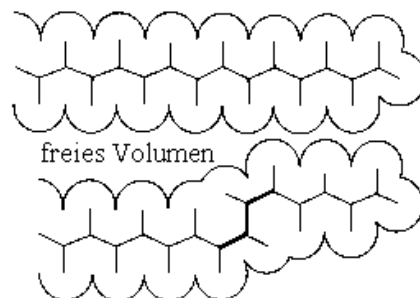


Abbildung 3.3: Modell einer gauche-trans-gauche-Kinke gegenüber einer Acylkette in all-trans Konformation. Die gewellte Kurve gibt die Van-der-Waals-Radien der Wasserstoffatome an und legt das freie Volumen fest.

Im Gegensatz zur Gelphase sind in der flüssig-kristallinen Phase natürlich höhere Defekte möglich. Insbesondere gilt dies für Bereiche im Zentrum der Membran, wo der Ordnungsgrad stark abnimmt.

Als wichtige Konsequenz der Defekte gilt die Bildung freien Volumens, das essentiell für den Einbau von Fremdmolekülen ist. Die Defekte zeichnen sich durch eine hohe Beweglichkeit aus. Ihre Sprungfrequenz, d.h. die Geschwindigkeit mit der sich eine Kinke längs

der Kette bewegen kann, liegt bei einer Temperatur von 300 K bei $v = 10^{11} \text{ s}^{-1}$ was einem Diffusionskoeffizienten von $D \approx 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ entspricht. Diese enorme Beweglichkeit der Kette bestimmt die Geschwindigkeit des Transports von Molekülen innerhalb der Membran.

Auf Basis des freien Volumenmodells der Diffusion von Cohen und Turnball (1969) läßt sich die Brown'sche Bewegung in fluiden Membranen deuten. Der elementare Prozeß ist die Schaffung des freien Volumens in der Lipiddoppelschicht durch laterale Dichteschwankungen. Dabei spielt die laterale Kompressibilität κ der Lipidschicht eine bedeutende Rolle. Das diffundierende Molekül springt dann von seinem Platz in die entstehende Lücke (freies Volumen), falls deren Volumen eine ausreichende Größe v_k besitzt. Das Zurückspringen in die ursprüngliche Position wird durch Besetzung derselben durch Lösungsmittelmoleküle verhindert. Die Sprungfrequenz des diffundierenden Moleküls wird durch zwei Faktoren bestimmt:

- 1) Durch die gaskinetische Geschwindigkeit des Teilchens in seinem Lösungsmittelkäfig.
- 2) Durch die mittlere Zeit, die zur Schaffung eines freien Volumens der Größe v_k notwendig ist.

Die mittlere freie Fläche pro Molekül ist für amphiphatische Moleküle, die im polaren Bereich der Membran verankert sind, als freies Volumen zu betrachten. Das freie Volumenmodell führt zu einer exponentiellen Temperaturabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten. Die Erzeugung freien Volumens ist durch die Beweglichkeit der Kettendefekte entlang der Acylketten bestimmt. Diese Defekt-Diffusion ist daher auch die treibende Kraft der lateralen Beweglichkeit.

Das freie Volumenmodell erlaubt nun, Beziehungen zwischen Transporteigenschaften der Membran und seinen thermodynamischen Eigenschaften herzustellen. Wird die laterale Beweglichkeit in den Lipidschichten reduziert, so hat dies eine Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit zur Folge.

Xiang und Anderson (1998) untersuchten mit Hilfe der Kombination von NMR-Messungen und Dynamischer Lichtstreuung den Einfluß der Packung der Lipidmoleküle und der Form des penetrierenden Teilchens auf die Permeabilität der Lipiddoppelschicht. Um der Ordnung der Kettenmoleküle Rechnung zu tragen, führten sie einen Korrekturfaktor $f = P_m/P_o$ ein, der sich aus dem Quotienten der Abweichung des gemessenen Permeabilitätskoeffizienten P_m und dem mit Hilfe des Löslichkeitsdiffusionsmodells vorher-

gesagten Permeabilitätskoeffizienten P_0 berechnen läßt, um die Abnahme der Permeabilitätskoeffizienten wegen der Acylkettenordnung zu erklären. Desweiteren schlugen sie vor, daß die Permeation der Moleküle mit ihrer langen Hauptachse entlang der Membrannormalen verläuft. Dabei kommt es hauptsächlich auf das Verhältnis von Querschnittsfläche des penetrierenden Teilchens und der mittleren freien Oberfläche der Membran an. Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Darstellung des Effekts von freier Oberfläche der Lipidmembran der Permeation zweier penetrierender Teilchen mit dem selben Molekularvolumen aber unterschiedlicher Querschnittsfläche.

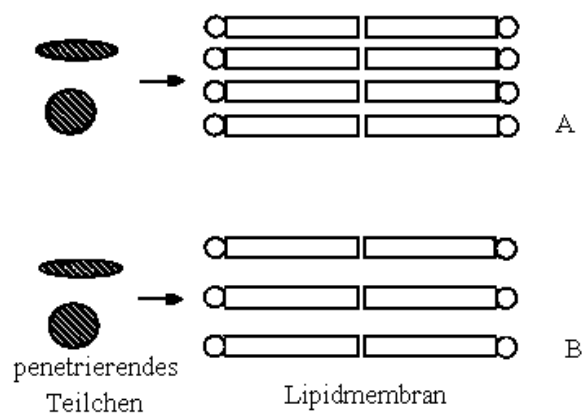


Abbildung 3.4: A) geringe “freie Oberfläche der Lipidschicht“,
B) größere “freie Oberfläche der Lipidschicht“,
(aus Xiang und Anderson (1998)).

Desweiteren fanden sie heraus, daß die Permeationsgeschwindigkeit der Moleküle stärker von ihrer molekularen Querschnittsfläche als vom Molekularvolumen abhängt.

3.1.4 Porenmodell

Die sogenannten Poren können durch hydrophobe und hydrophile Kanäle gebildet werden, welche die Lipiddoppelschicht durchspannen. Abbildung 3.5 gibt ein mögliches Energieprofil für die Diffusion der Wassermoleküle durch diese Poren wieder.

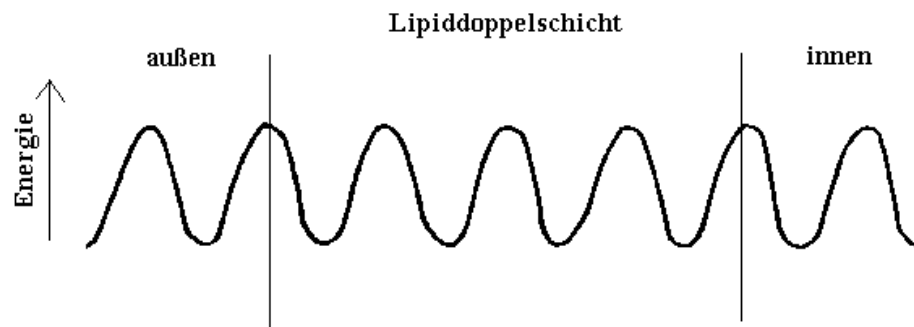


Abbildung 3.5: Hypothetisches Energieprofil des Diffusionsvorganges im Rahmen des Porenmodells einer makroskopischen Pore.

Sháafi (1981) fand heraus, daß das Verhältnis von P_f/P_d für die Wasserpermeation durch biologische Membranen meist Werte größer drei annimmt. Für Lipidmembranen, die große, voluminöse Moleküle enthalten (Nystatin, Amphotericin B oder Gramicidin A), fand man für das Verhältnis P_f/P_d Werte um fünf (Rosenberg und Finkelstein, 1978; Holz und Finkelstein, 1970). Membranen mit einem hohen Proteingehalt zeigen auch gegenüber Molekülen eine erhöhte Permeabilität. Das Vorhandensein solcher voluminöser Moleküle bzw. Proteine in der Lipiddoppelschicht erhöht nicht nur die Wasserpermeabilität, sondern auch die Permeationsgeschwindigkeit von Ionen und kleinen Molekülen (Läuger, 1985).

Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, daß ein Transport von kleinen Molekülen auch über einen Porenmechanismus ablaufen könnte. Für biologische Membranen wurde ein Transport durch makroskopische Poren angenommen, die von den Molekülen Nystatin, Amphotericin B oder Gramicidin A gebildet werden können. Finkelstein (1987) berechnete für Nystatin und Amphotericin B den Radius einer makroskopischen Pore mit 0,4 nm, für Gramicidin A erhielt er einen Radius von 0,2 nm.

Longuet-Higgins und Austin (1966) berechneten unter Berücksichtigung des Selbstdiffusionskoeffizienten von Wasser einen Porenradius von 0,45 nm für hydrophile Kanäle, welche durch die Doppelschicht hindurchreichen. Die Wasserpermeation durch solch große Poren, in denen Wasser seine kollektiven Eigenschaften beibehält, sollte eine ähnlich hohe

Aktivierungsenergie erfordern, wie sie von Sháafi (1981) für die Selbstdiffusion von Wasser ermittelt wurde (20 kJ/mol).

Bei den hier untersuchten Lipiden können Poren durch fluktuierende Membrandefekte erzeugt werden. Dabei stellt sich die Frage, ob es sich um hydrophobe oder um hydrophile Poren handelt. Glaser et al. (1988) postulierten, daß sich hydrophobe Poren dann ausbilden, wenn es zu spontanen Fluktuationen in der Lipiddoppelschicht kommt. Dehnen sich diese Defekte weiter aus, so entstehen hydrophile Poren mit einem Radius von 0,3-0,5 nm. In Abbildung 3.6 werden die beiden Typen von Poren in Lipiddoppelschichten schematisch dargestellt.

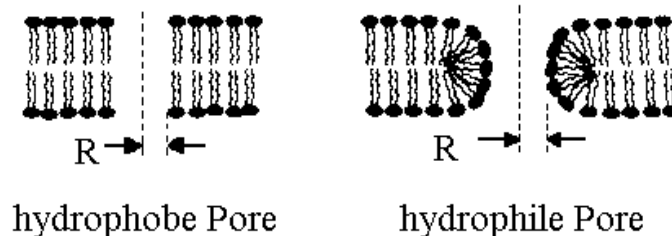


Abbildung 3.6: Hydrophobe und hydrophile Poren in Phospholipidmembranen (Glaser et al., 1988).

Ein Vergleich der Energie von Poren in Abhängigkeit vom Porenradius wird in Abbildung 3.7 gezeigt. Eine hydrophobe Pore mit dem Radius 0 entspricht einem ungestörten Zustand der Membran. Hydrophile Poren mit einem kleinen Radius besitzen eine hohe Energie. Bei einem Radius r^* ist die Energie von hydrophober und hydrophiler Pore gleich. Diese Energie E^* ist zu überwinden, damit sich eine hydrophile Pore ausbilden kann. Bei dem Radius r_m besitzt die hydrophile Pore die niedrigste Energie, obwohl der Radius größer als r^* ist. Unter diesen Umständen existiert die hydrophile Pore im metastabilen Zustand. Wird der Radius der Pore größer als r_d , so wächst die Pore unbegrenzt weiter und zerstört die Membran.

Es bilden sich immer zuerst hydrophobe Poren durch spontane Fluktuationen, die sich zu hydrophilen Poren ausbilden können.

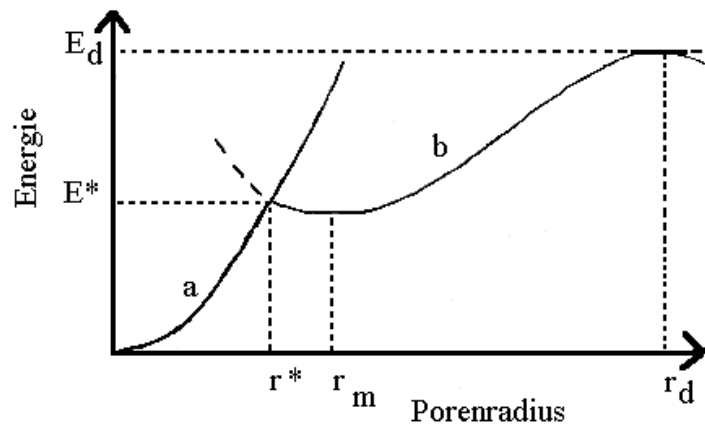


Abbildung 3.7: Vergleich der Energie von hydrophoben und hydrophilen Poren mit unterschiedlichen Porenradien (Glaser et al., 1988).

3.2 Transportmechanismen durch die Lipiddoppelschicht

3.2.1 Diffusionskontrollierte Wasserpermeation

Eine gerichtete Diffusion von Stoffen durch die Membran kann nur dann ablaufen, wenn der gelöste Stoff auf der einen Seite der Membran höher konzentriert ist als auf der anderen Seite. Um dieses Konzentrationsgefälle auszugleichen, erfolgt eine Diffusion des gelösten Teilchens so lange, bis der Stoff auf beiden Seiten der Membran die gleiche Konzentration erreicht hat. Im Gleichgewicht findet keine Nettodiffusion mehr statt, da Hin- und Rückdiffusion gleich groß sind.

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Untersuchung der diffusiven Wasserpermeation durch Lipiddoppelschichten dargestellt. Die einfachste Möglichkeit wurde 1984 von Lawaczeck et al. vorgestellt. Dabei wird eine der beiden (Wasser)-Phasen, zwischen denen sich die Membran befindet, mit D_2O versetzt. Es wird aber vorausgesetzt, daß H_2O und D_2O identische Diffusionseigenschaften haben. Man beobachtet dann einen Kon-

zentrationsausgleich von D₂O und H₂O durch diffusiven Austausch in entgegengesetzter Richtung. Der molare Volumenfluß von D₂O durch die Membran kann durch Gleichung (3-3) beschrieben werden (Finkelstein, 1987).

$$\Phi_w = \frac{J_v}{V_w} = P_d \cdot A \cdot \Delta c_w \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Φ_w = molarer Wasserfluß von D₂O [mol/s]; J_v = Volumenfluß von D₂O [cm³/s]; V_w = Molvolumen von Wasser; P_d = diffusiver Permeabilitätskoeffizient; A = Oberfläche der Membran; Δc_w = Konzentrationsdifferenz von D₂O zwischen beiden Phasen.

3.2.1.1 Bestimmung der diffusionskontrollierten Wasserpermeation mittels der H₂O/D₂O–Austauschmethode

Mit Hilfe des H₂O/D₂O–Austauschverfahrens kann die diffusive Wasserpermeabilität ohne Nettotransport gemessen werden. Die Methode beruht auf dem geringfügig unterschiedlichen Brechungsindex von H₂O und D₂O (Lawaczeck et al., 1984). Da die Intensität des Streulichtes der Vesikelprobe im direkten Zusammenhang mit dem Brechungsindex der unterschiedlichen wässrigen Phasen steht, gibt eine zeitabhängige Messung der Streulichtintensität Aufschluß über die H₂O/D₂O-Austauschkinetik.

In Abbildung 3.8 wird das Schema der Vesikel bei einer diffusionskontrollierten Permeation einer Stopped-Flow Messung dargestellt.

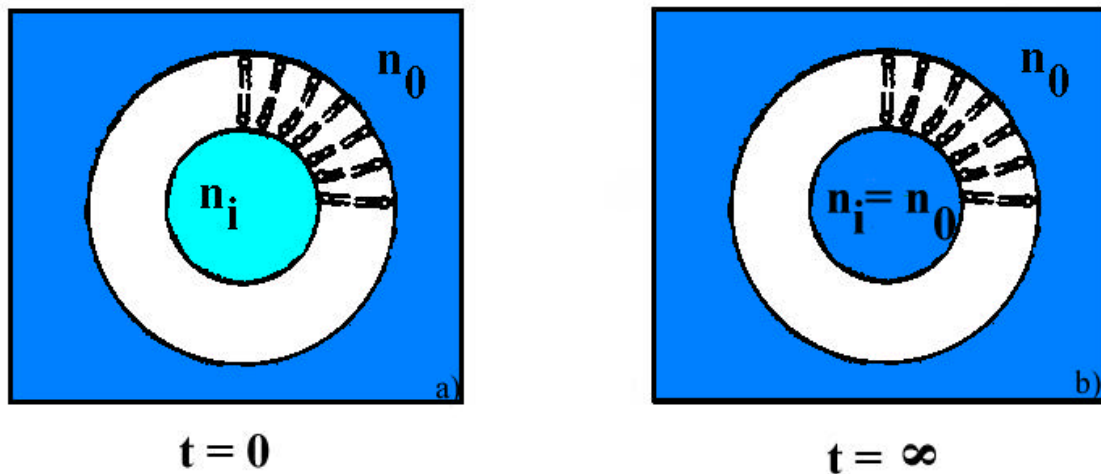


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des H₂O/D₂O-Austauschs.

Bei den Messungen wurden die Vesikel in H₂O dispergiert und anschließend mit D₂O gemischt. Zu Beginn des Experiments ($t=0$) befand sich in den Vesikeln Wasser mit dem Brechungsindex von $n_i = 1,33299$. Der Brechungsindex für D₂O beträgt $n = 1,32845$. Im extravesikulären Raum lag nach dem Mischen ein Gemisch von H₂O und D₂O im Verhältnis 1:1 vor. Der Brechungsindex in Abbildung 3.8a beträgt $n_0 = 1,33072$. Durch Diffusion von D₂O durch die Lipiddoppelschicht stellte sich für $t \rightarrow \infty$ der in Abbildung 3.8b dargestellte Endzustand ein.

Durch den Austausch von D₂O und H₂O ergab sich somit eine zeitabhängige Lichtstreuung bzw. Trübung der Probe. Da das intrazelluläre Volumen der Vesikel klein gegenüber dem Volumen der Probe ist, kann die Wasserpermeation als Kinetik pseudo-erster Ordnung behandelt werden (der D₂O-Anteil im äußeren Medium wird näherungsweise als konstant angesehen). Beim Meßvorgang sinkt der Brechungsindex von $n_i = 1,33299$ direkt nach dem Mischen ($t=0$) auf $n_0 = 1,33072$ für $t = \infty$.

Gleichung (3-4) beschreibt den intravesikulären Brechungsindex als Funktion der Zeit.

$$n_i(t) = n_0 + (n_i(0) - n_0)e^{-kt} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$n_i(t)$ = Brechungsindex zur Zeit t ; n_0 = Brechungsindex des extravesikulären Mediums; $n_i(0)$ = Brechungsindex des intravesikulären Mediums für $t = 0$; k = Geschwindigkeitskonstante ; $(n_i(0)-n_0)$ = Amplitude.

Es muß berücksichtigt werden, daß die Geschwindigkeitskonstante abhängig von der Größe der Teilchen ist (k ist um so kleiner je größer die Vesikel sind). Bei Vesikeldispersionen mit einer breiten Größenverteilung setzt sich die gemessene Geschwindigkeitskonstante aus einer Summe verschiedener Konstanten zusammen.

$$n_i(t) = n_0 + (n_i(0) - n_0) \cdot \sum_j e^{-k_j t} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Nachstehende Abbildung 3.9 zeigt ein Beispiel für die zeitabhängige Änderung der Lichtstreuintensität der Probe. Im Kurvenverlauf sieht man links als Gerade den Ausgangszustand vor dem Mischen der beiden Reaktionslösungen. Nach dem Mischen der Vesikeldispersion mit D_2O steigt die Amplitude sprunghaft an und die nachfolgende exponentiell abfallende Meßkurve beschreibt den H_2O/D_2O -Austausch.

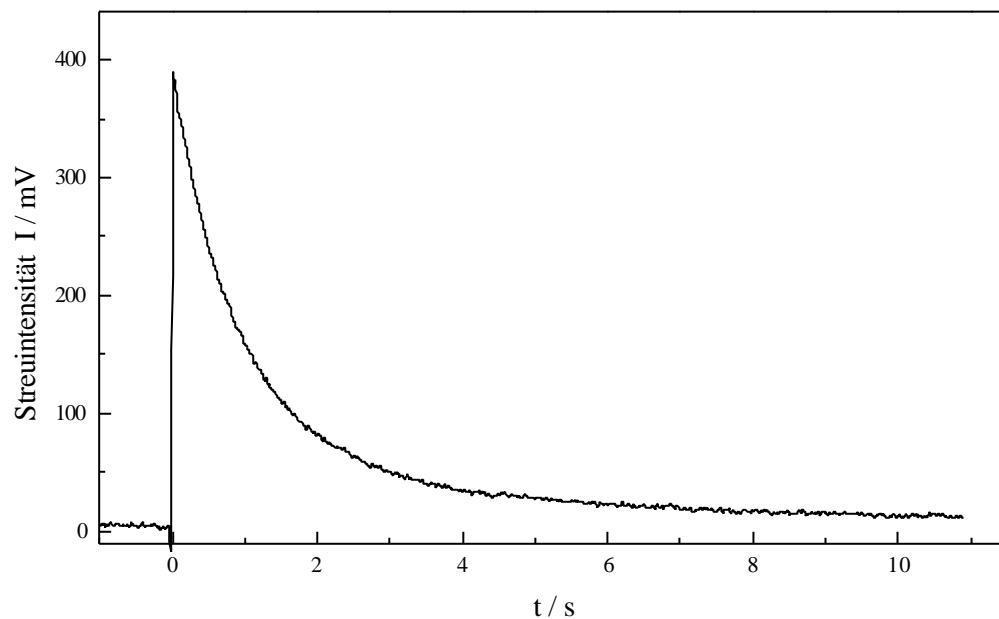


Abbildung 3.9: Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Lichtstreuintensität beim H_2O/D_2O -Austausch. Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 120 nm bei einer Temperatur von $30^\circ C$.

Diese Meßkurve wird mit Hilfe einer A/D-Wandlerkarte im Computer gespeichert und anschließend mit Origin ausgewertet. Die dabei abfallende Exponentialfunktion liefert die Relaxationszeit τ mit der direkt die Geschwindigkeitskonstante k des H_2O/D_2O -Austausches berechnet werden kann.

Der Austausch läßt sich auch mit in D₂O präparierten Vesikeln durchführen, die bei der Messung mit H₂O gemischt werden. Es ergeben sich hierbei jedoch zwei wesentliche Nachteile:

- 1) die Differenz der Brechungsindizes ist geringer,
- 2) ein erhöhter D₂O-Verbrauch ist unvermeidbar, was zu höheren Kosten führt.

Bei allen Messungen wurden die Vesikel deswegen nur in H₂O dispergiert und mit D₂O vermischt.

Der diffusive Permeabilitätskoeffizient P_d ist durch Gleichung (3-3) definiert. Die Gleichung (3-9) läßt sich mit Hilfe der Definition der Molekülpermeation durch Lipidmembranen (3-5) und der Beziehung (3-6) herleiten:

$$P_{Molekül} = \frac{J_{Molekül}}{\Delta[Molekül]} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

$$\frac{J_{Molekül} \cdot A}{V} = - \frac{d[Molekül]}{dt} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

V = Volumen der Vesikel; A = Oberfläche der Vesikel.

Löst man nach J_{Molekül} auf und setzt dann die Gleichungen (3-5) und (3-6) gleich, so erhält man den Ausdruck (3-7):

$$- \frac{d[Molekül]}{dt} = \frac{A}{V} \cdot P_{Molekül} \cdot \Delta[Molekül] \quad \text{Gleichung 3-7}$$

Die Lösung der Gleichung (3-7) ist eine Exponentialfunktion der Relaxationszeit τ (3-8):

$$t = \frac{1}{P_{Molekül}} \cdot \frac{V}{A} = \frac{1}{k} \quad \text{Gleichung 3-8}$$

Durch einfaches Umstellen der Gleichung (3-8) erhält man Gleichung (3-9).

Der diffusive Permeabilitätskoeffizient P_d kann ausgehend von der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k berechnet werden, wenn die Vesikelgröße mittels DLS bekannt ist (Verkman et al., 1985).

$$P_d = \frac{V}{A} \cdot k = \frac{1}{3} \cdot r \cdot k = \frac{1}{3} \cdot \frac{r}{t} \quad \text{Gleichung 3-9}$$

r = Radius der Vesikel.

Die Aktivierungsenergie E_A der Wasserpermeation kann über die Steigung der Arrheniusauftragung bestimmt werden. Sie gibt Aufschluß, wie stark der Permeationsprozeß von der Temperatur abhängig ist (Gleichung 3-10).

$$\ln k = \frac{-E_A}{RT} \quad \text{Gleichung 3-10}$$

Die Berechnung der Aktivierungsenergie erfolgt mittels linearer Regression aus der Steigung der Arrheniusauftragung ($\log P_d$ gegen $1/T$). Es wurden dazu nur Meßwerte berücksichtigt, die deutlich außerhalb des Bereichs der Hauptphasenumwandlung lagen.

3.2.1.2 Bestimmung der diffusionskontrollierten Permeation von anderen kleinen Molekülen

Der Permeabilitätskoeffizient P_d für andere kleine Moleküle berechnet sich wie für H_2O nach Gleichung (3-9).

Die Aktivierungsenergie wird analog zum H_2O/D_2O -Austauschexperiment bestimmt.

In Abbildung 3.10 wird ein Beispiel für die zeitabhängige Änderung der Lichtstreuintensität dargestellt. Bei dem Stopped-Flow-Experiment handelt es sich um DMPC-Vesikel, welche in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) hergestellt und anschließend mit 500 mM Glycerinlösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) vermischt wurden. Die exponentiell abfallende Meßkurve beschreibt die Glycerinpermeation in die Vesikel. Diese Meßkurve wird analog zum Experiment des H_2O/D_2O -Austausches ausgewertet.

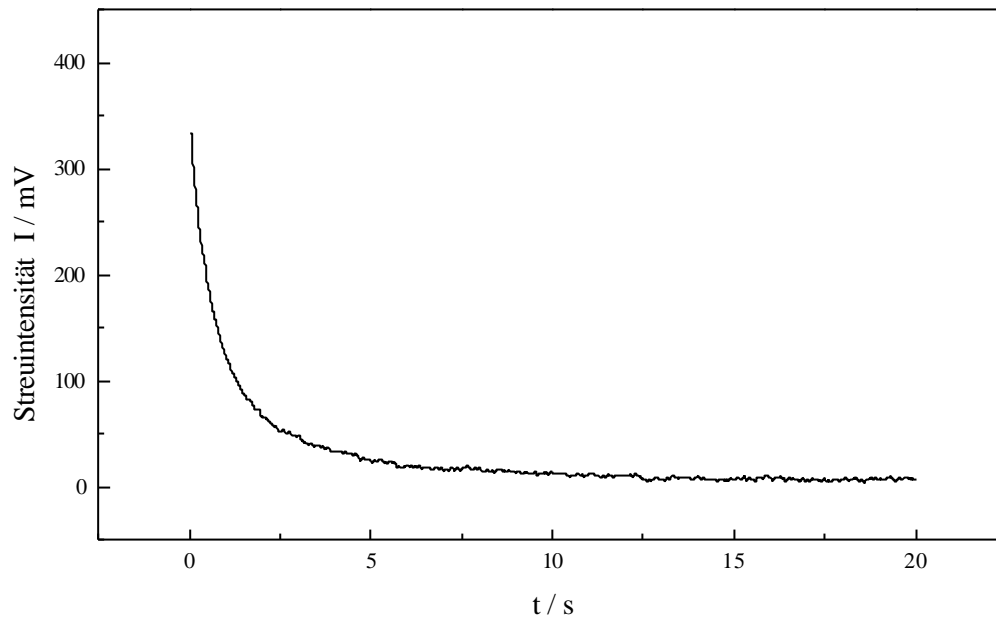


Abbildung 3.10: Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Lichtstreuintensität bei der diffusiven Glycerinpermeation in die Vesikel. DMPC-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 120 nm bei $T = 30^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Osmotische Wasserpermeation

Werden zwei wässrige Phasen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines gelösten Stoffes durch eine Membran getrennt, welche lediglich für Wassermoleküle durchlässig ist, so wird Wasser auf Grund des entstandenen Konzentrationsgradienten durch die Lipiddoppelschicht permeieren. Diesen Transport von Wasser durch eine semipermeable Membran bezeichnet man als Osmose. Durch Einströmen von Wasser in die hypertone Phase baut sich in dieser Phase ein osmotischer Druck auf, der dem Einströmen von Wasser entgegenwirkt und diesen zum Stillstand bringt. Beide Phasen befinden sich im Gleichgewicht, wenn der hydrostatische Druck der Lösung gerade gleich dem osmotischen Druck ist und somit kein Nettovolumenfluß von Wasser mehr durch die Membran stattfindet. Eine thermodynamische Behandlung der osmotischen Wasserpermeation geht davon aus, daß im

Gleichgewicht das chemische Potential des Lösungsmittels auf beiden Seiten der Membran gleich sein muß (Gleichung 3-11).

$$m^R(p) = m(x_a; p + \Pi) \quad \text{Gleichung 3-11}$$

x_a = Molenbruch der gelösten Substanz, p = Druck, Π = osmotischer Druck

In der hypertonen Phase hat sich ein erhöhter osmotischer Druck Π eingestellt, der dem Konzentrationsunterschied der gelösten Substanzen in beiden Lösungen direkt proportional ist (Gleichung 3-12).

$$\Pi = RT\Delta a_i \quad \text{Gleichung 3-12}$$

Π = Druckdifferenz zwischen beiden Phasen; Δa_i = Differenz der molaren Aktivitäten der gelösten Stoffe zwischen hyper- und hypotoner Phase.

Der Nettovolumenfluß von Wasser J_V , angegeben in cm^3/s , durch die Membran kann mit Gleichung (3-13) beschrieben werden und ist somit der Konzentrationsdifferenz der impermeablen Substanz zwischen beiden Phasen direkt proportional.

$$J_V = L_p \cdot \Pi \quad \text{Gleichung 3-13}$$

L_p = hydraulischer Permeabilitätskoeffizient.

Der hydraulische Permeabilitätskoeffizient L_p beschreibt die Geschwindigkeit der osmotischen Wasserpermeation. Um osmotische und diffusive Wasserpermeation vergleichen zu können, wird der hydraulische Permeabilitätskoeffizient L_p in einen osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f umgerechnet (Gleichung 3-14). Dies erfolgt durch Multiplikation von L_p mit dem Faktor $RT/(V_W \cdot A)$. P_f hat analog zu P_d die Einheit cm/s :

$$P_f = L_p \cdot \frac{RT}{V_W \cdot A} = \frac{J_V}{\Pi} \cdot \frac{RT}{V_W \cdot A} \quad \text{Gleichung 3-14}$$

V_W = Molvolumen von Wasser.

3.2.2.1 Bestimmung der osmotischen Wasserpermeation

Präpariert man Vesikel in einer wässrigen Lösung eines nicht permeierenden Stoffes (hypertone Phase) und mischt diese mit Wasser (hypotone Phase), so permeiert das Solvens auf Grund des entstandenen Konzentrationsgradienten des gelösten Stoffes von außen in die Vesikel hinein. Werden die Vesikel in Wasser hergestellt und anschließend mit der wässrigen Lösung eines impermeablen Stoffes vermischt, so permeieren die Wassermoleküle aus den Vesikeln heraus. Die Vesikel vergrößern bzw. verkleinern durch das Einströmen bzw. Ausströmen ihr Volumen.

Die Lichtstreuung einer Lipiddispersion hängt von der Größe der Vesikel ab. Die Brechungsindexänderung und die Volumenveränderung führen zu einer Änderung der Lichtstreuintensität. Durch das Einströmen von Wasser wachsen die Vesikel und die Lichtstreuintensität nimmt zu. Eine Abnahme der Intensität der Lichtstreuung beobachtet man, wenn die Wassermoleküle aus den Vesikeln permeieren.

Auf Grund der linearen Korrelation zwischen Signalintensität und relativer Volumenänderung der Vesikel (Sidel et al., 1957; Sháafi et al., 1967), kann die Geschwindigkeit der osmotischen Wasserpermeation mittels der verwendeten Stopped-Flow Apparatur gemessen werden. Unter folgenden Annahmen kann die Volumenvergrößerung der Vesikel als Prozeß mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung angesehen werden.

- 1) Gelöster Stoff (z.B.: D(+)-Glucose) permeiert nicht durch die Lipiddoppelschicht.
- 2) Die Vesikel verhalten sich wie ideale Osmometer, d.h. die Änderung der Lichtstreuung ist direkt proportional zur Konzentration des gelösten Stoffes.
- 3) Vesikel sind sphärische Objekte mit einer kugelförmigen Membranoberfläche ohne Vertiefungen oder Einstülpungen.
- 4) Die Vesikel sind unilamellar und liegen in einem engen Größenbereich vor.

Der Volumenfluß von Wasser J_V [cm^3/s] durch die Membran kann beschrieben werden als eine Volumenänderung der Vesikel pro Zeiteinheit ($\Delta V/\Delta t$). Als Volumenänderung wurde für alle Experimente 5% bei der Halbwertszeit $t_{1/2}$ angenommen. Carruthers und Melchior (1983) fanden bei ihren Untersuchungen eine Volumenvergrößerung von 6%. Da sich die Volumenveränderung der Vesikel gemäß einer Kinetik erster Ordnung verhält, entspricht die zeitliche Änderung des Lichtstreusignals der in Abbildung 3.11 gezeigten Meßkurve für die osmotische Wasserpermeation.

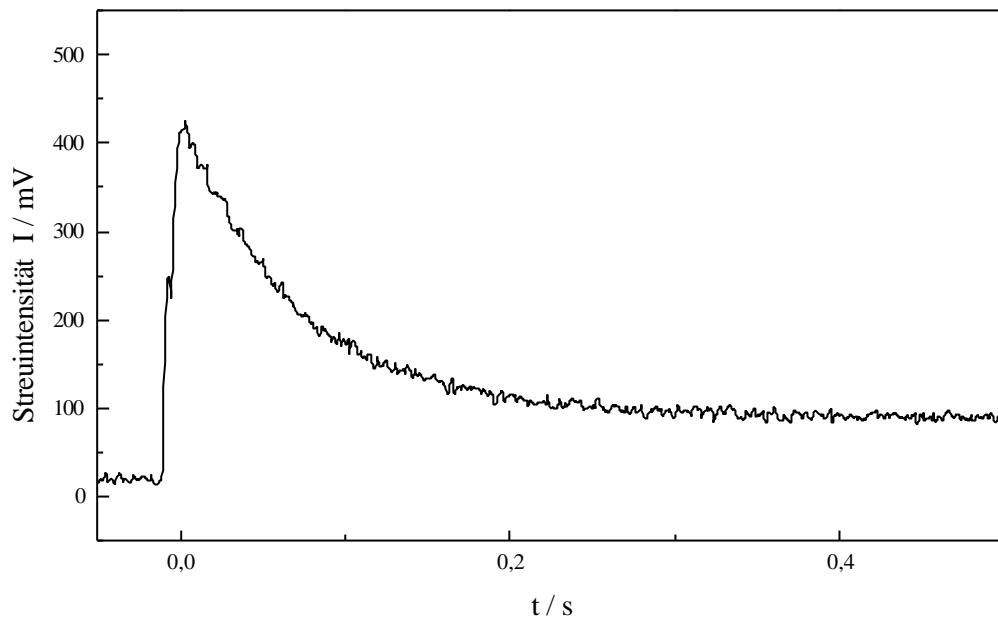


Abbildung 3.11: Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Lichtstreuintensität beim osmotischen Experiment. DMPC-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 130 nm und einer Temperatur von 35°C.

Der osmotische Permeabilitätskoeffizient P_f ist durch Gleichung (3.14) definiert. Man kann den Volumenfluß J_V durch den Ausdruck $\Delta V/\Delta t$ ersetzen, wobei ΔV hierbei 0,05V (Volumenänderung von 5%) entspricht und Δt durch die Halbwertszeit $t_{1/2} = \ln 2/k$ ersetzt wurde. Hieraus ergibt sich für P_f unter Verwendung von $V/A = 1/3 \cdot r$ folgende Gleichung (3-15):

$$P_f = \frac{0,05 \cdot r \cdot k}{3 \cdot \ln 2} \cdot \frac{RT}{V_w \cdot \Pi} \quad \text{Gleichung 3-15}$$

Der osmotische Gradient Π berechnet sich nach Gleichung (3-12).

Über die Steigung der Arrheniusauftragung kann die Aktivierungsenergie E_A der Wasserpermeation bestimmt werden. Sie gibt Aufschluß darüber, wie stark der Permeationsvorgang von der Temperatur abhängig ist (vgl. Gleichung 3-10). Analog des Austauschexperimentes wurde die Aktivierungsenergie E_A mittels linearer Regression bestimmt, wobei nur die Meßwerte berücksichtigt wurden die deutlich außerhalb des Phasenumwandlungsbereiches lagen.

3.3 Bestimmung der Größe von Poren in Phospholipiddoppelschichten

3.3.1 Berechnung der Größe von makroskopischen Poren

Zur Bestimmung des Porenradius einer makroskopischen Pore muß das Verhältnis zwischen P_f und P_d bekannt sein.

Mit Hilfe des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes kann der osmotische Wasserfluß durch makroskopische Poren beschrieben werden, unter Verwendung von Gleichung (3-14) erhält man den nachstehenden Ausdruck für den osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f (Gleichung 3-16).

$$P_f = \frac{n}{A} \cdot \frac{\mathbf{p} \cdot r^4 \cdot RT}{8 \cdot L \cdot \mathbf{h} \cdot V_w} \quad \text{Gleichung 3-16}$$

n = Anzahl der Poren; r = Porenradius; A = Membranoberfläche; L = Porenlänge; η = Viskosität von Wasser; V_w = Molvolumen von Wasser.

Die diffusionskontrollierte Wasserpermeation durch makroskopische Poren kann mit Hilfe des Fick'schen Diffusionsgesetzes beschrieben werden (Gleichung 3-17).

$$P_d = \frac{n}{A} \cdot \frac{\mathbf{p} \cdot r^2 \cdot D_w}{L} \quad \text{Gleichung 3-17}$$

D_w = Selbstdiffusionskoeffizient von Wasser.

Wenn man Gleichung (3-16) durch Gleichung (3-17) dividiert, erhält man einen Ausdruck für das Verhältnis von P_f zu P_d . Sind die experimentellen Werte der osmotischen und diffusen Wasserpermeation bekannt, so kann man den Porenradius einer makroskopischen Pore mit Hilfe von Gleichung (3-18) berechnen.

$$\frac{P_f}{P_d} = \frac{RT}{8 \cdot \mathbf{h} \cdot D_w \cdot V_w} \cdot r^2 \quad \text{Gleichung 3-18}$$

3.3.2 Berechnung der Porengröße nach dem “Single-File“ Modell

Die Bildung von Poren in Lipidmembranen kann auf verschiedenen Wegen stattfinden. Durch fluktuierende Membrandefekte, durch Defekte an Domänengrenzen beim Phasenübergang gel nach flüssig-kristallin. Es ist aber nicht zu erwarten, daß die dadurch entstandenen Poren makroskopische Dimensionen erreichen. Vielmehr werden sie als so klein angesehen ($r < 0,3 \text{ nm}$), daß die Wassermoleküle während der Wanderung durch diese Poren ihre kolligativen Eigenschaften verlieren und sie nicht aneinander in der Pore vorbei diffundieren können (Abbildung 3.12).

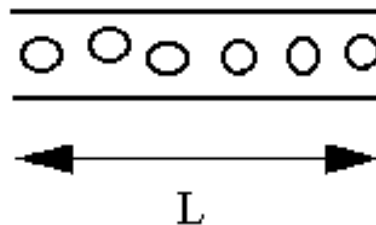


Abbildung 3.12: Graphische Darstellung einer “Single-File Pore“ der Länge L.

Finkelstein (1987) und Levitt (1974) beschrieben mit Hilfe des Single-File Modells, den Transport von Wasser durch Poren mit einem Radius von bis zu 0,3 nm.

Auch das “Single-File“ Modell führt für den osmotischen und diffusiven Wasserfluß zu unterschiedlichen Ergebnissen. Auf Grund des Konzentrationsgradienten bei der osmotischen Wasserpermeation, muß die kooperative Bewegung der Wassermoleküle berücksichtigt werden. Dies ist erforderlich, da alle Wassermoleküle in der Pore zwischen den beiden Phasen gleichzeitig eine treibende Kraft erfahren. Ausgehend von den experimentellen Daten der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation, kann mit Hilfe des “Single-File“ Modells die Anzahl der Poren pro Flächeneinheit bestimmt werden. Die Gleichungen werden nachstehend für die osmotische und für die diffusionskontrollierte Wasserpermeation getrennt besprochen.

3.3.2.1 Diffusionskontrollierter Wassertransport durch die Lipidmembran

Der diffusive Permeabilitätskoeffizient pro Pore p_d ist der Quotient aus diffusivem Permeabilitätskoeffizient P_d und der Anzahl der Poren pro Flächeneinheit n/A (Gleichung 3-19).

$$p_d = \frac{A}{n} \cdot P_d \quad \text{Gleichung 3-19}$$

Der diffusive Permeabilitätskoeffizient pro Pore kann im Gleichgewicht, d.h. bei konstanter Diffusionsgeschwindigkeit der Wassermoleküle durch die Pore, mit Gleichung (3-20) beschrieben werden, wobei p_d unabhängig von der Anzahl der Moleküle in der Pore ist.

$$p_d = \frac{v_w \cdot kT}{\mathbf{d} \cdot L^2} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

v_w = Volumen eines Wassermoleküls; k = Boltzmannkonstante; T = Temperatur; δ = Reibungskoeffizient eines Wassermoleküls in der Pore; L = Länge der Pore.

Für die Berechnung von p_d müssen v_w , L und δ bekannt sein.

Unter Verwendung von (Gleichung 3-19), kann man aus den experimentellen Daten von P_d und mit den berechneten Werten für p_d die Anzahl der Poren pro Flächeneinheit bestimmen.

3.3.2.2 Osmotischer Wassertransport durch die Lipidmembran

Der osmotische Permeabilitätskoeffizient pro Pore p_f kann analog zu p_d als Quotient aus osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f und der Anzahl der Poren pro Flächeneinheit n/A (Gleichung 3-21) ausgedrückt werden.

$$p_f = \frac{A}{n} \cdot P_f \quad \text{Gleichung 3-21}$$

Unter "steady state"-Bedingungen, d.h. bei konstanter Fließgeschwindigkeit der Wassermoleküle durch die Pore, kann der osmotische Permeabilitätskoeffizient pro Pore p_f mit Gleichung (3-22) berechnet werden. Im Gegensatz zu p_d ist p_f proportional zu der Anzahl der Wassermoleküle in der Pore.

$$p_f = \frac{v_w \cdot kT}{d \cdot L^2} \cdot N \quad \text{Gleichung 3-22}$$

v_w = Volumen eines Wassermoleküls; k = Boltzmannkonstante; T = Temperatur; δ = Reibungskoeffizient eines Wassermoleküls in der Pore; L = Länge der Pore; N = Anzahl der Wassermoleküle pro Pore.

Das Verhältnis zwischen P_f und P_d erhält man, wenn man Gleichung (3-22) durch Gleichung (3-20) dividiert. Dieses Verhältnis entspricht der mittleren Anzahl der Wassermoleküle pro Pore N (Gleichung 3-23).

$$\frac{P_f}{P_p} = \frac{p_f}{p_d} = N \quad \text{Gleichung 3-23}$$

Das Verhältnis für das "Single-File" Modell (Gleichung 3-23) unterscheidet sich auffallend von dem Ergebnis für das Löslichkeitsdiffusionsmodell, wo das Verhältnis zwischen osmotischer und diffusiver Wasserpermeation 1 sein sollte. Für $N = 1$ wären beide Modelle identisch. Für $N > 1$ kann das "Single-File" Modell so verstanden werden, daß N Wassermoleküle für die osmotische Wasserpermeation eine kooperative Bewegung in der Pore ausführen. Diese Wechselwirkung der Wassermoleküle hat auf die diffusive Wasserpermeation keinen Einfluß, da hier auf die einzelnen Wassermoleküle kein Konzentrations-

gradient wirkt. Die Wassermoleküle bewegen sich in der Pore nur auf Grund der freien Diffusion.

Um den Porenradius und die Anzahl der Poren pro cm^2 berechnen zu können sind die nachstehend aufgeführten Gleichungen (3-24 bis 3-27) erforderlich.

Der Radius einer "Single-File" Pore kann aus der Anzahl der Wassermoleküle pro Pore mit Hilfe der Gleichung (3-24) berechnet werden.

$$N = \frac{p \cdot r^2 \cdot L}{v_w} \quad \text{Gleichung 3-24}$$

v_w = Volumen eines Wassermoleküls.

Das Volumen eines Wassermoleküls v_w kann mit Hilfe von makroskopischen Daten angegeben werden (Gleichung 3-25).

$$v_w = \frac{V_w}{N_A} = 3 \cdot 10^{-23} \text{ cm}^3 \quad \text{Gleichung 3-25}$$

V_w = Molvolumen von Wasser; N_A = Avogadro'sche Konstante.

Unter der Annahme, daß die Wassermoleküle die Form einer Kugel besitzen, was als Voraussetzung für das "Single-File" Modell gilt, erhält man für den Radius eines Wassermoleküls r_w den Wert von 0,19 nm. Legt man den Selbstdiffusionskoeffizienten von Wasser ($D_w = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) für die Berechnung von r_w zu Grunde, so erhält man unter Verwendung des Stokes'schen Gesetzes einen sehr viel kleineren Wert von 0,1 nm (Schmitt und Thews, 1977). Setzt man die beiden unterschiedlichen Radien der Wassermoleküle in Gleichung (3-24) ein, so führt dies zu unterschiedlichen Porenradien. Finkelstein (1987) gab den Wert von r_w mit 0,15 nm an, was als gute Approximation für den tatsächlichen Molekülradius von Wasser angesehen werden kann.

Der Reibungskoeffizient δ wird mit Hilfe der Nernst-Einstein-Beziehung (Gleichung 3-26) berechnet.

$$d = \frac{k \cdot T}{D_w^0} \quad \text{Gleichung 3-26}$$

D_w^0 = Diffusionskoeffizient eines Wassermoleküls in der Pore.

Durch Einsetzen von Gleichung (3-24) und (3-26) in die Gleichung (3-22) kann der osmotische Permeabilitätskoeffizient pro Pore p_f auch folgendermaßen geschrieben werden (Gleichung 3-27).

$$p_f = \frac{p \cdot r^2 \cdot D_w^0}{L} \quad \text{Gleichung 3-27}$$

Analog zur osmotischen Wasserpermeation kann auch bei der diffusiven Wasserpermeation der Reibungskoeffizient δ unter Verwendung der Nernst-Einstein Beziehung, durch den Diffusionskoeffizienten ersetzt werden. Der diffusive Permeabilitätskoeffizient pro Pore (3-20), geht dadurch in Gleichung (3-28) über.

$$p_d = \frac{v_w \cdot D_w^0}{L^2} \quad \text{Gleichung 3-28}$$

Der Diffusionskoeffizient von Wasser in einer "Single-File" Pore sollte kleiner sein als der verwendete Selbstdiffusionskoeffizient von Wasser, da die Wassermoleküle eine stärkere Reibung an der Porenwand erfahren, als bei der Diffusion in reinem Wasser. Levitt (1974) zeigte aber mittels Molekulardynamik Berechnungen, daß der Diffusionskoeffizient von Wasser in einer "Single-File" Pore sich nur geringfügig vom Wert einer makroskopischen Pore unterscheidet. Daher kann in den Gleichungen der Selbstdiffusionskoeffizient von Wasser für die jeweilige Temperatur eingesetzt werden.

4. Methoden

4.1 Vesikelpräparation

Zur Untersuchung der Permeation von kleinen Molekülen durch Phospholipidmembranen ist es erforderlich, unilamellare Vesikel einer definierten Größe herzustellen. In der Literatur werden eine Vielzahl von Methoden zur Präparation von Liposomen und Vesikel bestimmter Größen beschrieben (Lichtenberg und Barenholz, 1987). Für kinetische Untersuchungen an unilamellaren Vesikeln ist eine möglichst enge Größenverteilung erforderlich.

Daher stellte sich die Behandlung mit Ultraschall als die geeignetste Methode heraus. Diese Ultraschallmethode wurde von Saunders et al. (1962) zur Herstellung von SUV eingeführt. Dispergiert man ein Lipid ca. 10°C oberhalb seiner Phasenumwandlungstemperatur T_m in Wasser mit einem mechanischen Rüttler, so bilden sich spontan multilamellare Vesikel (MLV) aus (Lichtenberg, 1993).

Die Beschallungsdauer, Beschallungsstärke, Beschallungstemperatur, Probenvolumen und die Konzentration des Lipids im wässrigen Medium, besitzen einen großen Einfluß auf die Größe und Lamellarität der erhaltenen Vesikeldispersion. Diese und andere experimentelle Parameter, wie Geometrie der Probenbehälter und unterschiedlicher Wasserstand im Ultraschallbad beim Beschallen, sind verantwortlich für die geringe Reproduzierbarkeit der Methode, d.h. man erhält zwar immer SUV, aber mit unterschiedlicher Größenverteilung (Hauser, 1993). Eine Beschallung im Ultraschallbad ist im Vergleich zu einer Beschallung mit dem Titanschwingstab sehr viel schonender und die erhaltenen Vesikelpopulationen sind deshalb stabiler (länger lagerfähig). Nach der Beschallung einer Probe wurde die Vesikelgröße in der Lipiddispersion mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

Mit Hilfe der Ultraschallmethode entstanden hauptsächlich neben SUV mit einem Durchmesser von 80 nm bis 170 nm auch ein kleiner Anteil von MLV (ca. 10%) (Hauser, 1993). Für kinetische Messungen ist es aber erforderlich, Vesikelpopulationen mit einem einheitlichen mittleren Durchmesser herzustellen. Eine einfache Beschallung der Proben erwies sich als nicht ausreichend. Um eine engere Größenverteilung der unilamellaren Vesikel zu erhalten und den Anteil an MLV zu minimieren, wurden die Dispersionen mit einem LipoFast-Extruder der Firma MM Development, Inc. (Ottawa, Kanada) ca. 10°C oberhalb von T_m des Lipids mehrfach filtriert. Gegenüber einer einfachen Filtration hat die Extrusion den Vorteil, daß durch die auftretenden Scherkräfte große Vesikel zerstören und aus

ihnen kleinere gebildet wurden. Dadurch bleibt weniger Lipid im Filter zurück, so daß sich die Konzentration der Lipidprobe kaum ändert. Aus den vorhandenen MLV wurden so durch wiederholte Extrusionen (zehn bis fünfzehn) nach und nach unilamellare Vesikel (Lichtenberg, 1993; Hauser, 1993) hergestellt.

4.1.1 Herstellung der Lipidproben

Es wurden Suspensionen mit Lipidkonzentrationen von 1 mg/ml in einem 66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) hergestellt und anschließend für zehn Minuten auf ca. 80°C erwärmt. Mit dem mechanischen Rüttler wurde die Probe anschließend mehrere Minuten grob dispergiert. Danach wurde die Lipiddispersion in einem Ultraschallbad vom Typ Transsonic 310/H (Firma Elma, Singen) mit einer Leistung von 50 Watt bei 80°C je nach Lipid und Lipidgemisch zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten beschallt.

Die folgende Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Beschallungszeiten bei den verwendeten Lipiden. Diese können aber nur als Anhaltspunkte dienen, da trotz annähernd gleicher Bedingungen (dispergieren, beschallen und extrudieren), die Reproduzierbarkeit nicht immer vorhanden war.

Lipid	Beschallungszeit bei 80°C
DMPC, DPPC	3-8 min
DMPA, DPPA	30 sec-2 min
Lipidgemisch	
DMPC:DPPC	4-8 min
DMPA:DPPA	1-3 min
DMPC:DMPA	2-5 min
DPPC:DPPA	2-5min
DMPC:DPPA	3-6 min
DPPC:DMPA	4-8 min

Tabelle 4.1: Beschallungszeiten für die untersuchten Phospholipide.

Anschließend wurde die Dispersion noch ca. zwei Stunden bei 80°C belassen und danach langsam im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Probe wurde nun in einem Liposofast Extruder der Firma MM Developments, Inc. (Ottawa, Kanada), der sich in einem externen, temperierbaren Wasserbad befand, mehrfach filtriert. Die erhaltenen Vesikel hatten einen Durchmesser von 80-170 nm (Abbildung 4.1). Zur Überprüfung wurde die Größenverteilung der Vesikel mittels dynamischer Lichtstreuung (Abschnitt 4.2) bestimmt.

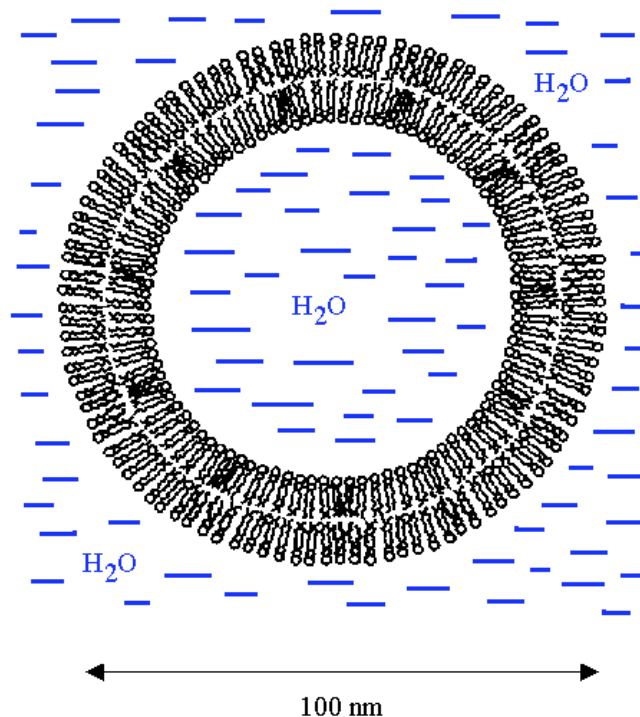


Abbildung 4.1: Unilamellares Lipidvesikel nach der Extrusion.

Zum Herstellen von Lipidgemischen wurden zuerst Stammlösungen der einzelnen Lipidkomponenten hergestellt. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von Chloroform/Methanol (3:1 v/v). Nach dem Zusammenpipettieren der entsprechenden Volumina wurde das Lösungsmittel nach leichtem Erwärmen durch Überleiten eines Argonstroms schnell abgeblasen. Schließlich wurden die Lipidmischungen noch ca. acht Stunden am Hochvakuum von restlichen Lösungsmittelspuren befreit. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte wie oben beschrieben.

Bei Verwendung des Detergenz n-Octyl- β -D-glucopyranosid wurden die Vesikel wie oben beschrieben erst hergestellt und anschließend ca. zehn Minuten vor der Stopped-Flow Messung mit der entsprechenden Detergenzkonzentration vermischt.

4.1.2 Aufbau und Verwendung des LiposoFast-Extruders

Abbildung 4.2 zeigt die schematische Darstellung des LiposoFast-Extruders. Im Edelstahlgehäuse wird eine Polycarbonatmembran zwischen zwei Tefloneinsätzen **B** eingesetzt. Beide Teflonhülsen haben in der Mitte eine Öffnung **E**, so daß die Lipiddispersion von der einen Spritze in die andere durch die Membran gepreßt werden kann. Auf jeder Hülse ist ein Nylonsieb **C** mit Hilfe eines O-Rings **D** befestigt, damit die Lipidlösung gleichmäßig auf dem Polycarbonatfilter verteilt wird.

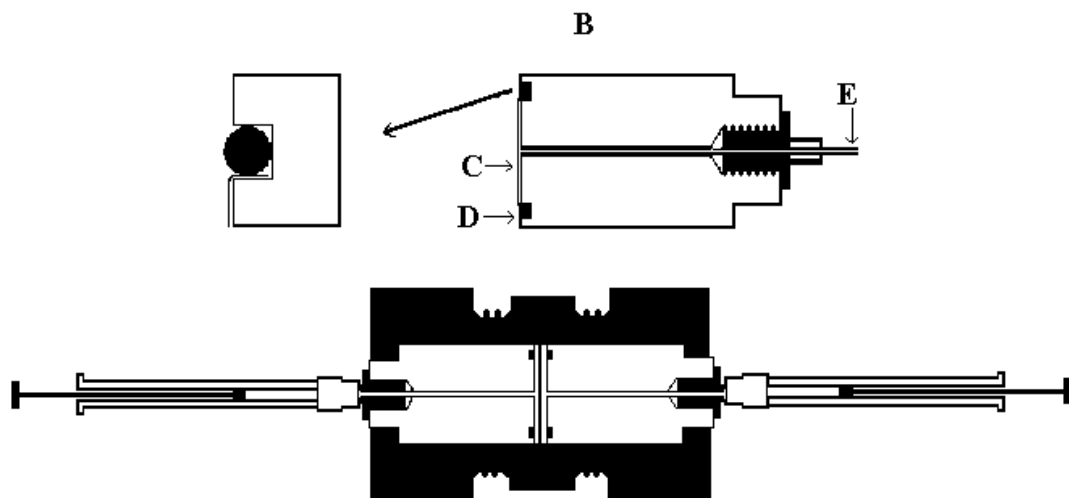


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des LiposoFast-Extruders (MacDonald, 1991).

Die Dispersion wurde in die Starterspritze gegeben und die gesamte Apparatur in einem Wasserbad auf ca. 10°C oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des Lipids erwärmt. Nachdem die Lipiddispersion die Wasserbadtemperatur erreicht hat, wird die Spritzenfüllung ca. 10 mal hin und her durch die Membran gedrückt. Anschließend wurde die Lösung der Zielspritze entnommen. Als Filter dienen Polycarbonatmembranen (Avestin Inc., Ottawa, Kanada) mit einer Porengröße von 200 nm und einem Durchmesser von 19 mm. Mit Hilfe des LiposoFast-Extruders wurde eine exaktere Größenverteilung der unilamellaren Vesikel erreicht und die Anzahl der multilamellaren Vesikel approximiert gegen Null.

4.2 Größenbestimmung der Vesikel mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS)

4.2.1 Allgemeine Grundlagen

Die Dynamische Lichtstreuung (auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt) mißt die Schwankungen der Streulichtintensität, welche durch die Bewegung der lichtstreuenden Partikel verursacht wird (Ostrowsky, 1993). Sie ist die am meisten verwendete Routinemethode zur Größenbestimmung von Lipiddispersionen (Ruf et al., 1989; Hallet et al., 1991). Die Meßgröße ist die zeitliche Schwankung der Streulichtintensität, die beim Durchgang des Laserstrahls durch die Probe winkelabhängig gemessen werden kann. Da die untersuchte Brown'sche Molekularbewegung statistischer Natur ist, kommt es zu einer teilchengrößenabhängigen Frequenzverbreiterung des gestreuten Lichts.

Diese liegt zwischen mehreren 100 und einigen 1000 Hz. Dies ist im Vergleich zur eingestrahnten Frequenz von ca. $5 \cdot 10^{14}$ Hz sehr gering. Die Halbwertsbreite $\Delta\omega$ der Streustrahlung, der sogenannten Rayleigh Linie, ist umgekehrt proportional zur charakteristischen Fluktuationszeit τ , mit der die durch die Brown'sche Partikelbewegung verursachten Fluktuationen der Diffusionskoeffizienten erfolgen.

Sie stellt somit ein Maß der Partikelbeweglichkeit dar und ist direkt mit der Partikelgröße verknüpft: große Teilchen bewegen sich langsam und kleine entsprechend schneller. Um eine extrem hohe Auflösung bei der Bestimmung der Halbwertsbreite $\Delta\omega$ zu erreichen, aus der sich die Partikelgröße herleiten läßt, wird die fourier-transformierte Form des Frequenzspektrums, die sogenannte Autokorrelationsfunktion (AkF) gemessen und ausgewertet (Abbildung 4.3).

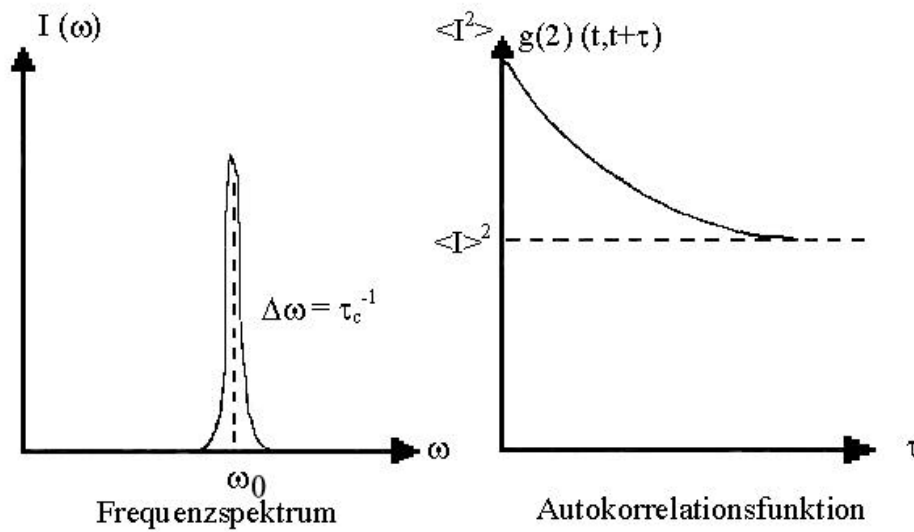


Abbildung 4.3: Frequenzspektrum und Autokorrelationsfunktion.

In einem sogenannten Korrelator wird die vom Photomultiplier detektierte Streulichtintensität als Funktion der Zeit gespeichert. Durch ständige Partikelbewegung ändert sich auch fortwährend das Interferenzmuster und damit die Intensität am Detektor (Abbildung 4.4).

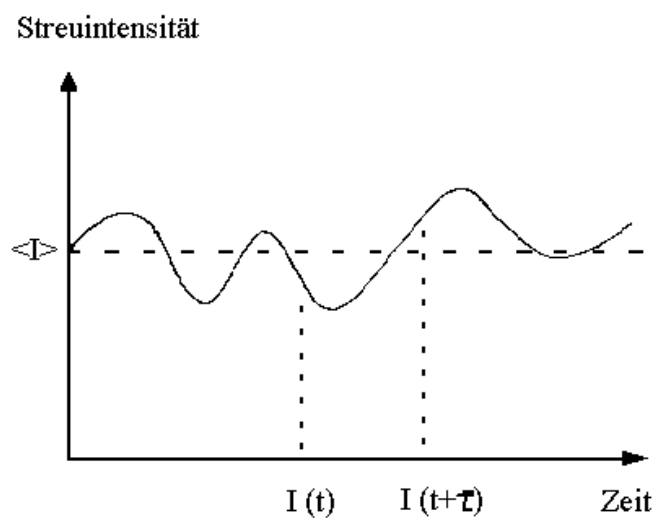


Abbildung 4.4: Fluktuation der Lichtstreuung in Abhängigkeit von der Zeit (Ostrowsky, 1993).

Die Autokorrelationsfunktion korreliert mit einem aktuellen Zustand, d.h. die momentane Partikelanordnung innerhalb des Beobachtungsvolumens, mit einem Ausgangszustand. Sie wird aus den Intensitätsdaten der Streustrahlung im Korrelator berechnet. Die Autokorrelationsfunktion der Intensität der Streustrahlung, die sogenannte Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung ist folgendermaßen definiert (Gleichung 4-1).

$$g^{(2)}(t, t + \mathbf{t}) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \mathbf{t}) \rangle}{\langle I \rangle^2}$$

Gleichung 4-1

Die eckigen Klammern bedeuten die Summierung der Produkte der zu verschiedenen Zeiten gemessenen Intensitäten $I(t)$. Die Korrelationszeit τ gibt das Zeitintervall an, in dem die den Photomultiplier erreichenden Photonen gezählt und abgespeichert werden. Zur Auswertung der AkF wird diese in die Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes $g^{(1)}$ umgerechnet (Gleichung 4-2).

$$g^{(2)}(t, t + \mathbf{t}) = 1 + |g^{(1)}(t, t + \mathbf{t})|^2$$

Gleichung 4-2

Für den Idealfall einer monodispersen Probe ergibt sich für diese eine einfache Exponentialfunktion (Gleichung 4-3)

$$g^{(1)}(t, t + \mathbf{t}) = e^{-\Gamma t}$$

Gleichung 4-3

mit einer charakteristischen Abklingkonstanten Γ .

Mittels Γ läßt sich der Diffusionskoeffizient D berechnen (Gleichung 4-4)

$$D = \frac{\Gamma}{K^2}$$

Gleichung 4-4

Der Streulichtvektor K ist für ein gegebenes System konstant und beschreibt, wie stark das Licht mit einem Teilchen wechselwirkt (Gleichung 4-5).

$$K = \frac{4 \mathbf{p} n_0}{\lambda} \sin(\Theta / 2)$$

Gleichung 4-5

λ = Wellenlänge des Laserlichtes, Θ = Streuwinkel, n_0 = Brechungsindex des Dispersionsmediums.

Unter Kenntnis der Viskosität η der Probe, läßt sich der hydrodynamische Radius R_h mittels der Stokes-Einstein-Beziehung unter der Annahme, daß kugelförmige Partikel vorliegen berechnen (Gleichung 4-6).

$$R_h = \frac{k_b T}{6 \pi \eta R}$$

Gleichung 4-6

k_b = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur, η = Viskosität des Dispersionsmediums.

In der Regel treten monodisperse Systeme praktisch nicht auf und in einer polydispersen Probe besitzt jede Partikelgröße eine eigene Abklingkonstante, so daß die Autokorrelationsfunktion $g^{(1)}$, nun durch eine Summe bzw. ein Integral über verschiedene Exponentialfunktionen beschrieben werden muß, wobei $G(\Gamma)$ die gesuchte Partikelgrößenverteilung ist (Gleichung 4-7).

$$g^{(1)}(t, t + \tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma \tau} d\Gamma$$

Gleichung 4-7

Für die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung aus der gemessenen AkF wurden verschiedene Verfahren entwickelt (Mc Neil-Watson, 1988).

Bei der Kumulantenmethode wird die Autokorrelationsfunktion logarithmiert, wobei im Idealfall einer monodispersen Probe eine Gerade entsteht. An die logarithmierte AkF wird ein Polynom 2. Grades angepaßt. Dabei liefert dessen Anfangssteigung einen mittleren Durchmesser und die Krümmung des Polynoms ergibt die Polydispersität der Verteilung.

Dieses Verfahren gibt keinen Aufschluß über Form und Symmetrie der Größenverteilung einer Probe.

Um eine Aussage über die Partikelgrößenverteilung zu erhalten, kann die modellunabhängige "exponential sampling"-Methode verwendet werden. Hierbei werden 24 Modell-Exponentialfunktionen, die jeweils einer bestimmten Partikelgröße entsprechen, so lange kombiniert, bis sich eine optimale Übereinstimmung zwischen der gemessenen und der aus den Modellfunktionen berechneten Autokorrelationsfunktion ergibt (Gleichung 4-8).

$$g^{(1)}(t, t + \mathbf{t}) = \sum_i s_i(\Gamma) e^{-\Gamma_i t}$$

Gleichung 4-8

mit $\Gamma_i = D_i K^2$.

Hierbei werden die Exponenten $(-\Gamma_i \tau)$ fest vorgegeben und die Amplituden $s_i(\Gamma)$ angepaßt. Mit dieser Methode erhält man als Ergebnis eine Unterteilung des Meßbereichs in 24 Größenklassen und kann so eventuelle, nicht zu eng verteilte Bimodalitäten erkennen.

4.2.2 Durchführung der Messung und Auswertung

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Photonenkorrelationsspektrometers vom Typ Zetasizer 3 durchgeführt. Als Meßzelle diente eine AZ 10 Zelle, die eine Probenmenge von ca. 0,5 ml erfordert. Die Genauigkeit der Messung wurde durch Testmessungen an Latexprouben bekannter Teilchengröße überprüft. Die Ergebnisse der gleichen Probe schwankten dabei um ca. 2-3% und die Abweichung von der wirklichen Teilchengröße der Latexprouben betrug höchstens 10%. Das von der Betreiberfirma mitgelieferte Programm erstellte eine Größenverteilung der Teilchen. Bei dem hier verwendeten Verfahren ist die genaue Kenntnis des Brechungsindex der Lipidvesikel nicht notwendig, allerdings müssen Viskosität und Brechungsindex des Lösungsmittels bekannt sein. Die entsprechenden Werte wurden dem Handbook of Chemistry and Physics (61ST Edition, 1980-1981) entnommen oder experimentell bestimmt. Es wurde allerdings vorausgesetzt, daß die Vesikel sphärischen Charakter besitzen. Als Durchmesser für die Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten wurde der Mittelwert der numerischen Mittelwerte der drei Messungen verwendet. Die erhaltenen Vesikeldurchmesser lagen zwischen 80 nm und 170 nm.

4.3 Kinetische Messungen

Die Stopped-Flow Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 15-75°C, welcher die Umwandlung der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase beinhaltet, durchgeführt.

Oberhalb von 75°C waren durch Luftblasenbildung in den Spritzen keine reproduzierbaren Messungen mehr durchführbar.

Die Meßergebnisse wurden in einer Arrheniusdarstellung in der Form $\log P_f$ bzw. $\log P_d$ gegen $1/T \cdot 1000$ dargestellt. Aus der Steigung der Geraden wurden die Aktivierungsenergien E_A für den Permeationsprozeß berechnet. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m der untersuchten Lipide und Lipidgemische wurde in den Abbildungen durch einen Pfeil bzw. der Phasenumwandlungsbereich durch zwei Pfeile kenntlich gemacht.

Die Schwankungen der Meßwerte wurden durch Fehlerbalken dargestellt. Dabei wurden sowohl Abweichungen der Meßwerte als auch die Meßfehler bei der Größenbestimmung berücksichtigt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Einzelmessungen, sie schwanken um $\pm 10\%$. Auch die Vesikelgröße wurde aus dem Mittelwert von drei Messungen der DLS bestimmt. Der bei der Größenbestimmung beobachtete Meßfehler lag unterhalb von 5%.

Wurden von einem Lipid unter gleichen Bedingungen mehrere Proben hergestellt und anschließend vermessen, so schwankten die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten bzw. die berechneten Permeabilitätskoeffizienten im Bereich der Meßgenauigkeit.

Vor allen Stopped-Flow Messungen wurden die Lösungen 10 Minuten unter Wasserstrahlvakuum entgast. Mittels dynamischer Lichtstreuung wurde die Größe der Vesikel vor und nach der Messung bestimmt, um Fusions- und Aggregationsvorgänge während des Experimentes überprüfen zu können.

Zur Stopped-Flow Messung zeigten sich Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm bis 150 nm als am besten geeignet. Vesikel kleiner als 70 nm sind relativ instabil und neigen eher zur Fusion (Wong und Thompson, 1982; Wong et al., 1982). Bei Vesikel mit einer Größe oberhalb von durchschnittlich 200 nm sind multilamellare Vesikel kaum auszuschließen (Lichtenberg und Barenholz, 1987) und sie zeigen beim Vermischen in der Stopped-Flow Apparatur mechanische Instabilität.

4.3.1 Stopped-Flow Methode

Die kinetischen Messungen wurden mit Hilfe einer Stopped-Flow Apparatur durchgeführt. Bei dieser Methode werden die beiden zuvor entgasten Reaktanden (Vesikellösung und Referenzlösung) luftblasenfrei in die zwei Treiberspritzen gefüllt. Anschließend werden sie mit Hilfe von Druckluft sehr schnell miteinander im Mixer vermischt und die Lösung in eine Reaktionskammer (Meßzelle) injiziert. Die Meßzelle hat ein Volumen von 40 μl und ist durch einen Kolben der Stoppspritze abgeschlossen, der von der ausströmenden Lösung zuerst zurückgetrieben wird, bis er den Anschlag mit dem Trigger berührt. Damit wird der Mischvorgang unterbrochen, gleichzeitig der Trigger ausgelöst und die nachfolgende Messung spektroskopisch verfolgt.

Die Totzeit der Apparatur wurde mit Hilfe einer Testreaktion nach Tonomura et al. (1978) überprüft.

Die osmotische und die diffusive Wasserpermeation bzw. Molekülpermeation wurde über eine zeitliche Veränderung der Lichtstreuintensität der Probe verfolgt. Dies geschieht mit einer optischen Detektionseinheit. Sie besteht aus einer Xenonlampe (75 W), die monochromatisches Licht über ein Glasfaserkabel in die Meßzelle einstrahlt. Die Intensität des gestreuten Lichtes wurde mittels eines Photomultiplieres, der senkrecht zum eingestrahnten Licht angeordnet ist, registriert.

Abbildung 4.5 zeigt den schematischen Aufbau der Stopped-Flow Apparatur.

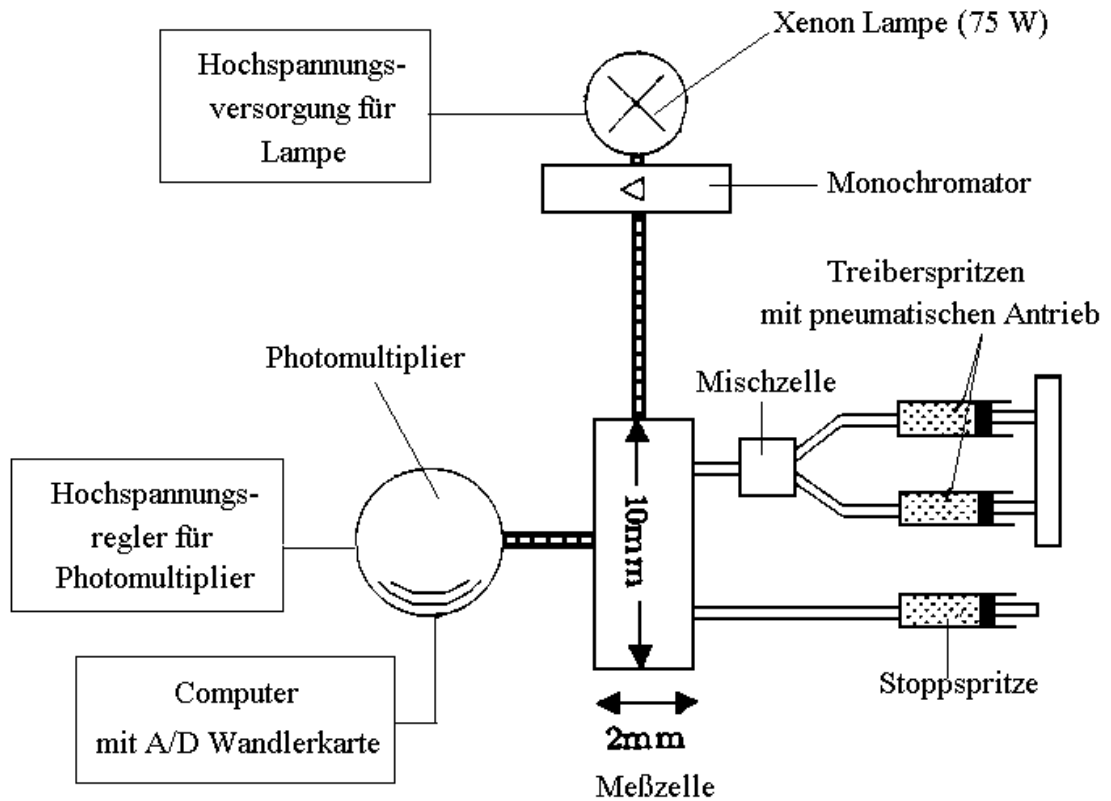


Abbildung 4.5: Schematischer Aufbau der Stopped-Flow Apparatur.

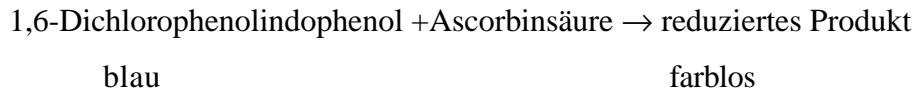
4.3.2 Bestimmung der Totzeit der Stopped-Flow Apparatur

Die Zeit, die vom Einspritzen der Reaktanten in den Mixer bis zum Start der Messungsaufnahme vergeht, bezeichnet man als Totzeit. Wenn Reaktionen innerhalb dieser Zeit ablaufen, sind sie nicht mehr meßbar. Je kleiner die Totzeit ist, um so schnellere Reaktionen können detektiert werden.

Um die Auflösungsgrenze der Meßapparatur zu bestimmen, wurde eine Testreaktion nach Tonomura et al. (1978) durchgeführt.

Hierbei wird der Farbstoff 1,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) durch Zugabe von verschiedenen Ascorbinsäurekonzentrationen zu einem farblosen Produkt reduziert. Das Verschwinden der blauen Farbe von DCIP kann bei einer Wellenlänge von 520 nm kinetisch verfolgt werden.

Beträgt die DCIP-Konzentration weniger als 5% der Ascorbinsäurekonzentration, so ist die Geschwindigkeit des Reduktionsvorgangs linear von der Ascorbinsäure abhängig (Kinetik pseudo-erster Ordnung).



Die Reaktionen wurden bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (20°C und 50°C) durchgeführt. Durch eine kontinuierliche Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration und eine damit verbundene Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, wurde die Totzeit zu ca. 2 ms bestimmt. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede der Totzeit bei den beiden verschiedenen Temperaturen festgestellt werden.

4.3.3 Durchführung der Stopped-Flow Messung

Als Stopped-Flow-Apparatur wurde ein Gerät der Firma HighTech Scientific (Salsbury, England) vom Typ SF51 verwendet.

Die mit dem LiposoFast-Extruder hergestellten Vesikelproben wurden zehn Minuten lang unter Wasserstrahlvakuum entgast und anschließend der mittlere Durchmesser mittels dynamischer Lichtstreuung (Zetasizer 3) gemessen. Dabei wurde der Vesikeldurchmesser bestimmt und überprüft, ob die Probe eine einheitliche Größenverteilung besitzt.

Die Vesikelprobe wurde dann luftblasenfrei in eine der Treiberspritzen (2,5 ml) aufgezogen. In die zweite Treiberspritze (2,5 ml) wurde anschließend die entgaste Referenzlösung gefüllt. Die gesamte Apparatur einschließlich der Treiberspritzen wurde vor der Messung fünf Minuten lang bei konstanter Temperatur gehalten. Die Wellenlänge des eingestrahnten monochromatischen Lichtes betrug 520 nm.

Die Meßkurven wurden mittels einer Meßkarte (Adioda 12/8-Bit-A/D-Wandlung mit einer Wandlungsfrequenz von 25 kHz) direkt in einen PC eingelesen und anschließend mit einem eigens dafür erstellten Programm (GFA-Basic) ausgewertet.

Nach der Messung wurde der Stopspritze das 1:1 Gemisch aus Vesikelprobe und Referenzlösung entnommen und eine DLS-Messung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden,

daß die Proben vor und nach dem Experiment die annähernd gleiche Größenverteilung aufweisen, obwohl die Vesikel beim Mischvorgang in der Meßapparatur erheblichen physikalischen Kräften ausgesetzt waren.

4.3.4 Messung der diffusiven Wasserpermeabilität

Der diffusive Wasserpermeabilitätskoeffizient wurde mit Hilfe des H₂O/D₂O-Austauschverfahrens nach Lawaczeck (1984) gemessen, das auf dem geringfügig unterschiedlichen Brechungsindex von H₂O und D₂O beruht. Dabei wurden die Vesikel in Wasser hergestellt (vgl. Abschnitt 3.1.1) und anschließend mit D₂O vermischt. Mit Hilfe der gemessenen Exponentialkurve, kann die Geschwindigkeitskonstante k der Wasserpermeation bestimmt werden. Setzt man die Geschwindigkeitskonstante in Gleichung (3-9) ein, so kann man den diffusiven Permeabilitätskoeffizient direkt berechnen.

$$P_d = \frac{V}{A} \cdot k = \frac{1}{3} \cdot r \cdot k \quad \text{Gleichung 3-9}$$

Die Aktivierungsenergie kann über die Steigung der Arrheniusauftragung mittels linearer Regression bestimmt werden (vgl. Abschnitt 3.2.1.1).

4.3.5 Messung der Permeabilität von kleinen Molekülen

Mit Hilfe der Stopped-Flow Apparatur wurde außerdem die Permeationsgeschwindigkeit von kleinen polaren und unpolaren Molekülen durch die Lipiddoppelschicht von DMPC-Vesikeln gemessen.

Dazu wurden Lösungen der Stoffe Ethylenglykol, tert. Butylalkohol, Harnstoff, Glycerin, β -D-Glucose und Perfluoro-tert. Butylalkohol mit einer Konzentration von 500 mM hergestellt.

Die Vesikel wurden in 500 mM Glucoselösung hergestellt und anschließend mit der zu untersuchenden Lösung vermischt. Lösungen mit niedriger Konzentration erbrachten bei den Stopped-Flow Messungen keine ausreichenden Amplitudenänderungen.

β -D-Glucoselösung wurde deshalb verwendet, damit kein osmotischer Gradient nach dem Vermischen auftrat. Da die Permeationsgeschwindigkeit der Glucosemoleküle durch die Lipiddoppelschicht mit Abstand am langsamsten verläuft, wurde ausgeschlossen, daß Moleküle gleichzeitig in entgegengesetzter Richtung diffundieren.

Es permeiert die gelöste Substanz in die bzw. aus den Vesikeln, zusätzlich findet immer gleichzeitig ein Wasserfluß statt. Aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes kommt es zu einer Zu- oder Abnahme der Lichtstreuung, die mit Hilfe der Stopped-Flow Apparatur registriert werden kann.

Der diffusive Permeabilitätskoeffizient P_d für kleine Moleküle kann ausgehend von der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k berechnet werden, wenn die Größe der Vesikel bekannt ist (Gleichung 3-9).

4.3.6 Messung der osmotischen Wasserpermeabilität

Werden die Vesikel in einer wässrigen β -D-Glucoselösung (hypertone Phase) präpariert und mit Wasser (hypotone Phase) vermischt, so permeiert das Solvens auf Grund des entstandenen Konzentrationsgradienten von außen in die Vesikel hinein. Bei Umkehrung des Experimentes permeiert das Solvens aus den Vesikeln heraus. Die Vesikel vergrößern oder verkleinern ihr Volumen und der sich aufbauende osmotische Druck wirkt dem Wasserfluß entgegen. Da die Lichtstreuereigenschaften einer Lipidprobe von der Größe der Vesikel und dem Brechungsindex abhängen, führt die o.g. Volumen- und Brechungsindexänderung zu einer Zu- bzw. Abnahme der Lichtstreuintensität. Aufgrund der linearen Korrelation zwischen Signalintensität und relativer Volumenänderung der Vesikel, kann die Geschwindigkeitskonstante der osmotischen Wasserpermeation bestimmt werden. Ist die Vesikelgröße bekannt, so läßt sich der osmotische Permeabilitätskoeffizient P_f mit Gleichung (3-15) berechnen.

$$P_f = \frac{0.05 \cdot r \cdot k}{3 \cdot \ln 2} \cdot \frac{RT}{V_w \cdot \Pi} \quad \text{Gleichung 3-15}$$

Der osmotische Gradient Π berechnet sich nach Gleichung (3-12).

5. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse einer systematischen Untersuchung der osmotischen und diffusionskontrollierten Permeation von kleinen polaren und unpolaren Molekülen durch Lipiddoppelschichten dargestellt. Die Vesikel wurden aus Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen und unterschiedlichen Acylketten hergestellt. Durch einen Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten von osmotischer und diffusionskontrollierter Wasserpermeation sollte festgestellt werden, ob der Transport von Wassermolekülen durch die Phospholipidmembran nach dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus oder aber durch Poren erfolgt.

Um Informationen über die Permeationseigenschaften von Lipidmembranen im Phasenumwandlungsbereich zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase zu erhalten, wurden Lipidgemische, die durch einen breiten Phasenumwandlungsbereich gekennzeichnet sind, vermessen.

Der Einfluß des osmotischen Konzentrationsgradienten auf die Permeation von Wassermolekülen wurde mit Hilfe von konzentrationsabhängigen osmotischen Messungen untersucht. Dabei wurden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen im intra- oder extravesikulärem Medium erzeugt und die Wasserpermeation in bzw. aus den Vesikeln gemessen. Durch ein- bzw. ausströmendes Wasser vergrößern oder verkleinern die Vesikel ihr Volumen und gleichzeitig kommt es zu einer Brechungsindexänderung, was als Zu- bzw. Abnahme der Intensität der Lichtstreuung der Probe beobachtet werden kann.

Außerdem wurden die Permeationseigenschaften von kleinen polaren und unpolaren Molekülen durch 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin Vesikel untersucht. Dabei interessierte besonders, ob Größe und Polarität der Moleküle einen meßbaren Einfluß auf die Geschwindigkeit der Permeation ausübt.

Von Interesse war gleichfalls, inwieweit die Detergengkonzentration von n-Octyl- β -D-glucosid in der Lipiddoppelschicht die Permeationseigenschaften von kleinen Molekülen durch die Membran verändert. Es ist bekannt, daß durch die Einführung der Detergenmoleküle in die Lipiddoppelschicht die Packung der Moleküle innerhalb der Membran verändert wird (Edwards, 1991; Keller, 1997; Moroi, 1992).

5.1 Diffusive und osmotische Wasserpermeation

5.1.1 DMPC und DMPA

Es wurde die diffusive und osmotische Wasserpermeation durch Vesikel der Lipide DMPC und DMPA und deren Gemische untersucht. Bei den osmotischen Untersuchungen wurden die Vesikel immer in 100 mM Glucoselösung/66,7mM Phosphatpuffer (pH = 7) hergestellt und anschließend mit 66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) vermischt. Durch die Bestimmung des Verhältnisses von P_f zu P_d sollte überprüft werden, ob die Wasserpermeation dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus folgt oder aber durch Poren und Defektstellen innerhalb der Phospholipiddoppelschicht abläuft. In Abbildung 5.1.1 sind der Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten für die diffusive und osmotische Wasserpermeation durch DMPC und DMPA-Vesikel dargestellt.

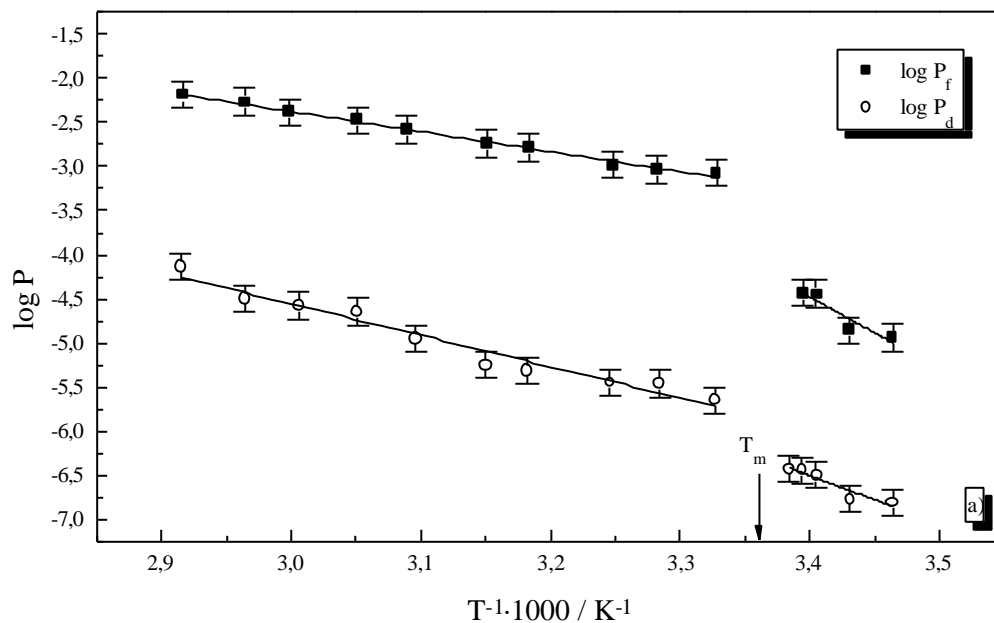


Abbildung 5.1.1a: $\log P$ gegen $1/T$ für diffusive Wasserpermeation und osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50$ mM. Werte für P in $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$.

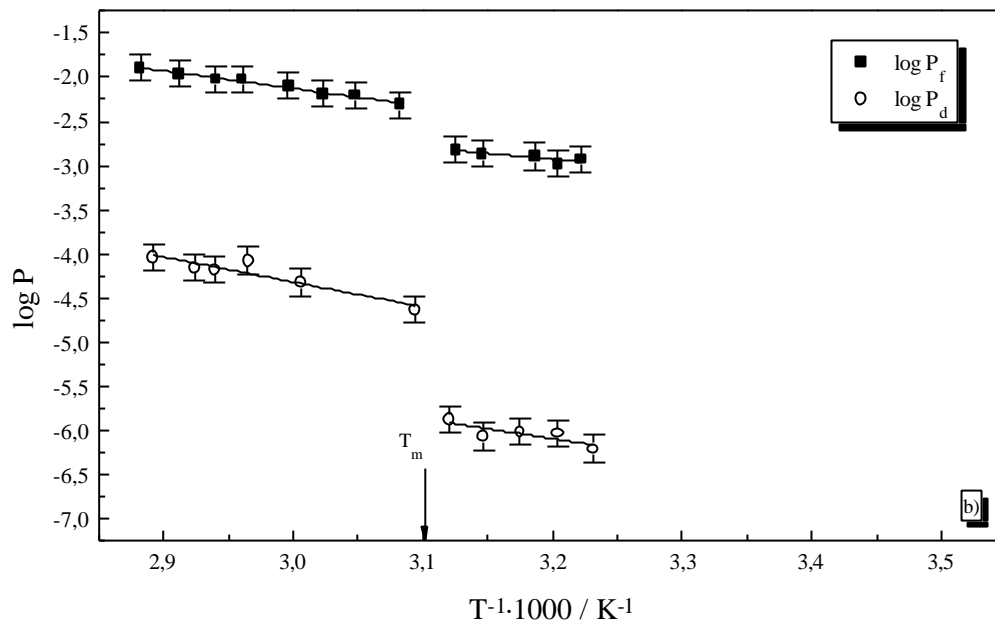


Abbildung 5.1.1b: log P gegen $1/T$ für diffusive Wasserpermeation und osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50$ mM. Werte für P in $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Für beide Phospholipide DMPC und DMPA kann man die sprunghafte Zunahme der Wasserpermeabilität beim Übergang der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase beobachten. Für DMPC liegen die Permeabilitätskonstanten in der flüssig-kristallinen Phase in einem Bereich von $P_f = 7 \cdot 10^{-4} - 6 \cdot 10^{-3}$ cm/s für die osmotische Wasserpermeation und für die diffusive Wasserpermeation zwischen $P_d = 2 \cdot 10^{-6} - 7 \cdot 10^{-5}$ cm/s. In der Gelphase schwanken die Permeabilitätskonstanten für P_f in einem Bereich von $1-4 \cdot 10^{-5}$ cm/s und für P_d liegen sie um $3 \cdot 10^{-7}$ cm/s.

Die Permeabilitätskonstanten der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation durch DMPA-Membranen liegen in der flüssig-kristallinen Phase für P_f zwischen $4 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$ cm/s und die P_d -Werte liegen zwischen $2-9 \cdot 10^{-5}$ cm/s. In der Gelphase bewegen sich die Werte der osmotischen Wasserpermeation um $1 \cdot 10^{-3}$ cm/s und für die diffusive Wasserpermeation durchlaufen sie einen Bereich von $6 \cdot 10^{-7}$ bis $2 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Vergleicht man die Werte von DMPC mit denen von DMPA, so sind die Permeabilitätskoeffizienten des DMPA Lipides immer größer verglichen mit den Werten von DMPC. Anscheinend per-

meieren die Wassermoleküle schneller durch DMPA-Lipidmembranen als durch DMPC-Lipidmembranen. Der lineare Zusammenhang zwischen den Permeabilitätskonstanten und der reziproken Temperatur wird in Abbildung 5.1.1 deutlich. Die durch lineare Regression aus den Arrheniusplots berechneten Aktivierungsenergien E_A sind in Tabelle 5.1.1 zusammengefaßt.

Lipid	Permeationsprozeß	Gelphase	flüssig-kristalline Phase
DMPC	osmotisch	155 kJ/mol	43 kJ/mol
	diffusiv	104 kJ/mol	67 kJ/mol
DMPA	osmotisch	26 kJ/mol	38 kJ/mol
	diffusiv	42 kJ/mol	53 kJ/mol

Tabelle 5.1.1: Aktivierungsenergien der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation der Lipide DMPC und DMPA.

In der flüssig-kristallinen Phase liegen die Aktivierungsenergien der osmotischen Wasserpermeation für beide Lipide um 40 kJ/mol und sind somit kleiner als die Werte der diffusiven Wasserpermeation der beiden Lipide. Man benötigt anscheinend eine geringere Aktivierungsenergie für die osmotische Wasserpermeation.

Vergleicht man das Verhältnis P_f/P_d , das oft zur Überprüfung des Löslichkeitsdiffusionsmodells dient, so stellt man fest, daß das Verhältnis für alle Messungen der reinen Lipide immer größer als eins ist. Für die in Tabelle 5.1.2 gezeigten Werte von P_f/P_d wurden die Permeabilitätskoeffizienten für die flüssig-kristalline Phase und für die Gelphase eingesetzt. Lagen für diese Temperaturen keine Permeabilitätskonstanten vor, wurden sie mittels linearer Regression berechnet.

Lipid	Temperatur	P_f [cm/s]	P_d [cm/s]	Verhältnis P_f/P_d
DMPC	20°C	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-7}$	109
	70°C	$6,4 \cdot 10^{-3}$	$7,3 \cdot 10^{-5}$	88
DMPA	40°C	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$8,9 \cdot 10^{-7}$	1460
	70°C	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$9,0 \cdot 10^{-5}$	122

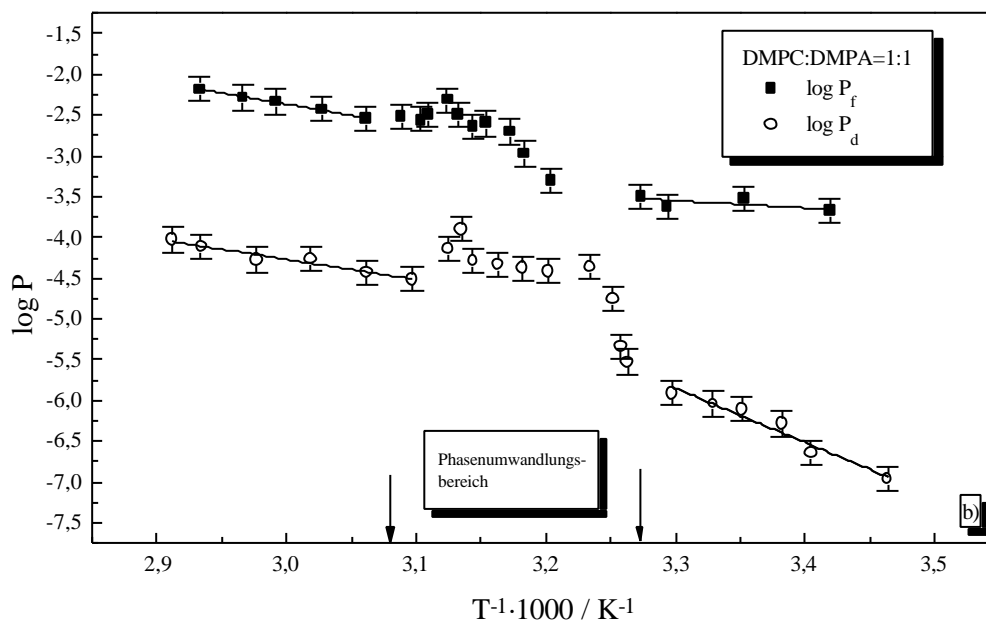
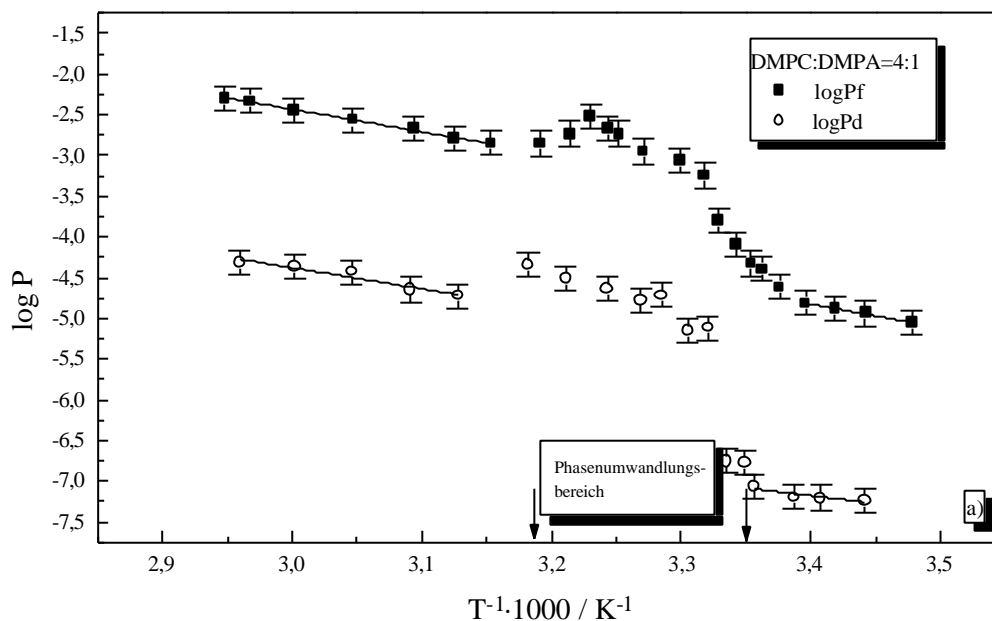
Tabelle 5.1.2: Permeabilitätskonstanten bei unterschiedlichen Temperaturen der diffusiven und osmotischen Wasserpermeation.

Die großen Werte für das Verhältnis P_f/P_d widersprechen dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus und sind nur durch das Porenmodell zu erklären.

Das sehr große Verhältnis P_f/P_d für DMPA bei einer Temperatur von 40°C ist wahrscheinlich auf Membrandefekte in der Gelphase zurück zu führen. Im allgemeinen, dies gilt für alle Permeationsmessungen, sollte man die Permeabilitätskoeffizienten und die Aktivierungsenergien in der Gelphase etwas differenzierter betrachten.

5.1.2 Gemische von DMPC und DMPA

In den Abbildungen 5.1.2a,b,c werden die Ergebnisse für P_d und P_f für drei Gemische von DMPC/DMPA im Molverhältnis 4:1; 1:1 und 1:4 dargestellt.



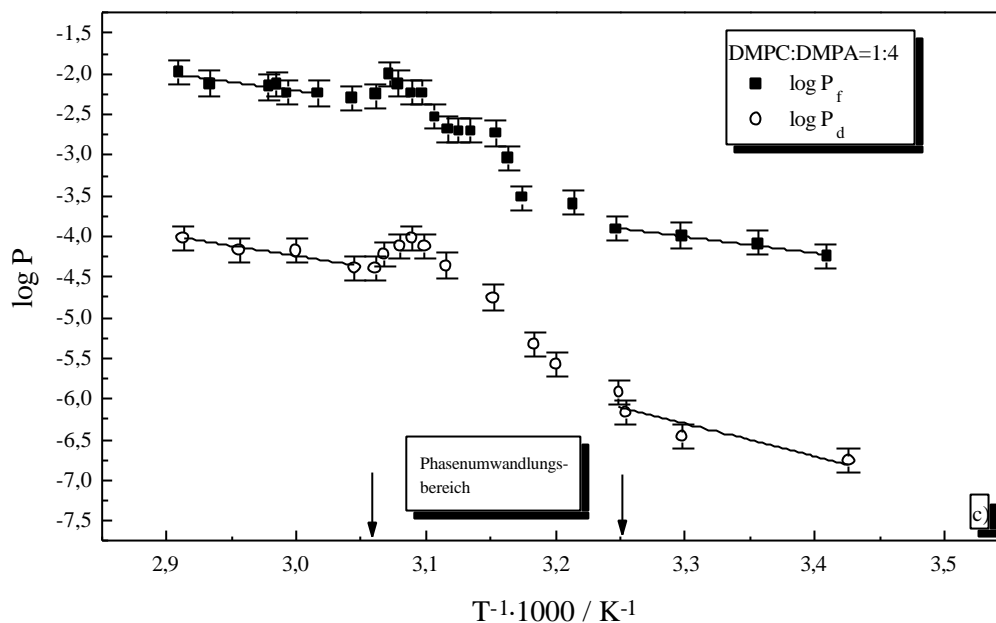


Abbildung 5.1.2: $\log P$ gegen $1/T$ für diffusive Wasserpermeation und osmotisch getriebene Wasserpermeation in Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50$ mM.

Werte für P in $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$:

- a) DMPC:DMPA=4:1
- b) DMPC:DMPA=1:1
- c) DMPC:DMPA=1:4

Die Anfangs- und Endtemperaturen des Phasenumwandlungsbereiches gel \rightarrow flüssig-kristallin sind durch Pfeile symbolisiert. Läßt man den Phasenumwandlungsbereich außer acht, so beobachtet man analog zu den reinen Lipiden eine starke Zunahme der osmotischen und diffusiven Wasserpermeabilität in der flüssig-kristallinen Phase. Mit der Zunahme des Anteils von DMPA im Lipidgemisch steigen die osmotischen und diffusiven Permeabilitätskonstanten. Die Permeabilitätskonstanten für die Gemische liegen zwischen den Werten der Permeabilitätskonstanten der reinen Lipide.

Im Phasenumwandlungsbereich durchlaufen die Werte der Permeabilitätskoeffizienten ein Maximum. Man beobachtet eine starke Zunahme der Wasserpermeabilität zu Beginn der Phasenumwandlung. Danach nimmt die Wasserpermeabilität nur noch geringfügig zu und sie durchläuft ein zweites kleineres Maximum bei den Endtemperaturen des Phasenumwandlungsbereiches. In Tabelle 5.1.3 sind die osmotischen und die diffusiven Permeabilitätskoeffizienten der Lipidgemische zusammengefaßt.

Lipidgemisch DMPC:DMPA (mol:mol)	Temperatur	P_f [cm/s]	P_d [cm/s]	Verhältnis P_f/P_d
4:1	20°C	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-8}$	206
	70°C	$6,2 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	100
1:1	20°C	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$	913
	70°C	$7,2 \cdot 10^{-3}$	$9,4 \cdot 10^{-5}$	76
1:4	20°C	$5,6 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	224
	70°C	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$9,5 \cdot 10^{-5}$	115

Tabelle 5.1.3: Permeabilitätskonstanten der diffusiven und osmotischen Wasserpermeation der Lipidgemische von DMPC:DMPA bei unterschiedlichen Temperaturen.

In Abbildung 5.1.3 wird das Verhältnis P_f/P_d gegen $1/T$ dargestellt, die Anfangs- und Endtemperaturen der Phasenumwandlung gel \rightarrow flüssig-kristallin sind durch Pfeile symbolisiert.

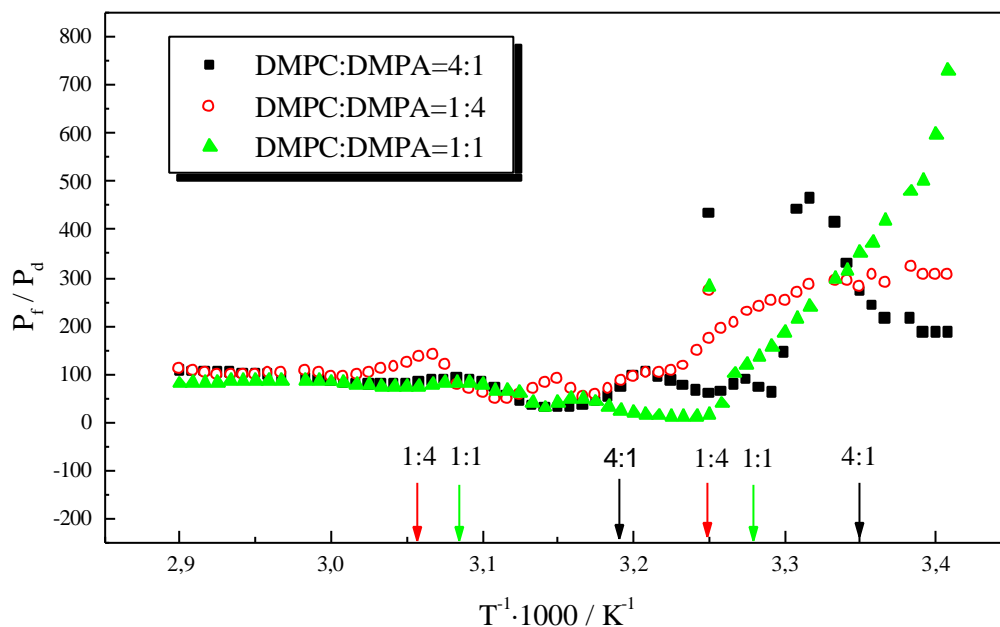


Abbildung 5.1.3: P_f/P_d gegen $1/T$ für diffusive Wasserpermeation und osmotisch getriebene Wasserpermeation in Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50$ mM für die einzelnen Gemische von DMPC/DMPA.

Man beobachtet, daß offensichtlich in der flüssig-kristallinen Phase für alle drei Gemische das Verhältnis P_f/P_d annähernd konstant bleibt, während im Phasenumwandlungsbereich es abzunehmen scheint. Bei tiefen Temperaturen in der Gelphase schwanken die Werte der drei Mischungen stark, was auf die geringere Reproduzierbarkeit bei tiefen Temperaturen zurück zu führen ist.

Analog zu den Ergebnissen der reinen Lipide ist das Verhältnis P_f/P_d immer größer als eins. Die Aktivierungsenergien für die Wasserpermeation durch DMPC/DMPA Membranen sind in Tabelle 5.1.4 zusammengefaßt.

Lipidgemische DMPC:DMPA (mol:mol)	Permeationsprozeß	Gelphase	flüssig-kristalline Phase
4:1	osmotisch	55 kJ/mol	52 kJ/mol
	diffusiv	52 kJ/mol	46 kJ/mol
1:1	osmotisch	17 kJ/mol	52 kJ/mol
	diffusiv	126 kJ/mol	48 kJ/mol
1:4	osmotisch	40 kJ/mol	41 kJ/mol
	diffusiv	78 kJ/mol	48 kJ/mol

Tabelle 5.1.4: Aktivierungsenergien der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation der Lipidgemische von DMPC:DMPA.

In der flüssig-kristallinen Phase liegen die Aktivierungsenergien der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation in einem engen Bereich von 41-52 kJ/mol. Die Aktivierungsenergien in der Gelphase erstrecken sich über einen großen Energiebereich, wobei sie abhängig von der Anzahl der Defekte und Größe der Vesikel sind, womit diese großen Unterschiede in den E_A -Werten zu erklären sind.

5.1.3 Zusammenfassung

Die Permeabilitätskoeffizienten für die Wasserpermeation durch DMPA-Vesikel sind etwas größer als die durch DMPC-Vesikel. Anscheinend spielt die Größe und Ladung der Kopfgruppe eine Rolle bei der Permeation. Im Gegensatz zu DMPC bilden sich starke Wasserstoffbrückenbindungen mit den Kopfgruppen des Lipides DMPA aus, wodurch die H_2O -Moleküle an der Grenzfläche Wasser/Lipid gebunden werden. Dies führt wahrscheinlich zu einer erleichterten Permeation durch die Membran.

Bei den Lipidgemischen von DMPC/DMPA wurde untersucht, ob die Zusammensetzung der Lipiddispersion einem meßbaren Einfluß auf die Permeabilitätskoeffizienten ausübt. Man konnte deutlich erkennen, daß die P_f - bzw. P_d -Werte mit steigendem DMPA-Gehalt in der Lipiddoppelschicht zunahmten.

In der Nähe der Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m der reinen Lipide konnten reproduzierbare Lichtstreuungsergebnisse mit ausreichender Amplitudenänderung in einem Bereich von $2\text{-}3^\circ\text{C}$ um T_m gemessen werden. Man beobachtete eine sprunghafte Zunahme der Wasserpermeabilität im Phasenumwandlungsbereich. Bei den Lipidgemischen von DMPC und DMPA, deren Phasenumwandlung sich über einen großen Temperaturbereich erstreckt, wurden osmotische und diffusive Messungen in dem Temperaturbereich der Phasenumwandlung durchgeführt.

In diesem Phasenumwandlungsbereich durchlaufen die Permeabilitätskonstanten ein Maximum.

Dieser Effekt läßt sich damit erklären, daß sich im Phasenumwandlungsbereich Defektstellen zwischen den Phasendomänen (Gelpase und flüssig-kristalline Phase) ausbilden. Durch diese Defektstellen können sich hydrophobe Poren in der Lipiddoppelschicht ausbilden. Durch Zunahme der Temperatur gehen immer mehr Moleküle in den Konformationszustand der flüssig-kristallinen Phase über, wodurch sich die Domänengrenzen vergrößern. So können sich nicht nur hydrophobe, sondern auch hydrophile Poren bilden (Glaser et al., 1987). Das Maximum der Wasserpermeabilität wird wahrscheinlich erreicht, wenn die Gleichgewichtskonfiguration eingestellt ist.

Die großen Werte für das Verhältnis von P_f zu P_d lassen sich nicht mit dem Löslichkeitsdiffusionsmodell erklären. Die Geschwindigkeit der Wasserpermeation durch die Lipiddoppelschicht ist temperaturabhängig. Eine Aktivierungsenergie für den Permeationsprozeß, die nur gering über der Aktivierungsenergie für die Selbstdiffusion von Wasser liegt, läßt vermuten, daß die Wassermoleküle nahezu ungehindert die Lipidmembran passieren

können. Diese leicht erhöhten E_A -Werte der Wasserpermeation gegenüber der Aktivierungsenergie der Selbstdiffusion von Wasser, können auf die Energie zurückzuführen sein, welche für die Porenbildung durch Lipiddoppelschichten aufgebracht werden muß.

Ein solches Verhalten ist nur mit einem Porenmechanismus zu vereinbaren. Es ist also am wahrscheinlichsten, daß die Wasserpermeation durch transiente Poren erfolgt, die sich durch Defektstellen und thermische Fluktuationen in der Doppelschicht bilden.

5.2 Wasser- und Harnstoffpermeation durch DMPC-Vesikel in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten von Harnstoff

Mit Hilfe der osmotisch getriebenen Wasserpermeation und der nachfolgenden diffusiven Harnstoffpermeation durch DMPC-Vesikel soll der Einfluß des Konzentrationsgradienten auf die Geschwindigkeit der Permeation der Wassermoleküle bzw. Harnstoffmoleküle untersucht werden. Dabei wurden Stopped-Flow Messungen mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen durchgeführt.

5.2.1 Methode der osmotischen Wasser- und Harnstoffpermeation

Ein typisches Experiment wird in Abbildung 5.2.1 gezeigt. Die Vesikel werden in 200 mM Harnstofflösung hergestellt und anschließend mit Wasser vermischt. Das Schwellen und das darauffolgende Schrumpfen der Vesikel läßt sich mit Hilfe der Lichtstreuintensität als Funktion der Zeit messen. Dieses Phänomen läßt sich dadurch erklären, daß wegen des entstandenen Konzentrationsgradienten des Harnstoffs Wasser zuerst von außen in die Vesikel hineinströmt und dadurch die Vesikel ihr Volumen vergrößern. Der nachfolgende langsamere Prozeß beschreibt die Permeation des Harnstoffs aus den Vesikeln (Cohen and Bangham, 1972). Die Umkehrung des Experimentes ist möglich.

t = 0, nach Mischen

t = 1s Wassereinfluß

t = 500s Harnstoffausfluß

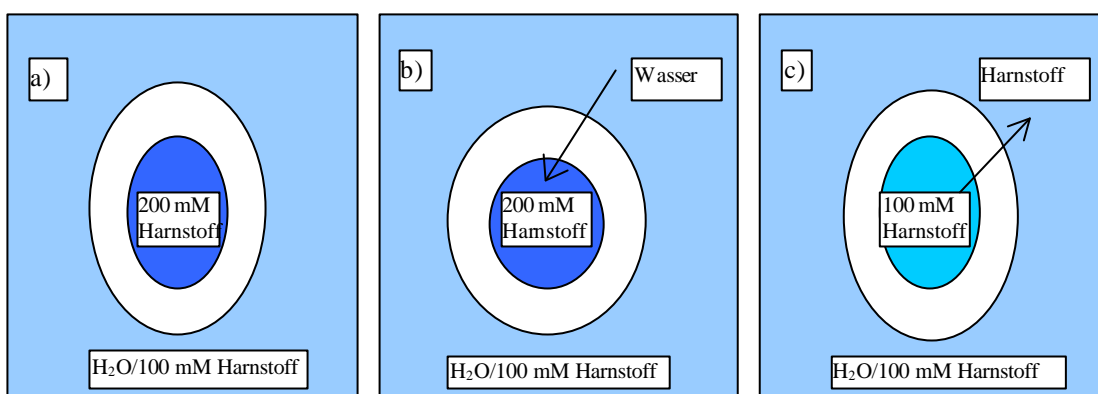


Abbildung 5.2.1:

- Zeigt das Experiment direkt nach dem Einspritzen der beiden Lösungen in die Meßkammer.**
- Die Vesikel schwellen an infolge des schnellen Wassereinflusses.**
- Die Vesikel schrumpfen wegen des folgenden langsamen Harnstoffausflusses.**

In Abbildung 5.2.2 werden als Beispiel die zeitabhängigen Änderungen der Lichtstreuung für die beiden Experimente abgebildet. Es werden jeweils zwei unterschiedliche Exponentialfunktionen mit unterschiedlichen Vorzeichen erhalten (zuerst die schnelle Wasserpermeation und als langsameren zweiten Prozeß die Harnstoffpermeation).

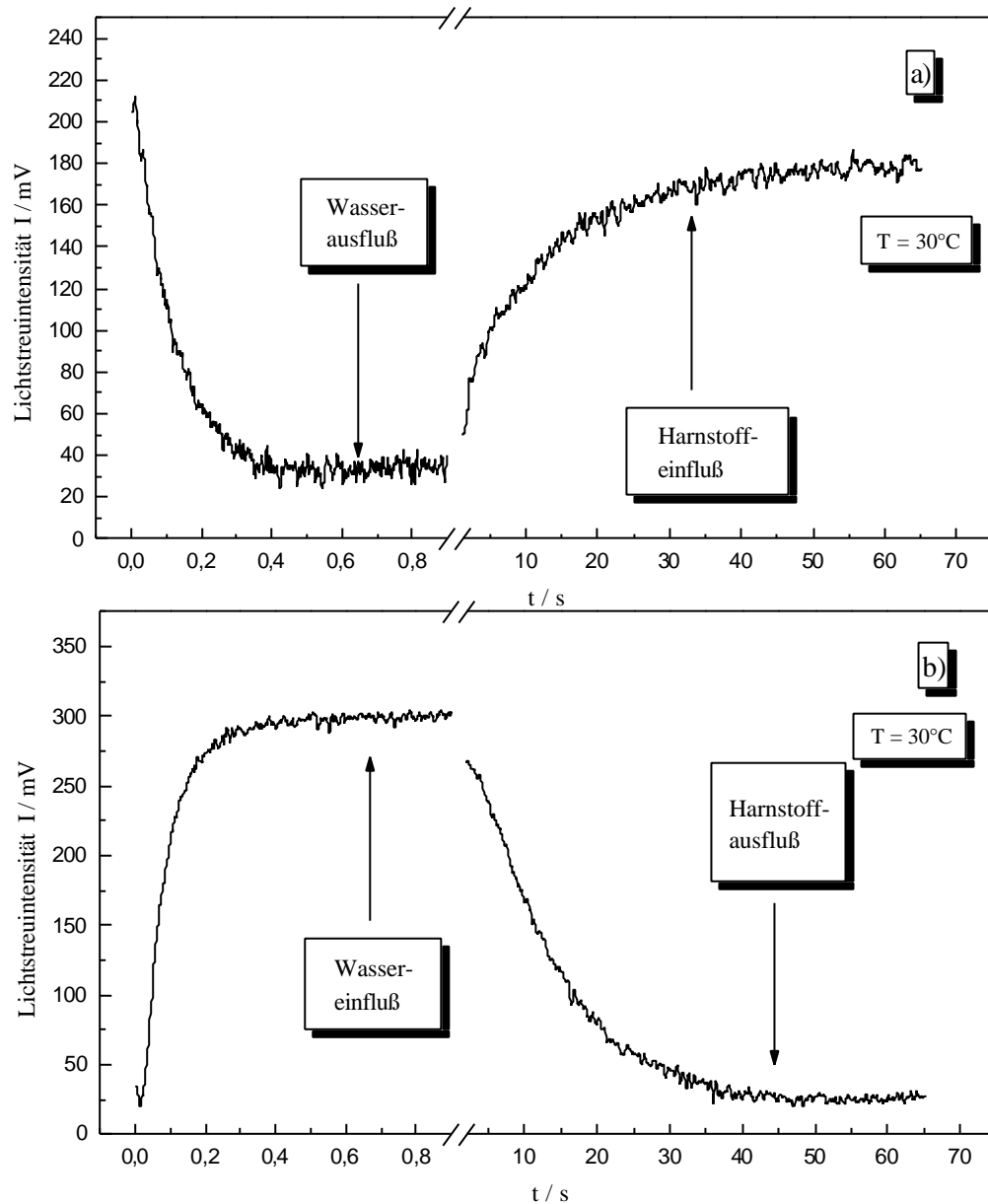


Abbildung 5.2.2: Zeitlicher Verlauf der Lichtstreuintensität, wobei die Intensitätskurve in zwei Teilschritten aufgelöst wurden. In beiden Experimenten liegt ein osmotischer Gradient von 200 mM an.

- a) DMPC in 66,7 mM Phosphatpuffer dispergiert und mit 0,4 M Harnstofflösung/66,7 mM Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 vermischt,
- b) DMPC in 0,4 M Harnstofflösung/66,7 mM Phosphatpuffer dispergiert und mit 66,7 mM Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 vermischt.

In Abbildung 5.2.2a sieht man wie die Streuintensität nach dem Mischen der beiden Reaktanten wegen der schnell verlaufenden Wasserpermeation aus den Vesikeln exponentiell abnimmt. Die nachfolgend langsamere Harnstoffpermeation in die Vesikel kann durch die Zunahme der Streuintensität beobachtet werden. Abbildung 5.2.2b zeigt gerade den umgekehrten Verlauf der Lichtstreuintensität, da hier umgekehrte Konzentrationsgradienten vorliegen.

Sháafi (1967) und Sidel (1957) zeigten, daß eine lineare Wechselbeziehung zwischen Signalintensität und relativem Vesikelvolumen existiert. Außerdem verhalten sich große unilamellare Vesikel wie ideale Osmometer (Bangham et. al., 1967; Bittman and Blau, 1972).

Den osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f für Wasser berechnet man nach folgender Gleichung (Herleitung siehe Kapitel 3.2.2).

$$P_f = \frac{0,05 \cdot r \cdot k}{3 \ln 2} \cdot \frac{RT}{\Pi \cdot V_w}$$

Gleichung 3-15

k = Geschwindigkeitskonstante der Wasserpermeation, r = Radius der Vesikel, V_w = Molvolumen von Wasser, Π = osmotischer Gradient.

Der Permeabilitätskoeffizient P_d für Harnstoff kann aus der Geschwindigkeitskonstanten des zweiten Prozesses berechnet werden (Verkman, 1985; Paula, 1996).

$$P_d = \frac{1}{3} \cdot r \cdot k$$

Gleichung 3-9

k = Geschwindigkeitskonstante der Harnstoffpermeation, r = Radius der Vesikel.

5.2.2 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k für die H_2O -Permeation von der Harnstoffkonzentrationsdifferenz

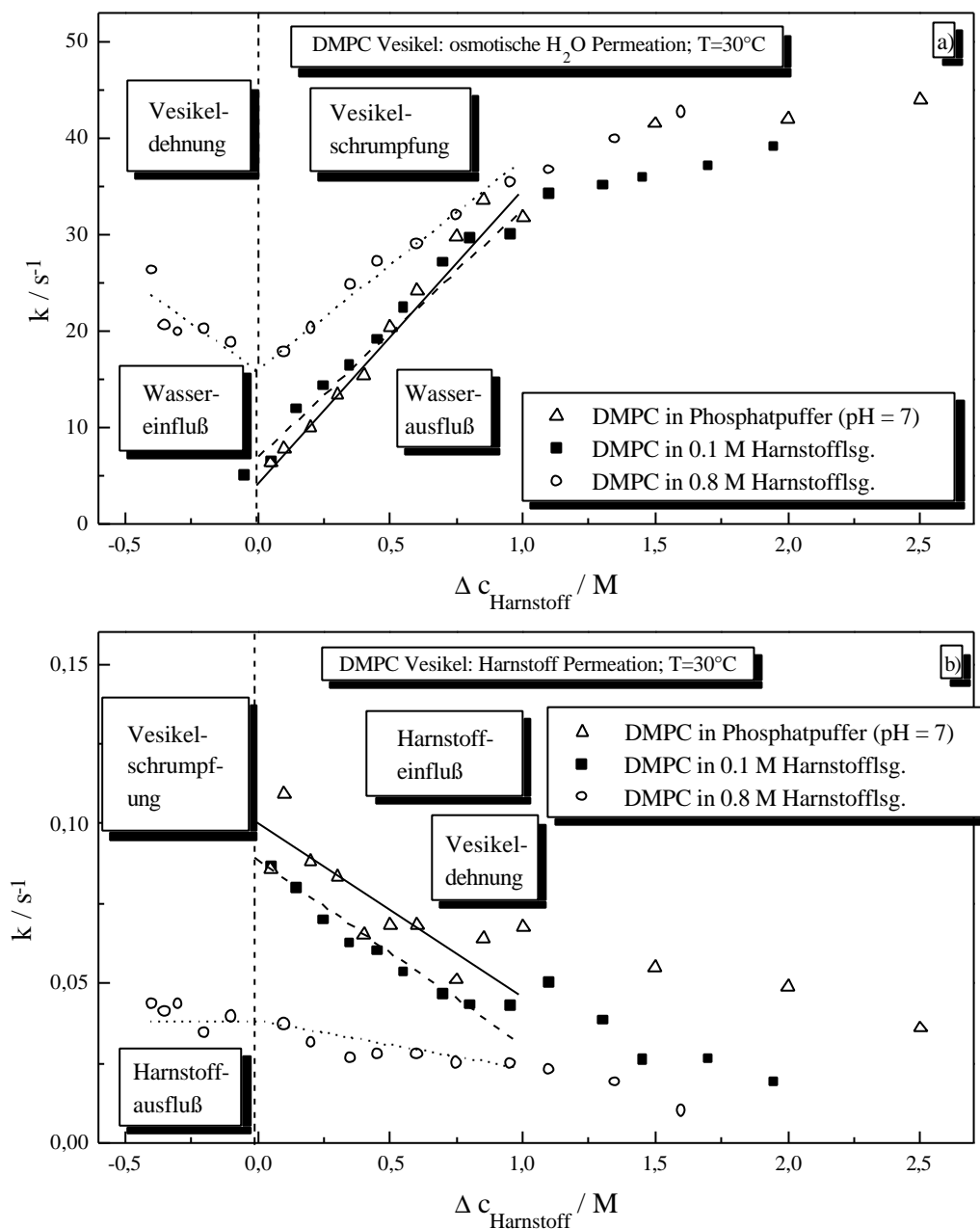


Abbildung 5.2.3:

- Geschwindigkeitskonstante k der osmotischen Wasserpermeation durch DMPC-Vesikel als Funktion des Konzentrationsgradienten von Harnstoff zwischen intra- und extravesikulärem Raum.
- Geschwindigkeitskonstante k für Harnstoffpermeation durch DMPC-Vesikel als Funktion des Konzentrationsgradienten von Harnstoff zwischen intra- und extravesikulärem Raum.

Durch die Untersuchung der Permeation von Wasser und Harnstoff sollte geprüft werden, ob der osmotische Gradient einen Einfluß auf den Permeabilitätskoeffizienten besitzt.

Abbildung 5.2.3a zeigt die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k für die Wasserpermeation von der Harnstoffkonzentration von DMPC-Vesikel bei einer Temperatur von 30°C . Die Vesikel wurden in $66,7\text{ mM}$ Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$), $0,1\text{ M}$ und $0,8\text{ M}$ Harnstofflösung/ $66,7\text{ mM}$ Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) dispergiert und mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen bzw. $66,7\text{ mM}$ Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) vermischt. Für $\Delta c_{\text{Harnstoff}}$ ($\Delta_{\text{außen}} - \Delta_{\text{innen}} < 0$) kommt es zu einer Wasserpermeation in die Vesikel und $\Delta c_{\text{Harnstoff}} > 0$ führt zu einem Wasseraustritt.

Für die Wasserpermeation aus den Vesikeln, welche in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$), $0,1\text{ M}$ bzw. $0,8\text{ M}$ Harnstofflösung dispergiert wurden, ist die Steigung der Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten bis zu einem Gradienten von 1 M konstant. Aus der Steigung läßt sich nach Gleichung (3-15) P_f ermitteln. Für die Vesikel in $0,1$ bzw. $0,8\text{ M}$ Harnstoff liegen die P_f -Werte bei $2,4 \cdot 10^{-3}$ bzw. $1,8 \cdot 10^{-3}\text{ cm/s}$. Offensichtlich ist für Vesikel in $0,8\text{ M}$ Harnstoff der P_f -Wert kleiner.

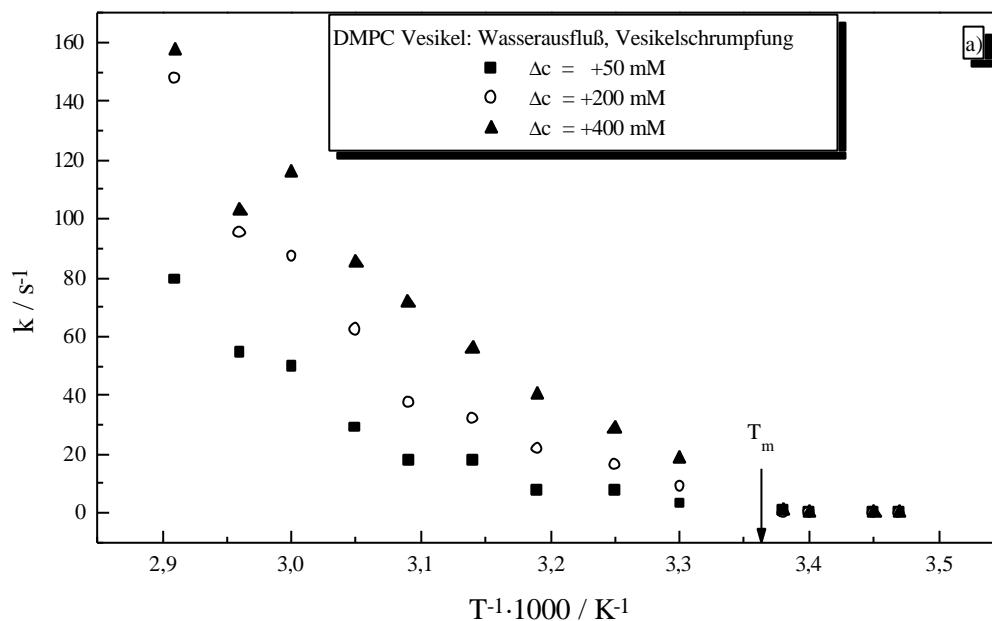
Man erkennt deutlich, daß ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentrationsgradienten und Geschwindigkeitskonstanten besteht. Wobei die Steigung der Geraden für Vesikel in $0,8\text{ M}$ Harnstofflösung dispergiert kleiner ist, als die beiden anderen Geraden, aber die k -Werte sind im gesamten Bereich größer. Dies läßt sich damit erklären, daß beim Vermischen der Reaktanten es zu einem kurzzeitigen Aufreißen der Lipiddoppelschicht kommen kann, wodurch die Wasserpermeation stark ansteigt. Untersuchungen haben gezeigt, daß Lipidmembranen bei Konzentrationsgradienten vom mehr als 400 mM aufreißen können (Hallet et al.,1993; Ertel et al.,1993). Ab einem Konzentrationsunterschied von $\Delta c > 1\text{ M}$ bricht der lineare Zusammenhang ab (siehe Abb. 5.2.3a). Daß bei $\Delta c = 0$ $k \neq 0$ ist, hängt mit der diffusiven Permeation von Wasser durch die Lipidmembran zusammen. Die einzelnen P_d -Werte für die Vesikel in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$), $0,1\text{ M}$ und $0,8\text{ M}$ Harnstoff sind $8,7 \cdot 10^{-6}$, $1,5 \cdot 10^{-5}$ und $3,8 \cdot 10^{-5}\text{ cm/s}$.

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für die Harnstoffpermeation vom Konzentrationsgradienten wird in Abbildung 5.2.3b dargestellt. Auch hier ist wieder ein linearer Zusammenhang zwischen Geschwindigkeitskonstante der Harnstoffpermeation und des osmotischen Gradienten zu erkennen. Man beobachtet, daß mit steigendem Konzentrationsgradienten die Geschwindigkeitskonstante der Harnstoffpermeation leicht linear fällt. Eigentlich sollte man erwarten, daß die Geschwindigkeitskonstante der Harnstoffpermeation unabhängig vom angelegten Gradienten ist.

5.2.3 Temperaturabhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten

5.2.3.1 Osmotische Wasserpermeation

Abbildung 5.2.4 zeigt die Meßergebnisse für die Geschwindigkeitskonstante der osmotischen Wasserpermeation durch DMPC-Vesikel. In Abhängigkeit von verschiedenen Harnstoffkonzentrationen über einen Temperaturbereich, der die Phasenumwandlung beinhaltet, wurden die Geschwindigkeitskonstanten gemessen. In beiden Abbildungen zeigen die dargestellten Messungen einen Anstieg von P_f an der Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m . In der Gelphase ist nur eine äußerst geringe Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zu beobachten.



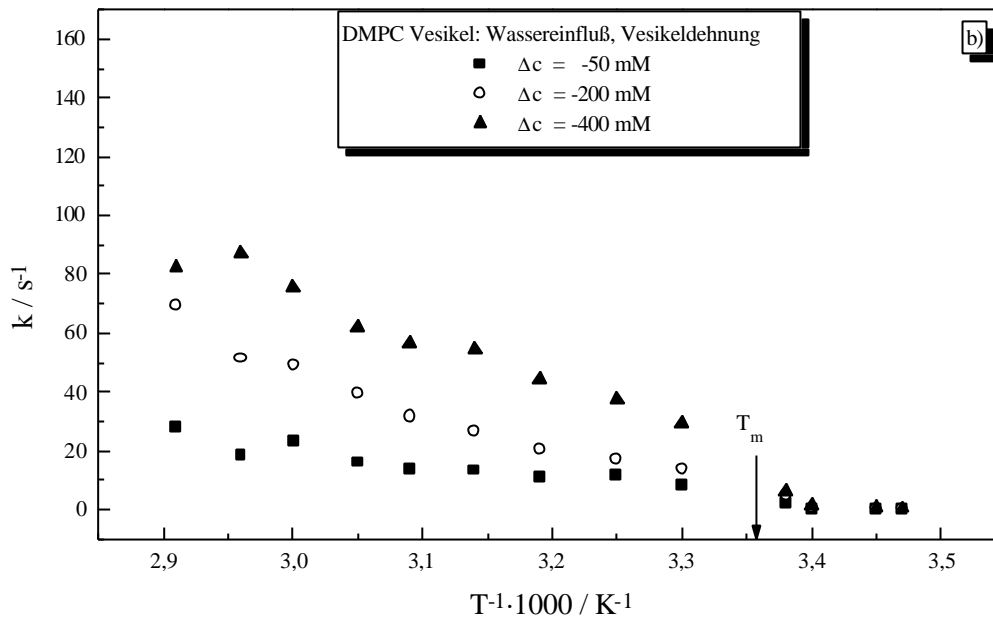


Abbildung 5.2.4: Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k der osmotisch getriebenen Wasserpermeation.

- a) Osmotisch getriebene Wasserpermeation aus DMPC-Vesikeln bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50, 200$ und 400 mM.
- b) Osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = -50, -200$ und -400 mM.

Abbildung 5.2.4a zeigt Ergebnisse für den Wasserausfluß, die Vesikel schrumpfen. Für die flüssig-kristalline Phase liegen die k -Werte in einem Bereich von $3\text{--}157$ s^{-1} und nehmen mit steigender Temperatur zu. Mit der Zunahme des osmotischen Gradienten nimmt auch die Geschwindigkeitskonstante der Wasserpermeation zu, wie bereits vorher beschrieben.

In Abbildung 5.2.4b sind die Vesikel in verschiedenen Harnstoffkonzentrationen dispergiert und werden mit Phosphatpuffer (pH = 7) vermischt. Das Wasser permeiert in die Vesikel und diese dehnen sich aus, d.h. die Lipiddoppelschicht wird gedehnt. Die Ergebnisse sind ähnlich wie für den Schrumpfungsprozeß. Man beobachtet wieder eine Zunahme der Wasserpermeabilität an der Hauptphasenumwandlung gel \rightarrow flüssig-kristallin. Die Werte für k liegen in der flüssig-kristallinen Phase zwischen $8\text{--}82$ s^{-1} , in der Gelphase sind sie kleiner als 6 s^{-1} . Analog zu Experiment 5.2.4a nimmt mit Zunahme des Gradienten auch die Geschwindigkeitskonstante der Wasserpermeation zu. Auffällig ist zudem, daß die Geschwindigkeitskonstante k der osmotische Wasserpermeation aus den Vesikeln, ab einer

Temperatur von ca. 45°C größer ist als beim umgekehrten Experiment, d.h. der Wasserfluß aus den Vesikeln ist schneller als der Wasserfluß in die Vesikel.

Die Permeabilitätskoeffizienten der Wasserpermeation lassen sich nun aus den gemessenen k -Werten nach Gleichung (3.15) berechnen. In Abbildung 5.2.5 sind die Ergebnisse dargestellt.

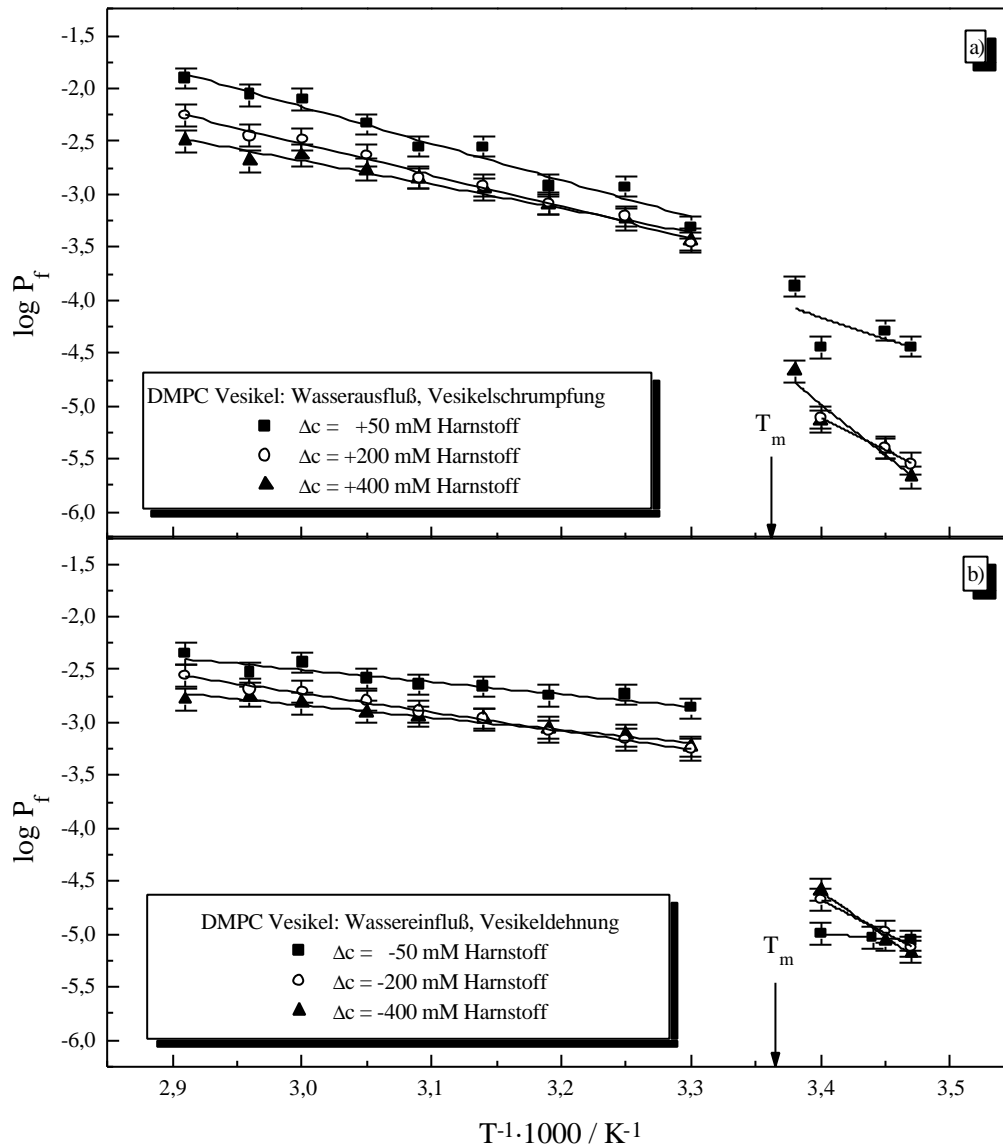


Abbildung 5.2.5: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation. Werte für P_f in cm s^{-1} .

- Osmotisch getriebene Wasserpermeation aus DMPC-Vesikeln bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff von $\Delta c = 50, 200$ und 400 mM in $66,7$ mM Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$).
- Osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff von $\Delta c = -50, -200$ und -400 mM in $66,7$ mM Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$).

Die durch lineare Regression aus den Arrheniusplots berechneten Aktivierungsenergien variieren oberhalb und unterhalb der Hauptphasenumwandlung stark. Für die Wasserpermeation in der flüssig-kristallinen Phase ist die Aktivierungsenergie kleiner für schwellende Vesikel ($E_A = 21\text{-}33\text{ kJ/mol}$) verglichen mit schrumpfenden Vesikeln ($E_A = 43\text{-}66\text{ kJ/mol}$). Abbildung 5.2.6 verdeutlicht, daß bei der Wasserpermeabilität Unterschiede zwischen Wassereinfluß und Wasserausfluß bestehen.

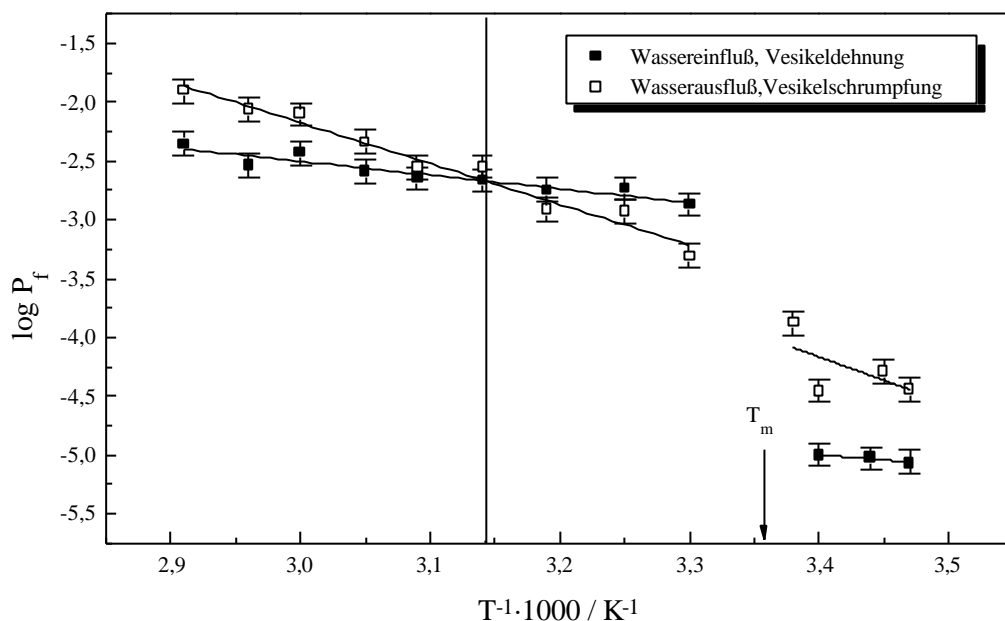


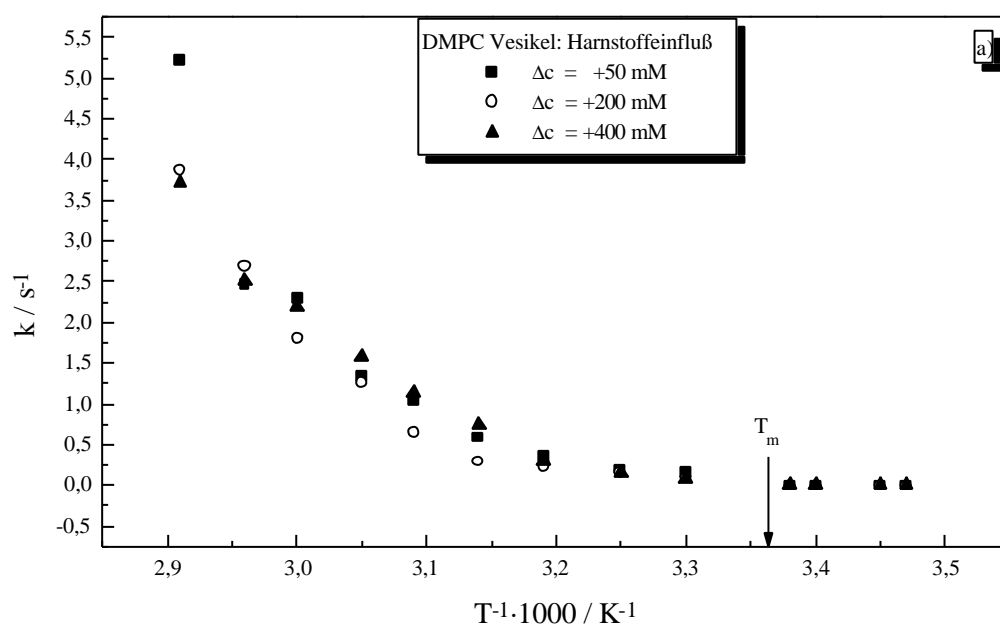
Abbildung 5.2.6: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in die und aus den Vesikeln bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50\text{ mM}$. Werte für P_f in cm s^{-1} .

Direkt nach der Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m sind die P_f -Werte der Wasserpermeation aus den Vesikeln kleiner verglichen mit den P_f -Werten der Wasserpermeation in die Vesikel (vgl. Tabelle 5.2.2, bei $T=30^\circ\text{C}$). Ab einer Temperatur von ca. 45°C spiegelt sich dieses Phänomen, d.h. die Wasserpermeation aus den Vesikeln ist jetzt größer als die Permeation in die Vesikel. Allerdings wurde bei beiden Experimenten eine Volumenänderung von 5% für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ angenommen. Diese Änderung zeigt für schwellende Vesikel eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten von Carruthers und Melchior (1983). Jedoch liegen keine Werte für Volumenänderungen bei schrumpfenden Vesikeln vor.

keln vor. Zwar gibt es Untersuchungen, die zeigen, daß sich die Vesikel stark verformen und Einstülpungen auftreten können, welche wie Hasenohren aussehen. Man kann also nicht davon ausgehen, daß schrumpfende Vesikel eine sphärische Form beibehalten. Um aber die Permeabilitätskoeffizienten miteinander vergleichen zu können wurde eine Volumenänderung von 5% für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für schrumpfende und schwellende Vesikel angenommen.

5.2.3.2 Diffusive Harnstoffpermeation

In den Abbildungen 5.2.7 wird die Geschwindigkeitskonstante k für die Harnstoffkonzentration gegen die reziproke Temperatur dargestellt. Es zeigt sich in beiden Darstellungen a) bzw. b), daß bei steigender Temperatur die Permeationsgeschwindigkeit zunimmt und die k -Werte in der flüssig-kristallinen Phase fast übereinstimmen. Die Differenz der Harnstoffkonzentration zwischen intra- und extravesikulärem Raum beeinflusst anscheinend nicht die Geschwindigkeitskonstante. Die k -Werte in der Gelphase weisen eine große Bandbreite auf, was sich mit einer erheblichen Verlängerung der Aufnahmezeit des Experimentes gegenüber des Systems in der flüssig-kristallinen Phase erklären läßt.



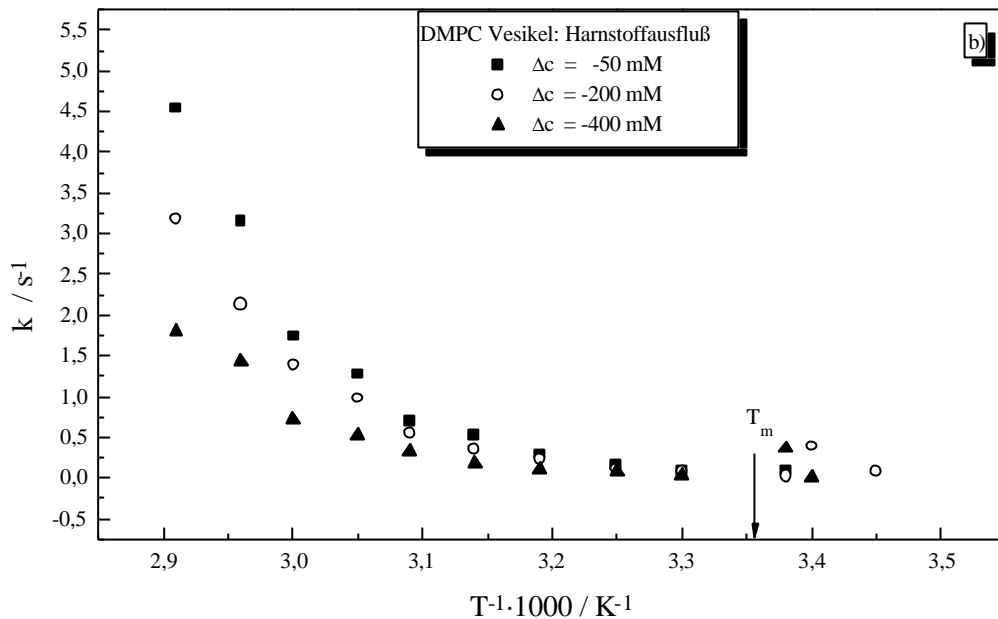


Abbildung 5.2.7: Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k der diffusiven Harnstoffpermeation.

- a) Diffusive Harnstoffpermeation in geschrumpfte DMPC-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50, 200$ und 400 mM.
- b) Diffusive Harnstoffpermeation aus gedehnten DMPC-Vesikeln bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = -50, -200$ und -400 mM.

Die diffusiven Permeabilitätskoeffizienten der Harnstoffpermeation wurden aus den gemessenen k -Werten berechnet. Abbildung 5.2.8 zeigt die Abhängigkeit von $\log P_d$ für die Harnstoffpermeation von der Temperatur. Die Aktivierungsenergien für die Harnstoffpermeation wurden wiederum durch lineare Regression bestimmt und ergaben Werte um die 80 kJ/mol oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur.

In Abbildung 5.2.8a wird der Harnstoffeinstrom in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationsgradienten abgebildet. In der flüssig-kristallinen Phase bewegen sich die Werte P_d zwischen $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s.

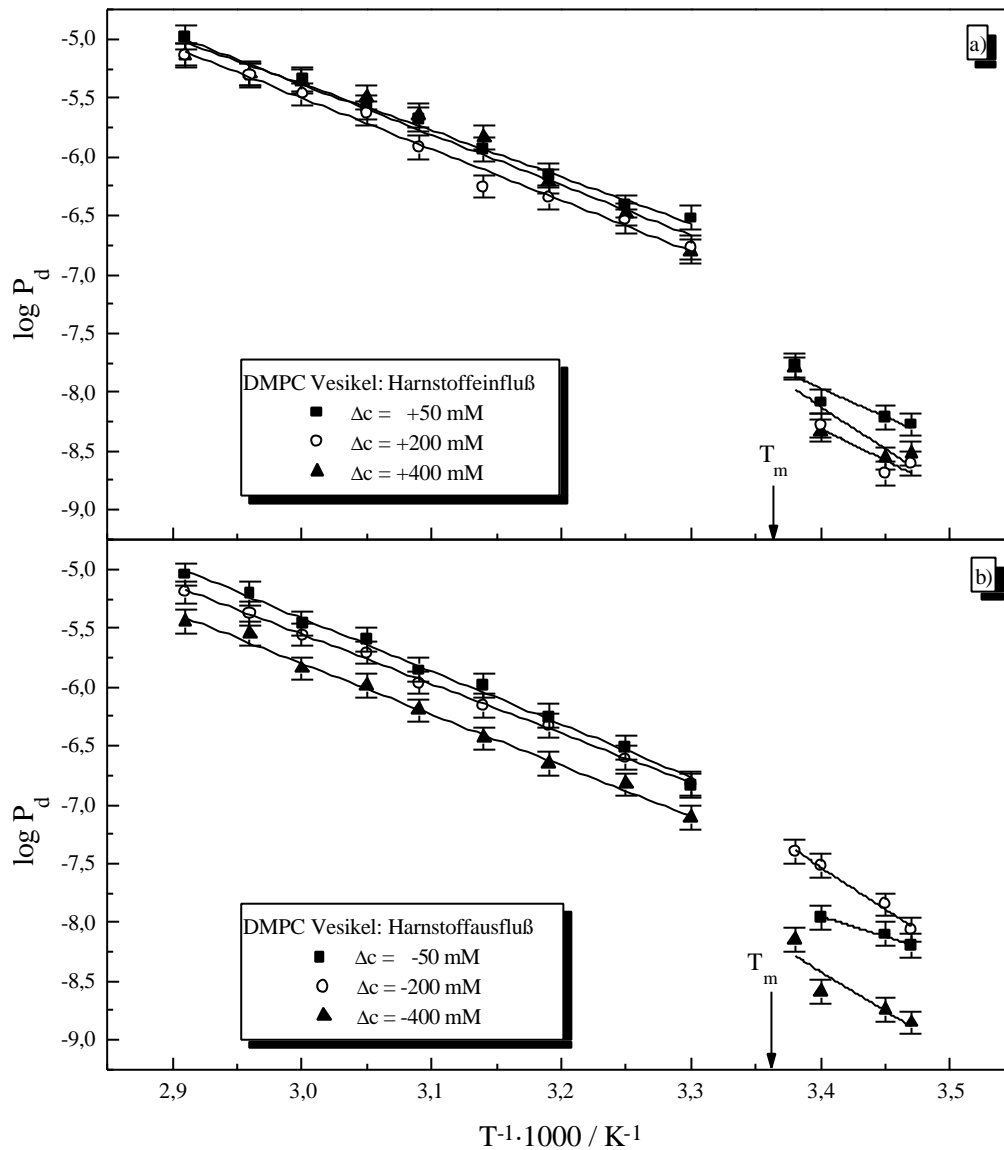


Abbildung 5.2.8: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive Harnstoffpermeation.

Werte für P_d in $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

- a) Diffusive Harnstoffpermeation in geschrumpfte DMPC-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 50, 200$ und 400 mM.
- b) Diffusive Harnstoffpermeation aus gedehnten DMPC-Vesikeln bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = -50, -200$ und -400 mM.

Analog zeigt Abbildung 5.2.8b die Meßergebnisse der Harnstoffpermeation aus den Vesikeln. In der flüssig-kristallinen Phase differieren die P_d -Werte nur geringfügig und liegen innerhalb der Meßgenauigkeit ($P_d = 7 \cdot 10^{-8} - 9 \cdot 10^{-6}$ cm/s).

In der Gelphase schwanken die Permeabilitätskonstanten bei beiden Experimenten (a, b) in einem Bereich von $1 \cdot 10^{-9} - 3 \cdot 10^{-8}$ cm/s.

Die Richtung der Harnstoffpermeation hat keinen Einfluß auf die Werte der Permeabilitätskonstanten, da sich die P_d -Werte für Harnstoffeinfluß bzw. Ausfluß nur unwesentlich unterscheiden.

Einen Überblick über alle Ergebnisse gibt Tabelle 5.2.1. Hier sind die Geschwindigkeitskonstanten k für osmotisch getriebene Wasserpermeation und die diffusive Harnstoffpermeation bei unterschiedlichen Konzentrationsgradienten zusammengefaßt.

komprimierte Doppelschicht							gedehnte Doppelschicht					
Wasserausfluß			Harnstoffeinfluß				Wassereinfluß			Harnstoffausfluß		
$\Delta c/\text{mM}$	+50	+200	+400	+50	+200	+400	-50	-200	-400	-50	-200	-400
T = 21°C	0,2	0,2	0,4	0,04	0,03	0,001	0,1	0,5	1,3	0,003	0,003	0,002
T = 30°C	3,1	9,2	18,5	0,07	0,08	0,04	9	14	29	0,2	0,09	0,08
T = 70°C	79	148	157	5	3	2	28	69	82	5	4	4

Tabelle 5.2.1 Geschwindigkeitskonstanten der osmotischen Wasser- bzw. der diffusen Harnstoffpermeation. Werte für die Geschwindigkeitskonstante k in 1/s.

Die gemessene Geschwindigkeitskonstante k scheint bei der Harnstoffpermeation durch gedehnte Vesikel eine größere Konzentrationsabhängigkeit zu zeigen (siehe Abbildung 5.2.7b) und zwar bei allen gemessenen Temperaturen.

In Tabelle 5.2.2 sind die Permeabilitätskoeffizienten P_f bzw. P_d für osmotisch getriebenen Wasserpermeation und der diffusiven Harnstoffpermeation zusammengefaßt.

	komprimierte Doppelschicht			gestreßte Doppelschicht		
	Wasserausfluß			Wassereinfluß		
$\Delta c/mM$	+50	+200	+400	-50	-200	-400
$T = 20^\circ C$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$7,7 \cdot 10^{-6}$	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$
$T = 30^\circ C$	$4,9 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$5,9 \cdot 10^{-4}$
$T = 70^\circ C$	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
	Harnstoffeinfluß			Harnstoffausfluß		
$\Delta c/mM$	+50	+200	+400	-50	-200	-400
$T = 20^\circ C$	$8,3 \cdot 10^{-9}$	$5,3 \cdot 10^{-9}$	$4,7 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$2,6 \cdot 10^{-9}$
$T = 30^\circ C$	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$7,7 \cdot 10^{-8}$
$T = 70^\circ C$	$1 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-6}$	$7,4 \cdot 10^{-6}$	$9,0 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 5.2.2: Permeabilitätskoeffizienten P_f bzw. P_d für die osmotisch getriebene Wasserpermeation und die diffusive Harnstoffpermeation. Werte für P_f und P_d in cm/s.

5.2.4 Permeation im Phasenumwandlungsbereich

In Abbildung 5.2.9 wird das Permeationsverhalten der Wassermoleküle im Phasenumwandlungsbereich von DMPC dargestellt. Es wurden DMPC-Vesikel in 1 M Harnstofflösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) dispergiert und anschließend mit 66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) vermischt.

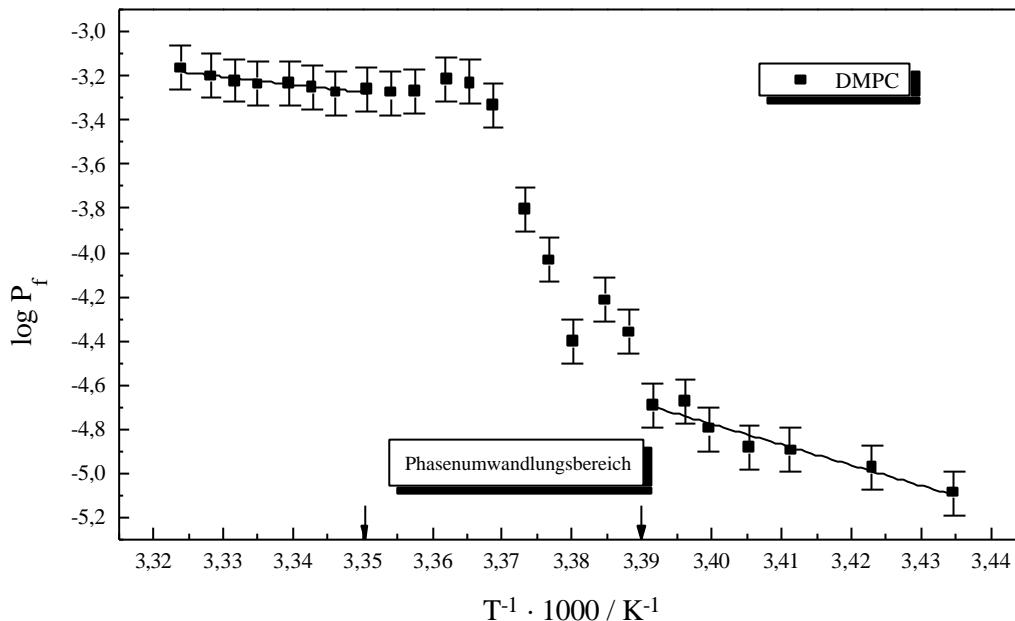


Abbildung 5.2.9: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC-Vesikel im Phasenumwandlungsbereich bei einem Konzentrationsgradienten für Harnstoff/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) von $D_c = 500$ mM. Werte für P_f in cm s^{-1} .

Der Phasenumwandlungsbereich wird mit zwei Pfeilen kenntlich gemacht. Man beobachtet eine Zunahme der Permeabilität, wenn man sich dem Phasenumwandlungsgebiet nähert. Ein Maximum der Wasserpermeation wird im Phasenumwandlungsbereich beobachtet. In früheren Untersuchungen konnte dieses Phänomen zwar beobachtet werden (Jansen und Blume, 1995), aber reproduzierbare Daten wurden wegen der geringen Lichtstreuintensität bzw. kurzen Relaxationszeiten nicht erhalten. Für Ionenpermeabilitätsmessungen sind Permeationszeiten im Phasenumwandlungsbereich bekannt (Antonov et al., 1980), da es sich hier um einen sehr viel langsameren Permeationsprozeß handelt. Es scheint, daß die Permeabilität der Doppelschicht im Phasenumwandlungsbereich für Wassermoleküle zunimmt.

5.2.5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Stopped-Flow Methode wurde die Abhängigkeit der osmotisch getriebenen Wasser- und der diffusiven Harnstoffpermeation durch 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin Vesikel von der Harnstoffkonzentration untersucht. Die stark unterschiedlichen Permeabilitätskoeffizienten der Wasser- und Harnstoffpermeation legen den Verdacht nahe, daß die beiden Moleküle auf verschiedenen Wegen die Lipiddoppelschicht durchdringen.

In der Literatur werden verschiedene Permeationsmodelle beschrieben.

Der Löslichkeitsdiffusionsmechanismus (Hanai und Haydon, 1966; Finkelstein und Cass, 1968; Lieb und Stein, 1969; Reeves und Dowben, 1970; Träuble, 1971; Stein, 1990), die Permeation durch Poren und fluktuierende Defekte oder transiente Poren der Lipiddoppelschicht (Huang und Thompson, 1966; Carruthers und Melchior, 1983; Lawaczeck, 1988; Jansen und Blume, 1995) und das Freie-Volumen-Modell (Turnbull und Cohen, 1969; Xiang, 1993; Xiang und Anderson, 1994; 1997; 1998). Nach den Ergebnissen der Stopped-Flow Messungen ist anzunehmen, daß die osmotische Wasserpermeation durch fluktuierende Defekte oder transiente Poren der Lipiddoppelschicht abläuft und die Harnstoffpermeation eher dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus folgt. Dies läßt sich durch folgende Überlegungen untermauern. Der nach Gleichung (3-15) berechnete P_f -Wert der osmotischen Wasserpermeation für $T = 30^\circ\text{C}$ (vgl. Tab. 5.2.2) liegt um eine Zehnerpotenz höher als der Verteilungskoeffizient von Wasser in Hexadecan ($K_p = 4,2 \cdot 10^{-5}$ für $T = 25^\circ\text{C}$, Finkelstein, 1976). Diese Abweichung kann man nicht mit dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus erklären. Hingegen stimmen die nach Gleichung (3-9) berechneten Permeabilitätskoeffizienten P_d der Harnstoffpermeation für $T = 30^\circ\text{C}$ (vgl. Tab. 5.2.2) gut mit dem Verteilungskoeffizient für Harnstoff in Hexadecan ($K_p = 2,8 \cdot 10^{-7}$ für $T = 25^\circ\text{C}$, Walter und Gutknecht, 1986) überein.

Einen Hinweis für den Permeationsmechanismus der beiden Moleküle durch Lipiddoppelschichten liefert die Aktivierungsenergie, die für den Transport der beiden Moleküle benötigt wird. Die Aktivierungsenergien E_A für die Wasserpermeation liegen in einem Bereich von 21-33 kJ/mol für schwellende Vesikel und 43-66 kJ/mol für schrumpfende Vesikel. Die unterschiedlichen E_A -Werte deuten darauf hin, daß ein Wasserfluß in die Vesikel leichter abläuft als aus den Vesikeln. Diese Werte liegen zwischen denen von Carruthers und Melchior (1983) ($E_A = 10-27$ kJ/mol) und denen von Lawaczeck (1988) ($E_A = 167-184$ kJ/mol). Verglichen mit den Werten von Jansen und Blume (1995) zeigen sie eine gute

Übereinstimmung. Für die Selbstdiffusion von Wasser wurde eine Aktivierungsenergie von 20 kJ/mol gefunden (Landolt-Börnstein, 1961; Sháafi, 1981). Die hier gemessenen Aktivierungsenergien für die Wasserpermeation sind demnach doppelt so hoch, wie die für die Selbstdiffusion von Wasser. Die erhöhten E_A -Werte können auf die Energie zurückzuführen sein, die für die Porenbildung benötigt wird. Die Differenz der Aktivierungsenergien zwischen schrumpfenden und wachsenden Vesikeln läßt vermuten, daß die Bildung von Poren oder transienten Defekten in gedehnten Lipiddoppelschichten wahrscheinlich leichter als in zusammengepreßten Doppelschichten abläuft.

Ein solches Verhalten läßt sich mit einem Wassertransport durch Poren und fluktuierende Defekte oder transiente Poren, die den hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht durchspannen, erklären.

Für die Harnstoffpermeation liegen die Aktivierungswerte bei 80 kJ/mol. Die höhere Aktivierungsenergie der Harnstoffpermeation würde für den Löslichkeitsdiffusionsmechanismus sprechen, da hier eine größere Aktivierungsbarriere überwunden werden muß. Außerdem werden hier Aktivierungsenergien gefunden, die für gedehnte und geschrumpfte Vesikel gleich sind.

Im Umwandlungsbereich zwischen Gelphase zur flüssig-kristallinen Phase konnten reproduzierbare Lichtstreukurven mit genügenden Amplituden gemessen werden. Die Permeabilitätskoeffizienten durchlaufen im Umwandlungsbereich ein Maximum (vgl. Lipidgemische). Im Phasenumwandlungsbereich erfolgt die Permeation wahrscheinlich durch Defektstellen an den Domänengrenzen zwischen Gelphase und flüssig-kristalliner Phase.

Die Wasserpermeation durch Phospholipiddoppelschichten ist ca. 100-fach schneller als die Harnstoffpermeation. Diese große Differenz der beiden Permeabilitätskoeffizienten kann entstehen, wenn die Wasserpermeation weitgehend durch Lipiddoppelschichten mittels kooperativen Bewegungen der Wassermoleküle durch Poren oder transiente Defekte erfolgt und die Harnstoffpermeation nach dem Löslichkeitsdiffusionsmodell abläuft.

5.3 Osmotische Wasserpermeation durch Bilayer aus Gemischen von Phosphatidylcholinen und Phosphatidsäuren

5.3.1 Permeabilität von Vesikeln aus den Phosphatidsäuren DMPA und DPPA bzw. den Phosphatidylcholinen DMPC und DPPC

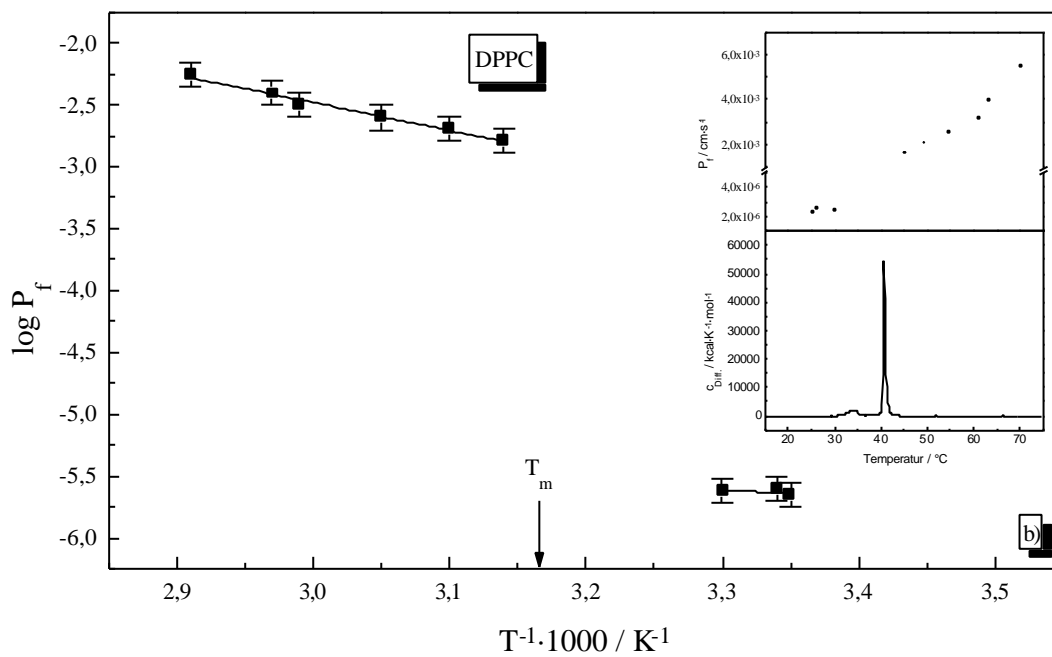
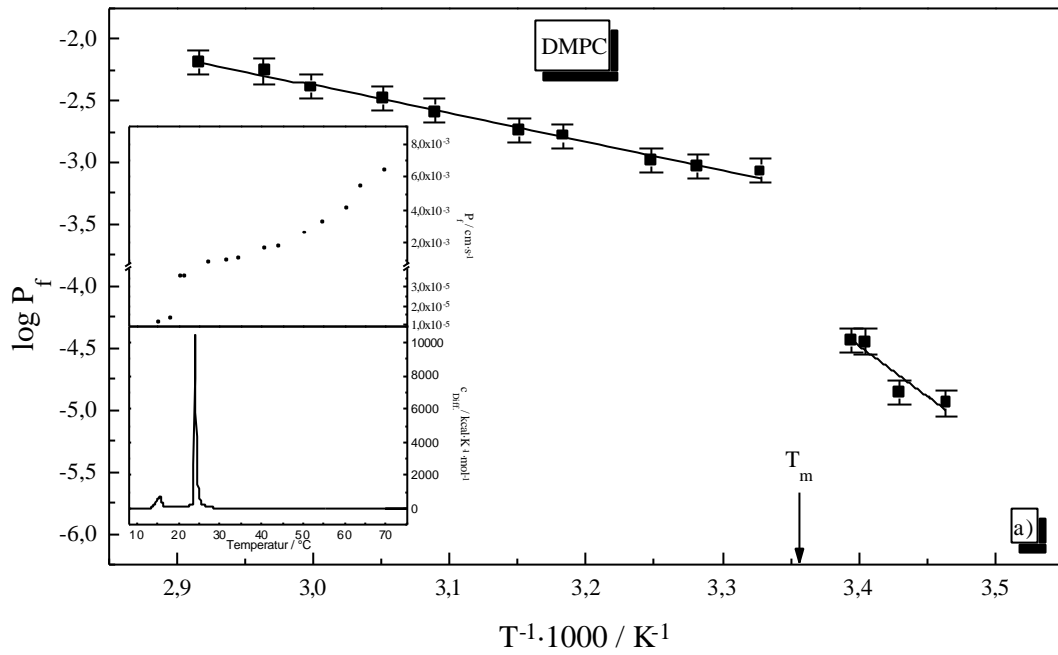
Durch die Untersuchung der Phosphatidsäuren DMPA und DPPA sowie der Phosphatidylcholine DMPC und DPPC soll gezeigt werden, ob die Dicke des hydrophoben Teils der Lipiddoppelschicht und die Größe und Ladung der Kopfgruppe der Lipidmoleküle einen meßbaren Einfluß auf die Geschwindigkeit der osmotischen Wasserpermeation besitzt.

Die Kopfgruppen sind zwitterionisch (Phosphatidylcholine) bzw. bei $\text{pH} = 7$ einfach negativ geladen (Phosphatidsäuren).

Die Lipide wurden in 100 mM/66,7 mM Glucoselösung/Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) hergestellt und mit 66,7 mM Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) vermischt.

In den folgenden Abbildungen sind die Permeabilitätskonstanten der osmotischen Wasserpermeation dargestellt. Desweiteren sind in den einzelnen Abbildungen die Kalorigramme und die osmotischen Permeabilitätskonstanten gegen die Temperatur abgebildet.

Abbildung 5.3.1 zeigt die Meßergebnisse der osmotischen Wasserpermeation für die Phospholipide DMPC, DPPC, DMPA und DPPA.



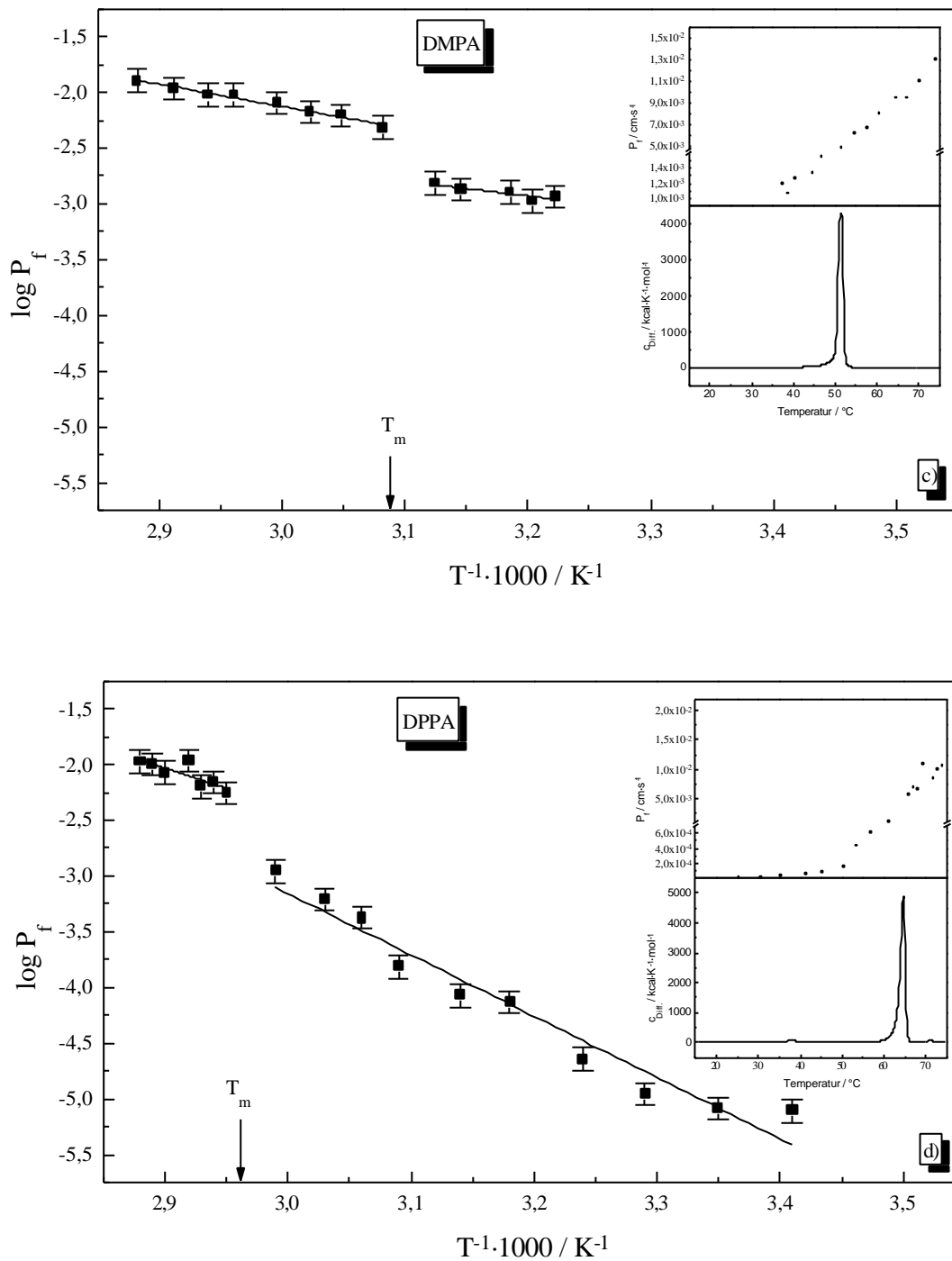


Abbildung 5.3.1: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC; DPPC; DMPA und DPPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50$ mM. Werte für P_f in cm/s.

Die Lage der Phasenumwandlungstemperatur der Lipide wurde jeweils mit einem Pfeil kenntlich gemacht.

Alle Lipide zeigen eine Zunahme der Wasserpermeabilität an der Phasenumwandlung gel \rightarrow flüssig-kristallin. Die Zunahme ist bei den Phosphatidylcholinen stärker ausgeprägt als bei den Phosphatidsäuren, bei denen die P_f -Werte nur um den Faktor 3 bis 5 zunehmen.

In der flüssig-kristallinen Phase differieren die P_f -Werte der Lipide nur geringfügig und liegen für DMPC und DPPC im Bereich von $9 \cdot 10^{-4}$ - $6 \cdot 10^{-3}$ cm/s und für die Lipide DMPA und DPPA in einem Bereich von $5 \cdot 10^{-3}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ cm/s. Es scheint, daß die Variation der Länge der Fettsäureketten oberhalb der Phasenumwandlung keinen meßbaren Einfluß auf die osmotische Wasserpermeation besitzt. Dagegen übt anscheinend die Größe und Ladung der Kopfgruppe einen Einfluß auf die Wasserpermeation aus. Die P_f -Werte der Phosphatidylcholine sind etwa halb so groß wie die Werte der osmotischen Wasserpermeation von Phosphatidsäuren in der flüssig-kristallinen Phase. Durch die größere Polarität der Kopfgruppe von DMPA und DPPA kommt es zu einer stärkeren Hydratisierung im Kopfgruppenbereich, was wahrscheinlich zu einer schnelleren Wasserpermeation führt.

Die Aktivierungsenergien werden analog zu Abschnitt (5.1) und (5.2) aus den Arrheniusplots mit Hilfe der linearen Regression berechnet. Die Werte sind in Tabelle 5.3.1 zusammengefaßt.

Lipide	Gelphase	flüssig-kristalline Phase
DMPC	155 kJ/mol	44 kJ/mol
DPPC	6 kJ/mol	43 kJ/mol
DMPA	68 kJ/mol	44 kJ/mol
DPPA	105 kJ/mol	57 kJ/mol

Tabelle 5.3.1: Aktivierungsenergien der osmotischen Wasserpermeation.

Die Aktivierungsenergien der osmotischen Wasserpermeation in der flüssig-kristallinen Phase liegen in einem engen Bereich von 43-57 kJ/mol und stimmen mit den Ergebnissen in den Abschnitten (5.1) und (5.2) gut überein. Die E_A -Werte der Gelphase schwanken zwischen 6 und 155 kJ/mol, was auf Defekte und unterschiedliche Größen der Lipidvesikel schließen läßt.

5.3.2 Permeation durch DMPC/DPPC und DMPA/DPPA-Membranen

Ein weiteres Ziel bei den osmotischen Permeationsmessungen war es, die Permeationseigenschaften von Lipidmembranen im Phasenumwandlungsbereich näher zu untersuchen. Dies ist bei Lipidgemischen eher möglich, da hier der Phasenumwandlungsbereich breiter ist, als bei den untersuchten reinen Lipiden. Dabei wurden Lipidgemische mit unterschiedlicher Acylkettenlänge und gleicher Kopfgruppe vermessen.

In früheren Untersuchungen (Jansen und Blume 1995) war es nicht möglich, reproduzierbare Lichtstreuungssignale mit ausreichenden Amplitudenänderungen in einem Bereich von 3-4°C um T_m herum zu messen. Dies lag vor allem daran, daß die Relaxationszeiten der Wasserpermeation innerhalb der Totzeit der Stopped-Flow Apparatur lagen.

In Abbildung 5.3.2 wird die Amplitude der Lichtstreuung des Lipidgemischs DMPC:DPPC=1:1 gegen die Temperatur aufgetragen.

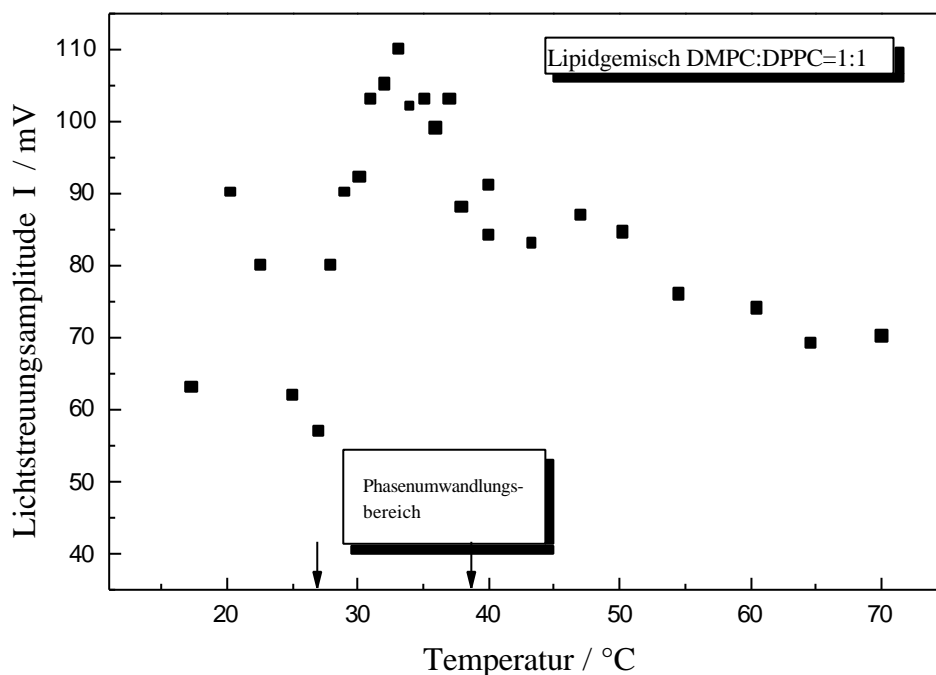


Abbildung 5.3.2: Temperaturabhängigkeit der maximalen Amplitude der Lichtstreuung des binären Gemisches von DMPC:DPPC=1:1 am Beispiel der Messung aus Abbildung 5.3.3.

Die Maximalamplituden des Lichtstreuensignals beim osmotischen Experiment liegen unterhalb und oberhalb der Phasenumwandlung im Bereich von 60 bis 90 mV. Im Temperaturbereich der Phasenumwandlung von 27 bis 39 °C liegen die registrierten Amplituden im Bereich von 90 bis 110 mV, also oberhalb der Amplituden von Gelphase und flüssig-kristalliner Phase. Die Ursache für die Zunahme der Amplitude hängt wahrscheinlich mit einer stärkeren Brechungsindex- bzw. mit einer größeren Volumenänderung im Phasenumwandlungsbereich zusammen. Die Zunahme der Amplitude im Phasenumwandlungsbereich wurde für alle binären Lipidgemische beobachtet.

Analog zu Abschnitt 5.3.1 wird in den folgenden Abbildungen die osmotische Wasserpermeation in der Form $\log P_f$ gegen $1/T \cdot 1000$ dargestellt. Desweiteren sind in den einzelnen Abbildungen die Kalorigramme und die osmotischen Permeabilitätskonstanten gegen die Temperatur abgebildet. Der Phasenumwandlungsbereich wird durch zwei Pfeile kenntlich gemacht.

Man beobachtet analog zu der osmotischen Wasserpermeation durch Membranen der reinen Lipide eine sprunghafte Zunahme der Wasserpermeabilität um den Faktor 20 bei den Gemischen von Phosphatidylcholinen und für die Gemische der Phosphatidsäuren eine Zunahme um den Faktor 55 bis 130 bei der Umwandlung von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase.

Unterhalb von T_m zeigen die Werte der DMPC:DPPC- bzw. DMPA:DPPA-Gemische vergleichbare Werte für P_f ($P_f = 1 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-5}$ cm/s und $P_f = 9 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$ cm/s). Oberhalb der Phasenumwandlung stimmen die Permeabilitätskoeffizienten der Phosphatidylcholingemische gut überein. Sie liegen für alle drei Messungen in einem Bereich von $P_f = 9 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ cm/s. Die P_f -Werte der Gemische von DMPA:DPPA sind um einen Faktor 2 größer und liegen in einem Bereich von $P_f = 5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2}$ cm/s.

Auch hier beobachtet man wieder, daß die Größe und Ladung der Kopfgruppe nur einen geringen Einfluß auf die osmotisch getriebene Wasserpermeation ausübt.

Die Aktivierungsenergien der osmotischen Wasserpermeation in der flüssig-kristallinen Phase liegen für alle sechs Lipidgemische in einem Bereich von 42-56 kJ/mol. Sie stimmen somit mit den Aktivierungsenergien der reinen Lipide gut überein. Es läßt sich keine Systematik zwischen Lipid und Lipidgemisch erkennen. Die Werte in der Gelphase schwanken genauso, wie die Aktivierungsenergien der reinen Lipide ($E_A = 35-135$ kJ/mol).

In den folgenden Abbildungen 5.3.2 und 5.3.3 ist die osmotische Wasserpermeation durch Membranen der Lipidgemische von DMPC:DPPC und DMPA:DPPA dargestellt.

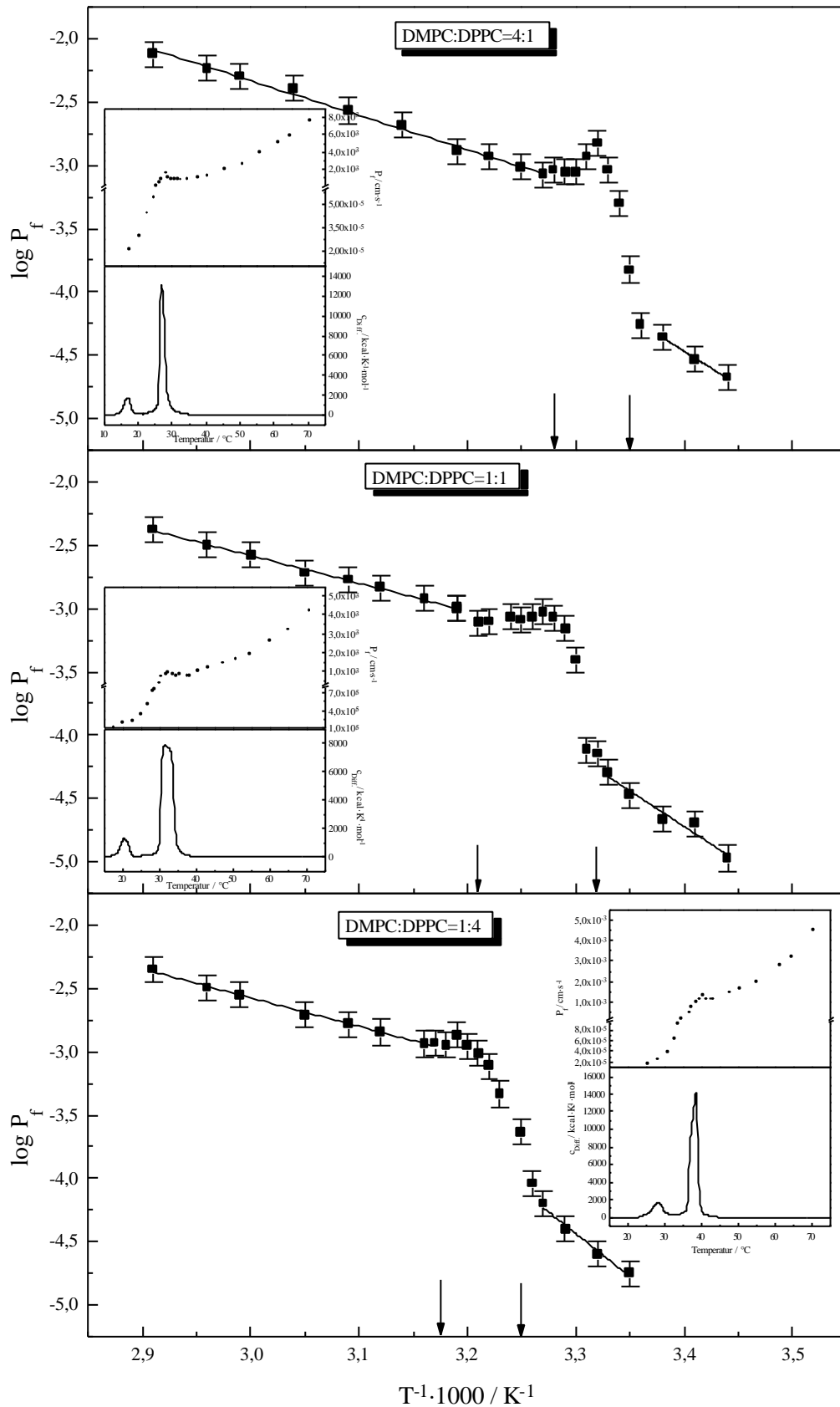


Abbildung 5.3.3: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC:DPPC-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50\text{mM}$. Werte für P_f in $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

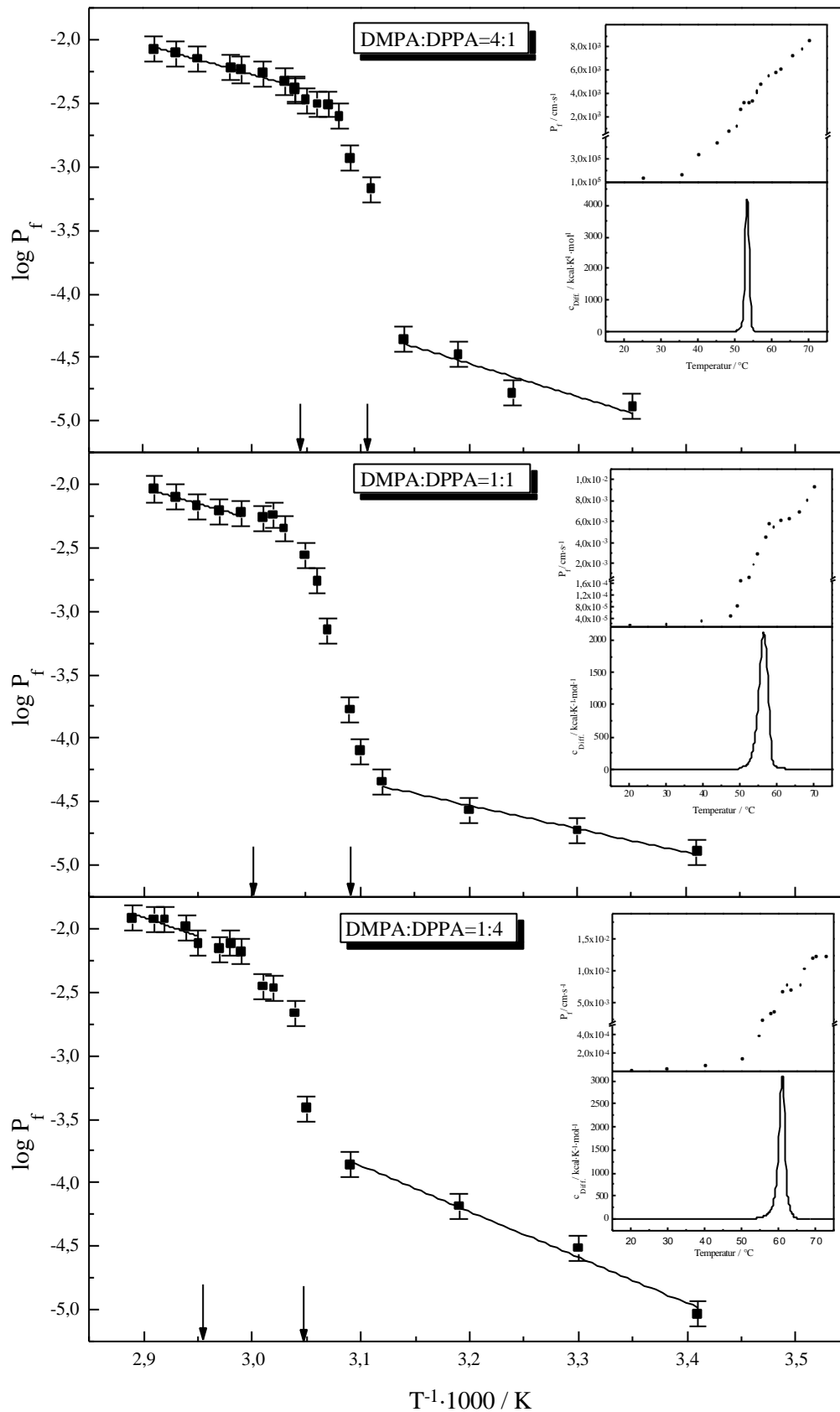


Abbildung 5.3.4: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPA:DPPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50$ mM. Werte für P_f in cm/s.

Bei Annäherung an die Hauptphasenumwandlung nehmen die Permeabilitätskonstanten der osmotischen Wasserpermeation am Anfang sehr schnell zu, d.h. sobald sich Domänengrenzen zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase ausgebildet haben.

Bei den Gemischen (Abbildung 5.3.3) der Phosphatidylcholine beobachtet man deutlich ein Maximum der osmotischen Wasserpermeation im Phasenumwandlungsbereich.

Die Darstellung der Meßergebnisse in der Form P_f gegen T mit dem Vergleich der Kalorigramme der Gemische zeigt, daß das Maximum der osmotischen Wasserpermeation nicht direkt mit dem Maximum der Wärmekapazitätskurve übereinstimmt. Das Maximum der Geschwindigkeit der Wasserpermeation scheint immer 1-2°C zu höheren Temperaturen verschoben zu sein. Das liegt wahrscheinlich daran, daß die Temperaturanzeige der Stopped-Flow Apparatur eine höhere Temperatur anzeigt als tatsächlich in der Mischzelle vorliegt. Eine Überprüfung der Temperatur im Wasserbad der Treiberspritzen ergab eine Schwankung von 0,5-1,5 °C gegenüber der Temperaturanzeige der Stopped-Flow Apparatur, wenn man den Temperaturgradienten zwischen Mischzelle und Wasserbad vernachlässigt. Dies scheint somit ein apparativer Fehler der Temperaturmessung zu sein.

Die osmotische Wasserpermeation durch Membranen von DMPA:DPPA-Gemischen (Abbildung 5.3.4) durchläuft im Phasenumwandlungsbereich auch ein Maximum, welches aber nicht so deutlich ausgeprägt ist.

5.3.3 Wasserpermeation durch Membranen aus Lipidgemischen von Phosphatidsäuren und Phosphatidylcholinen

5.3.3.1 Untersuchung der binären Lipidgemische DMPC:DMPA und DPPC:DPPA

Es wurden die Lipidgemische von DMPC:DMPA und DPPC:DPPA untersucht. Die jeweiligen Lipide bestehen aus der gleichen Fettsäure aber besitzen unterschiedliche Kopfgruppen.

An der Phasenumwandlung gel \rightarrow flüssig-kristallin wird eine Zunahme der osmotischen Wasserpermeation um den Faktor 30-58 bei den Gemischen von DMPC:DMPA und eine Zunahme um den Faktor 32-75 bei den Gemischen DPPC:DPPA beobachtet.

In der Gelphase liegen die osmotischen Permeabilitätskoeffizienten für die Gemische von DMPC:DMPA und DPPC:DPPA in einem Bereich von $1\text{-}9\cdot 10^{-5}$ cm/s. Man beobachtet eine Zunahme der osmotischen Wasserpermeabilität bei gleicher Temperatur mit steigendem Phosphatidsäuregehalt in der Lipiddoppelschicht.

Die P_f -Werte für die Lipidgemische von DMPC:DMPA in der flüssig-kristallinen Phase durchlaufen einen Bereich von $1\cdot 10^{-3}$ – $2\cdot 10^{-2}$ cm/s und für die Lipidgemische von DPPC:DPPA liegen sie in einem engen Bereich von $3\text{-}9\cdot 10^{-3}$ cm/s. Auch hier beobachtet man, wie in der Gelphase, eine Permeabilitätszunahme der osmotischen Wasserpermeation bei gleicher Temperatur mit zunehmendem Lipidgehalt der Phosphatidsäure in der Doppelschicht.

Diese Zunahme beträgt zwar nur einen Faktor 2, ist aber doch signifikant.

Lipidgemisch	P_f [cm/s] in der Gelphase T = 30°C	P_f [cm/s] in der flüssig- kristallinen Phase T = 70°C
DMPC:DMPA=4:1	$3,9\cdot 10^{-5}$	$6,7\cdot 10^{-3}$
DMPC:DMPA=1:1	$4,5\cdot 10^{-5}$	$8,1\cdot 10^{-3}$
DMPC:DMPA=1:4	$1,0\cdot 10^{-4}$	$1,3\cdot 10^{-2}$
DPPC:DPPA=4:1	$1,2\cdot 10^{-5}$	$5,7\cdot 10^{-3}$
DPPC:DPPA=1:1	$2,2\cdot 10^{-5}$	$8,1\cdot 10^{-3}$
DPPC:DPPA=1:4	$3,2\cdot 10^{-5}$	$8,4\cdot 10^{-3}$

Tabelle 5.3.2: Permeabilitätskoeffizient für die osmotische Wasserpermeation durch PC:PA-Doppelschichten.

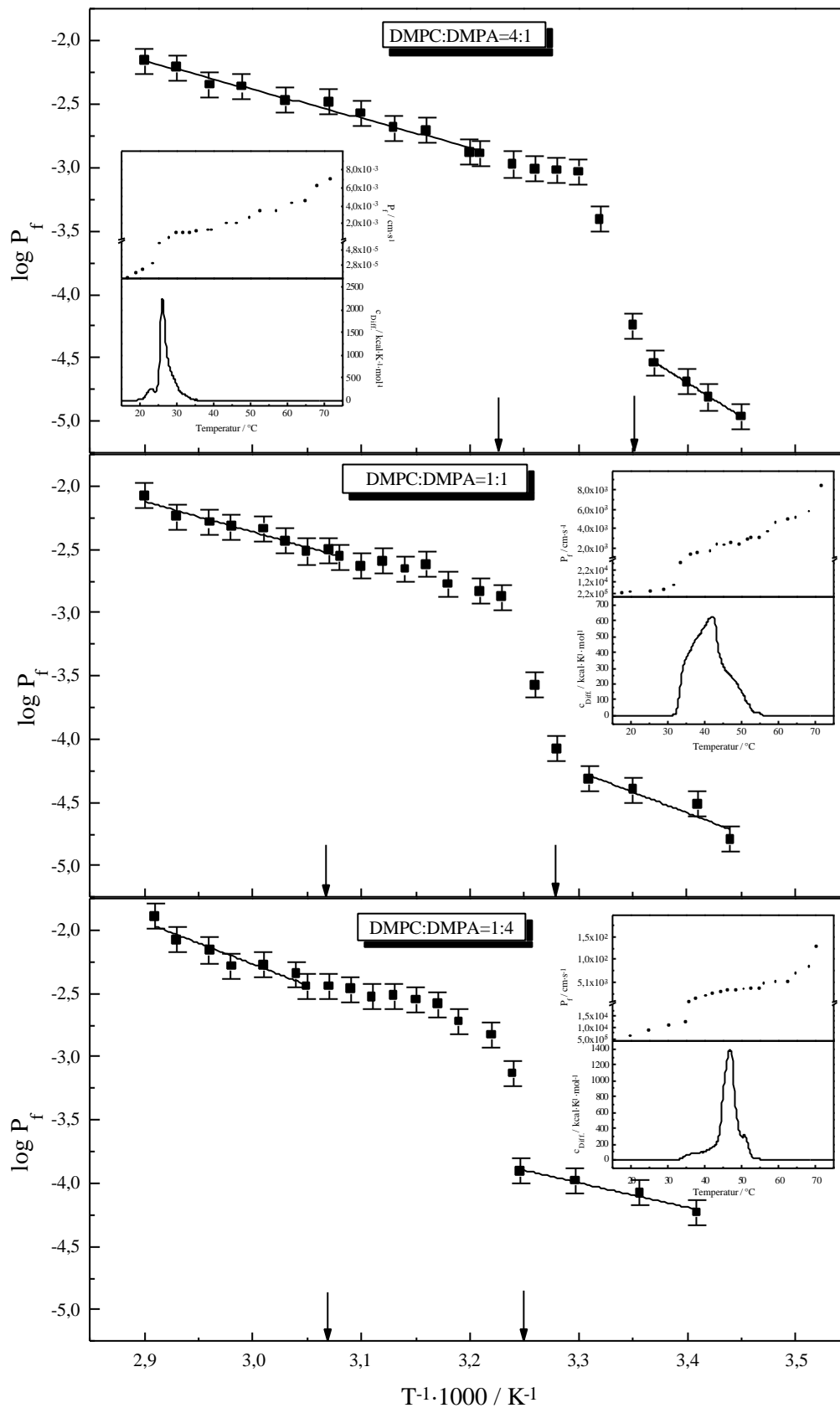


Abbildung 5.3.5: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC:DMPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50$ mM. Werte für P_f in cm/s.

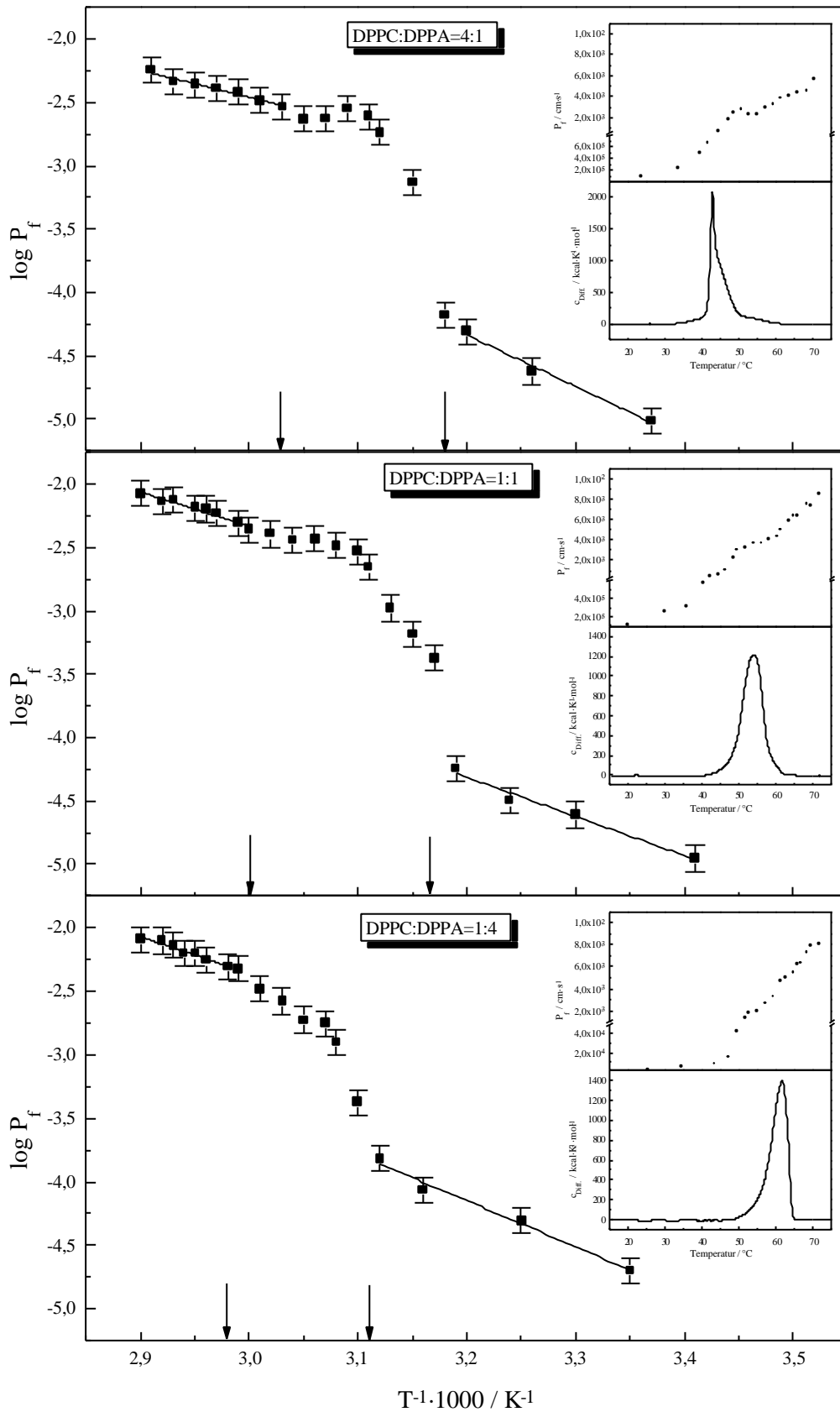


Abbildung 5.3.6: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DPPC:DPPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50$ mM. Werte für P_f in cm/s.

Die Permeabilitätskonstanten der osmotischen Wasserpermeation steigen analog den Gemischen von DMPC:DPPC und DMPA:DPPA am Anfang des Phasenumwandlungsbereiches stark an. Ein ausgeprägtes Maximum im Phasenumwandlungsbereich, wie bei den Lipidgemischen mit gleicher Kopfgruppe gefunden, wird aber nicht beobachtet. Bei den Gemischen DMPC:DMPA ist das Maximum kaum zu sehen.

Die Wärmekapazitätskurven erstrecken sich bei DMPC:DMPA und DPPC:DPPA über einen weiten Temperaturbereich. Dies liegt an den stark unterschiedlichen Umwandlungstemperaturen der beiden reinen Lipide. Bei binären Mischungen kann mittels DSC untersucht werden, ob ideale Mischbarkeit vorliegt, oder ob Mischungslücken auftreten. Die Information darüber steckt in der Form des binären Phasendiagramms.

Es findet auf jeden Fall Phasenseparation in gel und flüssig-kristalline Domänen statt. Die Größe der Domänen und damit die Länge der Domänengrenzen ist unbekannt. Man könnte aus dem Fehlen des Maximums von P_f vielleicht umgekehrt schließen, daß die Domänen groß, die Domänengrenzen damit gering sind.

Die berechneten Aktivierungsenergien der osmotischen Wasserpermeation in der flüssig-kristallinen Phase der untersuchten Lipidgemische von DMPC:DMPA und DPPC:DPPA liegen in einem Bereich von 40-60 kJ/mol. Die Aktivierungsenergien zeigen eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Aktivierungsenergien der reinen Lipide und der Lipidgemische der Phosphatidylcholine bzw. der Phosphatidsäuren.

In der Gelphase schwanken sie analog den Gemischen in Abschnitt 5.3.2 in einem großen Bereich von 37–105 kJ/mol.

Auch hier ist keine Systematik der Aktivierungsenergien der Lipidgemische zu erkennen.

5.3.3.2 Untersuchung der binären Lipidgemische DMPC:DPPA und DPPC:DMPA

Die Lipidgemische DMPC:DPPA und DPPC:DMPA bestehen aus Lipiden mit unterschiedlich langen Acylketten und unterschiedlichen Kopfgruppen.

Wie aus den Abbildungen 5.3.7 und 5.3.8 zu ersehen ist, beobachtet man eine sprunghafte Zunahme der osmotischen Wasserpermeabilität um den Faktor 39-79 bei den Gemischen von DMPA:DPPC und eine Zunahme um den Faktor 70-220 bei den Gemischen von DMPC:DPPA an der Umwandlung von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase.

In der Gelphase liegen die P_f -Werte der Gemische von DPPC:DMPA in der Größenordnung von $1\text{-}7\cdot 10^{-5}$ cm/s und sind somit ein wenig größer als die P_f -Werte der DMPC:DPPA-Gemische, die zwischen $9\cdot 10^{-6}$ - $4\cdot 10^{-5}$ cm/s liegen. In der flüssig-kristallinen Phase sind die gemessenen osmotischen Permeabilitätskoeffizienten der DPPC:DMPA-Gemische ebenfalls zu größeren Werten verschoben. Die P_f -Werte erstrecken sich über einen Bereich von $2\cdot 10^{-3}$ - $2\cdot 10^{-2}$ cm/s und die Werte für die Gemische von DMPC:DPPA liegen zwischen $P_f = 1\cdot 10^{-3}$ - $8\cdot 10^{-3}$ cm/s.

Analog zu Abschnitt 5.3.3.1 beobachtet man eine Permeabilitätszunahme für Wasser mit steigendem Phosphatidsäuregehalt in der Doppelschicht.

In der flüssig-kristallinen Phase liegen die Aktivierungsenergien analog den Abschnitten (5.3.1-5.3.3) in einem Bereich von $E_A = 30\text{-}70$ kJ/mol für die Gemische von DMPC:DPPA und DPPC:DMPA.

Eine Abhängigkeit der Aktivierungsenergie vom Lipidgehalt der Phosphatidsäure in der Doppelschicht liegt nicht vor.

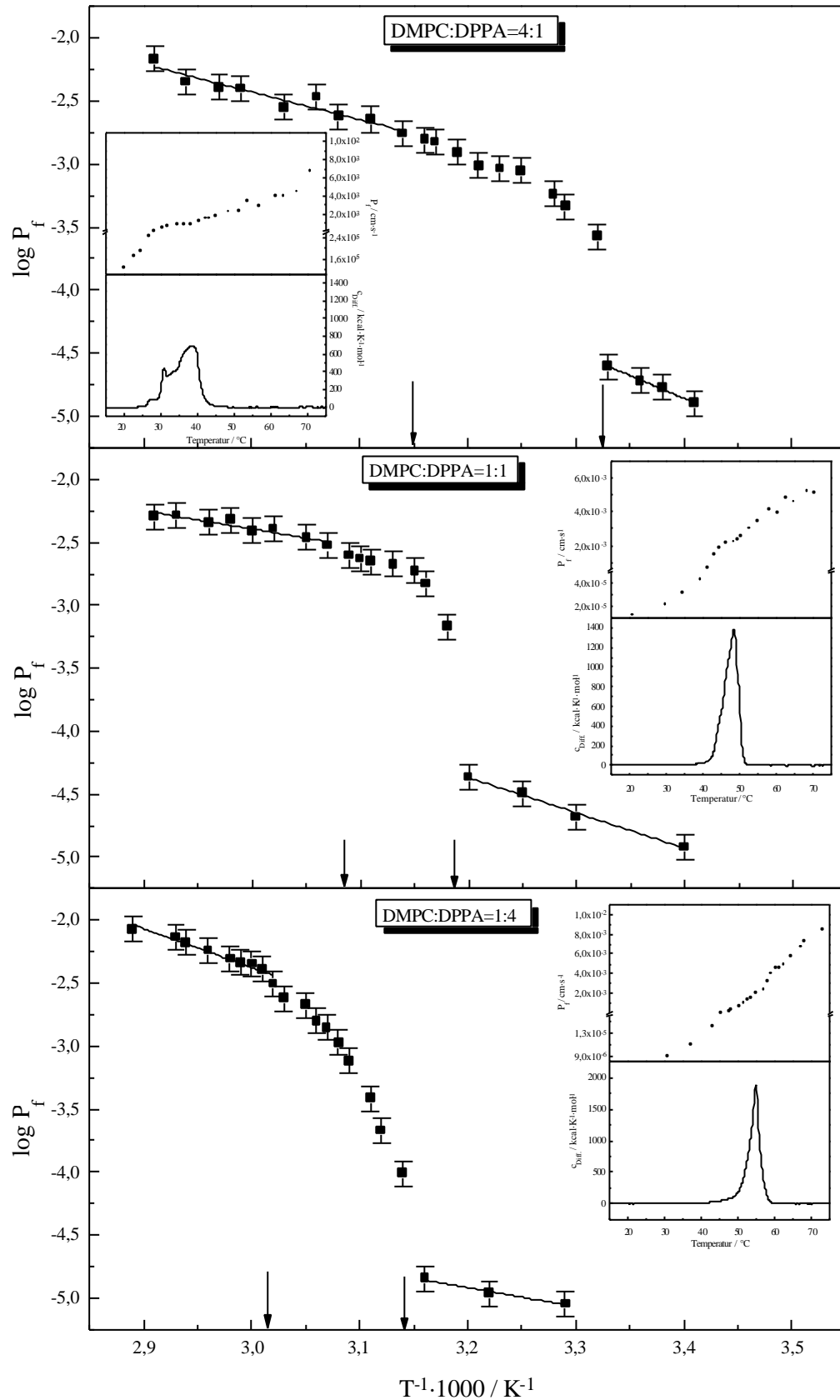


Abbildung 5.3.7: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DMPC:DPPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50$ mM. Werte für P_f in cm/s .

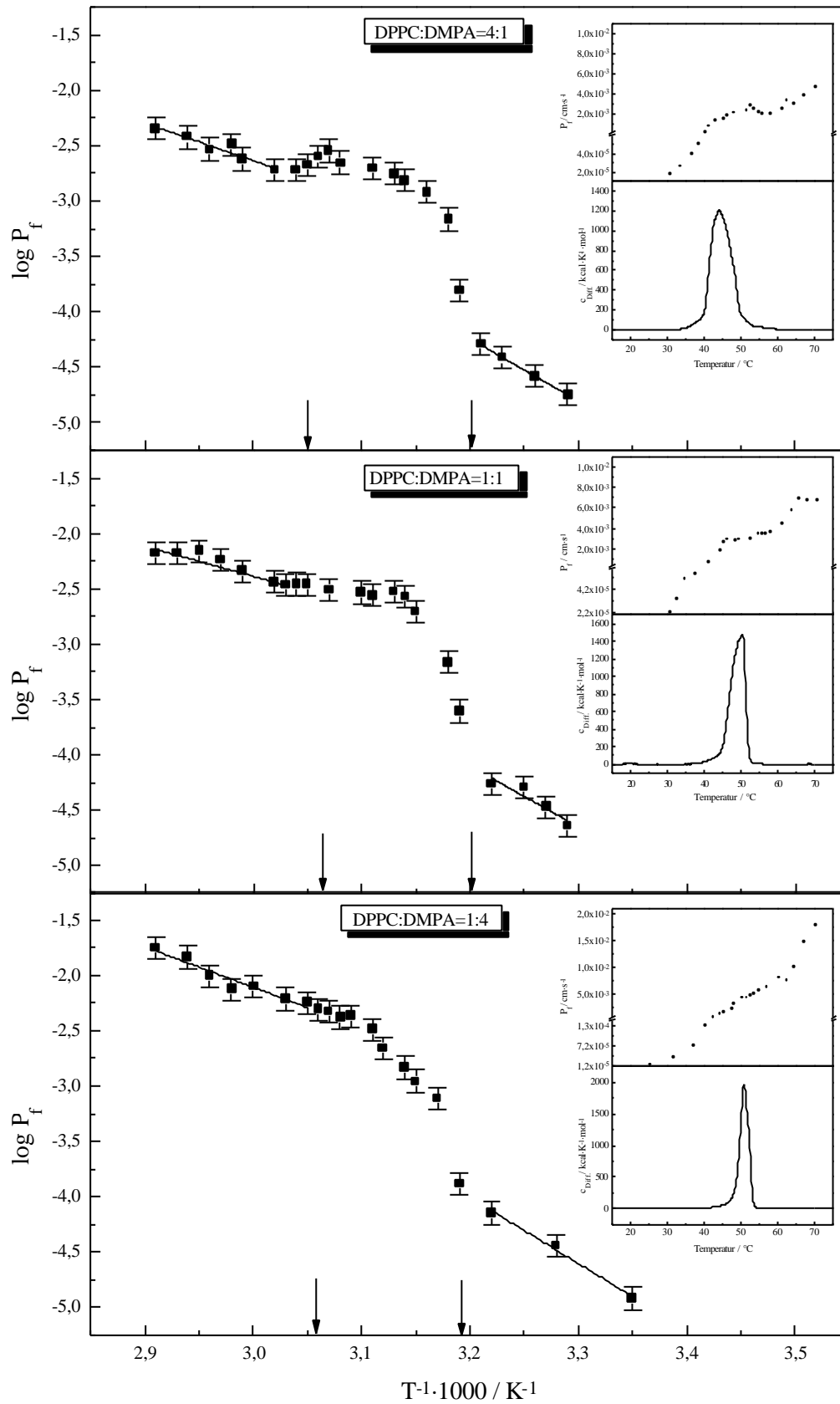


Abbildung 5.3.8: $\log P_f$ gegen $1/T$ für osmotisch getriebene Wasserpermeation in DPPC:DMPA-Vesikel bei einem Konzentrationsgradienten für Glucose/66,7 mM Phosphatpuffer von $D_c = 50$ mM. Werte für P_f in cm/s.

Auch hier ist eine starke Zunahme der osmotischen Wasserpermeation bei beiden binären Gemischen am Anfang des Phasenumwandlungsbereiches zu beobachten. Ein Maximum der Wasserpermeation im Umwandlungsbereich ist generell nicht deutlich erkennbar, mit Ausnahme des Gemisches DPPC:DMPA =4:1.

Die Wärmekapazitätskurven erstrecken sich auch bei DMPC:DPPA und DPPC:DMPA über einen weiten Temperaturbereich. Dies liegt wiederum an den stark unterschiedlichen Umwandlungstemperaturen der reinen Lipide.

5.3.4 Zusammenfassung

Der Vergleich der Lipide DMPC, DPPC, DMPA und DPPA sollte zeigen, welchen Einfluß die Länge der Fettsäureketten und damit die Dicke des hydrophoben Teils der Lipiddoppelschicht auf die osmotische Wasserpermeation hat. Wie in Abschnitt 5.3.1 dargelegt, läßt sich keine Systematik zwischen der Länge der Fettsäureketten und den Werten der osmotischen Wasserpermeation erkennen. Dies gilt für die flüssig-kristalline Phase. In der Gelphase schwanken die P_f -Werte stark, deshalb kann eine Systematik nicht diskutiert werden. Durch die Verlängerung der Fettsäureketten um zwei CH_2 -Einheiten (0,5 nm), ist unabhängig vom Mechanismus der Wasserpermeation zu erwarten, daß die Permeabilität der Wassermoleküle durch die Lipiddoppelschicht abnimmt. Ein Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten der Lipide mit unterschiedlichen Längen der Fettsäureketten gibt aber keinen Hinweis auf die Gültigkeit dieser Annahme. Entweder liegt dieser Effekt außerhalb des Bereiches der Meßgenauigkeit der Methode oder aber die Dicke der hydrophoben Lipiddoppelschicht hat nur einen geringen Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit der Wassermoleküle durch die Doppelschicht.

Paula et al. (1995) untersuchten die Permeabilität in Abhängigkeit von der hydrophoben Schichtdicke (C_{14} - C_{24}) der Lipidmembran. Sie stellten dabei fest, daß mit zunehmender Dicke der hydrophoben Schicht (20-37,5 Å) die Permeabilitätskoeffizienten kontinuierlich abnehmen. Für die Wasserpermeation ist der Permeabilitätskoeffizient vom kürzesten Lipid ($P_f = 2,4 \cdot 10^{-2}$ cm/s) um den Faktor 5 größer gegenüber dem P_f -Wert ($P_f = 5,0 \cdot 10^{-3}$ cm/s) des längsten Lipids.

Neben dem Einfluß der Länge der Fettsäureketten wurde die Auswirkung der Größe und Ladung der Kopfgruppe auf die osmotische Wasserpermeation untersucht. Die Kopfgrup-

penregion der Phospholipidmoleküle bilden die Grenzfläche zwischen hydrophobem Teil der Doppelschicht und der wässrigen Phase. Die Eigenschaften der Kopfgruppe haben einen großen Einfluß auf die thermotropen Eigenschaften von Lipidmembranen. So liegt die Temperatur der Umwandlung von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase bei DMPA (pH = 7) um 28 °C höher als bei DMPC. Dies läßt darauf schließen, daß die Phosphatidsäuren in der Gelphase dichter gepackt sind als Lipidmembranen, die aus DMPC hergestellt wurden. Außerdem bilden Phosphatidylcholine andere kristalline Phasen aus als Phosphatidsäuren. Die quasikristalline L_{β}' -Phase zeichnet sich bei den Phosphatidylcholinen im Gegensatz zur L_{β} -Phase der Phosphatidsäuren durch eine verzerrte hexagonale Packung der gestreckten Acylketten (all-trans Konformation) aus. Wegen des unterschiedlichen Flächenbedarfs der Phosphatidylcholin Kopfgruppe und der Kohlenwasserstoffketten sind die Ketten um ca 30° gegen die Membrannormale geneigt, wodurch eine hohe laterale Packungsdichte in der Membranmatrix ermöglicht wird. Nun stellt sich die Frage, ob solche strukturellen Unterschiede meßbare Auswirkungen auf die Permeationseigenschaften von Lipiddoppelschichten haben.

Die Untersuchung von Phosphatidsäuren und Phosphatidylcholinen ergaben unterschiedliche Permeabilitätskonstanten, sowohl in der Gelphase als auch in der flüssig-kristallinen Phase. Die osmotische Wasserpermeation durch Lipiddoppelschichten aus Phosphatidsäuremolekülen aufgebaut, ist in der flüssig-kristallinen Phase um den Faktor 2-3 schneller als die Permeation der Wassermoleküle durch Phosphatidylcholinvesikel.

Die Größe und Ladung der Kopfgruppe ändert offensichtlich die Permeationseigenschaften von Wasser durch Lipidmembranen. Durch die kleinere und geladene Kopfgruppe der Phosphatidsäure kommt es zu einer stärkeren Affinität von Wasser gegenüber den Phospholipidmolekülen, was zu einer großen Hydratisierung im Kopfgruppenbereich führt. Durch die wesentlich höhere Anzahl der Wassermoleküle an der Grenzfläche zwischen hydrophobem und hydrophilem Bereich, kommt es zu einer Schwächung der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Phospholipidmolekülen, was zu einer Erhöhung der Permeabilität führen könnte.

Um den Phasenumwandlungsbereich der Phospholipide auf die Permeationseigenschaften zu untersuchen, wurden zunächst Lipidgemische von Phosphatidylcholinen und solche von Phosphatidsäuren hergestellt. Dabei war gewährleistet, daß die Gemische sich nur in der

Länge der Acylketten unterschieden. Der Einfluß der Kopfgruppe wurde dabei zunächst außer acht gelassen. Man beobachtet am Anfang der Phasenumwandlung eine starke Zunahme der Wasserpermeabilität, d.h. sobald sich Domänengrenzen zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase gebildet haben, ist eine deutliche Permeabilitätssteigerung der Doppelschicht sichtbar.

Durch die laterale Phasentrennung von den gemischten Lipiden innerhalb der Lipiddoppelschicht kommt es zu Domänengrenzflächen, an welchen sich Defekte ausbilden können. Dies führt dazu, daß man im Phasenumwandlungsbereich ein Maximum der osmotischen Wasserpermeation messen kann.

Bei den Lipidgemischen mit unterschiedlichen Kopfgruppen und gleichlangen Fettsäureketten bzw. mit unterschiedlichen Acylkettenlängen konnte ein Permeabilitätsmaximum im Phasenumwandlungsbereich in den meisten Fällen nicht beobachtet werden. Man kann davon ausgehen, daß sich im Phasenumwandlungsbereich dieser Gemische große Domänen mit gering ausgedehnten Domänengrenzlinien bilden.

Es läßt sich eine Systematik zwischen dem Lipidanteil der Phosphatidsäure in der Lipiddoppelschicht und der osmotischen Wasserpermeabilität in der flüssig-kristallinen Phase erkennen. Mit steigendem Molenbruch der Phosphatidsäure in der Lipidmembran nimmt die osmotische Permeation der Wassermoleküle zu (z.B.: P_f (DMPC:DMPA=4:1) < P_f (DMPC:DMPA=1:1) < P_f (DMPC:DMPA=1:4)).

Einen Hinweis für den Mechanismus der osmotischen Wasserpermeation durch Lipiddoppelschichten liefert die Aktivierungsenergie E_A , die für den Wassertransport benötigt wird. Diese Aktivierungsenergie wird aus der Temperaturabhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten berechnet.

Die aus den Arrheniusdarstellungen berechneten Werte für E_A in der flüssig-kristallinen Phase liegen für die reinen Lipide zwischen 43-57 kJ/mol und für die Lipidgemische in einem Bereich von 30-70 kJ/mol. Diese Werte stimmen mit den ermittelten E_A Werten der osmotischen Wasserpermeation in den Abschnitten (5.1) und (5.2) gut überein.

5.4 Permeation von anderen kleinen polaren Molekülen durch Doppelschichten

In den letzten Jahren wurde die Permeation von ionischen und nichtionischen Stoffen durch biologische Membranen und durch reine Lipiddoppelschichten untersucht. Dabei fand man heraus, daß der Transport der geladenen und ungeladenen Moleküle durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Bei dem Transport von kleinen Molekülen durch die Lipidmembran steht die Löslichkeit des Stoffes in dem hydrophoben Bereich der Doppelschicht im Vordergrund. Deshalb wird oft in der Literatur (Walter und Gutknecht, 1986; Finkelstein, 1976a) die Diffusion von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht auf der Basis des Verteilungskoeffizienten des Stoffes zwischen Wasser und einem langkettigen Kohlenwasserstoff (meisten n-Hexadecan) beschrieben. Durch einen Vergleich der Permeabilitätskonstanten der kleinen Moleküle durch die Lipiddoppelschicht und dem Verteilungskoeffizient K_p , ist eine Aussage über den Permeationsmechanismus der kleinen Moleküle möglich.

Deshalb ist es wichtig, den Verteilungskoeffizient der Moleküle zwischen n-Hexadecan und Wasser zu ermitteln. In Tabelle 5.4.1 sind die Verteilungskoeffizienten der untersuchten Moleküle zwischen Wasser und n-Hexadecan angegeben.

Molekül	Verteilungskoeffizient K_p	Literatur
Ethylenglykol	$1,7 \cdot 10^{-5}$	Finkelstein (1976a)
tert. Butylalkohol	2,4	gemessen
Perfluoro-tert. Butylalkohol	1,9	gemessen
Glycerin	$2,0 \cdot 10^{-6}$	Orbach und Finkelstein (1980)
Harnstoff	$2,8 \cdot 10^{-7}$	Walter und Gutknecht (1986)

Tabelle 5.4.1: Verteilungskoeffizienten der untersuchten Moleküle zwischen n-Hexadecan und Wasser bei $T = 25^\circ\text{C}$.

Die gemessenen Verteilungskoeffizienten wurden mit Hilfe der IR-Spektroskopie ermittelt.

Die Molekülstrukturen der untersuchten Moleküle sind in Abbildung 5.4.1 unter Angabe der Molekulargewichte dargestellt.

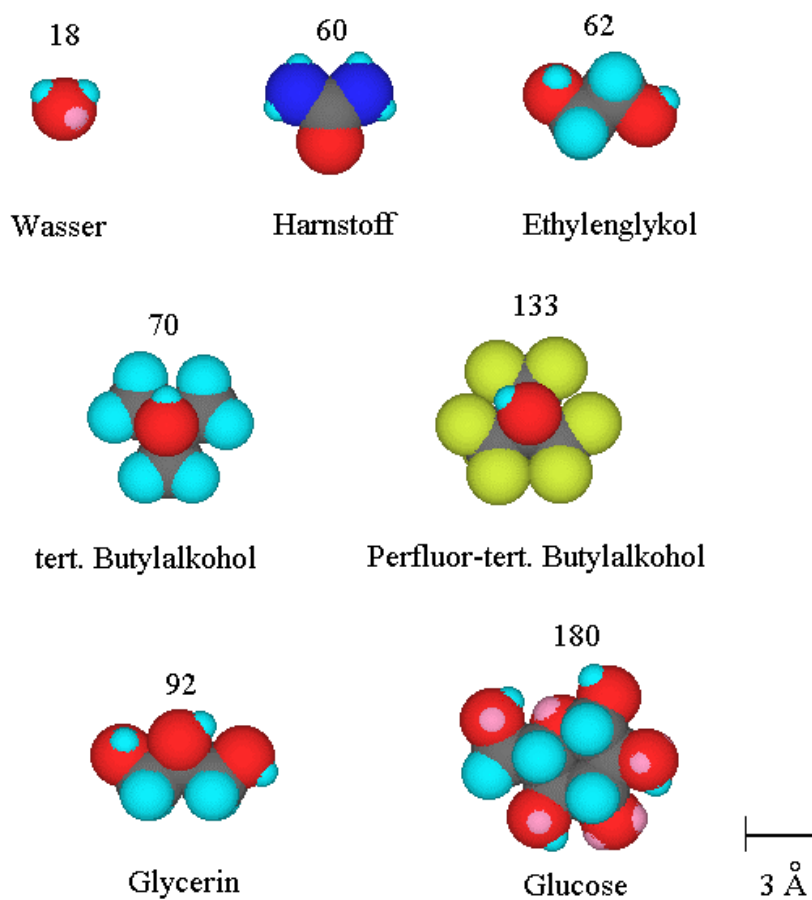


Abbildung 5.4.1: Darstellung der untersuchten Moleküle mit Molekülstruktur unter Angabe des Molekulargewichtes.

5.4.1 Permeationseigenschaften der Moleküle

Durch die Untersuchung der Permeationseigenschaften der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht sollte ermittelt werden, ob Größe, Molekulargewicht und Polarität der Moleküle einen meßbaren Einfluß auf die Geschwindigkeit der Permeation der Moleküle besitzen.

Es war von Interesse, ob sich das Permeationsverhalten der Moleküle beim hinein bzw. heraus permeieren aus den Vesikeln unterscheidet. Desweiteren interessierten die Permeationseigenschaften im Bereich der Phasenumwandlung.

Um die Permeation der Moleküle in die Vesikel zu untersuchen, wurden die DMPC-Vesikel in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) dispergiert und anschließend mit der äquivalenten Konzentration der wässrigen Lösung des zu untersuchenden Moleküls in der Stopped-Flow Apparatur vermessen. Wollte man das Permeationsverhalten aus den Vesikeln beobachten, so wurden die DMPC Vesikel in 500 mM wässriger Lösung der zu untersuchenden Substanz dispergiert und anschließend mit 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) vermischt.

Der diffusive Permeabilitätskoeffizient P_d der Moleküle kann ausgehend von der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k berechnet werden, wenn die Größe der Vesikel bekannt ist (Gleichung 3-9).

In den folgenden Abbildungen wird die Temperaturabhängigkeit der Permeation der kleinen Moleküle mit Hilfe einer Arrheniusdarstellung verdeutlicht. Daher wurde für alle Messungen eine einheitliche Darstellung der Meßergebnisse in der Form $\log P_f$ bzw. $\log P_d$ gegen $1/T \cdot 1000$ gewählt. Über die Steigung der Arrheniusauftragung wurde die Aktivierungsenergie für den Permeationsprozeß der Moleküle berechnet. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m des Dimyristoylphosphatidylcholins ist in den nachfolgenden Abbildungen durch einen Pfeil kenntlich gemacht. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel wurde mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetrie (DSC) bestimmt (vgl. Abschnitt 6.3.3). Es wurde jeweils die Permeation der Moleküle in bzw. aus den Vesikeln dargestellt.

In Abbildung 5.4.2 kommt es nicht zuerst zu einer osmotisch getriebenen Wasserpermeation, da hier kein osmotischer Konzentrationsgradient anliegt, im Gegensatz zum Experiment in Abbildung 5.2.6.

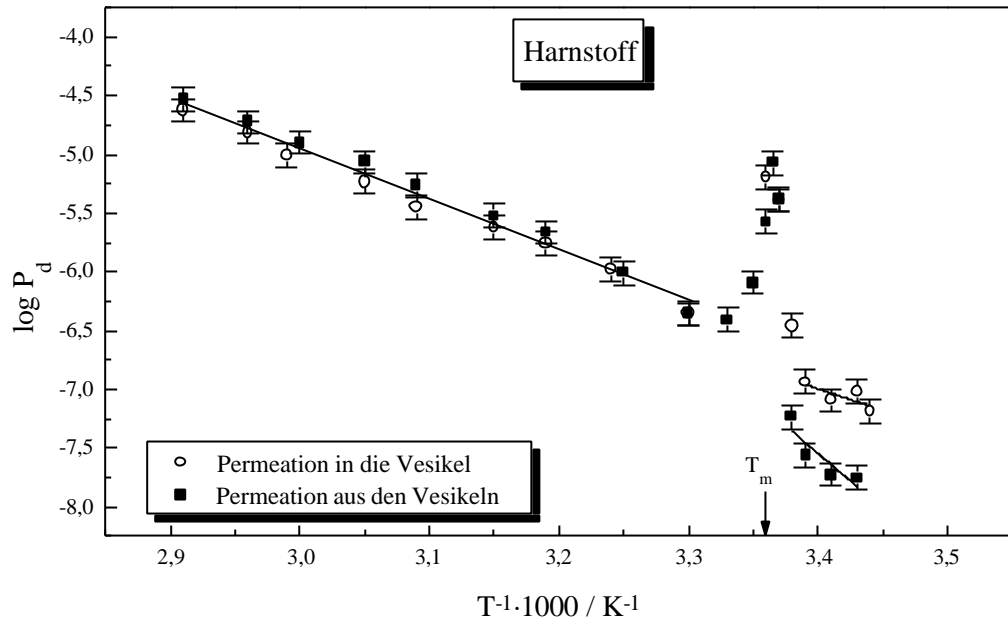


Abbildung 5.4.2: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive Harnstoffpermeation in und aus DMPC-Vesikel. Hergestellt in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) und vermischt mit 500 mM Harnstofflösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) oder umgekehrt. Werte für P_d in cm/s.

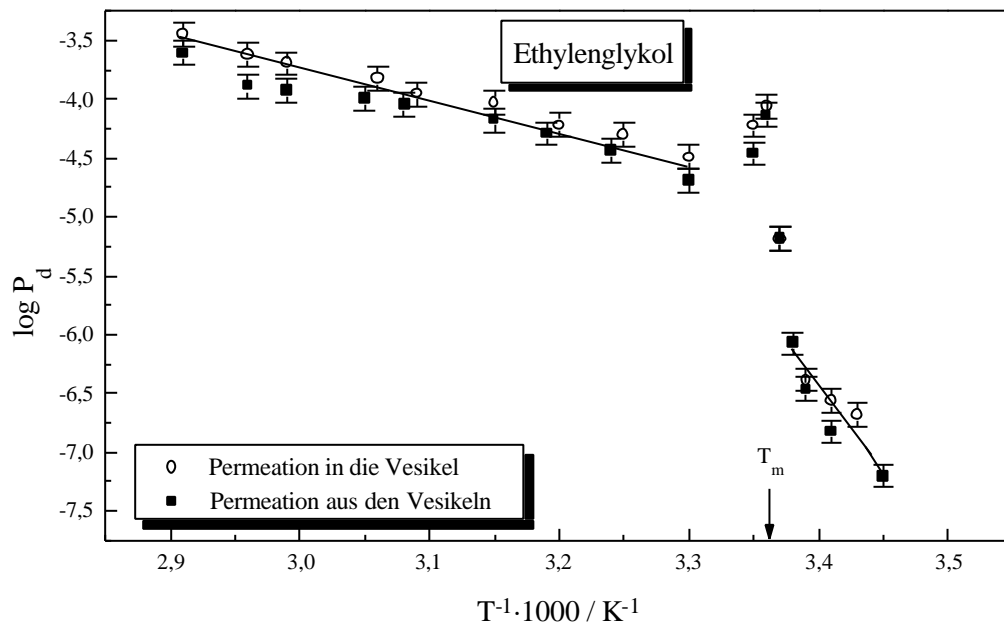


Abbildung 5.4.3: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive Ethylenglykolpermeation in und aus DMPC-Vesikel. Hergestellt in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) und vermischt mit 500 mM Ethylenglykollösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) oder umgekehrt. Werte für P_d in cm/s.

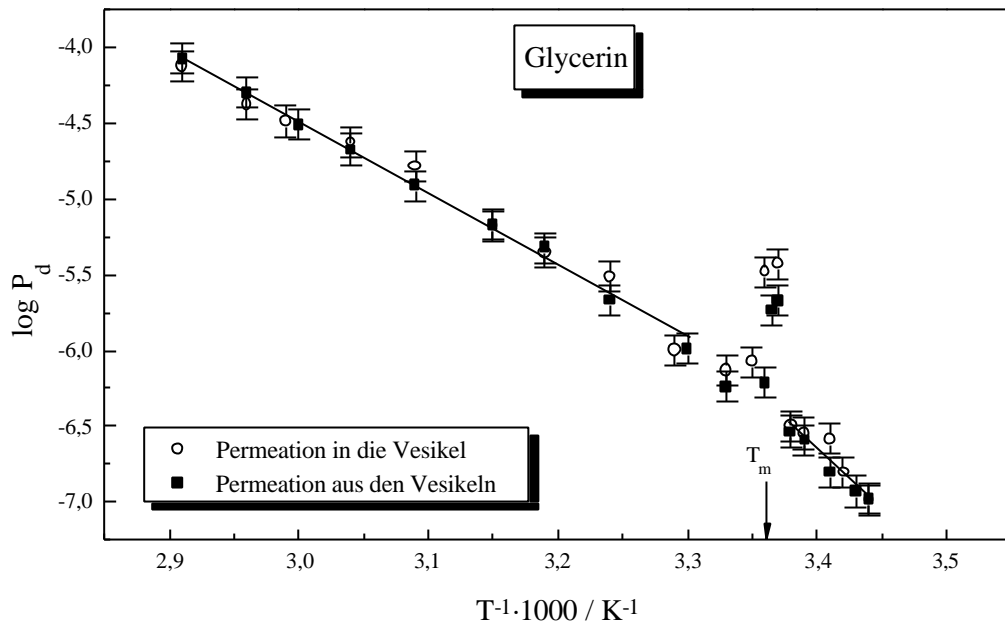


Abbildung 5.4.4: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive Glycerinpermeation in und aus DMPC-Vesikel. Hergestellt in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) und vermischt mit 500 mM Glycerinlösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) oder umgekehrt. Werte für P_d in cm/s.

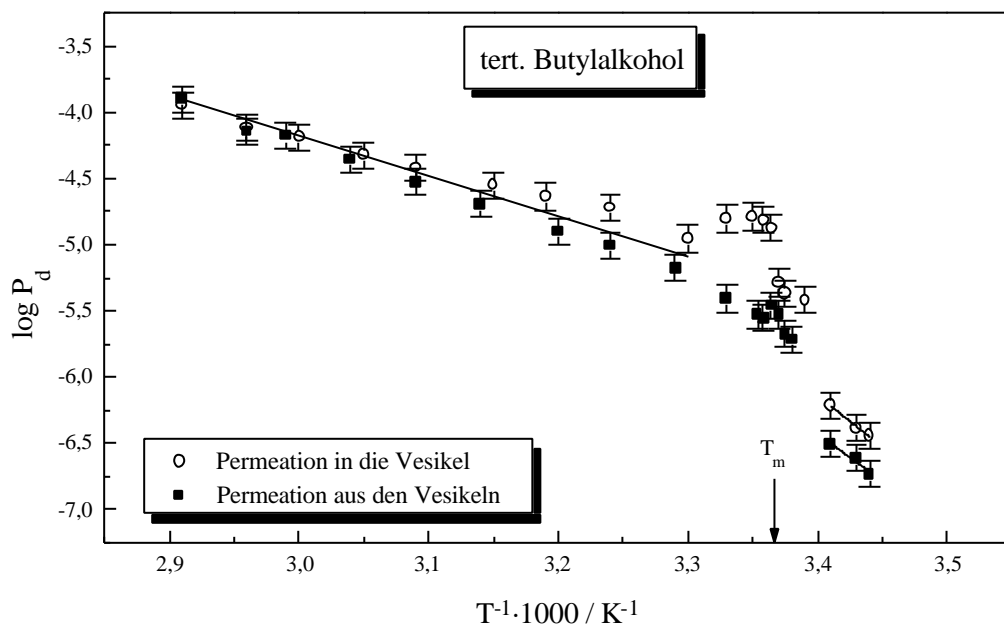


Abbildung 5.4.5: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive tert. Butylalkoholpermeation in und aus DMPC-Vesikel. Hergestellt in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) und vermischt mit 500 mM tert. Butylalkohollösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) oder umgekehrt. Werte für P_d in cm/s.

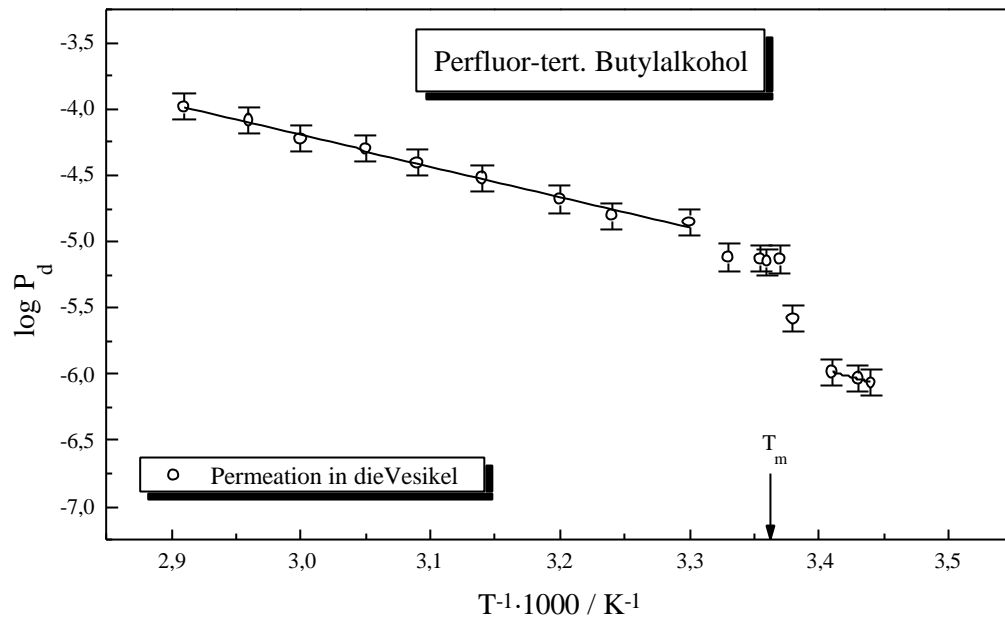


Abbildung 5.4.6: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive Perfluor-tert. Butylalkoholpermeation in DMPC-Vesikel. Hergestellt in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) und vermischt mit 500 mM Perfluor-tert. Butylalkohollösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7). Werte für P_d in cm/s.

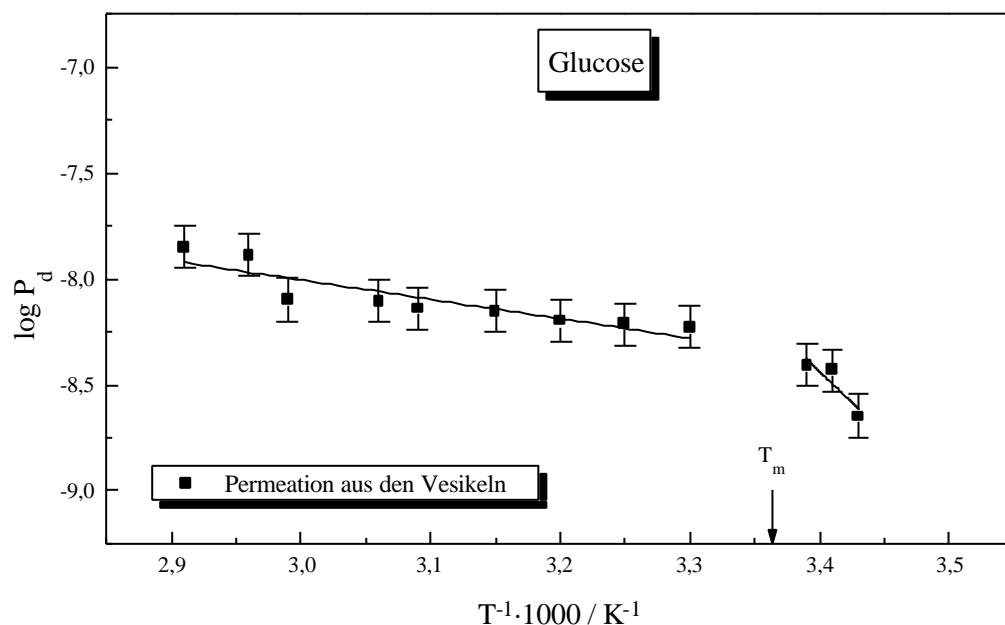


Abbildung 5.4.7: $\log P_d$ gegen $1/T$ für diffusive Glucosepermeation aus DMPC-Vesikel. Hergestellt in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) und vermischt 66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7). Werte für P_d in cm/s.

An der Umwandlung von der Gelphase zur flüssig-kristallinen Phase wird eine Zunahme der diffusiven Permeabilitätskoeffizienten beobachtet. Die Größe der Zunahme ist abhängig vom Molekül und von der Permeationsrichtung. Glucose und Glycerin weisen die geringste Zunahme mit dem Faktor 2-4 auf und Ethylenglykol zeichnet sich durch eine Zunahme um den Faktor 60 aus. Für die Permeabilitätszunahme am Phasenumwandlungsbereich läßt sich weder im Bezug auf die Molekülgröße noch auf die Permeationsrichtung eine Systematik feststellen. Die Wertebereiche der Permeabilitätskonstanten in der Gelphase und in der flüssig-kristallinen Phase für die einzelnen Moleküle sind in Tabelle 5.4.2 dargestellt. Die Permeabilitätskoeffizienten für die Permeation aus den Vesikeln werden **fett** und die Werte für die Permeation in die Vesikel werden *kursiv* dargestellt. Bei kleinen polaren Molekülen hat die Permeationsrichtung keinen meßbaren Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der Harnstoffpermeation in Abschnitt 4.2 gut überein. Tabelle 5.4.2 gibt eine Zusammenfassung der gemessenen Permeabilitätskoeffizienten der kleinen Moleküle.

Molekül	Gelphase P_d [cm/s]	flüssig-kristalline Phase P_d [cm/s]
Harnstoff	$1,8 \cdot 10^{-8}$ - $5,8 \cdot 10^{-8}$ <i>$6,5 \cdot 10^{-8}$</i> - <i>$1,2 \cdot 10^{-7}$</i>	$4,4 \cdot 10^{-7}$ - $2,9 \cdot 10^{-5}$ <i>$4,5 \cdot 10^{-7}$</i> - <i>$2,5 \cdot 10^{-5}$</i>
Ethylenglykol	$6,3 \cdot 10^{-8}$ - $8,4 \cdot 10^{-7}$ <i>$2,1 \cdot 10^{-7}$</i> - <i>$4,1 \cdot 10^{-7}$</i>	$2,1 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-4}$ <i>$3,2 \cdot 10^{-5}$</i> - <i>$3,6 \cdot 10^{-4}$</i>
Glycerin	$1,0 \cdot 10^{-7}$ - $2,9 \cdot 10^{-7}$ <i>$1,1 \cdot 10^{-7}$</i> - <i>$3,2 \cdot 10^{-7}$</i>	$1,0 \cdot 10^{-6}$ - $8,5 \cdot 10^{-5}$ <i>$1,0 \cdot 10^{-6}$</i> - <i>$7,6 \cdot 10^{-5}$</i>
tert. Butylalkohol	$1,8 \cdot 10^{-7}$ - $3,1 \cdot 10^{-7}$ <i>$3,6 \cdot 10^{-7}$</i> - <i>$6,1 \cdot 10^{-7}$</i>	$3,9 \cdot 10^{-6}$ - $1,3 \cdot 10^{-4}$ <i>$1,1 \cdot 10^{-5}$</i> - <i>$1,1 \cdot 10^{-4}$</i>
Perfluor-tert. Butylalkohol	<i>$8,7 \cdot 10^{-7}$</i> - <i>$1,0 \cdot 10^{-6}$</i>	<i>$1,4 \cdot 10^{-5}$</i> - <i>$1,1 \cdot 10^{-4}$</i>
Glucose	$2,3 \cdot 10^{-9}$ - $3,9 \cdot 10^{-9}$	$5,9 \cdot 10^{-9}$ - $1,4 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 5.4.2: Permeabilitätskoeffizienten für kleine Moleküle unter Berücksichtigung der Permeationsrichtung:

fett = Permeation aus den Vesikeln,

kursiv = Permeation in die Vesikel.

Der Transport von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Neben der Löslichkeit des Stoffes in dem hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht spielen auch noch die Größe und das Molekulargewicht der Moleküle eine entscheidende Rolle. In Abbildung 5.4.8 wird der Einfluß des Molekulargewichtes auf die Permeationsgeschwindigkeit der Moleküle dargestellt. Dabei werden die Permeabilitätskoeffizienten der Moleküle gegen das Molekulargewicht aufgetragen. Die Permeationsrichtung der Moleküle wird durch unterschiedliche Symbole charakterisiert.

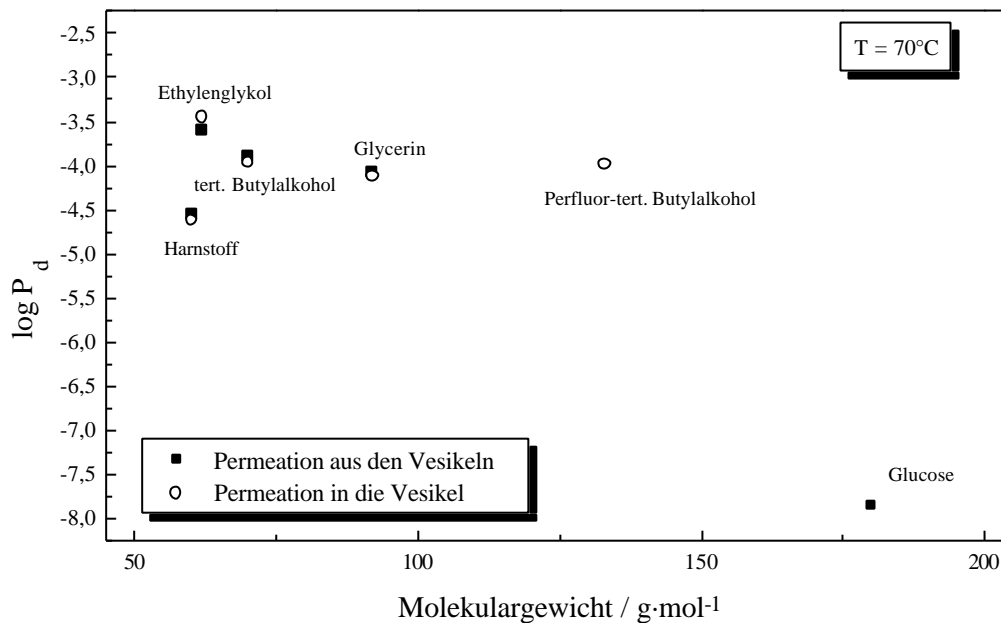


Abbildung 5.4.9: Permeabilitätskoeffizienten P_d in cm/s der Moleküle in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht.

In Tabelle 5.4.3 werden die Permeabilitätskonstanten der Permeation der Moleküle aus den Vesikeln bei $T = 70^\circ\text{C}$ mit dem Molekulargewicht verglichen.

Molekül	Molekulargewicht [g/mol]	Permeabilitätskoeffizient P_d [$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$]
Harnstoff	60	$2,9\cdot 10^{-5}$
Ethylenglykol	62	$2,5\cdot 10^{-4}$
tert. Butylalkohol	70	$1,3\cdot 10^{-4}$
Glycerin	92	$8,5\cdot 10^{-5}$
Perfluor-tert. Butylalkohol	133	$1,0\cdot 10^{-4}$
Glucose	180	$1,4\cdot 10^{-8}$

Tabelle 5.4.3: Permeabilitätskoeffizienten der Moleküle bei $T = 70^\circ\text{C}$.

Man erkennt, daß anscheinend nicht nur die Größe und die Molekülmasse einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Permeation ausübt, sondern daß auch andere Faktoren die Permeationsgeschwindigkeit beeinflussen.

Eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang zwischen Permeabilität und Molekulargewicht ist deshalb nicht möglich. So fand Brahm (1983), daß die Permeabilität von einwertigen Alkoholen mit steigender Anzahl von Kohlenstoffatomen linear ansteigt. Erhöht man aber die Anzahl der Hydroxylgruppen pro Alkohol bei gleichzeitig konstanter Anzahl der Kohlenstoffatome, so erniedrigt sich die Permeabilität schrittweise (Cohen und Bingham, 1972). Auch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen polaren Molekülen und der Kopfgruppe der Lipidmoleküle bestimmen die Permeabilität der Moleküle sehr stark.

Vergleicht man Ethylenglykol (2 Hydroxylgruppen) mit Glycerin (3 Hydroxylgruppen), so nimmt die Permeabilität von Ethylenglykol zu Glycerin ab.

Harnstoff hat ein geringeres Molekulargewicht von 60 g/mol als tert. Butylalkohol (72 g/mol), besitzt aber einen Permeabilitätskoeffizient ($P_d = 2,9\cdot 10^{-5}$ cm/s bei $T=70^\circ\text{C}$) der um den Faktor 5 kleiner ist als der Permeabilitätskoeffizient von tert. Butylalkohol.

Die Permeabilitätskonstanten von tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol sind fast identisch obwohl eine große Differenz von Größe und Molekulargewicht besteht.

Die geringste Permeabilität gegenüber Phospholipidmembranen besitzt die Glucose, mit 5 Hydroxylgruppen. Sie ist mit 180 g/mol das schwerste und zugleich größte Molekül, das auf sein Permeationsverhalten untersucht wurde.

Vergleicht man die Verteilungskoeffizienten (Tabelle 5.4.1) mit den nach Gleichung (3-9) berechneten diffusiven Permeabilitätskoeffizienten, so zeigen die Moleküle Ethylenglykol, Glycerin und Harnstoff eine gute Übereinstimmung.

Die mit Hilfe der IR-Spektroskopie gemessenen Verteilungskoeffizienten von tert.-Butylalkohol und Perfluoro-tert.-Butylalkohol sind um das 10000 fache größer als die nach Gleichung (3-9) berechneten Permeabilitätskoeffizienten.

Man kann nicht einfach das Permeationsverhalten von Molekülen mit Hilfe der Größe und des Molekulargewichtes erklären. Anscheinend spielt die Molekülform neben dem Vorhandensein von polaren Gruppen im Molekül eine wichtige Rolle im Permeationsverhalten der Moleküle.

Die Aktivierungsenergien E_A der Permeation von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht sind in Tabelle 5.4.4 zusammengefaßt. Es wird auch hier wieder zwischen Permeation in die und aus den Vesikeln unterschieden.

Molekül	Gelphase E_A [kJ/mol]	flüssig-kristalline Phase E_A [kJ/mol]
Harnstoff	180	86
	<i>70</i>	<i>81</i>
Ethylenglykol	285	45
	<i>141</i>	<i>48</i>
Glycerin	149	92
	<i>155</i>	<i>88</i>
tert. Butylalkohol	137	65
	<i>149</i>	<i>47</i>
Perfluor-tert. Butylalkohol	<i>50</i>	<i>45</i>
Glucose	114	18

Tabelle 5.4.4: Aktivierungsenergien der Permeation von kleinen Molekülen durch die

**Lipiddoppelschicht: fett = Permeation aus den Vesikeln,
 kursiv = Permeation in die Vesikel.**

Die Aktivierungsenergien der Permeation schwanken in der Gelphase in einem großen Bereich. Eine Systematik zwischen den E_A -Werten in der Gelphase und der Permeationsrichtung wird nicht festgestellt. In der flüssig-kristallinen Phase liegen die Aktivierungsenergien für die Permeation in die bzw. aus den Vesikeln in einem engen Bereich. Auch hier läßt sich keine Systematik in Bezug auf die Permeationsrichtung der Moleküle erkennen. Allerdings ist die Aktivierungsenergie der Glucosepermeation mit 18 kJ/mol relativ gering, man sollte eigentlich für Glucose einen wesentlich höheren E_A -Wert erwarten. Wahrscheinlich ist dieser Wert durch die großen Ungenauigkeiten der P_d -Werte verfälscht, da diese Messungen über einen großen Zeitraum aufgenommen wurden.

5.4.2 Zusammenfassung

Das Permeationsverhalten von kleinen polaren Molekülen durch die Lipiddoppelschicht von 1,2-Dimyristoylphosphatidylcholin wurde mit Hilfe der Stopped-Flow Apparatur untersucht. Hierbei zeigte sich, daß der Transport von Molekülen von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Häufig benutzt man dabei die von Overton (1895) aufgestellte Regel, daß Permeabilitätskoeffizient und Verteilungskoeffizient K_p proportional sind (siehe Kapitel 4.1.1). Moleküle mit einem Molekulargewicht < 50 g/mol besitzen einen 2-15 fach höheren Permeabilitätskoeffizienten. Dieses Permeationsverhalten zeigt keine Korrelation mit den Verteilungskoeffizienten (Walter und Gutknecht, 1986).

In Tabelle 5.4.5 werden die Verteilungskoeffizienten mit den Permeabilitätskoeffizienten der Moleküle dargestellt.

Molekül	Verteilungskoeffizient K_p	Permeabilitätskoeffizient P P_f und P_d [cm/s]
Wasser	$4,2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$ gemessen
Ethylenglykol	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$ gemessen
tert. Butylalkohol	2,4 gemessen	$3,9 \cdot 10^{-6}$ gemessen
Perfluoro-tert. Butylalkohol	1,9 gemessen	$1,4 \cdot 10^{-5}$ gemessen
Glycerin	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$ gemessen
Harnstoff	$2,8 \cdot 10^{-7}$	$4,4 \cdot 10^{-7}$ gemessen

Tabelle 5.4.5: Permeabilitätskoeffizient P_f und P_d der osmotischen und diffusiven Permeation bei $T=30^\circ\text{C}$ in DMPC-Vesikel und Verteilungskoeffizient K_p zwischen Hexadecan/Wasser bei $T=25^\circ\text{C}$.

Beim Transport von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht steht die Löslichkeit des penetrierenden Stoffes in der hydrophoben Schicht der Bilayer im Vordergrund. Deshalb wird oft der Verteilungskoeffizient K_p mit den Permeabilitätskonstanten der Moleküle verglichen.

Die nach Gleichung (3-9) berechneten Permeabilitätskonstanten der Moleküle von Ethylenglykol, Glycerin und Harnstoff weisen eine gute Übereinstimmung mit ihren Verteilungskoeffizienten auf.

Die mit Hilfe von IR-Spektroskopie ermittelten Verteilungskoeffizienten von tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol zeigen einen hohen Verteilungskoeffizienten in Hexadecan. Die Permeabilitätskoeffizienten sind aber mit denen von Ethylenglykol vergleichbar.

Bei der Diffusion von polaren Molekülen durch eine Lipiddoppelschicht können sich die Moleküle an den Grenzflächen (polare Kopfgruppe) anlagern und so Wassermoleküle substituieren. Desweiteren steigt die Permeabilität von einwertigen Alkoholen mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome (Brahm, 1983). Erhöht man die Anzahl der Hydroxylgruppen bei konstanter Anzahl der Kohlenstoffatome, so nimmt die Permeabilität ab (Cohen und Bangham, 1972). Dies läßt sich damit erklären, daß eine Erhöhung der Anzahl der

Kohlenstoffatome pro Molekül zu einer besseren Löslichkeit in Hexadecan und eine Vergrößerung der Anzahl von polaren Gruppen zu einem schlechteren Löslichkeitsverhalten im unpolaren Solvens führt, so daß die Permeabilität der entsprechenden Moleküle gegenüber der Lipiddoppelschicht zu- oder abnimmt.

Bei dem Transport der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht konnte bei allen Messungen ein mehr oder weniger starkes Maximum der Molekülpermeabilität im Phasenumwandlungsbereich beobachtet werden. Wie bei allen Messungen, konnte in der Nähe der Hauptphasenumwandlung T_m reproduzierbare Lichtstreu Kurven mit ausreichender Amplitudenänderung gemessen werden. Die Permeabilität stieg im Phasenumwandlungsbereich bis um das 10-fache an. Das starke Ansteigen der Permeabilität der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht läßt sich auf verschiedene Weise erklären. Einerseits kann auf Grund der Umorientierung der Lipidmoleküle die Membran besonders elastisch werden, was zu einer erhöhten Permeabilität führt. Eine Umorientierung der Lipidmoleküle kann zu einer Abnahme der Permeabilitätsbarriere führen, wodurch die Moleküle leichter durch die Lipiddoppelschicht permeieren können. Andererseits können sich kleine Defektstellen zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase im Phasenumwandlungsbereich ausbilden. Durch diese Domänen können dann die Moleküle die Lipidmembran ungehindert passieren.

Einen Hinweis für den Transportmechanismus der Moleküle durch die Lipidmembran liefert noch die Aktivierungsenergie, die für den Transport der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht aufgebracht werden muß. Diese Energie wird aus den Arrheniusdarstellungen der Molekülpermeation berechnet. Wenn man die Aktivierungsenergie für Glucose außer acht läßt, so ist sie für Wasser am kleinsten und für die Moleküle Harnstoff und Glycerin mit ca. 80 kJ/mol am größten. Ethylenglykol, tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol besitzen eine $E_A = 45-65$ kJ/mol. Die Ergebnisse der Aktivierungsenergie für Harnstoff stimmen mit den gefundenen Werten in Abschnitt 5.2 gut überein.

Wenn man die Ergebnisse der Permeabilitätskoeffizienten und der Verteilungskoeffizienten bzw. die Aktivierungsenergien für den Transportprozeß der Moleküle miteinander vergleicht, so lassen sich Rückschlüsse auf die Permeationsmechanismen der einzelnen Moleküle durch die Lipiddoppelschicht ziehen.

Die relativ großen Unterschiede zwischen den nach Gleichung (3-9) berechneten Permeabilitätskoeffizienten und den gemessenen Verteilungskoeffizienten der Moleküle von tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol lassen darauf schließen, daß die Molekülform einen starken Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit besitzt. Durch die hohen Verteilungskoeffizienten von tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol müßte eigentlich die Permeation so schnell ablaufen, daß sie mit der Stopped-Flow-Apparatur nicht mehr meßbar ist. Xiang und Anderson (1998) zeigten, daß die Querschnittsfläche der permeierenden Moleküle einen großen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Permeation der Moleküle ausübt. Bei den beiden Molekülen handelt es sich um sterisch große Moleküle, somit lassen sich die großen Unterschiede zwischen den P_d und K_p -Werten erklären.

Dadurch, daß die Moleküle von Ethylenglykol, tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol fast identische Permeabilitätskonstanten und Aktivierungsenergien besitzen, ist der Permeationsprozeß wahrscheinlich bei allen drei Molekülen gleich. Durch ihre polaren Gruppen im Molekül können sie sich höchstwahrscheinlich an der Grenzfläche Lipid/Wasser anlagern und substituieren dabei Wassermoleküle. Die Permeation der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht erfolgt wahrscheinlich nach dem Löslichkeitsdiffusionsmodell, aber einen Transport durch Poren oder durch transiente Defektstellen kann man nicht ausschließen.

Die geringe Abweichung der Permeabilitätskonstanten von Glycerin und Harnstoff mit ihren Verteilungskoeffizienten zwischen Hexadecan/Wasser und die hohen Aktivierungsenergien für den Permeationsprozeß lassen vermuten, daß die Permeation der beiden Moleküle nach dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus erfolgt.

Die langsame Permeation von Glucose durch die Lipiddoppelschicht ist eigentlich nur mit dem Löslichkeitsdiffusionsmodell zu erklären, obwohl die geringe Aktivierungsenergie eigentlich einen anderen Mechanismus vermuten läßt. Aber durch die langen Aufnahmezeiten bei der Stopped-Flow Messung sind wahrscheinlich die berechneten Permeabilitätskoeffizienten und auch somit der E_A -Wert mit einem großen Fehler behaftet.

5.5 Einfluß der Lipid-Detergens-Wechselwirkung auf die Permeation von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht

5.5.1 Detergentien

Detergentien sind amphiphile Moleküle, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Molekülteil besitzen. Der hydrophile Molekülteil kann geladen oder ungeladen sein, beim hydrophoben Molekülteil handelt es sich häufig um einen aliphatischen Kohlenwasserstoffrest. Detergentien besitzen die Eigenschaft die Grenzflächenspannung an einer Wasser-Luft-Grenzfläche zu reduzieren. Die Klassifizierung der Detergentien erfolgt nach der Ladung ihrer Kopfgruppe in anionische, kationische, nichtionische und zwitterionische Moleküle (Moroi, 1992).

Werden die Detergensmoleküle in Wasser aufgenommen, so sind sie bis zu einer charakteristischen Konzentration als Monomere löslich, die man als kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) bezeichnet. Bei höherer Detergengkonzentration werden die sich bildenden Aggregate der Detergentien in Lösung Mizellen genannt. Die Detergensmoleküle lagern sich so zusammen, daß die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten vom Wasser abgeschirmt werden. Das nichtionische Tensid Octylglucosid (OG) ist in Abbildung 5.5.1 dargestellt.

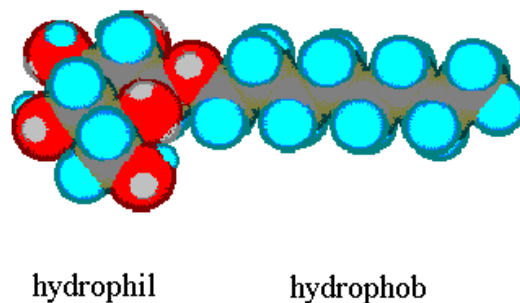


Abbildung 5.5.1: Struktur von n-Octyl-β-D-glucopyranosid (OG).

Anders als die Detergentien können die Phospholipide in Wasser zu lamellaren Doppelschichten aggregieren und durch Krümmen der Doppelschichten geschlossene Schalen (Vesikel) bilden, die ein wässriges Medium einschließen.

Mischt man das Detergens Octylglucosid (OG) mit Lipidvesikeln, so kann man eine Abhängigkeit der entstehenden Strukturen von der Konzentration des Octylglucosides beobachten. Für die einzelnen Zustände entwickelte Lichtenberg ein Modell, das den Zusammenhang der beiden Konzentrationen beschreibt (Lichtenberg et al., 1983; Lichtenberg, 1985, 1993; Jackson et al., 1982). Dieses Modell ist in drei Stufen unterteilt (vgl. Abbildung 5.5.2).

In der I. Stufe bauen sich die Detergensmoleküle in die lamellare Phospholipiddoppelschicht ein und es entstehen gemischte Vesikel. Diese Stufe wird bei vorgegebener Lipidkonzentration L durch die Detergenskonzentration D_t^{SAT} begrenzt. Im intermediären Koexistenzbereich (Stufe II) findet nach weiterem Tensideinbau eine strukturelle Umwandlung der Vesikel statt, es liegen gemischte Vesikel und gemischte Mizellen nebeneinander vor. Oberhalb der Konzentration D_t^{SOL} ist die strukturelle Umwandlung (Solubilisierung) der Vesikel abgeschlossen und es existieren nur noch Mizellen (Almog et al., 1986, 1990; Ollivon et al., 1988; Lasch et al., 1990). D_t^{SAT} und D_t^{SOL} sind dabei Funktionen der Lipidkonzentration.

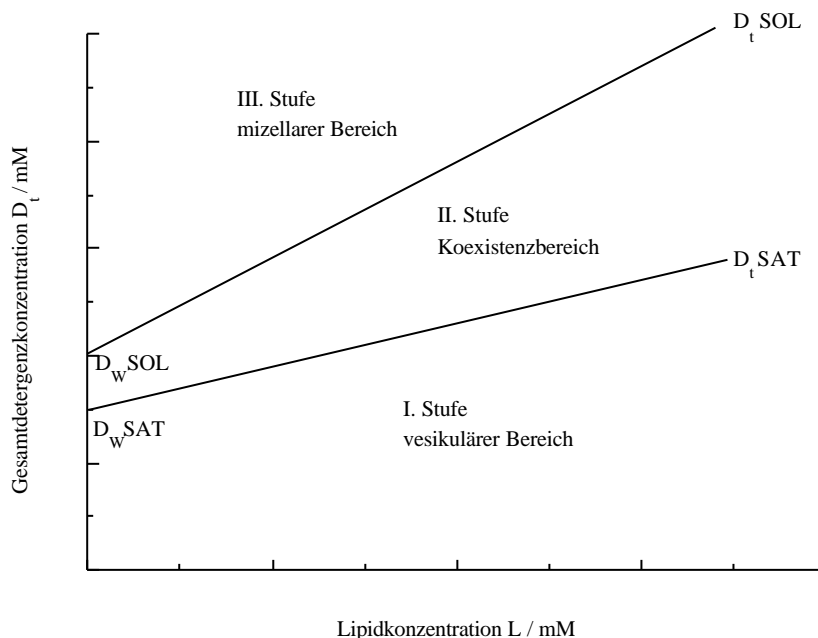


Abbildung 5.5.2: Schema zur Beschreibung der Phasen, die in wässrigen Detergens-Phospholipid-Dispersionen auftreten.

Die Schnittpunkte der beiden Geraden D_t^{SAT} und D_t^{SOL} mit der D_t -Achse liegen eigentlich im gleichen Punkt D_w^0 . Denn Beginn und Ende der Solubilisierung sollten bei einer verschwindend geringen Lipidkonzentration ($L \rightarrow 0$) bei nahezu der selben Detergengkonzentration stattfinden. Dieses Ergebnis wird aber nur selten gefunden, in den allermeisten Fällen schneidet die D_t^{SOL} -Gerade die D_t -Achse bei einem Wert der etwas über dem Schnittpunkt der D_t^{SAT} -Gerade und der D_t -Achse liegt.

Durch die Einlagerung der Detergensmoleküle in der Lipiddoppelschicht wird die Packung der Lipidmoleküle innerhalb der Lipidmembran verändert und damit auch das Permeabilitätsverhalten der Membran (Ueno et al., 1984). Man beobachtet meistens eine Permeabilitätszunahme der Membran. Eine geringe Zugabe von Detergens kann zu einer Optimierung der Packung der Lipidmoleküle in der Membran führen (Lasch et al., 1990). Durch weiteren Detergenseinbau werden die Lipidmembranen "undicht", d.h. es werden wahrscheinlich kurzlebige Poren gebildet, die die Membran durchspannen können (Schubert et al., 1986; Vinson et al., 1989; Walter et al., 1991).

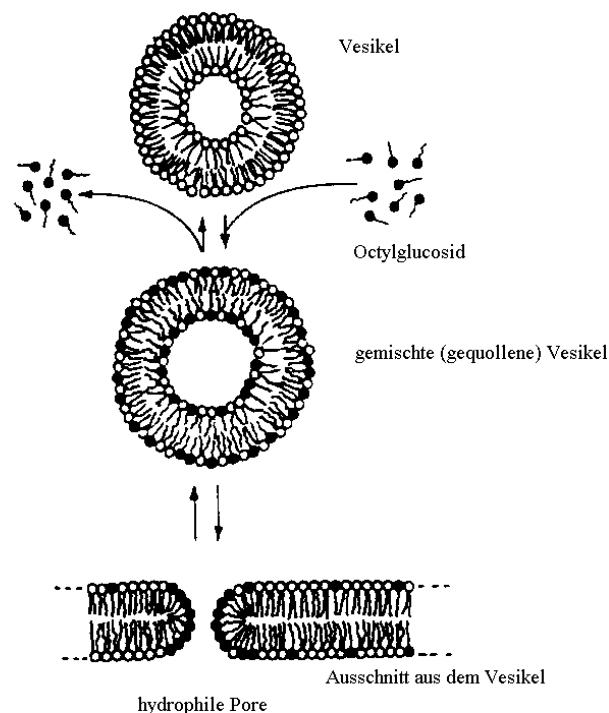


Abbildung 5.5.3: Einbau von Detergens in Vesikel, mit anschließender Porenbildung (Lasch, 1995).

5.5.2 Untersuchung des Einflusses von Octylglucosid auf die Permeabilität von Lipidmembranen

Um die Permeabilität von Membranen aus DMPC mit eingelagertem OG untersuchen zu können, ist die Kenntnis des Phasendiagramms analog Abbildung 5.5.2 notwendig.

In Abbildung 5.5.4 ist das Phasendiagramm aus Ergebnissen von Solubilisierungsexperimenten mit Hilfe der Isothermal Titration Calorimetry (ITC) von DMPC/OG bei einer Temperatur von 27°C dargestellt.

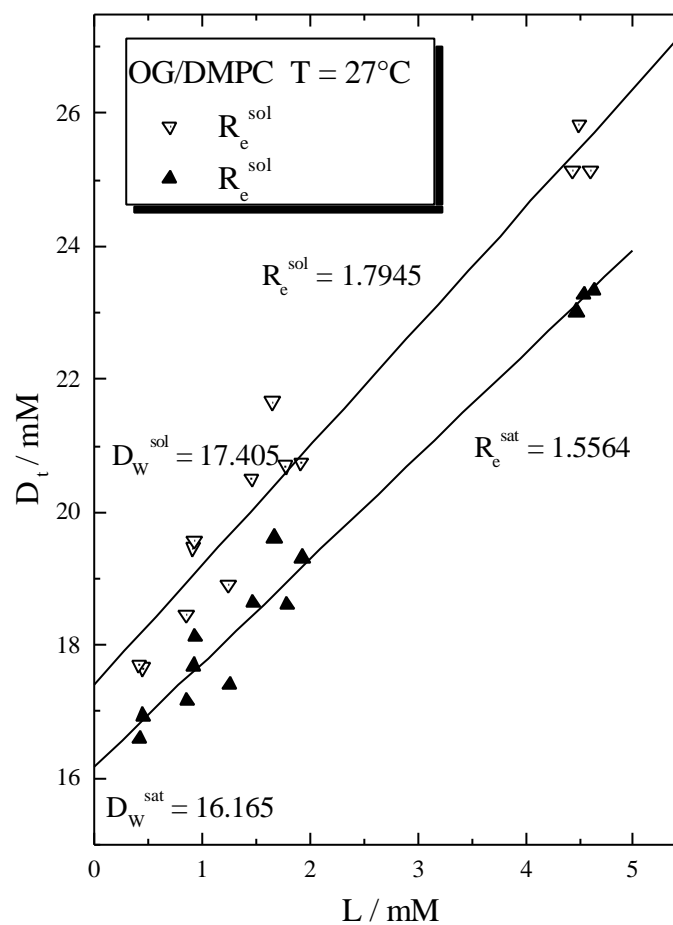


Abbildung 5.5.4: Phasendiagramm von DMPC/OG bei T = 27 °C (Keller et al., 1997)

R_e beschreibt das Verhältnis von Detergenskonzentration D_e zu Lipidkonzentration L in gemischten Vesikeln.

$$R_e = \frac{D_t - D_w}{L} = \frac{D_e}{L} \quad \text{Gleichung 5-1}$$

D_t = Gesamtdetergenskonzentration; D_e = Detergenskonzentration in der Lipiddoppelschicht; D_w = Detergenskonzentration im Wasser.

Die Phasengrenzen können durch die Verhältnisse R_e^{SAT} und R_e^{SOL} charakterisiert werden, die in Abbildung 5.5.4 durch die Steigung der Geraden gegeben sind.

Für unsere Untersuchungen war nur die Phasengrenze R_e^{SAT} von Interesse, da lediglich das Permeabilitätsverhalten von Vesikeln vor der beginnenden Solubilisierung gemessen werden sollte.

Bei allen Messungen wurden zuerst die Vesikel in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) hergestellt und mit der entsprechenden Detergenskonzentration versetzt. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten wurden die Lipid/Detergensgemische in der Stopped-Flow Apparatur mit den entsprechenden wässrigen Lösungen vermischt.

In Tabelle 5.5.1 sind die Ergebnisse der Stopped-Flow Messungen für die Permeation verschiedener Moleküle in DMPC-Vesikel mit unterschiedlichen Konzentrationen des Detergens Octylglucosid bei einer Temperatur von 30°C dargestellt. Die Lipidkonzentration wurde immer konstant gehalten und die Detergenskonzentration kontinuierlich bis fast zur Detergenskonzentration von R_e^{SAT} erhöht.

Man beobachtet mit steigender Konzentration von Octylglucosid im Lipid/Detergensgemisch, eine Zunahme der apparenten Vesikelgröße. Diese Zunahme ist besonders stark vor der Sättigungsgrenze R_e^{sat} ausgeprägt (Keller et al., 1997).

DMPC Konzentration	2,873mmol	2,873mmol	2,873mmol	2,873mmol	2,873mmol
OG Konzentrationen	0	8,42mmol	14,36mmol	20,4mmol	27,2mmol
vermischt	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
resultierende Konzentrationen					
DMPC	1,44mmol	1,44mmol	1,44mmol	1,44mmol	1,44mmol
OG	0	4,21mmol	7,18mmol	10,2mmol	13,6mmol
Durchmesser [nm]	157,9	166,24	176,64	178,66	246,3
Geschwindigkeitskonstante k[1/s]					
Wasser	9,09	22,39	40,95	36,21	128,98
tert. Butylalkohol	21,68	17,85	42,19	37,93	165,01
Ethylenglykol	11,04	16,82	27,28	23,11	89,28
Glycerin	0,565	0,634	0,636	0,561	0,724
Harnstoff	0,203	0,321	0,323	0,321	0,51
Glucose	0,00146	0,00177	0,00186	0,00122	0,0022
Permeabilitätskoeffizient [cm/s]					
Wasser	$3,84 \cdot 10^{-4}$	$9,94 \cdot 10^{-4}$	$1,93 \cdot 10^{-3}$	$1,73 \cdot 10^{-3}$	$8,48 \cdot 10^{-3}$
tert. Butylalkohol	$5,71 \cdot 10^{-5}$	$4,95 \cdot 10^{-5}$	$1,26 \cdot 10^{-4}$	$1,12 \cdot 10^{-4}$	$6,77 \cdot 10^{-4}$
Ethylenglykol	$2,91 \cdot 10^{-5}$	$4,66 \cdot 10^{-5}$	$8,03 \cdot 10^{-5}$	$6,88 \cdot 10^{-5}$	$3,66 \cdot 10^{-4}$
Glycerin	$1,49 \cdot 10^{-6}$	$1,76 \cdot 10^{-6}$	$1,87 \cdot 10^{-6}$	$1,67 \cdot 10^{-6}$	$2,97 \cdot 10^{-6}$
Harnstoff	$5,34 \cdot 10^{-7}$	$8,89 \cdot 10^{-7}$	$9,52 \cdot 10^{-7}$	$9,56 \cdot 10^{-7}$	$2,09 \cdot 10^{-6}$
Glucose	$3,86 \cdot 10^{-9}$	$4,89 \cdot 10^{-9}$	$5,48 \cdot 10^{-9}$	$3,65 \cdot 10^{-9}$	$9,04 \cdot 10^{-9}$

Tabelle 5.5.1: Ergebnisse der Permeabilitätsmessungen der DMPC-Vesikel dispergiert in 500 mM Glucoselösung/66,7 mM Phosphatpuffer (pH =7) und vermischt mit verschiedenen Detergskonzentrationen bei T = 30°C.

Die Permeabilitätskoeffizienten der Moleküle Wasser, tert. Butylalkohol und Ethylenglykol zeigen einen kontinuierlichen Anstieg mit steigender OG-Konzentration in der Lösung. Für die Moleküle Glycerin, Harnstoff und Glucose ist nur eine leichte Zunahme der Permeabilitätskoeffizienten zu beobachten. Die Beobachtung, daß bei Stopped-Flow Messungen mit kontinuierlicher Zunahme der OG-Konzentration in der Lösung, die Werte der Permeabilitätskoeffizienten zunehmen, läßt sich mit der Verteilung des Detergens in der Lipiddoppelschicht korrelieren.

Der Verteilungskoeffizient P ist dabei als Verhältnis der Molenbrüche des Detergens in den beiden vorhandenen Phasen definiert:

$$P = \frac{x_e}{x_w} \quad \text{Gleichung 5-2}$$

mit x_e = Molenbruch des Detergens in der Lipiddoppelschicht, x_w = Molenbruch des Detergens in Wasser.

Die Molenbrüche x_e bzw. x_w lassen sich nach Gleichung 5-3 und 5-4 berechnen. Gleichung 5-5 gibt die gesamte Detergenkonzentration in der Lösung an.

$$x_e = \frac{D_e}{D_e + L} \quad \text{Gleichung 5-3}$$

$$x_w = \frac{D_w}{D_w + W} \quad \text{Gleichung 5-4}$$

$$D_i = D_e + D_w \quad \text{Gleichung 5-5}$$

mit D_e = Detergenkonzentration in der Lipiddoppelschicht, L = Lipidkonzentration, D_w = Detergenkonzentration in der Wasserphase, W = Wasserkonzentration, D_i = gesamte Detergenkonzentration in der Lösung.

Stellt man Gleichung 5-3 um, so kann man die Konzentration von n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) in der Lipiddoppelschicht berechnen.

In Abbildung 5.5.5 sind die Ergebnisse der Tabelle 5.5.1 in der Form, Permeabilitätskonstanten gegen Molenbruch von Octylglucosid in der Lipiddoppelschicht abgebildet.

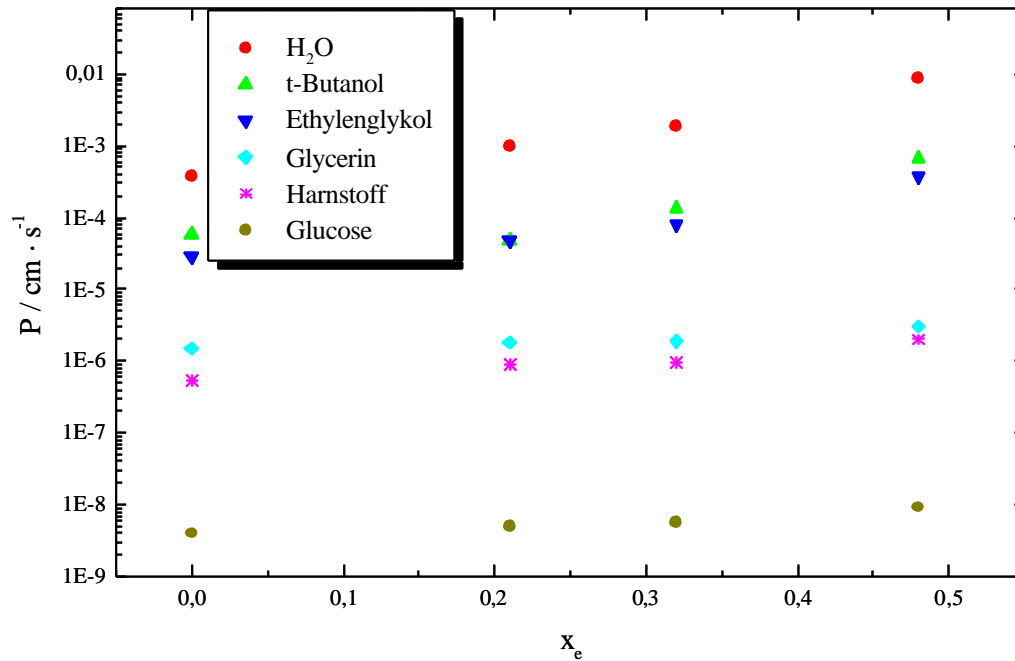


Abbildung 5.5.5: Permeabilitätskoeffizienten P_f und P_d der Moleküle durch die Lipidmembran in Abhängigkeit vom Molenbruch x_e des Detergens in der Lipiddoppelschicht.

Die relativen Zunahmen der Permeabilität mit steigender OG-Konzentration werden in Abbildung 5.5.6 veranschaulicht. Das Molekül Wasser weist die deutlichste Permeabilitätszunahme mit ca. 25% auf. Ethylenglykol und tert. Butylalkohol zeigen eine große Permeabilitätssteigerung durch die Lipidmembran mit Zunahme der OG-Konzentration in der Lipidmembran um ca. 12-13%. Die Moleküle Glycerin, Harnstoff und Glucose weisen gegenüber einer hohen OG-Konzentration in der Membran kaum eine Zunahme ihrer Permeabilitätskoeffizienten auf.

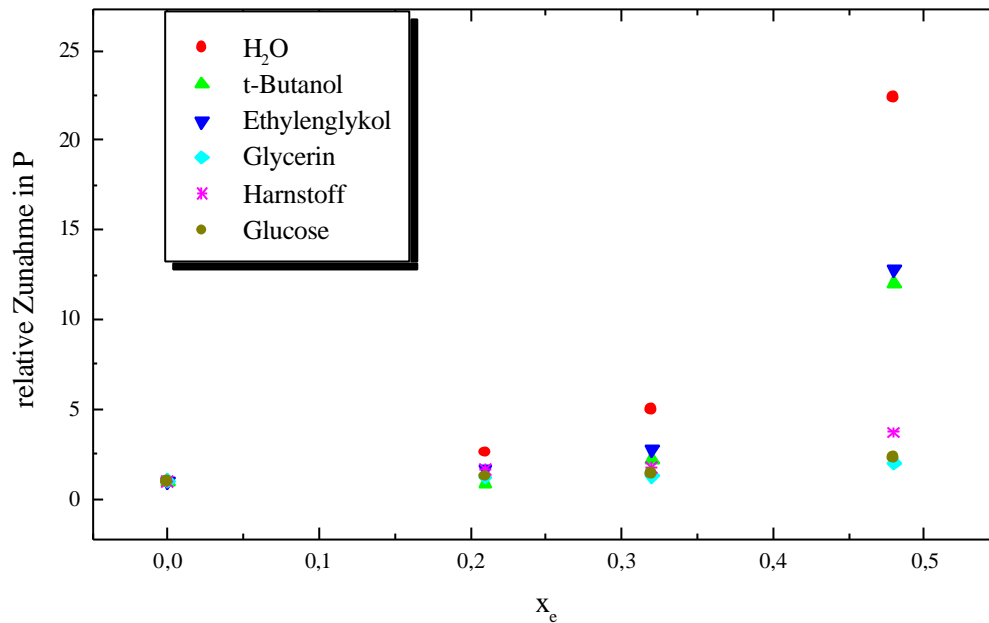


Abbildung 5.5.6: Relative Permeabilitätszunahme von P_f und P_d mit steigendem OG-Gehalt in der Lösung.

5.5.3 Zusammenfassung

Ob sich die Permeationseigenschaften von Lipiddoppelschichten durch Zugabe von Octylglucosid verändern, wurde mit Hilfe der Stopped-Flow Apparatur untersucht. Dabei wurde die Detergengkonzentration in der Lipidmembran kontinuierlich erhöht. Die benötigte Konzentration an Octylglucosid in der Lösung, um die Phasengrenze R_e^{SAT} zu erreichen, konnte im Phasendiagramm des Solubilisierungsexperimentes von Keller et al. (1997) abgelesen werden. Es zeigte sich, daß durch Zugabe von Octylglucosid die Permeabilität von Lipiddoppelschichten erhöht wird. Je höher die Konzentration von Octylglucosid in der Lipiddoppelschicht ist, desto schneller können die Moleküle die Lipiddoppelschicht durchdringen. Die Detergengkonzentration von Octylglucosid nahm von 0,38 über 0,67 bis 1,32 mmol in der Lipidmembran zu. Jedoch zeigten die Moleküle unterschiedliche Zunahmen in ihrer Permeabilitätsgeschwindigkeit.

Durch den Einbau von Detergensemolekülen in die Lipiddoppelschicht wird die Packung der Lipidmoleküle innerhalb der Membran verändert und damit auch ihre Durchlässigkeit (Ueno et al., 1984). Dieser Einbau von Octylglucosid führt wahrscheinlich dazu, daß die Vesikel “weich“ werden, d.h., die Permeabilitätsbarrieren für die Permeation von Molekü-

len durch die Lipiddoppelschicht nehmen mit steigendem Detergensgehalt in der Lipidmembran ab. Das aufweichen der Lipidschicht hängt stark von der Molekülform des OG's ab. Durch die kürzere Acylkette kommt es in der Doppelschicht zu einer Erhöhung der Unordnung der Kohlenwasserstoffketten was zu einer beweglicheren hydrophoben Schicht führt. Durch weiteren Einbau von Detergens in die Lipidschicht werden die Lipidmembranen immer durchlässiger, was mit gebildeten Poren, die die Membran durchspannen, erklärt werden kann (Schubert et al., 1986; Vinson et al., 1989; Walter et al., 1991). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um kurzlebige hydrophile Poren.

Die unterschiedlichen Permeabilitätszunahmen der Moleküle mit steigendem Octylglucosid-Gehalt in der Lipidmembran, lassen auf unterschiedliche Permeationswege schließen.

Die große Permeabilitätszunahme der Membran gegenüber den Wassermolekülen um den Faktor 25, kann mit einer Vergrößerung der Anzahl von Poren und transienten Defekten, die die Membran durchspannen, erklärt werden. Für die Moleküle Ethylenglykol und tert. Butylalkohol beobachtet man eine Erhöhung der Permeabilität um den Faktor 12-13. Diese relativ große Zunahme der Permeationsgeschwindigkeit läßt vermuten, daß bei hoher Detergensenkonzentration in der Lipidmembran, die Moleküle Ethylenglykol und tert. Butylalkohol die Lipidschicht mit Hilfe der gebildeten Poren oder durch transiente Defekte durchdringen.

Glycerin, Harnstoff und Glucose zeigen eine geringe Zunahme der Permeabilität um den Faktor 2-4, was darauf schließen läßt, daß diese Moleküle nach dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus die Membran passieren.

Bei der Permeation durch die Lipiddoppelschicht spielen wahrscheinlich nicht nur die Anzahl der Poren sondern auch die Porengröße eine entscheidende Rolle. Wichtig ist auch die Fähigkeit der Moleküle sich an der Lipiddoppelschicht anzulagern. Kleine und polare Moleküle können sich gut an den Kopfgruppen der Lipidmoleküle anlagern oder aber in Wechselwirkungen mit ihnen treten. Anscheinend besitzt nicht nur die Porenbildung einen großen Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht, sondern auch die Wechselwirkungen der Moleküle mit den Kopfgruppen der Lipidmoleküle. Wobei der Durchtritt der Moleküle durch die Grenzfläche zwischen Wasser und Lipid eine wesentliche Rolle bei der Permeation der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht spielt.

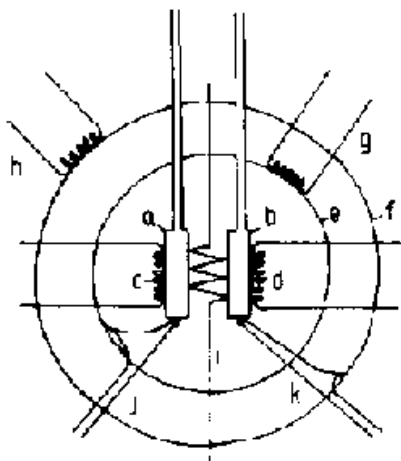
6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

6.1 Allgemeines und Problemstellung

Die Differential Scanning Calorimetry (DSC) ist eine Standardmethode, mit der die thermisch induzierten Phasenübergänge in biologischen und Modellmembranen untersucht werden können (Blume, 1988; 1991). Das Grundprinzip besteht im wesentlichen darin, unterschiedliche Wärmekapazitäten von Proben- und Referenzzelle zu detektieren und mittels einer Hilfsheizung auszugleichen. Mit Hilfe der DSC können thermodynamische Parameter wie die Phasenumwandlungstemperatur T_m und die mit der Umwandlung verknüpften Änderungen der Enthalpie ΔH , sowie die Entropie ΔS ermittelt werden.

Das Mikrokalorimeter besteht aus zwei identischen Meßzellen, die von einem adiabatischen Mantel umgeben sind. Beide Zellen sind mit einer Hauptheizspule und einer Hilfsheizspule umgeben. Die Proben und Referenzzelle werden mit einer konstanten Leistung (10-60°C pro Stunde) aufgeheizt.

Findet in der Probe eine endotherme Phasenumwandlung statt, so wird die daraus resultierende Temperaturdifferenz zwischen den Zellen über eine Differentialthermosäule, die mit beiden Zellen verbunden ist, detektiert und durch eine Zusatzleistung der Temperatursgleichung induziert. In Abbildung 6.1 wird der schematische Aufbau einer DSC-Meßzelle ab-



Das Privalov-Kalorimeter

- a) Probezelle
- b) Referenzzelle
- c) und d) Heizspulen
- e) und f) adiabatische Mäntel
- g) und h) Heizspulen der adiabatischen Mäntel
- i) Differentialthermosäule zwischen den Zellen
- j) und k) Thermoelment zwischen den Meßzellen und dem adiabatischen Mantel

gebildet.

Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau einer DSC-Meßzelle.

Die benötigte Wärme wird als elektrische Energie N zugeführt, die mit der Wärmekapazität c der Zelle in folgendem Zusammenhang steht:

$$c = N \cdot \left(\frac{dt}{dT} \right) \quad \text{Gleichung 6-1}$$

mit dT : Temperaturänderung im Zeitintervall dt .

Durch die Phasenumwandlung ergibt sich eine Differenz der Wärmekapazitäten in der Meß- und Referenzzelle.

$$c_{Diff} = c_{Pr} - c_{Ref} = (N_{Pr} - N_{Ref}) \cdot \left(\frac{dt}{dT} \right) = N_{Diff} \cdot \left(\frac{dt}{dT} \right) \quad \text{Gleichung 6-2}$$

- mit c_{Pr} : Wärmekapazität der Probe
 c_{Ref} : Wärmekapazität der Referenzzelle
 c_{Diff} : Differenz der Wärmekapazitäten
 N_{Pr} : Energie, die der Probe zugeführt wird
 N_{Ref} : Energie, die der Referenzzelle zugeführt wird.

Daraus ergibt sich die Phasenumwandlungsenthalpie Δh durch Integration

$$\Delta h = \int_{T_A}^{T_E} c_{Diff} dT = \int_{t_A}^{t_E} N_{Diff} dt \quad \text{Gleichung 6-3}$$

- mit T_A : Anfangstemperatur der Umwandlung
 T_E : Endtemperatur der Umwandlung
 t_A : Zeitpunkt, zu dem die Zusatzheizung eingeschaltet wird
 t_E : Zeitpunkt, zu dem die Zusatzheizung ausgeschaltet wird.

Durch Division mit der Molzahl n kann man aus Δh die molare Enthalpie ΔH erhalten.

$$n = c_{\text{Lip}} \cdot V \quad \text{Gleichung 6-4}$$

mit c_{Lip} : Konzentration des Lipids
 V : Zellvolumen.

$$\Delta H = \frac{\Delta h}{n} \quad \text{Gleichung 6-5}$$

Aus der Gibbs'schen Gleichung

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Gleichung 6-6}$$

folgt mit $\Delta G = 0$ die Entropieänderung bei der Phasenumwandlung

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad \text{Gleichung 6-7}$$

Mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) wurde an Dimyristoylphosphatidylcholin untersucht, ob die Lamellarität der DMPC-Vesikel und verschiedene Konzentrationen von gelöstem Harnstoff einen Einfluß auf die Phasenumwandlungstemperatur besitzen.

Desweiteren wurden Wärmekapazitätskurven von einigen Lipidgemischen bestimmt, um sie in Abschnitt 5.3 mit den Ergebnissen der Stopped-Flow Messungen vergleichen zu können.

6.2 Durchführung der Messung

6.2.1 Probenvorbereitung

Die Vesikel wurden nach drei verschiedenen Methoden hergestellt, um den Einfluß der Größe und der Lamellarität der Vesikel auf die Phasenumwandlungstemperatur zu untersuchen.

Methode 1: Die DMPC-Proben wurden in einem Lösungsmittel suspendiert. Die Suspension wurde im Wasserbad für 10 Minuten auf 80°C erhitzt, mit einem mechanischen Rüttler 2 Minuten dispergiert und anschließend im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Es lagen multilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 500-1500 nm vor.

Methode 2: Die nach Methode 1 hergestellten Vesikel wurden nach dem dispergieren in einem Ultraschallbad bei 80°C mit einer Leistung von 50 Watt 1-2 Minuten beschallt. Die klare Suspension wurde im Wasserbad auf Raumtemperatur langsam abgekühlt. Es handelte sich um unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 100-200 nm und mit einem Anteil an multilamellaren Vesikel von ca. 5%.

Methode 3: Die beschallten Vesikel wurden zusätzlich bei einer Temperatur, 10°C oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur, extrudiert. Die erhaltenen unilamellaren Vesikel hatten eine einheitliche Größenverteilung mit einem Durchmesser von 80-150 nm.

Bei allen DSC-Messungen wurde die gleiche Lipidkonzentration von 1 mg/ml gewählt. In den Messungen zur Überprüfung der Stabilität der Vesikel wurden nur extrudierte Vesikel vermessen.

6.2.2 Aufnahme der Kalorigramme

Die vorbereiteten Proben wurden mit einer Glasspritze luftblasenfrei in die Meßzelle mit einem Volumen von 1,2197 ml eingefüllt. Die Referenzzelle enthielt das Lösungsmittel. Um Gasentwicklung während der Messung zu verhindern, wurde auf die Zelle ein Druck von ca. 0,8 bar angelegt. Der Temperaturbereich der Messung lag zwischen 5-80°C mit einer Aufheizrate von 60°C pro Stunde. Von jeder Probe wurden jeweils drei Kalorigramme aufgenommen, die Äquilibrierzeit zwischen den Messungen lag bei einer Stunde.

6.2.3 Auswertung der Kalorigramme

Mit dem Origin Programm der Fa. Microcal Inc. erfolgte die Auswertung der Kalorigramme. Vor der Subtraktion der Basislinie wurde die differentielle molare Wärmekapazität c_{diff} , bezogen auf die DMPC Konzentration, ermittelt. Es wurden die Umwandlungstemperaturen T_V bzw. T_m als Maxima der Wärmekapazitätskurven erhalten. Die drei Aufheizkurven stimmten im wesentlichen überein, für die Auswertung wurde jeweils die 2. Messung verwendet.

6.3 Ergebnisse und Diskussion der DSC-Messungen

6.3.1 Einfluß der Konzentration von Harnstoff auf das Phasenumwandlungsverhalten der DMPC-Vesikel

Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abbildungen 6.2 bis 6.4 dargestellt. In Abbildung 6.2 sind die DSC-Kurven der DMPC-Vesikel in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration aufgetragen. In den Wärmekapazitätskurven sind zwei Maxima zu erkennen. Das erste Maximum liegt in einem Temperaturbereich von 11-15°C und wird der Vorumwandlung $T_V (L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'})$ zugeordnet. Das zweite Maximum, die Hauptphasenumwandlung ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) ist bei einer Temperatur von 22-24°C zu erkennen. Abgesehen von einer leichten Verschiebung der Hauptphasenumwandlung zu niedrigeren Temperaturen um ca. 1,5 °C bei einer kontinuierlichen Zunahme der Harnstoffkonzentration, ist der Einfluß auf die DMPC-Matrix gering.

In Abbildung 6.3 sind analog zu Abbildung 6.2 die Meßkurven der beschallten Vesikel im jeweiligen Lösungsmittel aufgetragen. Die Wärmekapazitätskurven gleichen denen in Abbildung 6.2, jedoch fällt auf, daß die Vorumwandlung teilweise verschwunden ist, da sich die $P_{\beta'}$ -Phase bei kleineren, starker gekrümmten Vesikeln nur noch schlecht ausbilden kann. Die Temperatur der Hauptphasenumwandlung nimmt analog den dispergierten Vesikeln mit steigender Harnstoffkonzentration des Lösungsmittels minimal ab.

Die Ergebnisse der extrudierten Vesikel sind in Abbildung 6.4 dargestellt. Eine Vorumwandlung ist in den Meßkurven kaum noch ersichtlich. Auch hier ist eine leichte Verschiebung der Hauptphasenumwandlungstemperatur mit steigender Harnstoffkonzentration zu beobachten.

Desweiteren fällt auf, daß die multilamellaren Vesikel (Methode 1) im Vergleich mit den beiden anderen Präparationsmethoden einen deutlich größeren Anstieg der molaren Wärmekapazitätskurven bei der Phasenumwandlung zeigen und damit das zugehörige Maximum viel schärfer definiert ist.

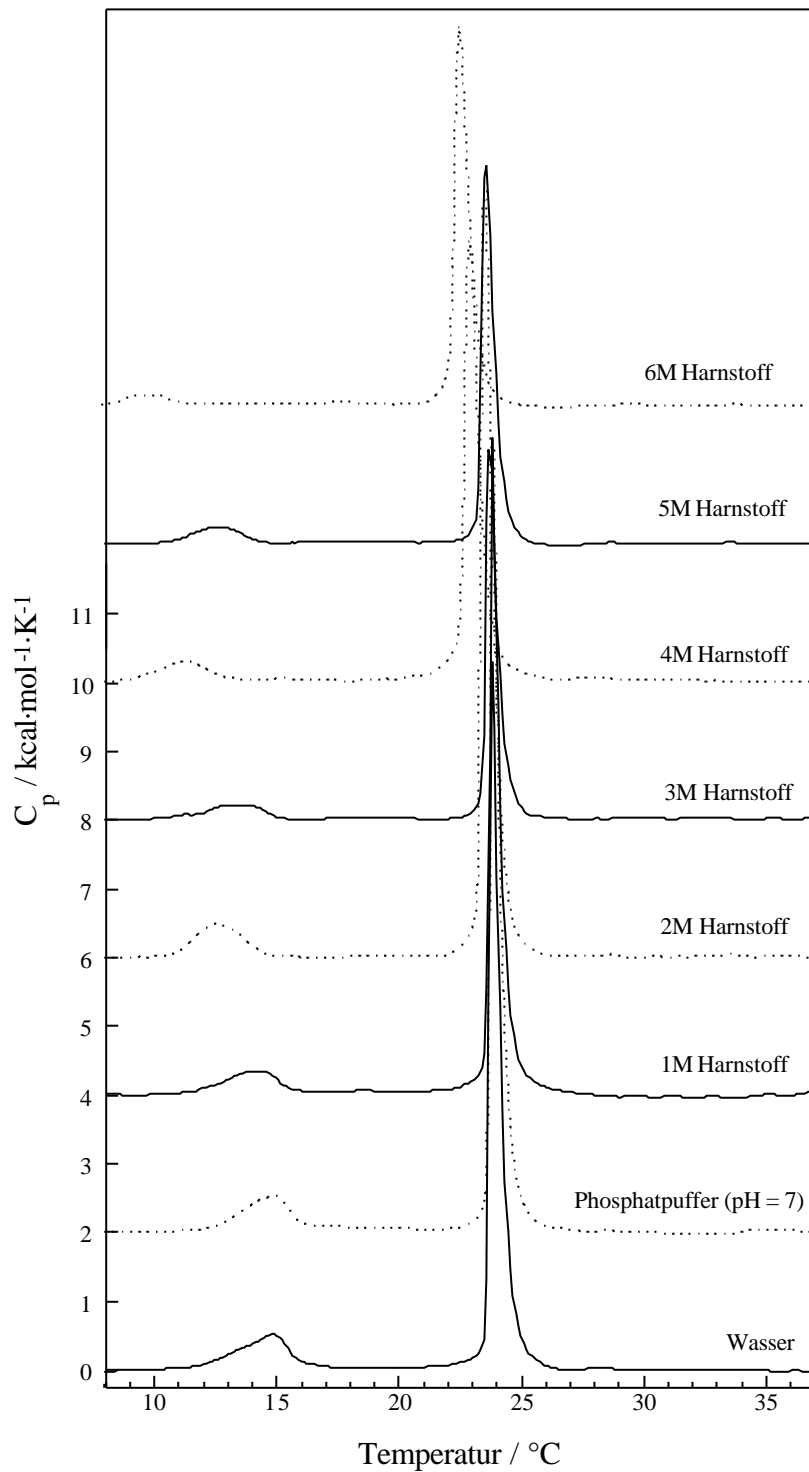


Abbildung 6.2: Kalorigramme der dispergierten DMPC-Vesikel mit einem Durchmesser von 500-1500 nm in Lösungen mit unterschiedlicher Harnstoffkonzentration/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7).

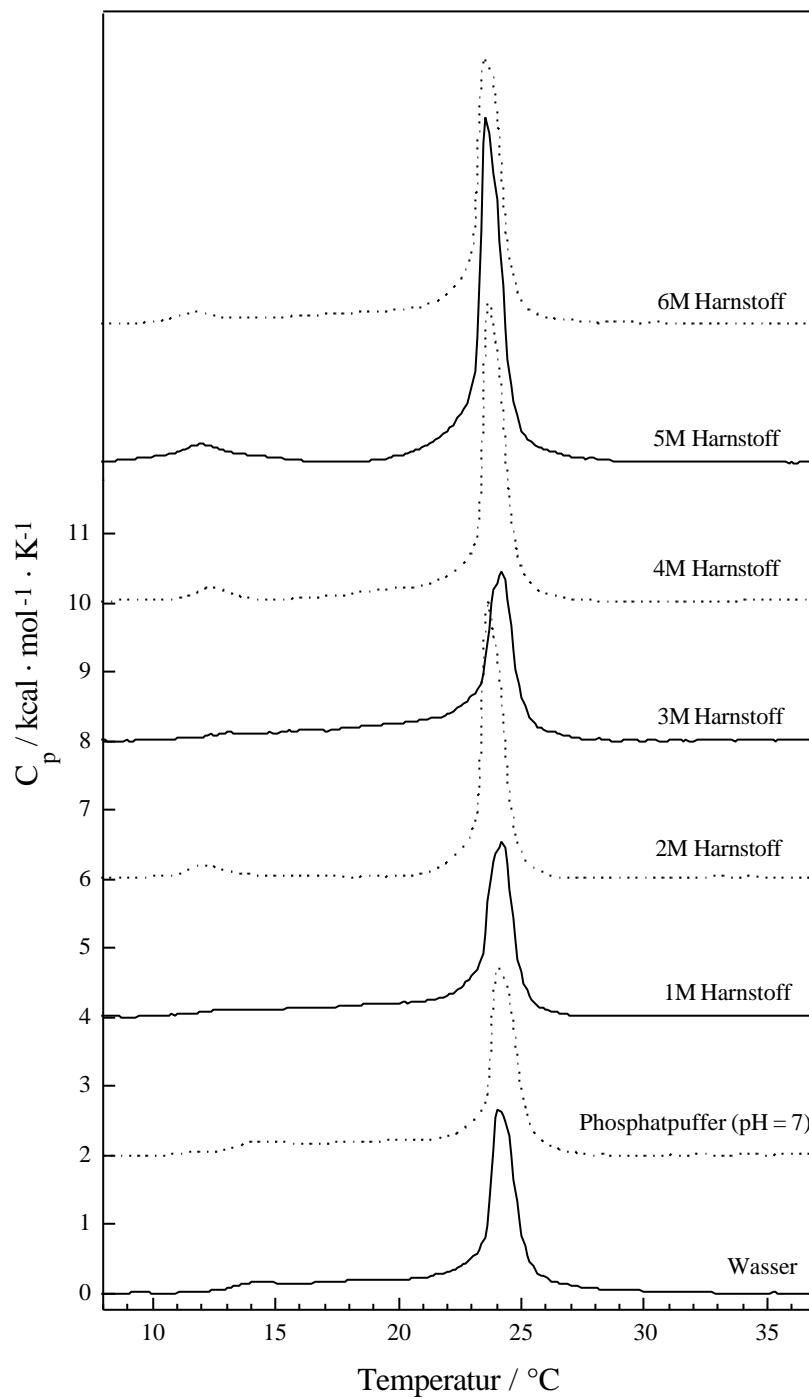


Abbildung 6.3: Kalorigramme der beschallten DMPC-Vesikel mit einem Durchmesser von 100-200 nm in Lösungen mit unterschiedlicher Harnstoffkonzentration/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7).

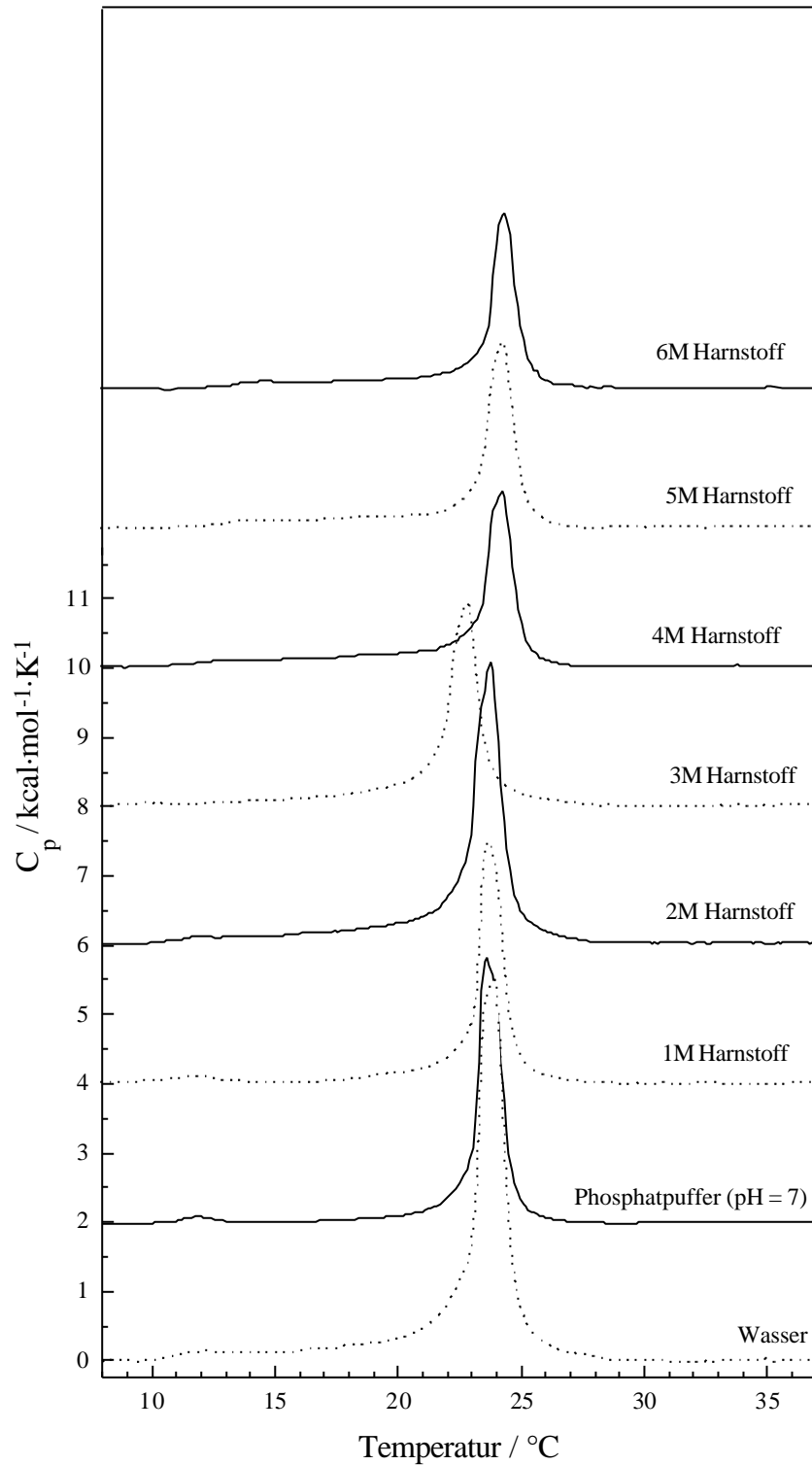


Abbildung 6.4: Kalorigramme der extrudierten DMPC-Vesikel mit einem Durchmesser von 80-150 nm in Lösungen mit unterschiedlicher Harnstoffkonzentration/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7).

Die Temperaturwerte der Hauptphasenumwandlung sind in Tabelle 6.1 zusammengefaßt.

Lösung	T_m dispergiert [°C]	T_m beschallt [°C]	T_m extrudiert [°C]
Wasser	23,8	24,1	24,3
Phosphatpuffer (pH = 7)	23,9	24,0	24,3
1M Harnstoff	23,8	24,0	24,2
2M Harnstoff	23,5	23,6	22,8
3M Harnstoff	23,7	24,2	23,7
4M Harnstoff	22,8	23,6	23,6
5M Harnstoff	23,6	23,6	23,6
6M Harnstoff	22,4	23,5	23,9

Tabelle 6.1: Temperaturen der Hauptphasenumwandlung von DMPC-Vesikeln.

Die Temperatur der Phasenumwandlung der dispergierten, beschallten bzw. extrudierten DMPC-Vesikel zeigt eine geringe Abnahme mit steigender Harnstoffkonzentration. Nur bei einer 6 molaren Harnstoffkonzentration fällt der Wert der dispergierten Vesikel von T_m mit 22,4°C etwas heraus. Dies liegt wahrscheinlich an einer fehlerhaften Herstellung der Lipidvesikel.

Die Meßkurven unterscheiden sich, je nach Vesikelpräparation, deutlich in ihrer Kooperativität der Phasenumwandlung.

Die Umwandlungsenergie zeigt für alle drei Vesikelpräparationen vergleichbare Werte, eine wesentliche Enthalpieänderung bzw. Entropieänderung mit steigender Harnstoffkonzentration läßt sich nicht feststellen. In Tabelle 6.2 werden die Enthalpiewerte ΔH_m und in Tabelle 6.3 werden die Entropiewerte ΔS_m der Hauptphasenumwandlung dargestellt.

Lösung	ΔH_m dispergiert [kcal·mol ⁻¹]	ΔH_m beschallt [kcal·mol ⁻¹]	ΔH_m extrudiert [kcal·mol ⁻¹]
Wasser	6,1	5,9	4,7
Phosphatpuffer (pH = 7)	6,3	5,8	5,4
1M Harnstoff	5,4	5,3	5,3
2M Harnstoff	7,4	4,9	6,2
3M Harnstoff	3,5	5,5	8,6
4M Harnstoff	5,4	6,3	5,6
5M Harnstoff	3,7	7,0	5,5
6M Harnstoff	4,4	7,2	11,2

Tabelle 6.2: Hauptphasenumwandlungsenthalpien ΔH_m von verschiedenen hergestellten DMPC-Vesikeln.

Lösung	ΔS_m dispergiert [cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	ΔS_m beschallt [cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	ΔS_m extrudiert [cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
Wasser	21	20	16
Phosphatpuffer (pH = 7)	21	20	18
1M Harnstoff	18	18	18
2M Harnstoff	25	17	21
3M Harnstoff	12	18	29
4M Harnstoff	18	21	19
5M Harnstoff	13	24	18
6M Harnstoff	15	24	38

Tabelle 6.3: Hauptphasenumwandlungsentropien ΔS_m von verschiedenen hergestellten DMPC-Vesikeln.

Die berechneten ΔH_m und ΔS_m Werte sind nur bedingt zu interpretieren, da eine Phasentrennung in Vor- bzw. Hauptumwandlung bei manchen Kurven nicht immer möglich war. Jedoch ist eine Enthalpieabnahme zu kleineren Vesikeln zu beobachten.

6.3.2 Stabilität der Vesikel

Um die Stabilität der Vesikel gegen Aggregation und Fusion zu überprüfen, wurden DMPC-Vesikel nach der Methode 3 hergestellt, damit eine einheitliche Größenverteilung der Vesikel gewährleistet war. Die Vesikelproben wurden sofort nach der Herstellung (nach Abkühlung auf RT), nach einem Tag und nach zwei Tagen vermessen. In Abbildung 6.5 sind die Kalorigramme von DMPC-Vesikeln nach verschiedenen Lagerungszeiten der Proben dargestellt.

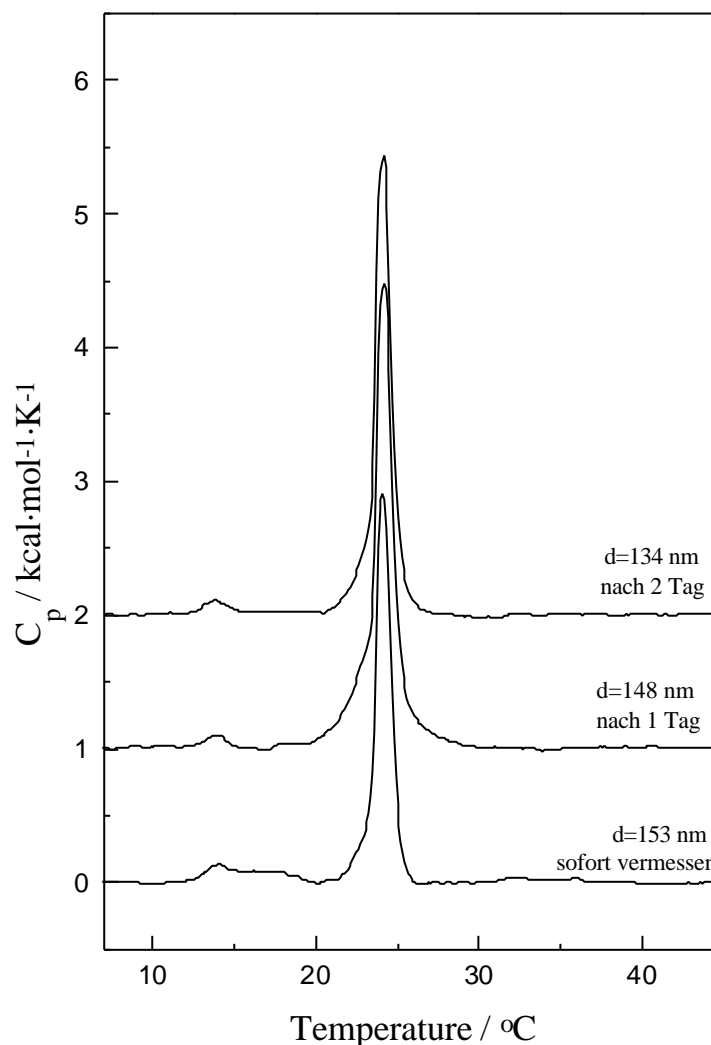


Abbildung 6.5: Kalorigramme von DMPC-Vesikeln mit unterschiedlichen Lagerungszeiten. Die Lipide wurden in 66,7 mM Phosphatpuffer (pH=7) dispergiert und nach Methode 3 hergestellt.

Eine Stabilität der Vesikel über zwei Tage ist anscheinend gegeben. Allerdings nimmt der Vesikeldurchmesser während der Lagerungszeit leicht ab. Vesikel, die länger als 3 Tage aufbewahrt wurden, neigen zur Fusion, so daß große Vesikel mit geringerer Oberflächenkrümmung entstehen. Dadurch müßte eigentlich der Vesikeldurchmesser zunehmen, was aber hier nicht beobachtet werden konnte.

Die DSC-Meßkurven brachten keine nennenswerten Unterschiede. Die dispergierten und beschallten Vesikel waren von ähnlicher Stabilität und zeigten auch eine Lagerfähigkeit von bis zu 2 Tagen.

6.3.3 Einfluß des Lösungsmittels auf die Phasenumwandlung

Die DMPC-Vesikel wurden in 500 mM wässrigen Lösungen der zu untersuchenden Substanzen hergestellt. Es wurden nur die extrudierten Vesikel untersucht.

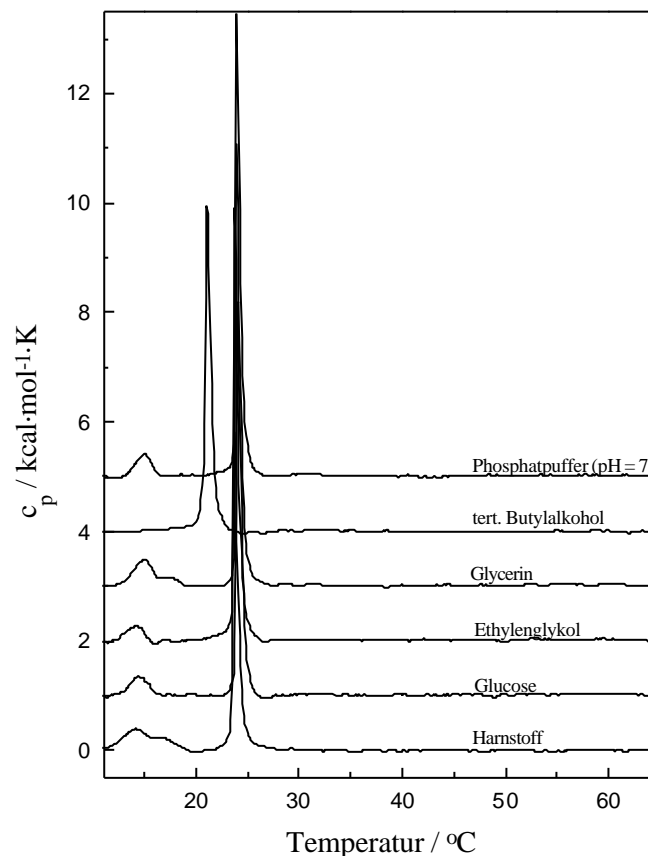


Abbildung 6.6: Kalorigramme von DMPC-Vesikel mit unterschiedlichen wässrigen Lösungen/66,7 mM Phosphatpuffer (pH = 7) bei einer Konzentration von 500 mM.

Die Untersuchung des Einflusses der polaren Moleküle auf die Phasenumwandlung der DMPC-Vesikel ergab, daß keine meßbaren Veränderungen an den Wärmekapazitätskurven zu beobachten waren.

Nur bei Gegenwart von tert. Butanol, das unpolar ist, ergaben sich Änderungen der DSC-Kurve.

Es wurde keine Vorumwandlung beobachtet, desweiteren ist $T_m = 22^\circ\text{C}$ zu niedrigen Temperaturen verschoben, was auf eine Anlagerung bzw. Einlagerung des tert. Butylalkohols an die Lipiddoppelschicht zurückzuführen ist. DSC-Messungen von Perfluor-tert. Butylalkohol mit dem Lipid DMPC konnten nicht durchgeführt werden, da es zu einer Phasenseparation in zwei Phasen kam.

6.4 Zusammenfassung

Mittels Differentialkalorimetrie wurde der Einfluß verschiedener Vesikelherstellungsmethoden auf die DMPC Phasenumwandlung untersucht. Die Überlagerung der Phasenvor- und Phasenhauptumwandlung bzw. die verringerte Kooperativität der Umwandlung für kleine Vesikel wurde schon von Gruenewald et al. (1979) und Kodama et al. (1993) festgestellt.

Dabei wurde das Phasenumwandlungsverhalten von DMPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Vesikelgröße untersucht. Es wurde besonders der Einfluß der Beschallungszeit, der Beschallungsleistung und der Temperatur auf die Vesikelgröße und Lamellarität überprüft. Die ermittelten Werte von Kodama et al. (1993) zeigten eine gute Übereinstimmung mit den hier dargelegten Ergebnissen.

Die Vesikelpräparation und die Harnstoffkonzentration üben keinen meßbaren Einfluß auf die Phasenumwandlungstemperatur der DMPC-Vesikel aus. Eine Anlagerung der Harnstoffmoleküle bzw. starke Wechselwirkungen mit der Lipiddoppelschicht kann man nach diesen Ergebnissen ausschließen.

Mit abnehmender Vesikelgröße nimmt auch leicht die Phasenumwandlungsenthalpie ab. Da die Enthalpie stark von der Packungsdichte der Vesikel abhängt und der Packungsparameter mit steigender Oberflächenkrümmung abnimmt, führt dies zu einer Verminderung der van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Kohlenstoffketten. Deswegen muß bei

einem Phasenübergang auch weniger Energie aufgebracht werden, um z.B. von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase zu gelangen. Die leichte Abnahme der Enthalpie und Entropie spiegeln qualitativ die Ergebnisse von Kodama et al. (1993) wieder.

Die Stabilität der Vesikel ist über einen Zeitraum von 2 Tagen gegeben. Bei der Lagerung der hergestellten Vesikel ist darauf zu achten, daß die Lagerungstemperatur oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur des verwendeten Lipids liegt.

Anscheinend haben verschiedene, gelöste polare Moleküle keinen Einfluß auf die DMPC Matrix. Nur tert. Butylalkohol bewirkt eine Verschiebung der Phasenumwandlung. Durch die Wechselwirkungen der Moleküle mit der Lipiddoppelschicht nimmt die Unordnung in der Gelphase zu, was zu einem Verschwinden der Phasenvorumwandlung und einer Verschiebung der Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m zu kleineren Temperaturen führt.

7. Diskussion der Ergebnisse

Zur Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten P_f und P_d wurden die Geschwindigkeitskonstanten der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation bzw. der diffusiven Permeation von Molekülen durch die Lipiddoppelschicht mittels der Stopped-Flow Messungen experimentell bestimmt. Für die Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten benötigt man den mittleren Vesikelradius, der mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) α -ermittelt wurde. Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten k , für alle drei unterschiedlichen Permeationsexperimente, aus mehreren aufeinanderfolgenden Messungen, schwankten um $\pm 10\%$. Die bei der Photonen-Korrelations-Spektroskopie beobachtete Schwankung der Vesikeldurchmesser, bei drei aufeinander folgenden Messungen, lag unterhalb von 5%. Um die Größe der Fehlerbalken in den Arrheniusdarstellungen abbilden zu können, wurden am Anfang der Untersuchung der Permeabilität, fünf Vesikelproben des Lipids DMPC hergestellt und mittels der Stopped-Flow Apparatur vermessen. Für die Permeabilitätskoeffizienten in der flüssig-kristallinen Phase wurde eine Abweichung von maximal 10% der Werte beobachtet und in der Gelphase lag die Streuung der berechneten Permeabilitätskoeffizienten bei 15%. Desweiteren ergab sich wie zu erwarten, eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Vesikelgröße, d.h. bei kleinen Vesikeln war die gemessene Geschwindigkeitskonstante k höher als bei größeren Vesikeln.

Die apparativen Meßfehler und die Fehler der Vesikelpräparation, ergaben für die berechneten Permeabilitätskoeffizienten eine Meßgenauigkeit von $\pm 10\%$.

Für die Herstellung von unilamellaren Vesikeln ist eine Vielzahl von Präparationsmethoden bekannt (Lichtenberg und Barenholz, 1987). Die unilamellaren Vesikel wurden durch Beschallung in einem Ultraschallbad hergestellt und anschließend mit Hilfe des LiposoFast Extruders extrudiert um eine einheitliche Größenverteilung zu gewährleisten. Die Beschallung der Proben mit dem Ultraschallbad ist im Vergleich zu einer Beschallung mit einem Titanschwingstab sehr viel schonender. Die erhaltenen Vesikelpopulationen sind deshalb stabiler und eine Steuerung der Vesikelgröße ist durch unterschiedliche Beschallungszeiten möglich (Jansen und Blume, 1995).

Für die Stopped-Flow Messungen wurden Vesikel mit einem Durchmesser von 80-170 nm verwendet.

Die Stabilität und besonders die Lagerfähigkeit der Vesikel ist von verschiedenen Parametern (Vesikelgröße, Temperatur der Lagerung und Methode der Vesikelpräparation) abhängig. Kleinere Vesikel neigen sehr stark zu Aggregation und Fusion (Wong und Thompson, 1982; Wong et al., 1982), hingegen sind große Vesikel stabil und eine gewisse Zeit lagerfähig (Lichtenberg und Barenholz, 1987; Habel, 1989).

Deshalb wurde die Stabilität und die Lagerfähigkeit der Lipidvesikel über einen Zeitraum von 2 Tagen mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) untersucht. Die Vesikelproben wurden bei einer Temperatur oberhalb von der Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m gelagert. Die DSC-Messungen zeigten keine Veränderung der Kalorigramme und die gemessenen Vesikeldurchmesser mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung, nahmen nur geringfügig mit der Lagerungszeit ab. Eine Fusion bzw. Aggregation der Vesikel konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Stabilität und die Lagerfähigkeit der Vesikel über zwei Tage war somit gewährleistet; bei einer Temperatur oberhalb von T_m des Phospholipids.

Um Veränderungen an den Lipiddispersionen ausschließen zu können und um die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten bzw. die berechneten Permeabilitätskoeffizienten der verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die extrudierten Vesikel noch am selben Tag vermessen.

Die Vesikelgröße wurde kurz vor und kurz nach der Stopped-Flow Messung mittels DLS untersucht, um auszuschließen, daß sich die Vesikelgröße während des Experiments verändert. Dies war erforderlich, da beim Vermischen in der Stopped-Flow Apparatur Scherkräfte auftreten, die möglicherweise zum Aufreißen der Membran führen können, was zu einer Aggregation und Fusion von Lipidvesikeln führen kann. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung zeigten keine meßbaren Vergrößerungen der Lipidvesikel.

Ob sich aber durch die Stopped-Flow Messung multilamellare Vesikel gebildet haben, konnte nicht untersucht werden, da bei der Photonen-Korrelations-Spektroskopie die Vesikelgröße nur durch eine Analyse der Lichtstreuereigenschaften der Probe bestimmt wird. Eine Aussage über Lamellarität und Form der Vesikel kann man nur durch elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden wie Gefrierbruch- und Cryo-Elektronenmikroskopie (Groll et al., 1995) tätigen.

Untersuchungen der Lamellarität an beschallten Vesikeln mit Hilfe der Elektronenmikroskopie haben gezeigt, daß mit steigender Vesikelgröße die Anzahl multilamellarer Vesikel zunimmt (Habel, 1989; Lichtenberg und Barenholz, 1987; Hallet et al., 1991).

Die diffusionskontrollierte Wasserpermeation P_d und die Permeation von Molekülen durch die Lipiddoppelschicht kann unter Verwendung von Gleichung (3-9) direkt berechnet werden. Für die Berechnung der osmotische Wasserpermeation P_f durch Lipidmembranen muß zusätzlich die Volumenänderung ΔV der Vesikel beim Vesikelwachstum bzw. bei der Vesikelschrumpfung bekannt sein. Durch die für uns zur Verfügung stehenden Meßmethoden konnten wir die Größe der Volumenveränderung während der Stopped-Flow Messung nicht bestimmen.

Eine genaue Bestimmung der Volumenänderung für die Lipidproben ist schwierig, da die Größe von ΔV der Vesikel sehr stark von der Vesikelgröße abhängig ist (Sun et al., 1986; Hallet et al., 1993). Carruthers und Melchior (1983) bestimmten experimentell die Volumenänderung verschiedener Vesikelpräparationen von Phosphatidylcholin. In der Gelphase fanden sie eine Volumenveränderung von 6% und in der flüssig-kristallinen Phase lag sie bei 6,8%. Für Phosphatidsäure wurden Werte für ΔV zwischen 5-10% gefunden, je nach permeierenden Molekülen (Hains et al., 1987).

Die Volumenänderung ΔV kann prinzipiell auch berechnet werden, wenn das Kompressibilitätsmodul K der Membran und die Membranspannung T bekannt sind (Needham et al., 1988). Die Membranspannung kann unter Verwendung der Gleichung (7-1) berechnet werden.

$$T = \Pi \cdot r/2 \qquad \text{Gleichung 7-1}$$

mit Π = Osmotischer Druck.

Für einen Konzentrationsgradienten Δc von 50 mM erhält man für die Membranspannung einen Wert von $T = 5 \text{ dyn/cm}$.

Ist das Kompressibilitätsmodul K der Lipidmembran bekannt, so kann mit Gleichung (7-2) die Zunahme der Vesikeloberfläche berechnet werden, da jede Änderung der molekularen Fläche ΔA zu einer tangentialen Spannung in der Ebene der Membran führt.

$$T/K = \Delta A/A$$

Gleichung 7-2

Hieraus kann man unmittelbar die Volumenänderung ΔV der Vesikel bestimmen, unter der Voraussetzung einer Kugelgestalt der Vesikel. Durch mikromechanische Untersuchungsmethoden wurde das Kompressibilitätsmodul für verschiedene Lipide, sowohl in der Gelphase, als auch in der flüssig-kristallinen Phase bestimmt (Needham et al., 1988). Für DMPC in den flüssig-kristallinen Phasen liegen die Werte bei $K = 120-150 \text{ dyn/cm}$. Die hieraus berechnete Volumenänderung beträgt ca. 6%, welche eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Carruthers und Melchior (1983) darstellt.

Mit Hilfe der vorhandenen Literaturdaten ist damit eine Abschätzung über die Volumenänderung möglich. Zur Berechnung der osmotischen Permeabilitätskoeffizienten für alle Lipide und Lipidgemische oberhalb und unterhalb von T_m wurde ΔV mit 5% bei einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ berücksichtigt, was einer Volumenänderung von 10% entspricht. Im Phasenumwandlungsbereich ist wahrscheinlich mit einer Zunahme der Volumenänderung zu rechnen. Um aber die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde auch dort eine 10%ige Volumenänderung berücksichtigt.

Dies führt zu Fehlern, da aus verschiedenen Lipiden/Lipidgemischen hergestellte Membranen unterschiedliche Kompressibilitätsmoduli aufzeigen.

Für die Volumenabnahme wird auch eine Volumenänderung von 10% angenommen, obwohl wahrscheinlich die Volumenabnahme kleiner ist, da sich die Lipidmembran nur schwer komprimieren läßt. Dies ist auch aus den erhöhten Aktivierungsenergien für die Wasserpermeation von schrumpfenden Vesikeln ersichtlich.

Über die Änderung der Form läßt sich nur schwer eine Aussage machen, schwellende Vesikel werden wahrscheinlich ihre sphärische Form behalten, hingegen bilden sich bei kleinen, schrumpfenden Vesikeln ellipsenförmige Vesikel mit definierten Schollen aus (Groll et al., 1995). Bei großen Vesikeln beobachtet man die Ausbildung von Hasenohren.

Für alle osmotischen Permeationsexperimente wurde ein Wert von 5% für ΔV bei einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ eingesetzt, der an der unteren Grenze der Literaturwerte liegt.

Bei den kinetischen Messungen an der Stopped-Flow Apparatur wurden die Geschwindigkeitskonstanten der osmotischen und diffusionskontrollierten Wasserpermeation und die

Permeation von kleinen Molekülen durch die Lipidmembran gemessen. Bei der diffusiven Wasserpermeation wurde das $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschverfahren, welches auf dem geringfügig unterschiedlichen Brechungsindex von H_2O und D_2O beruht, verwendet. Bei dem osmotischen Experiment baut sich in den Vesikeln ein osmotischer Druck auf, der dem Konzentrationsgefälle der D(+)-Glucoselösung zwischen intra- und extravasikulärem Medium proportional ist. Bei hohen osmotischen Drücken besteht die Gefahr, daß die Lipidmembran dem Druck nicht mehr standhält und kurzzeitig aufreißt. Untersuchungen haben gezeigt, daß Lipidmembranen erst ab einem Konzentrationsgradienten oberhalb von 500 mM aufreißen (Hallet et al., 1993; Ertel et al., 1993). Bei dem von uns häufig verwendeten Konzentrationsgefälle von 50 mM besteht daher eine solche Gefahr nicht.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einer systematischen Untersuchung der diffusionskontrollierten und osmotischen Wasserpermeation durch Lipiddoppelschichten. Diese Lipidmembranen wurden aus Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen und verschiedenen Acylkettenlängen hergestellt. Das Permeationsverhalten von Wasser im Phasenumwandlungsbereich der Lipidgemische wurde mit Hilfe des osmotischen Experimentes untersucht. Die untersuchten Lipide ließen eine Beurteilung der Frage zu, inwieweit die Größe der Kopfgruppe bzw. die Länge der Fettsäure einen meßbaren Einfluß auf die Wasserpermeation besitzt. Ob die Permeationsgeschwindigkeit von Wasser und Harnstoff durch die Lipiddoppelschicht konzentrationsabhängig ist, wurde durch eine Erhöhung des Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extravasikulärem Medium untersucht.

Desweiteren wurde die Permeation von kleinen Molekülen durch die Membran gemessen. Dabei interessierte besonders, ob die Verteilungskoeffizienten der Moleküle zwischen Wasser und einem langkettigen Kohlenwasserstoff (n-Hexadecan), mit den berechneten Permeabilitätskoeffizienten übereinstimmen oder ob der Transport von kleinen Molekülen von anderen Faktoren beeinflusst wird.

Durch den Einbau von Detergens in die Lipidmembran wird die Packung der Lipidmoleküle verändert und somit auch das Permeationsverhalten der Lipiddoppelschicht (Ueno et al., 1984). Die Stabilität und Lagerfähigkeit der Lipidvesikel wurde mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) überprüft.

Die Untersuchung der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation durch die Lipide DMPC und DMPA, bzw. ihren Gemischen, bildete die Grundlage für weitere Messungen, da für diese Lipide bereits Literaturdaten bekannt waren. Die Untersuchung der osmotischen Wasserpermeation begann 1957 mit den Arbeiten von Sidel et al. an Erythrocyten-

membranen. Später folgten Arbeiten an Zellmembranen (Finkelstein, 1987) und an synthetisch hergestellten Phosphatidylcholinen mit gesättigten und ungesättigten Fettsäureketten (Carruthers und Melchior, 1983). Die Messungen der diffusiven Wasserpermeabilität gehen auf Finkelstein (1987) zurück, der die Permeation mit Hilfe von radioaktiven Substanzen an planaren Lipidmembranen (BLM) untersucht hat. Engelbert und Lawaczeck (1985) entwickelten eine Methode, die auf dem unterschiedlichen Brechungsindex von H_2O und D_2O beruht, um die diffusive Wasserpermeation bestimmen zu können. Tabelle 7.1 gibt einen Überblick über die bisherigen Literaturdaten und den in dieser Arbeit gemessenen Permeabilitätskoeffizienten von DMPC und DMPA.

Lipid	Phase	Temp. [°C]	P_d [cm/s]	P_f [cm/s]	Literatur
DMPC	Gel-	14	-	$2,0 \cdot 10^{-5}$	Carruthers und Melchior (1983)
	flüssig-k.	34	-	$6,0 \cdot 10^{-4}$	
DMPC	Gel-		$10^{-6} - 10^{-5}$	-	Lawaczeck (1988)
	flüssig-k.		$10^{-4} - 10^{-3}$	-	
DMPC	Gel-	20	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	Jansen und Blume(1995)
	flüssig-k.	70	$5,2 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	
DMPC	flüssig-k.	30	-	$2,4 \cdot 10^{-2}$	Paula et al., (1996)
egg PC decane	flüssig-k.	30	-	$2,4 \cdot 10^{-2}$	Walter (1981)
DMPC	Gel-	20	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	eigene Messung
	flüssig-k.	70	$7,3 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-3}$	
DMPA	Gel-	20	$1,2 \cdot 10^{-6}$	-	Jansen und Blume(1995)
	flüssig-k.	70	$1,3 \cdot 10^{-4}$	-	
DMPA	Gel-	40	$8,9 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	eigene Messung
	flüssig-k.	70	$9,0 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	

Tabelle 7.1: Permeabilitätskoeffizienten von DMPC und DMPA.

Vergleicht man die gemessenen Permeabilitätskoeffizienten der diffusionskontrollierten und osmotischen Wasserpermeation mit den Literaturwerten, so lassen sich einige Übereinstimmungen erkennen. Die von Carruthers und Melchior (1983) berechneten Permeabilitätskoeffizienten der osmotischen Wasserpermeation durch DMPC-Vesikel stimmen oberhalb und unterhalb von T_m mit den eigenen Messungen gut überein. Dies überrascht

nicht, da sie annähernd die gleiche Volumenänderung beim Anschwellen der Vesikel verwendet haben.

Für die diffusionskontrollierte Wasserpermeation von DMPC fand Lawaczeck Werte, die sowohl in der Gelphase, als auch in der flüssig-kristallinen Phase, etwas höher liegen als die hier gemessenen P_d -Werte.

Die osmotischen und diffusiven Permeabilitätskoeffizienten für das Lipid DMPC von Jansen und Blume (1995) zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten in dieser Arbeit. Verglichen mit den Permeabilitätskoeffizienten der osmotischen Wasserpermeation von Paula et al., (1996) und Walter (1981) sind die gemessenen P_f -Werte um einiges niedriger, dies läßt sich aber damit erklären, daß Paula und Walter keine Volumenänderung der Vesikel in ihren Berechnungen berücksichtigt haben. In ihren Auswertungen wird lediglich das Molvolumen von Wasser und der Konzentrationsunterschied der beiden Lösungen beachtet. Man darf die Volumenänderung der Vesikel bei der Wasserpermeation nicht außer acht lassen, da die Vesikel ihr Volumen eindeutig verändern. Werden die Änderungen des Volumens nicht beachtet, so führt dies zu einer falschen Berechnung von P_f , deshalb sind die Permeabilitätskoeffizienten von Paula (1996) und Walter (1981) auch um fast einen Faktor 10 größer als die in dieser Arbeit berechneten P_f -Werte. Die für das Lipid DMPA bestimmten Werte von Jansen und Blume (1995) für die diffusionskontrollierte Wasserpermeation unterhalb und oberhalb von T_m sind leicht zu größeren P_d -Werten verschoben, verglichen mit den eigenen Meßwerten.

Verwendet man biologische Membranen, so verläuft die osmotische und die diffusive Wasserpermeation gegenüber synthetisch hergestellten Lipidmembranen um einiges schneller. Dies läßt sich auf die Struktur der Proteine in biologischen Membranen zurückführen. Sie sind in der Lage Defektstellen zu erzeugen, diese können sich zu Poren zusammenschließen, durch die die Wassermoleküle ungehindert die biologische Membran passieren können (Finkelstein, (1987); Läuger (1985).

Durch die Untersuchung der Phosphatidylcholine und der Phosphatidsäuren wurde der Einfluß der Länge der Fettsäure und die Größe bzw. Ladung der Kopfgruppe auf die osmotische Wasserpermeation überprüft. Man erwartet unabhängig vom Mechanismus, daß die Geschwindigkeitskonstante der Wasserpermeation bei einer Verlängerung der Fettsäureketten um zwei CH_2 -Einheiten, abnimmt. Dies entspricht einer Zunahme der Lipiddoppelschicht um ca. 0,5 nm. Ein Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten der unterschied-

lich langen Phospholipide, ergab keinen Hinweis auf die Gültigkeit der Vermutung. Wahrscheinlich liegt der Effekt im Bereich der Meßgenauigkeit der Stopped-Flow Methode, oder aber die Dicke der hydrophoben Schicht in der Lipidmembran besitzt keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Wasserpermeation durch Lipiddoppelschichten. Paula (1996) zeigte, daß die Permeabilität der Lipidmembran mit zunehmender Dicke der hydrophoben Schicht abnimmt.

Im Gegensatz dazu besitzt die Kopfgruppe der Lipidmoleküle einen großen Einfluß auf die Permeation der Wassermoleküle durch die Membran. Die Kopfgruppenregion der Lipidmoleküle bildet die Grenzfläche zwischen hydrophobem Teil der Lipiddoppelschicht und dem wässrigen Medium. Die Eigenschaften der Kopfgruppe haben einen großen Einfluß auf die thermotropen Eigenschaften von Lipidmembranen. So liegt die Hauptphasenumwandlungstemperatur bei DMPA (pH=7) um 28°C höher als bei DMPC. Dies läßt auf eine dichtere Packung der Lipidmoleküle in der Gelphase schließen. Permeabilitätsuntersuchungen an Phosphatidsäuren und Phosphatidylcholinen ergaben unterschiedliche Permeabilitätskoeffizienten sowohl in der Gelphase, als auch in der flüssig-kristallinen Phase. Die osmotische Wasserpermeabilität in die Vesikel lief durch Phosphatidsäuremembranen ca. um den Faktor 2 schneller als durch Lipidmembranen aus Phosphatidylcholinen.

Eine wichtige Hilfe zur Bestimmung des Permeationsmechanismus ist die Aktivierungsenergie, welche für den Wassertransport benötigt wird. Die reinen Lipide und die Lipidgemische zeigten identische E_A -Werte. Die Aktivierungsenergien E_A für die osmotische und diffusive Wasserpermeation in der flüssig-kristallinen Phase, liegen in einem Bereich von 35-60 kJ/mol. Die E_A -Werte liegen damit zwischen denen von Carruthers und Melchior (1983) ($E_A = 10-27$ kJ/mol) und von Lawaczeck (1988) ($E_A = 167-184$ kJ/mol). Mit den Werten von Jansen und Blume (1995) stimmen die aus den Arrheniusdarstellungen berechneten Werte von E_A gut überein. Für die Selbstdiffusion von Wasser wurde eine Aktivierungsenergie von 20 kJ/mol gefunden (Landolt-Börnstein, 1961; Sháafi, 1981). Verglichen mit den von uns berechneten Aktivierungsenergien für die Wasserpermeation liegen sie an der untersten Grenze. Die Differenz zwischen den berechneten Aktivierungsenergien der Wasserpermeation und der Aktivierungsenergie für die Selbstdiffusion von Wasser, könnte die Energie sein, welche aufgebracht werden muß, um Poren in der Lipidmembran zu bilden. Die relativ geringen Aktivierungsenergien der Wasserpermeation lassen darauf schließen, daß die Wassermoleküle nahezu ungehindert durch die Lipiddoppelschicht permeieren können.

Um den Phasenumwandlungsbereich zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase der Phospholipide auf seine Permeationseigenschaften zu untersuchen, wurden Lipidgemische von Phosphatidylcholinen und Phosphatidsäuren hergestellt. Dabei sollte besonders der Einfluß der Kopfgruppe und die Länge der Acylketten auf die Geschwindigkeitskonstante der Wasserpermeation beobachtet werden. Bei den Lipidgemischen der Phosphatidylcholinen und den Gemischen der Phosphatidsäuren konnte man den Einfluß der Kopfgruppe außer acht lassen. Die mit Hilfe der DSC-Apparatur gemessenen Wärmekapazitätskurven weisen keine großen Halbwertsbreiten auf, was auf eine hohe Kooperativität der Lipidmoleküle schließen läßt. Man beobachtet bei den Permeabilitätskoeffizienten der osmotischen Wasserpermeation am Anfang der Hauptphasenumwandlung eine starke Zunahme der Wasserpermeabilität. Dies läßt darauf schließen, sobald sich Domängrenzen zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase ausbilden, steigt die Wasserpermeabilität sprunghaft an.

Es ist bekannt, daß es durch Translationsbewegung zu einer lateralen Phasentrennung von gemischten Lipiden innerhalb einer Doppelschicht kommt. Doppelschichten die aus Phospholipiden mit verschiedenen langen Fettsäureketten bestehen, wie z.B. Mischungen aus Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC), zeigen in der Nähe der Phasenübergangstemperatur innerhalb der Doppelschicht eine Auftrennung in diskrete Bereiche. Diese enthalten vorwiegend das höher schmelzende Lipid in der Gelphase oder das niedriger schmelzende Lipid in der flüssig-kristallinen Phase. Durch diese laterale Phasentrennung entstehen Domängrenzen, welche sich zu Poren zusammenschließen können (Glaser et al., 1987). Durch die die Wassermoleküle ungehindert die Lipiddoppelschicht passieren können und somit ein Maximum der osmotischen Wasserpermeation aufweisen.

Durch unterschiedliche Präparationsbedingungen sind die Vesikelgrößen in den Abbildungen 5.1.2 bzw. 5.3.5 verschieden, was dazu führt, daß die Maxima der osmotisch getriebenen Wasserpermeation in Abbildung 5.3.5 nicht deutlich erreicht werden.

Eine Abnahme der Wasserpermeabilität mit steigendem Gehalt der längeren Acylketten in der Lipiddoppelschicht, konnte nicht festgestellt werden.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der osmotischen Wasserpermeation und der Harnstoffpermeation von der Harnstoffkonzentration, wurden aus DMPC hergestellte Lipiddispersionen mit unterschiedlich starken Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extravasikulärem Medium untersucht. Die Permeabilitätskoeffizienten der diffusiven Wasser-

permeation sind ca. um den Faktor 10-20 größer als die Permeabilitätskoeffizienten der Harnstoffpermeation. Diese stark unterschiedlichen Permeabilitätskoeffizienten legen den Verdacht nahe, daß die beiden Moleküle auf unterschiedlichen Wegen die Lipiddoppelschicht durchdringen.

In der Literatur werden häufig zwei Permeationsmodelle, das Löslichkeitsdiffusionsmodell (Finkelstein und Cass, 1968; Lieb und Stein, 1969; Träuble, 1971 und Stein, 1990) und die Permeation durch Poren und fluktuierende Defekte der Lipiddoppelschicht (Carruthers und Melchior, 1983; Lawaczeck, 1988; Jansen und Blume, 1995), beschrieben.

Vergleicht man die nach Gleichung (3-9 bzw. 3-15) berechneten Permeabilitätskoeffizienten mit den Verteilungskoeffizienten K_p zwischen Wasser und Hexadecan, so stellt man fest, daß die osmotische Wasserpermeation bei $T=30^\circ\text{C}$ um eine Zehnerpotenz größer ist, als der vergleichbare Verteilungskoeffizient ($K_p = 4,2 \cdot 10^{-5}$, Finkelstein 1976). Der Permeabilitätskoeffizient von Harnstoff ist im Bereich der Meßgenauigkeit identisch mit seinem Verteilungskoeffizient ($K_p = 2,8 \cdot 10^{-7}$, Walter und Gutknecht, 1986).

Einen weiteren Hinweis für den Permeationsmechanismus der beiden Moleküle durch die Lipiddoppelschicht liefert die Aktivierungsenergie, die für den Transport benötigt wird. Die E_A -Werte der Harnstoffpermeation sind fast doppelt so groß wie die von Wasser und liegen bei 80 kJ/mol.

Die relativ geringen Aktivierungsenergien der Wasserpermeation sind ein Beweis dafür, daß die Wassermoleküle die Lipiddoppelschicht nahezu ungehindert passieren können. Ein solches Verhalten läßt sich nur mit einem Wassertransport durch Poren oder fluktuierende Defektstellen, die den hydrophoben Bereich der Lipidschicht durchspannen, erklären. Die hohe Aktivierungsenergie der Harnstoffpermeation spricht für einen Löslichkeitsdiffusionsmechanismus, da hier eine größere Aktivierungsbarriere überwunden werden muß.

Im Phasenumwandlungsbereich zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase konnte ein Permeabilitätsmaximum der osmotischen Wasserpermeation gemessen werden. Wie bei fast allen Lipidgemischen durchläuft die Wasserpermeation ein Maximum im Phasenumwandlungsbereich. Auch hier erfolgt die Permeation wahrscheinlich durch Defektstellen an den Domängrenzen zwischen den Lipidmolekülen in der Gelphase und denen, die bereits in der flüssig-kristallinen Phase vorliegen.

Charakteristisch für beide Moleküle ist die sprunghafte Zunahme der Permeabilität an der Hauptphasenumwandlung gel → flüssig-kristallin.

Die Geschwindigkeitskonstante der osmotischen Wasserpermeation zeigt eine Abhängigkeit vom angelegten Konzentrationsgradienten. Je größer die Differenz der Harnstoffkonzentration zwischen intra- und extravasikulärem Medium ist, desto schneller verläuft die Wasserpermeation durch die Lipiddoppelschicht. Außerdem kann man eine leichte Differenz der Permeabilitätskoeffizienten der Wasserpermeation durch gedehnte bzw. geschrumpfte Vesikel messen. Die Bildung von Poren oder transiente Defekte in gedehnten Lipiddoppelschichten verläuft wahrscheinlich leichter als in zusammengepreßten.

Unabhängig vom Konzentrationsgradienten und der Permeationsrichtung ist die Harnstoffpermeation.

Die große Differenz der beiden Moleküle in den Permeabilitätskoeffizienten und die doppelt so hohe Aktivierungsenergie der Harnstoffpermeation führen zu der Annahme, daß die Wassermoleküle und die Harnstoffmoleküle auf unterschiedlichen Wegen und mit unterschiedlichen Mechanismen durch die Lipiddoppelschicht permeieren.

Die Wasserpermeation verläuft wahrscheinlich durch Poren oder transiente Defekte, die den hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht durchspannen.

Die Harnstoffpermeation durch die Lipidmembran folgt wahrscheinlich dem Löslichkeitsdiffusionsmodell, da Verteilungskoeffizient und Permeabilitätskoeffizient fast übereinstimmen und eine hohe Aktivierungsenergie für den Transport der Harnstoffmoleküle durch die Lipiddoppelschicht benötigt wird.

In den letzten Jahren wurde die Permeation von ionischen und nichtionischen Stoffen durch biologische Membranen und durch reine Lipiddoppelschichten untersucht. Dabei fand man heraus, daß der Transport von geladenen und ungeladenen Molekülen durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Häufig wird in der Literatur der Permeabilitätskoeffizient und der Verteilungskoeffizient der Moleküle miteinander verglichen (Walter und Gutknecht, 1986; Finkelstein, 1976a).

Durch den Einbau von Proteinen oder Carriermolekülen in die Lipiddoppelschicht läßt sich der Transport von Molekülen gezielt beschleunigen (Läuger, 1985).

Tabelle 7.2 gibt einen Überblick über die Permeabilität einiger Moleküle durch die Membran.

Molekül	Temp. [°C]	Lipid	P_d [cm/s]	Literatur
Harnstoff	30	DMPC	$3,6 \cdot 10^{-6}$	Paula et al., 1996
	30	egg PC	$4,0 \cdot 10^{-6}$	Finkelstein, 1976a
	37	BBMV*	$2,4 \cdot 10^{-6}$	Verkman et al., 1985
	30	DMPC	$4,4 \cdot 10^{-7}$	eigene Messung
Ethylenglykol	30	egg PC	$8,8 \cdot 10^{-5}$	Finkelstein, 1976a
	30	DMPC	$2,1 \cdot 10^{-5}$	eigene Messung
Glycerin	30	DMPC	$6,2 \cdot 10^{-6}$	Paula et al., 1996
	30	egg PC	$5,4 \cdot 10^{-6}$	Orbach und Finkelstein, 1980
	30	DMPC	$1,1 \cdot 10^{-6}$	eigene Messung

*BBMV= Brush border membrane vesicles.

Tabelle 7.2: Permeabilitätskoeffizienten von Molekülen durch Lipidmembranen.

Vergleicht man die gemessenen Permeabilitätskoeffizienten mit den Literaturwerten, so kann man keine wesentlichen Differenzen feststellen.

Bei allen Permeabilitätsmessungen der Moleküle durch DMPC-Vesikel, ist eine sprunghafte Zunahme der Permeabilität der Moleküle beim Übergang von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase zu beobachten. Bei dem Transport der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht konnte bei allen Messungen (Permeation in oder aus den Vesikel) ein mehr oder weniger starkes Maximum der Permeabilität im Phasenumwandlungsbereich beobachtet werden.

Durch den Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten der Moleküle bei $T = 30^\circ\text{C}$ mit ihren Verteilungskoeffizienten, läßt sich erkennen, nach welchem Permeationsmodell der Transport der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht abläuft (Finkelstein, 1987; Walter und Gutknecht, 1986). Für Ethylenglykol, Glycerin und Harnstoff zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Permeabilitätskoeffizienten mit den Verteilungskoeffizienten. Der berechnete Permeabilitätskoeffizient von Wasser liegt um eine Zehnerpotenz höher als sein Verteilungskoeffizient. Die mit Hilfe der IR-Spektroskopie bestimmten Verteilungskoeffi-

zienten für tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol sind um ein vielfaches größer als die gemessenen Permeabilitätskoeffizienten.

Man hätte bei diesen Verteilungskoeffizienten erwartet, daß die Permeation der beiden Moleküle durch die Lipidmembran so schnell verläuft, daß sie innerhalb der Totzeit der Stopped-Flow Apparatur liegt. Aber anscheinend ist die Querschnittsfläche der Moleküle größer als die mittlere freie Oberfläche der Lipidmembran, was dazu führt, daß die Permeation durch die Lipiddoppelschicht gehemmt wird.

Xiang und Anderson (1998) führten einen Korrekturfaktor f ein, der sich aus dem Quotienten der Abweichung des gemessenen Permeabilitätskoeffizienten und dem mit Hilfe des Löslichkeitsdiffusionsmodells vorhergesagten Permeabilitätskoeffizienten berechnen läßt. Mit diesem konnten sie die Abnahme der Permeationsgeschwindigkeit erklären. Sie schlugen vor, daß die Permeation der Moleküle mit ihrer langen Hauptachse entlang der Membrannormalen verläuft. Es kommt dabei besonders auf das Verhältnis von Querschnittsfläche des penetrierenden Moleküls zur mittleren freien Oberfläche der Membran an. Damit könnte man die Differenz zwischen Verteilungskoeffizient und Permeabilitätskoeffizient von tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol erklären.

Bei dem Transport von Molekülen durch die Lipiddoppelschicht spielen nicht nur der Verteilungskoeffizient im hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht und die Molekülgröße eine Rolle, sondern auch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den polaren Molekülen und der Kopfgruppe der Lipidmoleküle. Desweiteren nimmt die Permeabilität von einwertigen Alkoholen mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome zu (Brahm, 1983). Erhöht man die Anzahl der Hydroxylgruppen bei konstanter Kohlenstoffatomanzahl, so nimmt die Permeabilität ab (Cohen and Bangham, 1972). Dies läßt sich damit erklären, daß eine Erhöhung der Kohlenstoffatome pro Molekül zu einer besseren und die Vergrößerung von polaren Gruppen in einem Molekül zu einer schlechteren Löslichkeit in dem hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht führt, so daß die Permeabilität der entsprechenden Moleküle gegenüber der Lipidmembran zu oder abnimmt.

Neben der Größe der Ionen wird die Permeabilität, besonders bei Anionen und Kationen, durch das Abstreifen der Solvathülle beim Übergang in den hydrophoben Bereich der Lipidmembran erschwert (Paula et al., 1996; Volkov et al., 1997).

Einen weiteren Hinweis auf den Permeationsmechanismus der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht liefert die Aktivierungsenergie, die für den Transport der Moleküle durch die Membran überwunden werden muß. Läßt man die Aktivierungsenergie für Glucose außer acht, so ist sie für Wasser am kleinsten und für die Moleküle Harnstoff und Glycerin

mit ca. 80 kJ/mol am größten. Ethylenglykol, tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol besitzen eine E_A -Wert von 45-65 kJ/mol.

Wenn man die Ergebnisse der Permeabilitätsmessungen und die berechneten Aktivierungsenergien mit den Verteilungskoeffizienten vergleicht, so lassen sich Rückschlüsse auf die Permeationsmechanismen der einzelnen Moleküle ziehen.

Die Differenz der Permeabilitätskoeffizienten der Wasserpermeation zu dem Verteilungskoeffizient, sowie die geringe Aktivierungsenergie für den Wassertransport durch die Lipiddoppelschicht, sind nicht mit einem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus vereinbar. Vielmehr muß eine Permeation von Wassermolekülen durch Poren oder transiente Defektstellen, die den hydrophoben Bereich der Membran durchspannen, erfolgen.

Dadurch, daß die Moleküle von Ethylenglykol, tert. Butylalkohol und Perfluor-tert. Butylalkohol fast identische Permeabilitätskoeffizienten und Aktivierungsenergien aufweisen, kann der Permeationsmechanismus bei allen drei Molekülen gleich sein. Durch ihre polaren Gruppen im Molekül sind sie wahrscheinlich in der Lage, sich an der Grenzfläche Lipid/Wasser anzulagern und dabei Wassermoleküle zu substituieren. Dadurch ist der Schritt durch die Grenzfläche nicht mehr so groß. Die Permeation der drei Moleküle durch die Lipiddoppelschicht erfolgt nach dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus, aber ein Transport durch Poren oder durch transiente Defektstellen kann nicht ausgeschlossen werden.

Glycerin und Harnstoff zeigen beide eine gute Übereinstimmung der nach Gleichung (3-9) berechneten Permeabilitätskoeffizienten mit ihren Verteilungskoeffizienten. Ihre Aktivierungsenergien für den Transport durch die Lipidmembran sind relativ hoch. Dies läßt vermuten, daß die Permeation der beiden Moleküle durch die Lipiddoppelschicht nach dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus erfolgt.

Die mit Abstand langsamste Permeation zeigen die Glucosemoleküle auf, ein solches Permeationsverhalten durch die Lipidmembran ist nur mit dem Löslichkeitsdiffusionsmodell zu erklären.

Durch die Anlagerung von Octylglucosid in die Lipiddoppelschicht erhöht sich die Permeabilität der Lipidmembran. Je höher die Konzentration von Octylglucosid in der Lipiddoppelschicht ist, desto schneller können die Moleküle die Membran durchdringen. Jedoch zeigten die Moleküle unterschiedliche Zunahmen in ihrer Permeabilitätsgeschwindigkeit. Eine allgemeine Systematik auf das Permeationsverhalten der einzelnen Moleküle mit steigendem Gehalt an Octylglucosid in der Lipiddoppelschicht konnte nicht festgestellt werden.

Durch den Einbau von Detergens in die Lipidmembran verändert sich die Packung der Moleküle innerhalb der Lipiddoppelschicht und damit die Permeationseigenschaften (Ueno et al., 1984). Wird die Konzentration an Detergens in der Lipidmembran erhöht, so können sich kurzlebige hydrophile Poren bilden, die die Membran durchspannen (Schubert et al., 1985; Vinson et al., 1989 und Walter et al., 1991).

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Erhöhung des Detergensgehaltes auf die Permeationsgeschwindigkeit in der Lipiddoppelschicht, läßt vermuten, daß die Moleküle auf unterschiedlichen Wegen die Membran durchdringen.

Die relative Zunahme um 25% bei der Wasserpermeation, kann durch eine Erhöhung der Anzahl von Poren und transienten Defekte erklärt werden. Die erhöhten Werte für Ethylenglykol und tert. Butylalkohol um den Faktor 12-13 lassen vermuten, daß die Permeation durch die Lipidmembran bei hohem Detergensgehalt in der Lipidschicht mit Hilfe von Poren oder transienten Defekten erfolgt. Anscheinend spielt jetzt die relativ große Molekülform und die geringe Polarität von tert. Butylalkohol keine entscheidende Rolle bei der Permeation mehr.

Glycerin, Harnstoff und Glucose haben unterschiedliche Molekülgrößen, zeigen aber kaum eine Zunahme der Permeabilität mit steigendem OG-Gehalt in der Membran. Dies läßt darauf schließen, daß sie die Lipiddoppelschicht nach dem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus passieren.

Nicht nur die Anzahl der Poren spielen eine entscheidende Rolle bei der Permeation durch die Lipidmembran, sondern wichtig ist auch die Fähigkeit der Moleküle sich an der Lipiddoppelschicht anzulagern. Besonders kleine und polare Moleküle können sich gut an den Kopfgruppen der Lipidmoleküle anlagern oder in Wechselwirkung mit ihnen treten. Bei der Permeation von kleinen Molekülen durch die Lipiddoppelschicht spielen Molekülform und Polarität der penetrierenden Teilchen eine große Rolle (Xiang und Anderson, 1998).

Fast man alle Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, so ist eine qualitative Aussage über die wahrscheinlichsten Permeationsmechanismen der kleinen Moleküle durch Phospholipidmembranen möglich.

8. Materialien und Geräte

8.1 Materialien

Die für die Untersuchungen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren alle, sofern nicht anders vermerkt, vom Reinheitsgrad pro analysi und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Entionisiertes Wasser wurde ausschließlich mit einer Wasseraufbereitungsanlage (SG-Reinstwassersystem RS-90-4MF) hergestellt.

8.1.1 Chemikalien

Lösungsmittel, anorganische Salze; E. Merck, Darmstadt bzw. Riedel de Haen, Seelze

Deuteriumoxid 99,9%; Campro Scientific, Niederlande

D(+)-Glucose; Jansen Chimica, Beerse, Niederlande

n-Octyl- β -D-glucopyranosid; Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg

Ascorbinsäure; Riedel de Haen, Seelze

1,6-Dichlorophenolindophenol; Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

Harnstoff; E. Merck, Darmstadt

1,2 Ethandiol (Ethylenglykol); Riedel de Haen, Seelze

Glycerin; Riedel de Haen, Seelze

2-Methyl-2-propanol (tert. Butylalkohol); Riedel de Haen, Seelze

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2- (Trifluormethyl)-2-propanol (Perfluoro-tert. butylalkohol); Riedel de Haen, Seelze

Als Phosphatpuffer diente eine auf pH=7 eingestellte 1/15 molare Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat.

8.1.2 Lipide

DMPC; Lipoid KG, Ludwigshafen; Nattermann GmbH, Köln

DPPC; Nattermann GmbH, Köln

DMPA; Sygena, Schweiz

DPPA; Sigma AG, Deisenhofen

8.2 Geräte

Zur Temperierung wurden extern ansteuerbare Thermostate der Firma Haake, Karlsruhe verwendet.

Dynamische Lichtstreuungsapparatur (Photonen-Korrelationsspektrometer):

Zetasizer 3 mit Multi-8-Correlator (Series 7032), Malvern Instruments, Herrenberg

Extrusionsapparatur:

Liposofast Extruder; Fa. MM Development, Inc., Ottawa, Kanada

Temperierbad für Liposofast Extruder nach Konstruktionszeichnungen

von der Metallwerkstatt der Universität Kaiserslautern angefertigt

Polycarbonatfilter, Durchmesser 19 mm, Porendurchmesser 200 nm

Differential Titration Calorimeter:

OMEGA-ITC, Microcal Inc., Northampton, Ma, USA

Differential Scanning Calorimeter:

MC-2 Kalorimeter; Microcal Inc., Northampton, Ma, USA

Stopped-Flow Meßapparatur:

Stopped Flow Apparatur; Fa. HighTech Scientific SF 51 mit Spektrophotometer
(Hi-Tech Scientific SU-40)

Datenerfassung: 486-DX50 mit Wasco ADIODA 12 (low cost)-A/D-Wandlertarte

Wasseraufbereitungsanlage:

RS 90-4 MF; Wasseraufbereitung- und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel

Ultraschallbad:

Transsonic 310/H; Fa. Elma, Singen

Mechanischer Rüttler:

VF2; Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.

9. Literatur

- Abuin, E.B., Campos, A.M., Lissi, E.A. und Disalvo, E.A., (1994), *Osmotic response of large unilamellar vesicles of phosphatidylcholine: Factors determining the rate of the process and the properties of the shrunken vesicles*. J. Colloid Interface Sci., 171, 406-412.
- Almog, S., Kushnir, T., Nir, S. und Lichtenberg, D., (1986), *Kinetic and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles*. Biochemistry, 25 (9), 2597-2604.
- Almog, S., Litman, B.J., Wimley, W., Cohen, J., Wachtel, E.J., Barenholz, Y., Ben-Shaul, A. und Lichtenberg, D., (1990), *States of aggregation and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and octyl glucoside*. Biochemistry, 29 (19), 4582-4592.
- Antonov, V.F., Petrov, V.V., Molnar, A.A., Predvoditelev, D.A. und Ivanov, A.S., (1980), *The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature*. Nature, 283, 585-586.
- Bangham, A.D., De Gier, J. und Greville, G.D., (1967), *Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals*. Chem. Phys. Lipids, 1, 225-246.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. und Watkins, J.C., (1965), *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. J. Mol. Biol., 13, 238-252.
- Benz, R. und Zimmermann, U., (1981), *The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown*. Biochim. Biophys. Acta, 640, 169-178.
- Betriebshandbuch Zetasizer 3, Müttek-Laser und optische Geräte GmbH, Hersching, 194-209.
- Bittmann, R. und Blau, L., (1972), *The phospholipid-cholesterol interaction. Kinetics of water permeability in liposomes*. Biochemistry, 11, 4831-4839.
- Blokzijl, W. und Engberts, J.B.F.N., (1993), *Hydrophobe Effekte-Ansichten und Tatsachen*. Angew. Chem., 105, 1610-1648.
- Bloom, M., (1992), *The physics of soft, natural materials*. Phys. Can., 48, 7-16.
- Blume, A., (1979), *A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers*. Biochim. Biophys. Acta, 557, 32-44.
- Blume, A., (1988), *Applications of calorimetry to lipid model membranes*. in Physical properties of biological membranes and their functional implications, ed. C. Hidalgo, pp. 71-121.

- Blume, A., (1991), *Biological calorimetry: membranes*. Thermochem. Acta, 193, 299-347.
- Blume, A., (1993), *Dynamic Properties*. in Phospholipids Handbook, ed. g. Cevc, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 455-509.
- Brahm, J., (1983), *Permeability of human red cells to a homologous series of aliphatic alcohols*. J. Gen. Physiol., 81, 283-304.
- Caffrey, M. und Cheng, A., (1995), *Kinetic of lipid phase changes*. Current opinion in structural biology, 5, 548-555.
- Carruthers, A. und Melchior, D.L., (1983), *Studies of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state*. Biochemistry, 22, 5797-5807.
- Cevc, G. und Marsh, D., (1987), *Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models*. John Wiley & Sons, New York.
- Chakrabarti, A.C. und Deamer, D.W., (1992), *Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate*. Biochim. Biophys. Acta, 1111, 171-177.
- Chapman, D., Williams, R.M. und Ladbroke, B.D., (1967), *Physical studies of Phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2 Diacyl-Phosphatidylcholines (Lecithins)*. Chem. Phys. Lipids, 1, 445-475.
- Chia, N.-C. und Mendelsohn, R., (1996), *Conformational disorder in unsaturated phospholipids by FTIR spectroscopy*. Biochim. Biophys. Acta, 1283, 141-150.
- Cohen, B.E. und Bangham, A.D., (1972), *Diffusion of small non-electrolytes across liposome membranes*. Nature, 236, 173-174.
- Deamer, D.W. und Bramhall, J., (1986), *Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes*. Chem. Phys. Lipids, 40, 167-188.
- de Gier, J., (1993), *Osmotic behaviour and permeability properties of liposomes*. Chem. Phys. Lipids, 64, 187-196.
- Denisov, G., Wanaski, S., Luan, P., Glaser, M. und McLaughlin, S., (1998), *Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: An electrostatic model and experimental results*. Biophys. J., 74, 731-744.
- Edwards, K. und Almgren, M., (1991), *Solubilization of lecithin vesicles by C₁₂E₈*. J. Colloid Interface Sci., 147-153.
- Eibl, H., (1984), *Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen*. Angew. Chem., 96, 247-262.

- Elbert, A., (1995), *Systematische Untersuchung der diffusionskontrollierten und osmotischen Wasserpermeation durch Phospholipidmembranen*. Diplomarbeit, Kaiserslautern.
- Engelbert, H.P. und Lawaczeck, R., (1985), *The H₂O/D₂O exchange across vesicular lipid bilayers. Lecithins and binary mixtures of lecithins*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 89, 754-759.
- Ertel, A., Marangoni, A.G., Marsh, J., Hallet, F.R. und Wood, J.M., (1993), *Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analyses of osmotic swelling and lyses*. Biophys. J., 64, 426-434.
- Fettiplace, R. und Haydon, D.A., (1980), *Water permeability of lipid membranes*. Physiol.Rev., 60, 510-550.
- Finkelstein, A., (1976a), *Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes*. J. Gen. Physiol., 68, 127-135.
- Finkelstein, A., (1976b), *Nature of water permeability increase induced by antidiuretic hormone (ADH) in toad urinary bladder*. J. Gen. Physiol., 68, 137-143.
- Finkelstein, A., (1987), *Water movement through lipid Bilayers, pores and plasma membranes*. Wiley-Interscience.
- Finkelstein, A. und Cass, P., (1968), *Permeability and electrical properties of thin lipid membranes*. J. Gen. Physiol., 52, 145-172.
- Fischer, H., Gottschlich, R., Seelig, A., (1998), *Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion*. J. Membrane Biol., 165, 201-211.
- Galla, H.J., (1988), *Spektroskopische Methoden in der Biophysik*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Garidel, P., Johann, C. und Blume, A., (1997), *Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a funktion of acyl chain length and pH*. Biophys. J., 72, 2196-2210.
- Glaser, R.W., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F. und Sokirko, A.I., (1988), *Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores*. Biochim. Biophys. Acta, 940, 275-287.
- Groll, R., Böttcher, A., Jäger, J., Hozwarth, J. F., (1995), *Temperatur dependent intermediate structures during the main phase transition of dimyristoyl phosphatidylcholine vesicles a combined iodine laser-temperatur jump and time resolved cryo-electron microscopy study*. Biophys. Chem., 58, 53-65.

- Gruenewald, B., Stankowski, S., Blume, A., (1979), *Curvature Influence on the Cooperativity and the Phase Transition Enthalpy of Lecithin Vesicles*. FEBS-Letters, 102, 227-229.
- Habel, K., (1989), *Untersuchung zur Struktur, Thermodynamik und Protonenpermeabilität von Modellmembranen aus ω -cyclohexyl-Phospholipiden*. Dissertation, Universität Freiburg.
- Haines, T.H., Li, W., Green, M. und Cummins, H.Z., (1987), *The elasticity of uniform, unilamellar vesicles of acidic phospholipids during osmotic swelling is dominated by the ionic strength of the media*. Biochemistry, 26, 5439-5447.
- Hallet, F.R., Watton, J. und Krygsmann, P., (1991), *Vesicle sizing; number distributions by dynamic light scattering*. Biophys. J., 59, 357-363.
- Hallet, F.R., Marsh, J. und Nickel, B.G., (1993), *Mechanical properties of vesicles. II. A model for osmotic swelling and lysis*. Biophys. J., 64, 435-442.
- Hanai, T. und Haydon, D.A., (1966), *The permeability to water of biomolecular lipid membranes*. J. Theor. Biol., 11, 370-382.
- Handbook of Chemistry and Physics. (1981), 61ST Edition 1980-1981, Chemical Rubber Company, Cleveland, USA
- Hauser, H., (1993), *Phospholipid Vesicles in Phospholipids Handbook* (Cevc, G., Hrsg.), Marcel Dekker, New York.
- Herbert, S.C. und Andreoli, T.E., (1982), *Water permeability of biological membranes*. Biochim. Biophys. Acta, 650, 267-280.
- Hill, A.E., (1994), *Osmotic Flow in Membrane Pores of Molecular Size*. J. Membrane Biol., 137, 197-203.
- Holz, R. und Finkelstein, A., (1970), *The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B*. J. Gen. Physiol., 56, 125-145.
- Huang, C. und Thompson T.E., (1966), *Properties of Lipid Bilayer Membranes Separating Two Aqueous Phases: Water Permeability*. J. Mol. Biol., 15, 539-554.
- Israelachvili, J.N., Marceelja, S., Horn, R.G., (1980), *Physical principles of membrane organization*. Q. Rev. Biophys., 13, 121-200.
- Jackson, M.L., Schmidt, C.F., Lichtenberg, D., Litman, B.J. und Albert, A.D., (1982), *Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside*. Biochemistry 21 (19), 4576-4582.

- Janiak, M.J., Small, D.M. und Shipley, G.G., (1976), *Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: Dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin*. *Biochemistry*, 15, 4575-4580.
- Jansen, M. und Blume, A., (1995), *A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains*. *Biophys. J.*, 68, 997-1008.
- Jansen, M., (1994), *Untersuchung der Wasserpermeation durch Lipidmembranen*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Kanehisa, M.I. und Tsong, T.Y., (1978), *Cluster model of lipid phase transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers*. *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 424-432.
- Käs, J. und Sackmann, E., (1991), *Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes*. *Biophys. J.*, 60, 825-844.
- Ketterer, B., Neumcke, B. und Läuger, P., (1971), *Transport mechanism of hydrophobic ions through lipid bilayer membranes*. *J. Membrane Biol.* 5, 225-245.
- Keller, M., Kerth, A. und Blume, A., (1997), *Thermodynamics of interaction of octyl glucoside with phosphatidylcholine vesicles: partitioning and solubilization as studied by high sensitivity titration calorimetry*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1326, 178-192.
- Kodama, M., Miyata, T. und Takaichi, Y., (1993), *Calorimetric investigations of phase transitions of sonicated vesicles of dimyristoylphosphatidylcholine*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1169, 90-97.
- Landolt-Börstein, (1961), *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik*. 6th ed., Vol. II, Band 5a, Springer Verlag.
- Läuger, P., (1985), *Mechanismen des biologischen Ionentransports- Carrier, Kanäle und Pumpen in künstlichen Membranen*. *Angew. Chem*, 97, 939-959.
- Lasch, J., Hoffmann, J., Omelyanenko, W.G., Klibanov, A.A., Torchilin, V.P., Binder, H. und Gawrisch, K., (1990), *Interaction of triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1022, 171-180.
- Lasch, J., (1995), *Interaction of detergents with lipid vesicles*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241, 269-292.

- Lawaczeck, R., (1979), *On the permeability of water molecules across vesicular lipid bilayers*. J. Membrane Biol., 51, 1-33
- Lawaczeck, R., (1984), *Water permeability through biological membranes by isotopic effects of fluorescence and light scattering*. Biophys. J., 45, 491-194.
- Lawaczeck, R., (1988), *Defect Structures in Membranes: Routes for the Permeation of small molecules*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 92, 961-963
- Levitt, D.G., (1974a), *A new theory of transport for red cell membrane pores. 1. General theory and application to red cell*. Biochim. Biophys. Acta, 373, 115-131.
- Levitt, D.G., (1974b), *A new theory of transport for red cell membrane pores. 2. exact results and computer simulation (Molecular dynamics)*. Biochim. Biophys. Acta, 373, 132-140.
- Levitt, D.G. und Mlekoday, H.J., (1983), *Reflection coefficient and permeability of urea and ethylene glycol (sic) in the human red cell membrane*. J. Gen. Physiol., 81, 239-253.
- Lewis, R.N.A.H. und McElhaney, R.N., (1993), *Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase behavior of a homologous series of n-saturated 1,2-diacylphosphatidylethanolamines*. Biophys. J., 64, 1081-1096.
- Lichtenberg, D., Robson, R.J. und Dennis, E.A., (1983), *Solubilization of phospholipids by detergents*. Biochim. Biophys. Acta, 737, 285-304.
- Lichtenberg, D., (1985), *Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants*. Biochim. Biophys. Acta, 821, 470-478.
- Lichtenberg, D. und Barenholz, Y., (1987), *Liposomes: Preparation, characterization and preservation*. Meth. Biochem. Anal., 33, 337-513.
- Lichtenberg, D., (1993), *Micelles and Liposomes in Biomembranes*. (Shinitzky, M., Hrsg.), 1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Lieb, W.R. und Stein, W.D., (1969), *Biological membranes behave as nonporous polymeric sheets with respect to the diffusion of non-electrolytes*. Nature, 224, 240-243.
- Longuet-Higgins, H.C. und Austin, G., (1966), *The kinetics of osmotic transport through pores of molecular dimensions*. Biophys. J., 6, 217-224.
- Luzzati, V., (1968), *X-ray diffraction studies of lipid-water systems*. Biological Membranes, Vol 1, Academic Press, London, 71-123.

- MacDonald, R.C., MacDonald, R.I. und Meaco, R.I., (1991), *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*. Biochim. Biophys. Acta, 1061, 297-303.
- Markin, V.S. und Kozlov, M.M., (1985), *Pore statistics in bilayer lipid membranes*. Biol. Mem. Volume, 2, pp. 404-442.
- Marrink, S.J. und Berendsen, H.J.C., (1994), *Simulation of water transport through a lipid membran*. J. Phys. Chem., 98, 4155-4168.
- Marrink, S.J. und Berendsen, H.J.C., (1996), *Permeation process of small molecules across lipid membranes studied by molekular dynamics simulations*. J. Phys. Chem., 100, 16729-16738.
- McIntosh, T.J. und Simon, S.A., (1986), *Area per molecule and distribution of water in fully hydrated dilauroylphosphalidylethanolamine bilayers*. Biochemistry, 25, 4948-4955.
- Mc Neil-Watson, F., (1988), *Particle Size Analysis 1998*. Edited by 1988 P. J. Lloyd.
- Moroi, Y., (1992), *Micelles: Theoretical and Applied Aspects*. 1. Edition, Plenum Press, New York.
- Nagle, J.F. und Scott, H.L., (1978), *Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers, Theory of membrane permeability*. Biochim. Biophys. Acta, 513, 236-243.
- Nebel, S. Ganz, P. und Seelig, J., (1997), *Heat changes in lipid membranes under sudden osmotic stress*. Biochemistry, 36, 2853-2859.
- Needham, D. und Evans, E., (1988), *Structure and mechanical properties of gigant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20°C below to 10°C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24°C*. Biochemistry, 27, 8261-8269.
- Nozaki, Y. und Tanford, C., (1981), *Proton and hydroxide ion permeability of phospholipid vesicles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4424-4428.
- Ollivon, M., Eidelman, O., Blumenthal, R. und Walter, A., (1988), *Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside*. Biochemistry, 27 (5), 1695-1703.
- Orbach, E. und Finkelstein, A., (1980), *The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes*. J. Gen Physiol., 75, 427-436.
- Ostrowsky, N., (1993), *Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy*. Chem. Phys. Lipids, 64, 45-56.
- Overton, E., (1895), *Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzellen*. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich, 40, 159-201.

- Paula, S., Volkov, A.G., Van Hoek, A.N., Haines, T.H. und Deamer, D.W., (1996), *Permeation of protons, potassium ions and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness*. Biophys. J., 70, 339-348.
- Paula, S., Volkov, A.G. und Deamer, D.W., (1998), *Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism*. Biophys. J., 74, 319-327.
- Reeves, J.P. und Dowbwn,R.M., (1970), *Water permeability of phospholipid vesicles*. J. Membrane Biol., 3, 123-141.
- Rosenberg, P.A. und Finkelstein, A., (1978a), *Interaction of ions and water in gramicidin A channels. Streaming potentials across lipid bilayer membranes*. J. Gen. Physiol., 72, 327-340.
- Rosenberg, P.A. und Finkelstein, A., (1978b), *Water permeability of gramicidin A-treated lipid bilayer membranes*. J. Gen. Physiol., 72, 341-350.
- Ruf, H., Georgalis, Y. und Grell, E., (1989), *Dynamic laser light scattering to determine size distribution of vesicles*. Methods Enzym., Vol. 172, 364-390.
- Rys, F.S., (1984), *Kritische Eigenschaften von Lipiddoppelschichten am Hauptphasenübergang*. Progr Colloid & Polymer Sci., 69, 106-108.
- Sackmann, E., (1982), *in Biophysik*. (Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H., Herg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sackmann, E., (1974), *Flüssig-kristalline Zustände in künstlichen und biologischen Membranen*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 78, 924-941.
- Saunders, L., Perrin, J. und Gammack, D.B., (1962), *Ultrasonic irradiation of some phospholipid sols*. J. Pharm. Pharmacol., 14, 567-572.
- Schmidt, R.F. und Thews, G., (1977), *Physiologie des Menschen*. 19. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Schubert, R., Beyer, K., Wolburg, H. und Schmidt,K.H., (1985), *Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate*. Biochemistry, 25, 5263-5269.
- Schwarz, G. und Engel, J., (1972), *Kinetik kooperativer Konformationsumwandlungen von linearen Biopolymeren*. Angew. Chem., 84, Nr. 13.
- Seddon, J.M. und Cevc, G., (1993), *Lipid Polymorphism: Structure and Stability of Lyotropic Mesophases of Phospholipids in* : Phospholipids Handbook, Marcel Dekker, New York.

- Seddon, J.M., (1996), *Lyotropic phase behavior of biological amphiphiles*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 100, 380-393.
- Seelig, A. und Seelig, J., (1974), *The dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance*. Biochemistry, 13, 4839-4845.
- Sháafi, R.I., (1981), *Membrane transport*. (Bonting and de Pont, Hrsg.). Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Sháafi, R.I., (1967), *The effect of the unstirred layer on human red cell water permeability*. J. Gen. Physiol., 41, 1377-1394.
- Shillcock, J.C. und Seifert, U., (1998), *Thermally induced proliferation of pores in a model fluid membrane*. Biophysical J., 74, 1754-1766.
- Sidel, V.W. und Solomon, A.K., (1957), *Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient*. J. Gen. Physiol., 41, 243-257.
- Singer, S.J. und Nicolson, G.L., (1972), *The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes*. Sciences 175, 720-731.
- Stein, W.D., (1990), *Channels, Carriers and Pumps. An introduction to membrane transport*. Academic Press, San Diego.
- Sun, S-T., Milon, A., Tanaka, T., Ourisson, G. und Nakatani, Y., (1986), *Osmotic swelling of unilamellar vesicles by the stopped-flow light scattering method. Elastic properties of vesicles*. Biochim. Biophys. Acta, 860, 525-530.
- Tanford, C., (1980) *The hydrophobic effect. Formation of micelles and biological membranes*. Wiley (Interscience), New York.
- Tieleman, D.P., Marrink, S.J. und Berendsen, H.J.C., (1997), *A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems*. Biochim. Biophys. Acta, 1331, 235-270.
- Tonomara, B., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yomaguchi-Ho, J. und Hiromi, K., (1978), *Test reactions for a stopped-flow apparatus. Reduction of 1,6 dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid*. Anal. Biochem., 84, 370-383.
- Träuble, H., (1971), *The movement of molecules across lipid membranes: A molecular theory*. J. Membr. Biol., 4, 193-208.
- Tsong, T.Y., Greeberg, M. und Kanehisa, M.I., (1977), *Anesthetic action on membrane lipids*. Biophys. Chem., 4, 319-342.

- Tuchtenhagen, J., (1994), *Kalorimetrische und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen an Phospholipidmodellmembranen*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Turnbull, D. und Cohen, M.H., (1969), *On the Free-Volume Model of the Liquid-Glass Transition*. J. Chem. Phys., 52, 3038-3041.
- Ueno, M., (1989), *Partition behavior of a nonionic detergent, octyl glucoside, between membrane and water phases, and effect on membrane permeability*. Biochemistry, 28, 5631-5631.
- Ueno, M., Tanford, C. und Reynolds, J.A., (1984), *Phospholipid vesicle formation using nonionic detergents with low monomer solubility. Kinetic factors determine vesicle size and permeability*. Biochemistry, 23, 3070-3076.
- Verkman, A.S., Dix, J.A. und Seifter, J.L., (1985), *Water and urea transport in renal microvillus membrane vesicles*. Am. J. Physiol., 650-655.
- Vinson, P.K., Talmon, Y. und Walter, A., (1989), *Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy*. Biophys. J., 56, 669-681.
- Volkov, A.G., Paula, S. und Deamer, D.W., (1997), *Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers*. Bioelectrochem. Bioenerg., 42, 153-160.
- Walter, A., (1981), *Nonelectrolyte Permeability of Lipid Bilayer Membranes*. Ph. D. Thesis. Duke University. University Microfilms, Ann Arbor, Michigan.
- Walter, A. und Gutknecht, J., (1986), *Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes*. J. Membrane Biol., 90, 207-217.
- Walter, A., Vinson, P.K., Kaplun, A. und Talmon, Y., (1991), *Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition*. Biophys. J., 60, 1315-1325.
- Weaver, J.C., Powell, K.T., Mintzer, R.A., Sloan, S.R. und Ling, H., (1984), *The diffusve permeability of bilayer membranes: The contribution of transient aqueous pores*. Bioelectrochem. Bioenerg., 12, 405-412.
- White, G., Pencer, J., Nickel, B.G., Wood, J.M. und Hallett, F.R., (1996), *Optical changes in unilamellar vesicles experiencing osmotic stress*. Biophys. J., 71, 2701-2715.
- Wong, M. und Thompson, T.E., (1982), *Aggregation of Dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles*. Biochemistry, 21, 4133-4139.

- Wong, M., Anthony, F.W., Tillack, T.W. und Thompson, T.E., (1982), *Fusion of Dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles at 4°C*. *Biochemistry*, 21, 4126-4132.
- Xiang, T., (1993), *A Computer Simulation of Free-Volume Distributions and Related Structural Properties in a Model Lipid Bilayer*. *Biophys. J.*, 65, 1108-1120.
- Xiang, T. und Anderson B.D., (1994), *Molecular Distributions in Interphases: Statistical Mechanical Theory Combined with Molecular Dynamics of a Model Lipid Bilayer*. *Biophys. J.*, 66, 561-573.
- Xiang, T. und Anderson B.D., (1997), *Permeability of acetic acid across gel and liquid-crystalline lipid bilayers conforms to free-surface-area theory*. *Biophys. J.*, 72, 223-237.
- Xiang, T. und Anderson B.D., (1998), *Influence of Chain Ordering on the Selectivity of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer Membranes for Permeant Size and Shape*. *Biophys. J.*, 75, 2658-2671.

Dank

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern (auch ehemaligen) des Arbeitskreises A. Blume, namentlich Dr. P. Gariedel, Dr. A. Giehl, Dr. S. Hoffmann, H. Janetzki, C. Johann, M. Keller, A. Kerth, Dr. A. Lange, Dr. E. Müller, Dr. H. Pax, Dr. M.-A. Requero, B. Thierfelder, H. Wieder, für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich meinen Forschungspraktikanten C. Eichhorn, T. Sögding, J. Basler, A. Hausherr und S. Vukojevic danken, sowie all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. Stefan Hoffmann für seine Unterstützung bei auftretenden Problemen während meiner Arbeit und für seine Menschlichkeit in allen Lebenssituationen.

Dr. Horst Pax für seine Hilfe bei der Unterweisung der Programmiersprache GFA-Basic und für ein lustiges Fußballturnier, mit der Erkenntnis, daß ohne einen guten Torwart kein Blumentopf zu gewinnen ist.

Herbert Janetzki für die überaus lustigen Radlertreffs und die Grillabende im Europameisterschaftsjahr 1996.

Matthias Keller für die einjährige gute Zusammenarbeit in Halle und die langen Fahrten mit dem Auto nach Halle, mit der Erkenntnis, daß man mit Ohrenstöpsel trotz des „lauten“ Autoradios gut schlafen kann.

Dr. Dirk Chelius für die gute und lustige Zusammenarbeit während der Praktika in Physik und in der physikalischen Chemie.

Dr. Thomas Herweck für die gute Zusammenarbeit beim Vorbereiten auf Prüfungen, sowie des Praktikums in Technischer Chemie und für die interessanten Diskussionen während der gemeinsamen Fahrten zur Universität.

Meinen Eltern, die mir Studium und Promotion erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Name Armin Elbert
Geburtstag 14.02.1970
Geburtsort Mainz
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1976-1985 Grund- und Hauptschule Flonheim
1985-1987 Berufsfachschule Landwirtschaft Bad Kreuznach
1987-1990 Staatliches Aufbaugymnasium Alzey
26.05.1990 Allgemeine Hochschulreife

Studium

01.10.1990 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Kaiserslautern
12.01.1993 Vordiplom
29.09.1995 Abschluß des Hauptstudiums mit einer Diplomarbeit im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. A. Blume im Fachbereich Chemie

Promotion

01.10.1995-30.09.1997 Beginn der Promotion bei Herrn Prof. Dr. A. Blume im Fachbereich Chemie/Physikalische Chemie der Universität Kaiserslautern
seit 01.10.1997 Promotion bei Herrn Prof. Dr. A. Blume im Institut für Physikalische Chemie der Universität Halle-Wittenberg

Berufstätig

seit 01.01.1999 Applikationsberater bei der SAP-SI in Alsbach

Abstract

Die Kenntnis der Transportmechanismen von polaren und unpolaren Molekülen durch biologische Membranen ist notwendig für das Verständnis von vielen biologischen Vorgängen. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis des Transportes von kleinen Molekülen durch Phospholipidmodellmembranen liefern. Hierzu wurden kinetische und kalorimetrische Messungen an Lipidvesikeln durchgeführt. Besonders großes Interesse bestand darin, zu klären, wie diese Moleküle die Membran durchqueren. Um das Permeationsverhalten von Wasser zu erforschen, wurden systematische Untersuchungen der osmotisch getriebenen und der diffusionskontrollierten Wasserpermeation an Lipiddoppelschichten, hergestellt aus Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen und unterschiedlichen Fettsäureketten durchgeführt. Dabei wurde auch die Permeationsgeschwindigkeit im Phasenumwandlungsbereich untersucht. Die diffusionskontrollierte Wasserpermeation wird mit Hilfe des $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschverfahrens gemessen und bei osmotischen Messungen erzeugt man einen Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extravasikulärem Raum. Es wurde für alle Lipide und Lipidgemische eine sprunghafte Zunahme der osmotischen und diffusiven Wasserpermeation an der Hauptphasenumwandlung gel \rightarrow flüssig-kristallin gefunden. Die Permeabilitätskoeffizienten für die osmotische Wasserpermeation lagen bei allen Messungen um den Faktor 100 höher als die Werte für die diffusionskontrollierte Wasserpermeation. Im Phasenumwandlungsbereich durchlaufen die Permeabilitätskoeffizienten ein Maximum. Die experimentell gewonnenen Daten lassen einen Wassertransport durch transiente Poren, die sich durch Defektstellen und thermische Fluktuationen in der Doppelschicht bilden, vermuten und widersprechen einem Löslichkeitsdiffusionsmechanismus. Um den Einfluß des Konzentrationsgradienten auf die Permeation näher zu untersuchen, wurden osmotische Messungen mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Wasserpermeation abhängig vom angelegten Konzentrationsgradienten war, während die Harnstoffpermeation keine Abhängigkeit zeigte. Die stark unterschiedlichen Permeabilitätskoeffizienten der beiden Moleküle legen den Verdacht nahe, daß sie auf unterschiedlichen Wegen die Lipiddoppelschicht durchdringen. Um das Permeationsverhalten von kleinen Molekülen aufzuklären, wurden Messungen der diffusionskontrollierten Permeation vorgenommen. Desweiteren war von Interesse ob durch den Einbau von Detergensmoleküle in die Lipidmembran die Permeationseigenschaften der Moleküle verändert werden. Mit Hilfe der gewonnen Daten sind Rückschlüsse auf den Mechanismus der Permeation von kleinen Molekülen durch biologische Membranen möglich.