

**Herstellung und Charakterisierung von  
unsymmetrischen Liposomen unter Verwendung  
von rekombinanten Proteinen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

vorgelegt von  
**Joachim Momm**  
aus Winterthur (CH)

2004

Dekan:	Prof. Dr. K. Bucher
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. G. E. Schulz
Referent:	Prof. Dr. R. Schubert
Korreferentin:	PD Dr. R. Peschka-Süss

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 05. Februar 2004

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungen.....	VII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Liposomen als Membranmodelle</i> .....	1
1.2 <i>Problemstellung und Zielsetzung</i> .....	2
1.3 <i>Liposomen</i> .....	3
1.3.1 <i>Definition und Eigenschaften</i> .....	3
1.3.2 <i>Einteilung</i> .....	5
1.3.3 <i>Herstellung</i> .....	6
1.3.3.1 <i>Filmmethode</i> .....	6
1.3.3.2 <i>Extrusion</i> .....	7
1.3.3.3 <i>Detergendsialyse</i> .....	7
1.3.4 <i>Liposomencharakterisierung</i> .....	11
1.3.4.1 <i>Photonenkorrelationsspektroskopie</i> .....	11
1.3.4.2 <i>ζ-Potentialmessungen</i> .....	12
1.4 <i>Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung</i> .....	14
1.4.1 <i>Definition</i> .....	14
1.4.2 <i>Herstellung unsymmetrischer Liposomen</i> .....	15
1.4.2.1 <i>Inkorporierung von Membrankomponenten in den äusseren Monolayer</i> .....	15
1.4.2.2 <i>Lipidaustausch zwischen verschiedenen Liposomenpopulationen</i> .....	16
1.4.2.2.1 <i>Spontaner Austausch</i> .....	16
1.4.2.2.2 <i>Proteinvermittelter Austausch</i> .....	17
1.4.2.2.3 <i>Verfolgung des Lipidaustausches</i> .....	19
1.4.2.2.3.1 <i>Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)</i> .....	19

---

1.4.2.2.3.2	Free Flow Elektrophorese .....	21
1.4.2.3	Extraktion mit BSA.....	21
1.4.2.4	Enzymatische Modifizierung .....	22
1.4.2.5	Weitere Methoden .....	22
1.4.2.5.1	Chemische Modifizierung .....	22
1.4.2.5.2	Physikochemische Methoden.....	22
1.4.3	Charakterisierung von unsymmetrischen Liposomen .....	23
1.4.3.1	Lipidverteilung .....	23
1.4.3.1.1	Phospholipid-Analoga.....	23
1.4.3.1.2	Derivatisierung natürlicher Phospholipide .....	24
1.4.3.1.3	Verwendung von Phospholipasen .....	25
1.4.3.2	Flipp-Flopp.....	25
1.5	<i>Klonierung und Expression von Genen</i> .....	28
1.5.1	Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls.....	29
1.5.1.1	Einzufügendes Gen .....	29
1.5.1.2	Vektor .....	30
1.5.2	Transfektion des Konstruktes und Expression des Genproduktes .....	30
1.5.2.1	Cloning Host.....	30
1.5.2.2	Expression Host .....	31
1.5.3	Isolierung des Genproduktes.....	32
1.6	<i>Free Flow Elektrophorese</i> .....	32
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i> .....	34
2.1.1	Chemikalien.....	34
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	39
2.2	<i>Lösungen und Puffer</i> .....	39
2.2.1	Puffer für die Free Flow Elektrophorese .....	39
2.2.2	Weitere Puffer und Lösungen .....	40
2.3	<i>Geräte</i> .....	42
2.3.1	Octopus PZE .....	42

---

2.3.1.1	Beschreibung und Inbetriebnahme .....	42
2.3.1.2	Kalibrierung der Anlage .....	47
2.3.1.2.1	Einstellung der Kammersymmetrie .....	47
2.3.1.2.2	Kontrolle der Pufferströme .....	47
2.3.2	Weitere Geräte .....	48
2.4	<i>Liposomenherstellung</i> .....	49
2.4.1	Extrusion .....	49
2.4.2	Detergensdialyse .....	50
2.4.2.1	Allgemeine Durchführung .....	50
2.4.2.2	Herstellung von Liposomen unterschiedlicher Grösse .....	50
2.4.2.2.1	Akzeptorliposomen 100 nm .....	51
2.4.2.2.2	Donorliposomen 200 nm .....	51
2.5	<i>Liposomencharakterisierung</i> .....	52
2.5.1	Grössenmessung mittels PCS .....	52
2.5.2	$\zeta$ -Potentialmessungen .....	53
2.5.3	Phospholipid-Quantifizierung .....	54
2.5.3.1	Bartlett-Methode .....	54
2.5.3.2	Steward-Assay .....	55
2.6	<i>Expression und Isolierung des ns-LTP in E. coli</i> .....	56
2.7	<i>Klonierung und Expression der PSD als GST-Fusionsprotein</i> .....	58
2.7.1	Präparation der Gesamt-DNA aus E. coli .....	58
2.7.1.1	Isolierung der DNA .....	58
2.7.1.2	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	58
2.7.2	PCR .....	59
2.7.3	Analytisches Agarosegel .....	60
2.7.4	Isolierung, Restriktionsverdau und Aufreinigung des PCR-Produktes .....	61
2.7.4.1	Ethanol-fällung des PCR-Ansatzes .....	61
2.7.4.2	Restriktionsverdau des PCR-Produktes .....	61
2.7.4.3	Agarosegel-Aufreinigung des Fragmentes .....	62
2.7.5	Präparation und Aufreinigung des Vektors pGEX 6P-2 .....	62
2.7.5.1	Herstellung des pGEX 6P-2 Vektors .....	62
2.7.5.2	Restriktionsverdau des Vektors .....	63

---

2.7.5.3	Agarosegel-Aufreinigung .....	63
2.7.6	Ligation .....	63
2.7.7	Transformation in Cloning Host .....	64
2.7.8	Isolierung und Restriktionsanalyse des Plasmides .....	65
2.7.9	Transformation in Expression Host.....	66
2.7.10	Überprüfung auf Proteinexpression .....	66
2.7.11	Optimierung der Proteinexpression .....	68
2.7.12	Isolierung des Fusionsproteins .....	68
2.8	<i>Präparation von Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung</i> .....	70
2.8.1	Spontaner Austausch .....	70
2.8.2	Proteinvermittelter Austausch.....	70
2.9	<i>Methoden zur Verfolgung des Lipidaustausches</i> .....	71
2.9.1	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....	71
2.9.1.1	Herstellung der Liposomen.....	71
2.9.1.2	Bindung des C <sub>12</sub> -NBD-PC an das ns-LTP .....	72
2.9.1.3	Austausch von C <sub>12</sub> -NBD-PC .....	73
2.9.2	FFE.....	74
2.9.2.1	Austausch von EPG .....	74
2.9.2.2	Austausch von EPS .....	75
2.10	<i>Methoden zur Bestimmung von Lipidverteilung und Flipp-Flopp</i> .....	75
2.10.1	ζ-Potentialmessungen .....	76
2.10.1.1	Zusammenhang zwischen EPG-Gehalt und ζ-Potential von Liposomen .....	76
2.10.1.2	Flipp-Flopp von EPG .....	77
2.10.2	Fluorescamin-Assay .....	77
2.10.2.1	Reaktionsbedingungen und Linearität des Assays .....	77
2.10.2.2	Bestimmung der Verteilung und des Flipp-Flopp von EPS.....	77
2.10.3	2-(p-Toluidinyl)naphthalen-6-sulfonsäure -Assay .....	79
2.10.3.1	Assay-Bedingungen .....	79
2.10.3.1.1	Fluoreszenzspektren .....	79
2.10.3.1.2	Zeitlicher Verlauf der Einlagerung .....	80
2.10.3.2	Erstellen einer Kalibrationsfunktion für EPG- und EPS-haltige Liposomen .....	82

---

2.10.3.3	Durchführung einer TNS-Messung .....	83
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>84</b>
3.1	<i>Bestimmung des Lipidaustausches</i> .....	84
3.1.1	FRET-Messungen.....	84
3.1.1.1	Bindung des C <sub>12</sub> -NBD-PC an ns-LTP .....	84
3.1.1.1.1	DOPC-Liposomen .....	84
3.1.1.1.2	EPC-Liposomen .....	88
3.1.1.1.3	Vergleich der Bindungsdaten .....	89
3.1.1.2	Austausch des C <sub>12</sub> -NBD-PC .....	91
3.1.1.3	Diskussion der Austauschmessungen mit FRET .....	93
3.1.2	Free Flow Elektrophorese (FFE) .....	94
3.1.2.1	Herstellung von Liposomen gleicher Grösse mittels Detergendsdialyse .....	96
3.1.2.1.1	Anpassung der Grösse von EPC-Liposomen .....	96
3.1.2.1.2	Anpassung der Grösse von EPG-haltigen Liposomen .....	96
3.1.2.2	EPG-Gehalt von Liposomen und elektrophoretische Mobilität... ..	98
3.1.2.3	Austausch von EPG .....	103
3.1.2.3.1	Spontaner Austausch .....	103
3.1.2.3.2	Proteinvermittelter Austausch.....	104
3.1.2.4	Austausch von EPG aus Polymer- und Ankerliposomen .....	107
3.1.2.4.1	Spontaner Austausch .....	108
3.1.2.4.2	Proteinvermittelter Austausch.....	110
3.1.2.5	Vergleich der verschiedenen Liposomenarten.....	112
3.1.2.6	Diskussion der Austauschmessungen mit FFE .....	113
3.2	<i>Bestimmung des Flipp-Flopp</i> .....	114
3.2.1	Methoden.....	114
3.2.1.1	ζ-Potential von EPG-haltigen Liposomen .....	114
3.2.1.2	Linearität des Fluorescamin-Assays.....	116
3.2.1.3	TNS-Assay .....	117
3.2.1.3.1	EPG-haltige Liposomen.....	117
3.2.1.3.1.1	Lipidkonzentration und -zusammensetzung.....	117
3.2.1.3.1.2	EPG-Anteil im äusseren Monolayer .....	119

---

3.2.1.3.1.3	TNS-Assay und $\zeta$ -Potential .....	121
3.2.1.3.2	EPS-haltige Liposomen .....	122
3.2.1.3.2.1	Lipidkonzentration und -zusammensetzung .....	123
3.2.1.3.2.2	EPS-Anteil im äusseren Monolayer .....	124
3.2.1.3.2.3	TNS-Assay und $\zeta$ -Potential .....	126
3.2.2	Flipp-Flopp von EPG .....	126
3.2.2.1	Etablierung einer PG-Unsymmetrie .....	126
3.2.2.2	$\zeta$ -Potentialmessungen .....	128
3.2.2.3	TNS-Assay .....	133
3.2.2.4	Diskussion der Flipp-Flopp-Messungen von EPG .....	135
3.2.3	Flipp-Flopp von EPS .....	136
3.2.3.1	Etablierung einer EPS-Unsymmetrie .....	136
3.2.3.2	Fluorescamin-Assay .....	136
3.2.3.3	TNS-Assay .....	139
3.2.3.4	Diskussion der Flipp-Flopp-Messungen von EPS .....	140
3.3	<i>Enzymatische Modifizierung von Liposomen mittels PSD</i> .....	142
3.3.1	Aktivitätsnachweis an Vesikeln .....	142
3.3.1.1	Dünnschichtchromatographie .....	142
3.3.1.2	TNS-Assay .....	144
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>146</b>
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>151</b>



## **Abkürzungen**

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	Tetraethylglykolmonoocylether
cDNA	Coding DNA
cm	Centimeter
DC	Dünnschichtchromatographie
DD	Detergendsdialyse
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
EPC	Ei-Phosphatidylcholin
FFE	Free Flow Elektrophorese
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kCps	Kilocounts per second
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTP	Lipidtransferprotein

---

LUV	Large unilamellar vesicles
mA	Milliampère
MCS	Multiple Cloning Site
MLV	Multilamellar large vesicles
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Na-C	Natriumcholat
NBD-PC	7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylphosphatidylcholin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance
N-Rh-PE	N-Lissamine <sup>®</sup> -Rhodamin-B-Phosphatidylethanolamin
ns-LTP	nichtspezifisches Lipidtransferprotein
OG	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
OLV	Oligolamellar large vesicles
PA	Phosphatidsäure
PBS	Phosphat Buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PI	Polydispersitätsindex
PS	Phosphatidylserin

---

PSD	Phosphatidylserin Decarboxylase
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
SCP2	Sterol carrier protein 2
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEC	Size exclusion chromatography
SUV	Small unilamellar vesicles
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNS	2-( <i>p</i> -Toluidinyl)naphthalen-6-sulfonsäure
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
VT	Volumenteile
ζ-Potential	Zetapotential

# **1 Einleitung**

## **1.1 Liposomen als Membranmodelle**

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zu zellulären Membranen eignen sich Liposomen hervorragend als Membranmodelle. Gemeinsames Charakteristikum ist die Lipiddoppelschicht, deren Hauptbestandteile Phospholipide darstellen.

Liposomen sind sehr gut geeignet, um passive Transportvorgänge, bzw. das Permeationsverhalten von Stoffen durch eine Membran, zu untersuchen. Zudem lassen sich Interaktionen (Assoziation, Einlagerung, Umlagerung, Verteilung, Porenbildung) verschiedenster nieder- und hochmolekularer Stoffe mit Membranen erfassen (Hellwich & Schubert, 1993). So ist es beispielsweise möglich, das Verhalten neuer Arzneistoffe an Zellmembranen mit Hilfe von Phospholipid-Vesikeln abzuschätzen (Lohner, 1991; Avdeef & Testa, 2002). Aber auch die Einlagerung von Proteinen in Membranen kann simuliert und die Aktivität von inter- und transmembranären Proteinen und Proteinkomplexen (Enzyme, Rezeptoren, Ionenkanäle) gemessen werden (Eytan et al., 1996; Plancon et al., 1997; Poklar et al., 1999; Fischer & Graber, 1999). Durch Variation der Lipidzusammensetzung, Grösse und Oberflächenladung oder des transmembranären Potentials von Liposomen kann der Einfluss verschiedener biophysikalischer Parameter auf die Interaktion zwischen liposomalen Bilayern und hoch- oder niedermolekularen Stoffen untersucht werden. Des weiteren können mit Liposomen verschiedene Vorgänge wie Fusionen zwischen membranären Systemen dargestellt werden (Parlati et al., 2000; Waarts et al., 2002; Wang et al., 2003).

Bei einer Vielzahl von Untersuchungen ist es erforderlich, dass die verwendeten Liposomen nur eine Lipiddoppelschicht (Bilayer) aufweisen, also unilamellar sind. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn die Permeation und das Verteilungsverhalten von niedermolekularen Stoffen an liposomalen Membranen untersucht werden sollen.

Ebenfalls eine wichtige Rolle spielt die Liposomengrösse. Liposomen mit einem Durchmesser von über 50 nm lassen sich als Membranmodelle einsetzen. Ihre Bilayer weisen einen geringen Krümmungsradius auf und sind fast spannungsfrei. Die Anzahl der Phospholipide im inneren und äusseren Monolayer ist praktisch identisch. Durch den geringen Krümmungsradius kann zudem davon ausgegangen

werden, dass bei Liposomen, die aus verschiedenen Phospholipiden zusammengesetzt sind, eine symmetrische Verteilung der Membrankomponenten vorliegt.

## **1.2 Problemstellung und Zielsetzung**

Der komplexe Aufbau von biologischen Membranen wurde erst Anfang der 70er Jahre durch die Arbeiten von Singer und Nicolson in ersten Ansätzen aufgeklärt. Sie beschrieben das „fluid mosaic“ Modell, bei welchem amphiphile Lipidmoleküle eine hydratisierte Doppelschicht ausbilden, in welcher die Lipide ungehindert lateral diffundieren können (Singer & Nicolson, 1972).

Kurze Zeit später zeigte sich, dass biologische Membranen strukturell und funktionell unsymmetrisch aufgebaut sind. So besitzen in die Membran eingelagerte (integrale) Proteine in der Regel eine feste Orientierung, die an ihre Funktion als Enzyme, Ionenkanäle, Rezeptoren, Zell-Zell-Erkennungsmerkmale, Transporter oder Strukturgeber gebunden ist. Diese Unsymmetrie beschränkt sich jedoch nicht nur auf Proteine. Bretscher konnte an der Membran von humanen Erythrozyten eine unsymmetrische Verteilung der membranbildenden Phospholipide nachweisen. So befinden sich die cholinhaltigen Phospholipide (Phosphatidylcholin, PC und Sphingomyelin) zum grössten Teil im äusseren Monolayer, während die Aminophospholipide (Phosphatidylserin, PS und Phosphatidylethanolamin, PE) hauptsächlich im inneren (cytosolischen) Monolayer vorhanden sind (Bretscher, 1972a; 1972b). Ähnliche unsymmetrische Verteilungen von Phospholipiden konnten auch bei eukaryontischen Plasmamembranen und Zellorganellen unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen werden (Zachowski, 1993). Bakterielle und virale Membranen wiederum weisen häufig stark unterschiedliche Lipidzusammensetzungen und Lipidverteilungen auf. So besteht die Membran von *Bacillus megaterium* vorwiegend aus PE und PG, wobei PE mehrheitlich im inneren und PG ausschliesslich im äusseren Monolayer zu finden ist (Rothman & Kennedy, 1977).

Diese spezifische Membranverteilung ist wichtig bei verschiedenen physiologischen Vorgängen wie der Hämostase, Apoptose oder Zell-Zell-Erkennung. Eine entscheidende Rolle kommt dabei dem PS zu, welches sich normalerweise hauptsächlich im cytosolischen Monolayer befindet. Der Verlust der PS-Unsymmetrie ist ein Auslöser für die oben genannten Prozesse.

Ziel dieser Arbeit ist es, Liposomen mit einer unsymmetrischen Lipidverteilung mit Hilfe von rekombinanten Proteinen herzustellen und zu charakterisieren. Diese Liposomen sollen als Modelle für natürliche Membranen zur Verfügung stehen.

Die Unsymmetrie soll in erster Linie über Lipidaustausch unter Zuhilfenahme des nichtspezifischen Lipidtransferproteins (ns-LTP) generiert werden. Nach der Untersuchung der Aktivität des rekombinant hergestellten Proteins mittels der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik (FRET) soll der Austausch von negativ geladenen Phospholipiden (Phosphatidylglycerol, PG und Phosphatidylserin) zwischen Phosphatidylcholin-Vesikeln erfasst werden. Dazu werden sog. Donorliposomen hergestellt, die neben dem ungeladenen PC definierte Mengen an PG oder PS enthalten. Die Akzeptorliposomen bestehen aus reinem PC. Die Verfolgung des Austauschs geschieht über die Free Flow Elektrophorese (FFE), mit der sich Liposomen analytisch und präparativ nach ihrer Oberflächenladung trennen lassen. Die so gewonnenen Liposomenpopulationen weisen eine unsymmetrische Verteilung der negativ geladenen Phospholipide zwischen ihren Monolayern auf.

Bei der Charakterisierung der Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung ist die transversale Diffusion von Phospholipiden (Flipp-Flopp) von grosser Bedeutung, da sie der ungleichen Verteilung der Lipide entgegenwirkt. Da über den Flipp-Flopp von natürlichen, unmodifizierten Phospholipiden noch wenig verlässliche Zahlen vorhanden sind, soll an den unsymmetrischen Liposomen die Geschwindigkeit der Umlagerung von PG und PS gemessen werden.

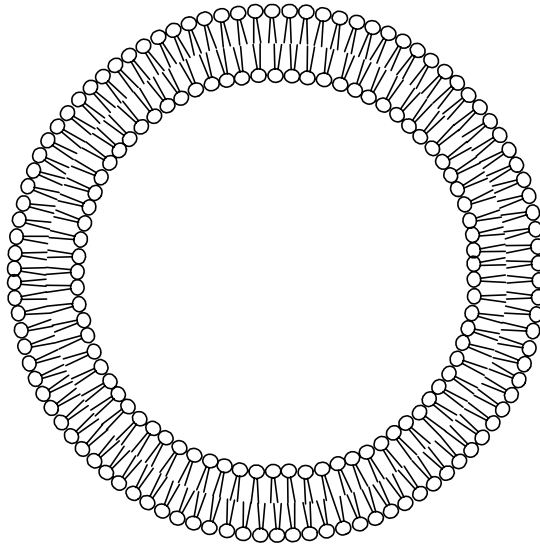
Zusätzlich soll untersucht werden, ob sich PS im äusseren Layer von Liposomen enzymatisch in PE umwandeln lässt. Das entsprechende Enzym, die Phosphatidylserin-Decarboxylase (PSDC) wird in *E. coli* rekombinant hergestellt. Da Proteine aufgrund ihrer Grösse nicht durch liposomale Bilayer permeieren können, wird nur PS im äusseren Monolayer modifiziert. Dies führt zu einer unsymmetrischen Verteilung von PS zwischen den Monolayern.

## **1.3 Liposomen**

### **1.3.1 Definition und Eigenschaften**

Die Entdeckung und erstmalige Beschreibung von Liposomen durch Bangham datiert aus dem Jahr 1963 (Bangham, 1963). Ihren Namen erhielten sie in Anlehnung an Begriffe wie Endosom oder Lysosom (Sessa & Weissmann, 1968).

Es handelt sich um vesikuläre, meist kugelförmige Strukturen, deren Grösse im Bereich von etwa 20 nm bis einigen  $\mu\text{m}$  liegen kann. Ihre Hülle, die einen wässrigen Innenraum umschliesst, besteht aus einer oder mehreren konzentrisch angeordneten Doppelschichten, sogenannten Bilayern, die üblicherweise aus Phospholipiden bestehen. Diese orientieren sich so, dass ihre polaren Kopfgruppen zur wässrigen Phase hin und ihre Fettsäurereste zueinander angeordnet sind (Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1** Schematische Darstellung eines Liposoms

Die Ausbildung des Bilayers ist ein spontaner enthalpiegetriebener Prozess. Die Dicke eines hydratisierten Bilayers liegt dabei im Bereich von 5 nm (Huang, 1969). Die zur Herstellung von Liposomen am häufigsten eingesetzten Phospholipide sind Phosphodiester-Derivate von 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphat. Phospholipide lassen sich nach ihrem chemischen Aufbau in zwei charakteristische Molekülbereiche - die hydrophile Kopf- und die lipophile Endgruppe - aufspalten. Die Kopfgruppe besteht aus dem Phosphorsäurediester, der einerseits mit Cholin, Ethanolamin, Glycerol, Inositol, Serin oder Zuckerresten verknüpft sein kann und andererseits mit einer der primären Hydroxylgruppen des Glycerols verbunden ist. Die lipophile Endgruppe wird von den Kohlenwasserstoffketten zweier Fettsäuren gebildet, die mit den übrigen zwei Hydroxylgruppen des Glycerols verestert sind. Die Länge der Fettsäuren liegt normalerweise zwischen 14 und 22 Kohlenstoffatomen. Die lamellaren Phasen der Doppelmembran können in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen, die bei der sogenannten Phasenübergangstemperatur ineinander übergehen. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur sind die

Phospholipide in einem quasikristallinen Gitterwerk fixiert. Darin besitzen die Fettsäurereste nur eine geringe Eigenbeweglichkeit, wodurch die Liposomen vergleichsweise starr erscheinen. Oberhalb der kritischen Temperatur befindet sich der Bilayer in einem flüssigkristallinen Zustand, in welchem die Alkylketten deutlich beweglicher sind, der lamellare Charakter jedoch erhalten bleibt. Dies ermöglicht den Lipidmolekülen, lateral durch die Lipidschicht zu diffundieren. Die physikalischen Eigenschaften der Liposomenmembranen unterscheiden sich demnach in diesen beiden Phasen. So erhöht sich zum Beispiel die Permeabilität der Membranen für kleine Moleküle im Bereich der Phasenübergangstemperatur aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit und Dauer von Packungsdefekten in der Membran. Die Phasenübergangstemperatur ist sowohl von der Kopfgruppe als auch von der Länge und vom Sättigungsgrad der Fettsäurereste abhängig (Szoka & Papahadjopoulos, 1980).

### **1.3.2 Einteilung**

Liposomen werden nach ihrer Grösse und Lamellarität in verschiedene Gruppen unterteilt (nach der *New York Academy of Science*, 1977):

- **SUV (small unilamellar vesicles)**

Kleine, unilamellare Vesikel haben einen Durchmesser bis zu 50 nm und nur einen Bilayer. Aufgrund ihres hohen Krümmungsradius werden die Kopfgruppen der Phospholipide im äusseren Monolayer auseinander gedrückt, wohingegen die Fettsäureketten dicht zusammenrücken. Im inneren Monolayer verhält es sich genau umgekehrt. Da die Kopfgruppen von Phospholipiden in der Regel einen grösseren Platzbedarf als die Fettsäureketten haben, enthält der äussere Monolayer mehr Lipidmoleküle als der innere. Setzen sich SUV aus verschiedenen Phospholipiden zusammen, haben solche mit einer grösseren Kopfgruppe die Tendenz, sich vermehrt im äusseren Monolayer aufzuhalten, wodurch eine Unsymmetrie in der Lipidverteilung entsteht (Thomas & Poznansky, 1989).

Aufgrund des hohen Krümmungsradius und den dadurch bedingten Membranspannungen weisen SUV eine vergleichsweise starke Tendenz zur Fusion und eine erhöhte Permeabilität für niedermolekulare Stoffe auf.

- **LUV (large unilamellar vesicles)**

Diese grossen, ebenfalls unilamellaren Vesikel haben einen Durchmesser von über 50 nm. Aufgrund ihrer Grösse ist die Membran nahezu spannungsfrei,



wodurch die Anzahl der Lipidmoleküle sowie deren Anordnung in beiden Monolayern praktisch identisch ist. Setzen sich LUV aus Phospholipiden natürlichen Ursprungs zusammen (Ei, Soja), weisen sie physikochemische Eigenschaften auf, die denen von Biomembranen relativ ähnlich sind, weshalb sie als Modellmembranen zum Einsatz kommen können.

- **OLV / MLV (oligolamellar / multilamellar large vesicles)**

Hierbei handelt es sich um Liposomen, die mehrere (OLV) bzw. viele (MLV) konzentrische Bilayer aufweisen. Ihr Durchmesser bewegt sich zwischen 100 nm und mehreren  $\mu\text{m}$ .

Aufgrund der erhöhten Lamellenzahl sind OLV und MLV nicht als Modelle für Biomembranen geeignet.

- **MVV (multivesicular vesicles)**

Bei multivesikulären Vesikeln handelt es sich um Liposomen mit einem Durchmesser von mehr als 100 nm, die in ihrem Inneren ein oder mehrere deutlich kleinere Liposomen aufweisen.

### **1.3.3 Herstellung**

In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die bestehenden Herstellungsmethoden für Liposomen gegeben.

Dabei wird besonders auf die in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren eingegangen. Das methodische Vorgehen bei den präparativen Verfahren wird in Kapitel 2.4 beschrieben.

#### **1.3.3.1 Filmmethode**

Bei der von Bangham erstmals beschriebenen Filmmethode (Bangham et al., 1965) werden die Membrankomponenten und eventuelle zusätzliche Stoffe lipophiler Natur (Arzneistoffe, Fluoreszenzsonden etc.) in geeigneten organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen gelöst und in einen Rundkolben pipettiert. Das Lösungsmittel wird anschliessend unter reduziertem Druck und erhöhter Temperatur (ca. 40 °C) am Rotationsverdampfer entfernt. Auf der Innenwand des Rundkolbens entsteht so ein homogener transparenter Lipidfilm, der im Hochvakuum nachgetrocknet wird.

Der Film wird nun mit einer entsprechenden Menge Puffer versetzt, wobei sich spontan eine in Bezug auf Grösse und Lamellarität inhomogene Liposomen-

dispersion bildet. Enthält der Puffer einen gelösten Wirkstoff, wird dieser bei diesem Prozess teilweise in die Liposomen eingeschlossen. Die Liposomendispersion kann mit Frier-Tau-Zyklen nachbehandelt werden. Durch das mehrmalige Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196 °C) und Auftauen kann die Einschlusseffizienz von Wirkstoffen verbessert und die Homogenität der Liposomendispersion erhöht werden.

Normalerweise werden Liposomen, die mit der Filmmethode hergestellt wurden, weiter verarbeitet mit dem Ziel, eine definierte, enge Grössenverteilung zu erhalten. Dies kann durch Ultraschall oder über mechanische Verfahren wie die Extrusion (vgl. 1.3.3.2), die Hochdruckhomogenisation oder die Hochdruckextrusion geschehen.

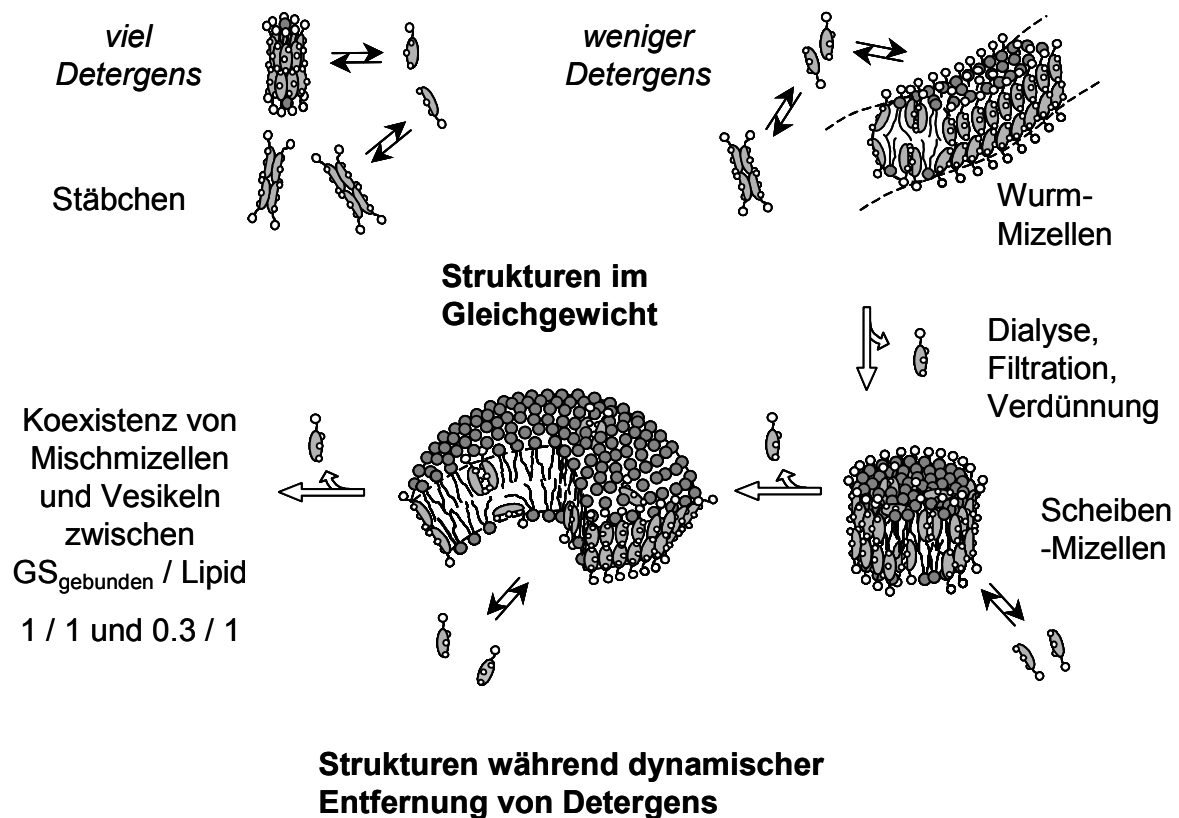
### **1.3.3.2 Extrusion**

Bei der Extrusion (Olson et al., 1979; Hope et al., 1985) wird die mittels Filmmethode (1.3.3.1) hergestellte Liposomendispersion mehrmals durch porenhaltige Polycarbonatmembranen gepresst. Dabei entstehen in Abhängigkeit vom Porendurchmesser und der Zahl der Extrusionsschritte uni- oder oligolamellare Liposomen mit enger Grössenverteilung. Die nominale Porenweite der Membranen liegt zwischen 30 und 2000 nm, wobei meistens Membranen mit einer Porenweite von 80 bis 800 nm eingesetzt werden.

### **1.3.3.3 Detergendsdialyse**

Als Vorbereitung zur Detergendsdialyse (DD) wird wie zuvor beschrieben (1.3.3.1) ein Lipidfilm hergestellt, der neben den Membranbestandteilen das ausgewählte Detergens bzw. das Detergensgemisch und eventuell weitere lipophile Bestandteile enthält.

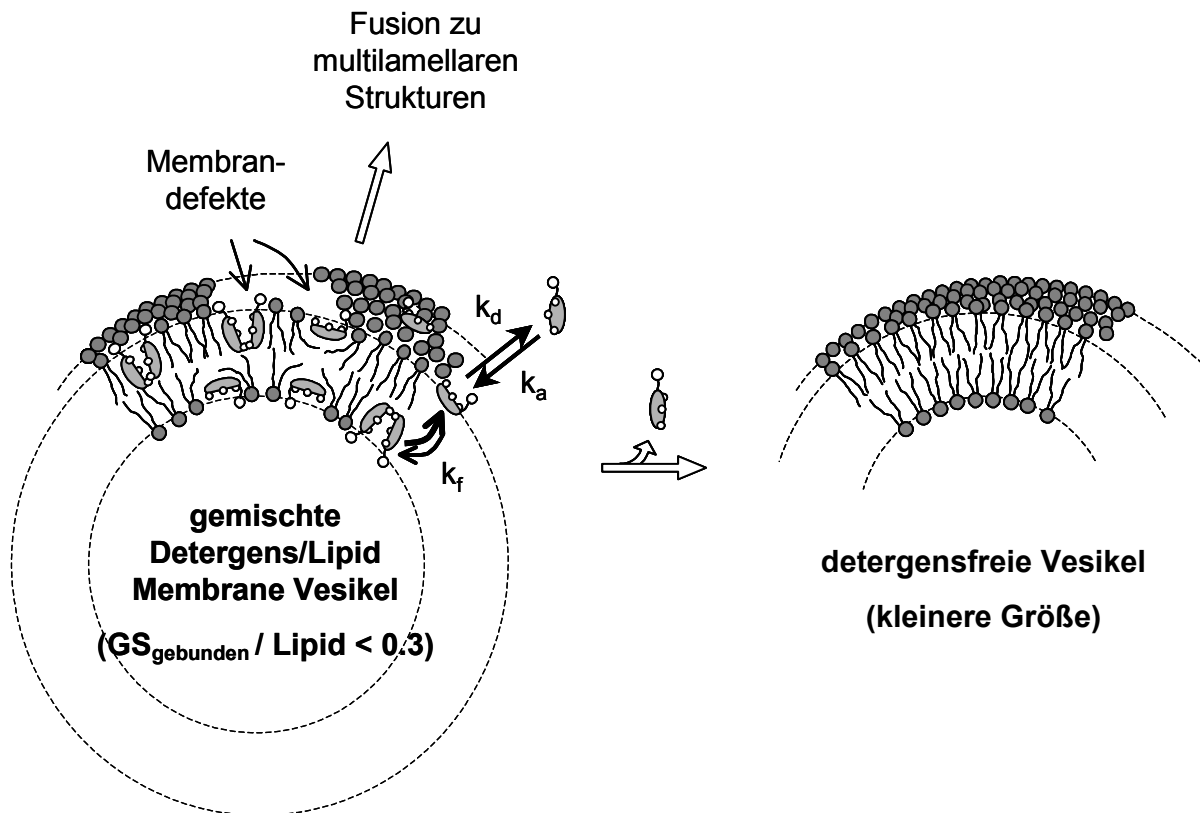
Nach Aufnahme des Filmes in Puffer bilden sich hier keine Vesikel, sondern Mischmizellen, deren Zusammensetzung und Form abhängig vom eingesetzten Detergens ist. Bei sehr hohem Gehalt an Detergens, speziell bei Gallensalzen, werden Aggregate diskutiert, die aus zwei PC-Molekülen, deren Fettsäurerest zueinander hinzeigen, umgeben von 16 bis 20 Gallensalmolekülen, bestehen (Abbildung 1-2) (Schubert, 1989; 2003).



**Abbildung 1-2** Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Herstellung von Liposomen mittels Detergensentfernung (nach Schubert 2003)

Bei geringeren Gallensalzkonzentrationen liegen längliche Lipid-Detergens-Aggregate („Wurm-Mizellen“) vor, deren genaue Struktur und Zusammensetzung von zahlreichen Parametern abhängig ist (Ulmius et al., 1982; Egelhaaf et al., 1998; Schubert, 2003). Die Detergensmoleküle stehen dabei in einem Gleichgewicht zwischen an Mizellen und Mischmizellen gebundenen und monomolekular gelösten Molekülen. Verarmt nun die Dispersion an Detergensmolekülen, sind die Mizellen in einem dynamischen Prozess gezwungen zu fusionieren. In einem ersten Schritt entstehen stäbchen- oder wurmartige Mischmizellen, wie über verschiedene Techniken wie NMR, Lichtstreuung oder Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) nachgewiesen werden konnte (Ulmius et al., 1982; Pedersen et al., 1995; Egelhaaf et al., 1998). Bei weiterem Detergensentzug entstehen Scheibenmizellen von grösserem Umfang, die von einem Ring aus Detergensmolekülen stabilisiert werden (Fromherz, 1983). Wird dem System weiter Detergens

entzogen, beginnen die Scheibenmizellen sich zu wölben, bis schliesslich die Vesikulierung eintritt (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3** Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Herstellung von Liposomen mittels Detergensentfernung (nach Schubert 2003)

Dies ist daran zu erkennen, dass bei ausreichender Grösse der Liposomen eine Trübung der Dispersion festzustellen ist. Die entstandenen Vesikel sind noch immer detergenshaltig. So enthalten frisch vesikulierte Liposomen, die mittels Gallensalzen hergestellt werden, noch ca. 25 mol% Gallensalzmoleküle. Dementsprechend geht eine erschöpfende Entfernung des Detergens auch mit einer Grössenabnahme einher.

Für die Detergensentfernung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

- Verdünnung (Schurtenberger et al., 1985; Son & Alkan, 1989)
- Gelchromatographie (Brunner et al., 1976)
- Tangentialfiltration (Peschka et al., 1998)
- Adsorption an Matrices (Philippot et al., 1983; Philippot et al., 1985)
- Detergendsialyse (DD) (Milsman et al., 1978)

Im Folgenden soll genauer darauf eingegangen werden, wie die DD in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Die Mischmizelldispersion wird in eine Kammer überführt, die mit einer sehr dünnen Dialysemembran (cutoff 10 kDa) gegen einen Überschuss (mind. 100-fach) an Puffer abgeschlossen wird. Die monomolekular vorliegenden Detergenzien vermögen durch die Membran zu diffundieren, während die wesentlich grösseren Mischmizellen zurückgehalten werden. Regelmässiger Pufferwechsel und gute Durchmischung der Dispersion in der Kammer mit einem Rührfisch garantieren eine schnelle und effiziente Entfernung des Detergens. Zur vollständigen Entfernung des Detergens sollte mind. 16 h lang (über Nacht) dialysiert werden.

Liegt die Lipidkonzentration bei der DD unter 25 bis 30 mM, erhält man sehr homogene, weitestgehend unilamellare Liposomen, deren Grösse von verschiedenen Faktoren abhängt:

- Art des Detergens
- anfängliches Verhältnis von Detergens zu Lipid
- Gesamtkonzentration von Detergens und Lipid
- Temperatur während der Dialyse
- Ionenstärke des Dialysemediums
- pH-Wert des Mediums
- Geschwindigkeit der Detergensentfernung

Die am häufigsten eingesetzten Detergenzien sind Gallensalze wie Na-C und n-Alkylsaccharide wie n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (OG). Na-C wird dabei in der Regel bei einer Lipidkonzentration von etwa 20 mM in einem molaren Verhältnis Detergens:Lipid von 2:1 und OG in einem Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Die Grösse der Vesikel bei der Dialyse gegen Wasser liegt mit Na-C bei ca. 40 nm und mit OG bei 140 nm. Sie kann durch den Einsatz von Detergensgemischen und Variation der Ionenstärke des Dialysemediums nach Wahl gesteuert werden (Rhoden & Goldin, 1979; Zumbuehl & Weder, 1981; Schwendener et al., 1981).

Nach erfolgter Dialyse sollte eine Phospholipidbestimmung durchgeführt werden, da während der Dialyse eine Verdünnung der Probe stattfindet. Diese ist darauf zurückzuführen, dass das Volumen in der Dialysezelle aufgrund des kolloidosmotischen Drucks, den die Liposomen ausüben, zunimmt. Diese Verdünnung, die erfahrungsgemäss ca. 25% beträgt, sollte in eine Ansatzberechnung mit einfließen.

### 1.3.4 Liposomencharakterisierung

#### 1.3.4.1 Photonenkorrelationspektroskopie

Die Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) ist ein Verfahren zur Bestimmung der Partikelgrösse bzw. der Partikelgrössenverteilung in kolloiddispersen Systemen. Erfasst wird dabei die zeitliche Abhängigkeit von Fluktuationen der Intensität von gestreutem Laserlicht (z. Bsp. He/Ne-Laser). Das in die Dispersion einfallende Licht wird an den Partikeln gestreut, die aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der freien Diffusion unterliegen. Der Diffusionskoeffizient  $D$  dieser Bewegung lässt sich in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$ , der Viskosität  $\eta$  des Dispergiermediums und des hydrodynamischen Radius  $r$  der dispergierten Partikel nach der Stokes-Einstein-Beziehung berechnen (vgl. Gleichung 1-1)

Kleine Partikel diffundieren demnach schneller als grössere, was darin resultiert, dass sie pro Zeiteinheit häufiger den Laserstrahl passieren und so mehr Streulichtsignale produzieren als grössere.

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_{hyd}}$$

Gleichung 1-1

$D$  = Diffusionskoeffizient [ $m^2 \cdot s^{-1}$ ]

$K$  = Boltzmann-Konstante [ $N \cdot m \cdot K^{-1}$ ]

$T$  = Temperatur [ $K$ ]

$\eta$  = Viskosität [ $N \cdot s \cdot m^{-2}$ ]

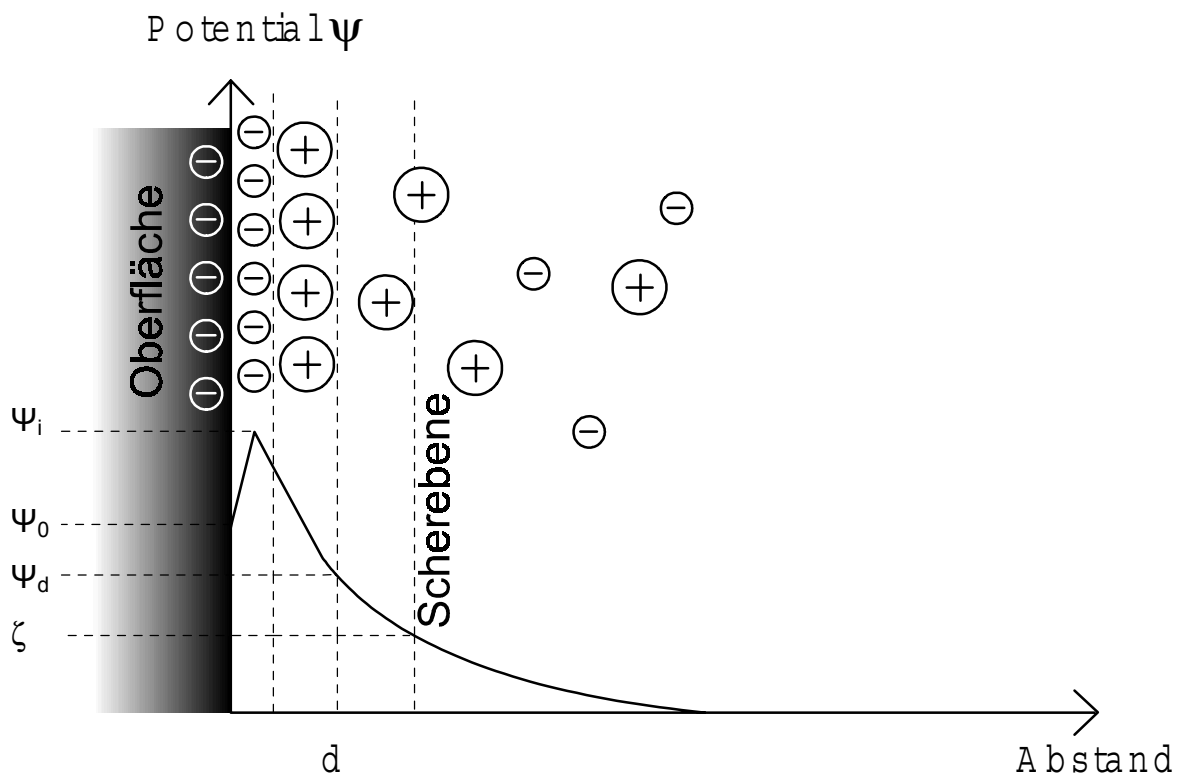
$r_{hyd}$  = hydrodynamischer Radius [ $m$ ]

In der Regel erfasst das Gerät ein hochkomplexes Streulichtmuster, welches aus der Überlagerung vieler Signale unterschiedlicher Frequenz und Intensität herrührt. Das liegt daran, dass die dispergierten Partikel ein mehr oder weniger breites Grössenspektrum abdecken. Mit Hilfe eines Korrelators kann das Streulichtmuster in eine Autokorrelationsfunktion überführt werden, woraus sich letztendlich eine Partikelgrössenverteilung (Z-Average) errechnen lässt. Aus den Daten lässt sich des weiteren ein Mass für die Breite der Verteilung ermitteln (Polydispersitätsindex).

**1.3.4.2  $\zeta$ -Potentialmessungen**

Teilchen, die in einem flüssigen Medium dispergiert sind, können an ihrer Oberfläche Moleküle und Ionen adsorbieren. Die Anlagerung von Ionen lässt sich über das Modell nach Stern darstellen (Cevc, 1990).

Es beschreibt eine elektrische Doppelschicht, bei der Elektrolyte aus dem umgebenden Medium direkt auf der Partikeloberfläche fix adsorbiert werden. Diese Schicht wird als innere Helmholtzschicht bezeichnet. Sie besteht aus dehydratisierten Ionen gleichen Vorzeichens. Dadurch erhöht sich das Oberflächenpotential  $\psi_0$  auf das Potential  $\psi_i$  der inneren Helmholtzschicht. Die äussere Helmholtzschicht besteht aus starr angeordneten hydratisierten Gegenionen, die das Potential auf den Wert  $\psi_d$  reduzieren. Innere und äussere Helmholtzschicht bilden die Sternschicht mit der Dicke  $d$ . Im Anschluss daran ist die Verteilung der Ladungsträger diffus. Der Wert des Potentials strebt gegen Null (elektrische Neutralzone).



**Abbildung 1-4 Schematische Darstellung von Ionenverteilung und elektrostatischem Potential an der Oberfläche dispergierter Teilchen (Modell nach Stern)**

Bei Bewegung der Teilchen (Migration, Gravitation) reissen sie einen Teil der diffusen Schicht mit; es kommt zur Ausbildung einer Scherebene. Die

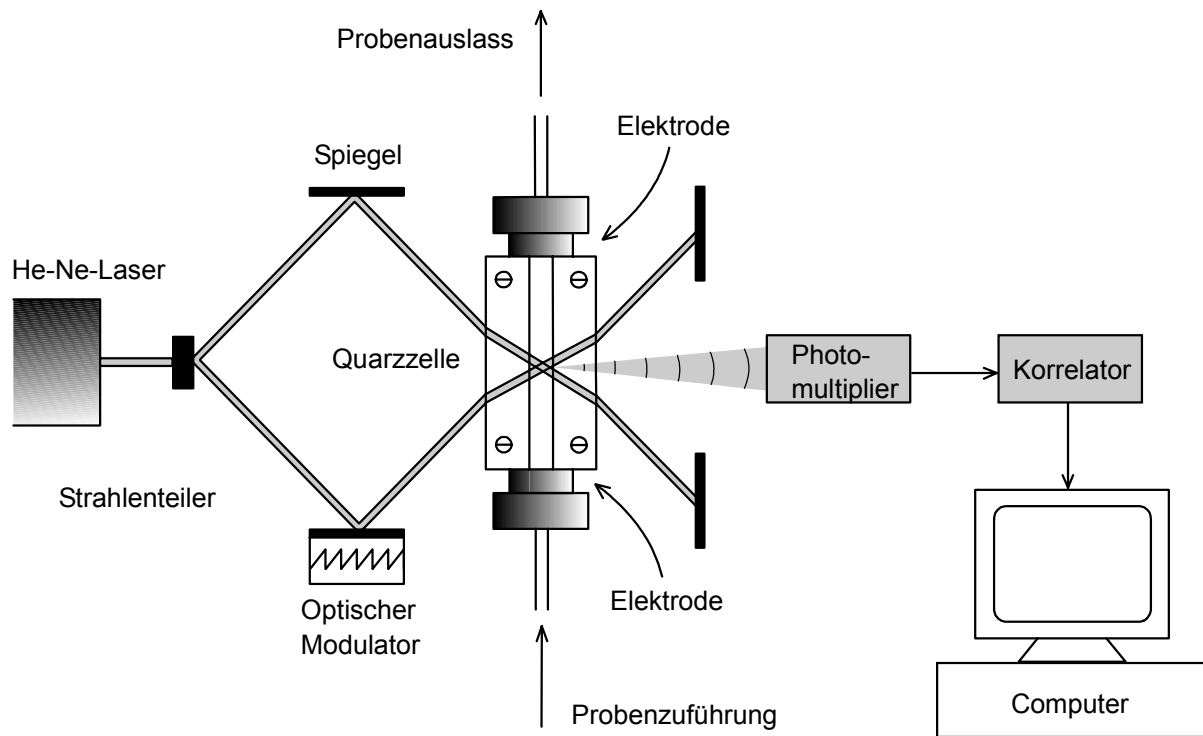
Potentialdifferenz  $\zeta$  zwischen dieser Scherebene und der elektrischen Neutralzone wird als  $\zeta$ -Potential bezeichnet.

Zur Messung des  $\zeta$ -Potentials wird ein Zetamaster S der Firma Malvern verwendet. Das  $\zeta$ -Potential lässt sich über die Wanderungsgeschwindigkeit geladener Partikel im elektrischen Feld ermitteln. Um die Geschwindigkeit der Teilchen in Abhängigkeit des applizierten elektrischen Feldes zu messen, wird die sogenannte Laser Doppler Anemometrie herangezogen. Licht, welches an einem sich bewegenden Teilchen gestreut wird, erfährt einen Frequenzshift, der abhängig von der Geschwindigkeit des Teilchens ist. Dieser Shift kann indirekt über interferometrische Techniken erfasst werden. Das Prinzip der Messung lässt sich folgendermassen beschreiben: zwei kohärente Laserstrahlen, die von derselben Lichtquelle abstammen und die gleiche Weglänge aufweisen, werden in der Messzelle zur Kreuzung gebracht (Abbildung 1-5). Das in dem Schnittvolumen (eigentliches Messvolumen) gestreute Licht wird von Detektoren (Photomultiplier) erfasst.

Das gemessene Intensitätssignal wird in einem Korrelator ausgewertet. Die dabei berechnete Korrelationsfunktion beschreibt die Intensität in Abhängigkeit von der Zeit. Durch Fouriertransformation kann sie in eine Anzahlverteilung als Funktion der Frequenz umgewandelt werden. Die so ermittelte Dopplerfrequenz lässt aber noch keine Rückschlüsse auf das Vorzeichen der Partikelladung zu. Um das Problem zu lösen, erfährt einer der beiden Laserstrahlen eine Frequenzverschiebung durch einen optischen Modulator. Dadurch entsteht im Schnittvolumen der beiden Strahlen ein Interferenzfeld, welches eine definierte Wanderungsgeschwindigkeit aufweist. Diese Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Bewegungsrichtung der Partikel im elektrischen Feld zu höheren oder tieferen Frequenzen hin verschoben.

Die zur  $\zeta$ -Potentialmessung zum Einsatz kommende Zelle weist einen rechteckigen Querschnitt auf. Um eine Beeinflussung der Messung durch den elektroosmotischen Fluss in der Zelle auszuschliessen, führen die beiden Laserstrahlen durch die stationäre Schicht, die in einem bestimmten Abstand zur Wand der Zelle vorliegt (14,7% der Messzellenhöhe). Um eine Ansammlung von Probe an den Elektroden zu vermeiden, wird das angelegte elektrische Feld mit einer bestimmten Frequenz (z. B. 0,5 Hz) umgepolt.





**Abbildung 1-5** Schematischer Aufbau der optischen Einheit des Zetamasters S zur Bestimmung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit

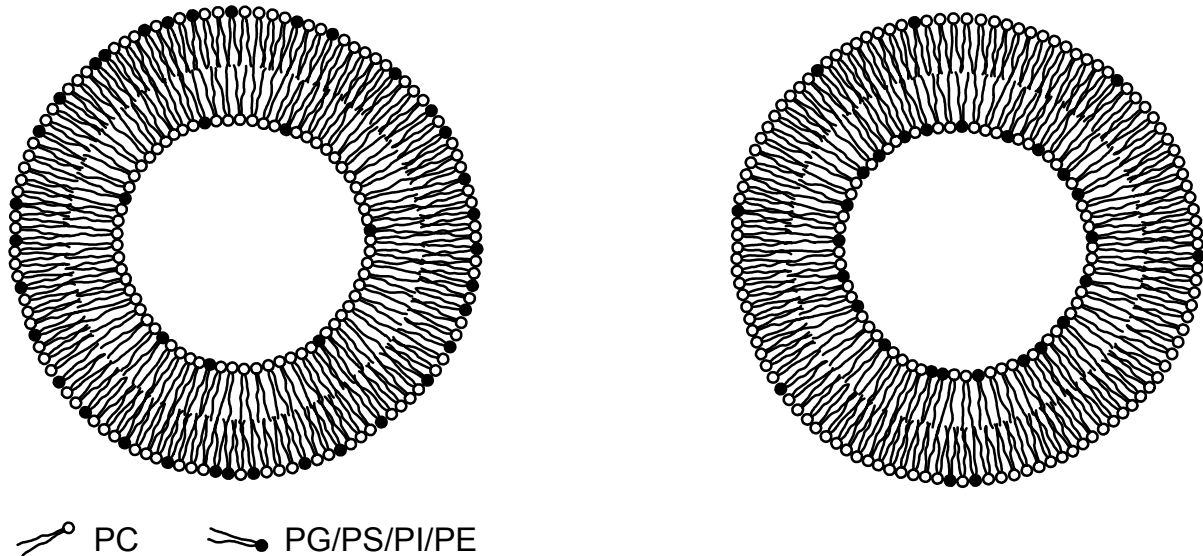
## 1.4 Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung

### 1.4.1 Definition

Von einer unsymmetrischen Lipidverteilung spricht man, wenn bei Liposomen, die aus mehr als einer Membrankomponente bestehen, das Verhältnis der Komponenten zueinander in den beiden Monolayern unterschiedlich ist. Bei der Mehrzahl biologischer Membranen unterschiedlichster Herkunft finden sich solche Ungleichgewichte (Op den Kamp, 1979; Zachowski, 1993; Boon & Smith, 2002; Voelker, 2002).

Liposomen, die als Modelle für Biomembranen dienen sollen, müssen diesem Umstand Rechnung tragen, da die Lipidzusammensetzung der einzelnen Monolayer direkten Einfluss auf diverse physikochemische Eigenschaften der Membranen (Permeabilität, Adsorptionsvermögen, Lipidaustausch, Flipp-Flopp, Oberflächenladung) hat (Moss & Bhattacharya, 1995; Negrete et al., 1996; Hill et al., 1999; Krylov et al., 2001; Traikia et al., 2002; Manno et al., 2002).

Das Basislipid der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Liposomen ist Lecithin. Die Unsymmetrie definiert sich in der Regel über die Verteilung der in Biomembranen seltener vertretenen Phospholipide wie PS, PG, PI oder PE (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6** Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung. Links: vermehrter Aufenthalt des entsprechenden Phospholipids (PG/PS/PI/PE) im äusseren Monolayer. Rechts: vermehrter Aufenthalt im inneren Monolayer

### **1.4.2 Herstellung unsymmetrischer Liposomen**

Setzt man zur Herstellung von Liposomen mehr als eine Lipidspezies ein, so verteilen sich die verschiedenen Membranbestandteile bei den üblichen Herstellungsweisen (vgl. 1.3.3) gleichmässig in den einzelnen Monolayern des Vesikels. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Methoden zur Etablierung einer unsymmetrischen Lipidverteilung findet sich in den Arbeiten von Op den Kamp und Etemadi (Op den Kamp, 1979; Etemadi, 1980). Einige der Methoden und weitere dort nicht beschriebene werden im Folgenden genauer diskutiert.

#### **1.4.2.1 Inkorporierung von Membrankomponenten in den äusseren Monolayer**

Eine einfache Methode, ein gewünschtes Lipid in den äusseren Monolayer eines Vesikels einzubauen, ist, eine Liposomendispersion mit einer organischen Lösung des Lipids zu versetzen (McIntyre & Sleight, 1991). Dabei kommt es zur spontanen Einlagerung des Lipids in den äusseren Monolayer der Liposomen. Es sollte darauf geachtet werden, dass der Anteil an organischem Lösungsmittel in der Präparation gering gehalten wird. Ausserdem wird berichtet, dass der Einbau von Phospholipide

in den äusseren Monolayer zu Formveränderungen bei den Liposomen führen kann (Farge & Devaux, 1992).

Nach der Einlagerung kommt es nach einiger Zeit wegen des einsetzenden Flipp-Flopp (vgl. 1.4.3.2) zu einer partiellen Umverteilung des Lipids in den inneren Monolayer und somit zu einem Verlust der Unsymmetrie.

#### **1.4.2.2 Lipidaustausch zwischen verschiedenen Liposomenpopulationen**

Beim Lipidaustausch kommen in der Regel zwei Liposomenpopulationen, sogenannte Donor- und Akzeptorliposomen, zum Einsatz. Die Donorliposomen enthalten neben EPC die Membrankomponenten, die an die Akzeptorliposomen, die meist aus reinem EPC bestehen, abgegeben werden sollen. Geht man davon aus, dass nach Herstellung der Liposomen mittels Extrusion oder DD das auszutauschende Lipid gleichmässig in beiden Monolayern der Donorliposomen vorliegt, werden beide Liposomenarten nach gemeinsamer Inkubation und dabei stattfindendem Lipidaustausch eine Unsymmetrie aufweisen. Dieser Lipidaustausch, der spontan abläuft, kann durch sogenannte Lipidtransferproteine beschleunigt werden (vgl. 1.4.2.2.2).

Ein wichtiger Schritt nach dem Lipidaustausch ist die Trennung der beiden Populationen. Unterscheiden sich Donor- und Akzeptorliposomen ausreichend in ihrer Grösse, können sie über Grössenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) oder Zentrifugation voneinander getrennt werden. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Liposomen über die FFE zu trennen. Dafür darf allerdings der Lipidaustausch nicht erschöpfend durchgeführt werden, da sonst die beiden Liposomenpopulationen die gleiche Ladungsdichte auf der Oberfläche aufweisen und somit elektrophoretisch nicht mehr zu trennen sind.

Entscheidend für alle Trennmethode ist, dass sie wenig Zeit in Anspruch nehmen, damit durch Flipp-Flopp-Umverteilung kein Verlust der Asymmetrie stattfindet.

##### **1.4.2.2.1 Spontaner Austausch**

Werden Donor- und Akzeptorliposomen zusammen inkubiert, findet aufgrund von Kollisionen und Monomerdiffusion Lipidaustausch statt. Die Geschwindigkeit ist dabei sowohl von der Konzentration der Vesikel (Jones & Thompson, 1989) als auch von der Temperatur abhängig (McLean & Phillips, 1984). Die Halbwertszeit dieses Austauschprozesses liegt in der Regel im Bereich von Stunden bis Tagen. Um

unsymmetrische Liposomen zu generieren, ist es daher wichtig, dass der Lipidaustausch wesentlich schneller vonstatten geht als der Flipp-Flopp.

#### **1.4.2.2.2 Proteinvermittelter Austausch**

Der Lipidaustausch zwischen verschiedenen Vesikelpopulationen lässt sich durch Zusatz von Lipidtransferproteinen (LTP) um ein Vielfaches beschleunigen. LTPs sind Proteine, die den Transfer und Austausch von Lipiden erleichtern.

Lipide müssen häufig von speziellen Syntheseorten an andere Stellen transportiert werden, wo sie ihre Aktivität entfalten, und von dort weiter zum Ort ihrer Metabolisierung. Den Transport der generell schlecht wasserlöslichen Lipide übernehmen Transferproteine, die sowohl extra- wie auch intrazellulär anzutreffen sind. Während die seltener anzutreffenden extrazellulären LTPs vor allem Lipide binden, die nicht in der Lage sind, Membranen zu bilden (z. Bsp. Triglyceride, Cholesterylester), bevorzugen die ubiquitär anzutreffenden intrazellulären LTPs membranbildende Lipide (Phospholipide, Cholesterol, Ganglioside) (Rueckert & Schmidt, 1990).

Die LTPs lassen sich auch nach ihren Liganden unterteilen. So findet sich in der Leber der Ratte sowohl ein Transferprotein, welches ausschliesslich PC bindet (McMurray & Dawson, 1969; Lutton & Zilversmit, 1976), als auch ein nichtspezifisches LTP (ns-LTP), welches neben Phospholipiden Cholesterol, Glycosphingolipide und Ganglioside transportiert (Bloj & Zilversmit, 1977; Crain & Zilversmit, 1980a; Poorthuis et al., 1981). Letzteres, welches in der Literatur auch unter dem Synonym Sterol Carrier Protein 2 (SCP2) zu finden ist, konnte von S. Wieland in einer früheren Arbeit (Wieland-Berghausen, 1999) in *E. coli* kloniert werden.

Es handelt sich um ein 13 kDa grosses globuläres Protein, welches aus 123 Aminosäuren aufgebaut ist. Ns-LTP kann aus einer Vielzahl von Geweben isoliert werden, und da seine Primärstruktur in verschiedenen Spezies hoch konservativ ist, kann angenommen werden, dass es eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus einnimmt (Stolowich et al., 1997). Es beschleunigt sowohl den Transfer von natürlichen als auch den von fluoreszenzgelabelten Phospholipiden. Für NBD-C<sub>6</sub> seitenkettengelabelte Phospholipide wurde folgende Reihenfolge der Transferrate gefunden: PA > PC > PG > PE (Crain & Zilversmit, 1980b; Nichols & Pagano, 1982).

Über den Mechanismus des Transfers herrscht noch weitgehend Unklarheit. Huang beschreibt eine Proteindomäne, über welche das ns-LTP unter Konformationsänderung an Liposomen bindet (Huang et al., 1999b). Es handelt sich dabei um das N-terminale Peptid <sup>1-32</sup>ns-LTP, welches in wässriger Umgebung vorwiegend als random coil und in Gegenwart von Membranen als  $\alpha$ -Helix vorliegt. Die Stärke der Interaktion nimmt mit steigendem Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden (PG, PS) und Cholesterol ab und mit abnehmender Grösse der Vesikel zu (Schroeder et al., 1990; Huang et al., 1999a). Diese Interaktion ist entscheidend für die Bindung von Cholesterol, mit welchem ns-LTP einen 1:1 Komplex eingeht. Ob der Transfer von Phospholipiden von der Interaktion des N-terminalen Endes vom ns-LTP mit Liposomen abhängt, ist noch nicht geklärt. Auch ist noch unklar, auf welche Weise ns-LTP den Lipidtransfer beschleunigt. NMR- und röntgenkristallographische Untersuchungen zeigen, dass das Protein einen hydrophoben Kanal aufweist, in welchem die Fettsäurereste eines Phospholipids aufgenommen werden können (Garcia et al., 2000). Es ist allerdings noch nicht gelungen, einen ns-LTP-Phospholipid-Komplex zu isolieren. Falls ein solcher Komplex in Gegenwart von Membranstrukturen zustande kommt, scheint er relativ schwach und von kurzer Dauer zu sein. Eine Bindung von NBD-kopfgruppengelabeltem PC konnte indirekt nachgewiesen werden (Nichols, 1987). Dabei wurde zudem festgestellt, dass NBD-kopfgruppengelabeltes PE mit zunehmender Acyl-Kettenlänge in Gegenwart von Liposomen weniger stark an ns-LTP bindet. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Bindung der Phospholipide an das Protein mit der Bindung an die Membranen konkurriert.

Dennoch ist es möglich, dass ns-LTP Phospholipide aktiv von einer Membran zur nächsten transportiert. Denkbar wäre aber auch, dass es durch Interaktion mit dem Liposom die Aktivierungsenergie des Überganges der Phospholipide aus der Membran in das wässrige Medium herabsetzt (Nichols & Pagano, 1983; Nichols, 1988). Dadurch können mehr Phospholipide pro Zeiteinheit durch die wässrige Phase zu einer Akzeptormembran diffundieren.

Daten aus kinetischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Transfer von NBD-kopfgruppengelabeltem PC zwischen Vesikeln zum Grossteil über den ns-LTP-Phospholipid-Komplex abläuft. Dabei interagiert das Protein mit der Membran, bindet Phospholipid (Stöchiometrie unbekannt) und transportiert es zu einer anderen Membran. Der Vergleich der Messdaten mit theoretischen Modellen weist allerdings

darauf hin, dass ein geringer Teil der Phospholipide auch durch Monomerdiffusion übertragen wird (Nichols, 1988).

#### 1.4.2.2.3 Verfolgung des Lipidaustausches

##### 1.4.2.2.3.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Das Prinzip des FRET ist, dass zwischen zwei geeigneten Chromophoren in Abhängigkeit ihrer Distanz und Orientierung ein Energietransfer stattfindet. Voraussetzung dafür ist, dass eine spektrale Überlappung vorliegt, d.h. dass sich das Emissionsspektrum des Donorchromophores mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorchromophores überlappt. Der Abstand, bei dem Quenching der Fluoreszenz des Donorchromophores durch das Akzeptorchromophor stattfindet, liegt üblicherweise zwischen 1 und 10 nm. Die Effizienz des Energietransfers in Abhängigkeit von der Distanz der zwei fluoreszenzaktiven Gruppen beschreibt folgende Gleichung (Förster, 1959; Stryer, 1978):

$$E = \frac{r^{-6}}{r^{-6} + R_0^{-6}}$$

Gleichung 1-2

*E* = Energietransfer-Effizienz

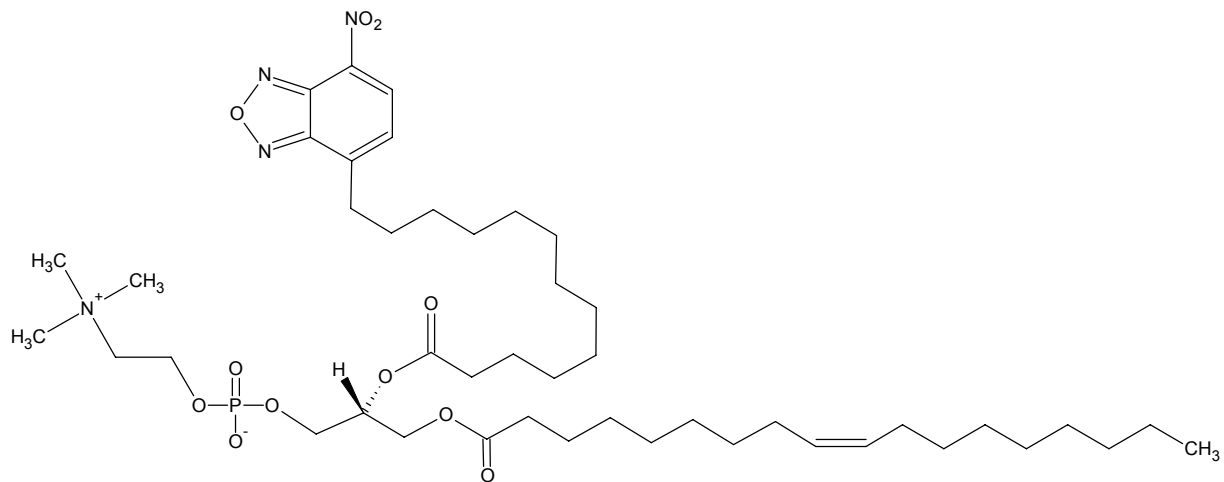
*R* = Abstand zwischen den Fluorophoren [nm]

*r*<sub>0</sub> = Förster-Radius [nm]

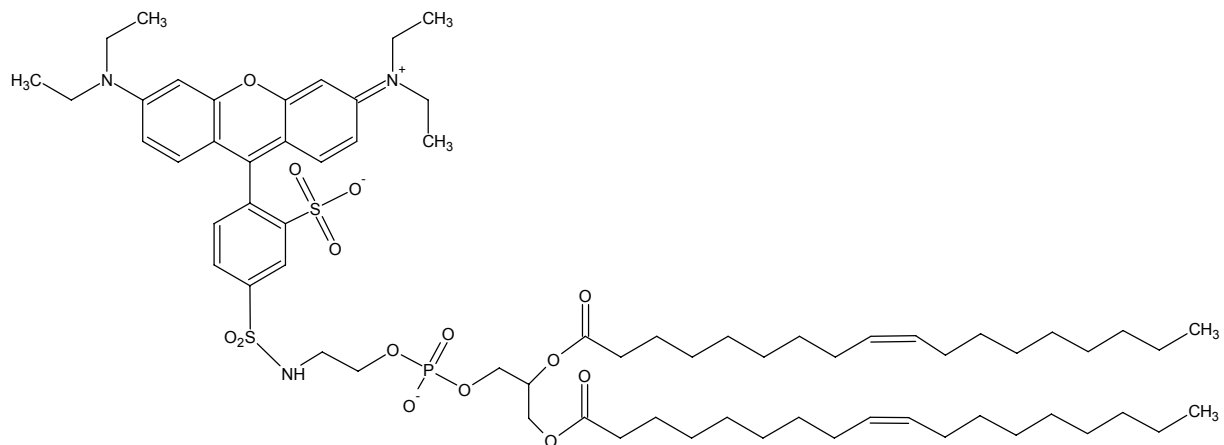
Als Förster-Radius wird derjenige Abstand zwischen den Fluorophoren genannt, bei dem die Effizienz des Energietransfers genau 50 % beträgt. Das bedeutet, dass 50 % der angeregten Donorchromophore durch Energietransfer deaktiviert werden. Wie in der Gleichung zu sehen, zeigt die Energietransfer-Effizienz eine starke Abhängigkeit vom Abstand der zwei Fluorophore in der 6. Potenz.

Lipidaustausch lässt sich verfolgen, indem Donorliposomen, die beide Fluorophore in Form von gelabelten Lipiden tragen, mit Akzeptorliposomen, die aus reinem EPC bestehen, inkubiert werden. Findet nun Lipidaustausch statt, wird eine räumliche Distanz zwischen den beiden Fluorophoren aufgebaut, wodurch der Energietransfer

abnimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten gelabelten Phospholipide sind C<sub>12</sub>-NBD-PC (Abbildung 1-7) und N-Lissamin<sup>®</sup>-Rhodamin-B-PE (Abbildung 1-8).



**Abbildung 1-7 C<sub>12</sub>-NBD-PC**



**Abbildung 1-8 N-Lissamine<sup>®</sup>-Rhodamin-B-DOPE (N-Rh-PE)**

Das PC-Derivat trägt das Donorchromophor und das PE-Derivat das Akzeptorchromophor. Entscheidend beim Austausch ist, dass nur eines der beiden Phospholipidderivate daran beteiligt ist. In diesem Fall ist das C<sub>12</sub>-NBD-PC das austauschbare Lipid, da es aufgrund seines voluminösen Seitenkettenlabels nur schwach in der Membran verankert ist. H-NMR-Untersuchungen deuten darauf hin, dass die gelabelte Seitenkette in der Membran einen Loop ausbildet und der NBD-Rest im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide liegt (Chattopadhyay & London, 1987; Huster et al., 2001). Das kopfgruppengelabelte N-Rh-PE dagegen ist mit beiden Fettsäureresten im Bilayer verankert und verbleibt in der Membran der Donorvesikel (Pagano et al., 1981; Struck et al., 1981).

Während den Messungen wird die Fluoreszenzintensitätszunahme des C<sub>12</sub>-NBD-PC erfasst. Diese wird ausschliesslich durch den ausgetauschten Anteil C<sub>12</sub>-NBD-PC hervorgerufen, da der verbleibende Anteil im Donorvesikel weiterhin vom N-Rh-PE gequenchet wird.

Mittels FRET-Messungen ist es möglich, Phospholipidtransfer in Echtzeit zu verfolgen und zu quantifizieren. Nachteil der Methode ist, dass die ermittelten Daten nur bedingt auf natürliche Phospholipide übertragen werden können, da sich die physikochemischen Eigenschaften der gelabelten Lipide von denen der natürlichen unterscheiden. Deshalb wurden die Lipidderivate in der vorliegenden Arbeit lediglich eingesetzt, um die Aktivität des rekombinant hergestellten ns-LTP zu überprüfen und um die Transferleistung des Proteins abzuschätzen.

#### **1.4.2.2.3.2 Free Flow Elektrophorese**

Ein Austausch negativ geladener Phospholipide zwischen zwei Liposomenpopulationen lässt sich mittels der FFE beobachten. Dazu werden negativ geladene Donorliposomen und neutrale Akzeptorliposomen zusammen inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben über FFE aufgetrennt. Mit fortlaufendem Austausch an negativ geladenem Phospholipid gleicht sich die Ladungsdichte an der Oberfläche der beiden Vesikelpopulationen immer mehr an. Lassen sich die unterschiedlich geladenen Liposomenarten anfangs noch gut trennen, nähern sie sich mit längerer Austauschzeit immer mehr an, bis sie letztendlich nicht mehr zu trennen sind und über FFE nur noch eine Population aufgefangen werden kann. Trägt man die Zeiten der Probennahme und Auftrennung gegen die Anzahl der Fraktionen, die zwischen den beiden Hauptfraktionen liegen, auf, erhält man einen zeitlichen Verlauf des Lipid-austausches.

#### **1.4.2.3 Extraktion mit BSA**

Die Phospholipid-Extraktion mit BSA stellt eine Methode dar, mit welcher sich Liposomen herstellen lassen, die ein gewünschtes Lipid hauptsächlich im inneren Monolayer aufweisen. Zunächst werden auf übliche Weise Liposomen mit einer symmetrischen Lipidverteilung hergestellt. Durch Inkubation mit BSA lässt sich das entsprechende Phospholipid dann aus dem äusseren Monolayer entfernen (Dao et al., 1991; Wu et al., 1996). Werden dabei grössere Mengen Phospholipid extrahiert, kann es zu Membranstörungen kommen.



#### **1.4.2.4 Enzymatische Modifizierung**

Mit Hilfe von Enzymen, die aufgrund ihrer Grösse einen Bilayer nicht durchdringen können, lassen sich Phospholipide exklusiv im äusseren Monolayer modifizieren, wodurch eine Unsymmetrie generiert wird. So kann mit der Phosphatidylserin-Decarboxylase (PSD) PS zu PE decarboxyliert werden (Denkins & Schroit, 1986). PE wiederum lässt sich mit der Phosphatidylethanolaminmethyltransferase (PEMT) zu PC methylieren (Audubert & Vance, 1984; Cui et al., 1993). Die PSD wurde in dieser Arbeit als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* kloniert und stand in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung.

#### **1.4.2.5 Weitere Methoden**

##### **1.4.2.5.1 Chemische Modifizierung**

Eine chemische Modifizierung lässt sich vor allem bei jenen Phospholipiden erreichen, die eine reaktive Aminogruppe besitzen (PS, PE). Andere Phospholipide müssen in der Regel mit Chemikalien behandelt werden, die zu Membranstörungen führen oder den Bilayer leicht durchdringen (Amar et al., 1974). Aminogruppen reagieren unter vergleichsweise milden Bedingungen, bei denen Membranen nur gering beeinflusst werden. Da aber auch die aminoreaktiven Substanzen Bilayer durchdringen können, müssen die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass die Permeation minimiert werden kann (Bretscher, 1972b). Daneben ist zu bedenken, dass es durch die Derivatisierung generell zu Membranstörungen kommen kann, da in die Kopfgruppen der Phospholipide neue chemische Strukturen eingeführt werden. Eine häufig eingesetzte Substanz ist Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS), die mit Aminogruppen unter Bildung farbiger Produkte reagiert (Gordesky et al., 1973; Hope & Cullis, 1987). Eine Alternative zur TNBS ist Fluorescamin (Floram<sup>®</sup>), welches mit primären Aminogruppen zu fluoreszierenden Produkten reagiert (vgl. 1.4.3).

##### **1.4.2.5.2 Physikochemische Methoden**

Membranpotentiale oder pH-Gradienten zwischen eingeschlossenem Volumen und umgebenden Medium können Einfluss auf die Lipidverteilung nehmen. So ist die Verteilung von negativ geladenen Lipiden wie PG, PA oder PI vom Membranpotential abhängig. Weisen Liposomen ein stark negatives Membranpotential auf, befindet sich der Grossteil dieser Lipide im äusseren Monolayer. Bei einem stark positiven

Membranpotential verhält es sich umgekehrt. Liegt kein Membranpotential vor, verteilen sich die Lipide gleichmässig zwischen den Monolayern (Haest et al., 1997). Redelmeier konnte zeigen, dass die Verteilung von PG durch Einstellen von pH-Gradienten beeinflusst werden kann (Redelmeier et al., 1990). Liegt beispielsweise im Inneren eines Vesikels ein basischer pH-Wert vor und aussen ein leicht saurer, verschiebt sich die PG-Verteilung zugunsten des inneren Monolayers.

### **1.4.3 Charakterisierung von unsymmetrischen Liposomen**

#### **1.4.3.1 Lipidverteilung**

Die Untersuchung der Verteilung bestimmter Lipide in unsymmetrischen Liposomen wird normalerweise an unilamellaren Liposomen durchgeführt, um den störenden Einfluss weiterer Bilayer auszuschliessen. Die zeitliche Abhängigkeit der Verteilung von Phospholipiden lässt Rückschlüsse über die Geschwindigkeit der transversalen Diffusion der Lipide zu (Flipp-Flopp, vgl. 1.4.3.2). Die zur Verfügung stehenden Methoden werden im Folgenden besprochen.

##### **1.4.3.1.1 Phospholipid-Analoga**

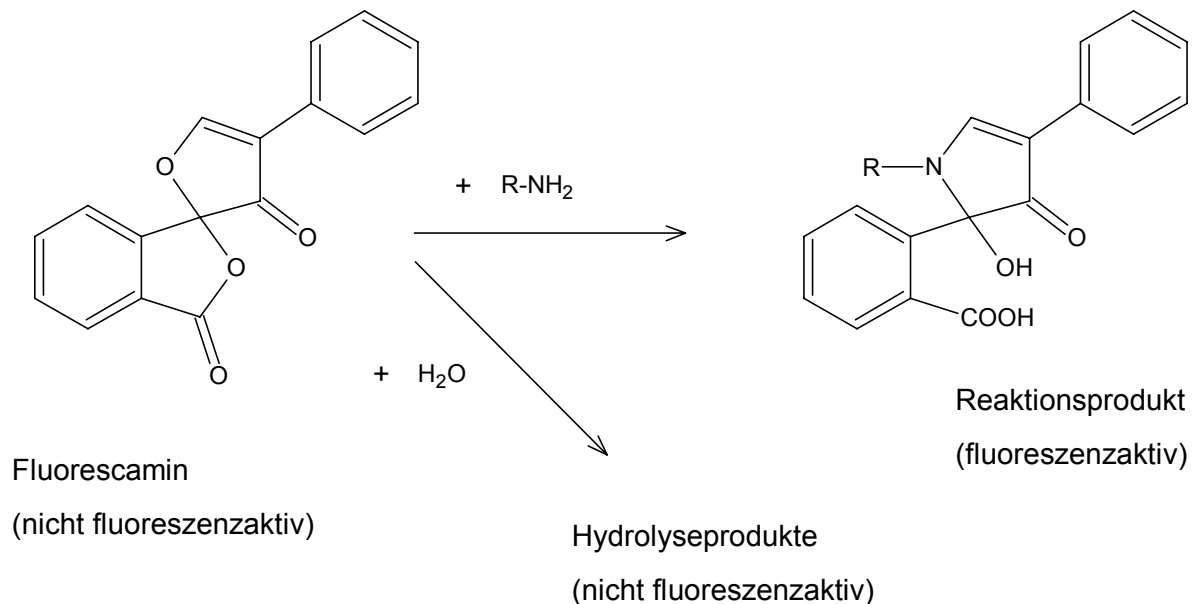
Bei einer Vielzahl von Untersuchungen der Lipidverteilung werden Phospholipid-Analoga eingesetzt. Oft handelt es sich dabei um Phospholipide, die entweder an ihrer Kopfgruppe oder in einer der Fettsäure-Seitenketten eine fluoreszenzaktive Gruppe tragen. Die Verteilung unterschiedlich gelabelter Phospholipide zwischen den Monolayern wurde von Wolf untersucht (Wolf et al., 1992).

Am häufigsten verwendet werden NBD-gelabelte Lipide (McIntyre et al., 1991; Moss et al., 1995). Die Verteilung der gelabelten Lipide kann bestimmt werden, indem die NBD-Gruppen im äusseren Monolayer mit Natriumdithionit reduziert werden, wodurch sie ihre Fluoreszenzaktivität verlieren. Somit kann durch die Differenz der Fluoreszenzintensität auf die Verteilung der NBD-gelabelten Lipide geschlossen werden. Die Permeation von Natriumdithionit durch die Membran ist bei den kurzen Reaktionszeiten (ca. 1 min) vernachlässigbar.

Weitere Phospholipid-Analoga, die zur Bestimmung der Lipidverteilung herangezogen werden können, sind spin-gelabelte Phospholipide (Seigneuret & Devaux, 1984; Buton et al., 1996; Gallet et al., 1999).

### 1.4.3.1.2 Derivatisierung natürlicher Phospholipide

Die beiden Reagenzien Fluorescamin und TNBS, die schon unter 1.4.2.5.1 beschrieben wurden, können zur Bestimmung der Lipidverteilung herangezogen werden. Fluorescamin wird in dieser Arbeit zur Bestimmung der Verteilung von Aminophospholipiden eingesetzt. Dabei werden in einem ersten Schritt Liposomen mit dem Reagens versetzt, wodurch nur Aminophospholipide im äusseren Monolayer reagieren können. Eine zweite Messung mit den gleichen Liposomen, die zuvor mit Detergens zerstört werden, erfasst alle Aminophospholipide (100 %-Wert). Die Reaktion ist in Abbildung 1-9 dargestellt. Fluorescamin wurde u.a. zur Bestimmung der Verteilung von Aminophospholipiden in Erythrozyten (Franck et al., 1986) und Liposomen (Koynova & Tenchov, 1983; Roy et al., 1997; Wieland et al., 1999) eingesetzt.



**Abbildung 1-9** Reaktionsmechanismus der Reaktion von Fluorescamin mit primären Aminen. Überschüssiges Fluorescamin wird in wässriger Umgebung zu nicht fluoreszierenden Produkten hydrolysiert

Entscheidend ist, dass Fluorescamin in niedrigen Konzentrationen eingesetzt wird, bei denen eine Membranstörung und dadurch induzierte schnelle Permeation durch den Bilayer ausgeschlossen werden kann.

### 1.4.3.1.3 Verwendung von Phospholipasen

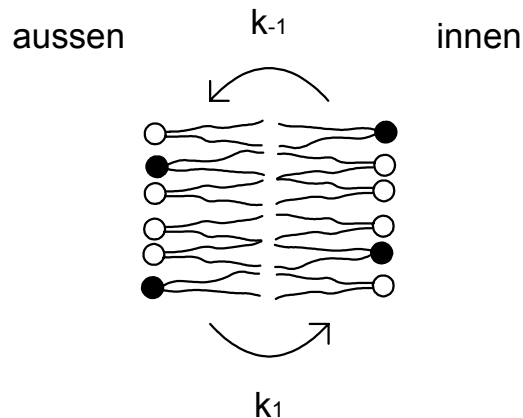
Die Bestimmung der Lipidverteilung in unsymmetrischen Liposomen kann mittels Hydrolyse durch Phospholipasen erfolgen. Bei dieser Methode werden Phospholipide im äusseren Monolayer in ihre entsprechenden Lysoverbindungen überführt. Anschliessend erfolgt eine Quantifizierung von Phospholipiden und Lysophospholipiden (Verkleij et al., 1973; Kahlenberg et al., 1974). Bei dieser Methode ist jedoch zu beachten, dass die verschiedenen erhältlichen Phospholipasen ein begrenztes Substratspektrum aufweisen (Etemadi, 1980). Zudem ist bekannt, dass die entstehenden Lysoverbindungen konzentrationsabhängig zu Membranstörungen führen können, was die Bestimmung der Lipidverteilung stören kann. Ausserdem betragen die Reaktionszeiten bis zu 30 min, was bei Lipiden, die sich schnell zwischen den Monolayern umverteilen, zu lange sein kann.

### 1.4.3.2 Flipp-Flopp

Beim Flipp-Flopp handelt es sich um eine transversale Diffusion von Phospholipiden, also um eine Umlagerung zwischen den beiden Monolayern einer Membran. Die Phospholipidbewegung vom äusseren zum inneren Monolayer wird als Flipp bezeichnet. Die gegenläufige Bewegung bezeichnet man als Flopp. Es handelt sich dabei um einen Prozess, der in der Regel nur sehr langsam abläuft. Die Geschwindigkeit der Umverteilung hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab:

- Temperatur
- Zustand der Membran (flüssigkristallin - gelartig) (Wimley & Thompson, 1991)
- Kopfgruppe und Fettsäurereste der Phospholipide (Kornberg & McConnell, 1971; Homan & Pownall, 1988)
- Stoffe, die in die Membran eingelagert sind (z. Bsp. Detergenzien, Proteine) (Connor et al., 1992; Pantaler et al., 2000; Daleke & Lyles, 2000)

Der Flipp-Flopp von Phospholipiden ist ein spontaner Prozess, der kontinuierlich in einer Membran abläuft. Bei LUV, die eine Unsymmetrie aufweisen, kommt es aufgrund dieses Vorganges nach ausreichend langer Lagerung zu einer symmetrischen Verteilung der entsprechenden Phospholipide. Sind die Halbwertszeiten des Flipp-Flopp verschiedener Lipide bekannt, lässt sich die Stabilität der unsymmetrischen Verteilung beurteilen.



**Abbildung 1-10 Kinetisches Modell zur Beschreibung der Bewegung von Phospholipiden zwischen den beiden Monolayern einer liposomalen Membran.  $k_1$  ist die Geschwindigkeitskonstante der Lipidverlagerung von ausßen nach innen und  $k_{-1}$  diejenige für die Bewegung von innen nach ausßen.**

Bei der Bewegung von Phospholipiden zwischen den Monolayern von LUV handelt es sich um eine monomolekulare Reaktion, die sich mittels einer Funktion erster Ordnung beschreiben lässt (Kornberg et al., 1971). Abbildung 1-10 beschreibt die kinetischen Vorgänge in einer liposomalen Membran.

Wenn jede Flipp und jede Flopp-Bewegung eines Phospholipids ein unabhängiger Vorgang ist, lässt sich die Veränderung des Lipidgehaltes im inneren Monolayer folgendermassen beschreiben:

$$\frac{dPL_i}{dt} = k_1 \cdot PL_a - k_{-1} \cdot PL_i$$

**Gleichung 1-3**

$PL_a$  = Phospholipidanteil im äusseren Monolayer [%]

$PL_i$  = Phospholipidanteil im inneren Monolayer [%]

$k_1$  = Geschwindigkeitskonstante des Flipp [ $h^{-1}$ ]

$k_{-1}$  = Geschwindigkeitskonstante des Flopp [ $h^{-1}$ ]

Bei konstanter Grösse und Form von Vesikeln einer Population sind  $k_1$  und  $k_{-1}$  konstant. Danach gilt für die Gleichung 1-3:

$$k_1 \cdot PL_a^\infty = k_{-1} \cdot PL_i^\infty$$

Gleichung 1-4

$PL_a^\infty$  = Phospholipidanteil im äusseren Monolayer im Gleichgewicht [% ]

$PL_i^\infty$  = Phospholipidanteil im inneren Monolayer im Gleichgewicht [% ]

Da  $PL_i + PL_a = PL_i^\infty + PL_a^\infty$  lassen sich Gleichung 1-3 und Gleichung 1-4 umformen in:

$$\frac{d(PL_i - PL_i^\infty)}{dt} = -k \cdot (PL_i - PL_i^\infty)$$

Gleichung 1-5

wobei

$$k = k_1 + k_{-1}$$

Gleichung 1-5 lässt sich integrieren in:

$$\frac{PL_i - PL_i^\infty}{PL_i^0 - PL_i^\infty} = e^{-k \cdot t}$$

Gleichung 1-6

$PL_i^0$  beschreibt den Phospholipidanteil im äusseren Monolayer zum Zeitpunkt  $t = 0$ .

Zur Untersuchung von Flipp-Flopp Phänomenen stehen prinzipiell die gleichen Methoden zur Verfügung wie unter 1.4.3.1 beschrieben. Bei der Verwendung von Phospholipid-Analoga ist zu bedenken, dass durch Einführung einer paramagnetischen Gruppe bzw. eines Fluorophors die physikochemischen Eigenschaften der Phospholipide verändert werden. Dies nimmt Einfluss auf die Geschwindigkeit der Lipidbewegung zwischen den Monolayern. Die chemische Derivatisierung gelingt in der Regel nur bei Phospholipiden, die eine Aminofunktion in der Kopfgruppe tragen.

Für Lipide wie PG, PA und PI stehen andere Methoden zur Verfügung, die auf der negativen Ladung, die diese Lipide tragen, basieren. So können Änderungen in der Ladungsdichte, die durch Verlagerung dieser Lipide durch Flipp-Flopp zustande kommen, mittels  $\zeta$ -Potentialmessungen erfasst werden (Crommelin, 1984). Auch mittels fluoreszierender Sonden kann die Lipidverteilung dargestellt werden. Dabei wird häufig 2-(*p*-Toluidinyl)naphthalin-6-sulfonsäure (TNS) eingesetzt (Abbildung 1-11). TNS lagert sich in Abhängigkeit von der Menge negativ geladener Lipide in den Bereich der hydrophilen Kopfgruppen des äusseren Monolayers an und wird dadurch fluoreszenzaktiv, während in Wasser gelöste TNS praktisch keine Fluoreszenz aufweist (Kachel et al., 1998). Da TNS nur in sehr geringem Masse membrangängig ist, wird nur der auf der Aussenseite befindliche Anteil an negativ geladenen Phospholipiden erfasst (Eisenberg et al., 1979; Cevc, 1990; Eastman et al., 1991; Eastman et al., 1992).

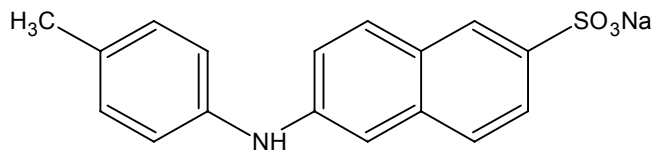


Abbildung 1-11 2-(*p*-Toluidinyl)naphthalin-6-sulfonsäure (TNS)

## 1.5 Klonierung und Expression von Genen

Mit Hilfe der DNA-Rekombinationstechnik lassen sich im Labor neue Kombinationen artverschiedener Gene herstellen. Diese können kloniert, d. h. in hoher Zahl vervielfältigt werden, indem man sie in passende Zellen einbringt, wo sie durch den DNA-Syntheseapparat des Wirtes repliziert werden. Ziel ist es häufig, dass die eingeführten Gene in der neuen Umgebung einer Transkription und Translation unterzogen werden, wodurch ein gewünschtes Protein entsteht.

Eine entscheidende Bedeutung bezüglich Ausbeute und Funktionalität des Proteins kommt dem Expressionssystem zu. Seit Mitte der achtziger Jahre wurde das Wissen über die Genexpression ständig erweitert. Wichtig war dabei vor allem die Synthese einer grossen Anzahl von Vektoren, die in unterschiedlichen Expressionssystemen Verwendung finden können. Die Entscheidung, auf welches Expressionssystem zurückgegriffen wird, erfordert die Abwägung verschiedener Rahmenbedingungen wie

- erwünschte Ausbeute an Protein
- Verwendungszweck des Proteins
- Zeitaufwand bei Klonierung und Expression
- posttranslationale Modifikationen
- Kosten.

Es sind inzwischen eine Vielzahl von Klonierungssystemen auf dem Markt, die z. T. auf unterschiedlichen Methoden basieren. Ausführliche Informationen dazu sind den Katalogen der Hersteller zu entnehmen.

Auch wenn inzwischen Standardprozeduren zur Kultivierung von gängigen Expressionssystemen publiziert sind, ist es in der Regel erforderlich, für ein neues Genprodukt eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen vorzunehmen.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Proteine wurden rekombinant hergestellt. Das Gen, welches die Informationen für das gewünschte Protein enthält, wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt, enzymatisch modifiziert und in eine geeignete Träger-DNA (Vektor) eingebaut. Dieses Konstrukt wurde dann in einen *E. coli* Stamm überführt, der in der Lage ist, das Genprodukt zu synthetisieren. Die Isolierung des Proteins erfolgte über affinitätschromatographische Verfahren.

Die wichtigsten Schritte bei der Klonierung und Expression von Genen werden im Folgenden genauer diskutiert.

### **1.5.1 Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls**

#### **1.5.1.1 Einzufügendes Gen**

Der erste Schritt zur Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls stellt in der Regel die Vervielfältigung und Isolierung des gesuchten Genes dar. Bei prokaryotischen Quellen kann dabei direkt die Gesamt-DNA des Organismus isoliert werden. Bei eukaryotischen Zellen wird zuerst die Gesamt-RNA isoliert, die dann mittels Reverser Transkriptase in die entsprechende Coding-DNA (cDNA) umgeschrieben werden muss. Die verwendeten Primer sind normalerweise so zusammengesetzt, dass sie spezifische Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen an Anfang und Ende des vervielfältigten Genes einführen. Dies ermöglicht bei der Ligation den korrekten Einbau in den ausgewählten Vektor.



Nach erfolgter PCR wird das DNA-Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschliessend wird es aus dem Gel isoliert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen modifiziert.

### **1.5.1.2 Vektor**

Bei einem Vektor handelt es sich normalerweise um ein Plasmid oder eine Phagen-DNA. Die wesentliche Eigenschaft eines Vektors besteht darin, dass er sich in einem passenden Wirt autonom repliziert. Daneben trägt er häufig auch Selektionsmarker, die es dem Wirt ermöglichen, sich unter selektierenden Bedingungen (z. Bsp. in Gegenwart von Antibiotika) zu vermehren. Bei Expressionsvektoren trägt das Plasmid in der Nähe des zu exprimierenden DNA-Abschnittes einen starken Promotor, der eine optimale Transkription ermöglicht und es codiert für eine Ribosomenbindestelle nahe des Startcodons des Gens.

Das verwendete Plasmid muss in seiner multiple cloning site (MCS) Schnittstellen für die beim einzusetzenden DNA-Fragment verwendeten Restriktionsenzyme bereitstellen. Nach dem enzymatischen Verdau wird der modifizierte Vektor über ein Agarosegel aufgereinigt, isoliert und steht so für die Ligation zur Verfügung.

## ***1.5.2 Transfektion des Konstruktes und Expression des Genproduktes***

### **1.5.2.1 Cloning Host**

Das aus der Ligation von DNA-Fragment und Vektor resultierende Konstrukt wird in einem ersten Schritt in einen sogenannten Cloning Host transferiert. Es handelt sich dabei um bakterielle Stämme (z. Bsp. E. coli XL1-blue), die Plasmide in grosser Menge und hoher Qualität herzustellen vermögen. Um die DNA in das Bakterium einschleusen zu können, wird deren Zellwand entweder auf chemischem Weg oder über Elektroporation durchlässig gemacht. Da die eingesetzten Stämme nicht in der Lage sind Translation durchzuführen, können sie nicht als Expression Host eingesetzt werden. Aus den Cloning Hosts lässt sich lediglich das Konstrukt in grossen Mengen und guter Qualität für die Transfektion des Expression Hosts gewinnen.

### 1.5.2.2 Expression Host

Der Expression Host dient dazu, das Genprodukt (Zielprotein) in ausreichender Menge herzustellen. Klone, die das Konstrukt enthalten, können unter Zusatz von Glycerol über längere Zeit bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Bei Bedarf wird von dem „Glycerol-Stock“ eine geringe Menge entnommen und eine Übernachtskultur (ÜNK) beimpft. Diese dient als Ausgangspunkt für eine grössere Kultur. Haben die Bakterien eine gewisse Zelldichte erreicht, lässt sich die Proteinproduktion durch Zugabe eines Inducers, meist Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), starten.

Die Produktion eines gewünschten Proteins wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu gehören unter anderem die Inkubationstemperatur, das verwendete Medium, die Inducerkonzentration, die Inkubationsdauer und die An- bzw. Abwesenheit von Glucose. Tiefere Inkubationstemperaturen ( $26$  oder  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) können den Effekt haben, dass die Löslichkeit schwerlöslicher Proteine verbessert wird. Zudem wird die Ausbildung von „inclusion bodies“, die eine Isolierung des Genproduktes erschweren können, vermindert. „Inclusion bodies“ stellen unlösliche Anhäufungen des Zielproteins in der Zelle dar, die dann gebildet werden können, wenn die Zelle in kurzer Zeit grosse Mengen des Proteins produziert. Nachteil der Temperaturreduktion ist, dass für eine ausreichende Proteinexpression längere Inkubationszeiten nötig sind.

Ein Problem stellt die potentielle Toxizität des produzierten Proteins für den Expression Host dar. Durch eine starke Expression toxischer Genprodukte können die Bakterien sich selber soweit schädigen, dass sie absterben oder zumindest ihr Wachstum einstellen. Noch vor der Induktion können kleine Mengen solcher Genprodukte, die aufgrund der bestehenden Basalexpression kontinuierlich hergestellt werden, das Wachstum soweit behindern, dass vernünftige Zelldichten nicht erreicht werden. Dem kann durch Zugabe von Glucose (ad  $0,5$  oder  $1,0\text{ }\%$  (m/V)) entgegengewirkt werden. Glucose reduziert bei Expressionssystemen, die unter der Kontrolle eines *lac*-Promoters stehen, die basale Proteinexpression (Grossman et al., 1998; Pan & Malcolm, 2000). Eine weitere Massnahme ist die Reduktion der Inducerkonzentration. Damit kann bewirkt werden, dass die Bakterien nur soweit das Zielprotein produzieren, dass sie ihre eigene Vermehrung nicht zu stark behindern. So ist gewährleistet, dass ausreichend hohe Zelldichten erreicht werden.

### **1.5.3 Isolierung des Genproduktes**

In einem ersten Schritt werden die Bakterien nach dem Ernten lysiert. Dies kann durch Einsatz von Detergenzien, Lysozym, Ultraschall oder auch über Frier-Tau-Zyklen geschehen. Anschliessend werden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Lösliche Proteine verbleiben im Überstand und lassen sich auf unterschiedliche Art und Weise gewinnen.

In viele Fällen werden die exprimierten Proteine über Affinitätschromatographie isoliert und gereinigt. Zu diesem Zweck werden die Proteine z. Bsp. C- oder N-terminal mit einer Reihe von Histidin-Resten versehen (His-Tag), die Affinität zu immobilisierten  $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen aufweisen. Ein anderes weit verbreitetes System nutzt die hohe Affinität von Glutathion-S-Transferase (GST) zu Glutathion aus. Fusionsproteine aus dem gewünschten Genprodukt und GST lassen sich über Matrices, die kovalent gebundenes Glutathion auf ihrer Oberfläche bereitstellen, isolieren. Neben der vereinfachten Isolierung weist das Fusionsprotein in der Regel auch eine verbesserte Wasserlöslichkeit auf. Nach der Isolierung lässt sich der GST-Anteil enzymatisch abspalten.

### **1.6 Free Flow Elektrophorese**

Bei der Free Flow Elektrophorese FFE handelt es sich um eine Sonderform der Elektrophorese, die ohne stationäre Phase wie Gel oder Papier auskommt. Die Auftrennung der Probe erfolgt in einem Puffer, der eine flache Trennkammer laminar durchströmt (vgl. Abbildung 2-1). Die Elektroden sind parallel zur Strömungsrichtung des Puffers angebracht, wodurch ein elektrisches Feld in einem  $90^\circ$  Winkel zur Strömungsrichtung erzeugt wird. Proben, die sich in der Ladungsdichte an ihren Oberflächen unterscheiden, werden bei der Trennung aus der Strömungsrichtung des Trennpuffers in einem Winkel abgelenkt, der sich aus der Strömungsgeschwindigkeit des Mediums und ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit ergibt.

Am Ende der Trennkammer befindet sich eine Fraktionierungseinheit, über die der gesamte Pufferstrom geleitet und in 96 Fraktionen aufgetrennt wird. Wahlweise stehen 96 well plates oder grössere 10 ml Fraktionierungsröhrchen zum Auffangen der Proben zur Verfügung. Mit normalerweise  $> 90\%$  ist die Wiederfindungsrate bei der FFE sehr hoch. Da während der Trennung nur relativ schwache Kräfte auf die Proben einwirken, ist auch bei empfindlichen Proben mit keinen Veränderungen zu

rechnen. Somit lassen sich Zellen (Baier et al., 1988; Heidrich & Hannig, 1989), Zellorganellen wie Mitochondrien oder Endosomen (Ellinger et al., 2002), Proteine (Nath et al., 1996; Loseva et al., 1998) und Proteinkomplexe schonend auftrennen.

Nach erfolgter Isolierung sind dann weitere biochemische, pharmakologische oder immunologische Untersuchungen möglich. Die Trennungen können sowohl analytisch wie auch präparativ durchgeführt werden. Dabei können Substanzmengen im Bereich von einigen  $\mu\text{g}$  bis mehrere g getrennt werden. Abhängig von der aufzutragenden Probenmenge sind Prozesszeiten von 5 bis 20 min pro Trennung zu erwarten.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2-1 Chemikalien

Substanz	Qualität	M <sub>r</sub> [g/mol]	Abkürzung/ Summenformel	Hersteller
1 kb DNA ladder				New England Biolabs (Beverly, USA)
1,2-Distearyl-3-octa-ethylenglykolyglycerol-ethermethacrylat		1021,6	DOGM	Synthese Dr. O. Stauch, Universität Freiburg
2-( <i>p</i> -Toluidinyl)-naphthalin-6-sulfonsäure Natriumsalz	> 99 %	335,35	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> S · Na, TNS	Fluka (Buchs, CH)
Agar				Difco (Detroit, USA)
Agarose I				Amresco (Solon, Ohio, USA)
Albumin Standard 2 mg/ml				Pierce (Rockford, USA)
Amaranthrot	Standard Fluka	604,5	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	Fluka (Buchs, CH)
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	p.a.	1235,9	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
Brilliantblau G250	Standard Fluka	854,0	C <sub>47</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> · Na	Fluka (Buchs, CH)
Carbenicillin Dinatriumsalz	>98 %	422,4	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S · 2 Na	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	> 99 %	323,1	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Fluka (Buchs, CH)
Chloroform	p.a.	119,4	CHCl <sub>3</sub>	Carl Roth (Karlsruhe)

Di-Kaliumhydrogenphosphat	> 99 %	136,09	$K_2HPO_4$	Fluka (Buchs, CH)
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	> 99 %	177,99	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	Fluka (Buchs, CH)
1,4-Dithio-DL-threitol	> 99,5 %	154,3	DTT	Fluka (Buchs, CH)
Essigsäure	p.a.	60,05	$C_2H_4O_2$	Fluka (Buchs, CH)
Ethanol abs.	p.a.	46,1	EtOH	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml				Amresco (Solon, Ohio, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	f. Mikrobiologie	372,2	$EDTA-Na_2 \cdot 2 H_2O$	Merck (Darmstadt)
Fiske-Subbarow-Reducer				Fluka (Buchs, CH)
Fluorescamin	> 99 %	278,3	$C_{17}H_{10}O_4$ , Floram <sup>®</sup>	Fluka (Buchs, CH)
Glucose Monohydrat	f. Mikrobiologie	198,17	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	Carl Roth (Karlsruhe)
Reduz. L-Glutathion	> 97 %	307,3	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Fluka (Buchs, CH)
Glycerol 85%	Ph. Eur.	92,09	$C_3H_8O_3$	Synopharm (Barsbüttel)
Glycin	> 99 %	75,07	$C_2H_5NO_2$	Fluka (Buchs, CH)
Gramicidin A	> 90 %	1881	GrA	Fluka (Buchs, CH)
Imidazol	purum	68,08	$C_3H_4N_2$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	p.a.	60,1	$C_3H_8O$	Carl Roth (Karsruhe)
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid	>99 %	238,3	$C_9H_{18}O_5S$	Fluka (Buchs, CH)
Kaliumdihydrogenphosphat	> 99 %	136,09	$KH_2PO_4$	Fluka (Buchs, CH)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	ACS	203,31	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Sigma-Aldrich (Steinheim)

β-Mercaptoethanol	p.a.	78,13	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS, β-ME	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	p.a.	32,0	MeOH	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	f. Molekular- biologie	82,03	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Fluka (Buchs, CH)
Natriumchlorid	purum p.a.	58,44	NaCl	Fluka (Buchs, CH)
Natriumhydroxid	p.a.	40,00	NaOH	Merck (Darmstadt)
Natriumlaurylsulfat	p.a.	288,40	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> SNa	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumtetraborat Decahydrat	> 99,5 %	381,4	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	Fluka (Buchs, CH)
Ni-NTA Superflow Gel				Qiagen (Hilden)
Nucleasefreies Wasser				Promega (Madison, USA)
pGEX-6P-2 Expressionsvektor				Pharmacia (Freiburg)
Phenylmethan- sulfonylchlorid	> 99 %	190,6	PMSF	Fluka (Buchs, CH)
Protein Assay				Bio Rad (München)
Roti <sup>®</sup> -Mark Proteinstandard				Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 37%	p.a.	36,0	HCl	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetraethylglykol- dimethacrylat		330,3	TEGDM	Synthese Dr. O. Stauch, Universität Freiburg
Tryptone Peptone				Becton Dickinson Microbiology Systems (Sparks, USA)
Wasserstoffperoxid- Lösung 30% (m/m)	p.a.	34,01	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma (St. Louis, USA)
Yeast Extract				Becton Dickinson Microbiology Systems (Sparks, USA)

Tabelle 2-2 Detergenzien

Detergens	Qualität	M <sub>r</sub> [g/mol]	Abkürzung/ Summenformel	Hersteller
Natriumcholat	p.a.	430,6	Na-C	Sigma-Aldrich (Steinheim)
n-Octyl-β-D-glucopyranosid	> 99 %	292,4	OG	Fluka (Buchs, CH)
Triton® X-100	f. Molekular- biologie	576,6	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	Fluka (Buchs, CH)
Tetraethylglykol- monoocylether		306,5	C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	Synthese Dr. J.-K. Kim ,Universität Freiburg

Tabelle 2-3 Enzyme und Bakterienstämme

Enzym/Bakterien	Konzentration	Hersteller
Bam HI	10 U/μl	Promega (Madison, USA)
BL21 (DE3) pLysS kompetente E. coli Zellen		Promega (Madison, USA)
Cla I	10 U/μl	Promega (Madison, USA)
Eco RI	12 U/μl	Promega (Madison, USA)
Hind III	10 U/μl	Promega (Madison, USA)
Lysozym von Hühnereiweiss	ca. 70'000 U/mg	Fluka (Buchs, CH)
Nco I	10 U/μl	Promega (Madison, USA)
Nde I	10 U/μl	Promega (Madison, USA)
Pfu DNA Polymerase	3 U/μl	Promega (Madison, USA)
T4 DNA Ligase	3 U/μl	Promega (Madison, USA)
Xho I	10 U/μl	Promega (Madison, USA)
XL I - blue MRF' E. coli Cloning Host		Stratagene (Amsterdam, NL)



Tabelle 2-4 Natürliche und synthetische Phospholipide

Lipid	Qualität	M <sub>r</sub> [g/mol]	Abkürzung/ Summenformel	Hersteller
Dioleoylphosphatidylcholin	> 98 %	786	DOPC	Lipoid (Ludwigshafen)
Ei-Phosphatidylcholin	> 98 %	780	EPC	Lipoid (Ludwigshafen)
Ei-Phosphatidylglycerol -Na	> 98 %	787	EPG-Na	Lipoid (Ludwigshafen)
Ei-Phosphatidylserin	> 99 %	792	EPS	Lipoid (Ludwigshafen)
Lissamine <sup>®</sup> -Rhodamin-B- dihexadecanoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz	> 99 %	1333	Rh-PE	Molecular Probes (Leiden, NL)
1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro- 2,1,3-benzoxa-diazol-4- yl)amino]-dodecanoyl] phosphatidylcholin	> 99 %	857,05	C <sub>12</sub> -NBD-PC	Avanti Polar Lipids (Birmingham, USA)

Tabelle 2-5 Commercial kits

Kit	Hersteller
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Bug Buster	Pharmacia (Freiburg)
GST Detection Module	Pharmacia (Freiburg)
Bradford Assay	Bio Rad (München)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
DC-Alufohlen Kieselgel 60, Schichtdicke 0,2 mm	Merck (Darmstadt)
Dialflo Ultrafiltrationsmembranen YM 10	Millipore (Eschborn)
Dialysemembranen high permeability, cutoff 10 kDa	Diachema (München)
Einmalküvetten Polystyrol	Sarsted (Nürnberg)
Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
Falcon Röhrchen 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson (Fraklin Lakes, USA)
Fraktionsröhrchen	Sarsted (Nürnberg)
Mikroreaktionsgefäße	Greiner (Frickenhausen)
Partikelfilter unsteril 0,22 µm Porenweite	Sartorius (Göttingen)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Polycarbonatmembranen (100, 200 nm Porenweite)	Whatman Nucleopore (Pfullingen)
Polystyrolröhrchen 3 ml	Sarsted (Nürnberg)
Sterilfilter 0,22 µm Porenweite	Sartorius (Göttingen)

## 2.2 Lösungen und Puffer

### 2.2.1 Puffer für die Free Flow Elektrophorese

FFE-Puffer wurden vor ihrem Einsatz sterilfiltriert, um den Eintrag von Keimen sowie Schwebstoffen, die die Fraktionierung behindern können, zu verhindern. Die Puffer wurden so hergestellt, dass eine gleichbleibende Ionenstärke der Stammlösungen wie auch der Verdünnungen gewährleistet war. Die Leitfähigkeit der Pufferlösungen wurde routinemässig überprüft.

**Tabelle 2-7 Phosphat-Elektrodenpuffer 125 mM, pH 7,0**

Substanz	Molarität [mmol/l]	Einwaage [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	75	13,349
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50	6,805
1 N NaOH ad pH 7,0		

**Tabelle 2-8 Phosphat-Stabilisierungspuffer 50 mM, pH 7,0**

Substanz	Molarität [mmol/l]	Einwaage [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	30	5,340
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	20	2,722
1 N NaOH ad pH 7,0		

Alternativ: 200,0 ml Elektrodenpuffer (Tabelle 2-7) ad 500,0 ml mit demineralisiertem Wasser.

**Tabelle 2-9 Phosphat-Trennpuffer 5 mM, pH 7,0**

Substanz	Molarität [mmol/l]	Einwaage [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3	0,534
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	0,272
1 N NaOH ad pH 7,0		

Alternativ: 40,0 ml Elektrodenpuffer (Tabelle 2-7) ad 1000,0 ml mit demineralisiertem Wasser.

### **2.2.2 Weitere Puffer und Lösungen**

TE-Puffer pH 7,4	Tris	10 mM	1,211 g/l
	EDTA	1 mM	0,372 g/l

STEP-Puffer pH 7,4	SDS	0,5 % (m/V)	5,000 g/l
	Tris	50 mM	6,057 g/l
	EDTA	0,4 mM	0,149 g/l
	Proteinkinase K	1 mg/ml	1,000 g/l
TAE-Puffer pH 8,0	Tris	40 mM	4,846 g/l
	Essigsäure	20 mM	1,201 g/l
	EDTA	1 mM	0,372 g/l
PBS pH 7,4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 mM	0,231 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5,2 mM	0,926 g/l
	NaCl	150 mM	8,766 g/l
LB-Medium pH 7,4	Trypton	10,0 g/l	
	Hefeextrakt	5,0 g/l	
	NaCl	10 g/l	Autoklavieren
LB-Agarplatten	Trypton	10,0 g/l	
	Hefeextrakt	5,0 g/l	
	NaCl	10 g/l	
	Bacto-Agar	15 g/l	
TB-Medium	Trypton	12 g/900 ml	Lösungen
	Hefeextrakt	24 g/900 ml	getrennt
	Glycerol 85%	4,7 ml/900 ml	herstellen und
			autoklavieren.
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31 g/100 ml	Mischen, wenn
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54 g/100 ml	T < 60 °C	
DNA loading buffer	Bromphenolblau	10 mg	
	Glycerol	500 µl	
	Xylencyanid	10 mg	
	TAE-Puffer pH 7,4	500 µl	
SDS sample buffer	Tris	62,5 mM	7,571 g/l
	Glycerol 85 %	10 % (V/V)	117,6 ml/l
	SDS	2 % (m/V)	20 g/l
	Bromphenolblau	0,00125 % (m/V)	0,0125 g/l
	β-ME	5 % (V/V)	50 ml/l

SDS Laufpuffer pH 8,3	Tris	25 mM	3,029 g/l
	Glycin	192 mM	14,413 g/l
	SDS	0,1 % (m/V)	1,000 g/l
Fixierlösung	Methanol	50 % (V/V)	
	Essigsäure	10 % (V/V)	
	Wasser	40 % (V/V)	
Färbelösung	Ethanol	40 % (V/V)	
	Essigsäure	10 % (V/V)	
	Bromphenolblau	0,1 % (m/V)	
	Wasser	50 % (V/V)	
Entfärbelösung	Ethanol	45 % (V/V)	
	Essigsäure	10 % (V/V)	
	Wasser	45 % (V/V)	
Elutionspuffer pH 8,0	Tris	50 mM	6,057 g/l
	Reduz. L-Glutathion	10 mM	3,073 g/l
PreScission <sup>®</sup> Puffer pH 8,0	Tris	50 mM	6,057 g/l
	NaCl	100 mM	5,844 g/l
	EDTA	1 mM	3,722 g/l
	DTT	1 mM	1,543 g/l
Boratpuffer pH 8,25	Natriumtetraborat Decahydrat	50 mM	19,06 g/l

Der pH-Wert der Lösungen wurde nach Bedarf mit 1 N Salzsäure bzw. 1 N Natronlauge auf den Sollwert eingestellt.

## 2.3 Geräte

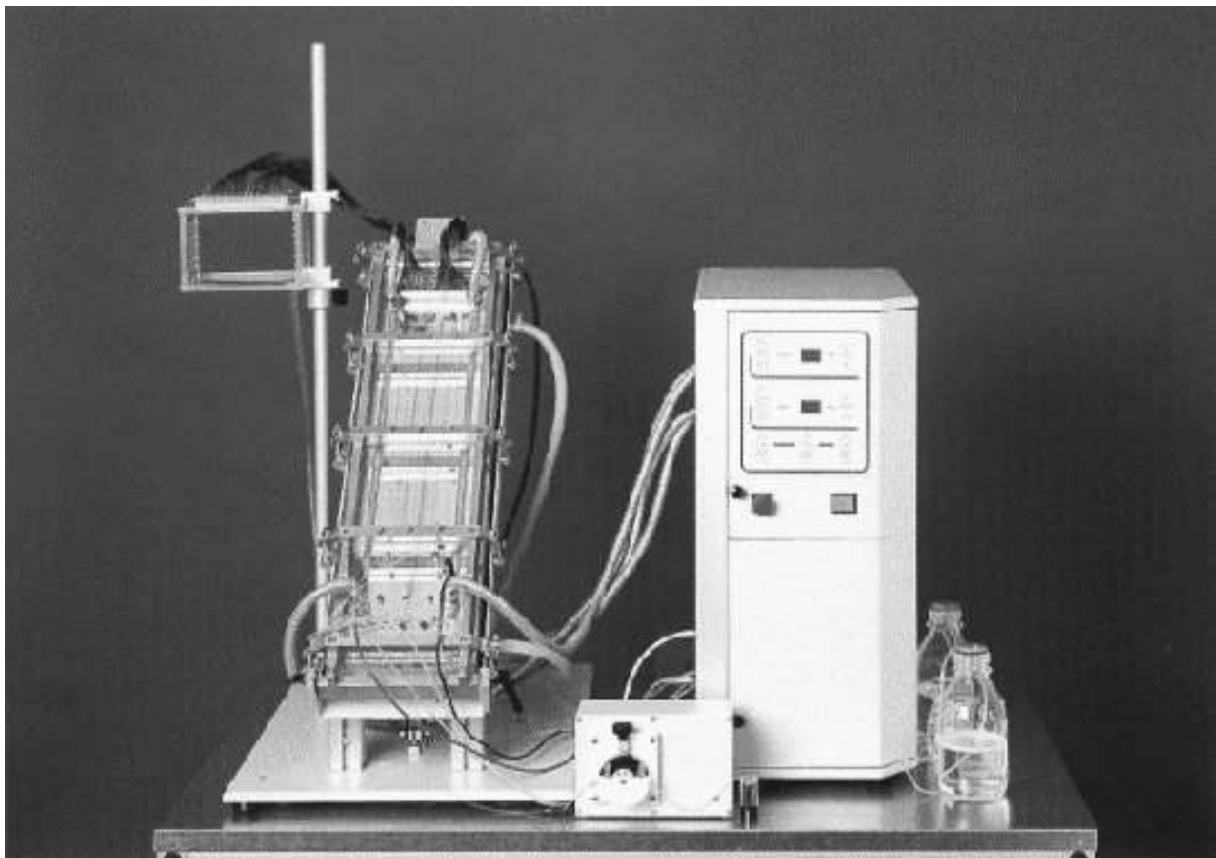
### 2.3.1 Octopus PZE

#### 2.3.1.1 Beschreibung und Inbetriebnahme

Bei dem Octopus PZE handelt es sich um ein Gerät, welches speziell für das Verfahren der kontinuierlichen Free Flow Zonenelektrophorese ausgelegt ist. Die Free Flow Elektrophorese stellt eine Elektrophoreseart dar, die sich von anderen

Elektrophoresearten darin unterscheidet, dass sie ohne stationäre Phase auskommt. Die in die Trennkammer eingebrachten Proben (Liposomen, Zellen, Zellorganellen, Proteine) werden in einem laminar fließenden Pufferstrom transportiert und im elektrischen Feld gemäss den Ladungsverhältnissen auf ihrer Oberfläche sowie untergeordnet ihrer Grösse (bei Partikeln) abgelenkt. Es lassen sich sowohl analytische wie auch präparative Arbeiten durchführen. Die Probenmenge kann dabei zwischen einigen  $\mu\text{g}$  und mehreren g liegen.

Das folgende Bild (Abbildung 2-1) zeigt die Trennkammer (links) mit Steuerungseinheit (rechts) und Samplepumpe (im Vordergrund). Die Trennkammer besteht aus drei Teilen: dem Trennkammerrückteil, dem Trennkammervorderteil und dem VA-Metallrahmen.

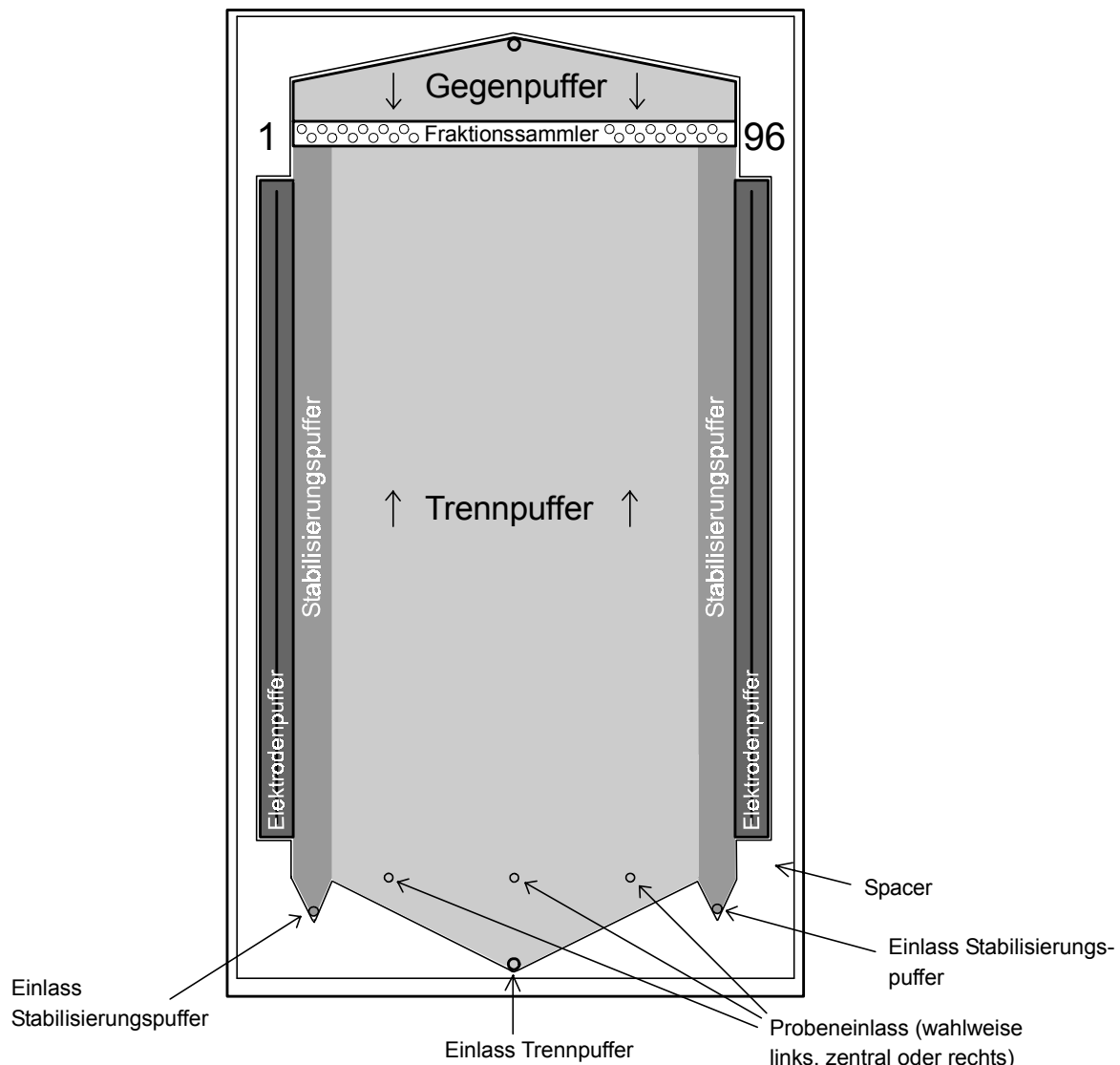


**Abbildung 2-1** Octopus PZE der Firma Dr. Weber GmbH. Links: Trennkammer mit der an einer Stange angebrachten Fraktionierungseinheit. Rechts: Steuerungseinheit. Leicht versetzt links vor der Steuerungseinheit: Probenpumpe

Das Rückteil, welches aus Aluminium besteht, dient hauptsächlich dem Wärmeaustausch. Es wird von einer Kühlflüssigkeit durchströmt, welche über den externen Umwälzkühler IC006 der Firma Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH

thermostatisiert wird. So kann die Temperatur der in der Trennkammer fließenden Medien zwischen  $-25$  und  $+40$  °C  $\pm$  0,1 °C gehalten werden. Auf das Rückteil zur Kammerseite hin aufgebracht ist zudem eine 0,8 mm dünne Glasplatte, die einen guten Wärmetransfer wie auch eine perfekte elektrische Abschirmung ermöglicht.

Das Trennkammervorderteil (Abbildung 2-2) besteht aus einem massiven Plexiglasblock, der auf der Aussenseite mit dem Metallrahmen verschraubt ist. In den Plexiglasblock sind in Längsrichtung die Elektrodenkanäle sowie Vertiefungen für Dichtungen eingefräst. In den Kanälen verlaufen die Platindrähte, die als Elektroden dienen. Zudem befinden sich am unteren und oberen Ende des Blocks Expansionsräume für die eingebrachten Medien. Des weiteren sind in den Plexiglasblock Anschlüsse für verschiedene Medien, die Probenzufuhr und die Hochspannung eingelassen.



**Abbildung 2-2** Schematischer Aufbau der Trennkammer der Octopus PZE

Die Länge der Trennstrecke beträgt 500 mm und der Abstand zwischen den beiden Elektrodenkanälen 100 mm. Die Höhe der Trennkammer, die dem Abstand von Trennkammervorder- und rückseite in zusammengesetztem Zustand entspricht, wird mit Hilfe eines eingelegten Spacers auf 0,5 mm eingestellt.

Am oberen Ende des Plexiglasblocks befindet sich die Fraktionierungseinheit. Sie setzt sich zusammen aus 96 nebeneinander liegenden Schläuchen, die einen Durchmesser von 1,1 mm aufweisen. Die Schläuche führen zu einem Fraktionierungsgestell, wo die aufgetrennten Proben wahlweise in Mikrotiterplatten oder 10 ml Röhrchen aufgefangen werden können. Über der Fraktionierungseinheit liegt der Einlass für den Gegenpuffer. Dieser entgegen der Trennrichtung fließende Puffer garantiert, dass die aufgetrennten Proben quantitativ in die Fraktionierungsschläuche getrieben werden.

Zur Inbetriebnahme der Anlage wird zuerst auf das Trennkammervorderteil der Spacer passgenau aufgelegt. Auf die Elektrodenkanäle, die von Dichtungen umgeben sind, werden die streifenartigen Elektrodenmembranen aufgelegt, die - auf den Dichtungen aufliegend - den Elektrodenraum so abdichten, dass nur ein elektrophoretischer Transport über die Grenzflächen der Membranen stattfinden kann. Für die Versuche wurden nichtionenselektive Membranen verwendet, die einen Ionentransport in beide Richtungen erlauben. Ist die Anlage längere Zeit ausser Betrieb, werden die Membranen in einer wässrigen Glycerol-Formalin-Lösung (25% und 4%, V/V) aufbewahrt. Vor einem erneuten Einsetzen in die Anlage werden sie mit demineralisiertem Wasser abgespült. Auf die Elektrodenmembranen werden befeuchtete Kartonstreifen der gleichen Grösse aufgelegt. Diese 0,8 mm dicken Streifen dichten den Elektrodenraum zusätzlich ab. Nun wird der Probenschlauch ein bis zwei mm in die Trennkammer gezogen und in Trennrichtung umgeklappt. Dies garantiert, dass die Proben verwirbelungsfrei in den Pufferstrom eingepumpt werden können. Dann werden die beiden Kammerteile zusammengeklappt und mit dem mittleren der 5 beidseitig angebrachten Klemmenpaaren fixiert. Nun werden die restlichen Klemmenpaare von der Mitte der Kammer nach aussen hin geschlossen. Danach werden, wiederum ausgehend von dem mittleren Klemmenpaar, die Klemmen soweit angezogen, dass die beiden Kammerteile satt aufeinander sitzen. Die parallele Lage von Kammervorder- und -rückteil kann mit einem Farbstoff kontrolliert werden, der in die Trennkammer eingepumpt wird (vgl. 2.3.1.2.1).



Nun wird die Kammer mit demineralisiertem Wasser befüllt. Dazu wird zuerst nur die zentrale Zuführung durch Aktivierung von Pumpenkanal 2 und/oder 3 verwendet. Ist der untere Bereich der Trennkammer blasenfrei gefüllt, werden die Kanäle 1 und 4 zugeschaltet. Sollte dennoch Luft in die Kammer eingebracht worden sein, kann diese durch wiederholtes Absenken und Anheben des Flüssigkeitsniveaus entfernt werden. Ist die Kammer blasenfrei gefüllt, wird so lange weitergepumpt, bis das Wasser am oberen Ende der Kammer aus dem Gegenpuffer-Schlauch austritt. Jetzt wird der Gegenpuffer (Pumpenkanal 5) zugeschaltet. Tritt das demineralisierte Wasser aus dem Schlauchstück aus, werden beide Teile über einen Dreiwegehahn verbunden, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luft mehr in die Kammer eingebracht wird. Ab jetzt wird das Wasser in die Fraktionierungsschläuche transportiert. Da das Wasser aufgrund von Luft in den Schläuchen nicht überall gleichmäßig heraustropft, muss mit einer Spritze am Dreiwegehahn Wasser in die Kammer injiziert werden, um die Luft aus den Schläuchen zu treiben. Ist dies geschehen, kann das demineralisierte Wasser durch die gewünschten Puffer ersetzt werden. Zudem kann begonnen werden, den Elektrodenpuffer durch die Kanäle zirkulieren zu lassen und die Trennkammer auf 9 °C herunterzukühlen. Ist dies geschehen, kann der Powersupply zugeschaltet werden. Sobald die Spannungswerte konstant sind, kann die zu trennende Probe injiziert werden. Dies ist je nach zu erwartender Oberflächenladung der Partikel an drei verschiedenen Stellen möglich. Während des Trennvorganges kann die Trennkammer wahlweise in waagrechter oder senkrechter Position gehalten werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden alle in senkrechter Position durchgeführt.

Nach erfolgter Trennung wird die Kammer und der Elektrodenpufferkreislauf mit demineralisiertem Wasser gespült. Das Gerät kann problemlos mehrere Tage betrieben werden. Bei längeren Standzeiten empfiehlt es sich aber, das Gerät auseinander zu bauen oder Trennkammer und Elektrodenpufferkreislauf mit Formaldehyd-Lösung (4%, V/V) zu füllen, um das Wachstum von Algen und Bakterien zu verhindern.

### **2.3.1.2 Kalibrierung der Anlage**

#### **2.3.1.2.1 Einstellung der Kammersymmetrie**

Die parallele Lage von Kammervorder- und -rückteil ist eine wichtige Voraussetzung für präzise und reproduzierbare Trennungen. Ist die Kammersymmetrie nicht gegeben, können die Proben schon ohne Anlegen eines elektrischen Feldes abgelenkt werden.

Um die Symmetrie zu überprüfen, wird eine konzentrierte wässrige Lösung von Amaranthrot in die Kammer injiziert. Ohne elektrisches Feld wird die Probe nur mittels Pufferstrom durch die Kammer transportiert. Liegen die beiden Kammerhälften genau parallel zueinander, durchläuft die Probe ohne Ablenkung die Trennstrecke. Sollte dies nicht der Fall sein, müssen die Klemmen der Trennkammer nachjustiert werden.

Driftet die Probe direkt nach Eintritt in die Trennkammer nach einer Seite weg, deutet das auf unausgewogene Puffer-Förderraten hin. Schläuche und Schlauchquetschpumpe sind dann zu kontrollieren.

#### **2.3.1.2.2 Kontrolle der Pufferströme**

Diese Kontrolle dient dazu, die pufferführenden Schläuche auf einwandfreie Funktion zu überprüfen und das optimale Verhältnis zwischen den verschiedenen Pufferströmen einzustellen.

Mit Amaranthrot gefärbter Puffer wird über die Schläuche 1 und 4 in die Trennkammer gepumpt. Die beiden gefärbten Pufferbahnen sollen einen geraden Verlauf aufweisen, vom Trennpuffer scharf abgegrenzt sein und in der Breite 9 Fraktionen nicht überschreiten. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, müssen die Schläuche kontrolliert oder das Flussverhältnis zwischen Stabilisierungs- und Trennpuffer neu eingestellt werden. Letzteres erreicht man durch den Einsatz von Schläuchen mit verändertem Innendurchmesser oder durch Abklemmen bestimmter Kanäle.

### 2.3.2 Weitere Geräte

Tabelle 2-10 Verwendete Geräte

Gerät	Typbezeichnung (Hersteller)
Agarosegel Elektrophoresekammer	Standardkammer mit Kühlung (Biometra, Göttingen)
Analysenwaage	Sartorius Research R 180 D-*D1 (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Tuttnauer 3870ELPV (Tuttnauer, Jerusalem, Israel)
Handextruder	LiposoFast (Avestin, Ottawa, CAN)
Heizblock	Liebisch SON/D A (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
Laborwaage	Sartorius Universal U 4600 P+ (Sartorius, Göttingen)
Lumineszenz-Spektrometer	LS 50B (Perkin-Elmer, Überlingen)
pH-Meter	pH-Meter Delta 320 (Mettler-Toledo, Steinbach)
Photonenkorrelationsspektrometer	Zetamaster S (Malvern Instruments, Malvern, GB)
Schütteltisch	Certomat S II (B. Braun Biotech, Melsungen)
SDS PAGE Gelelektrophoresekammer	Minigel Twin (Biometra, Göttingen)
Thermocycler	Biometra T <i>personal</i> (Biometra, Göttingen)
Ultrafiltrationszelle	Amicon Ultrafiltrationszelle 8010 (Millipore, Eschborn)
Ultraschallspitze	Sonoplus GM 70 (Bandelin, Berlin)
UV/Vis-Spektrophotometer	Uvikon 933 A (Kontron Instruments, Mailand, I)
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge	Biofuge <i>pico</i> (Heraeus, Osterode)

## **2.4 Liposomenherstellung**

Um den Umgang mit Phospholipiden, insbesondere mit EPC, zu erleichtern, werden von den Substanzen Stammlösungen in organischem Lösungsmittel hergestellt, die bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Messkolben mit Schliffstopfen gelagert werden. Als Lösungsmittel wird hauptsächlich Ethanol verwendet. Die Liposomen sollen spätestens 2 Wochen nach ihrer Herstellung verworfen werden. Gelagert werden sie während der Zeit im Kühlschrank bei ca.  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Liposomen werden in der Regel in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 hergestellt (Tabelle 2-9). Dieser Puffer entspricht dem bei der FFE verwendeten Trennpuffer. Alle weiteren Untersuchungen ( $\zeta$ -Potentialmessungen, Grössenmessungen, TNS-Assay) werden nach Möglichkeit in demselben Puffer durchgeführt. Änderungen sind bei den jeweiligen Experimenten vermerkt. Die für die FRET-Messungen durch DD hergestellten fluoreszenzgelabelten Liposomen werden in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 hergestellt.

### **2.4.1 Extrusion**

In einem ersten Schritt werden die für den entsprechenden Ansatz berechneten Volumina an Phospholipid-Stammlösung in einen geeignet grossen Rundkolben pipettiert. Anschliessend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck und bei moderater Temperatur (ca.  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) weitgehend entfernt. Der entstandene leicht trübe Lipidfilm wird am Hochvakuum ( $p = 0,05\text{ mbar}$ ) während mind. 1 h nachgetrocknet, um jegliche Lösungsmittelrückstände zu entfernen. Der Film wird in einer bestimmten Menge Puffer aufgenommen, wobei eine trübe, inhomogene MLV-Dispersion entsteht. Die Gesamtlipidkonzentration beträgt 10 bis 30 mM. Die Dispersion wird dann mit dem Liposofast<sup>®</sup>-Extruder 21-mal durch eine Polycarbonatmembran mit 200 bzw. 100 nm Porengrösse extrudiert. Durch die ungerade Anzahl Extrusionsschritte ist gewährleistet, dass grobe Verunreinigungen und grosse Lipidaggregate aus der MLV-Dispersion am Ende von der Membran zurückgehalten werden.

Die genaue Lipidzusammensetzung und -konzentration sowie die Grösse der hergestellten Liposomen ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

## **2.4.2 Detergensdialyse**

### **2.4.2.1 Allgemeine Durchführung**

Hier wird analog zur Herstellung durch Extrusion (2.4.1) ein Film in einem Rundkolben hergestellt, der neben den eingesetzten Membranbestandteilen ein Detergens bzw. ein Detergensgemisch enthält. Bei der Verwendung von Na-C ist der entstehende Film klar, während bei Verwendung von OG teilweise eine leichte Trübung auszumachen ist. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels wird der Film durch Zugabe einer bestimmten Menge Puffer in eine klare Mischmizelllösung überführt. Bei der Verwendung von OG kann dabei kurzzeitig eine leichte Trübung festgestellt werden, die aber nach kompletter Aufnahme des Filmes verschwindet.

Die Mischmizelllösung wird nun in eine nach der Vorschrift von O. Stauch selber hergestellte Dialysekammer überführt (Stauch, 2002). Bei der Dialyse kommen Membranen mit einem cutoff von 10 kDa zum Einsatz, die zuvor mind. 20 min im Dialysemedium hydratisiert werden. Um den Gehalt an Detergens auf ein vernachlässigbares Minimum zu reduzieren, wird über mind. 24 h dialysiert. Zu Beginn werden 200 ml Dialysemedium pro ml Mischmizelllösung eingesetzt, das stündlich während 5 h gewechselt wird. Danach erfolgt die erschöpfende Dialyse gegen 500 ml Dialysemedium pro ml Mischmizelllösung. Ein in die Kammer eingebrachter kleiner Rührfisch garantiert die homogene Durchmischung der Probe.

Nach der Dialyse wird jeweils eine Phospholipidbestimmung mittels Bartlett-Assay durchgeführt (2.5.3.1), da während der Dialyse wegen osmotischen Effekten, die zur Verdünnung führen, die Lipidkonzentration um ca. 25 % abnehmen kann.

### **2.4.2.2 Herstellung von Liposomen unterschiedlicher Grösse**

Liposomen, die EPG in Menge über 5 mol% enthalten, werden auch beim Einsatz von OG nicht grösser als 100 nm, da die negativen Ladungen der EPG-Moleküle durch gegenseitige Abstossung einen grösseren Durchmesser verhindern. Da reine EPC-Liposomen bei DD mit OG einen Durchmesser von ca. 180 nm aufweisen (vgl. 1.3.3.3), ist es nötig, die Grösse von Donor- und Akzeptorliposomen aneinander anzugleichen, um beim Einsatz von äquimolaren Menge beider Präparationen eine annähernd gleiche Anzahl Liposomen und somit eine vergleichbare Austauschfläche zu erhalten.

Um detergentsdialysierte Liposomen definierter Grösse herzustellen, werden unterschiedliche Detergenzien eingesetzt bzw. verschiedene Detergenzien in bestimmten Verhältnissen gemischt.

#### 2.4.2.2.1 Akzeptorliposomen 100 nm

Um Akzeptorliposomen (EPC 100 mol%, Lipidkonzentration 20 mM) einer Grösse von etwa 100 nm herzustellen, werden Gemische aus OG und Na-C eingesetzt. Das molare Verhältnis von OG zu EPC beträgt dabei immer 5:1, und Na-C wird in verschiedenen molaren Verhältnissen zu OG hinzugemischt. Die Herstellung der Liposomenpräparationen erfolgt wie unter 2.4.2 beschrieben.

Für 1 ml Liposomendispersion wurden folgende Ansätze hergestellt:

**Tabelle 2-11 Herstellung von 1 ml Akzeptorliposomen definierter Grösse (EPC 100 mol%, Lipidkonzentration 20 mM) mittels DD unter Verwendung von OG und Na-C in verschiedenen Verhältnissen**

Ansatz	EPC		OG		Na-C		Molares Verhältnis OG:Na-C
	[mg]	[mM]	[mg]	[mM]	[mg]	[mM]	
1	15,6	20	29,2	100	0,538	1,25	80:1
2	15,6	20	29,2	100	1,076	2,5	40:1
3	15,6	20	29,2	100	1,435	3,33	30:1
4	15,6	20	29,2	100	2,153	5	20:1

Im Anschluss an die Dialyse wurde der hydrodynamische Durchmesser der Liposomen mittels PCS (vgl 2.5.1) bestimmt.

#### 2.4.2.2.2 Donorliposomen 200 nm

Um Donorliposomen (EPC 90 mol%, EPG 10 mol%, Gesamtlipidkonzentration 20 mM) einer Grösse von 180 bis 200 nm herzustellen, werden verschiedene Verhältnisse von OG und C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> eingesetzt.

Das molare Verhältnis Gesamtlipid zu Detergens bzw. Detergensgemisch beträgt 1:5.

Die Herstellung der Liposomenpräparationen erfolgt wie unter 2.4.2 beschrieben.

Für 1 ml Liposomendispersion wurden folgende Ansätze hergestellt (vgl. Tabelle 2-12):

**Tabelle 2-12** Herstellung von 1 ml Donorliposomendispersion (EPC 90 mol%, EPG 10 mol%, Gesamtlipidgehalt 20 mM) mittels DD. Um die Grösse der Liposomen zu variieren, wurden bei den Ansätzen verschiedene Verhältnisse von OG und C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> eingesetzt

Ansatz	EPC		EPG		OG		C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	
	[mg]	[mM]	[mg]	[mM]	[mg]	[mM]	[mg]	[mM]
1	14,04	18	1,57	2	29,24	100	0	0
2	14,04	18	1,57	2	23,39	80	6,13	20
3	14,04	18	1,57	2	17,54	60	12,26	40
4	14,04	18	1,57	2	11,70	40	18,39	60
5	14,04	18	1,57	2	5,85	20	24,52	80
6	14,04	18	1,57	2	0	0	30,65	100

Im Anschluss an die Dialyse wurde der hydrodynamische Durchmesser der Liposomen mittels PCS (vgl 2.5.1) bestimmt.

## 2.5 Liposomencharakterisierung

### 2.5.1 Grössenmessung mittels PCS

Die mittlere Teilchengrösse (Z-Average) und die Polydispersität einer Liposomenpräparation werden mit einem Zetamaster<sup>®</sup> der Firma Malvern Instruments Inc. bestimmt. Die Streulichtmessung erfolgt in einem konstanten Winkel von 90 ° bei Einsatz eines Diodenlasers ( $\lambda = 670 \text{ nm}$ ) und unter Verwendung von Polystyrol-Einmalküvetten.

Die Probe wird zur Messung mit dem zur Herstellung verwendeten Medium soweit verdünnt, dass das Streulichtsignal 100'000 bis 300'000 Zählimpulse pro sec beträgt. Vor dem Verdünnungsschritt wird das Medium durch einen Oberflächenfilter der Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert, um störende Schwebstoffe zu entfernen. Bei Liposomenpräparationen mit sehr kleinem Partikeldurchmesser ( $< 40 \text{ nm}$ ) werden die Proben unverdünnt vermessen. Pro Probe werden drei Hauptmessungen zu je 120 sec

durchgeführt, wobei jede der Messungen wiederum aus 10 Einzelmessungen besteht.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgt im *Contin*-Modus. Der Z-Average als mittlerer hydrodynamischer Durchmesser der Liposomendispersion ergibt sich aus dem Mittelwert der drei Hauptmessungen. Der Polydispersitätsindex, ein Mass für die Breite der Verteilung, liegt in der Regel bei  $< 0,1$ , was einer monomodalen Verteilung entspricht. Ergibt die Messung einen Polydispersitätsindex von über  $0,3$ , was auf ein sehr breites, inhomogenes Partikelgrössenspektrum schliessen lässt, muss die Liposomenpräparation nochmals neu hergestellt werden.

### **2.5.2 $\zeta$ -Potentialmessungen**

Die  $\zeta$ -Potentialmessungen werden nach dem unter 1.3.4.2 beschriebenen Prinzip durchgeführt. Die Proben werden mit 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (Tabelle 2-9) soweit verdünnt, dass das Streulichtsignal des He-Ne-Lasers ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) 30'000 bis 500'000 Zählimpulse pro sec beträgt. Üblicherweise werden dazu bei einer 20 mM Liposomendispersion 25 bis 50  $\mu\text{l}$  der Zubereitung ad 5,0 ml mit Puffer versetzt. Der Phosphatpuffer wird vor dem Verdünnungsschritt über einen Oberflächenfilter der Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert, um störende Schwebstoffe zu entfernen.

Vor den Messungen wird die Messzelle mit Millipore<sup>®</sup>-Wasser so lange gespült, bis die Intensität des Streulichtsignals der wassergefüllten Zelle  $< 2000 \text{ counts pro sec}$  beträgt. Lässt sich dieser Wert auch nach längerem Spülen nicht erreichen, muss die Zelle ausgebaut und mit Ethanol oder milder Detergenlösung gründlich gereinigt werden.

Beim Einführen der Probe in die Messzelle sollte genauestens darauf geachtet werden, dass in der Zelle und im Bereich der Elektroden keine Luftblasen vorhanden sind, die den Laserstrahl oder das elektrische Feld beeinflussen können. Die Messungen werden bei einer Zellspannung von 150 V bzw. einem daraus resultierenden elektrischen Feld von 30 V/cm, einer Modulatorfrequenz von 250 Hz und einer Correlator sample time von 400  $\mu\text{sec}$  durchgeführt. Der Duty Cycling Modus verhindert ein zu starkes Erwärmen der Probe während den Messungen. Es werden pro Probe mind. 5 Einzelmessungen zu je 20 sec durchgeführt.

Das  $\zeta$ -Potential errechnet sich aus dem Mittelwert der Messungen. Einzelmessungen mit grossen absoluten Standardabweichungen ( $> \pm 3 \text{ mV}$ ) und Messungen, die mehr als einen  $\zeta$ -Potentialwert ergaben, werden nicht berücksichtigt.



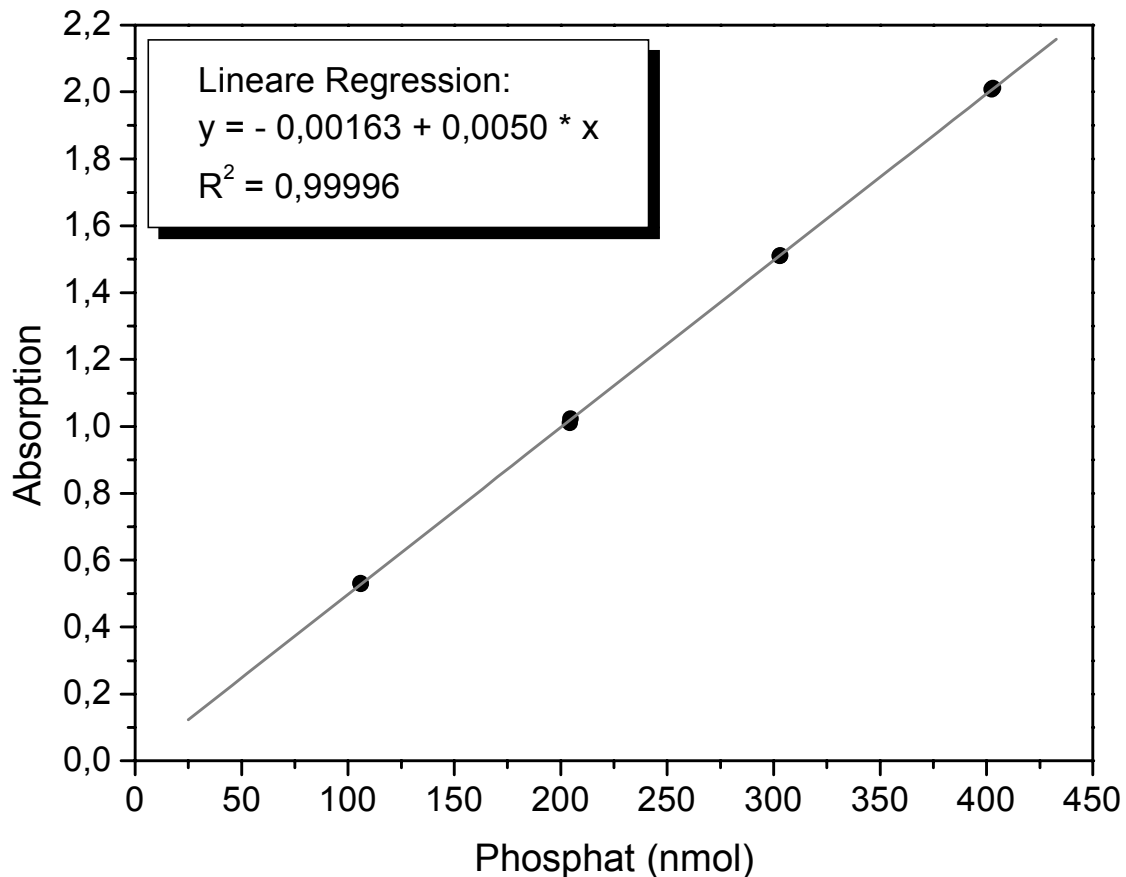
### 2.5.3 Phospholipid-Quantifizierung

#### 2.5.3.1 Bartlett-Methode

Bei der Quantifizierungsmethode nach Bartlett (Bartlett, 1959) wird der Phospholipid-Gehalt einer liposomalen Probe indirekt über die Quantifizierung des freien Phosphates nach oxidativer Veraschung ermittelt.

Bei der Durchführung kommen ausschliesslich phosphatfrei gespülte Glasgefässe zum Einsatz. Zudem werden alle Lösungen mit Millipore®-Wasser, welches mit einer Leitfähigkeit von unter  $5,5 \cdot 10^{-8} \mu\text{S/cm}$  sehr ionenarm ist, angesetzt. Bei folgender Versuchsdurchführung sollte das Probenvolumen 2 ml nicht überschreiten und die Probe nicht mehr als 10  $\mu\text{g}$  Phosphor enthalten. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen, werden Standardlösung und Proben auf der Analysenwaage gewogen. Es werden jeweils Doppelwerte angesetzt.

Zur Erstellung einer Kalibrationsfunktion werden 0, 100, 200, 300 und 400  $\mu\text{l}$  einer Phosphat-Standardlösung (1mM Phosphat) in Reagenzgläser pipettiert. Das Probenvolumen wird so berechnet, dass die Probe nicht mehr als 10  $\mu\text{g}$  Phosphor enthält, wobei für die Berechnung davon ausgegangen werden kann, dass ca. 4% (m/m) der Lipidmenge Phosphor darstellen. Bei einer Liposomendispersion mit einer Konzentration von 20 mM werden üblicherweise 15  $\mu\text{l}$  Probe eingesetzt. Alle Ansätze werden mit 500  $\mu\text{l}$  10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt, kurz gevortext und während 3 h bei 160 °C im Trockenschrank verascht. Nach Zufügen von jeweils 140  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (30%, V/V) werden alle Proben für weitere 2 h bei 160 °C inkubiert. Dann werden 4,6 ml Ammoniummolybdat-Lösung (0,22%, m/V) und 200  $\mu\text{l}$  Fiske-Subbarow Reducer-Lösung (14,8%, m/V) hinzu pipettiert. Beide Lösungen sind vor Gebrauch frisch herzustellen. Die Proben werden gevortext, die Reagenzgläser mit Glasmurmeln abgedeckt und für 10 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird die Intensität der Blaufärbung photometrisch bei 830 nm gegen den Leerwert erfasst. Über die aus den Daten der Standard-Proben ermittelte Kalibrationsfunktion (Abbildung 2-3) wird die Phosphat-Konzentration der Proben errechnet, die gleich der Phospholipidkonzentration ist.



**Abbildung 2-3** Beispiel einer Kalibrationsfunktion zur Bestimmung des Phosphatgehaltes nach der Bartlett-Methode

### 2.5.3.2 Steward-Assay

Der Steward-Assay (Stewart, 1980) stellt eine Alternative zur Methode nach Bartlett dar und kann dann zum Einsatz kommen, wenn die zu quantifizierende Liposomenprobe in hochmolarem Phosphatpuffer vorliegt. Der Assay macht sich zunutze, dass Phospholipide in organischer Lösung einen farbigen Komplex mit Ammoniumferrothiocyanat bilden, die spektrophotometrisch vermessen werden können.

Zur Erstellung einer Kalibrationsfunktion werden 0, 100, 200, 400, 600 und 800  $\mu\text{l}$  einer EPC-Stammlösung (0,1 mg/ml in  $\text{CHCl}_3$ ) in Reaktionsgefäße aus Glas pipettiert. Dann werden die Lösungen mit  $\text{CHCl}_3$  ad 2,0 ml versetzt. Nun wird zu den Kalibrationsproben je 2,0 ml 0,1 M Ammoniumferrothiocyanat-Lösung hinzugefügt. Von der zu analysierenden Probe werden bei einer Phospholipid-Konzentration von 20 mM 15  $\mu\text{l}$  in ein Glasreaktionsgefäß eingewogen und mit 2,0 ml  $\text{CHCl}_3$  versetzt.

Nachdem 10 sec gevortext wurde, wird die Lösung mit 1,985 ml 0,1 M Ammoniumferrothiocyanat-Lösung versetzt. Alle Ansätze werden nun während 20 sec gevortext und in einer Zentrifuge 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschliessend wird die Absorption der (unteren) organischen Phase bei 485 nm erfasst. Über die anhand der Standardproben erhaltene Kalibrationsfunktion (Abbildung 2-4) kann der Phospholipid-Gehalt berechnet werden. Wie bei der Methode nach Bartlett werden jeweils Doppelwerte bestimmt.

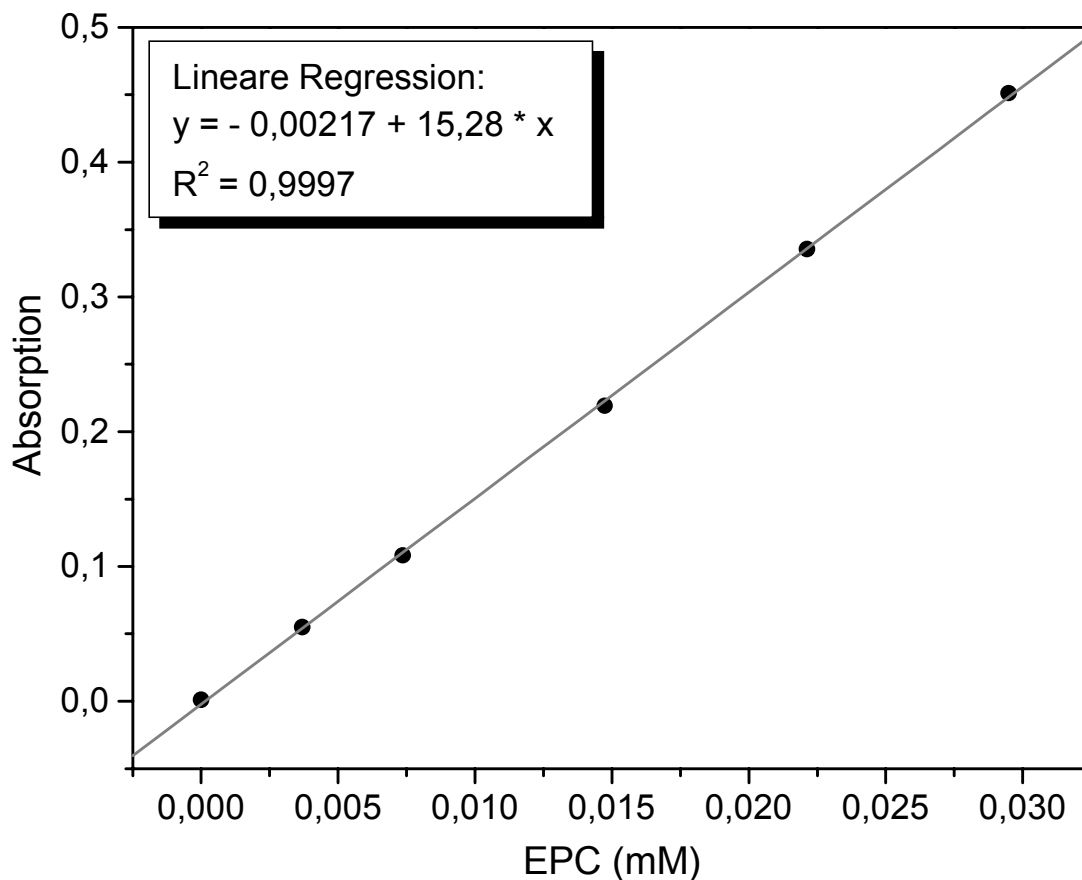


Abbildung 2-4 Beispiel einer Kalibrationsfunktion zur Bestimmung des Phospholipidgehaltes nach Stewart

## 2.6 Expression und Isolierung des ns-LTP in *E. coli*

### Expression von ns-LTP und Präparation des Rohextraktes:

Zur Expression des ns-LTP werden 1000 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Carbenicillin) mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wird bei 37 °C und unter intensivem Schütteln so lange inkubiert, bis die optische Dichte, gemessen bei 600 nm, bei 0,5 bis 0,7 liegt. Dann wird die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG

(Endkonzentration 1 mM) gestartet. 6 h nach Induktion werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 9800 x g während 15 min bei 4 °C pelletiert. Anschliessend werden die Bakterien in 30 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von PMSF ad 1 mM und 1 ml Lysozymlösung (50 mg/ml in PBS) wird das Gemisch während 30 min unter gelegentlichem Schwenken auf Eis gelagert. Nun wird Triton X-100 hinzugefügt (Endkonzentration 0,1 %) und das Gemisch 6-mal 30 sec ultrabeschallt (Ultraschallspitze, 60 % Leistung). Anschliessend folgt ein Zentrifugationsschritt bei 40'000 x g und 4 °C während 20 min.

### **Isolierung von ns-LTP:**

Ns-LTP ist gentechnisch am N-Terminus mit einem His-Tag versehen (Wieland-Berghausen, 1999). Dabei handelt es sich um 6 aufeinanderfolgende Histidine, die eine hohe Affinität zu (immobilisierten) zweiwertigen Metallionen aufweisen. So kann das Protein über ein Ni-NTA Gel isoliert und aufgereinigt werden.

2 ml einer Ni-NTA Gel Suspension werden mit 6-mal 2,5 ml PBS gewaschen. Der Überstand der Zentrifugation (Rohextrakt) wird zum Gelmaterial gegeben und der Ansatz während 15 min auf Eis bewegt. Fremdproteine mit unspezifischer Affinität zum Ni-NTA Gel werden dann mit 8-mal 5 ml 20 mM Imidazolösung in PBS gewaschen und das ns-LTP mit 6-mal 2 ml 400 mM Imidazolösung in PBS abeluiert.

### **Entfernung des Imidazols:**

In einer Amicon Ultrafiltrationszelle, die mit einer Ultrafiltrationsmembran versehen ist (cutoff 10 kDa), wird das Eluat unter N<sub>2</sub>-Druck (3,5 bis 4,0 bar) bei 4 °C von 12 auf 4 ml aufkonzentriert. Nach Zugabe von 6 ml PBS wird das Volumen auf 2 ml reduziert. Es wird nochmals PBS ad 10 ml hinzugefügt und wieder auf 2 ml aufkonzentriert. Das Protein wird bei - 27 °C gelagert.

### **Proteinbestimmung nach Bradford:**

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem Bio Rad Proteinbestimmungsassay nach den Angaben des Herstellers. Als Standard wird BSA (Pierce) in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 20 µg/ml eingesetzt.

## **2.7 Klonierung und Expression der PSD als GST-Fusionsprotein**

### **2.7.1 Präparation der Gesamt-DNA aus *E. coli***

#### **2.7.1.1 Isolierung der DNA**

Als Quelle für die Gesamt-DNA von *E. coli* dient der Top 10 Stamm von Invitrogen. 4 ml einer ÜNK der Bakterien in LB-Medium werden bei 3800 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl TE-Puffer pH 7,4 aufgenommen. Die Suspension wird bei - 28 °C eingefroren. Zur tiefgefrorenen Suspension werden 75 µl einer 10 mg/ml Lysozym-Lösung in Tris pH 8,0 gegeben, die Suspension bei RT aufgetaut und während 45 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl STEP-Puffer wird die Mischung bei 50 °C für weitere 60 min inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 13'000 x g während 5 min. Der Überstand wird entnommen und mit 400 µl eiskaltem Isopropanol versetzt, wodurch die DNA und RNA ausfallen. Die weissen Fäden werden auf eine Pipettenspitze aufgerollt und zweimal 30 sec in Ethanol 70 % (V/V) getaucht. Nach kurzem Trocknen der Nucleinsäure bei RT wird sie in 600 µl TE-Puffer pH 7,4 gelöst.

#### **2.7.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration erfolgt nach einer 1:20 Verdünnung mit TE-Puffer UV-spektrophotometrisch bei  $\lambda = 260$  nm gegen reinen Puffer. Die DNA-Konzentration der Probe errechnet sich über folgende Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Absorption}_{260 \text{ nm}} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Gleichung 2-1

Zusätzlich wird die Probe bei  $\lambda = 280$  nm vermessen. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm stellt ein Mass für die Verunreinigung der Probe mit Proteinen dar. Bei einem Verhältnis der Absorptionen  $A_{260}/A_{280} \sim 2$  kann davon ausgegangen werden, dass die DNA-Lösung weitgehend proteinfrei ist.

Für die isolierte DNA ergab sich eine Konzentration von 260 µg/ml bei  $A_{260}/A_{280} = 1,87$ .

### 2.7.2 PCR

Für die Polymerase Kettenreaktion werden unter Berücksichtigung der DNA-Sequenz der PSD und der in der MCS vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen folgende Primer ausgewählt:

Hinprimer:

5' C CTG GAG GGA TCC TTG TTA AAT TC 3'  
*Bam H I*

- Anzahl Basen: 24 / GC-Anteil: 46 %

Rückprimer:

5' GAT AAT CTC GAG CAC GTC AGC GTT TCC 3'  
*Xho I*

- Anzahl Basen: 27 / GC-Anteil: 52 %

Der Mastermix ist folgendermassen zusammengesetzt:

Puffer 10x	5,0 µl
dNTP's Mix (je 10 mM)	1,0 µl
Hinprimer (11,0 pmol/µl)	1,0 µl
Rückprimer (10,2 pmol/µl)	1,0 µl
E. coli DNA (260 µg/ml)	1,0 µl
Nucleasefreies Wasser	39,5 µl
Pfu Polymerase (2-3 U/µl)	1,5 µl
Total	50,0 µl

Thermocycler-Programmierung:

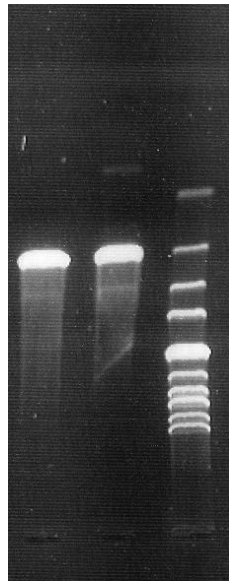
95 °C	3,5 min	Denaturierung
→ Zugabe der Pfu Polymerase		
95 °C	0,5 min	Denaturierung
58 °C	0,5 min	Annealing

73 °C	2,0 min	Amplifikation
→ 30 Schleifen		
73 °C	10,0 min	Elongation
4 °C	∞	

### 2.7.3 Analytisches Agarosegel

Zur Überprüfung der PCR wird ein analytisches Agarosegel angesetzt. Dazu werden 2,4 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer suspendiert. Die Suspension wird in einem Mikrowellenherd bis auf Siedetemperatur erhitzt, um die Agarose zu lösen. Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt ist, werden 10 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt und ein ca. 0,5 cm dickes Gel gegossen.

5 µl der PCR-Ansätze werden mit 1 µl 5x DNA Loading Buffer versetzt und nach Erstarren des Geles in die vorgeformten Probestaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt in TAE-Puffer bei 76 V während 60 min.



**Abbildung 2-5 Analytisches Agarosegel 1,2% des PCR-Ansatzes. Bahn 1 und 2: PCR-Ansätze, Bahn 3: Marker. Die GröÙe des PCR-Produktes liegt bei ca. 1000 bp und stimmt somit gut mit dem errechneten Wert von 1018 bp überein**

Als Marker wird eine 1 kb DNA Leiter aufgetragen. Die berechnete GröÙe des PCR-Produktes beträgt 1018 kb. Unter UV-Licht von 254 nm werden die Banden im Gel sichtbar gemacht. Die Beleuchtungszeit wird dabei so kurz wie möglich gehalten, um Schäden an der DNA zu minimieren.

## **2.7.4 Isolierung, Restriktionsverdau und Aufreinigung des PCR-Produktes**

### **2.7.4.1 Ethanolfällung des PCR-Ansatzes**

Die Ethanolfällung wird durchgeführt, um für das weitere Vorgehen unerwünschte Substanzen wie Proteine, Nucleotide und Salze zu entfernen.

Zuerst wird dem Ansatz 10 % seines Volumens an 3 M Kaliumacetat-Lösung pH 5,2 zugesetzt. Dann wird er mit dem 2,5-fachen seines Ausgangsvolumens an 100 % eiskaltem Ethanol versetzt, um die DNA zu fällen. Eine vollständige Fällung erreicht man durch Inkubation des Ansatzes bei -28 °C während 60 min. Die DNA wird 10 min bei 13'000 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 13'000 x g) wird das Pellet während 1 h bei RT getrocknet und anschliessend in einer entsprechenden Menge Tris/HCl pH 7,4 aufgenommen.

### **2.7.4.2 Restriktionsverdau des PCR-Produktes**

Durch den Restriktionsverdau des PCR-Produktes wird das Fragment für die Ligation mit dem Vektor so präpariert, dass ein gerichteter, effizienter Einbau gewährleistet ist. Als Restriktionsenzyme werde Bam H I und Xho I gewählt. Sie weisen beide keine Schnittstelle im PSD-Gen auf, lassen sich durch Hitze inaktivieren, zeigen hohe Aktivität im gleichen Puffer und hinterlassen an den Schnittstellen 4-Basen-Überhänge, was die Ligationseffizienz erhöht. Damit die Enzyme am 5' Ende des PCR-Fragmentes angreifen können, sollten nach der Schnittstelle noch mind. 6 weitere Basen folgen. Dies muss beim Primerdesign berücksichtigt werden (vgl. 2.7.2).



Restriktionsansatz:

PCR-Fragment	28,0 µl
10 x Restriktionspuffer	4,0 µl
BSA acetyliert 10 µg/µl	0,4 µl
Nucleasefreies Wasser	5,6 µl
Bam H I 10 U/µl	1,0 µl
Xho I 10 U/µl	1,0 µl
Total	40,0 µl

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C während 3 h.

#### **2.7.4.3 Agarosegel-Aufreinigung des Fragmentes**

Um das geschnittene Fragment von den anderen Bestandteilen des Ansatzes zu trennen und zur Überprüfung seiner Integrität wird der Restriktionsansatz auf ein 1,2 %iges (m/V) Agarosegel aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt in TAE-Puffer bei 97 V während 65 min.

Auf einem UV-Tisch werden die gesuchte Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten und die DNA nach der Vorschrift des QIAquick® Gel Extraction Kit isoliert. Dabei wird das Gelstück zuerst aufgeschmolzen und dann durch eine DNA-bindende Matrix zentrifugiert. Nach einem Waschschrift erfolgt die Abelson der DNA mit nucleasefreiem Wasser.

#### **2.7.5 Präparation und Aufreinigung des Vektors pGEX 6P-2**

##### **2.7.5.1 Herstellung des pGEX 6P-2 Vektors**

Ausgangspunkt ist ein E. coli XL I-blue Stamm, der das pGEX 6P-2 Plasmid trägt. Aus 4 ml einer ÜNK (LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin) dieser Bakterien wird der Vektor nach Vorschrift des QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert. Dabei werden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen, der Ansatz anschliessend neutralisiert und über eine DNA-bindende Matrix zentrifugiert. Nach Waschen der Matrix wird das

Plasmid mit nucleasefreiem Wasser abeluiert und steht in ausreichender Reinheit für die weiteren Schritte zur Verfügung.

Die Konzentration der in dieser Arbeit isolierten DNA (vgl.2.7.1.2) beträgt 300 µg/ml bei einem Verhältnis  $A_{260}/A_{280} = 1,88$ .

### 2.7.5.2 Restriktionsverdau des Vektors

Das pGEX 6P-2 Plasmid wird mit den gleichen Restriktionsenzymen, die unter 2.7.4 zum Einsatz kommen, geschnitten. Dabei werden sowohl ein Doppelverdau wie auch zwei Einzelverdaue angesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C während 3 h.

	Doppelverdau	Einzelverdau Bam H I	Einzelverdau Xho I
pGEX 6P-2 (300µg/ml)	5,0 µl	1,5 µl	1,5 µl
10x Restriktionspuffer	4,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
BSA acetyliert (10µg/µl)	0,4 µl	0,2 µl	0,2 µl
Nucleasefreies Wasser	29,1 µl	16,05 µl	16,05 µl
Bam H I (10 U/µl)	0,75 µl	0,25 µl	---
Xho I (10 U/µl)	0,75 µl	---	0,25 µl
Totalvolumen	40,0 µl	20,0 µl	20,0 µl

### 2.7.5.3 Agarosegel-Aufreinigung

Die Agarosegel-Aufreinigung wird analog zu Kapitel 2.7.4.3 durchgeführt, wobei die Konzentration des Gels an die Grösse des aufzureinigenden DNA-Fragmentes angepasst wird und hier 1,0 % (m/V) beträgt. Die Extraktion aus dem Gel erfolgt wiederum nach Vorschrift des QIAquick® Gel Extraction Kit.

### 2.7.6 Ligation

Bei der Ligation von Insert und Vektor wird ein 5-facher molarer Überschuss an Insert zu Vektor eingesetzt. Die Menge an Insert lässt sich über folgende Formel berechnen:

$$\frac{\text{Vektormenge (ng)} \cdot \text{Insertgrösse (kb)}}{\text{Vektorgösse (kb)}} \cdot \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Insertmenge (ng)}$$

Gleichung 2-2

Es werden 100 ng Vektor vorgelegt. Die Grösse des Vektors beträgt 4,985 kb und die des Inserts 1,0 kb. Daraus resultiert eine einzusetzende Menge Insert von 100 ng.

Ligationsansatz:

Vektor pGEX 6P-2 (20 ng/μl)	5,0 μl
Insert (17 ng/μl)	5,88 μl
10x Ligase Puffer	1,26 μl
4 Ligase (3 U/μl)	0,5 μl
Total	12,64 μl

Es ist anzumerken, dass es sich bei den DNA-Konzentrationen um Schätzwerte handelt, die sich aus der Menge DNA berechnen, die zum Restriktionsverdau eingesetzt wurde, unter Berücksichtigung von Verlusten bei der Gelextraktion, die üblicherweise zwischen 10 und 20 % liegen. Die Inkubation erfolgt während 3 h bei RT und 16 h bei 4 °C.

### **2.7.7 Transformation in Cloning Host**

100 μl einer Suspension von chemisch kompetenten E. coli XL I-blue werden auf Eis aufgetaut. Der gesamte Ligationsansatz wird hinzugefügt und durch leichtes Schnippen mit den Bakterien vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgt der Hitzeschock bei 42 °C während 2 min. Danach werden die Bakterien sofort wieder für 5 min auf Eis gelegt. Schliesslich werden 900 μl LB-Medium, welches zuvor auf RT gebracht worden ist, hinzu pipettiert, und der Ansatz wird 1 h bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert.

100 μl der Kultur werden auf einem LB-Agar mit 50 μg/ml Carbenicillin ausplattiert. Die Bakterien der restlichen 900 μl Kultur werden kurz in der Zentrifuge pelletiert, 800 μl Überstand verworfen und der Rest (ca. 100 μl) nach kurzer Homogenisation

auf eine zweite Agarplatte mit 50 µg/ml Carbenicillin verteilt. Auf diese zweite Platte wird somit im Vergleich zur ersten etwa das 10-fache an Bakterien aufgebracht.

Die Petrischalen werden für kurze Zeit mit dem Deckel nach oben bei 37 °C in den Inkubator gestellt, bis die aufgetragene Flüssigkeit vom Agar aufgenommen wurde. Dann werden sie umgedreht und über Nacht bei 37 °C bebrütet. 20 Kolonien werden mit einer sterilen Öse gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin über Nacht inkubiert.

### **2.7.8 Isolierung und Restriktionsanalyse des Plasmides**

Um die Bakterien über längere Zeit lagern zu können, werden Glycerol-Stocks angelegt. Dazu werden 500 µl der ÜNK mit 88 µl sterilfiltriertem Glycerol 85 % gut vermischt und bei -80 °C weggefroren. Aus dem Rest der ÜNK wird nach Vorschrift mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit das Plasmid isoliert, um eine Restriktionsanalyse durchzuführen. Dabei wird das zuvor eingesetzte DNA-Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wieder aus dem Vektor herausgeschnitten.

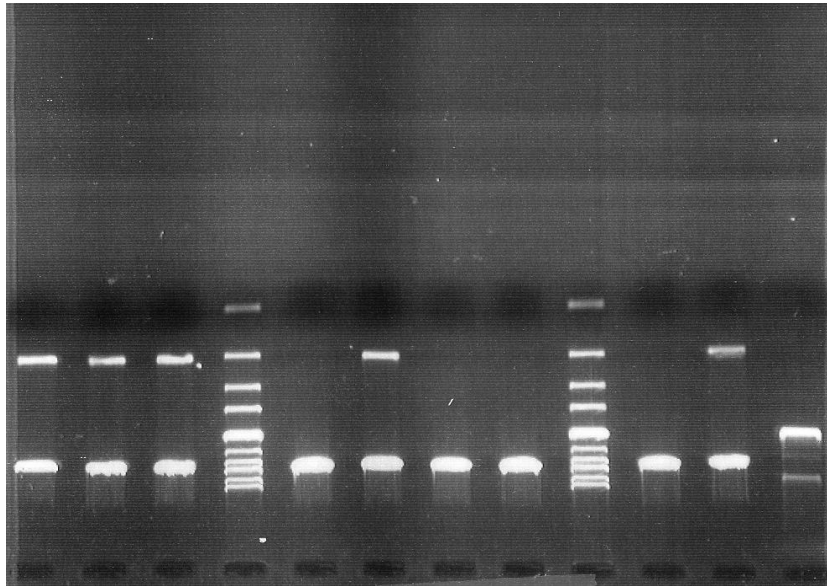
Für jeden gepickten Klon wird folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

Plasmid (280 ng/µl)	5,0 µl
10x Restriktionspuffer	4,0 µl
BSA acetyliert (10 µg/µl)	0,4 µl
Nucleasefreies Wasser	28,6 µl
Bam H I (10 U/µl)	1,0 µl
Xho I (10 U/µl)	1,0 µl
Total	40,0 µl

Die Proben werden während 3 h bei 37 °C inkubiert. 10 µl jedes Ansatzes werden mit 2 µl DNA loading buffer versetzt und auf ein 1,2 % (m/V) Agarosegel aufgetragen (vgl. 2.7.3).

Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 86 V während 35 min.

Das analytische Agarosegel (Abbildung 2-6) zeigt, dass bei der Mehrheit der Klone der Vektor das PSD-Gen trägt. Das Plasmid aus Klon 1 wird zur Transfektion des Expression Host weiter verwendet.



**Abbildung 2-6** Agarosegel der Restriktionsanalyse. Auf den Bahnen 4 und 9 ist jeweils der Marker aufgetragen. Auf den anderen Bahnen sind die Restriktionsansätze der Plasmide aus den einzelnen Klone zu sehen. Klon 4, 6 - 8 und 10 tragen das PSD-Gen nicht. Bei allen anderen Ansätzen ist auf der Höhe der 1000 bp Referenzbande eine Bande zu sehen, welche dem 999 bp Fragment des PSD-Genes entspricht.

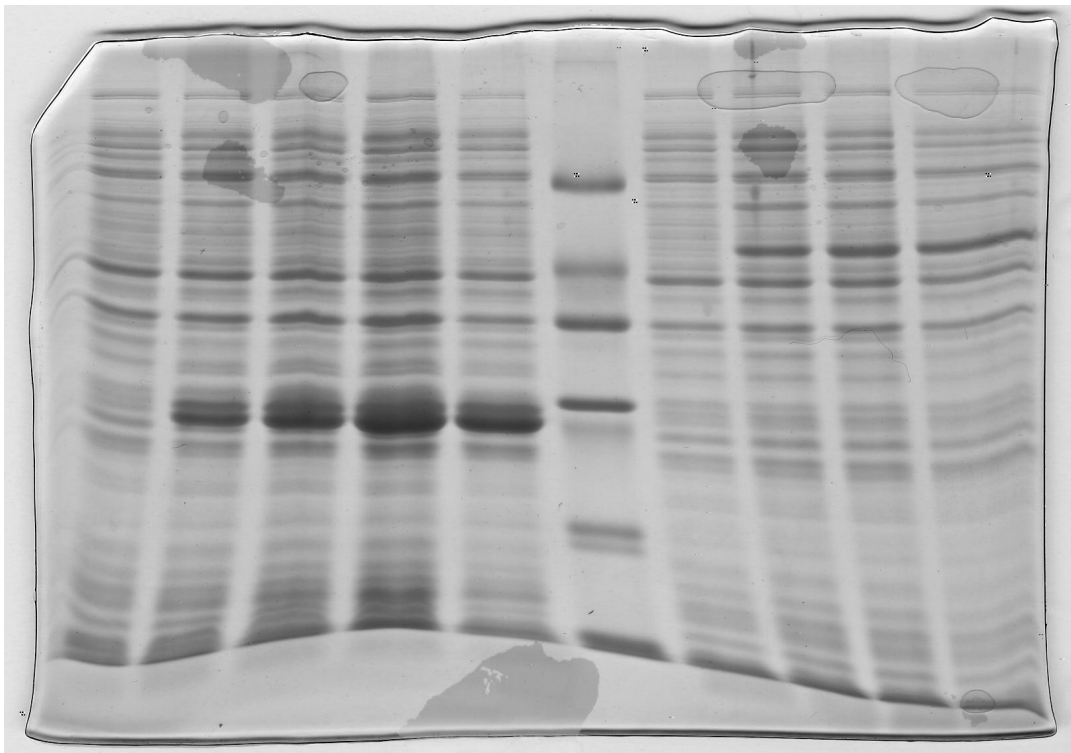
### **2.7.9 Transformation in Expression Host**

Als Expression Host wird der E. coli Stamm BL21 (DE3) pLysS verwendet. 100  $\mu$ l Bakteriensuspension werden eingesetzt. Die Transformation erfolgt wie in Kapitel 2.7.7 beschrieben. Der zum Ausplattieren verwendete LB-Agar enthält neben 50  $\mu$ g/ml Carbenicillin zusätzlich 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol. Nach der Inkubation über Nacht wird eine isolierte Kolonie gepickt und in LB-Medium (mit 50  $\mu$ g/ml Carbenicillin und 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) transferiert.

### **2.7.10 Überprüfung auf Proteinexpression**

Zur Überprüfung der Proteinexpression werden 50 ml LB-Medium (mit 50  $\mu$ g/ml Carbenicillin und 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) mit 1 ml ÜNK beimpft. Eine Positivkontrolle mit einem Expression Host, der den reinen pGEX 6P-2 Vektor trägt, wird ebenfalls angesetzt. Bei 37 °C werden die Kulturen solange unter intensivem Schütteln inkubiert, bis die Suspensionen eine optische Dichte  $OD_{600}$  von 0,6, die UV-spektrophotometrisch bei  $\lambda = 600$  nm gemessen wird, erreicht haben. Dann wird

die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) gestartet. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 1, 2, 3$  und 4 h nach IPTG-Zugabe wird jeweils 1 ml Kultur entnommen. Die Bakterien werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100  $\mu$ l 4 x SDS Sample Buffer aufgenommen. Vor der Auftrennung mittels Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine durch Erhitzen auf 97 °C während 5 min vollständig denaturiert. 10  $\mu$ l der Proben und 5  $\mu$ l Proteinstandard werden auf ein 12,5 %iges (m/V) Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei 10 mA während 10 min und dann 30 mA während 90 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für 45 min in einer Fixierlösung geschwenkt, 30 min in einer Färbelösung gefärbt und bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes in eine Entfärbelösung getaucht.



**Abbildung 2-7** Beispiel eines SDS-PAGE Gels. Bahnen 1-5: Positivkontrolle (reiner pGEX 6P-2 Vektor), 0, 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion. Die stärker werdende Bande auf der Höhe des 29 kDa Markers stellt die GST, die ca. 26 kDa gross ist, dar. Bahnen 7-10: E. coli mit pGEX 6P-2<sup>PSD</sup>, 0, 1, 2 und 3 h nach Induktion. Die nach 1 h sichtbar werdende Bande über dem 45 kDa Marker stellt das Fusionsprotein, welches ein Gewicht von ca. 56 kDa aufweist, dar. Bahn 6: Low Molecular Weight Marker (66, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 kDa)

Auf dem Gel ist zu erkennen, dass die Expression eines Genes aus dem pGEX 6P-2 Vektor in BL21 (DE3) pLysS möglich ist. Auch die Expression des Fusionsproteins ist

erfolgreich. An den Markerbanden lässt sich ein Gewicht von ca. 54 kDa abschätzen, was dem erwarteten Gewicht von 56 kDa relativ nahe kommt. Die eher schwach ausgeprägten Banden deuten allerdings darauf hin, dass nur geringe Mengen Fusionsprotein produziert wurden. Deshalb wird im Folgenden das Augenmerk auf die Verbesserung der Proteinexpression gelenkt.

### **2.7.11 Optimierung der Proteinexpression**

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Fusionsprotein zu erhalten, wird die Expression in *E. coli* schrittweise optimiert. Faktoren, die die Expression beeinflussen können sind

- Inkubationstemperatur
- Kulturmedium
- IPTG-Konzentration
- Glucosezugabe
- Inkubationsdauer.

Als Inkubationstemperaturen werden 16, 26 und 37 °C gewählt, als Kulturmedien LB-Medium und TB-Medium, und die IPTG-Konzentration variiert zwischen 50 und 500 µM. Die Inkubationsdauer beträgt je nach Temperatur zwischen 4 und 22 h. Da eine befriedigend hohe Ausbeute an Fusionsprotein nach 7 h Inkubation bei 26 °C in TB-Medium, welches 0,5 % (m/V) Glucose enthält, und bei einer IPTG-Konzentration von 100 µM erreicht wird, werden diese Bedingungen als optimal betrachtet.

### **2.7.12 Isolierung des Fusionsproteins**

Mit 1 ml einer ÜNK (TB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) wird 1 l TB-Medium gleicher Zusammensetzung beimpft. Die Kultur wird bei 37 °C so lange geschüttelt, bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,7 liegt. Nach Abkühlung auf 26 °C wird die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG ad 100 µM gestartet.

Nach 7 h Inkubation bei 26 °C werden die Bakterien 10 min bei 10'200 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 30 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Es wird nun PMSF ad 1 mM, 1,5 ml einer 10 mg/ml Lysozym-Lösung in PBS und 0,5 ml einer 2 mg/ml RNase A-Lösung in PBS hinzugefügt und die Suspension unter gelegentlichem Schütteln auf Eis gelagert. Dann wird die Mischung während 20 sec

bei einer Leistung von 40 % ultraschallt und 2 min auf Eis gestellt. Dies wird 4-mal wiederholt.

Unlösliche Zellbestandteile werden nun bei 15'800 x g während 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wird entnommen, mit 1,33 ml Glutathion-Sepharose 4B versetzt und auf Eis für 2 h auf dem Wipptisch inkubiert. Das Gelmaterial wird anschliessend bei 500 x g und RT 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Sepharose mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Das GST-PSD Fusionsprotein wird dann durch 5-malige Zugabe von 1 ml eiskaltem Elutionspuffer abeluiert. Zwischen den Elutionsschritten wird wiederum zentrifugiert.

Zur Gewinnung der reinen PSD wird das an der GST-Sepharose immobilisierte Fusionsprotein mittels PreScission<sup>®</sup> Protease zwischen GST- und PSD-Anteil gespalten. Dazu wird das Säulenmaterial nach den Waschsritten mit 10 ml PreScission<sup>®</sup>-Puffer umgepuffert. Nach Zugabe von 20 U PreScission<sup>®</sup> Protease wird der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Während die PreScission<sup>®</sup>-Protease auf der Säule verbleibt, lässt sich die reine PSD durch Zugabe von zweimal 1 ml PreScission<sup>®</sup>-Puffer abeluiieren.

Die Bestimmung der gewonnenen Menge an Fusionsprotein im Rohextrakt und im Eluat geschieht über das GST Detection Module (Pharmacia) nach Vorschrift des Herstellers.



## **2.8 Präparation von Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung**

### **2.8.1 Spontaner Austausch**

Um durch spontanen Austausch von Phospholipiden Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung herzustellen, werden äquimolare Mengen Donorliposomen, bei denen das entsprechende Lipid symmetrisch im Bilayer inkorporiert ist, und Akzeptorliposomen aus reinem EPC gemischt und bei 25°C bzw. 37 °C unter Rühren inkubiert. Beide Vesikelarten, die ungefähr gleich gross sein sollen, werden mittels DD (2.4.2) hergestellt und sind vorwiegend unilamellar. Die Trennung der beiden Liposomenpopulationen gelingt über die FFE. Für anschliessende Flipp-Flopp-Untersuchungen darf der Lipidaustausch allerdings nicht vollständig ablaufen, da sich die Vesikelarten sonst nicht mehr in ihrer Oberflächenladung unterscheiden würden.

Die Versuchsparameter (eingesetzte Menge Liposomen, Inkubationstemperatur und -dauer, FFE-Parameter) sind den einzelnen Experimenten zu entnehmen.

### **2.8.2 Proteinvermittelter Austausch**

Das Vorgehen entspricht weitgehend dem oben (2.8.1) beschriebenen. Durch Zugabe von ns-LTP lässt sich allerdings die Inkubationsdauer erheblich reduzieren. Die Menge an eingesetztem Protein wird nach der Gesamtlipidmenge berechnet und ist bei den einzelnen Experimenten in nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid angegeben. Die Versuchsparameter (eingesetzte Menge Liposomen und ns-LTP, Inkubationstemperatur und -dauer, FFE-Parameter) sind wiederum den Einzelexperimenten zu entnehmen.

## 2.9 Methoden zur Verfolgung des Lipidaustausches

### 2.9.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

#### 2.9.1.1 Herstellung der Liposomen

Die bei den FRET-Messungen eingesetzten Liposomen werden mittels DD hergestellt (vgl. 2.4.2), um weitgehend unilamellare Liposomen zu erhalten. Bei der Filmherstellung wie auch während der Dialyse werden die Präparationen mit Alufolie vor Licht geschützt.

Die Donorliposomen setzen sich folgendermassen zusammen:

EPC	4,0 mg	5,13 $\mu\text{mol}$	96 mol%
Rh-PE	0,141 mg	0,106 $\mu\text{mol}$	2 mol%
C <sub>12</sub> -NBD-PC	0,0908 mg	0,106 $\mu\text{mol}$	2 mol%
Na-C	4,42 mg	10,26 $\mu\text{mol}$	2:1 Überschuss

Der Film wird in 513  $\mu\text{l}$  10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mizellar gelöst. Die Lipidkonzentration beträgt 10 mM. Die Dialyse wird wie beschrieben (2.4.2) gegen den gleichen Puffer durchgeführt.

Die Akzeptorliposomen haben folgende Zusammensetzung:

EPC	8,0 mg	10,26 $\mu\text{mol}$	100 mol%
Na-C	8,84 mg	20,52 $\mu\text{mol}$	2:1 Überschuss

Der Film wird in 1026  $\mu\text{l}$  10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mizellar gelöst. Die Lipidkonzentration beträgt 10 mM. Die Dialyse wird wie beschrieben (2.4.2) gegen den gleichen Puffer durchgeführt. Nach der Dialyse wird von beiden Ansätzen eine Phospholipid-Quantifizierung nach Steward (2.5.3.2) durchgeführt.

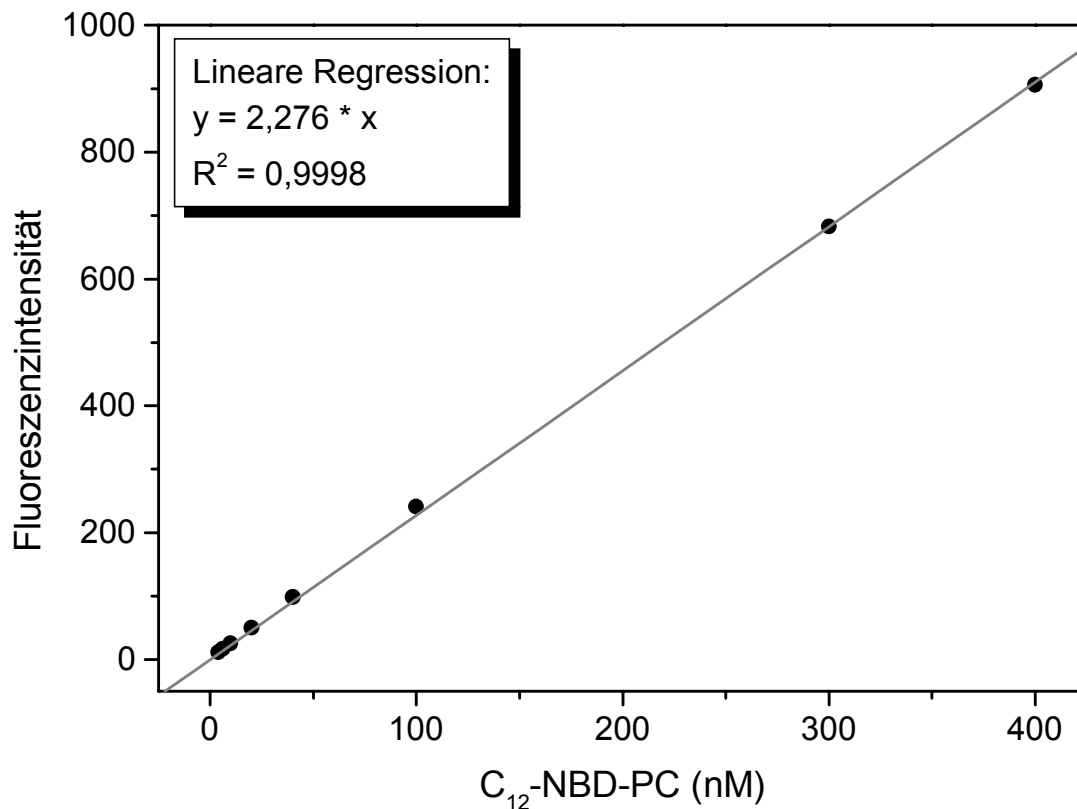
### 2.9.1.2 Bindung des C<sub>12</sub>-NBD-PC an das ns-LTP

Um die Bindung des C<sub>12</sub>-NBD-PC an das ns-LTP zu erfassen, werden aufsteigende Mengen Donorvesikel mit einer konstanten Menge ns-LTP inkubiert. Das Volumen der Probe beträgt 2,5 ml. Die Messungen erfolgen mit einem LS 50B Fluorimeter (Perkin Elmer) bei  $\lambda_{\text{ex}} = 464 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$ , Spaltbreite Ex: 7 nm, Em: 15 nm, und bei einer Temperatur von  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vor Gebrauch wird die Liposomenpräparation auf eine Gesamtlipidkonzentration von 0,5 mM mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. Während den Messungen wird die Probe mit einem Magnetrührer (Stufe 2) gemischt.

**Tabelle 2-13** Eingesetzte Menge Donorliposomen bzw. C<sub>12</sub>-NBD-PC beim Bindungsexperiment. Aufsteigende Mengen Donorliposomen werden mit einer konstanten Menge ns-LTP inkubiert. Die Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC an das ns-LTP kann über einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Donorfluorophors (NBD) verfolgt werden

Donorliposomen [ $\mu\text{l}$ ]	Gesamtlipid [ $\mu\text{M}$ ]	C <sub>12</sub> -NBD-PC [nmol]	ns-LTP [nmol]
1	0,2	0,01	2,5
1,5	0,3	0,015	2,5
2,5	0,5	0,025	2,5
5	1	0,05	2,5
10	2	0,1	2,5
25	5	0,25	2,5
75	15	0,75	2,5
100	20	1	2,5

In einer Quarzküvette wird eine entsprechende Menge vortemperierter Puffer vorgelegt. Nach Zugabe der Donorliposomen wird einige sec gewartet, bis die Liposomen sich homogen verteilt haben, und dann die Messung gestartet. Nach 30 sec wird das Protein hinzugefügt. 5 min später werden die Liposomen durch Zugabe von Triton X-100 ad 0,1 % solubilisiert, wodurch die Fluoreszenz auf einen maximalen Wert ansteigt (= 100%). Anhand einer Kalibrationsfunktion (Abbildung 2-8) lässt sich der gebundene Anteil C<sub>12</sub>-NBD-PC berechnen.



**Abbildung 2-8** Beispiel einer Kalibrationsfunktion von C<sub>12</sub>-NBD-PC. Donorliposomen werden durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration: 0,1 % (V/V)) solubilisiert und die Fluoreszenzintensität unter den oben genannten Bedingungen gemessen

### 2.9.1.3 Austausch von C<sub>12</sub>-NBD-PC

Zur Bestimmung der Kinetik des Austausches von C<sub>12</sub>-NBD-PC zwischen Donor- und Akzeptorliposomen werden aufsteigende Mengen Donorliposomen in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 vorgelegt. Die Messung erfolgt mit den Einstellungen, die unter 2.9.1.2 beschrieben sind. Vor Gebrauch werden die Liposomenpräparationen auf eine Gesamtlipidkonzentration von 2,0 mM mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. 30 sec nach Start der Messung wird eine äquimolare Menge Akzeptorliposomen hinzugefügt und der spontane Lipidaustausch während 2,5 min verfolgt. Nach Zugabe von 0,5 nmol ns-LTP wird die Intensitätsänderung der Fluoreszenz weitere 5 min verfolgt. Das Gesamtvolumen der Probe beträgt 2,5 ml.

**Tabelle 2-14** Eingesetzte Mengen Donor- und Akzeptorliposomen beim Austausch von C<sub>12</sub>-NBD-PC. Donorliposomen werden mit einer äquimolaren Menge Akzeptorliposomen inkubiert. Der Austausch kann über einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Donorfluorophors (NBD) verfolgt werden

Donorliposomen		Akzeptorliposomen			ns-LTP [nmol]
Volumen [μl]	Gesamtlipid [μM]	Volumen [μl]	Gesamtlipid [μM]	C <sub>12</sub> -NBD-PC [nmol]	
6,25	5	6,25	5	0,25	0,5
18,75	15	18,75	15	0,75	0,5
50	40	50	40	2	0,5
75	60	75	60	3	0,5
150	120	150	120	6	0,5
200	160	200	160	8	0,5

Zur Quantifizierung des Transfers von C<sub>12</sub>-NBD-PC werden die initialen Transferaten des spontanen wie des proteinvermittelten Austausches bestimmt und in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge C<sub>12</sub>-NBD-PC gebracht.

## 2.9.2 FFE

Mit der FFE (vgl. 2.3.1) kann die Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von Donor- und Akzeptorliposomen aufgrund des Austausches von negativ geladenen Phospholipiden verfolgt werden. So wird der spontane wie auch der proteinvermittelte Transfer von EPG und EPS bei verschiedenen Liposomenpräparationen zeitabhängig untersucht. Nach Auftrennung der Proben werden die in 10 ml Rörchen gesammelten Fraktionen UV-spektrophotometrisch bei  $\lambda = 230$  nm vermessen.

### 2.9.2.1 Austausch von EPG

Zur Untersuchung des Austausches von EPG werden Donorliposomen mit unterschiedlichen Anteilen EPG hergestellt. Die Akzeptorliposomen bestehen aus reinem EPC. Die Vesikel werden mittels DD hergestellt (vgl. 2.4.2), um vorwiegend unilamellare Liposomen zu erhalten.

Für die Versuche werden jeweils äquimolare Mengen Donor- und Akzeptorvesikel gleicher Grösse gemischt und bei RT bzw. 37 °C unter Rühren inkubiert. Zu gegebenen Zeitpunkten werden Aliquots entnommen und über FFE aufgetrennt. Die Auftrennung geschieht immer bei einer Kammertemperatur von 9 °C und im unter 2.2.1 beschriebenen Puffersystem.

Die genauen Angaben über die Zusammensetzung der Donorvesikel, die zur Trennung angelegte Spannung, die Flussraten der einzelnen Puffer, die eingesetzte Menge Protein, die Inkubationszeit und -temperatur und die Volumina der FFE-Proben sind den einzelnen Experimenten zu entnehmen.

### **2.9.2.2 Austausch von EPS**

Zur Bestimmung des Austausches von EPS wird wie in Kapitel 2.9.2.1 beschrieben vorgegangen.

Die genauen Angaben über die Zusammensetzung der Donorvesikel, die zur Trennung angelegte Spannung, die Flussraten der einzelnen Puffer, die eingesetzte Menge Protein, die Inkubationszeit und -temperatur und die Volumina der FFE-Proben sind den einzelnen Experimenten zu entnehmen.

## ***2.10 Methoden zur Bestimmung von Lipidverteilung und Flipp-Flopp***

Zur Bestimmung des Flipp-Flopp von Phospholipiden werden Liposomen mit einer unsymmetrischen Lipidverteilung wie unter 2.8.2 hergestellt. Nach Auftrennung von Donor- und Akzeptorvesikeln zu FFE stehen die gesammelten liposomenhaltigen Fraktionen für Untersuchungen über Lipidverteilung und Flipp-Flopp zur Verfügung. In der Regel werden diejenigen Fraktionen, in denen sich die Donor- bzw. Akzeptorliposomen hauptsächlich befinden, vor den Untersuchungen gepoolt.

Da die Liposomen durch die FFE-Trennung stark verdünnt werden (Faktor 20 bis 40) und in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (Tabelle 2-9) vorliegen, wird der Steward-Assay (2.5.3.2) zur Bestimmung der Lipidkonzentration herangezogen.

## 2.10.1 $\zeta$ -Potentialmessungen

### 2.10.1.1 Zusammenhang zwischen EPG-Gehalt und $\zeta$ -Potential von Liposomen

Um dem Zusammenhang von EPG-Gehalt und  $\zeta$ -Potential von Liposomen zu untersuchen, werden EPC-Liposomen mit einem EPG-Gehalt von 0 bis 20 mol% hergestellt.

Für 1 ml Liposomendispersion mit der Gesamtlipidkonzentration von 20 mM werden folgende Mengen Lipid eingesetzt:

**Tabelle 2-15 Herstellung von extrudierten EPC-Liposomen (Gesamtphospholipidkonzentration 20 mM) mit unterschiedlichen Anteilen EPG zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen EPG-Gehalt und  $\zeta$ -Potential der Liposomen**

Ansatz	EPC		EPG	
	[mg]	[mol%]	[mg]	[mol%]
1	15,60	100	0	0
2	15,29	98	0,315	2
3	14,98	96	0,630	4
4	14,66	94	0,945	6
5	14,35	92	1,260	8
6	14,04	90	1,575	10
7	13,73	88	1,890	12
8	13,10	84	2,520	16
9	12,48	80	3,150	20

Die Herstellung der Liposomen erfolgt nach der Extrusionsmethode (vgl. 2.4.1) in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (vgl. Tabelle 2-9). Die MLV-Dispersion wird dabei 21-mal durch eine 100 nm Membran extrudiert. Zur Messung des  $\zeta$ -Potentials werden 50  $\mu$ l Liposomendispersion mit 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 zu 5,0 ml verdünnt. Die Messung erfolgt wie unter 2.5.2 beschrieben.

### **2.10.1.2 Flipp-Flopp von EPG**

Zur Ermittlung der Flipp-Flopp-Rate von EPG in EPC-Liposomen werden wie unter 2.8.2 beschrieben unsymmetrische Liposomen hergestellt. Nach FFE-Trennung der Donor- und Akzeptorvesikel werden diejenigen Fraktionen, die die Donor- bzw. Akzeptorvesikel enthalten, gepoolt.

Das  $\zeta$ -Potential der Donor- und Akzeptorvesikel wird in regelmässigen Abständen über 26 h gemessen. Zur Messung des  $\zeta$ -Potentials der Liposomen werden 500  $\mu$ l der jeweiligen Probe mit 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 zu 5,0 ml verdünnt. Aus der zeitlichen Veränderung des  $\zeta$ -Potentials lässt sich die Kinetik des Flipp-Flopp von EPG bestimmen.

### **2.10.2 Fluorescamin-Assay**

Fluorescamin (Floram<sup>®</sup>) reagiert mit den primären Aminogruppen von PS unter Bildung eines fluoreszierenden Produktes.

#### **2.10.2.1 Reaktionsbedingungen und Linearität des Assays**

Die Reaktionsbedingungen des Fluorescamin-Assays zur Bestimmung des PS-Gehaltes in liposomalen Membranen wurden von Wieland-Berghausen untersucht (Wieland-Berghausen, 1999). In 50 mM Boratpuffer pH 8,25 und einem 30-fachen molaren Überschuss von Fluorescamin zu PS beträgt die erforderliche Reaktionszeit 4 min.

Zur Bestimmung der Linearität des Assays werden mittels Extrusion (vgl. 2.4.1) EPC-Liposomen mit 0 bis 20 mol% EPS hergestellt (vgl. Tabelle 2-16). Diese werden mit 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 auf 5 mM Gesamtlipidkonzentration verdünnt. Jeweils 10  $\mu$ l Liposomendispersion werden mit 1482  $\mu$ l 50 mM Boratpuffer pH 8,25 gemischt. Unter Vortexen werden mit einer Hamilton-Spritze 8  $\mu$ l 20 mM Fluorescamin-Lösung in wasserfreiem Aceton hinzu pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 4 min bei RT wird die Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{\text{ex}} = 388$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 470$  nm und Spaltbreiten von 10 nm während 10 sec gemessen und gemittelt.

#### **2.10.2.2 Bestimmung der Verteilung und des Flipp-Flopp von EPS**

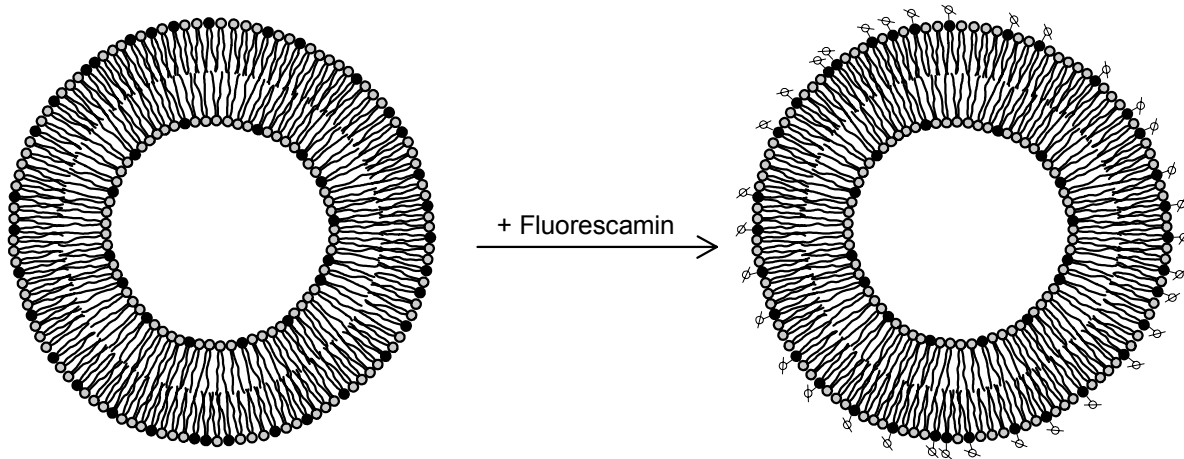
Zur Bestimmung der Verteilung von EPS wird die Reaktion zum einen mit Liposomen durchgeführt und zum anderen mit einer entsprechenden Mischmizelllösung (vgl. Abbildung 2-9). Letztere Messung ergibt den 100 %-Wert, anhand dessen die



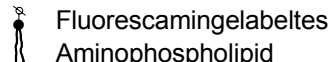
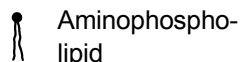
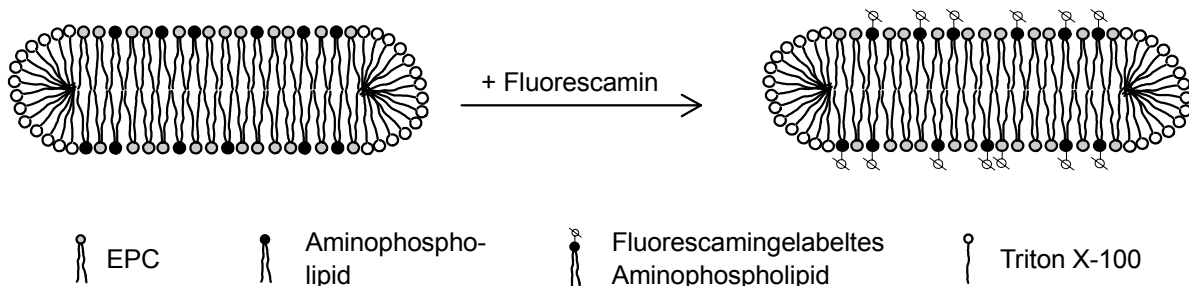
Verteilung der Aminophospholipide zwischen den Monolayern berechnet werden kann. Es lassen sich EPS-Konzentrationen bis  $0,1 \mu\text{M}$  quantifizieren.

Das Vorgehen ist unter 2.10.2.1 beschrieben. Die liposomale Probe ist so zu verdünnen, dass die Aminophospholipidkonzentration im Assay ungefähr  $1 \mu\text{M}$  beträgt.

Liposomen



Mischmizellen



**Abbildung 2-9 Fluorescamin-Assay zur Bestimmung der Verteilung von Aminophospholipiden zwischen den Monolayern.** In einer ersten Messung werden Liposomen mit Fluorescamin versetzt. Nur der Anteil an Aminophospholipiden im äusseren Monolayer wird derivatisiert. Im zweiten Schritt werden die Liposomen vor der Derivatisierung mit Triton X-100 zerstört, wodurch alle Aminophospholipide für das Fluorescamin zugänglich werden (100 %-Wert)

Zur Bestimmung des Flipp-Flopp von PS werden in regelmässigen Abständen während 50 h Änderungen in der Verteilung des Lipids verfolgt. Aus der Verschiebung der Lipidverteilung während der Lagerung der unsymmetrischen Liposomen lässt sich eine Kinetik für den Flipp-Flopp von PS ermitteln.

### 2.10.3 2-(*p*-Toluidinyl)naphthalen-6-sulfonsäure -Assay

2-(*p*-Toluidinyl)naphthalin-6-sulfonsäure stellt eine umgebungssensitive Fluoreszenzsonde dar, mit welcher Konformationsänderungen bei Proteinen und Veränderungen in Membranen verfolgt werden können (Dotsikas & Loukas, 2002), (Sentandreu et al., 2002), (Easter et al., 1978; Disalvo et al., 1996). In polarer Umgebung weist TNS nur eine sehr geringe Fluoreszenzaktivität auf. In apolaren Lösungsmitteln und nach Einlagerung in membranäre Systeme steigt die Fluoreszenzaktivität sehr stark an.

Das Bindungsverhalten an Liposomen hängt stark von der Oberflächenladung der Liposomen ab. Somit lassen sich Veränderungen in der Verteilung von negativ geladenen Phospholipiden zwischen den Monolayern von LUV über Fluoreszenzintensitätsänderungen verfolgen.

#### 2.10.3.1 Assay-Bedingungen

Zur Festlegung der Fluorimeter-Parameter werden Fluoreszenzspektren von TNS sowohl in Methanol als auch an Liposomen gebunden aufgenommen. Zudem wird untersucht, wie lange die Einlagerung in den äusseren Monolayer der Vesikel dauert und wie sich die Fluoreszenz mit der Zeit durch Permeation von TNS zum inneren Monolayer verändert.

##### 2.10.3.1.1 Fluoreszenzspektren

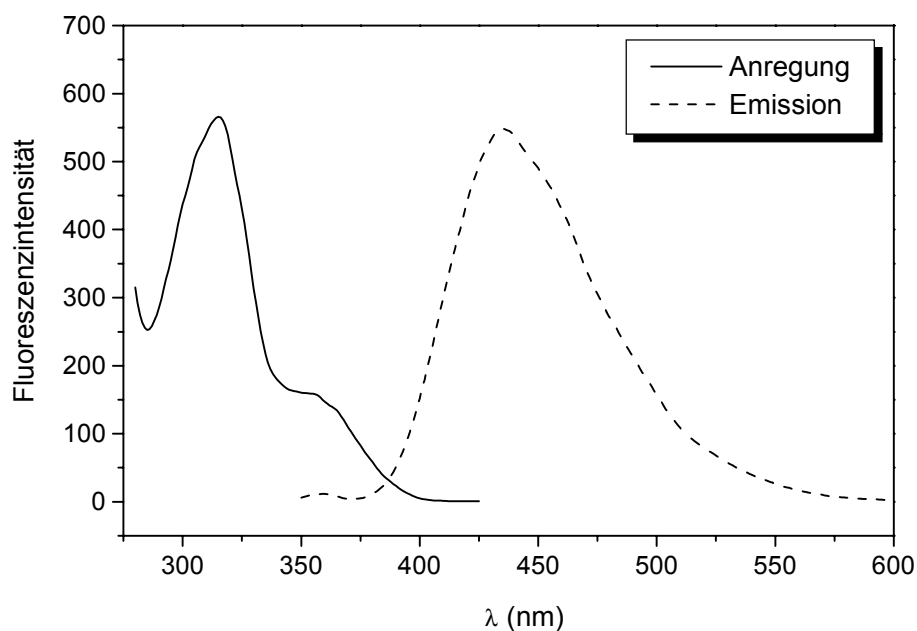
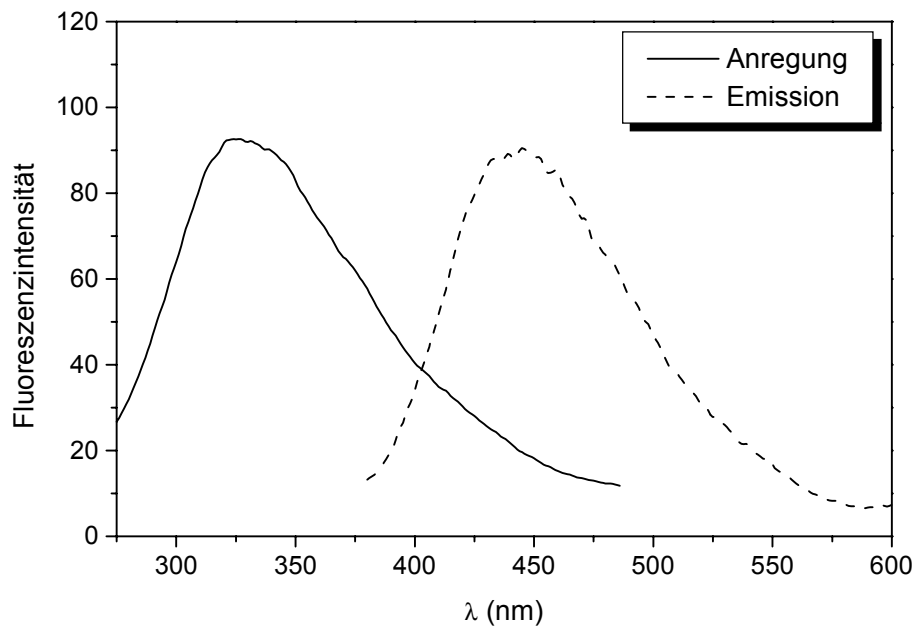


Abbildung 2-10

Anregungs- und Exmissionsspektrum von TNS in Methanol



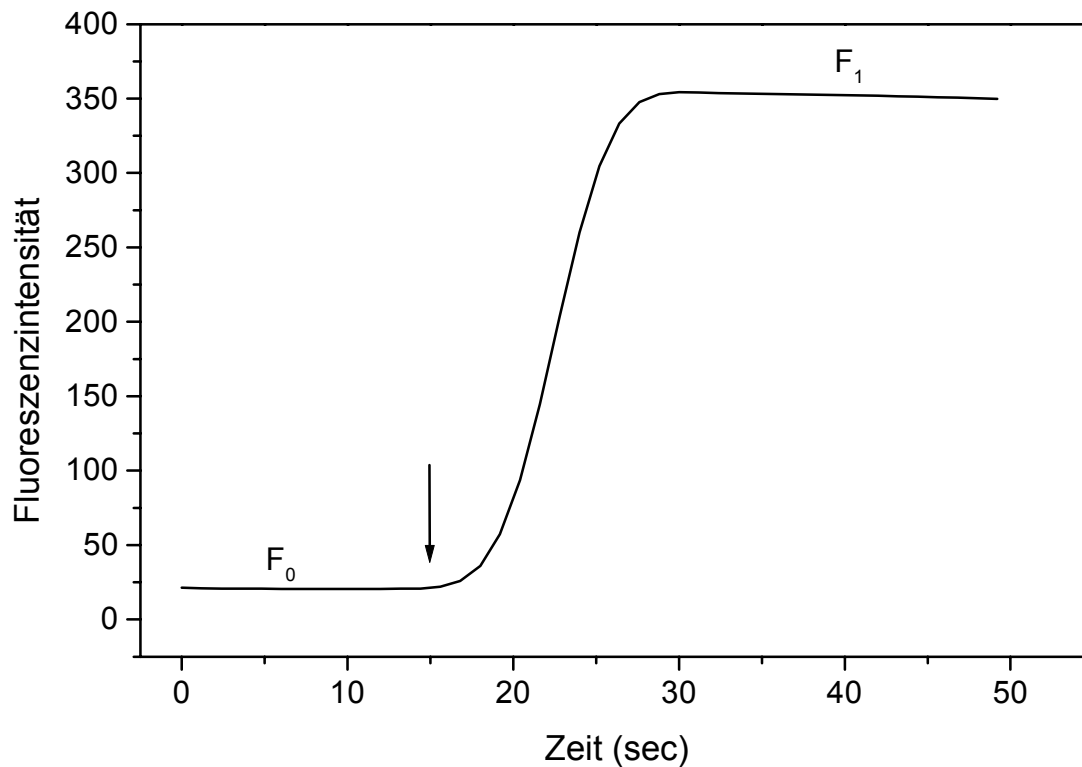
**Abbildung 2-11 Anregungs- und Emissionsspektrum von TNS an EPC-Liposomen**

Das Maximum der Anregung von TNS in EPC-Liposomen erfährt im Vergleich zur methanolischen Lösung eine leichte bathochrome Verschiebung. Das Emissionsspektrum verändert sich dagegen kaum. Für die Fluoreszenzmessungen wird eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 321$  nm (Spaltbreite 5 nm) und eine Emissionswellenlänge von  $\lambda = 445$  nm (Spaltbreite 10 nm) gewählt. Diese Werte entsprechen den Literaturangaben.

#### **2.10.3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Einlagerung**

In Anlehnung an Eisenberg wird eine TNS-Konzentration von 3  $\mu$ M gewählt (Eisenberg et al., 1979). Da die Bindung von TNS an liposomale Membranen temperaturabhängig ist, wird während der Messungen eine Temperatur von  $25 \pm 0,2$  °C eingehalten.

Zur Erfassung der Geschwindigkeit der Bindung von TNS an die Liposomenmembran werden 2495  $\mu$ l einer 3  $\mu$ M TNS-Lösung in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 in einer Quarzküvette vorgelegt. Ca. 20 sec nach Start der Fluoreszenzmessung werden 5  $\mu$ l EPC-Liposomen 20 mM (LUV, Grösse 100 nm) hinzu pipettiert. Ein Magnetrührer sorgt für eine schnelle homogene Verteilung der Probe. Die Einlagerung von TNS in den äusseren Monolayer der Liposomen führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität.

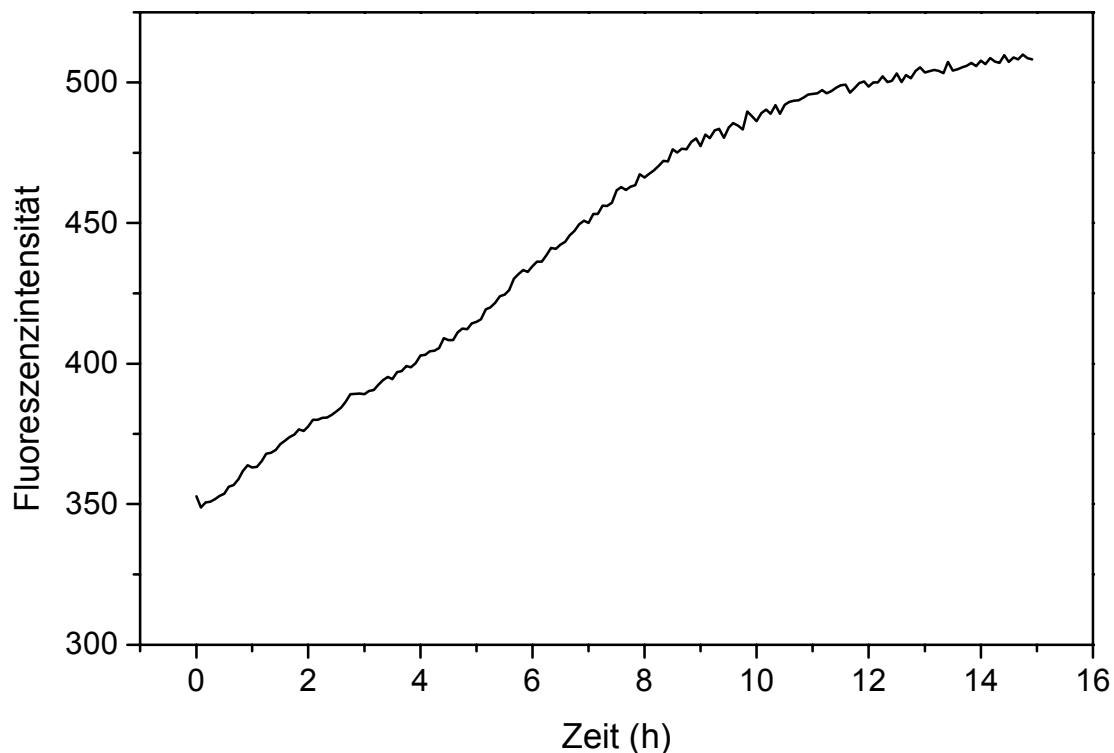


**Abbildung 2-12** Beispiel einer Fluoreszenzänderung durch Einlagerung von TNS in liposomale Membranen. In Puffer gelöste TNS (Konzentration  $3 \mu\text{M}$ ) weist nur eine geringe Fluoreszenzaktivität auf. Nach Zugabe von Liposomen (Endkonzentration  $40 \mu\text{M}$ ) zur TNS-Lösung (Pfeil) lagert sich TNS schnell in den äusseren Monolayer ein, wodurch es zum Anstieg in der Fluoreszenzintensität kommt.

Die Einlagerung von TNS in den äusseren Monolayer der Liposomen findet sehr schnell statt. Nach ungefähr 15 sec wird ein Maximum in der Fluoreszenzintensität erreicht, welches sich während 15 min nur unwesentlich ändert.

Um herauszufinden, wie schnell und in welchem Masse TNS durch liposomale Membranen penetriert, wird die Fluoreszenz während 15 h verfolgt. Damit lässt sich auch abschätzen, ob Veränderungen in der Oberflächenladung durch Flipp-Flopp an einer Probe über mehrere Stunden in Echtzeit gemessen werden können.

Der Anstieg deutet darauf hin, dass TNS innerhalb weniger Stunden durch den Bilayer permeiert (vgl. Abbildung 2-13). Eine Einzelmessung über längere Zeit ist demnach nicht durchführbar. Um den Flipp-Flopp von negativ geladenen Phospholipiden messen zu können, müssen demnach zu verschiedenen Zeitpunkten Einzelmessungen vorgenommen werden.



**Abbildung 2-13** Beispiel eines TNS-Assay mit EPC-Liposomen. Nach Zugabe der Liposomen ad 40  $\mu\text{M}$  Lipid zur 3  $\mu\text{M}$  TNS-Lösung wird die Fluoreszenz über 15 h verfolgt.

### 2.10.3.2 Erstellen einer Kalibrationsfunktion für EPG- und EPS-haltige Liposomen

Um herauszufinden, ob eine Quantifizierung des Gehaltes an EPG und EPS im äusseren Monolayer von Vesikeln über den TNS-Assay möglich ist, werden Liposomen der Grösse 100 nm mit unterschiedlichen Anteilen EPG bzw. EPS mittels Extrusion (vgl. 2.4.1) hergestellt. Für 1 ml Liposomendispersion mit einer Gesamtlipidkonzentration von 10 mM werden die in Tabelle 2-16 angegebenen Mengen eingesetzt:

Für die Fluoreszenzmessungen wird 3  $\mu\text{M}$  TNS-Lösung in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 in einer Quarzküvette vorgelegt und aufsteigende Mengen Liposomen (5 bis 50  $\mu\text{l}$ ) ca. 15 sec nach Start der Messung hinzu pipettiert. Das Probenvolumen in der Küvette beträgt 2,5 ml. Die Messungen erfolgen bei einer Temperatur von  $25 \pm 0,2$  °C und den unter 2.10.3.1.1 beschriebenen Parametern.

**Tabelle 2-16 Herstellung von Liposomen (1 ml, Gesamtlipidkonzentration 10 mM) mit unterschiedlichen Anteilen EPG bzw. EPS mittels Extrusion.**

Ansatz	EPC		EPG		EPS	
	[mg]	[mol%]	[mg]	[mol%]	[mg]	[mol%]
1	7,80	100	0	0	0	0
2	7,61	97,5	0,197	2,5	0,191	2,5
3	7,41	95	0,394	5,0	0,382	5,0
4	7,22	92,5	0,590	7,5	0,573	7,5
5	7,02	90	0,787	10	0,764	10
6	6,63	85	1,181	15	1,146	15
7	6,24	80	1,574	20	1,528	20

### 2.10.3.3 Durchführung einer TNS-Messung

Der Assay zur Bestimmung des Gehaltes an negativ geladenen Phospholipiden im äusseren Monolayer einer liposomalen Probe ist folgendermassen aufgebaut:

TNS-Lösung	2500 µl - x µl
Liposomenprobe	x µl

Die Konzentration der TNS-Lösung (in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0) ist so gewählt, dass die Endkonzentration von TNS im Assay 3,0 µM beträgt. Das Volumen der Liposomenprobe wird so angepasst, dass die gemessene Fluoreszenzintensität bei den unter 2.10.3.1.1 beschriebenen Geräteparametern zwischen 200 und 1000 liegt. Die TNS-Lösung wird in einer Quarzküvette vorgelegt und auf 25 °C ± 0,2 °C vortemperiert. Ca. 15 sec nach Start der Messung wird die liposomale Probe unter Rühren hinzu pipettiert und die Fluoreszenz bis zum Erreichen eines konstanten Wertes verfolgt.

## **3 Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1 Bestimmung des Lipidaustausches**

Der Lipidaustausch zwischen verschiedenen Liposomenpopulationen stellt eine wichtige Methode zur Herstellung von Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung dar. Die zur Untersuchung herangezogenen Phospholipide sind EPG und EPS. Die negative Ladung der beiden Moleküle wie auch die primäre Aminogruppe des EPS erlaubt eine Quantifizierung des Austausches mit unterschiedlichen Methoden. Neben dem langsamen spontanen Austausch von Lipiden ist vor allem der durch ns-LTP vermittelte schnelle Austausch von Interesse. Er ermöglicht, in kurzer Zeit Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung herzustellen, die zu weiteren Untersuchungen wie zur Lipidverteilung zwischen den Monolayern und zur Kinetik des Flipp-Flopp der entsprechenden Lipide zur Verfügung stehen. Der Lipidaustausch wurde von sowohl von normalen Liposomen wie auch von Liposomen, die im Inneren ein künstliches Zytoskelett (Stauch, 2002) tragen, bestimmt.

#### **3.1.1 FRET-Messungen**

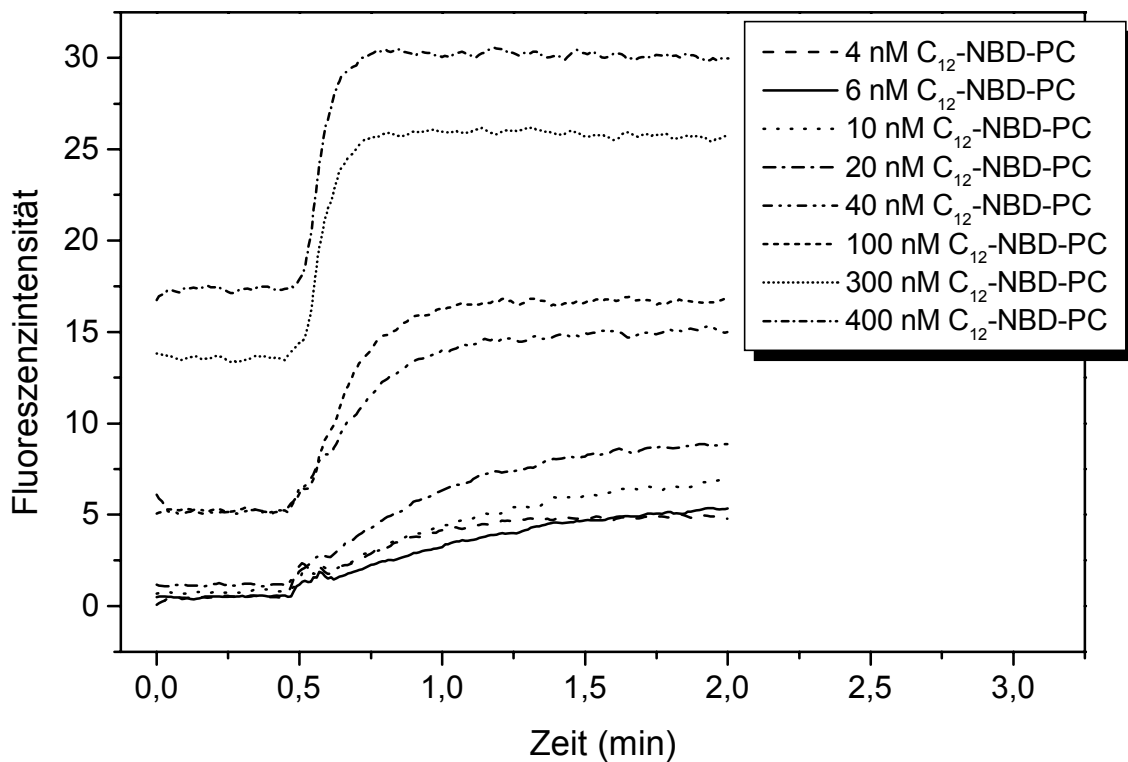
Messungen mit der FRET-Technik (vgl. Kapitel 1.4.2.2.3.1) erlaubten die direkte Beobachtung der Lipidbindung an das ns-LTP und des spontanen wie auch des proteinvermittelten Lipidaustausches zwischen Liposomen.

Die hierzu eingesetzten Vesikel bestanden aus EPC oder DOPC als Basislipid und jeweils 2 mol% Rh-PE und C<sub>12</sub>-NBD-PC.

##### **3.1.1.1 Bindung des C<sub>12</sub>-NBD-PC an ns-LTP**

###### **3.1.1.1.1 DOPC-Liposomen**

Analog zu den Versuchen von Wieland-Berghausen (Wieland-Berghausen, 1999) wurde zur Untersuchung der Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC an das ns-LTP DOPC als Basislipid zur Herstellung der Donorliposomen (vgl. 2.9.1.1) verwendet. Der Verlauf der Fluoreszenzänderung bei einer Messreihe ist in Abbildung 3-1 zu sehen.



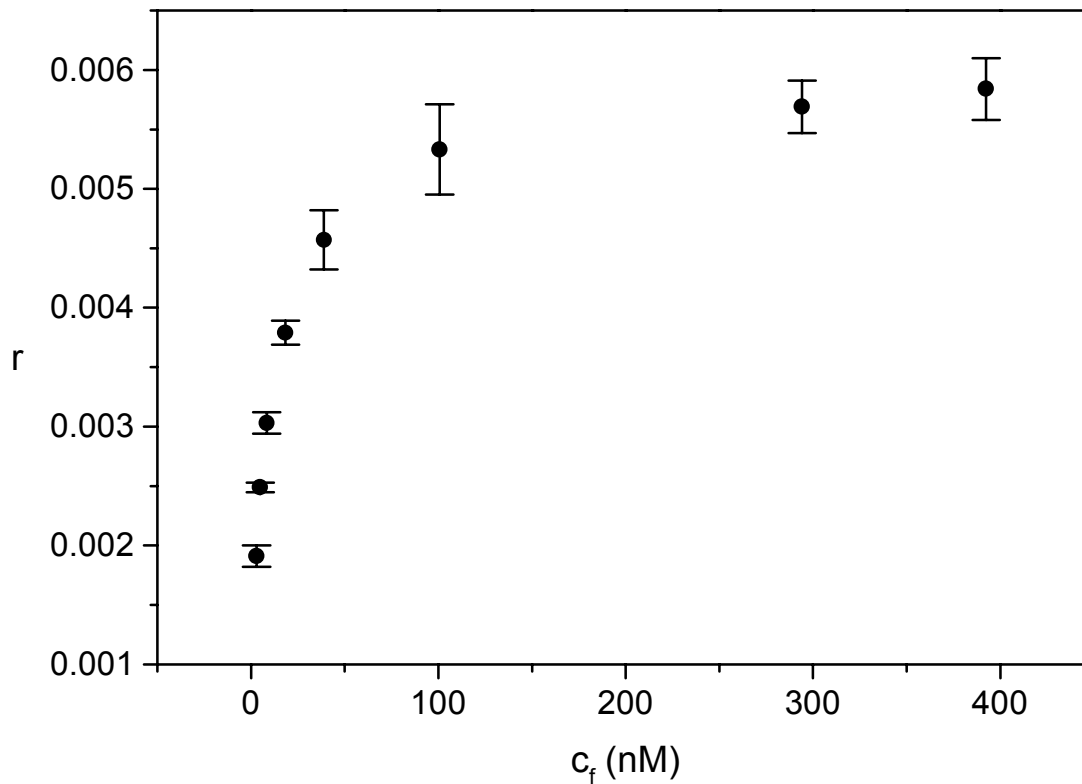
**Abbildung 3-1** Fluoreszenzanstieg durch die Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC an ns-LTP. Unterschiedliche Mengen DOPC-Donorliposomen (Lipidkonzentration 0,2 bis 20,0 µM) wurden vorgelegt und 30 sec nach Start der Messung mit einer konstanten Menge ns-LTP (1,0 µM) versetzt. Durch die Extraktion von C<sub>12</sub>-NBD-PC aus dem äusseren Monolayer kommt es zum Anstieg der Fluoreszenz

Bei der hier eingesetzten Lipidzusammensetzung wurde die Fluoreszenz des Donorchromophores (NBD) zunächst zu über 98% gelöscht.

Aus dem Anstieg in der Fluoreszenzintensität ist zu entnehmen, dass C<sub>12</sub>-NBD-PC aus der Membran entfernt wird und an das ns-LTP bindet. Aus der Intensitätszunahme nach Zugabe des Austauschproteins liess sich der gebundene Anteil C<sub>12</sub>-NBD-PC anhand einer Kalibrationsfunktion (Abbildung 2-8) berechnen. Dabei konnte davon ausgegangen werden, dass ausschliesslich aus der liposomalen Membran entferntes C<sub>12</sub>-NBD-PC (monomolekular gelöst oder proteingebunden) zur Intensitätszunahme beitrug, da in der Membran verbliebenes Lipid weiterhin gequencht wurde.

Es zeigte sich, dass die Bindung sättigbar war (Abbildung 3-2).





**Abbildung 3-2** Bindung von  $C_{12}$ -NBD-PC an ns-LTP. Aufsteigende Mengen DOPC-Donorliposomen wurden mit einer konstanten Menge Protein (Konzentration  $1,0 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Der Bindungsgrad  $r$  beschreibt das molare Verhältnis zwischen proteingebundenem Liganden und der totalen Menge Protein.  $c_f$  = Konzentration an freiem  $C_{12}$ -NBD-PC,  $n = 5$

Aus der Grafik ist ersichtlich, dass bei einer freien Ligandkonzentration ( $c_f$ , entspricht dem in der Membran vorliegenden und dem monomolekular gelösten Anteil  $C_{12}$ -NBD-PC) von etwa 300 nM eine Sättigung der Bindung an ns-LTP (Konzentration:  $1,0 \mu\text{M}$ ) erreicht wurde. Die dabei gebundene Menge  $C_{12}$ -NBD-PC ( $c_b$ ) betrug  $5,8 \text{ nmol pro } \mu\text{mol ns-LTP}$ . Die Sättigungskurve in Abbildung 3-2 nähert sich asymptotisch an die Gesamtzahl Bindungsstellen  $n$  von  $0,0060$  an. Zur weiteren Charakterisierung der Proteinbindung wurde die Scatchard-Gleichungen herangezogen, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz herleitet.

$$\frac{r}{c_f} = n \cdot K - K \cdot r$$

Gleichung 3-1

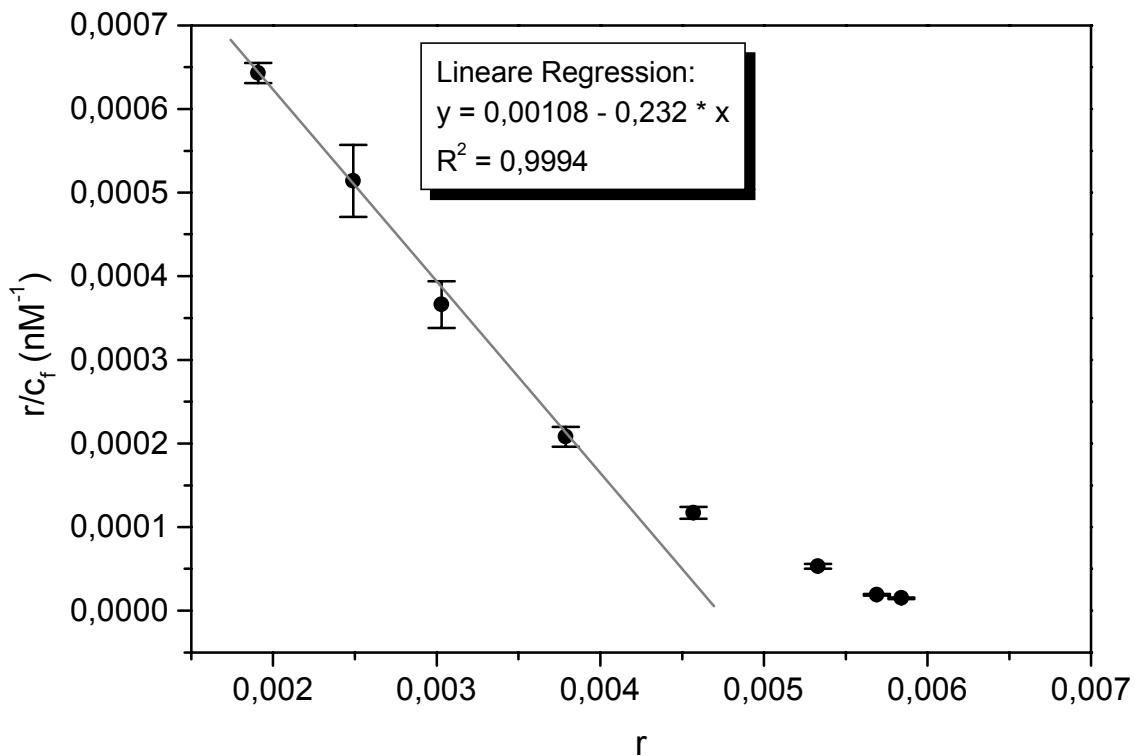
$r$  = Bindungsgrad

$n$  = Anzahl Bindungsstellen je Proteinmolekül

$K$  = Assoziationskonstante [ $M^{-1}$ ]

$c_f$  = Konzentration an freiem Liganden [ $M$ ]

Bei der Auswertung nach Scatchard wird aus dem gekrümmten Kurvenverlauf ersichtlich, dass ns-LTP mehr als eine Bindungsstelle für C<sub>12</sub>-NBD-PC bereithält.



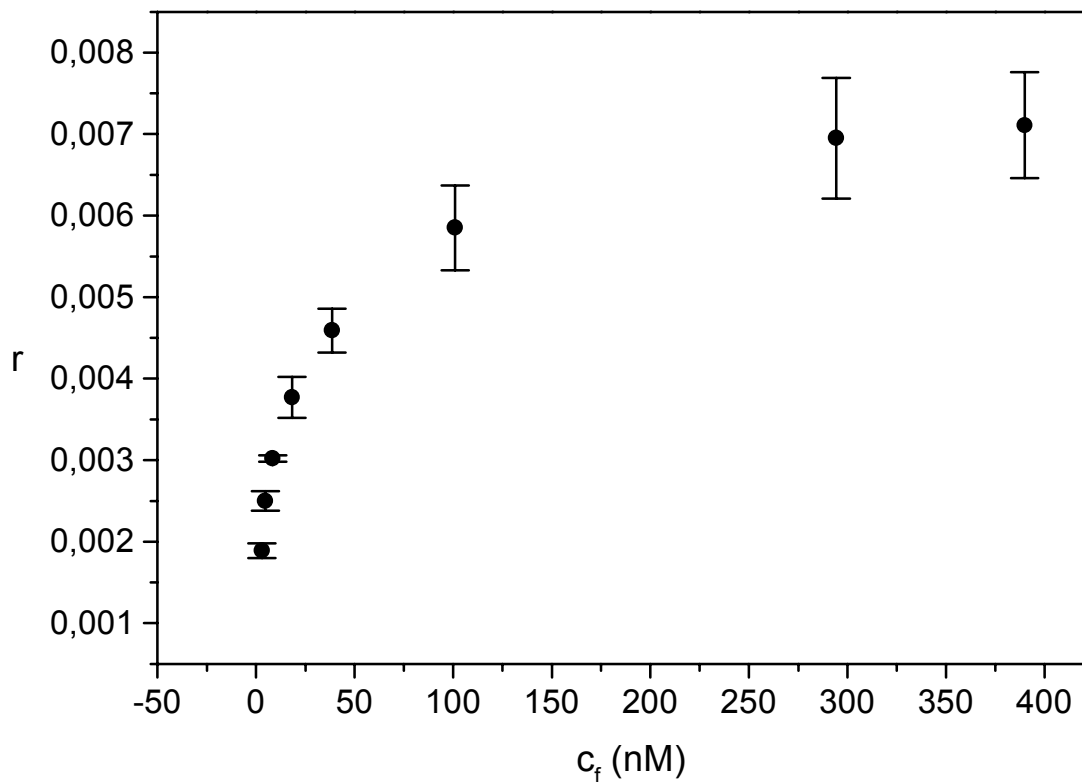
**Abbildung 3-3** Scatchard-Plot der Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC an ns-LTP. Der gekrümmte Kurvenverlauf deutet darauf hin, dass das ns-LTP mehr als eine Bindungsstelle für C<sub>12</sub>-NBD-PC aufweist. Beim Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse ist die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen  $n$  abzulesen, bei dem mit der y-Achse die Assoziationskonstante  $K$ .

Aus dem Scatchard-Plot ist eine Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen  $n$  von 0,00465 abzulesen. Dies bedeutet, dass maximal jedes 215. ns-LTP-Molekül ein C<sub>12</sub>-NBD-PC gebunden hat. Berücksichtigt man die weniger affinen Bindungsstellen,

erhält man 0,00635 Bindungsstellen pro Proteinmolekül. Dabei hat maximal jedes 157. ns-LTP-Molekül ein C<sub>12</sub>-NBD-PC gebunden.

### 3.1.1.1.2 EPC-Liposomen

Da DOPC ein synthetisch hergestelltes Phospholipid ist und die daraus gebildeten Bilayer in ihren Eigenschaften von Bilayern aus natürlichen Phospholipiden abweichen können, wurden die Versuche mit Liposomen aus EPC wiederholt.



**Abbildung 3-4** Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC an ns-LTP. Aufsteigende Mengen EPC-Donorliposomen wurden mit einer konstanten Menge Protein (Konzentration 1,0 μM) inkubiert. Der Bindungsgrad  $r$  beschreibt das molare Verhältnis zwischen proteingebundenem Liganden und der totalen Menge Protein.  $c_f$  = Konzentration an freiem C<sub>12</sub>-NBD-PC,  $n = 5$

Hier zeigte sich, dass ebenfalls bei einer Ligandkonzentration ( $c_f$ ) von ungefähr 300 nM eine Sättigung der Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC an ns-LTP (Konzentration 1,0 μM) erreicht wurde. Die dabei gebundene Menge  $c_b$  lag jedoch mit 7,1 nmol Lipid pro μmol ns-LTP leicht höher als bei DOPC-Donorliposomen.

### 3.1.1.1.3 Vergleich der Bindungsdaten

Die Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC aus Liposomen an ns-LTP stellt ein kompliziertes System dar, da C<sub>12</sub>-NBD-PC nicht monomolekular gelöst, sondern in eine liposomale Membran integriert vorliegt. Somit beeinflusst nicht nur die Affinität des Lipids zum Protein die Bindung, sondern auch die Wechselwirkung des Lipids zum Liposom. Die Lipidkomposition der Vesikel stellt also einen beeinflussenden Faktor für die Bindung dar. Es zeigte sich allerdings, dass die gebundenen Mengen Ligand bei Sättigung des ns-LTP bei beiden Liposomenarten vergleichbar waren. Dabei war auffallend, dass nur maximal jedes 157. ns-LTP-Molekül ein Lipidmolekül gebunden hat. Eventuell ist das Protein nur in einer selten auftretenden Konformation in der Lage, das Lipid zu binden. Denkbar wäre auch, dass die Fluoreszenz des gebundenen C<sub>12</sub>-NBD-PC vom Protein gequencht wurde.

Was die maximalen Transferraten von C<sub>12</sub>-NBD-PC von den Liposomen zum ns-LTP betraf, zeigten sich bei den beiden Liposomenpräparationen keine Unterschiede (vgl. Abbildung 3-5).

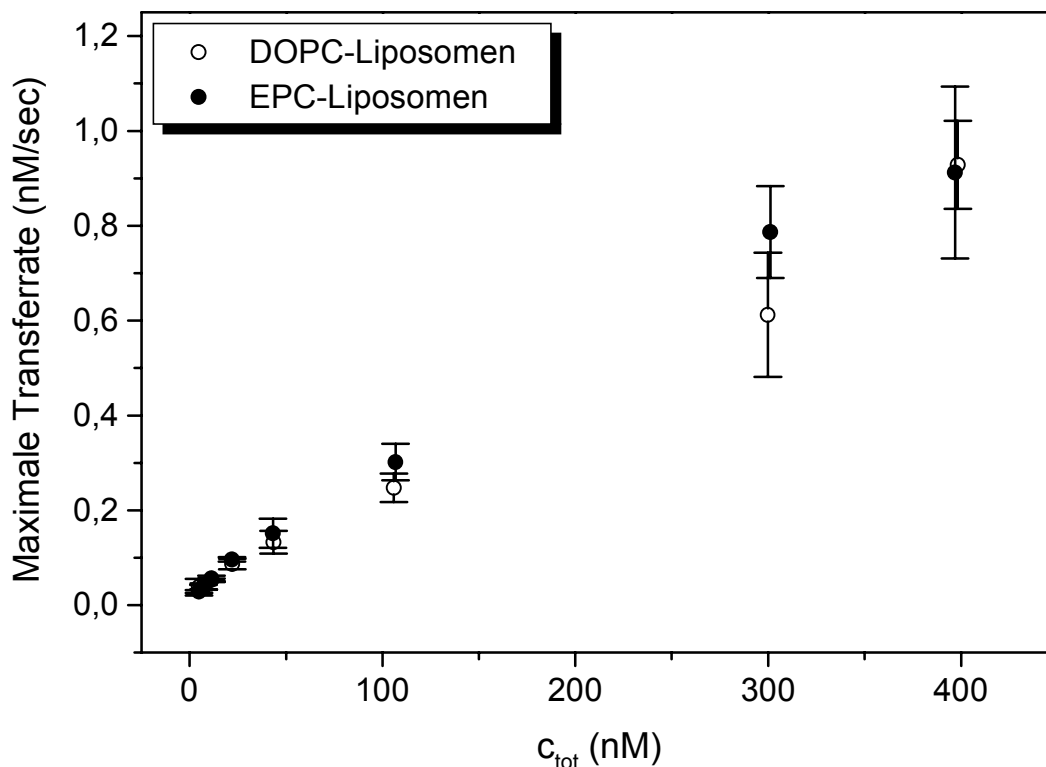
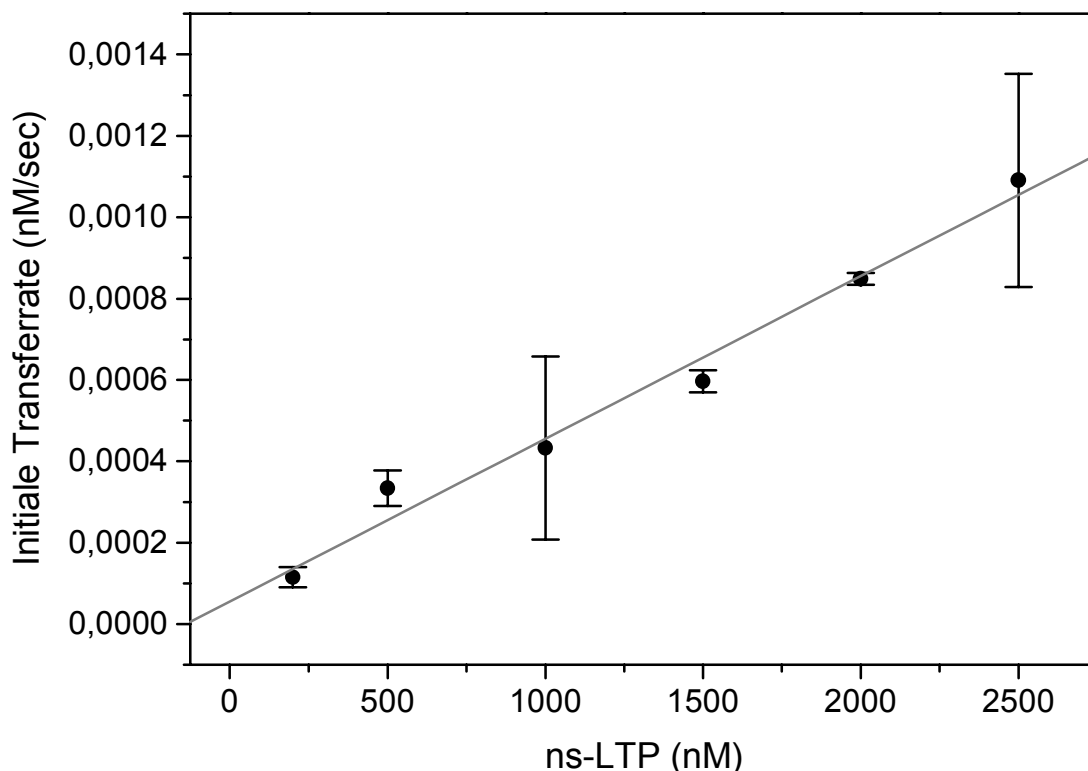


Abbildung 3-5 Vergleich der maximalen Transferraten von C<sub>12</sub>-NBD-PC zu ns-LTP zwischen DOPC- und EPC-Donorliposomen. Die Transferraten wurden aus den Fluoreszenzintensitätsänderungen, die sich nach Zugabe des ns-LTP zeigten, ermittelt (vgl. Abbildung 3-1).  $c_{tot}$  = Gesamtkonzentration an C<sub>12</sub>-NBD-PC

Die Art der Übertragung des Lipids auf das ns-LTP ist noch nicht restlos geklärt. Vorstellbar ist eine rein diffusionskontrollierte Übertragung des C<sub>12</sub>-NBD-PC zum ns-LTP wie auch ein kollisionsabhängiges Modell, bei welchem das Protein Lipidmoleküle beim Kontakt mit der Membran bindet. Möglich ist auch eine Kombination aus beidem. Kinetische Modelle stützen die Kombinationsthese (Nichols, 1988). Welche der Übertragungsarten dominiert, ist abhängig von der Protein- und Ligandkonzentration wie auch der Temperatur. Das lineare Verhältnis von maximaler Transferrate und Ligandkonzentration (vgl. Abbildung 3-5) deutet darauf hin, dass bei den durchgeführten Versuchen die kollisionsvermittelte Übertragung dominiert. Dieser Befund wird durch den linearen Zusammenhang zwischen maximaler Transferrate und ns-LTP-Konzentration gestützt (vgl. Abbildung 3-6). Bei einem rein diffusionskontrollierten Vorgang müssten sich die initialen Transferraten mit steigender C<sub>12</sub>-NBD-PC-Konzentration einem Grenzwert annähern, der dadurch bedingt ist, dass die Sättigungskonzentration von C<sub>12</sub>-NBD-PC in wässriger Lösung erreicht wurde.

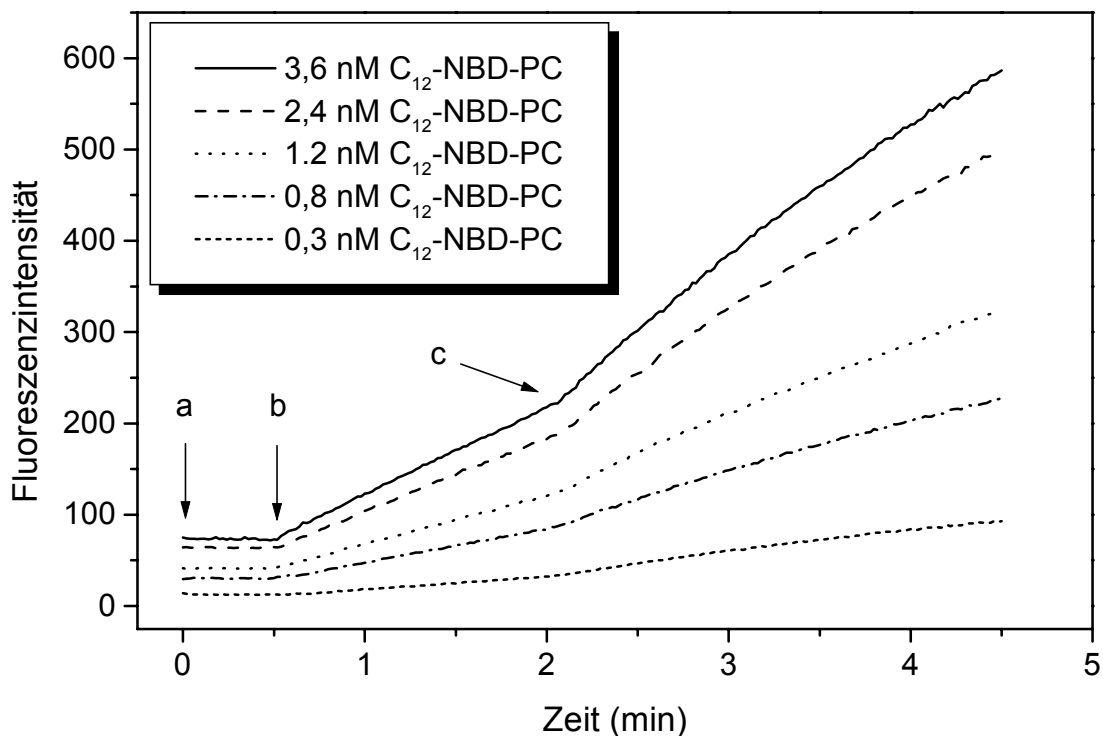


**Abbildung 3-6** Die maximale Transferrate von C<sub>12</sub>-NBD-PC aus Liposomen an ns-LTP in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration. Die Transferraten wurden aus den Fluoreszenzintensitätsänderungen, die sich nach Zugabe des ns-LTP zeigten, ermittelt (vgl. Abbildung 3-1). n = 3

### 3.1.1.2 Austausch des C<sub>12</sub>-NBD-PC

Die Transferaktivität von ns-LTP wurde über den Austausch von C<sub>12</sub>-NBD-PC zwischen Donor- und Akzeptorliposomen (vgl. 2.9.1.1) bestimmt. Als Basislipid wurde EPC eingesetzt, da es bei den Bindungsexperimenten zu vergleichbaren Resultaten führte wie das ebenfalls eingesetzte DOPC. Der Verlauf der Fluoreszenzänderung nach Zugabe von Akzeptorliposomen bzw. ns-LTP ist in Abbildung 3-7 zu sehen.

Der spontane Lipidaustausch kommt durch Monomerdiffusion und Vesikelkollision zustande. Die beschleunigte Übertragung von C<sub>12</sub>-NBD-PC von Donor- zu Akzeptorliposomen resultierte aus einer Überlagerung von spontanem und proteinvermitteltem Lipidtransfer.



**Abbildung 3-7** ns-LTP-vermittelter Transfer von C<sub>12</sub>-NBD-PC von Donor- zu Akzeptorvesikeln. Aufsteigende Mengen Donorvesikel wurden in Puffer vorgelegt (a). Nach Zugabe der gleichen molaren Menge Akzeptorvesikel (b) fand spontaner Lipidaustausch statt. Zugabe von ns-LTP (Endkonzentration 200 nM) beschleunigte den Austausch (c)

Die maximalen Transferraten liessen sich aus der Steigung der Kurven nach Akzeptorlipid- bzw. ns-LTP-Zugabe errechnen.

Wie in Abbildung 3-8 zu sehen, ist der proteinvermittelte Lipidtransfer ein sättigbarer Prozess und lässt sich über die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben:

$$v = \frac{V_{max} \cdot c_{tot}}{K_M + c_{tot}}$$

Gleichung 3-2

$v$  = Transferrate [M/min]

$V_{max}$  = maximale Transferrate [M/min]

$c_{tot}$  = Konzentration von  $C_{12}$ -NBD-PC [M]

$K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante [M]

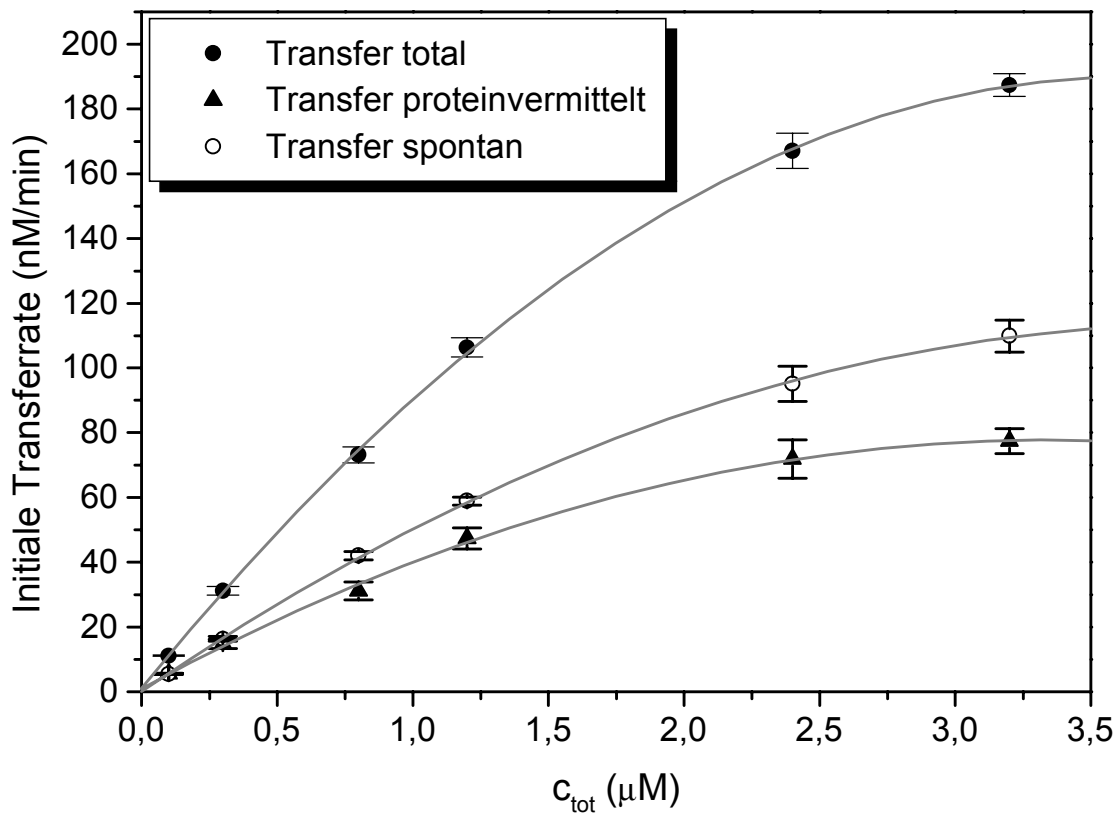


Abbildung 3-8 Totale und proteinvermittelte Transferraten von  $C_{12}$ -NBD-PC von Donor- zu Akzeptorliposomen. Der proteinvermittelte Transfer ergibt sich aus der Differenz zwischen totaler und spontaner Transferrate.  $c_{tot}$  = Gesamtkonzentration an  $C_{12}$ -NBD-PC,  $n = 3$ ; Fit: Polynom 1. Grades

Durch Umformen gelangt man zur Gleichung nach Hanes:

$$\frac{c_{tot}}{v} = \frac{c_{tot}}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}}$$

Gleichung 3-3

Gleichung 3-3 stellt eine linearisierte Form von Gleichung 3-2 dar. Aus der grafischen Darstellung lassen sich die Parameter  $K_M$  und  $v_{max}$  ablesen.

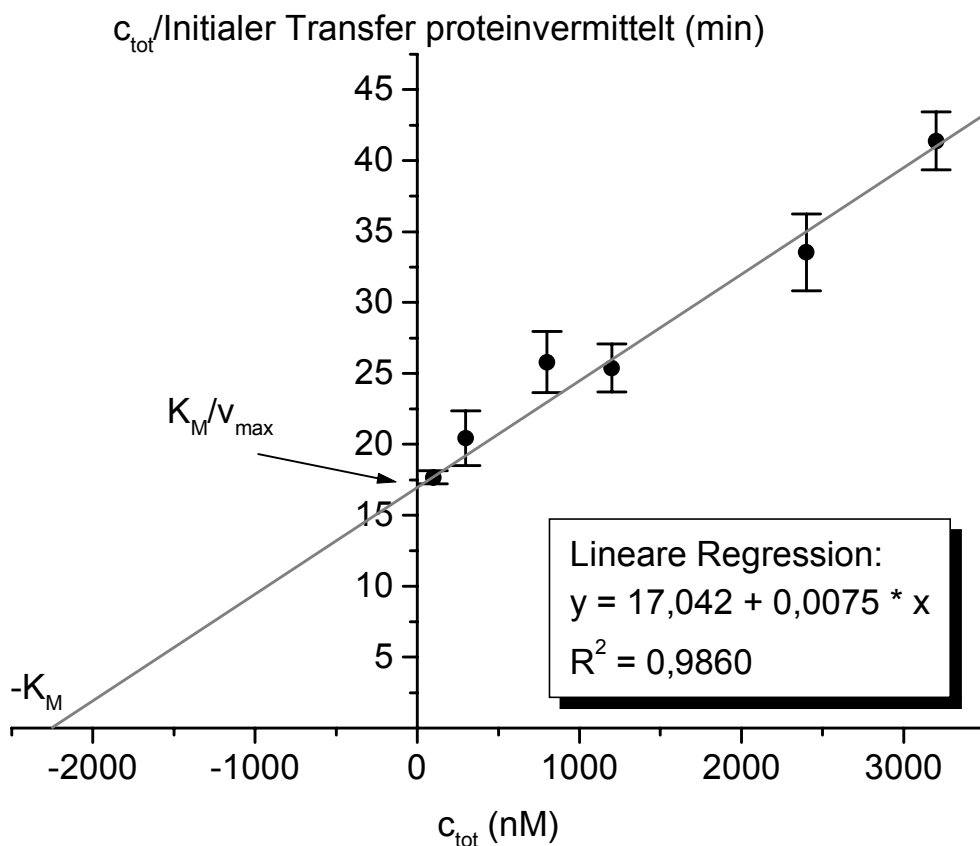


Abbildung 3-9 Hanes-Darstellung der proteinvermittelten Lipidtransferaten.

Demnach beträgt  $v_{max}$  133 nM/min und  $K_M$  2272 nM.

### 3.1.1.3 Diskussion der Austauschmessungen mit FRET

Die FRET-Technik ist zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von  $C_{12}$ -NBD-PC an ns-LTP sowie der Transferaktivität des ns-LTP geeignet. Zur Untersuchung der Bindung wurden Liposomen auf der Basis von synthetischem DOPC und von



natürlichem EPC eingesetzt. Die Bindung von C<sub>12</sub>-NBD-PC folgte einem normalen Sättigungsverhalten nach Michaelis-Menten, wobei die Auswertung der Daten nach Scatchard zeigte, dass im Sättigungszustand nur jedes 157. ns-LTP-Molekül ein C<sub>12</sub>-NBD-PC gebunden hatte. Dabei waren die Unterschiede zwischen Liposomen auf der Basis von DOPC zu solchen auf der Basis von EPC gering. DOPC bildet aufgrund seiner zwei ungesättigten Fettsäurereste weniger dicht gepackte Membranen als EPC, welches üblicherweise einen gesättigten und einen ungesättigten Fettsäurerest trägt. Deshalb ist zu erwarten, dass in DOPC-Membranen inkorporierte Lipide leichter zu extrahieren sind. Diese These konnte aber durch die Experimente nicht bestätigt werden. Der kleine Bindungsgrad  $r$  von C<sub>12</sub>-NBD-PC lässt sich dadurch erklären, dass zum einen die Affinität des Lipids zum Protein sehr gering ist, zum anderen das gebundene Lipid leicht wieder vom Protein abdissoziiert und das in der liposomalen Membran verankerte Lipid für die Bindung nicht leicht zugänglich ist. Dementsprechend ist es bisher nicht gelungen, den ns-LTP-Lipid-Komplex zu isolieren. Ebenso ist noch nicht restlos geklärt, ob die Übertragung der C<sub>12</sub>-NBD-PC-Moleküle diffusions- und/oder kollisionskontrolliert geschieht (Nichols, 1988). Die Resultate lassen den Schluss zu, dass bei den eingesetzten Mengen Lipid und Protein sowie bei der gewählten Temperatur von 25 °C die kollisionsvermittelte Übertragung dominiert.

Die Lipidtransferexperimente wurden mit Donor- und Akzeptorvesikeln auf EPC-Basis durchgeführt. Ns-LTP war in der Lage, den Transfer von C<sub>12</sub>-NBD-PC zwischen den Vesikeln zu beschleunigen. Bei den geringen eingesetzten Mengen ns-LTP wurde die Übertragungsrate gegenüber dem spontanen Austausch um 58 % beschleunigt. Der Lipidtransfer folgte einer Sättigungskinetik nach Michaelis-Menten. Die Auswertung der Daten ergab eine maximale Übertragungsrate von 117 nM/min C<sub>12</sub>-NBD-PC und eine Michaelis-Konstante von 1978 nM.

### **3.1.2 Free Flow Elektrophorese (FFE)**

Der Austausch natürlicher geladener Phospholipide lässt sich mittels elektrophoretischer Techniken verfolgen. Die Free Flow Elektrophorese eignet sich besonders gut dazu, da sie mit sehr geringer Probenmenge auskommt, schnelle Prozesszeiten von wenigen Minuten zulässt, die Probe schonend behandelt und eine analytische Aufbereitung der getrennten Liposomenpräparationen zulässt.

Zur Verfolgung des Lipidaustausches wurden Liposomen eingesetzt, die weitgehend unilamellar waren. Dies war nötig, um störende Effekte auszuschliessen, da bei bi- und oligolamellaren Liposomen Lipide aus den inneren Schalen nachgeliefert werden können. Die Herstellmethode der Wahl war die Detergensdialyse (DD). Bei ihr wird eine durchschnittliche Lamellenzahl von 1,2 erreicht (Schubert, 1991). Des weiteren sollten Donor- und Akzeptorvesikel annähernd die gleiche Grösse aufweisen. Zu kleine Liposomen (unter 50 nm) weisen einen zu hohen Krümmungsradius auf, was in einer unsymmetrischen Verteilung von Lipiden mit grosser oder geladener Kopfgruppe resultiert. Ausserdem sind Phospholipide im äusseren Layer aufgrund der starken Krümmung weniger fest in den Monolayer eingebunden und lassen sich dementsprechend leicht herauslösen.

Die Inkorporierung von negativ geladenen Phospholipiden führt bei der DD dazu, dass die Liposomen wesentlich kleiner werden als reine EPC-Liposomen. Werden Liposomen aus reinem EPC unter Verwendung von OG in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 hergestellt, weisen sie einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 180 nm auf. EPC-Liposomen, die 10 mol% EPG enthalten, werden nur etwa halb so gross.

Um Donor- und Akzeptorliposomen gleicher Grösse herzustellen, war es nötig, bei der DD Detergensgemische einzusetzen. Um die EPC-Liposomen in ihrer Grösse nach unten zu korrigieren, wurden OG-Na-C-Gemische eingesetzt. EPG-haltige Liposomen mit ungefähr 180 nm Durchmesser wurden unter Verwendung von OG-C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>-Gemischen hergestellt.

Die FFE-Parameter, die eine optimale Trennung von Donor- und Akzeptorvesikeln erlauben, mussten vor Durchführung der Austauschversuche experimentell bestimmt werden. Die entscheidenden Parameter sind dabei die Pufferströme und die angelegte Spannung. Bei langsamem Pufferstrom verbleibt eine Probe länger im Bereich der Trennzone und kann demnach gemäss ihrer Oberflächenladung weiter abgelenkt werden. Eine längere Verweilzeit im elektrischen Feld geht aber auch mit einer Bandenverbreiterung einher. Die angelegte Spannung sollte so gewählt werden, dass Liposomen unterschiedlicher Oberflächenladung ausreichend getrennt und Spannungsschwankungen aufgrund einer Überlastung der Spannungsquelle ausgeschlossen werden können. Desweiteren muss darauf geachtet werden, dass die Proben nicht so weit abgelenkt werden, dass sie in den Bereich des

Stabilisierungspuffers geraten, da dieser eine andere Zusammensetzung als der Trennpuffer aufweist und die Probe beeinflussen könnte.

Die Trennung von Donor- und Akzeptorvesikeln bei der Durchführung der Austauschexperimente wurde üblicherweise bei einer Trennpufferförderrate von 330 ml/h, einem Probendurchsatz von 41 µl/min und einer Spannung von 600 V, was einer elektrischen Feldstärke von 75 V/cm entspricht, durchgeführt.

### 3.1.2.1 Herstellung von Liposomen gleicher Grösse mittels Detergendsialyse

#### 3.1.2.1.1 Anpassung der Grösse von EPC-Liposomen

Donorliposomen mit einem EPG-Anteil von 10 mol% weisen nach einer DD in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0 unter Verwendung von OG einen hydrodynamischen Durchmesser von 90 bis 100 nm auf. Um reine EPC-Liposomen (Akzeptorliposomen) der gleichen Grösse zu erhalten, wurde ein Detergensgemisch aus Na-C und OG in verschiedenen Verhältnissen eingesetzt, wobei OG immer in einem molaren Verhältnis von 5:1 zur Gesamtlipidmenge vorlag. Die Dialyse erfolgte wie unter 2.4.2.2 beschrieben. Die Grösse der Liposomen wurde über PCS ermittelt.

**Tabelle 3-1 Herstellung von Akzeptorliposomen (100 mol% EPC) unterschiedlicher Grösse mittels Detergendsialyse**

Ansatz	Molares Verhältnis OG: Na-C	Z-Average (nm)	PI
1	80:1	161,1 ± 2,5	0,11
2	40:1	112,7 ± 2,7	0,10
<b>3</b>	<b>30:1</b>	<b>92,4 ± 0,5</b>	<b>0,17</b>
4	20:1	67,8 ± 1,8	0,19

Um EPC-Liposomen einer Grösse von 90 bis 100 nm zu erhalten, wurden OG und Na-C in einem molaren Verhältnis von 30:1 eingesetzt.

#### 3.1.2.1.2 Anpassung der Grösse von EPG-haltigen Liposomen

Wie schon beschrieben, erreichen EPC-Liposomen, die über DD unter Verwendung von reinem OG hergestellt wurden, einen Durchmesser von ca. 180 nm. Wird einem solchen Ansatz vor der Dialyse 10 mol% EPG beigemischt, verringert sich der

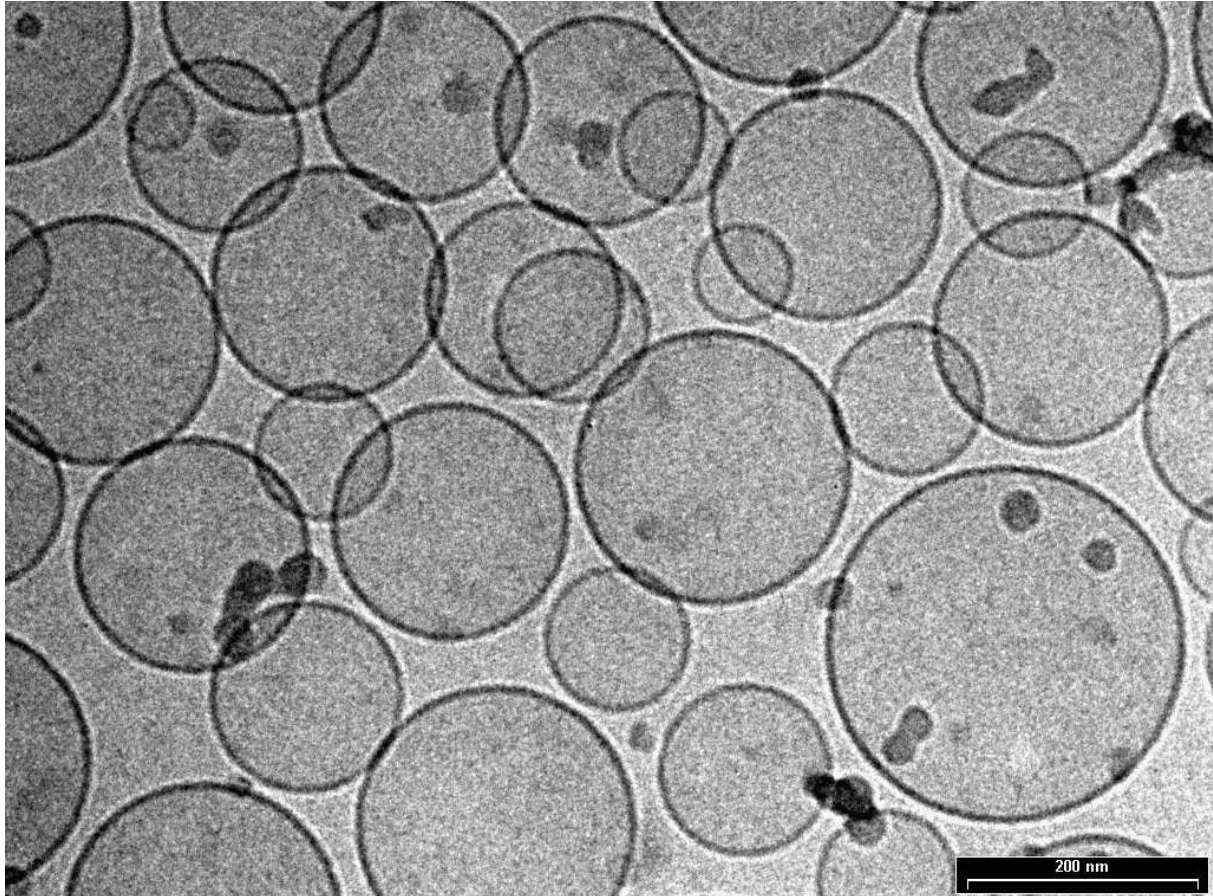
Durchmesser der resultierenden Vesikel ungefähr auf die Hälfte. Um die EPG-haltigen Liposomen nun in ihrer Grösse den EPC-Liposomen anzupassen, wurde dem OG C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> in unterschiedlichen Verhältnissen beigemischt. Die Dialyse wurde wie unter 2.4.2.2 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurde die Grösse der Liposomen über PCS ermittelt:

**Tabelle 3-2 Herstellung von Donorliposomen (EPC 90 mol%, EPG 10 mol%) unterschiedlicher Grösse mittels Detergensdialyse. Die Gesamtlipidkonzentration betrug 20 mM und die initiale Gesamtdetergenskonzentration 100 mM.**

Ansatz	OG [mol%]	C <sub>8</sub> E <sub>4</sub> [mol%]	Z-Average [nm]	PI
1	100	0	93,0 ± 1,2	0,11
2	80	20	129,9 ± 2,3	0,13
3	60	40	167,1 ± 1,3	0,17
4	40	60	203,7 ± 5,2	0,17
5	20	80	242,0 ± 11,6	0,21
6	0	100	350,4 ± 30,0	0,32

Mit steigenden Anteilen C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> stieg der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Liposomen an. Allerdings stieg auch der PI an, was darauf hindeutete, dass die Liposomen in ihrer Grösse weniger einheitlich waren. Dies widerspiegelte sich auch in den steigenden absoluten Standardabweichungen. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Ansätze 2 bis 6 nach der Dialyse beim Schütteln noch Schaumbildung zeigten, was darauf hindeutete, dass noch Detergens in der Präparation vorhanden war. Da beim Ansatz 1 nach der Dialyse keine Schaumbildung auszumachen war, wurde davon ausgegangen, dass das C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> nicht vollständig aus den Präparationen entfernt werden konnte. Auch nach verlängerten Dialysezeiten von bis zu 72 h war die Schaumbildung noch festzustellen. Cryo-TEM-Bilder der Präparationen zeigten nach 24 h Dialyse allerdings keine Membrandefekte (vgl. Abbildung 3-10).

Da Detergenzien den Lipidaustausch und den Flipp-Flopp von Phospholipiden beeinflussen können, wurden für die Lipidaustauschexperimente nur Donorliposomen eingesetzt, die unter Verwendung von reinem OG hergestellt wurden (Ansatz 1) (Pantaler et al., 2000). Diese entsprachen in ihrer Grösse mit etwa 90 nm den Akzeptorliposomen.



**Abbildung 3-10** Cryo-TEM-Aufnahme von detergentdialysierten Donorliposomen (EPC 90 mol%, EPG 10 mol%) unter Verwendung von OG (40 mol%) und  $C_8E_4$  (60 mol%). Z-Average =  $203,7 \pm 5,2$  nm; PI = 0,17

### 3.1.2.2 EPG-Gehalt von Liposomen und elektrophoretische Mobilität

Das Wanderungsverhalten von EPG-haltigen Liposomen im elektrischen Feld der FFE wurde an Liposomen untersucht, die 0 bis 20 mol% EPG enthielten. Anhand der Stärke der Ablenkung unter definierten FFE-Bedingungen liessen sich Rückschlüsse ziehen über den EPG-Gehalt der entsprechenden Liposomen.

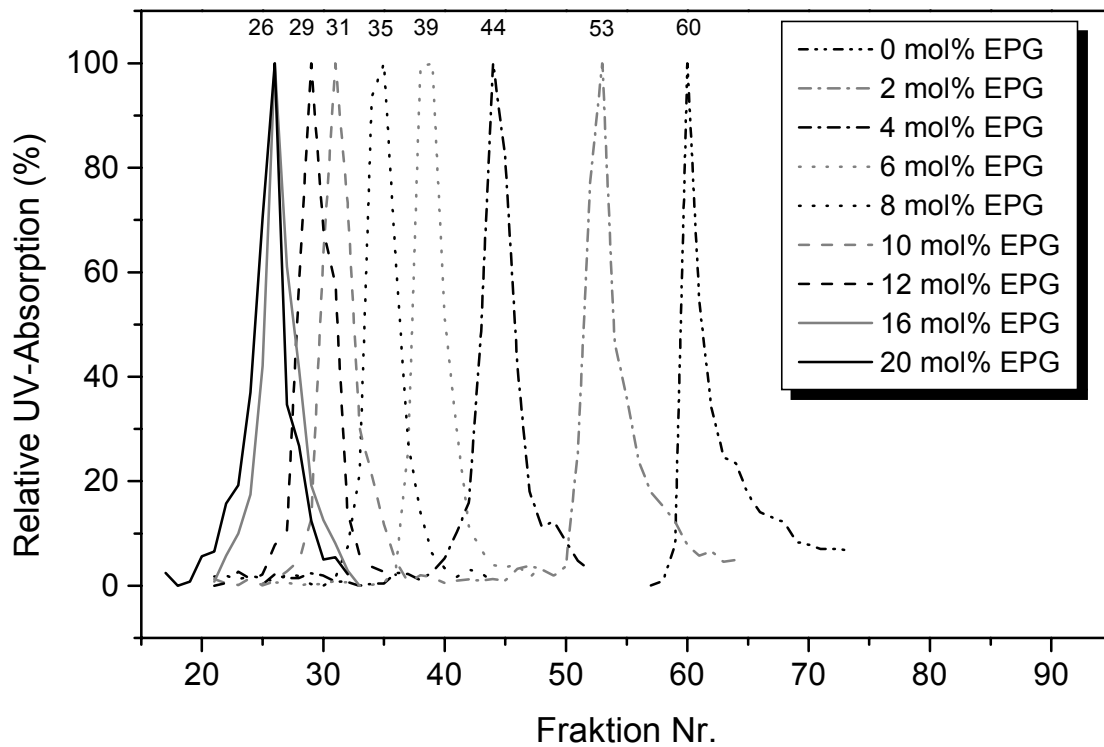
Da in diesem Fall nur die Oberflächenladung der Liposomen von Interesse war und die Lamellarität keine Rolle spielte, wurden die Liposomen mittels Extrusion durch eine Membran mit 100 nm Poren wie unter 2.4.1 beschrieben hergestellt. Für 1 ml Liposomendispersion mit einer Gesamtlipidkonzentration von 20 mM wurden folgende Mengen Lipid eingesetzt:

**Tabelle 3-3** Eingesetzte Lipidmengen zur Herstellung von 1 ml Liposomendispersion mit unterschiedlichen Anteilen EPG durch Extrusion. Die Gesamtlipidkonzentration betrug 20 mM

EPG-Anteil [mol%]	EPC [mg]	EPG [mg]
0	15,60	0,00
2	15,29	0,315
4	14,98	0,630
6	14,66	0,945
8	14,35	1,260
10	14,04	1,575
12	13,73	1,890
16	13,10	2,520
20	12,48	3,150

Zur Untersuchung des elektrophoretischen Verhaltens in der FFE wurden jeweils 50 µl Liposomen auf der kathodalen Seite (ungefähr auf Höhe von Fraktion 73) in die Trennkammer injiziert. Die FFE-Parameter sind unter 3.1.2 beschrieben. Nach der Trennung wurden die FFE-Fraktionen UV-spektrophotometrisch bei  $\lambda = 230$  nm vermessen.

In Abbildung 3-11 ist zu sehen, dass negativ geladene Liposomen entsprechend ihrer Oberflächenladungsdichte mehr oder weniger zur Anode hin abgelenkt wurden. Zu beachten ist, dass in ihrer Ladung neutrale Liposomen aus reinem EPC ebenfalls eine leichte Ablenkung zur anodalen Seite hin zeigten. Dies ist auf die Adsorption von Phosphationen aus dem Puffer an die Oberfläche der EPC-Liposomen zurückzuführen (Dern, 2002).



**Abbildung 3-11 FFE-Verhalten von Liposomen mit unterschiedlichen Anteilen EPG. Je 50 µl Liposomenpräparation wurden einzeln in die Trennkammer injiziert. Die FFE-Parameter sind dem Text zu entnehmen. Zu tieferen Fraktionszahlen (links) liegt die Anode, zu höheren (rechts) die Kathode**

In einer anderen Darstellungsweise wurden die Nummern der Fraktionen mit den höchsten relativen UV-Absorptionen (Hauptfraktionen) gegen den EPG-Anteil der entsprechenden Liposomenpräparation aufgetragen (vgl. Abbildung 3-12).

Es wird deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität und dem  $\zeta$ -Potential der EPG-haltigen Liposomen besteht. Trägt man die Nummern der Hauptfraktionen gegen das  $\zeta$ -Potential der jeweiligen Liposomenpräparation auf, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit mit einem Bestimmtheitsmass  $R^2$  von 0,9913 (vgl. Abbildung 3-13).

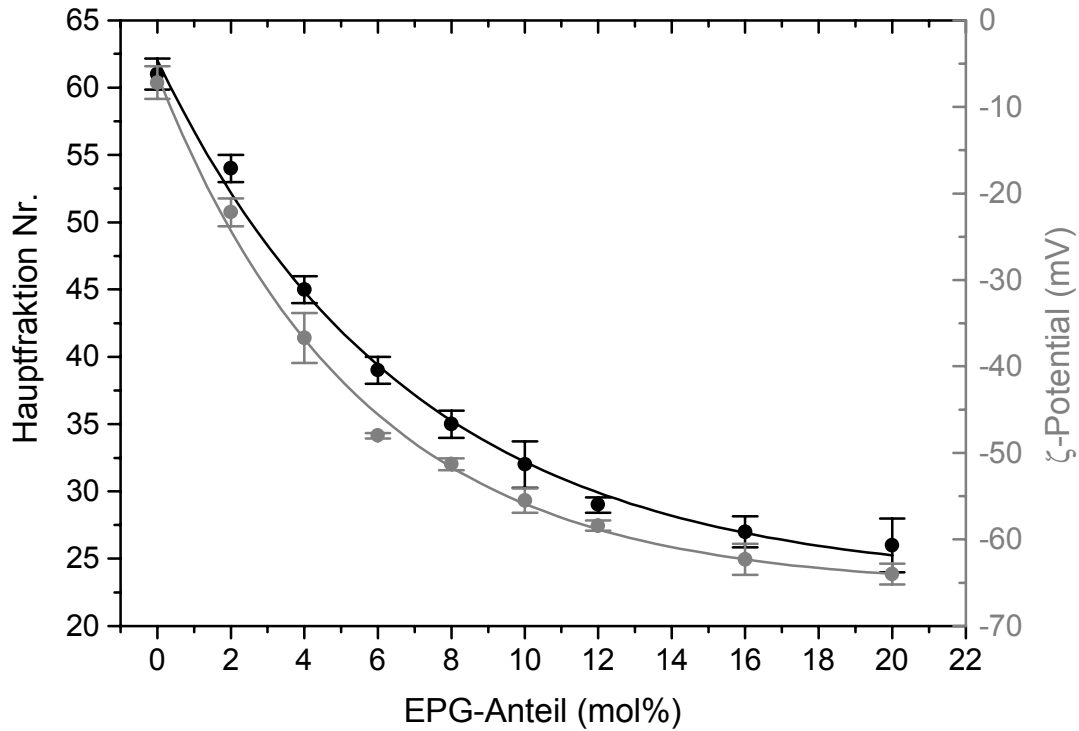


Abbildung 3-12 FFE-Verhalten und ZP von EPG-haltigen Liposomen. Die Hauptfraktionen repräsentieren die FFE-Fractionen mit der höchsten relativen UV-Absorption. Das ζ-Potential wurde wie unter 2.5.2 beschrieben bestimmt. Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung

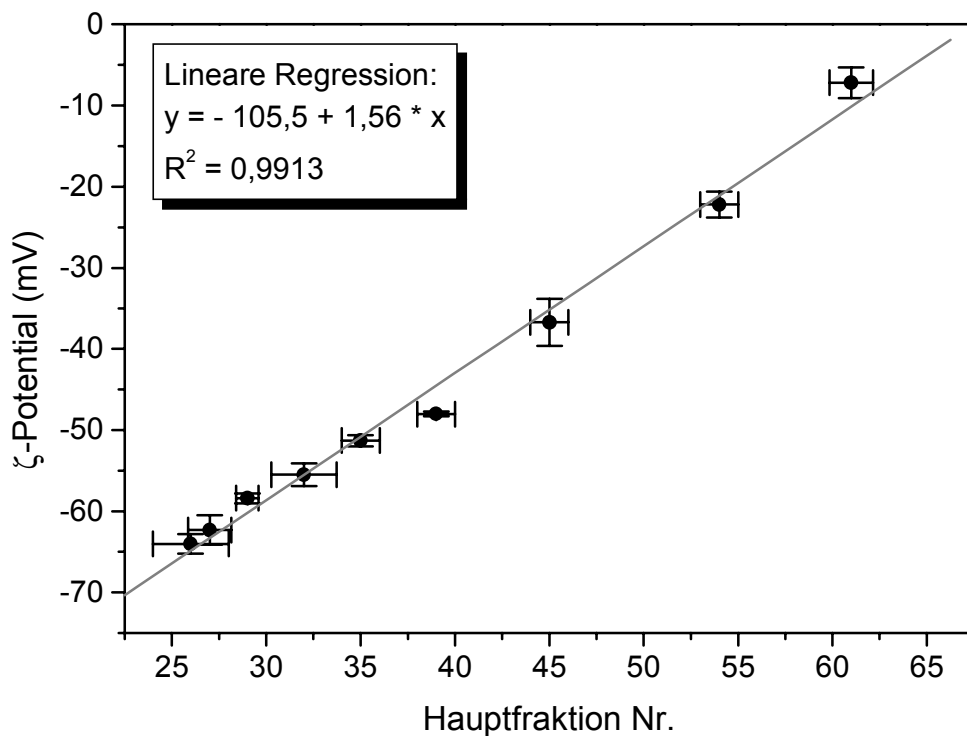
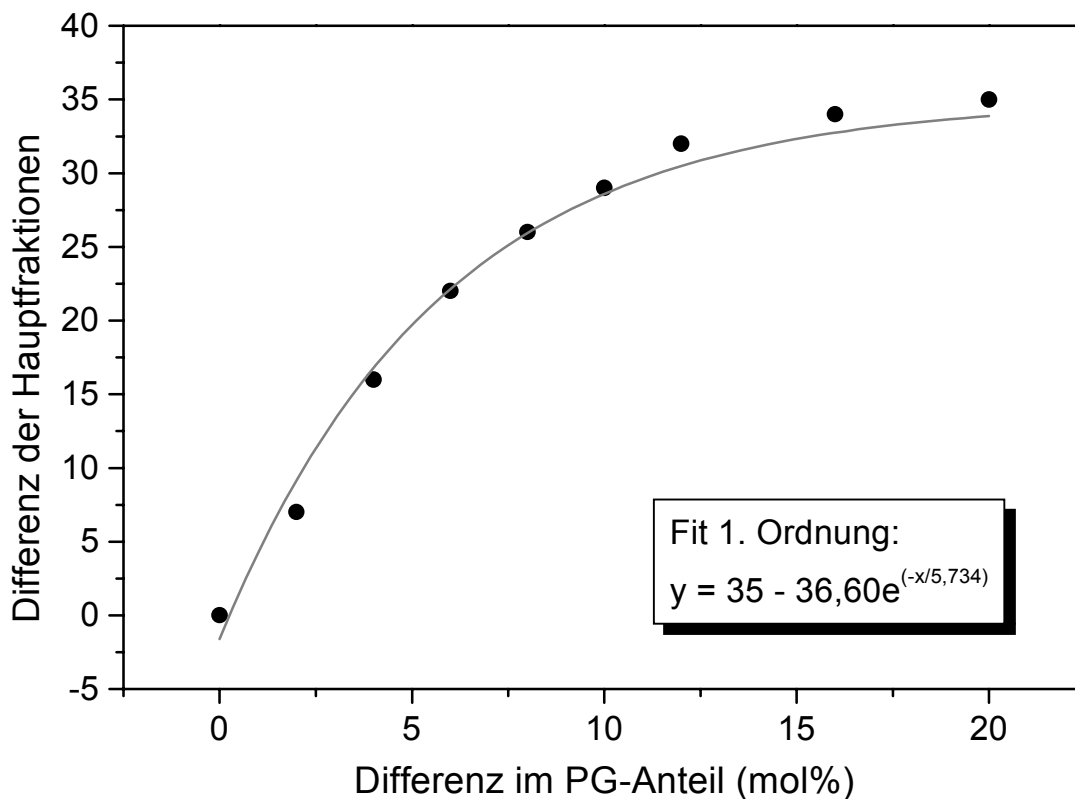


Abbildung 3-13 Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität und dem ζ-Potential von EPC-Liposomen, die 0 bis 20 mol% EPG enthalten.



Abbildung 3-12 kann herangezogen werden, um den EPG-Gehalt im äusseren Monolayer von Liposomen anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität abzuschätzen. Da sich jedoch die Lage der Hauptfraktionen von identischen Proben bei verschiedenen Trennvorgängen verschieben konnte, insbesondere wenn die FFE-Apparatur zwischendurch gewartet und wieder neu in Betrieb genommen worden war, konnte die in Abbildung 3-12 dargestellte Funktion zur Bestimmung des EPG-Gehaltes im äusseren Monolayer nur bedingt angewendet werden. Für Austauschexperimente empfiehlt es sich, die Differenzen zwischen den Hauptfraktionen zur Bestimmung des EPG-Austausches heranzuziehen (vgl. Abbildung 3-14)



**Abbildung 3-14** Relatives FFE-Verhalten von EPG-haltigen Liposomen zu reinen EPC-Liposomen. Die Differenz zwischen der Hauptfraktion der reinen EPC-Liposomen und den Hauptfraktionen der EPG-haltigen Liposomenpräparationen (vgl. Abbildung 3-11) wurde gegen die Differenz im EPG-Gehalt zwischen den EPC-Liposomen und den EPG-haltigen Liposomen aufgetragen

Abbildung 3-14 stellt die Abhängigkeit des Wanderungsverhaltens der Donor- und Akzeptorliposomen in der FFE vom EPG-Gehalt im äusseren Monolayer der beiden Liposomenarten dar. Somit kann über folgende Formel von der elektrophoretischen

Trennung auf die Differenz des EPG-Anteils im äusseren Monolayer der beiden Liposomenarten geschlossen werden:

$$\Delta EPG = -5,73 \cdot \ln \left( \frac{35 - \Delta Hf}{36,60} \right)$$

Gleichung 3-4

*$\Delta EPG$  = Differenz zwischen den EPG-Anteilen im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen [mol%]*  
 *$\Delta Hf$  = Differenz zwischen den Hauptfraktionen bei der FFE-Trennung von Donor- und Akzeptorliposomen*

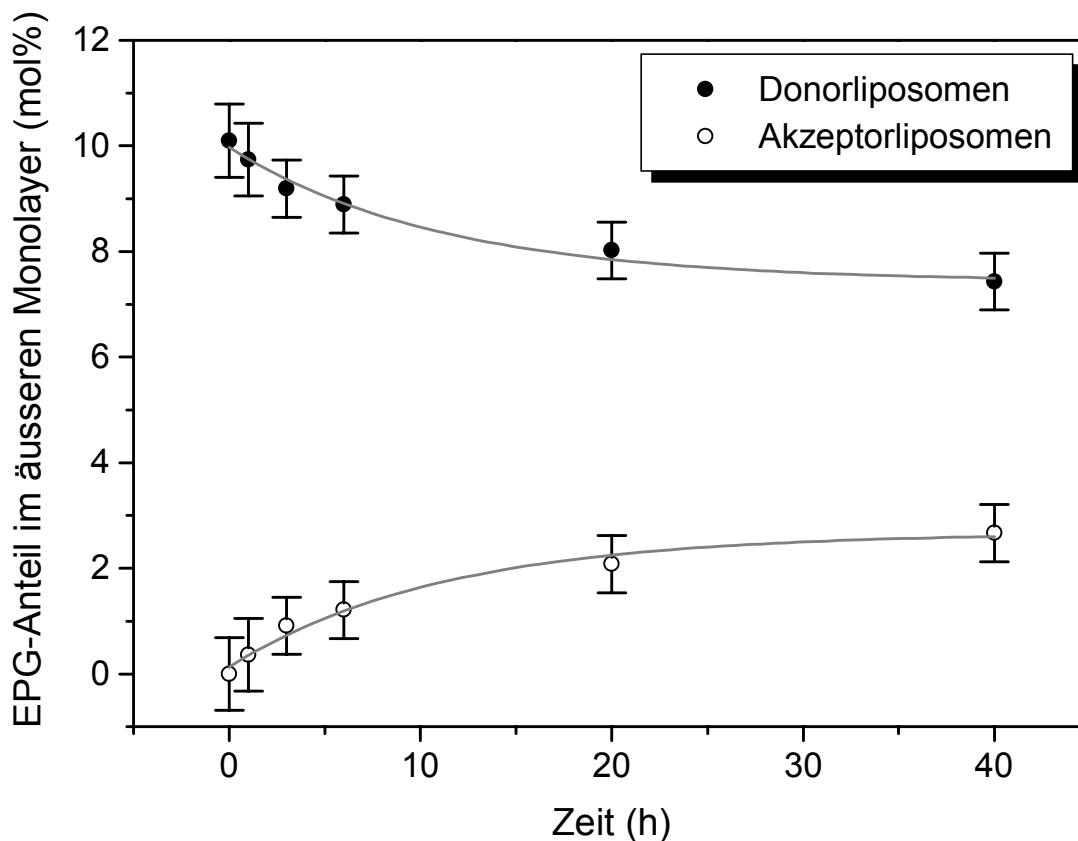
Der anfängliche EPG-Anteil im äusseren Monolayer der eingesetzten Donorliposomen ist bekannt. Demnach lässt sich der EPG-Anteil im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen über Gleichung 3-4 berechnen.

### 3.1.2.3 Austausch von EPG

#### 3.1.2.3.1 Spontaner Austausch

Zur Erfassung des spontanen Austausches von EPG zwischen Donor-LUV (EPC 90 mol%, EPG 10 mol%) und Akzeptor-LUV (EPC 100 mol%) wurden äquimolare Mengen der beiden Liposomenarten (Durchmesser je etwa 90 nm) bei  $25 \pm 0,5$  °C inkubiert (vgl. 2.8.1). Das totale Probenvolumen betrug ca. 500  $\mu$ l und die Gesamtlipidkonzentration 20 mM. Nach 0, 1, 3, 6, 20 und 40 h wurden jeweils 50  $\mu$ l Probe über die FFE aufgetrennt. Die FFE-Parameter sind unter 3.1.2 beschrieben.

Beim spontanen Austausch von EPG zwischen zwei Liposomenpopulationen handelte es sich um einen sehr langsamen Prozess mit einer Halbwertszeit von ungefähr 22 h.



**Abbildung 3-15** Kinetik des spontanen EPG-Austausches zwischen LUV. Donorliposomen: EPC 90 mol%, EPG 10 mol%; Akzeptorliposomen EPC 100 mol%. Äquimolare Mengen der beiden Liposomenarten wurden gemischt und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten über die FFE getrennt (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung).  $n = 3$

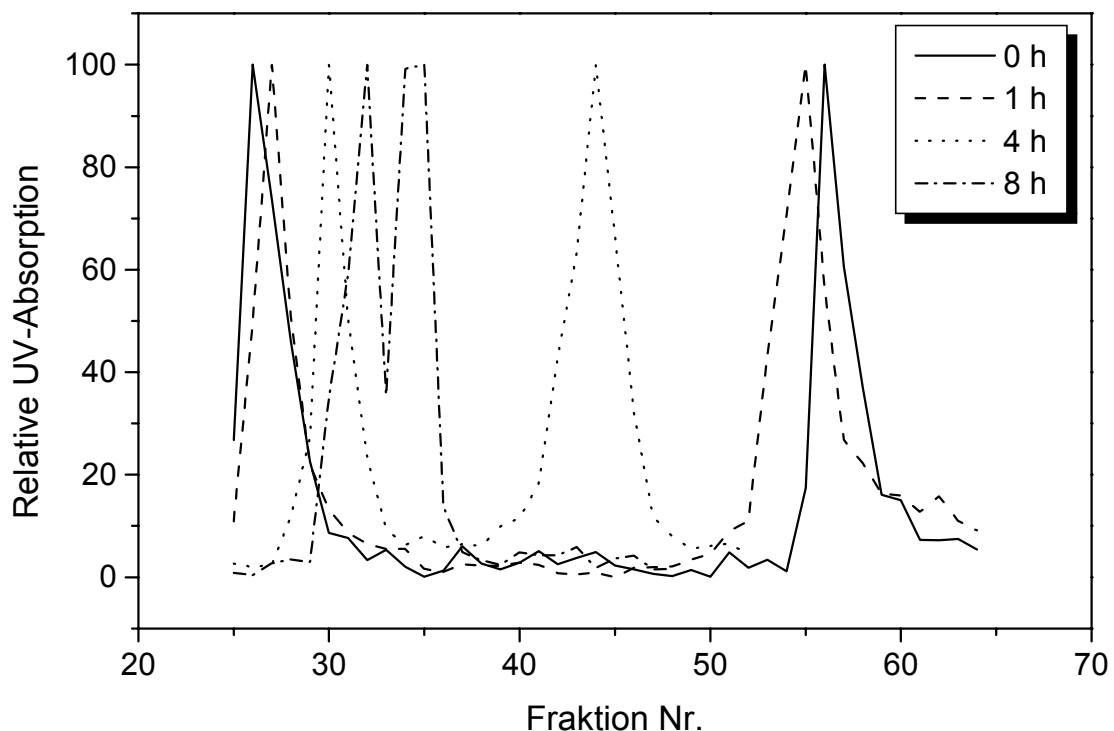
Wie in Abbildung 3-15 zu sehen ist, kam es auch nach 40 h Inkubation bei RT zu keinem vollständigen Ausgleich im EPG-Anteil des äusseren Monolayers der beiden Vesikelarten. Das lässt sich auf den Flipp-Flopp zurückführen, der bei den Donorvesikeln EPG aus dem inneren Monolayer nachliefert und der bei den Akzeptorvesikeln das EPG aus dem äusseren zum inneren Monolayer verschiebt.

### 3.1.2.3.2 Proteinvermittelter Austausch

Beim spontanen Austausch von EPG zwischen Donor- und Akzeptorvesikeln handelt es sich um einen sehr langsamen Prozess. Daher muss während des Austausches damit gerechnet werden, dass die generierte Unsymmetrie bezüglich EPG sowohl in den Donor- als auch in den Akzeptorliposomen durch Flipp-Flopp wieder aufgehoben wird. Durch Zugabe von ns-LTP soll nun der Austauschprozess soweit beschleunigt werden, dass eine gleichmässige Verteilung des EPG im äusseren Monolayer beider

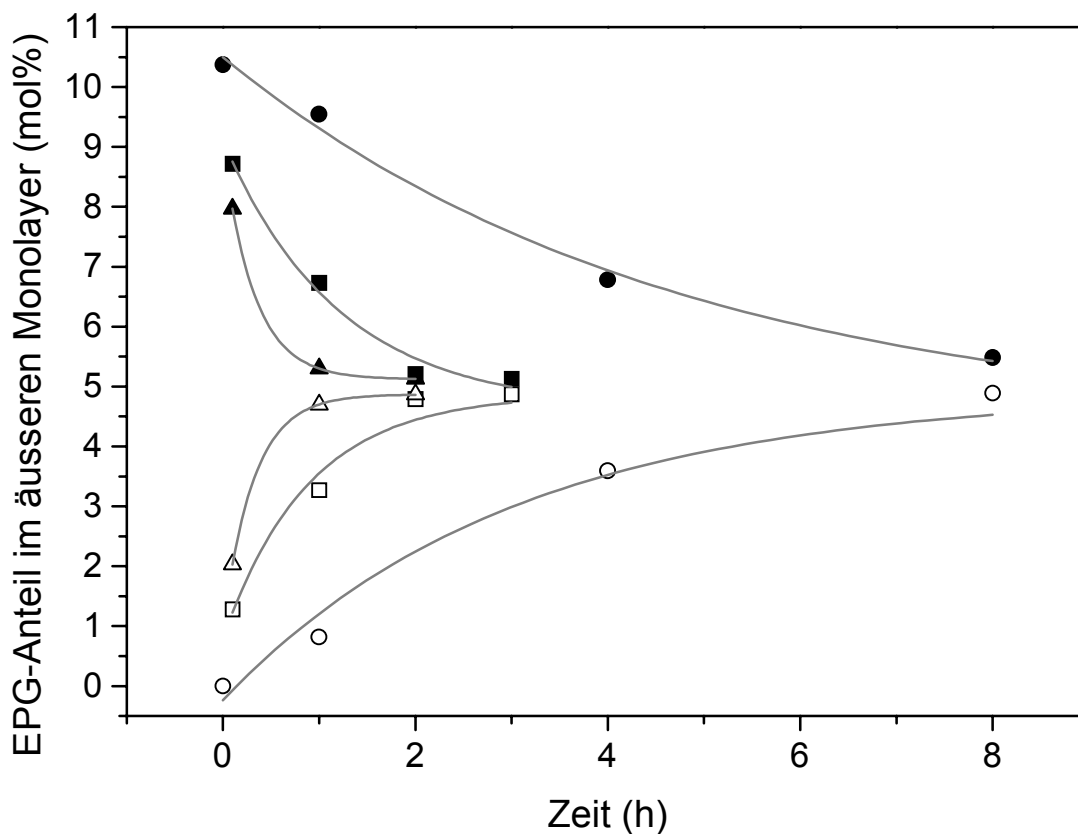
Vesikelpopulationen in einer Zeit erreicht wird, in der der Flipp-Flopp von EPG noch vernachlässigbar ist. Die Menge ns-LTP wurde jeweils auf die im Austauschexperiment total eingesetzte Menge Lipid berechnet und ist im Folgenden in nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid angegeben.

Zur Beschleunigung des Lipidaustausches wurde ns-LTP in Konzentrationen von 0,13, 0,26 und 0,52 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid eingesetzt. 275  $\mu\text{l}$  Donorliposomen (90 mol% EPC, 10 mol% EPG, Gesamtlipidkonzentration 17,05 mM) und 250  $\mu\text{l}$  Akzeptorliposomen (100 mol% EPC, Lipidkonzentration 18,75 mM) wurden mit 1,219 bzw. 2,438 und 4,876 nmol ns-LTP versetzt und bei RT gerührt. Bei dem Experiment mit der geringsten ns-LTP-Menge wurden nach 0, 1, 4 und 8 h jeweils 50  $\mu\text{l}$  des Ansatzes mit der FFE getrennt und die Fraktionen UV-spektrophotometrisch bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  vermessen. Bei den höheren ns-LTP-Mengen wurden nach 0, 1, 2 und 3 h Proben genommen und aufgetrennt. Die FFE-Parameter sind unter 3.1.2 beschrieben. Die folgende Abbildung zeigt die FFE-Trennung der Liposomen des Austauschexperimentes mit 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid.



**Abbildung 3-16** FFE-Trennung von Donorvesikeln (90 mol% EPC, 10 mol% EPG) und Akzeptorvesikeln (100 mol% EPC), die mit 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid bei RT inkubiert worden sind

In Abbildung 3-16 ist zu erkennen, dass die beiden Liposomenpopulationen zu Beginn deutlich voneinander getrennt waren. Die Donorliposomen wurden zur Anode hin abgelenkt und erschienen um die Fraktion 26. Die Akzeptorliposomen wurden nur leicht zur anodalen Seite hin abgelenkt und waren hauptsächlich in Fraktion 56 zu finden. Mit fortschreitendem Austausch glichen sich die Oberflächenladungen der beiden Liposomenarten aneinander an, wodurch sich die Hauptfraktionen bei der FFE-Trennung aufeinander zubewegten. Aus der Lage der Hauptfraktionen bei den verschiedenen Trennungsgängen bzw. aus der Anzahl Fraktionen zwischen den beiden Hauptfraktionen liess sich der EPG-Anteil im äusseren Monolayer der beiden Liposomenpräparationen über Gleichung 3-4 berechnen.



**Abbildung 3-17** Kinetik des proteinvermittelten EPG-Austausches zwischen Donor- und Akzeptorliposomen. Äquimolare Menge der beiden Liposomenpräparationen wurden mit der entsprechenden Menge ns-LTP versetzt und bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben über FFE getrennt. Der EPG-Anteil im äusseren Monolayer berechnete sich über Gleichung 3-4. Geschlossene Symbole: Donorliposomen; Offene Symbole: Akzeptorliposomen. ● 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid; ■ 0,26 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid; ▲ 0,52 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung)

Obige Abbildung zeigt, dass der Lipidaustausch bei einer Konzentration von 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid nach 8 h Inkubation bei RT noch keinen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Dennoch wird deutlich, dass der proteinvermittelte Austausch im Vergleich zum spontanen wesentlich schneller ablief. Bei Verdopplung bzw. Vervielfachung der Proteinkonzentration wurde die Lipidaustauschzeit jeweils auf etwa  $\frac{1}{3}$  verkürzt. Bei 0,52 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid fand sich schon nach 1 h Inkubation bei RT eine vollständige Angleichung der EPG-Anteile in den äusseren Monolayern von Donor- und Akzeptorvesikeln.

#### **3.1.2.4 Austausch von EPG aus Polymer- und Ankerliposomen**

Bei Polymerliposomen handelt es sich um Vesikel, die in ihrem Inneren ein künstliches Zytoskelett tragen (Ringsdorf et al., 1993; Stauch et al., 2002). Es ist davon auszugehen, dass dieses künstliche Zytoskelett die biophysikalischen Eigenschaften der liposomalen Membran (Membranelastizität, Lateraldiffusion von Phospholipiden, Flipp-Flopp, Lipidaustausch) verändert. Es sollte nun festgestellt werden, ob das Polymer im Liposomeninneren einen Einfluss auf den Lipidaustausch hat.

Die Herstellung der Polymerliposomen erfolgte über Detergendsialyse (DD) (Stauch, 2002). Ausgangspunkt war ein EPC- $\text{C}_8\text{E}_4$ -Gemisch, welches als zusätzlichen Bestandteil 1,2-Distearyl-3-octaethylenglykolyglycerolethermethacrylat (DOGM) als ungeladenes polymerisierbares Ankermolekül in der Membran enthielt. Die Dialyse erfolgte in demineralisiertem Wasser, in welchem das Comonomer N-Isopropylacrylamid (NIPAM) und Tetraethylenglykoldimethacrylat (TEGDM) als Vernetzer gelöst vorlagen und bei der Vesikulierung in die Liposomen eingeschlossen wurden. Nach der DD wurde der nichtverkapselte Anteil an Comonomer über Gelpermeationschromatographie abgetrennt. Durch Zugabe eines Radikalstarters zu den Liposomen und UV-Bestrahlung erfolgte die Polymerisation. Im Idealfall erhielt man eine dünne Polymerschicht, die sich an den inneren Monolayer der Liposomen anlagerte und über die Ankermoleküle mit ihm verbunden war.

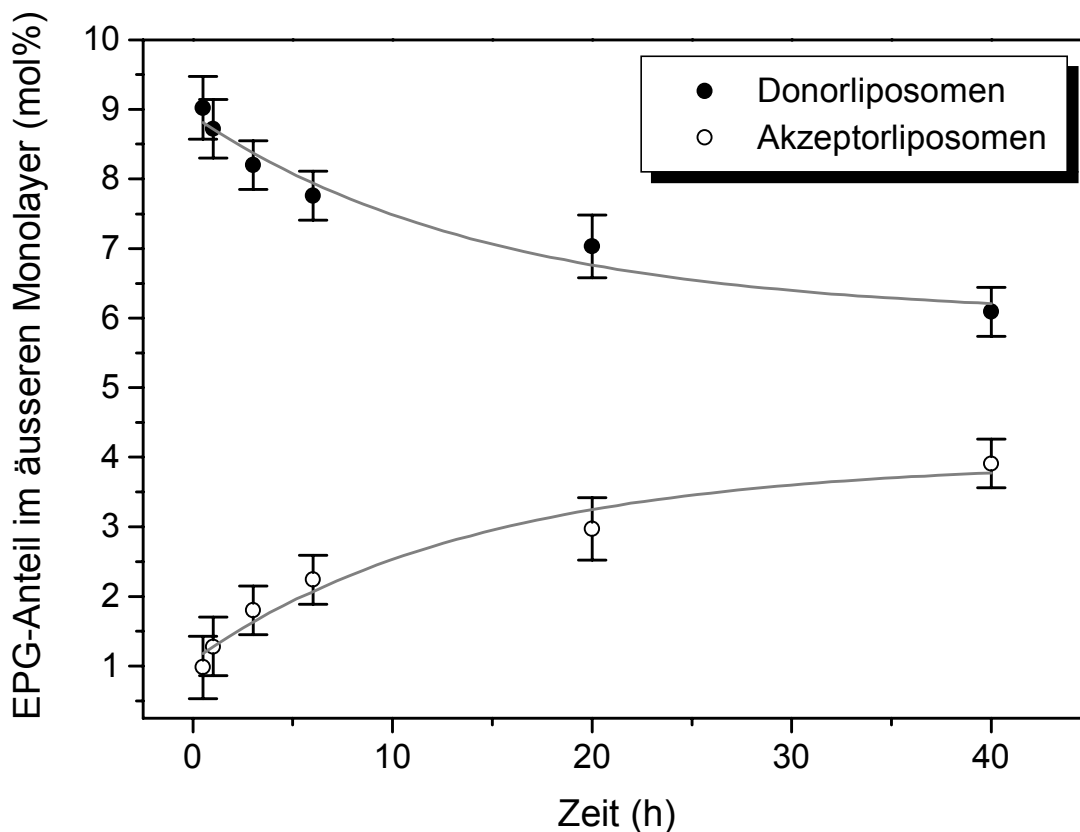
Im Folgenden wurde der Lipidaustausch zwischen Polymerliposomen untersucht. Dazu wurden Donorliposomen (EPC 90 mol%, EPG 10 mol%, Gesamtlipidkonzentration 20 mM) und Akzeptorliposomen (EPC 100 mol%, Lipidkonzentration 20 mM) mit einem künstlichen Zytoskelett versehen. Des Weiteren wurden Donor- und Akzeptorliposomen hergestellt, die nur den Anker DOGM enthielten. Mit diesen

Ankerliposomen sollte festgestellt werden, ob der Anker, der aufgrund der Herstellungsweise nicht nur in den inneren, sondern auch in den äusseren Monolayer inkorporiert wurde, Einfluss auf den Lipidaustausch hat.

### 3.1.2.4.1 Spontaner Austausch

#### a) Polymerliposomen

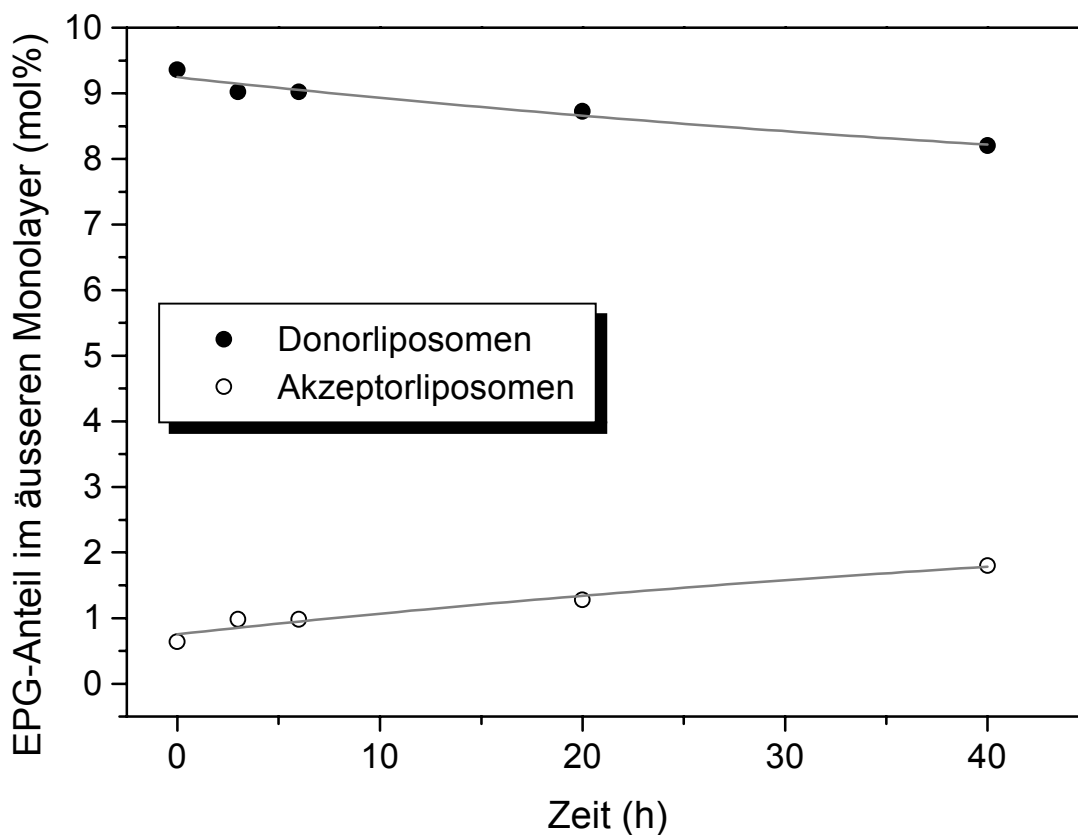
Um den spontanen Austausch von EPG bei Polymerliposomen zu bestimmen, wurden 381  $\mu\text{l}$  Donorliposomen (Gesamtlipidkonzentration 15,22 mM) und 319  $\mu\text{l}$  Akzeptorliposomen (Lipidkonzentration 18,17 mM) gemischt und bei RT inkubiert. Nach 0, 1, 3, 6, 20 und 40 h wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  über FFE aufgetrennt und die aufgefangenen Fraktionen im UV-Spektrophotometer bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  analysiert. Die FFE-Parameter sind unter 3.1.2 beschrieben.



**Abbildung 3-18** Kinetik des spontanen EPG-Austausches zwischen Polymerliposomen. Donorliposomen: EPC 90 mol%, EPG 10 mol%; Akzeptorliposomen EPC 100 mol%. Äquimolare Menge der beiden Liposomenpräparationen wurden gemischt und bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben über FFE getrennt. Der EPG-Anteil im äusseren Monolayer liess sich über Gleichung 3-4 berechnen. Zu Herstellung und Aufbau der Polymerliposomen siehe Text (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung). n = 3

b) Ankerliposomen

Um den spontanen Austausch von EPG bei Ankerliposomen zu bestimmen, wurden 277  $\mu\text{l}$  Donorliposomen (EPC 88 mol%, EPG 10 mol%, DOGM 2 mol%, Gesamtlipidkonzentration 16,06 mM) und 220  $\mu\text{l}$  Akzeptorliposomen (EPC 98 mol%, DOGM 2 mol%, Gesamtlipidkonzentration 20,25 mM) gemischt und bei RT inkubiert. Nach 0, 3, 6, 20 und 40 h wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  über FFE aufgetrennt und die aufgefangenen Fraktionen im UV-Spektrophotometer bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  analysiert. Die FFE-Parameter sind unter 3.1.2 beschrieben.



**Abbildung 3-19 Kinetik des spontanen EPG-Austausches zwischen Ankerliposomen. Äquimolare Menge der beiden Liposomenpräparationen wurden gemischt und bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben über FFE getrennt. Der EPG-Anteil im äusseren Monolayer liess sich über Gleichung 3-4 berechnen. Donorliposomen: EPC 88 mol%, EPG 10 mol%, DOGM 2 mol%; Akzeptorliposomen EPC 98 mol%, DOGM 2 mol% (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung)**

Beim Vergleich der Austauschcharakteristik der beiden Liposomenarten wird deutlich, dass der spontane Austausch von EPG zwischen Polymerliposomen wesentlich schneller vonstatten ging ( $t_{1/2} = 11 \text{ h}$ ) als zwischen Ankerliposomen

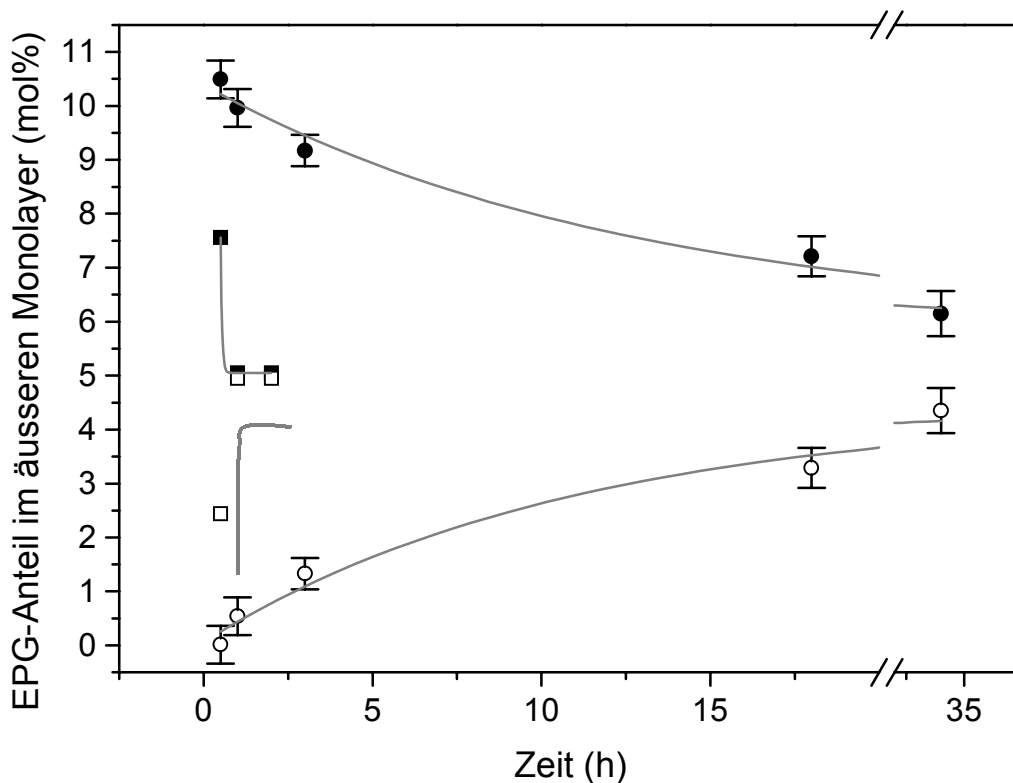


( $t_{1/2} = 52$  h). Das symmetrisch in den Bilayer eingelagerte Anker-molekül DOGM behinderte demnach den spontanen Austausch von EPG, während das künstliche Zytoskelett der Polymerliposomen den Austausch im Vergleich zu herkömmlichen Liposomen beschleunigte.

### 3.1.2.4.2 Proteinvermittelter Austausch

#### a) Polymerliposomen

Zur Bestimmung des proteinvermittelten Austausches von EPG zwischen Polymerliposomen wurden 544  $\mu$ l Donorliposomen (Gesamtlipidkonzentration 15,22 mM) und 456  $\mu$ l Akzeptorliposomen (Gesamtlipidkonzentration 18,17 mM) mit 2,153 bzw. 1,076 nmol ns-LTP versetzt, was einer Proteinmenge von 0,13 bzw. 0,065 nmol ns-LTP pro  $\mu$ mol Lipid entspricht.



**Abbildung 3-20** Kinetik des proteinvermittelten EPG-Austausches zwischen Polymerliposomen. Äquimolare Menge der beiden Liposomenpräparationen wurden gemischt und bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben über FFE getrennt. Der EPG-Anteil im äusseren Monolayer liess sich über Gleichung 3-4 berechnen. Donorliposomen: EPC 90 mol%, EPG 10 mol%; Akzeptorliposomen EPC 100 mol%. Geschlossene Symbole: Donorliposomen; Offene Symbole: Akzeptorliposomen. ■ 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu$ mol Lipid; ● 0,065 nmol ns-LTP pro  $\mu$ mol Lipid (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung).  $n = 3$

Bei der höheren Proteinkonzentration wurden nach 0, 1 und 2 h, bei der tieferen Konzentration nach 0, 1, 3, 18 und 34 h jeweils 100  $\mu\text{l}$  über die FFE aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen im UV-Spektrophotometer bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  analysiert.

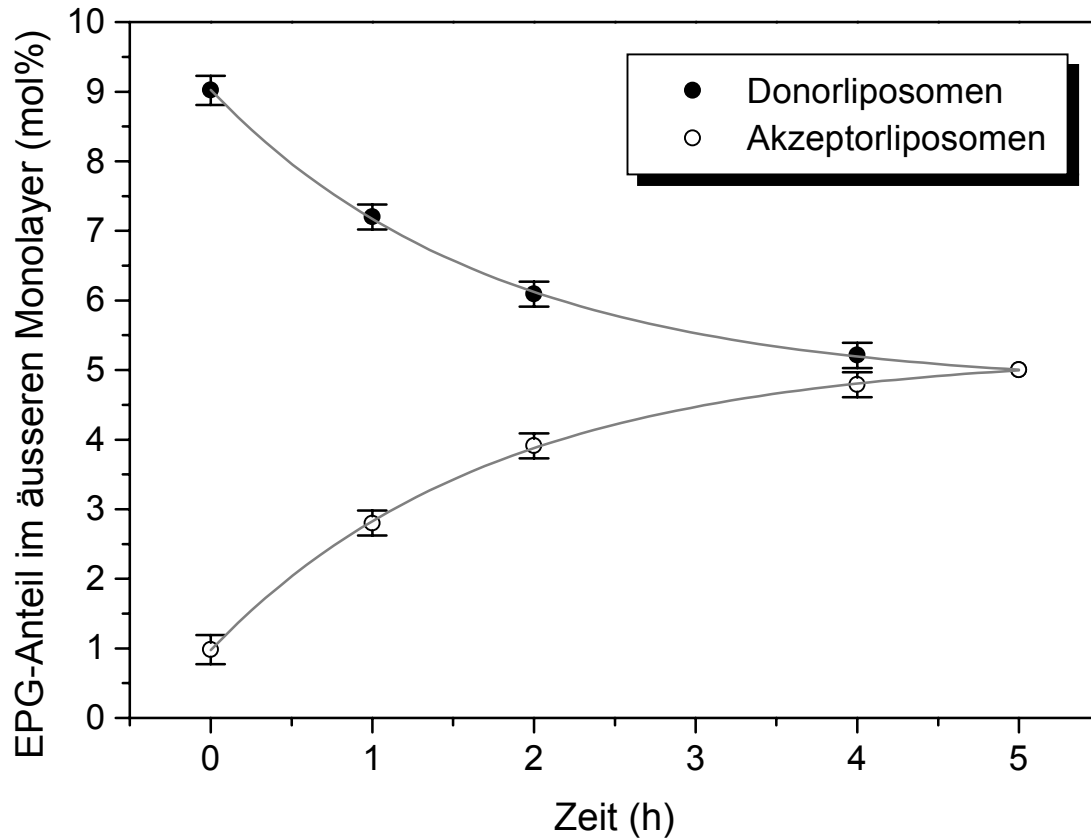
Wie in der obigen Abbildung deutlich zu sehen, verkürzte sich die Inkubationszeit beim Lipidaustausch durch Verdoppelung der Proteinkonzentration von 0,065 auf 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid dramatisch. Bei herkömmlichen Liposomen führt eine Verdoppelung der Proteinkonzentration zu einer Verdoppelung der Austauschgeschwindigkeit (Dern, 2002). Im Fall der Polymerliposomen vervielfachte sich die Austauschgeschwindigkeit.

#### b) Ankerliposomen

Zur Bestimmung des proteinvermittelten Austausches von EPG zwischen Ankerliposomen wurden 277  $\mu\text{l}$  Donorliposomen (EPC 88 mol%, EPG 10 mol%, DOGM 2 mol%, Gesamtlipidkonzentration 16,06 mM) und 220  $\mu\text{l}$  Akzeptorliposomen (EPC 98 mol%, DOGM 2 mol%, Gesamtlipidkonzentration 20,25 mM) mit 1,157 nmol ns-LTP versetzt.

Die Proteinkonzentration betrug 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid. Nach 0, 1, 2, 4 und 6 h wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Probe über die FFE aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen im UV-Spektrophotometer bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  analysiert.

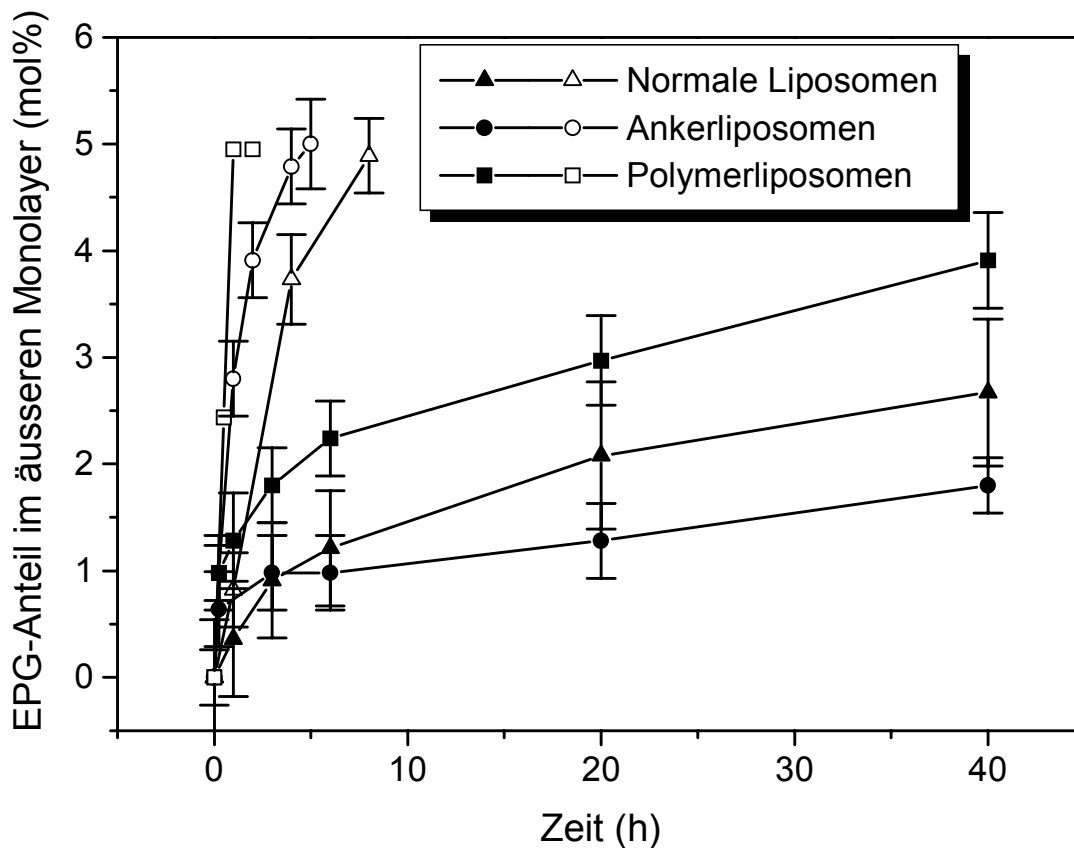
Polymer- und Ankerliposomen unterscheiden sich deutlich in der Geschwindigkeit des proteinvermittelten EPG-Austausches. Bei einer ns-LTP-Konzentration von 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid kam es bei Polymerliposomen schon nach 1 h zur vollständigen Angleichung der EPG-Anteile im äusseren Monolayer der beiden Vesikelarten, während der Vorgang bei den Ankerliposomen 5 h in Anspruch nahm.



**Abbildung 3-21** Kinetik des proteinvermittelten EPG-Austausches zwischen Ankerliposomen. Äquimolare Menge der beiden Liposomenpräparationen wurden gemischt und bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben über FFE getrennt. Der EPG-Anteil im äusseren Monolayer liess sich über Gleichung 3-4 berechnen. Donorliposomen: EPC 88 mol%, EPG 10 mol%, DOGM 2 mol%; Akzeptorliposomen EPC 98 mol%, DOGM 2 mol%. Proteinkonzentration: 0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung).  $n = 3$

### 3.1.2.5 Vergleich der verschiedenen Liposomenarten

Die Geschwindigkeit des spontanen und proteinvermittelten Austausches von EPG hängt unter anderem von der Liposomenzubereitung ab. Die unten stehende Grafik fasst die Resultate der Austauschversuche zusammen.



**Abbildung 3-22 Spontaner und proteinvermittelter EPG-Austausch in verschiedenen Liposomenpräparationen. Geschlossene Symbole: spontaner Lipidaustausch. Offene Symbole: proteinvermittelter Lipidaustausch (0,13 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid). Es sind die EPG-Anteile im äusseren Monolayer der Akzeptorliposomen dargestellt**

### 3.1.2.6 Diskussion der Austauschmessungen mit FFE

Wie schon erwähnt, beschleunigte die Zugabe von ns-LTP den Austausch von EPG um ein Vielfaches. Es zeigten sich aber deutliche Unterschiede bei den drei verschiedenen Liposomenpräparationen. Wie in Abbildung 3-22 zu sehen ist, wiesen die Polymerliposomen die höchste spontane und auch proteinvermittelte Austauschrate auf. Diese Liposomen schollen während der Polymerisation leicht an, was über Grössenmessungen mittels PCS nachgewiesen werden konnte. Dadurch verringerte sich möglicherweise die Packungsdichte der Phospholipide, wodurch die Lipide leichter aus dem Bilayer extrahiert werden konnten. Auch eine durch das starr verankerte Membranskelett induzierte thermische Schwingung der Membran könnte Membrandefekte erzeugt haben.

Das ungeladene Ankermolekül DOGM, das im Bilayer symmetrisch inkorporiert war, konnte für die erhöhte spontane Transferrate bei den Polymerliposomen nicht verantwortlich gemacht werden, da es nachweislich den Austausch von EPG behinderte. Dagegen schien es aber die proteinvermittelte Extraktion von EPG aus der Membran von Donorliposomen zu erleichtern. Sowohl Anker- als auch Polymerliposomen wiesen eine höhere proteinvermittelte Lipidtransferrate auf als normale Liposomen. Möglicherweise ist die dramatische Beschleunigung des ns-LTP-vermittelten EPG-Austausches bei den Polymerliposomen auf einen synergistischen Effekt von künstlichem Zytoskelett und Ankermolekül zurückzuführen.

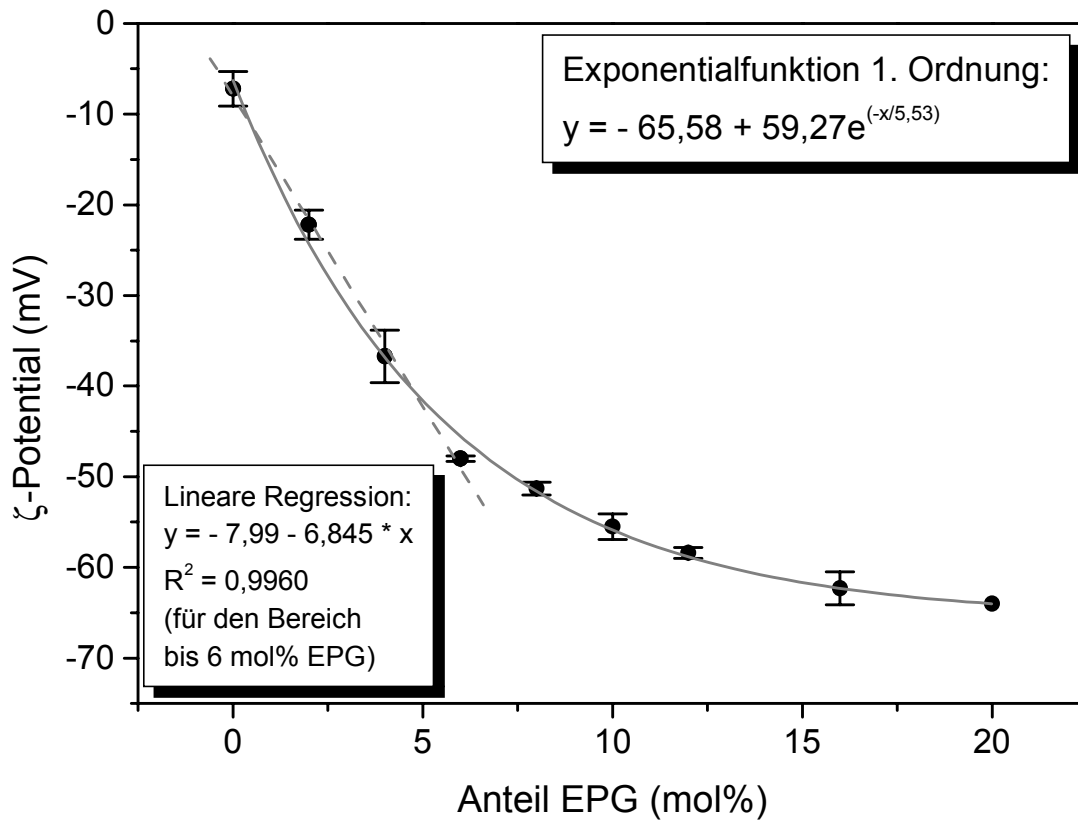
## **3.2 Bestimmung des Flipp-Flopp**

Die Umlagerung von Phospholipiden zwischen den Monolayern einer Membran (Flipp-Flopp, vgl. 1.4.3.2) stellt einen Prozess dar, der der Unsymmetrie in Liposomen entgegenwirkt. Um abschätzen zu können, in welchem Zeitraum es zum Verlust der unsymmetrischen Verteilung kommt, wurde die Geschwindigkeit des Flipp-Flopp von EPG und EPS in EPC-Liposomen untersucht.

### **3.2.1 Methoden**

#### **3.2.1.1 $\zeta$ -Potential von EPG-haltigen Liposomen**

Die Bewegung von EPG zwischen den beiden Monolayern von LUV geht einher mit einer Veränderung der Oberflächenladung der Liposomen. Mittels  $\zeta$ -Potentialmessungen lassen sich diese Veränderungen verfolgen. Um vom gemessenen  $\zeta$ -Potential auf den Gehalt an EPG im äusseren Monolayer der entsprechenden Probe schliessen zu können, wurde die Abhängigkeit des  $\zeta$ -Potentials vom EPG-Anteil im äusseren Monolayer untersucht. Dazu wurden Liposomen mit 0 bis 20 mol% EPG mittels Extrusion (vgl. 2.4.1) hergestellt. Das  $\zeta$ -Potential der verschiedenen Vesikelpräparationen wurde wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 3-23** ζ-Potential als Funktion des EPG-Anteils in EPC-Liposomen. Die Messungen wurden wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben durchgeführt. n = 3

Über folgende Formel liess sich der EPG-Anteil im äusseren Monolayer von LUV bei bekanntem ζ-Potential berechnen:

$$EPG_a = -5,53 \cdot \ln \left( \frac{\zeta + 65,58}{59,27} \right)$$

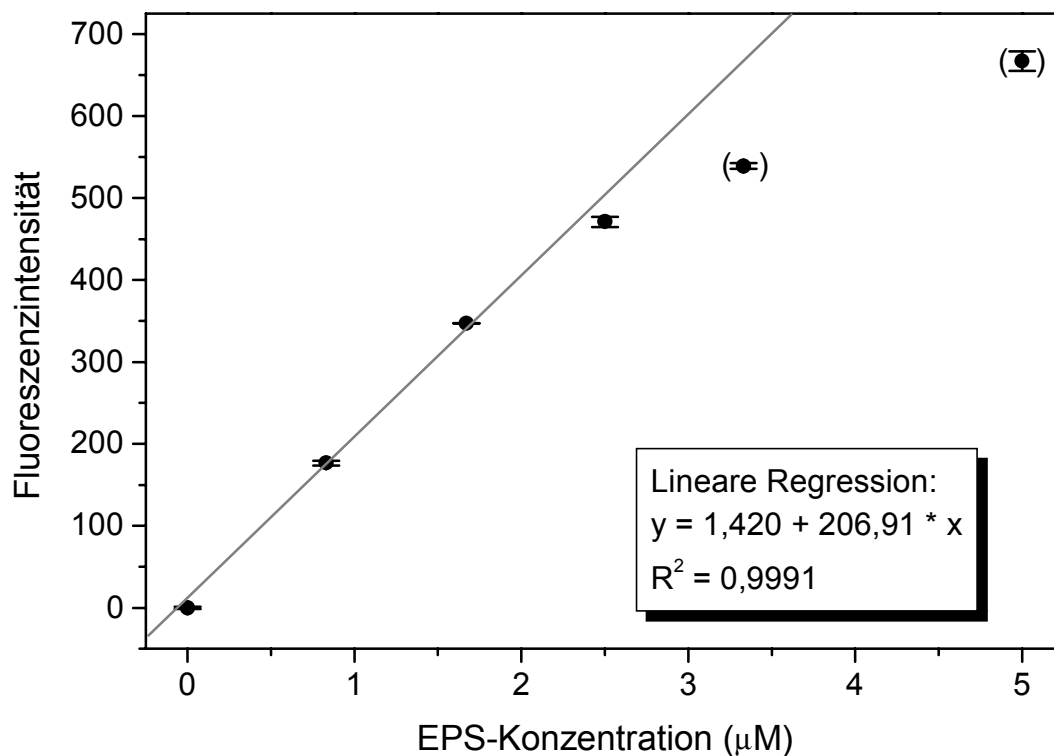
**Gleichung 3-5**

Wie aus Abbildung 3-23 ersichtlich wird, strebte das ζ-Potential von EPG-haltigen Liposomen bei steigendem EPG-Gehalt unter den entsprechenden Messbedingungen einem minimalen Wert von -65,6 mV entgegen. Bei Liposomen mit über 10 mol% EPG hätten sich Unterschiede im EPG-Gehalt mittels ζ-Potentialmessungen nur schwer erfassen lassen, da keine grossen Veränderungen der Werte zu erwarten waren. In den folgenden Versuchen wurde der EPG-Anteil in den Donorliposomen dementsprechend auf 5 mol% reduziert, um einen in etwa linearen

Zusammenhang zwischen  $\zeta$ -Potential und EPG-Anteil im äusseren Monolayer zu erhalten (vgl. Abbildung 3-23).

### 3.2.1.2 Linearität des Fluorescamin-Assays

Die Menge an EPS im äusseren Monolayer sowie die Verteilung von EPS zwischen den Monolayern von LUV lässt sich mit dem Fluorescamin-Assay bestimmen. Es sollte nun festgestellt werden, ob die Fluorescamin-Fluoreszenz proportional zum Anteil EPS im äusseren Monolayer von Liposomen ist.



**Abbildung 3-24** Fluorescamin-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der EPS-Konzentration. Der Fluorescamin-Assay wurde wie in Kapitel 2.10.2.1 beschrieben mit EPC-Liposomen, die 0 bis 20 mol% EPS enthielten, durchgeführt. Die Gesamtlipidkonzentration betrug dabei immer 33,3 µM. n = 3

Der Assay wurde wie unter 2.10.2.1 beschrieben mit EPC-Liposomen, die 0 bis 20 mol% EPS enthielten, durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter den herrschenden Bedingungen eine Linearität des Fluorescamin-Assays nur im Konzentrationsbereich bis 2,5 µM EPS gegeben war. Die im Assay eingesetzten Probenmengen wurden so angepasst, dass die totale EPS-Konzentration diesen Wert nicht überschritt.

### **3.2.1.3 TNS-Assay**

Die lipophile 2-(*p*-Toluidinyl)naphthalen-6-sulfonsäure lagert sich bei Bilayern in die Lipid-Wasserschicht im Bereich der Kopfgruppen der Phospholipide ein. Durch diese Interaktion steigt die Fluoreszenzaktivität von TNS im Vergleich zu einer wässrigen TNS-Lösung um ein Vielfaches an.

Die Einlagerung der Fluoreszenzsonde geschieht in Abhängigkeit von der Oberflächenladung der liposomalen Membran. Somit ist es möglich, durch Messung der TNS-Fluoreszenz auf die Menge an negativ geladenem Phospholipid zu schliessen, die im äusseren Monolayer von Liposomen vorhanden ist.

Da es sich bei der Bindung von TNS um ein Verteilungsgleichgewicht nach Massenwirkungsgesetz handelt, ist die Menge TNS, die sich in die liposomalen Membranen einlagert, und dementsprechend die Fluoreszenzintensität, nicht nur abhängig von der TNS-Konzentration in der wässrigen Phase und der Oberflächenladung der Liposomen, sondern auch von der totalen Lipidkonzentration. Der Zusammenhang von Lipidkonzentration, molaren Anteilen EPG bzw. EPS im äusseren Monolayer,  $\zeta$ -Potential der entsprechenden Liposomen und Fluoreszenzintensität wird im Folgenden näher besprochen.

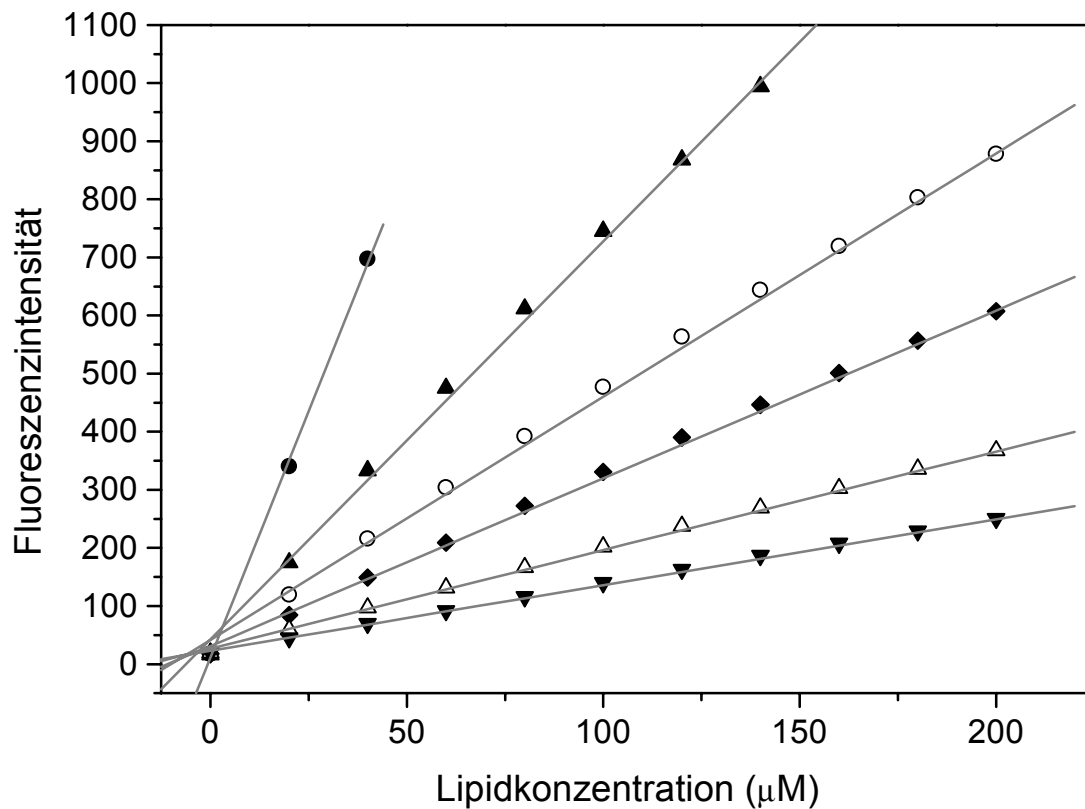
#### **3.2.1.3.1 EPG-haltige Liposomen**

Die Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Liposomen ist unter 2.10.3.2 beschrieben. Sie wurden mittels Extrusion durch eine 100 nm Membran hergestellt (vgl. 2.4.1).

##### **3.2.1.3.1.1 Lipidkonzentration und -zusammensetzung**

Die Fluoreszenzintensität beim TNS-Assay ist abhängig von der Lipidkonzentration in der Probe. Um festzustellen, ob und in welchen Konzentrationsbereichen das Verhältnis linear ist, wurde eine 3  $\mu$ M TNS-Lösung mit aufsteigenden Mengen EPG-haltiger Liposomen (0 bis 20 mol% EPG) versetzt. Die Lipidkonzentration im Assay betrug 20 bis 200  $\mu$ M.

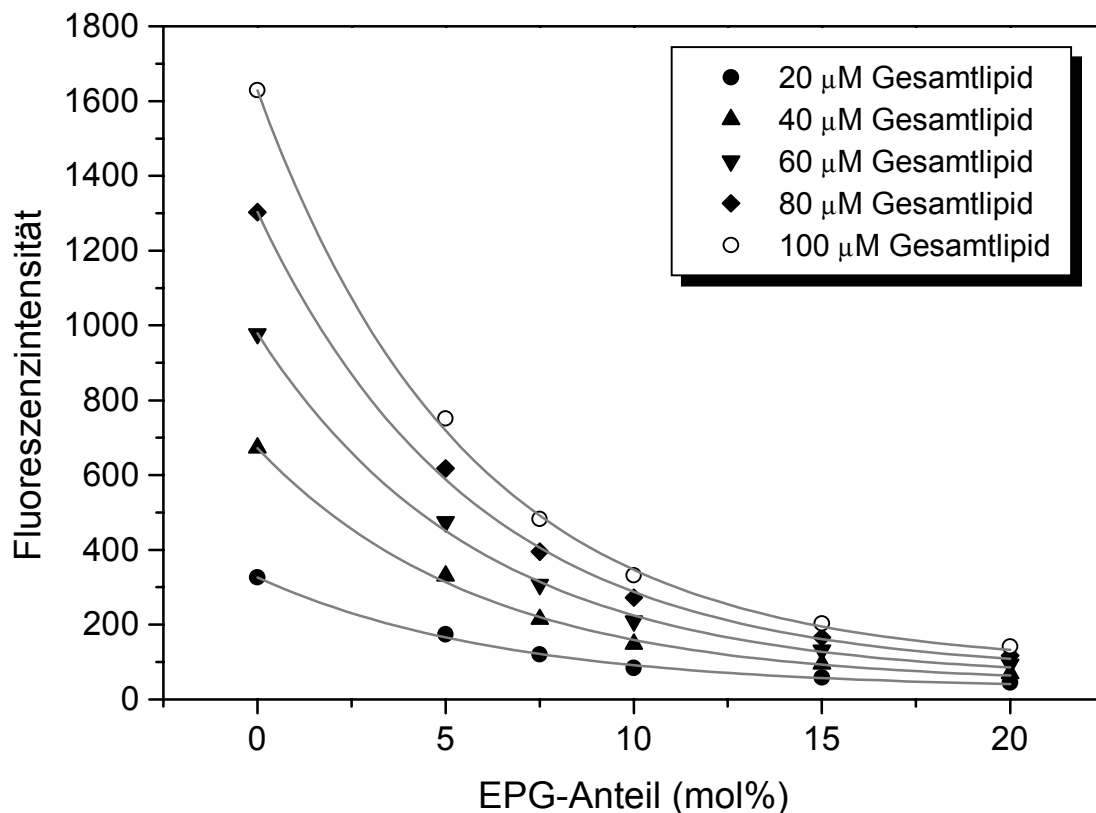




**Abbildung 3-25** Linearität des TNS-Assays. Aufsteigende Mengen EPG-haltiger Liposomen wurden zu einer 3 μM TNS-Lösung pipettiert und der Fluoreszenzanstieg verfolgt. Die totale Lipidkonzentration betrug 20 bis 200 μM. ● 0 mol% EPG; ▲ 5 mol% EPG; ○ 7,5 mol% EPG; ◆ 10 mol% EPG; △ 15 mol% EPG; ▼ 20 mol% EPG

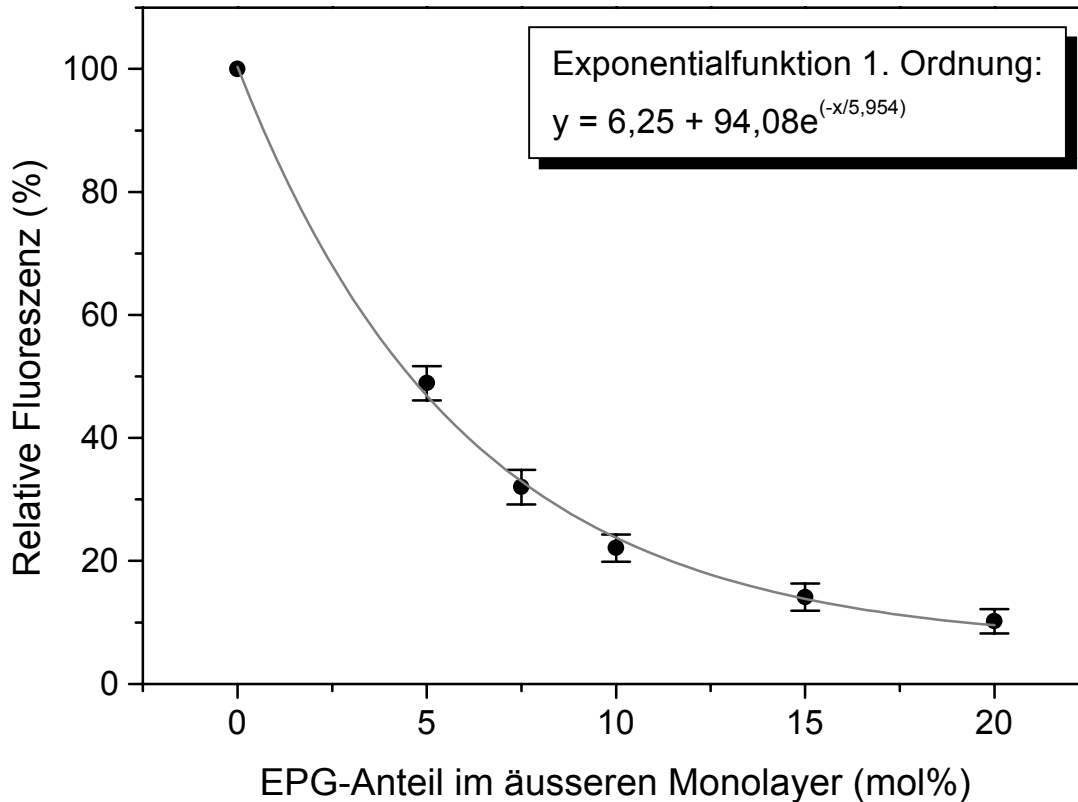
Abbildung 3-25 zeigt, dass die Fluoreszenzintensität in einem linearen Verhältnis zur Gesamtlipidkonzentration stand. Dies war zu erwarten, da es sich bei der Einlagerung von TNS in die liposomale Membran um ein Bindungsgleichgewicht handelt. Zudem ist die Abhängigkeit der Einlagerung von TNS vom EPG-Anteil der Liposomen zu erkennen. In die Membran von reinen EPC-Liposomen lagerte sich TNS am leichtesten ein, was zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz führte. Mit steigendem Anteil an EPG lagerte sich immer weniger TNS in den äusseren Monolayer ein und die Intensität der Fluoreszenz nahm ab. Bei den Liposomen mit 5, 7,5 und 10 mol% EPG lässt sich erkennen, dass bei Lipidkonzentrationen über 100 μM, was einem molaren Lipid-TNS-Verhältnis von 33:1 entspricht, der Fluoreszenzanstieg nicht mehr linear war, sondern leicht abflachte.

### 3.2.1.3.1.2 EPG-Anteil im äusseren Monolayer



**Abbildung 3-26** TNS-Fluoreszenz als Funktion des EPG-Anteils in EPC/EPG-Liposomen (Durchmesser 100 nm) bei verschiedenen Lipidkonzentrationen. Aufsteigende Mengen EPG-haltiger Liposomen wurden zu einer 3 µM TNS-Lösung pipettiert und der Fluoreszenzanstieg verfolgt. Die totale Lipidkonzentration betrug 20 bis 100 µM (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung)

Wie in Abbildung 3-26 zu sehen ist, resultierte ein steigender Anteil an EPG im äusseren Monolayer der Liposomen in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Es wird deutlich, dass kein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzsignal und EPG-Anteil bestand. Analog zum Zusammenhang von  $\zeta$ -Potential und EPG-Anteil (vgl. 3.2.1.1) konnte die TNS-Fluoreszenz als Exponentialfunktion 1. Ordnung des EPG-Anteils beschrieben werden. Um den Einfluss der totalen Lipidkonzentration auszuräumen, liess sich die TNS-Fluoreszenz der EPC/EPG-Liposomen auch als relative Fluoreszenz bezogen auf die gemessenen Werte von reinen EPC-Liposomen der gleichen Konzentration darstellen.



**Abbildung 3-27** TNS-Fluoreszenz als Funktion des EPG-Anteils in EPC/EPG-Liposomen (Durchmesser 100 nm, EPG-Anteil 0 bis 20 mol%). Die Fluoreszenz der EPG-haltigen Vesikel ist ausgedrückt als Verhältnis von gemessener TNS-Fluoreszenz der Probe und TNS-Fluoreszenz von reinen EPC-Liposomen der gleichen Gesamtlipidkonzentration (= 100 %-Wert). Im Graphen ist ein Konzentrationsbereich von 20 bis 100  $\mu$ M Gesamtlipid erfasst

Um nun aus der TNS-Fluoreszenz den EPG-Gehalt im äusseren Monolayer von Liposomen berechnen zu können, wurde die gemessene TNS-Fluoreszenz ins Verhältnis gesetzt zur TNS-Fluoreszenz einer Probe aus reinen EPC-Liposomen der gleichen Konzentration (100%-Wert). Bei bekannter relativer TNS-Fluoreszenz lässt sich der EPG-Anteil im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorvesikeln über folgende Formel berechnen (vgl. auch Abbildung 3-27):

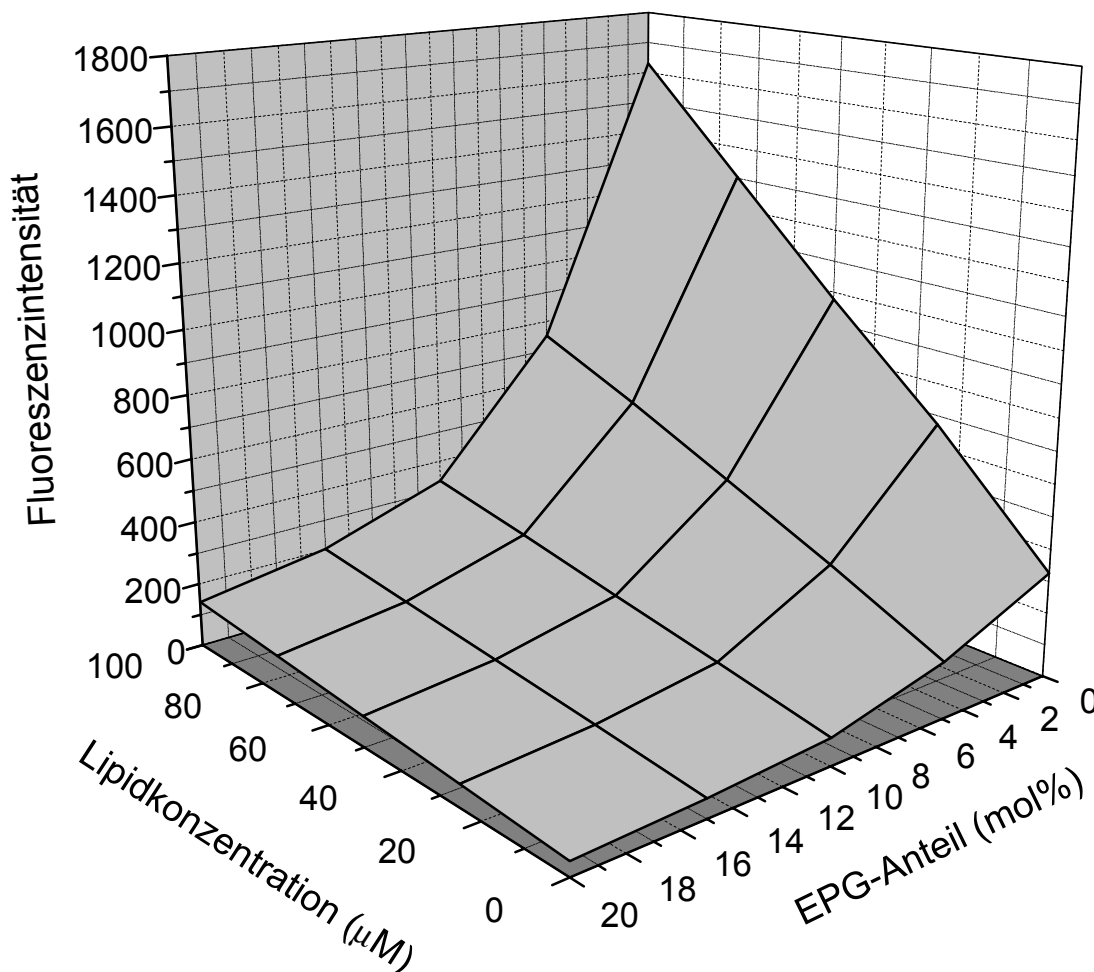
$$EPG_a = -5,95 \cdot \ln\left(\frac{F_{rel} - 6,25}{94,08}\right)$$

**Gleichung 3-6**

$EPG_a$  = EPG-Anteil im äusseren Monolayer [mol%]

$F_{rel}$  = Relative TNS-Fluoreszenz [%]

Die Abhängigkeit der TNS-Fluoreszenz von der Gesamtlipidkonzentration und dem EPG-Anteil lässt sich auch zusammenfassend in einem 3D-Graphen darstellen:

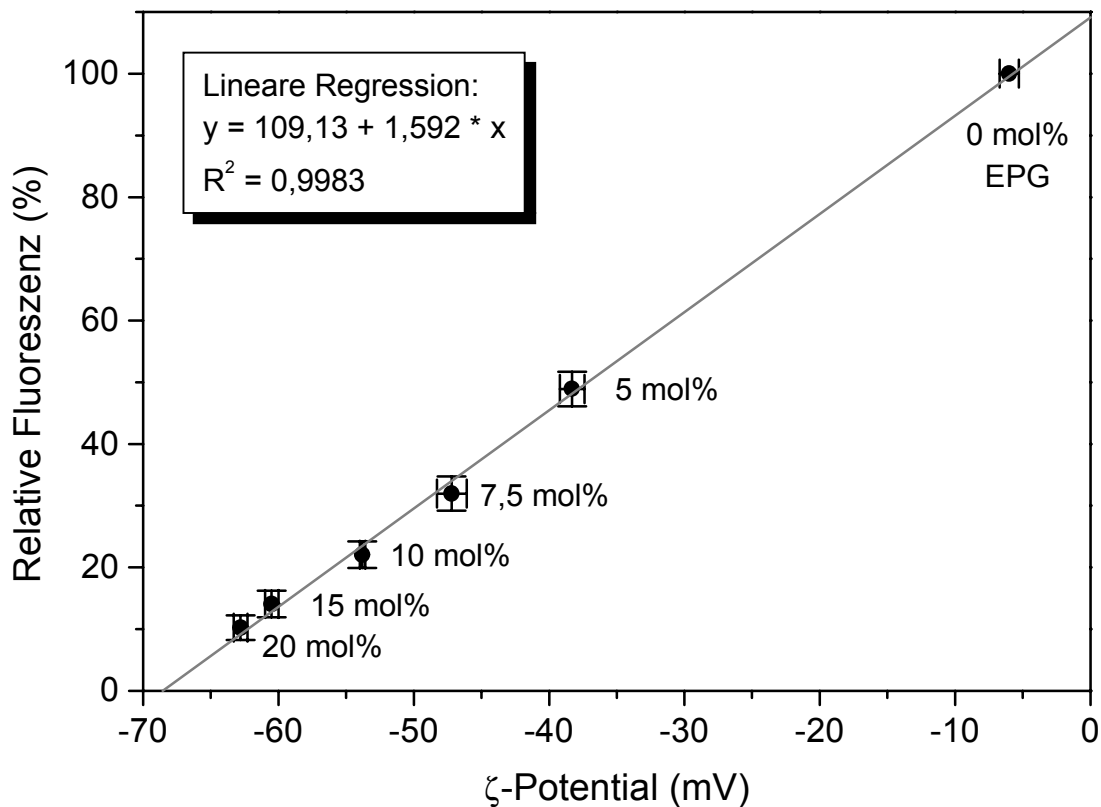


**Abbildung 3-28** TNS-Fluoreszenz als Funktion des EPG-Anteils in EPC/EPG-Liposomen (Durchmesser 100 nm) und der totalen Lipidkonzentration. Aufsteigende Mengen EPG-haltiger Liposomen (0 bis 20 mol% EPG) wurden zu einer 3 μM TNS-Lösung pipettiert und der Fluoreszenzanstieg verfolgt. Die totale Lipidkonzentration betrug 0 bis 100 μM

### 3.2.1.3.1.3 TNS-Assay und ζ-Potential

Bei TNS handelt es sich um eine umgebungssensitive Fluoreszenzsonde, die sich in Abhängigkeit zur Oberflächenladung in liposomale Membranen einlagert. Um festzustellen, ob von den Resultaten der TNS-Versuche direkt auf die Oberflächenladung von Liposomen geschlossen werden kann, wurde das ζ-Potential der für die TNS-Vorversuche verwendeten Liposomen (vgl. 2.10.3.2) gemessen und gegen die relative TNS-Fluoreszenz der Liposomen aufgetragen. Die Messung des ζ-Potentials erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

Wie in Abbildung 3-29 zu sehen ist, besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der relativen TNS-Fluoreszenz und dem  $\zeta$ -Potential von EPC/EPG-Liposomen. Dies zeigt, dass sich TNS in Abhängigkeit von der Oberflächenladung von Liposomen in deren Membran einlagerte, und dass die Einlagerung der negativ geladenen TNS in den vorliegenden Konzentrationen die Oberflächenladung nicht wesentlich veränderte.



**Abbildung 3-29** Die relative TNS-Fluoreszenz von EPC/EPG-Liposomen (0 / 5 / 7,5 / 10 / 15 und 20 mol% EPG) in Abhängigkeit vom  $\zeta$ -Potential der entsprechenden Liposomen

Somit stellt der TNS-Assay zur Bestimmung des Flipp-Flopp von EPG eine Alternative zur  $\zeta$ -Potentialmessung dar.

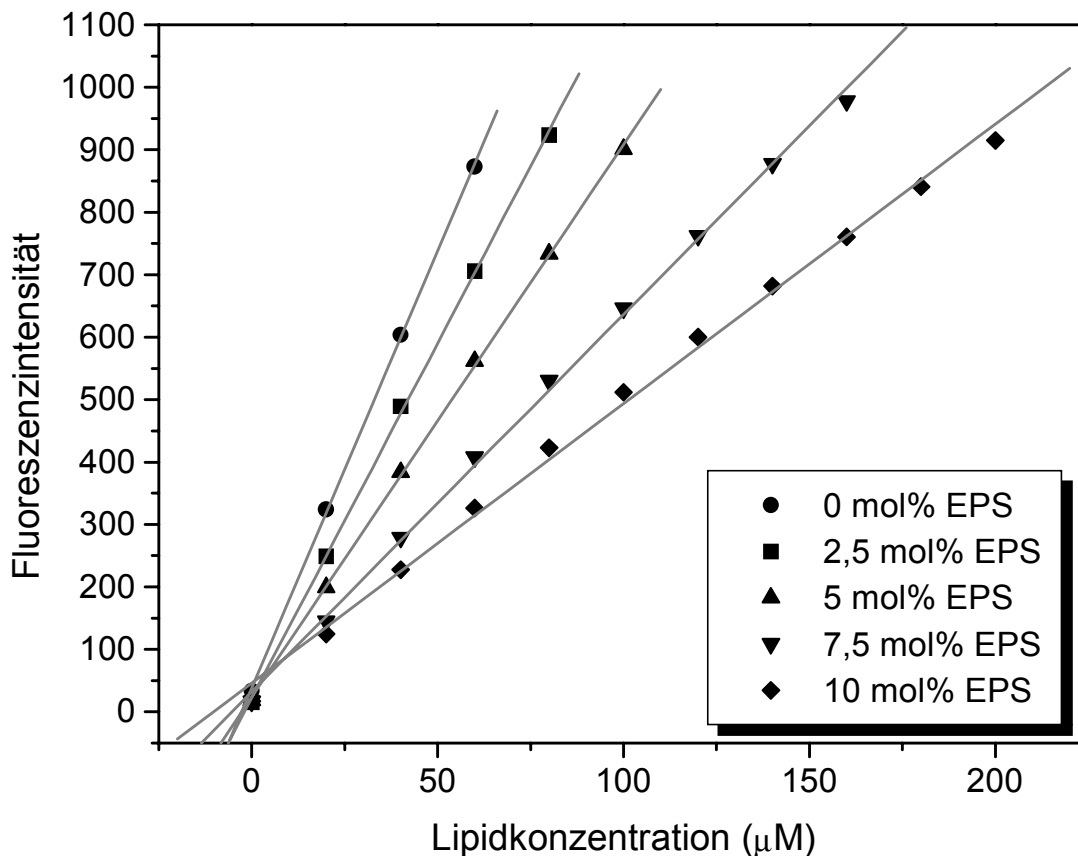
### 3.2.1.3.2 EPS-haltige Liposomen

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich der TNS-Assay auch bei EPS-haltigen Liposomen anwenden liess. Dazu wurden EPC-Liposomen mit 0 bis 10 mol% EPS hergestellt. Die Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Liposomen ist

unter 2.10.3.2 beschrieben. Sie wurden mittels Extrusion durch eine 100 nm Membran hergestellt (vgl. 2.4.1).

### 3.2.1.3.2.1 Lipidkonzentration und -zusammensetzung

Die Versuche wurden wie unter 3.2.1.3.1.1 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 3-30** Linearität des TNS-Assay. Aufsteigende Mengen EPS-haltiger Liposomen wurden zu einer 3 µM TNS-Lösung pipettiert und der Fluoreszenzanstieg verfolgt. Die totale Lipidkonzentration betrug 20 bis 200 µM

Wie bei EPG-haltigen Liposomen (vgl. Abbildung 3-25) fand sich auch hier ein lineares Verhältnis zwischen Gesamtlipidkonzentration und TNS-Fluoreszenz. Der Einfluss des Anteils an negativ geladenem EPS im Bilayer auf die Fluoreszenzintensität wurde auch hier deutlich. Analog zum Bindungsverhalten von TNS an EPG-haltige Liposomen zeigte sich hier bei Lipidkonzentrationen über 100 µM eine verminderte Einlagerung von TNS in die liposomalen Membranen, was zu einer Abflachung der Funktion führte.

3.2.1.3.2.2 EPS-Anteil im äusseren Monolayer

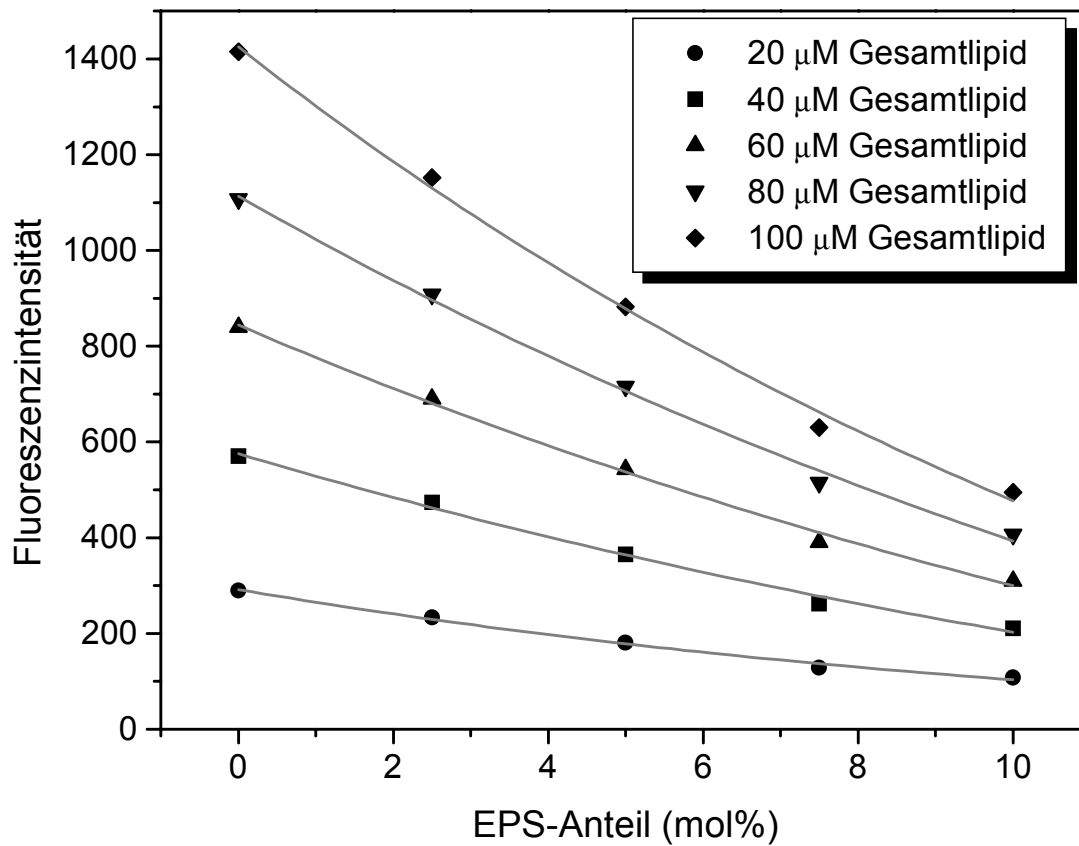
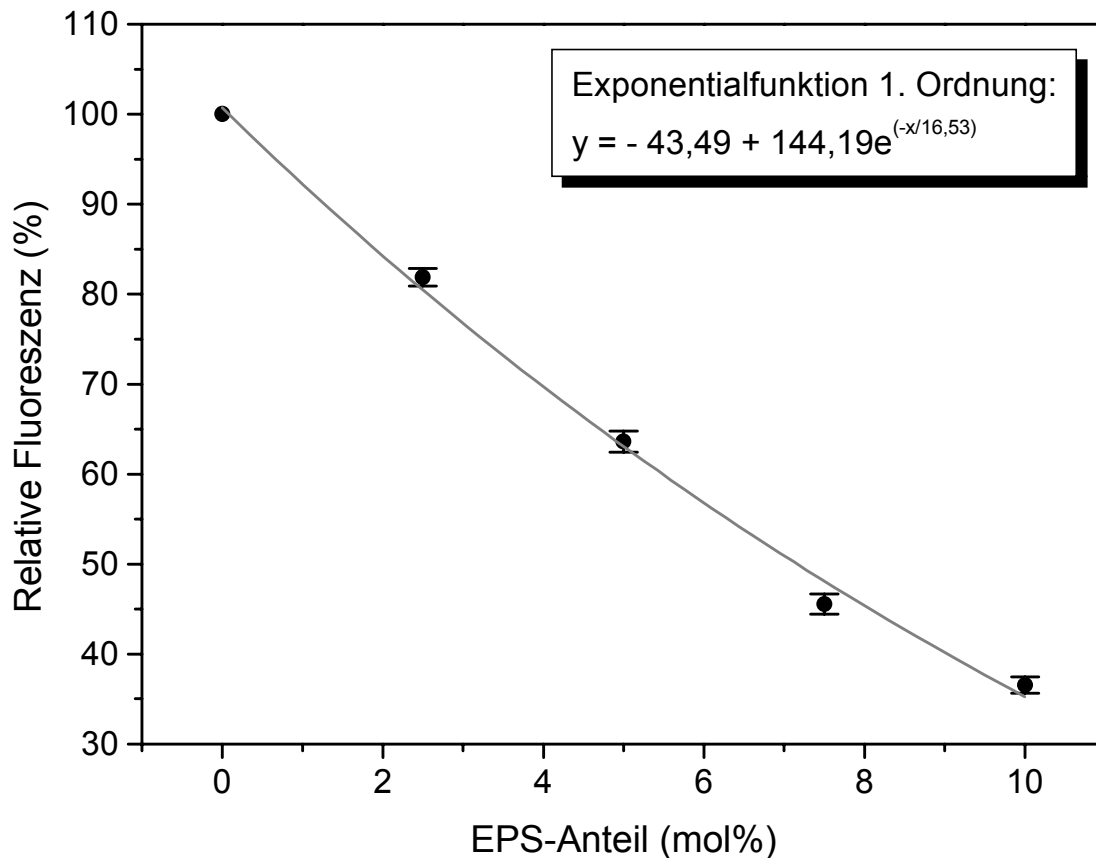


Abbildung 3-31 TNS-Fluoreszenz als Funktion des EPS-Anteils in EPC/eps-Liposomen (Durchmesser 100 nm) bei verschiedenen Lipidkonzentrationen. Aufsteigende Mengen EPS-haltiger Liposomen wurden zu einer 3 μM TNS-Lösung pipettiert und der Fluoreszenzanstieg verfolgt. Die totale Lipidkonzentration betrug 20 bis 100 μM (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung)

Der Zusammenhang zwischen TNS-Fluoreszenz und EPS-Anteil in Liposomen liess sich am besten als eine Exponentialfunktion 1. Ordnung beschreiben. In der Abbildung ist der Einfluss des EPS-Anteils und der Gesamtlipidkonzentration auf die Fluoreszenzintensität zu erkennen. Analog zur Abbildung 3-27 liess sich die gemessene TNS-Fluoreszenz einer Probe auch als relative Fluoreszenz, bezogen auf die TNS-Fluoreszenz von reinen EPC-Liposomen gleicher Konzentration, darstellen.



**Abbildung 3-32** TNS-Fluoreszenz als Funktion des EPS-Anteils in EPC/EPS-Liposomen (Durchmesser 100 nm, EPS-Anteil 0 bis 10 mol%). Die Fluoreszenz der EPS-haltigen Vesikel ist ausgedrückt als Verhältnis von gemessener TNS-Fluoreszenz der Probe und TNS-Fluoreszenz von reinen EPC-Liposomen der gleichen Gesamtlipidkonzentration (= 100 %-Wert). Im Graphen ist ein Konzentrationsbereich von 20 bis 100 µM Gesamtlipid erfasst

Der EPS-Anteil im äusseren Monolayer einer liposomalen Probe lässt sich demnach über folgende Kalibrationsfunktion errechnen, wenn die TNS-Fluoreszenz von reinen EPC-Liposomen der gleichen Konzentration bekannt war:

$$EPS_a = 16,53 \cdot \ln \left( \frac{F_{rel} + 43,49}{144,19} \right)$$

Gleichung 3-7

$EPS_a$  = EPS-Anteil im äusseren Monolayer [mol%]

$F_{rel}$  = Relative TNS-Fluoreszenz [%]



### 3.2.1.3.2.3 TNS-Assay und $\zeta$ -Potential

Wie in Abbildung 3-33 zu sehen ist, bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der relativen TNS-Fluoreszenz und dem  $\zeta$ -Potential von EPC/EPS-Liposomen. Dies zeigt, dass sich TNS bei EPS-haltigen Liposomen in Abhängigkeit von deren Oberflächenladung in die Membran einlagerte, und dass die Einlagerung der negativ geladenen TNS in den vorliegenden Konzentrationen die Oberflächenladung nicht wesentlich veränderte. Der TNS-Assay ist demnach eine geeignete Methode zur Erfassung der negativen Oberflächenladung von Vesikeln.

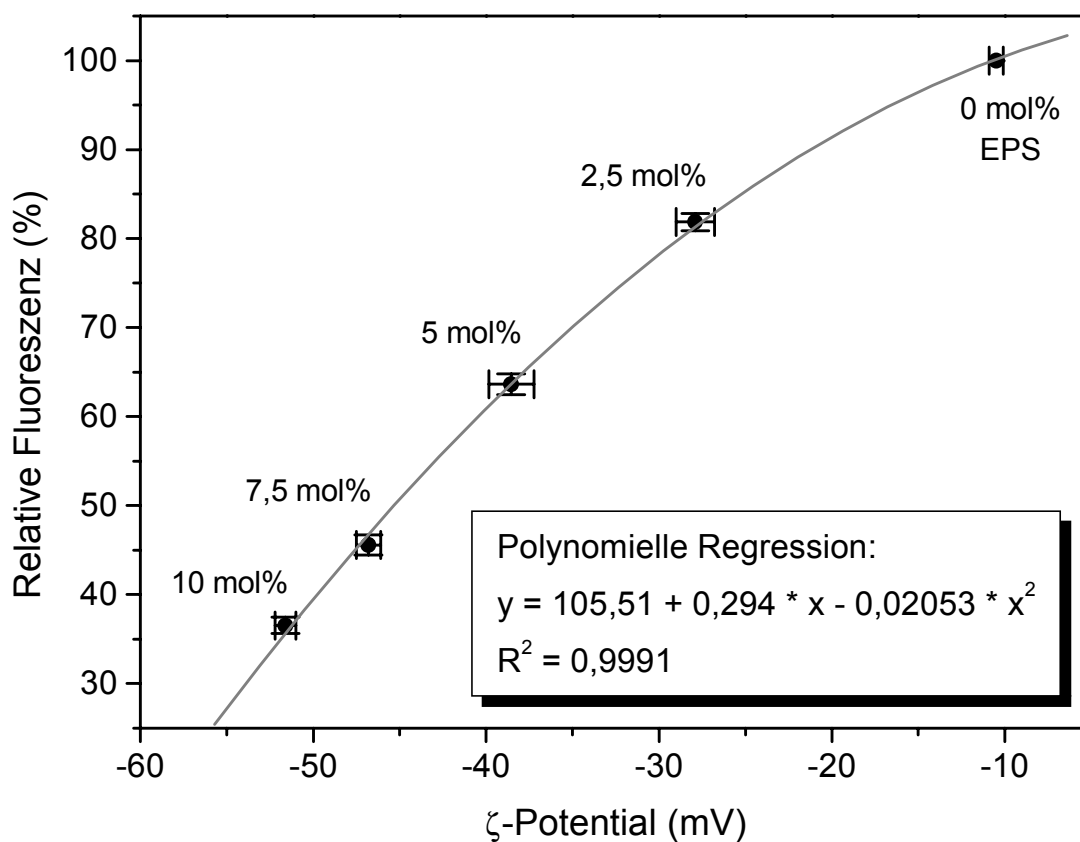


Abbildung 3-33 Die relative TNS-Fluoreszenz von EPC/EPS-Liposomen (0 / 2,5 / 5 / 7,5 und 10 mol% EPS) in Abhängigkeit vom  $\zeta$ -Potential der entsprechenden Liposomen

## 3.2.2 Flipp-Flopp von EPG

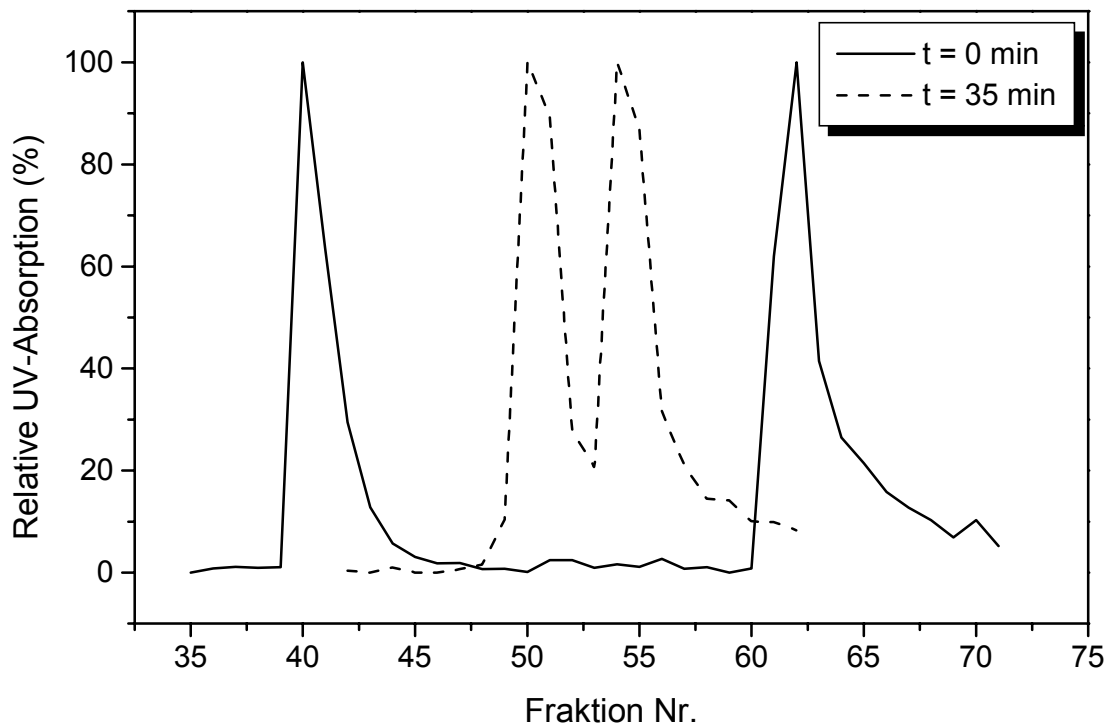
### 3.2.2.1 Etablierung einer PG-Unsymmetrie

Um Liposomen mit einer unsymmetrischen EPG-Verteilung herzustellen, wurden 254  $\mu$ l Donorliposomen (EPC 95 mol%, EPG 5 mol%, 17,71 mM) und 200  $\mu$ l Akzeptorliposomen (EPC 100 mol%, 22,48 mM) gemischt und mit 7,01 nmol ns-LTP

versetzt. Die ns-LTP-Konzentration betrug 0,78 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid. Nach 35 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mittels FFE getrennt.

Die Inkubationszeit war so gewählt, dass die beiden Liposomenpopulationen sich noch soweit in ihrer Oberflächenladung unterschieden, dass sie elektrophoretisch zu trennen waren (vgl. Abbildung 3-34). Die FFE-Trennung erfolgte bei einer Trennpufferförderrate von 219 ml/h, einem Probendurchsatz von 54  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer Spannung von 900 V, was einer elektrischen Feldstärke von 112,5 V/cm entsprach.

Nachdem die liposomenhaltigen Fraktionen UV-spektrophotometrisch bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  ermittelt worden waren, wurden diejenige, die Donor- bzw. Akzeptorvesikel enthielten, gepoolt, wobei darauf geachtet wurde, dass es zu keiner Vermischung der beiden Populationen kam.

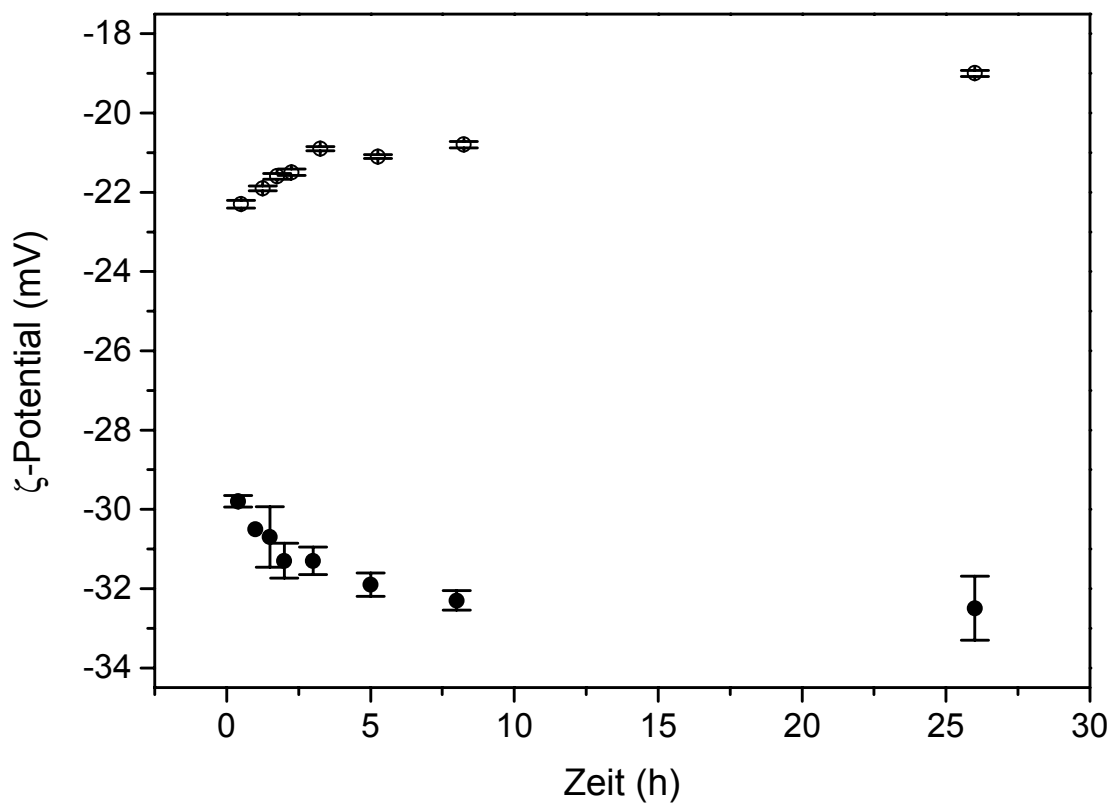


**Abbildung 3-34** ns-LTP-vermittelter Lipidaustausch und FFE-Trennung von Donor- und Akzeptorliposomen. Zu Beginn des Lipidaustausches waren die beiden Vesikelarten deutlich voneinander getrennt. Durch den Austausch von EPG näherten sie sich aneinander an. Nach 35 min war ein maximaler Lipidaustausch erreicht, bei dem eine elektrophoretische Trennung der beiden Liposomenpräparationen noch möglich war

### 3.2.2.2 $\zeta$ -Potentialmessungen

Durch den Austausch von negativ geladenem EPG näherten sich Donor- und Akzeptorvesikel in ihrem  $\zeta$ -Potential aneinander an. Das  $\zeta$ -Potential der Donorliposomen verschob sich von ungefähr - 44 mV zu - 30 mV. Die Akzeptorliposomen gewannen negative Ladung hinzu, wodurch sich ihr  $\zeta$ -Potential zu negativeren Werten, von ca. - 9 mV auf - 22 mV, verschob.

Beide Liposomenpopulationen waren nach Lipidaustausch und FFE-Trennung bezüglich der Verteilung von EPG unsymmetrisch. Die Donorliposomen wiesen im äusseren Monolayer einen geringeren EPG-Anteil auf als im inneren. Bei den Akzeptorliposomen war es umgekehrt. Durch Flipp-Flopp wurde diesem Verteilungsungleichgewicht entgegengewirkt.



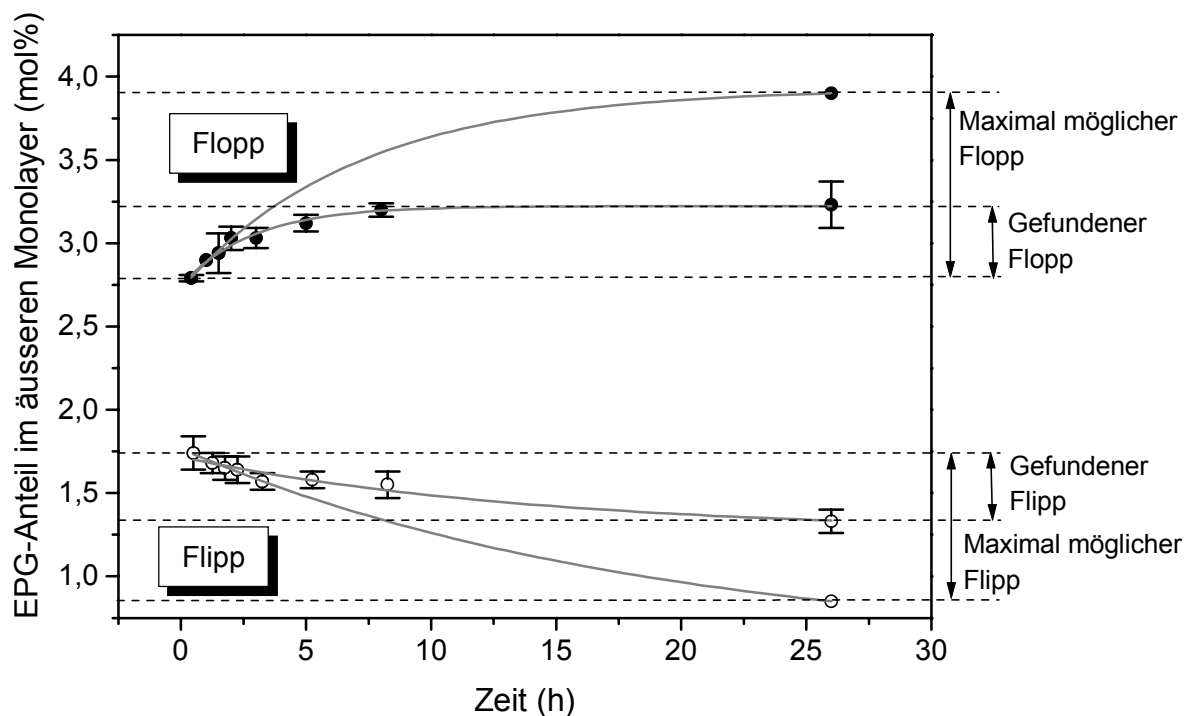
**Abbildung 3-35**  $\zeta$ -Potential von LUV, die eine unsymmetrische Verteilung von EPG zwischen den beiden Monolayern aufweisen. Die zeitliche Veränderung der  $\zeta$ -Potentialwerte ist auf den Flipp-Flopp von EPG zurückzuführen. ● Donorliposomen; ○ Akzeptorliposomen. n = 3

Die Umlagerung von EPG-Molekülen vom inneren zum äusseren Monolayer (Flopp) führte bei Donorvesikeln mit der Zeit zu einer Verschiebung des  $\zeta$ -Potentials zu negativeren Werten hin. Bei Akzeptorvesikeln war die EPG-Bewegung vom äusseren

zum inneren Monolayer gerichtet (Flipp). Dadurch wanderte deren  $\zeta$ -Potential zu weniger negativen Werten hin (vgl. Abbildung 3-35).

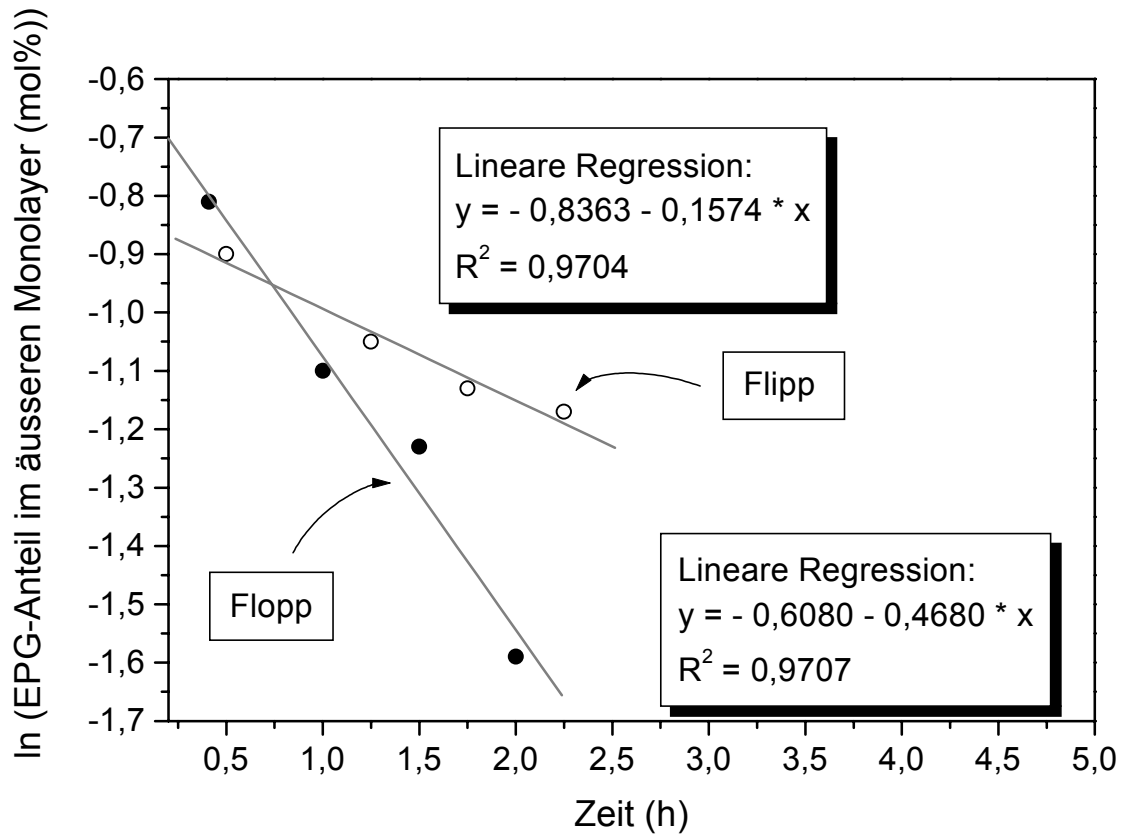
Der Beginn der FFE-Trennung wurde als Startpunkt für die Flipp-Flopp Messungen gewählt. Von da an wurde nach ½, 1, 1½, 2, 3, 5, 8 und 26 h wie unter 2.5.2 beschrieben das  $\zeta$ -Potential der beiden Liposomenpopulationen gemessen.

Aus den gemessenen  $\zeta$ -Potentialwerten liessen sich über Gleichung 3-5 die EPG-Anteile (mol%) im äusseren Monolayer der beiden Liposomenpopulationen berechnen (vgl. Abbildung 3-36).



**Abbildung 3-36** Zeitliche Veränderung des EPG-Anteils (ermittelt über  $\zeta$ -Potential) im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen nach Lipidaustausch zwischen den beiden Vesikelarten. Donor- und Akzeptor-LUV wiesen zu Beginn eine unsymmetrische Verteilung von EPG auf. Durch Flipp-Flopp kam es zur Umlagerung von EPG zwischen den beiden Monolayern. ● Donorliposomen; ○ Akzeptorliposomen. n = 3

Während der initialen Phase des Flipp-Flopp konnte davon ausgegangen werden, dass sich EPG hauptsächlich in eine Richtung, nämlich vom EPG-reichen zum EPG-armen Monolayer, bewegte. Da es sich dabei um eine monomolekulare „Reaktion“ handelte, liess sich der Vorgang mit einer Kinetik 1. Ordnung beschreiben (vgl. 1.4.3.2). Durch Logarithmierung liessen sich die Daten aus Abbildung 3-36 linearisieren (vgl. Abbildung 3-37).



**Abbildung 3-37** Linearisierte Darstellung der zeitabhängigen Veränderung des EPG-Gehaltes im äusseren Monolayer von LUV mit unsymmetrischer EPG-Verteilung zwischen den beiden Monolayern. Der initiale EPG-Transfer kann als unidirektional angesehen werden. ● Donorliposomen  $[EPG_{innen}] > [EPG_{ausseren}]$ ; ○ Akzeptorliposomen  $[EPG_{innen}] < [EPG_{ausseren}]$ .  $n = 3$

Aus den Steigungen der Geraden liessen sich die Geschwindigkeitskonstanten des Flipp-Flopp ablesen. Bei den Donorliposomen fand die EPG-Verlagerung in den ersten Stunden nach Generierung der Unsymmetrie hauptsächlich vom inneren zum äusseren Monolayer statt. Somit entspricht die ermittelte Geschwindigkeitskonstante derjenigen der Flopp-Bewegung ( $k_{-1} = 0,468 \text{ h}^{-1}$ ). Bei den Akzeptorvesikeln liess sich umgekehrt die Geschwindigkeitskonstante der Flipp-Bewegung berechnen ( $k_1 = 0,1574 \text{ h}^{-1}$ ). Für den Flopp ergab sich somit eine Halbwertszeit von 1,48 h und für den Flipp 4,40 h. Dies sind vergleichsweise schnelle Prozesse. Die Halbwertszeiten in der Literatur bewegen sich im Bereich von mehreren Stunden bis Tagen (Kornberg et al., 1971; Rothman & Dawidowicz, 1975; Haest et al., 1997). Bei den Literaturdaten ist allerdings anzumerken, dass diese in der Regel mit spin- oder fluoreszenzgelabelten Phospholipiden durchgeführt wurden. Diese unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von natürlichen Phospholipiden, was die grossen

Differenzen in den Flipp-Flopp-Eigenschaften erklären könnte. Nur bei vereinzelt Experimenten wurden radioaktiv markierte Lipide eingesetzt (Rothman et al., 1975). Auffällig ist, dass sich auch bei längerer Lagerung bei keiner der beiden Vesikelpräparationen eine gleichmässige Verteilung von EPG zwischen den beiden Monolayern einstellte (vgl. Tabelle 3-4).

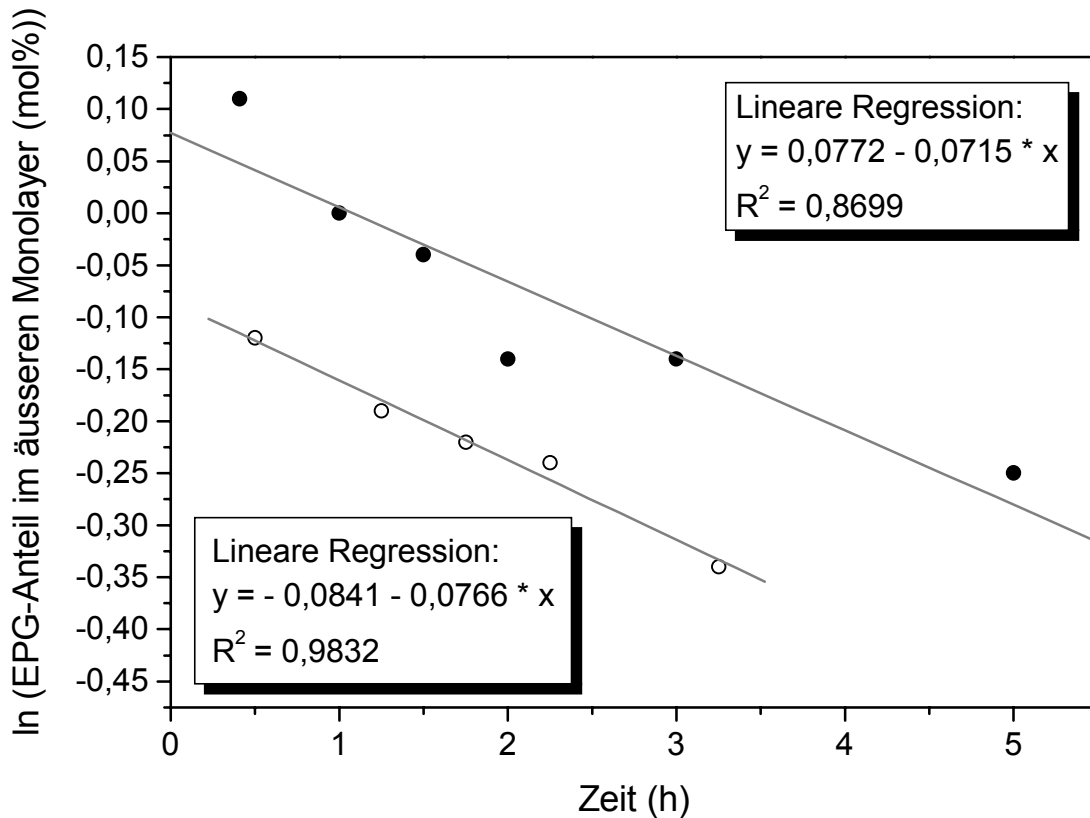
**Tabelle 3-4** Prozentuale Verteilung von EPG zwischen den Monolayern von LUV. Wie unter 3.2.2.1 beschrieben wurde bei Donorvesikeln (EPC 95 mol%, EPG 5 mol%) und Akzeptorvesikeln (EPC 100 mol%) eine EPG-Unsymmetrie erzeugt. Nach FFE-Trennung und Lagerung der beiden Liposomenpräparationen bei RT über 36 h stellte sich folgendes Gleichgewicht in der Verteilung ein:

Vesikelpräparation	EPG-Anteil	
	Äusserer Monolayer	Innerer Monolayer
Donor	41 %	59 %
Akzeptor	76 %	24 %

Eine Erklärung dafür könnte ein pH-Unterschied zwischen eingeschlossenem Innenraum und umgebendem Medium oder der Aufbau eines Membranpotentials sein (vgl. dazu Kapitel 1.4.2.5.2). Der mögliche Mechanismus des EPG-Flipp-Flopp wurde von Redelmeier beschrieben (Redelmeier et al., 1990). Demnach geschieht die Umlagerung von EPG im protonierten und somit ungeladenen Zustand nach Dehydratisierung der polaren Kopfgruppe. Findet wie bei den Akzeptorliposomen ein gerichteter Transport vom äusseren zum inneren Monolayer statt, werden somit Protonen in den wässrigen Innenraum der Liposomen transportiert. Bei nicht gepufferten Medien kann das zu einer Absenkung des pH-Wertes führen. Dies wiederum wirkt dem gerichteten Transport entgegen. Da die hier durchgeführten Versuche in Puffer stattfanden und der EPG-Anteil im liposomalen Bilayer mit 5 mol% gering war, ist ein pH-Shift als vordergründige Ursache wenig wahrscheinlich. Möglicherweise wurde der Flipp-Flopp von EPG durch den Aufbau eines Membranpotentials behindert. So geht eine Umlagerung von EPG zwischen den Monolayern mit einer Veränderung der Ladungsverhältnisse an der Oberfläche der Monolayer einher. Dies konnte unter anderem für negativ geladene Fettsäuren gezeigt werden (Pohl et al., 2000). Wird damit ein intermembranäres Potential aufgebaut, kann

dieses einer fortschreitenden Flipp-Flopp-Bewegung entgegenwirken (Haest et al., 1997).

Die Daten aus Abbildung 3-37 wurden neu ausgewertet in der Annahme, dass sich EPG im Gleichgewicht gleichmässig zwischen den Monolayern von Donor- und Akzeptorliposomen verteilte (vgl. Abbildung 3-36). Es zeigte sich folgendes Bild:



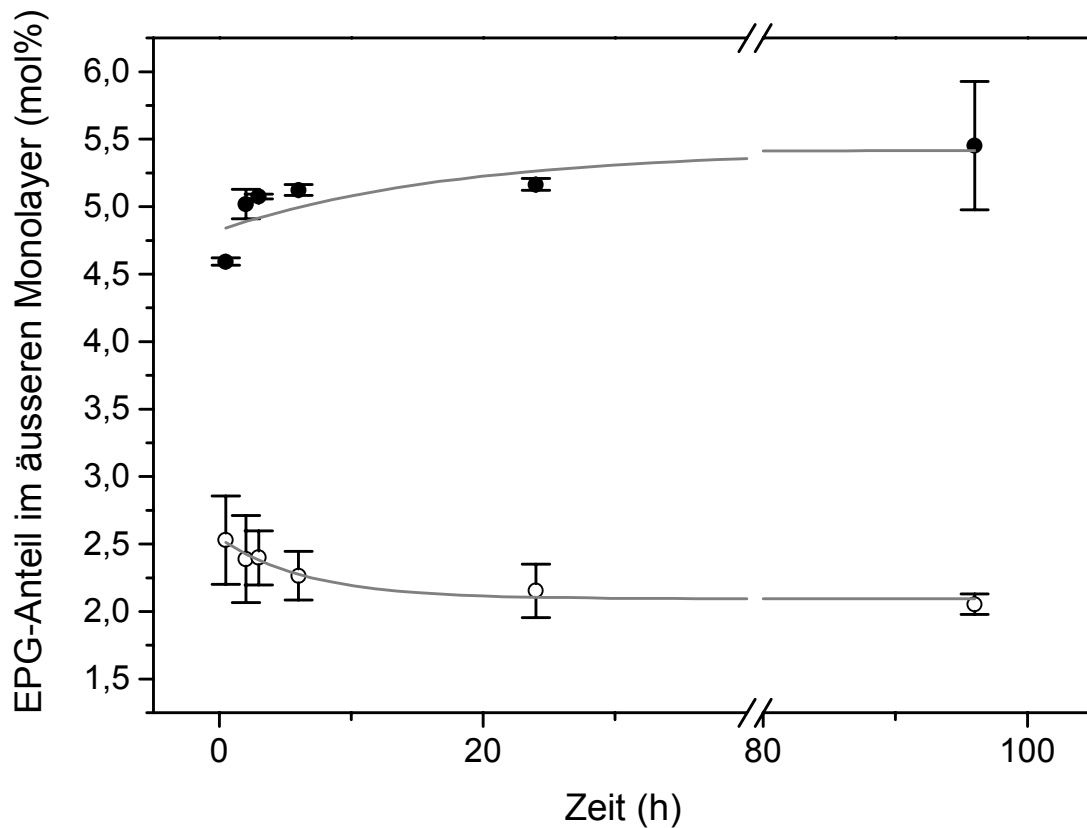
**Abbildung 3-38** Linearisierte Darstellung der zeitabhängigen Veränderung des EPG-Gehaltes im äusseren Monolayer von LUV mit unsymmetrischer EPG-Verteilung zwischen den beiden Monolayern. Der initiale EPG-Transfer kann als unidirektional angesehen werden. Den Berechnungen liegt zugrunde, dass sich EPG im Gleichgewicht gleichmässig zwischen den Monolayern von Donor- und Akzeptor-LUV verteilt. ● Donorliposomen  $[EPG_{\text{innen}}] > [EPG_{\text{ausseren}}]$ ; ○ Akzeptorliposomen  $[EPG_{\text{innen}}] < [EPG_{\text{ausseren}}]$ .  $n = 3$

Aus den Steigungen der Geraden liessen sich die Geschwindigkeitskonstanten des Flipp-Flopp ablesen. Bei den Donorliposomen fand die EPG-Verlagerung in den ersten Stunden nach der Generierung der Unsymmetrie hauptsächlich vom inneren zum äusseren Monolayer statt. Somit entspricht die ermittelte Geschwindigkeitskonstante derjenigen der Flopp-Bewegung ( $k_{-1} = 0,0715 \text{ h}^{-1}$ ). Bei den Akzeptorvesikeln liess sich umgekehrt die Geschwindigkeitskonstante der Flipp-Bewegung berechnen ( $k_1 = 0,0766 \text{ h}^{-1}$ ). Die beiden Vorgänge hatten somit vergleichbare

Halbwertszeiten von 9,05 h (Flipp) und 9,70 h (Flopp). Dies war durchaus zu erwarten, da die Verhältnisse am inneren und am äusseren Monolayer der LUV praktisch identisch sind.

### 3.2.2.3 TNS-Assay

Zur Bestimmung des Flipp-Flopp mittels TNS-Assay wurden, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, Liposomen mit einer unsymmetrischen EPG-Verteilung hergestellt. Die Donor-LUV bestanden aus 90 mol% EPC und 10 mol% EPG. Die Akzeptor-LUV setzten sich aus reinem EPC zusammen. 200 µl Donorliposomen (Gesamtlipidkonzentration 20,65 mM) und 210 µl Akzeptorliposomen (Lipidkonzentration 19,64 mM) wurden mit 3,22 nmol ns-LTP versetzt.

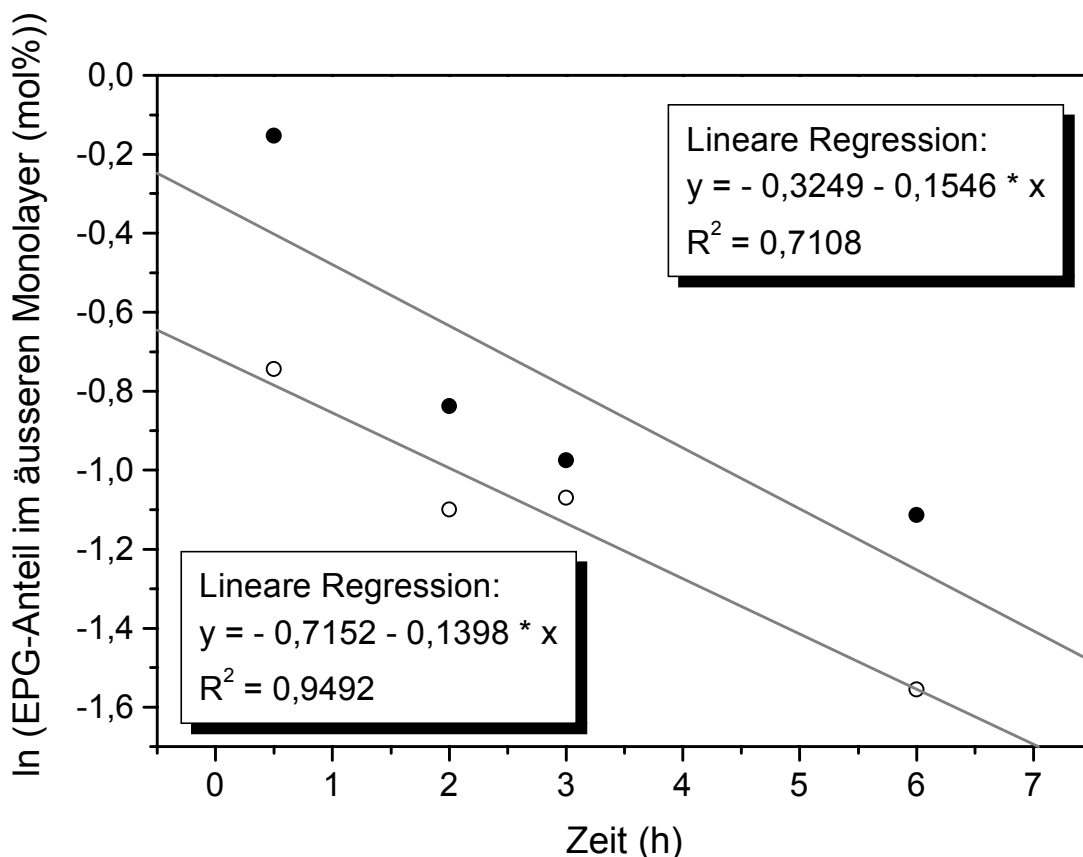


**Abbildung 3-39** Zeitliche Veränderung des EPG-Anteils im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen nach Lipidaustausch zwischen den beiden Vesikelarten und Auftrennung über FFE. Donor- und Akzeptor-LUV wiesen zu Beginn eine unsymmetrische Verteilung von EPG auf. Durch Flipp-Flopp kam es zur Umlagerung von EPG zwischen den beiden Monolayern (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung). ● Donorliposomen; ○ Akzeptorliposomen. n = 3



Die ns-LTP-Konzentration betrug 0,39 nmol ns-LTP pro  $\mu\text{mol}$  Lipid. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz über FFE getrennt. Die FFE-Parameter und das weitere Vorgehen sind unter 3.2.2.1 beschrieben.

Nach ½, 2, 3, 6, 24 und 96 h wurde der EPG-Anteil im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen mittels TNS-Assay (vgl. 2.10.3.3) bestimmt. Zu 2300  $\mu\text{l}$  3,26  $\mu\text{M}$  TNS-Lösung wurden 200  $\mu\text{l}$  Probe pipettiert und die Fluoreszenz bis zum Erreichen eines konstanten Wertes verfolgt. Aus der Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität  $F_1 - F_0$  (vgl. Abbildung 2-12) liess sich über Gleichung 3-6 der molare Anteil EPG im äusseren Monolayer der Vesikel berechnen. Dazu musste der Lipidgehalt der Proben mittels Steward-Assay (2.5.3.2) bestimmt und die TNS-Fluoreszenz reiner EPC-LUV gleicher Konzentration bestimmt werden (100 %-Wert). Wie schon beschrieben wurde von einer anfänglichen unidirektionalen Umlagerung von EPG zwischen den Monolayern ausgegangen. Durch Logarithmierung liessen sich die initialen Werte linearisieren.



**Abbildung 3-40** Linearisierte Darstellung der zeitabhängigen Veränderung des EPG-Gehaltes im äusseren Monolayer von LUV mit unsymmetrischer EPG-Verteilung zwischen den beiden Monolayern. Der initiale EPG-Transfer kann als unidirektional angesehen werden. ● Donorliposomen  $[\text{EPG}_{\text{innen}}] > [\text{EPG}_{\text{ausseren}}]$ ; ○ Akzeptorliposomen  $[\text{EPG}_{\text{innen}}] < [\text{EPG}_{\text{ausseren}}]$ . n = 3

Die Geschwindigkeitskonstante für den Flipp  $k_1$  betrug  $0,1398 \text{ h}^{-1}$ , die für den Flopp  $k_{-1}$  lag bei  $0,1546 \text{ h}^{-1}$ . Damit ergab sich für den Flipp eine Halbwertszeit von  $4,96 \text{ h}$  und für den Flopp von  $4,48 \text{ h}$ . Auch hier führte der Flipp-Flopp nicht zu einer gleichmässigen Verteilung von EPG zwischen den Monolayern der Liposomen. Legt man den Berechnungen eine symmetrische Verteilung zugrunde, erhält man ein  $k_1$  von  $0,0396 \text{ h}^{-1}$  und ein  $k_{-1}$  von  $0,0343 \text{ h}^{-1}$ . Damit ergeben sich Halbwertszeiten für den Flipp von  $17,5 \text{ h}$  und für den Flopp von  $20,2 \text{ h}$ .

#### **3.2.2.4 Diskussion der Flipp-Flopp-Messungen von EPG**

Zur Bestimmung des Flipp-Flopp von EPG wurden zwei verschiedene Methoden,  $\zeta$ -Potentialmessungen und TNS-Assay, eingesetzt. Beide machen sich zunutze, dass es bei der transversalen Verlagerung des negativ geladenen Phospholipids zu einer Veränderung der Ladungsdichte auf der Oberfläche der Liposomen kommt.

In einem ersten Schritt wurden LUV hergestellt, die eine unsymmetrische EPG-Verteilung zwischen den beiden Monolayern aufwiesen. Dazu wurden Donorliposomen (EPC 95 mol%, EPG 5 mol%) mit Akzeptorliposomen aus reinem EPC in Gegenwart von ns-LTP inkubiert. Dabei kam es zu einem sehr schnellen proteinvermittelten Lipidaustausch zwischen den beiden Vesikelarten. Nach 35 min Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die beiden Liposomenpräparationen über FFE getrennt. Die in verschiedenen Fraktionen aufgefangenen Liposomen, die nun eine unsymmetrische Verteilung von EPG zwischen den Monolayern aufwiesen, standen für Untersuchungen zur Verfügung.

Bei den  $\zeta$ -Potentialmessungen wurde direkt die zeitliche Veränderungen der Oberflächenladung der Vesikel erfasst. Aus den gemessenen Werten liess sich der EPG-Anteil im äusseren Monolayer über Gleichung 3-5 berechnen. Die berechneten Halbwertszeiten für den Flipp und den Flopp waren mit  $4,40 \text{ h}$  bzw.  $1,48 \text{ h}$  sehr kurz. Zudem zeigte sich, dass im Gleichgewichtszustand keine symmetrische Verteilung von EPG erreicht wurde. Ging man bei den Berechnungen davon aus, dass sich EPG im Gleichgewicht symmetrisch zwischen den Monolayern verteilt, ergaben sich Halbwertszeiten von  $9,05 \text{ h}$  (Flipp) und  $9,70 \text{ h}$  (Flopp). Diese Werte liegen im Bereich der Literaturdaten.

Bei der zweiten Methode wurde TNS als membranpotential- und umgebungs-sensitive Fluoreszenzsonde eingesetzt. Die zeitliche Veränderung der Oberflächenladung durch EPG-Flipp-Flopp liess sich durch Messung der TNS-Fluoreszenz-

intensität erfassen. Aus diesen Daten konnte über die Gleichung 3-6 der EPG-Anteil im äusseren Monolayer berechnet werden. Die kinetische Auswertung der Resultate ergab Halbwertszeiten von 4,96 h (Flipp) und 4,48 h (Flopp). Auch hier wurde nach ausreichender Inkubation keine symmetrische Verteilung von EPG zwischen den Monolayern festgestellt. Legte man den Berechnungen jedoch eine gleichmässige Verteilung zugrunde, ergaben sich Halbwertszeiten von 17,5 h für den Flipp und von 20,2 h für den Flopp.

### **3.2.3 Flipp-Flopp von EPS**

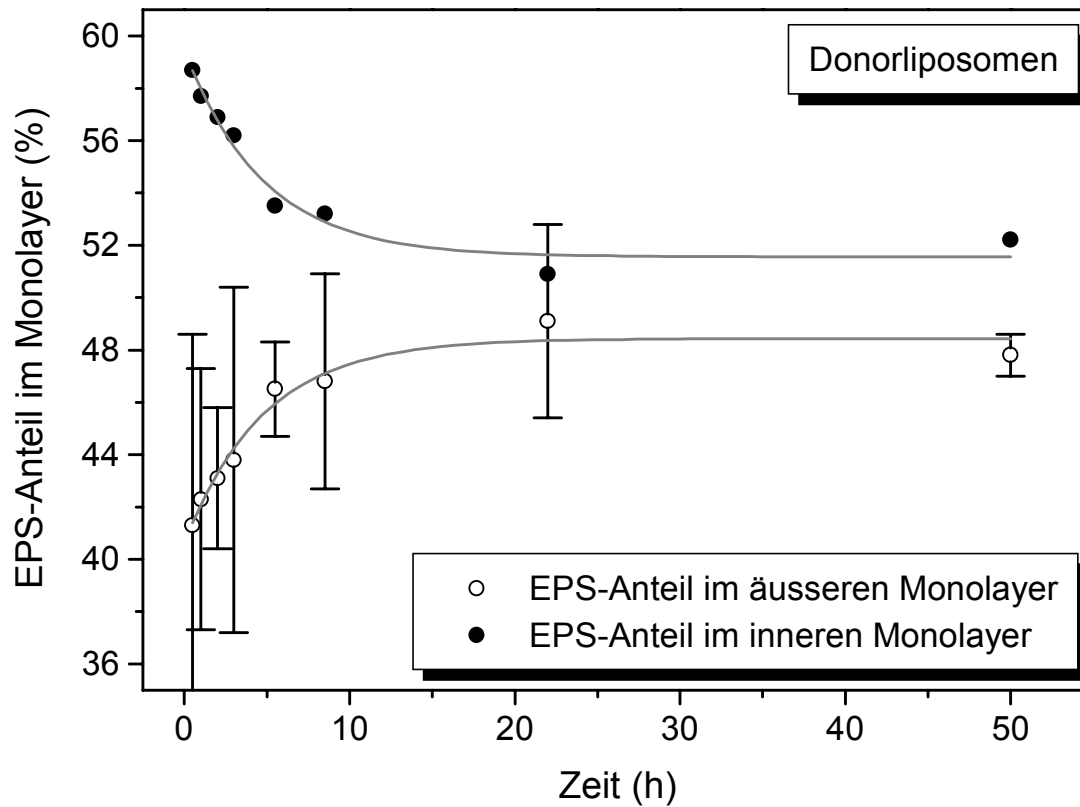
#### **3.2.3.1 Etablierung einer EPS-Unsymmetrie**

Um Liposomen mit einer unsymmetrischen EPS-Verteilung herzustellen, wurden 100 µl Donorliposomen (EPC 90 mol%, EPS 10 mol%, 19,71 mM) und 100 µl Akzeptorliposomen (EPC 100 mol%, 19,69 mM) gemischt und mit 3,07 nmol ns-LTP versetzt. Die ns-LTP-Konzentration betrug 0,78 nmol ns-LTP pro µmol Lipid. Nach 25 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mittels FFE getrennt. Das weitere Vorgehen ist in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

#### **3.2.3.2 Fluorescamin-Assay**

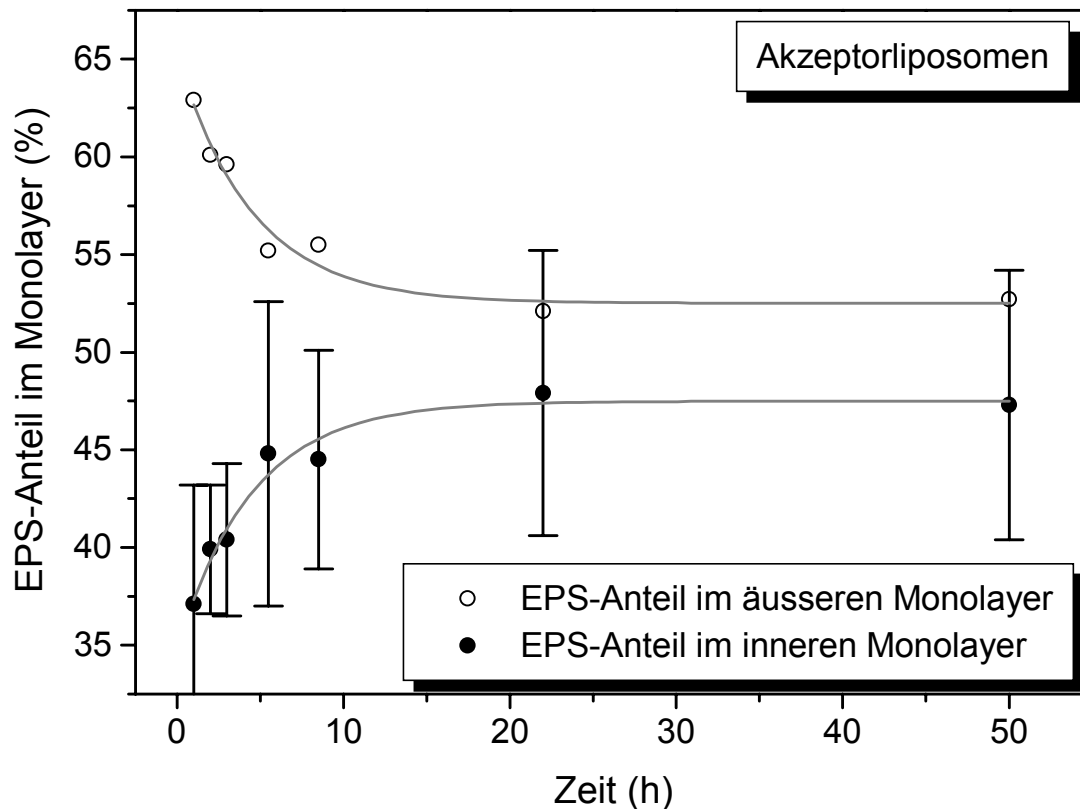
Zur Erfassung des Flipp-Flopp von EPS wurde die EPS-Verteilung in der Donorliposomen- und Akzeptorliposomenfraktion zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Fluorescamin-Assay ermittelt. ½, 1, 2, 3, 5½, 8½, 22 und 55 h nach der FFE-Trennung der beiden Liposomenpopulationen wurden 100 µl Probe wie unter 2.10.2.1 beschrieben analysiert.

Die anfängliche Verteilung von EPS zwischen den Monolayern der Donorliposomen lag nach Austausch und FFE-Trennung bei ungefähr 40 % zu 60 % (aussen zu innen). Nach 22 h ist es durch Flipp-Flopp zu einer Annäherung gekommen (49 % zu 51 %).



**Abbildung 3-41** Zeitliche Veränderung des EPS-Anteils in den Monolayern von Donor-LUV. Bei Liposomen mit einer unsymmetrischen Verteilung bezüglich EPS ( $EPS_{\text{ausseren}} < EPS_{\text{innen}}$ ) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Verteilung des Aminophospholipids zwischen den beiden Monolayern mittels Fluorescamin-Assay ermittelt. Die Inkubation der Vesikel erfolgte bei RT. Die absoluten Standardabweichungen sind für beide Datenreihen identisch. (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung).  $n = 4$

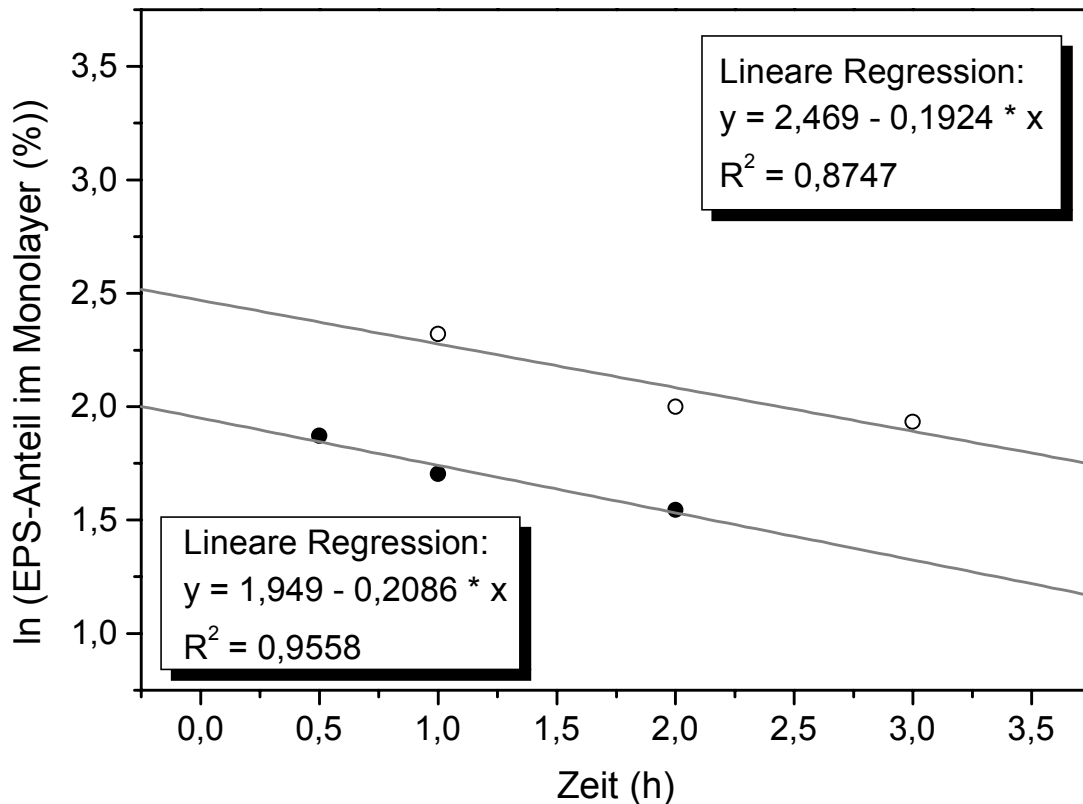
Bei den Akzeptorliposomen lag die EPS-Verteilung nach Lipidaustausch und FFE-Trennung bei ca. 65 % zu 35 % (ausseren zu innen). Nach 22 h betrug das Verhältnis  $EPS_{\text{ausseren}}$  zu  $EPS_{\text{innen}}$  52 % zu 48 %.



**Abbildung 3-42** Zeitliche Veränderung des EPS-Anteils in den Monolayern von Akzeptor-LUV. Bei Liposomen mit einer unsymmetrischen Verteilung bezüglich EPS ( $EPS_{\text{ausseren}} > EPS_{\text{innen}}$ ) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Verteilung des Aminophospholipids zwischen den beiden Monolayern mittels Fluorescamin-Assay ermittelt. Die Inkubation der Vesikel erfolgte bei RT. Die absoluten Standardabweichungen sind für beide Datenreihen identisch. (Fit: Exponentialfunktion 1. Ordnung).  $n = 4$

Analog zu den Flipp-Flopp-Untersuchungen mit EPG wurde davon ausgegangen, dass der initiale Flipp-Flopp zwischen den Monolayern unidirektional ist. Dementsprechend wurde angenommen, dass der Prozess einer Kinetik 1. Ordnung folgt. Die linearisierte Darstellung des initialen Flipp-Flopp ist in Abbildung 3-43 zu sehen.

Die Steigungen der Geraden stellen den negativen Wert der Geschwindigkeitskonstanten für die EPS-Bewegung zwischen den beiden Monolayern dar. Für den Flipp wurde ein  $k_1$  von  $0,2086 \text{ h}^{-1}$ , für den Flopp ein  $k_1$  von  $0,1925 \text{ h}^{-1}$  ermittelt. Die Halbwertszeiten lagen somit für den Flipp bei 3,32 h und für den Flopp bei 3,60 h.



**Abbildung 3-43** Linearisierte Darstellung der zeitabhängigen Veränderung des EPS-Gehaltes im äusseren Monolayer von LUV mit unsymmetrischer EPS-Verteilung zwischen den beiden Monolayern. Der initiale EPG-Transfer wurde als unidirektional angesehen. ● Donorliposomen  $[EPG_{innen}] > [EPG_{ausseren}]$ ; ○ Akzeptorliposomen  $[EPG_{innen}] < [EPG_{ausseren}]$ . n = 4

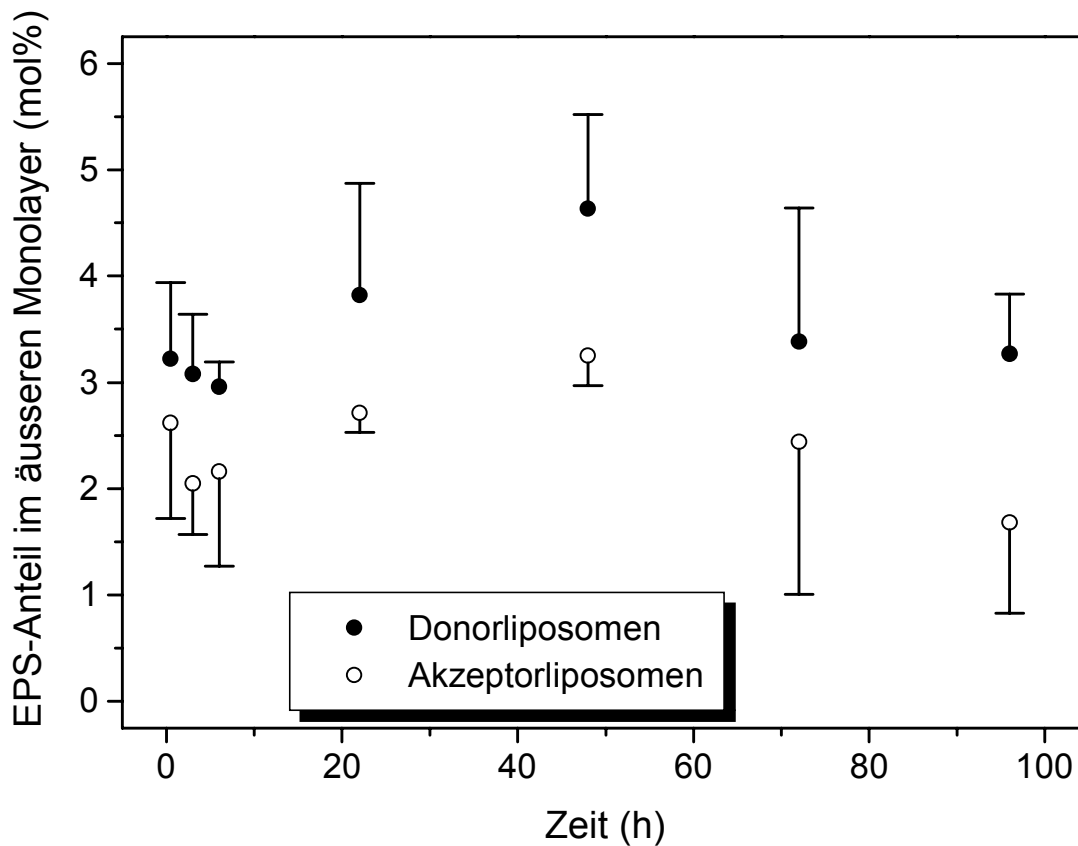
### 3.2.3.3 TNS-Assay

Zur Bestimmung des Flipp-Flopp mittels TNS-Assay wurden wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben Liposomen mit einer unsymmetrischen EPS-Verteilung hergestellt. Die Donor-LUV bestanden aus 90 mol% EPC und 10 mol% EPS. Die Akzeptor-LUV setzten sich aus reinem EPC zusammen. 200 µl Donorliposomen (Gesamtlipidkonzentration 19,59 mM) und 174 µl Akzeptorliposomen (Lipidkonzentration 22,52 mM) wurden mit 6,11 nmol ns-LTP versetzt. Die ns-LTP-Konzentration betrug 0,78 nmol ns-LTP pro µmol Lipid.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz über FFE getrennt. Die FFE-Parameter und das weitere Vorgehen sind unter 3.2.2.1 beschrieben.

Nach ½, 3, 6, 24, 48, 72 und 96 h wurde der EPS-Anteil im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen mittels TNS-Assay (vgl. 2.10.3.3) bestimmt. Das

Vorgehen dazu ist unter 3.2.2.3 beschrieben. Die Berechnung des EPS-Anteils im äusseren Monolayer erfolgte über Gleichung 3-7.



**Abbildung 3-44** Zeitliche Veränderung des EPS-Anteils im äusseren Monolayer von Donor- und Akzeptorliposomen nach Lipidaustausch zwischen den beiden Vesikelarten. Donor- und Akzeptor-LUV wiesen zu Beginn eine unsymmetrische Verteilung von EPS auf. Durch Flipp-Flopp kam es zur Umlagerung von EPS zwischen den beiden Monolayern. Zur besseren Übersicht wurde jeweils nur die eine Hälfte der Fehlerbalken dargestellt. n = 3

Der EPS-Anteil im äusseren Monolayer veränderte sich nicht wie erwartet. Vielmehr liess er sich in drei Phasen unterteilen, wobei sich Donor- und Akzeptorvesikel ähnlich verhielten. Zu Beginn sank der EPS-Anteil im äusseren Monolayer leicht ab, um im Anschluss bis zur 48. Stunde anzusteigen und nachher wieder zu fallen. Eine kinetische Auswertung der Daten war nicht möglich.

### 3.2.3.4 Diskussion der Flipp-Flopp-Messungen von EPS

Zur Bestimmung des Flipp-Flopp von EPS wurden zwei verschiedene Methoden, Fluorescamin-Assay und TNS-Assay, eingesetzt. Die beiden Assays greifen an unterschiedlichen Punkten an: Beim Fluorescamin-Assay wird eine chemische

Derivatisierung an der Aminofunktion von EPS durchgeführt, wodurch ein fluoreszenzaktives Produkt entsteht. TNS dagegen wird als membranpotential- und umgebungssensitive Fluoreszenzsonde eingesetzt.

In einem ersten Schritt wurden LUV hergestellt, die eine unsymmetrische EPS-Verteilung zwischen den beiden Monolayern aufwiesen. Dazu wurden Donorliposomen (EPC 90 mol%, EPS 10 mol%) mit Akzeptorliposomen aus reinem EPC in Gegenwart von ns-LTP inkubiert. Dabei kam es zu einem sehr schnellen proteinvermittelten Lipidaustausch zwischen den beiden Vesikelarten. Nach 25 min Inkubation bei 37 °C wurden die beiden Liposomenpräparationen über FFE getrennt. Die in verschiedenen Fraktionen aufgefangenen Liposomen, die nun eine unsymmetrische Verteilung von EPS zwischen den Monolayern aufwiesen, standen für Untersuchungen zur Verfügung.

Mit dem Fluorescamin-Assay wurde die Verteilung von EPS zwischen den beiden Monolayern der Liposomen zeitabhängig ermittelt. Die kinetische Auswertung der Daten ergab Halbwertszeiten von 3,32 h für den Flipp und 3,60 h für den Flopp. Im Vergleich zu EPG ist die transversale Bewegung von EPS zwischen den Monolayern von LUV deutlich schneller. Dies könnte daran liegen, dass die Kopfgruppe von EPG stärker hydratisiert ist als die von EPS (Loosley-Millman et al, 1982). Redelmeier konnte zeigen, dass sich PG nur im dehydratisierten Zustand zum anderen Monolayer verlagert (Redelmeier et al., 1990). Ein Grossteil der Aktivierungsenergie für den Flipp-Flopp ist darauf zurückzuführen, dass PG Wassermoleküle, die mit der Kopfgruppe und auch mit der Phosphatgruppe assoziiert sind, abstreifen muss.

Die Daten aus den TNS-Versuchen erlaubten keine Aussage über die Geschwindigkeit des Flipp-Flopp. Der berechnete EPS-Anteil im äusseren Monolayer der Donorliposomen stieg nicht wie erwartet auf einen konstanten Wert an, sondern fiel zuerst ab, stieg dann an und fiel in einer dritten Phase wieder ab. Die Akzeptorliposomen zeigten das gleiche Verhalten. Möglicherweise liegt dieses Verteilungsverhalten darin begründet, dass EPS leicht spontan zu EPE decarboxyliert. Dadurch verliert die Membran negative Ladung, wodurch die Einlagerung von TNS verändert wird. Der Fluorescamin-Assay dagegen wird nicht direkt von der Decarboxylierung beeinflusst, da er mit der Aminofunktion von EPS reagiert. Eine Beeinflussung des Flipp-Flopp von EPS ist durch die Bildung von EPE aber nicht auszuschliessen.



### **3.3 Enzymatische Modifizierung von Liposomen mittels PSD**

#### **3.3.1 Aktivitätsnachweis an Vesikeln**

##### **3.3.1.1 Dünnschichtchromatographie**

Zur Durchführung des Aktivitätsnachweis mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden EPS-haltige Liposomen (EPC 95 mol%, EPS 5 mol%, Gesamtphospholipidkonzentration 10 mM, Grösse 200 nm) über Extrusion (vgl. 2.4.1) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (Tabelle 2-8) hergestellt.

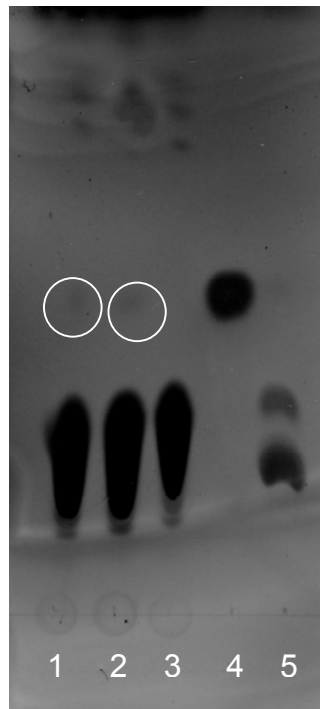
Es wurden folgende Proben angesetzt:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Liposomen	200 µl	200 µl	200 µl
GST-PSD 0,12 mg/ml	100 µl	100 µl	---
50 mM Phosphatpuffer pH 7,0	700 µl	690 µl	800 µl
Triton X-100 10% (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0)	---	10 µl	---
Total	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Die 3 Ansätze wurden unter gelegentlichem Schütteln bei 37 °C während 1 h inkubiert.

Zur Isolierung der Lipide wurden 300 µl der Ansätze mit 300 µl eines Chloroform-Methanol-Gemisches (65 + 25 VT) versetzt. Das Gemisch wurde 1 min lang gevortext und dann zur Phasentrennung während 2 min bei 16'000 x g zentrifugiert.

20 µl der organischen Phase wurden auf eine DC-Alufolie Kieselgel 60 (Merck) aufgetragen. Die Trennung erfolgte nach 15 min Kammersättigung mit einem Chloroform-Methanol-Wasser-Laufmittel (65 + 25 + 4 VT) über eine Strecke von 6 cm. Zur Detektion der Phospholipide wurden die Platten in 10 % Schwefelsäure getaucht und kurz erhitzt.



**Abbildung 3-45** Nachweis der Aktivität des Fusionsproteins GST-PSD mittels DC.

**Bahn 1:** EPS-haltige EPC-Liposomen mit PSD ohne Triton X-100

**Bahn 2:** EPS-haltige EPC-Liposomen mit PSD mit Triton X-100 (0,1%)

**Bahn 3:** EPS-haltige EPC-Liposomen

**Bahn 4:** EPE

**Bahn 5:** EPS

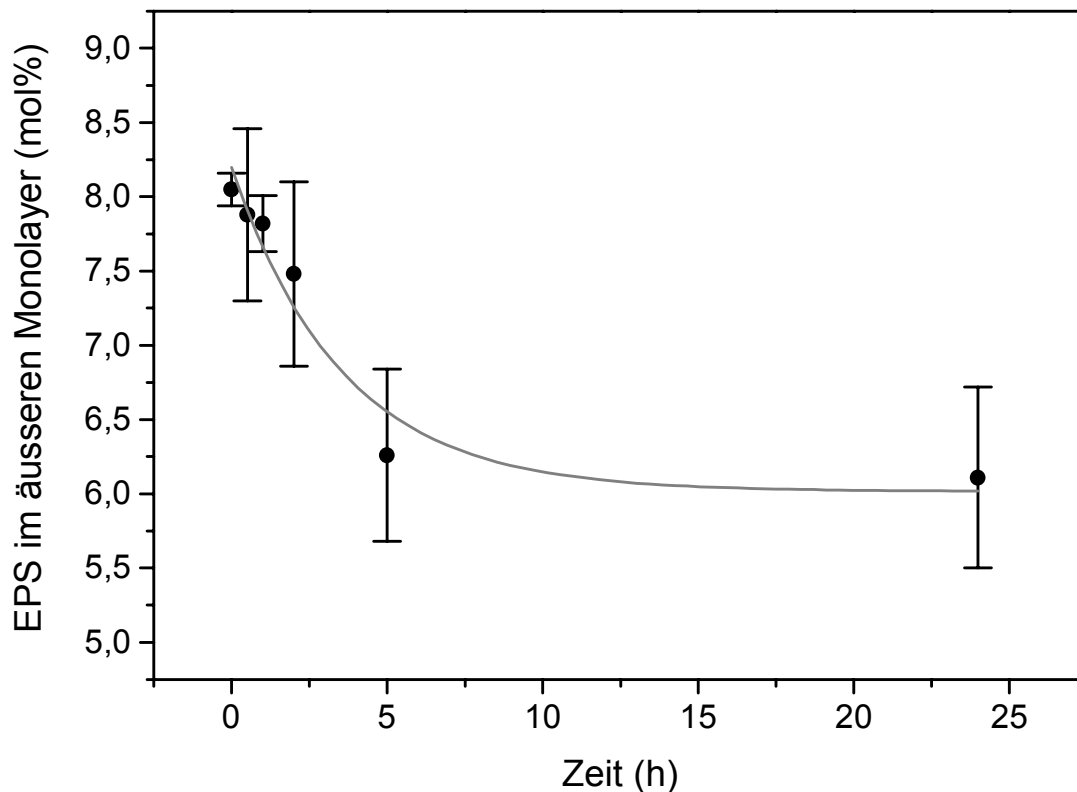
**Es ist zu erkennen, dass sich nach 1 h Inkubation bei 37°C bei den Ansätzen 1 und 2 kleine Mengen EPE gebildet haben.**

Wie in Abbildung 3-45 deutlich zu sehen ist, hatte sich bei den Ansätzen 1 und 2 nach 1 h Inkubation bei 37 °C eine kleine Menge EPE gebildet. Ansatz 3 zeigte in der Zeit keine spontane Decarboxylierung von EPS zu EPE. Die Bildung von EPE ist demnach auf die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins zurückzuführen.

In der Literatur wird gelegentlich darauf hingewiesen, dass die PSD nur in Gegenwart von nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100 aktiv ist (Rizzolo, 1981; Overmeyer & Waechter, 1989). Der Versuch zeigt jedoch, dass die beim detergens-freien Ansatz 1 gebildete Menge EPE vergleichbar ist mit der Menge EPE, die beim Ansatz 2, der Triton X-100 enthielt (Konzentration 0,1 %), gebildet wurde. Es ist demnach keine Voraussetzung für eine enzymatische Umwandlung von EPS, dass das Phospholipid mizellar gelöst vorliegen muss.

### 3.3.1.2 TNS-Assay

Die Decarboxylierung von EPS zu EPE führt zu einer Veränderung der Oberflächenladung der Liposomen, was über den TNS-Assay (vgl. 2.10.3) verfolgt werden kann. Zur Überprüfung der Aktivität des Fusionsproteins wurden EPS-haltige Liposomen (EPC 90 mol%, EPS 10 mol%; Gesamtlipidkonzentration 19,58 mM) mittels DD (vgl. 2.4.2) hergestellt. Der hydrodynamische Durchmesser der Liposomen betrug  $91 \pm 5$  nm. 100  $\mu$ l Liposomendispersion wurden mit 5  $\mu$ l Rohextrakt (vgl. 2.7.12) bzw. 5  $\mu$ l PBS versetzt und bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach 0,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 5 und 24 h wurden 5  $\mu$ l Proben mittels TNS-Assay analysiert.



**Abbildung 3-46** Aktivitätsnachweis des PSD-Fusionsproteins mittels TNS-Assay. 100  $\mu$ l Liposomendispersion wurden mit 5  $\mu$ l Rohextrakt bei 37 °C inkubiert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Proben mittels TNS-Assay analysiert und der EPS-Anteil im äusseren Monolayer über Gleichung 3-7 ermittelt. n = 3

Die Liposomendispersion ohne Rohextrakt zeigte im Zeitraum über 24 h keine Verminderung des EPS-Gehaltes im äusseren Monolayer. Demnach ist die Umwandlung von EPS zu EPE auf die Aktivität des Fusionsproteins zurückzuführen. Legt man dem in Abbildung 3-46 dargestellten Umwandlungsprozess eine Kinetik

erster Ordnung zugrunde, beträgt die Halbwertszeit für diesen Vorgang 4 h. Die enzymatische Decarboxylierung von EPS ist also ein vergleichsweise langsamer Prozess. Dies deutete sich schon bei den dünn-schichtchromatographischen Versuchen an (vgl. 3.3.1.1). Denkins konnte zeigen, dass NBD-seitenketten-gelabeltes PS im äusseren Monolayer von LUV (DOPC 99 mol%, NBD-PS 1 mol%) innerhalb 1 h von *E. coli* PSD vollständig in NBD-PE umgewandelt wurde (Denkins et al., 1986). Dabei wurde allerdings ein ungefähr 70-facher Überschuss (m/m) von PSD zu NBD-PS eingesetzt. Das Massenverhältnis bei den hier durchgeführten Experimenten betrug ungefähr 1:6 (Fusionsprotein : EPS), was einer Konzentration von 2,13 nmol Fusionsprotein pro  $\mu\text{mol}$  EPS entspricht. Nach 24 h sind nur etwa 2 mol% EPS im äusseren Monolayer umgewandelt worden. Dies liegt möglicherweise daran, dass das Enzym bei 37 °C instabil ist und die Aktivität schnell nachlässt. Zudem wird durch Flipp-Flopp EPS vom inneren zum äusseren Monolayer nachgeliefert, während EPE sich von der äusseren zur inneren Lipidschicht verteilt.

## 4 Zusammenfassung

Liposomen werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit zellulären Membranen in der Forschung häufig als Biomembran-Modelle herangezogen, um verschiedenste Vorgänge, die in und an Membranen stattfinden, isoliert zu untersuchen. Die dafür eingesetzten Liposomen müssen verschiedene Anforderungen erfüllen, um der sehr komplexen Situation an zellulären Membranen in Ansätzen Rechnung zu tragen. So sollten die Liposomen eine gewisse Grösse (ca. 50 nm) nicht unterschreiten und unilamellar sein. Diese Anforderungen erfüllen large unilamellar vesicles (LUV), die mittels Detergentsdialyse (DD) hergestellt werden können. Weitere Parameter, die die biophysikalischen Eigenschaften (Viskoelastizität, Permeabilität, Fusionsverhalten etc.) von Membranen beeinflussen, sind die Lipidzusammensetzung und Verteilung der Lipide zwischen den Monolayern. Viele natürliche Membranen zeigen eine unsymmetrische Verteilung verschiedener Lipide zwischen den beiden Monolayern. Bekanntestes Beispiel ist die humane Erythrozytenmembran, bei der sich die Amino-phospholipide Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) hauptsächlich im inneren Monolayer aufhalten, während die cholinhaltigen Lipide Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin mehr im äusseren Monolayer zu finden sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung und Charakterisierung von Liposomen, die eine unsymmetrische Lipidverteilung zwischen dem inneren und äusseren Monolayer aufweisen. Die Unsymmetrie sollte unter Verwendung von rekombinant aus *E. coli* gewonnenen Proteinen erzeugt werden. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: der Lipidaustausch zwischen zwei Liposomenpopulationen und die enzymatische Modifizierung der Liposomenoberfläche.

Beim Lipidaustausch wurde eine Unsymmetrie generiert, indem Donorliposomen, die neben dem Basislipid EPC 10mol% negativ geladenes EPG bzw. EPS enthielten, mit der gleichen Menge Akzeptorliposomen (100 mol% EPC) inkubiert wurden. Der sehr langsame spontane Lipidaustausch konnte unter Verwendung des rekombinant in *E. coli* gewonnenen nichtspezifischen Lipidtransferproteins (ns-LTP) aus der Rattenleber um ein Vielfaches beschleunigt werden. Die Trennung der beiden Vesikelpopulationen im Anschluss an den Lipidaustausch gelang mit der Free Flow Elektrophorese (FFE).

Zur enzymatischen Modifizierung der Liposomenoberfläche wurde die *E. coli* Phosphatidylserin-Decarboxylase (PSD) als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* hergestellt. Das Enzym beschleunigt die Umwandlung von PS zu PE. Aufgrund seiner Grösse vermag es liposomale Membranen nicht zu durchdringen, wodurch nur im äusseren Monolayer vorliegendes PS modifiziert wird. Dadurch wird bezüglich PS und PE eine Unsymmetrie zwischen den beiden Monolayern generiert.

Ein wichtiger Aspekt bei Liposomen mit unsymmetrischer Lipidverteilung ist die transversale Diffusion von Phospholipiden (Flipp-Flopp), bei der durch Umlagerung der Membrankomponenten zwischen den Monolayern die Unsymmetrie mit der Zeit wieder aufgehoben wird. Die Kinetik dieser Lipidbewegung wurde für die beiden Phospholipide EPG und EPS mittels  $\zeta$ -Potentialmessungen, Fluorescamin- und TNS-Assay ermittelt.

Das bei den Lipidaustauschexperimenten eingesetzte ns-LTP wurde von S. Wieland im Rahmen ihrer Doktorarbeit aus Rattenleber in *E. coli* kloniert. Die Aktivität des Proteins wurde mittels der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik (FRET) untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass ns-LTP das in der Seitenkette fluoreszenzgelabelte  $C_{12}$ -NBD-PC aus einer EPC-Membran extrahieren und binden kann. Die Bindung stellte sich allerdings als schwach heraus: im Sättigungsgleichgewicht bindet gemäss FRET-Assay nur jedes 157. ns-LTP-Molekül ein  $C_{12}$ -NBD-PC.

Der spontane Transfer von  $C_{12}$ -NBD-PC von FRET-gelabelten Liposomen (Donor) zu reinen EPC-Liposomen (Akzeptor) liess sich durch Zugabe von ns-LTP beschleunigen. Es zeigte sich, dass der proteinvermittelte Lipidtransfer ein sättigbarer Prozess nach Michaelis-Menten ist. Die kinetische Auswertung ergab eine maximale Transferrate von 133 nM/min und eine Michaelis-Konstante von 2272 nmol/l.

Der Austausch des negativ geladenen Phospholipids EPG zwischen Donor- und Akzeptorvesikeln konnte über das Wanderungsverhalten der beiden Liposomenarten in der FFE verfolgt werden. Es zeigte sich, dass ein Zusammenhang zwischen dem EPG-Gehalt von Liposomen und ihrer elektrophoretischen Mobilität besteht, der sich über eine Funktion 1. Ordnung beschreiben lässt. Somit konnte anhand des Wanderungsverhaltens der Liposomen in der FFE der EPG-Anteil im äusseren

Monolayer berechnet werden. Der spontane Austausch von EPG bei RT stellte einen sehr langsamen Prozess dar, bei dem selbst nach 40 h keine gleichmässige Verteilung von EPG zwischen den Donor- und Akzeptorvesikeln erreicht werden konnte. Durch Hinzufügen von ns-LTP konnte der Austausch konzentrationsabhängig beschleunigt werden. Bei einer ns-LTP-Konzentration von 0,13 nmol pro  $\mu\text{mol}$  Lipid war der vollständige Austausch von EPG zwischen den beiden Vesikelarten nach ca. 8 h vollzogen. Es wurde zusätzlich ein Vergleich mit Polymer- und Ankerliposomen durchgeführt (Stauch, 2002). Dabei zeigte sich, dass sowohl der spontane als auch der proteinvermittelte EPG-Austausch bei Polymerliposomen am schnellsten abläuft. Dies ist hauptsächlich auf das im Inneren des Liposoms befindliche Polymer zurückzuführen. Eine Beschleunigung des Austausches durch das Ankermolekül DOGM, welches in beiden Monolayern der Polymerliposomen inkorporiert ist, kann ausgeschlossen werden.

Der Flipp-Flopp von EPG und EPS in EPC-Liposomen wurde über verschiedene Methoden verfolgt. Da die Umlagerung der beiden negativ geladenen Phospholipide zwischen den beiden Monolayern von LUV mit einer Veränderung der Oberflächenladung einher geht, liess sich der Flipp-Flopp mittels  $\zeta$ -Potentialmessungen verfolgen.

Beim TNS-Assay macht man es sich zunutze, dass sich die Fluoreszenzsonde TNS in Abhängigkeit zur Oberflächenladung von Liposomen in die Membran einlagert, wodurch ihre Fluoreszenzaktivität sehr stark ansteigt. Da die gemessene Fluoreszenzintensität einer Probe nicht nur vom EPG bzw. EPS-Anteil im äusseren Monolayer der LUV, sondern auch von der Gesamtpospholipidkonzentration abhängig ist, müssen die gemessenen Intensitäten in Relation gesetzt werden zu den Intensitäten, die für reine EPC-Liposomen der gleichen Konzentration ermittelt wurden.

Als weitere Methode zur Beobachtung des Flipp-Flopp wurde der Fluorescaminassay eingesetzt. Fluorescamin reagiert mit primären Aminogruppen unter Bildung eines fluoreszenzaktiven Produktes. Da die Reaktion in geeignetem Medium innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist, erfasst das wenig membrangängige Reagens nur die im äusseren Monolayer befindlichen Aminogruppen. Die Verteilung von EPS zwischen den Monolayern von unilamellaren Vesikeln lässt sich messen, indem die

Fluoreszenz einer liposomalen Probe mit der Fluoreszenz einer identischen Probe, die vor der Reaktion mizellar gelöst wurde, in Relation gesetzt wird.

Es zeigte sich, dass die ermittelte Halbwertszeit der Flipp-Flopp-Bewegung von EPG und EPS im Bereich von Stunden lag und dass die Analytik Einfluss auf das Ergebnis hatte. So lag die über  $\zeta$ -Potentialmessungen ermittelte Halbwertszeit für den EPG-Flipp bei 9,05 h und für den Flopp bei 9,70 h, während der TNS-Assay Halbwertszeiten von 17,5 h für den Flipp und 20,2 h für den Flopp ergab.

Die mittels Fluorescaminassay ermittelten Halbwertszeiten für die Flipp-Flopp-Bewegung von EPS lagen bei 3,32 h (Flipp) und 3,60 h (Flopp). Eine Erfassung des EPS-Flipp-Flopp über den TNS-Assay war nicht möglich. Dies liegt vermutlich daran, dass EPS bei RT leicht zu EPE decarboxyliert, wodurch sich die Ladungsverhältnisse an der Oberfläche der Liposomen verändern.

Zur enzymatischen Modifizierung der Oberfläche von EPS-haltigen Liposomen wurde die E. coli PSD als Fusionsprotein mit der GST in E. coli exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aktivität des Fusionsproteins wurde mit verschiedenen Methoden untersucht.

Dünnschichtchromatographische Versuche zeigten, dass bei 37 °C nach 1 h ein Teil des EPS durch das Fusionsprotein in EPE umgewandelt wurde. Eine Bildung von EPE durch spontane Decarboxylierung konnte in dem Zeitraum nicht nachgewiesen werden. Auch scheint die Enzymaktivität nicht davon abhängig zu sein, ob das EPS in liposomalen Membranen oder mizellar vorliegend angeboten wird.

Die Aktivität liess sich auch über den TNS-Assay nachweisen. Es zeigte sich allerdings, dass für eine effiziente Umwandlung von EPS eine grosse Menge Protein eingesetzt werden muss. Bei einer Konzentration von 2,13 nmol Fusionsprotein pro  $\mu\text{mol}$  EPS wurden in 5 h bei 37 °C nur etwa 2 mol% EPS im äusseren Monolayer der LUV in EPE umgewandelt. Eine längere Inkubation führt zu keiner verstärkten Bildung von EPE. Dies deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein bei den gewählten Bedingungen zur Instabilität neigt und die Aktivität rasch nachlässt. Zudem wird vom inneren, EPS-reichen Monolayer durch Umlagerung dem äusseren Monolayer EPS nachgeliefert.

Eine Abtrennung des Proteins von den Liposomen über FFE oder Affinitätschromatographie wurde bislang noch nicht durchgeführt. Dies und die Überprüfung



der Aktivität des Fusionsproteins immobilisiert an eine Glutathion-Sepharose-Matrix könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen werden.

## 5 Literatur

Amar, A, Rottem, S and Razin, S (1974)

"Characterization of the mycoplasma membrane proteins. IV. Disposition of proteins in the membrane."

Biochim Biophys Acta 352(2): 228-244

Audubert, F and Vance, DE (1984)

"Evidence that the enzymes involved in the methylation of phosphatidylethanolamine are on the external side of the microsomal vesicles."

Biochim Biophys Acta 792(3): 359-62

Avdeef, A and Testa, B (2002)

"Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques."

Cell Mol Life Sci 59(10): 1681-9

Baier, TG, Weber, G, Hartmann, K, Heinrich, U and Schonberg, D (1988)

"Preparative separation of human B and T lymphocytes by free flow electrophoresis."

Anal Biochem 171(1): 91-5

Bangham, AD (1963)

"Physical structure and behaviour of lipid and lipid enzymes."

Adv Lipid Res 1: 65-104

Bangham, AD, Standish, MM and Watkins, JC (1965)

"Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids."

J Mol Biol 13(1): 238-52

Bartlett, GR (1959)

"Phosphorus assay in column chromatography."

J Biol Chem 234: 466-468

Bloj, B and Zilversmit, DB (1977)

"Rat liver proteins capable of transferring phosphatidylethanolamine. Purification and transfer activity for other phospholipids and cholesterol."

J Biol Chem 252(5): 1613-1619

Boon, JM and Smith, BD (2002)

"Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes."

Med Res Rev 22(3): 251-81

Bretscher, MS (1972a)

"Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes."

Nat New Biol 236(61): 11-2

Bretscher, MS (1972b)

"Phosphatidylethanolamine: differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent."

J Mol Biol 71(3): 523-8

Brunner, J, Skrabal, P and Hauser, H (1976)

"Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physico-chemical properties."

Biochim Biophys Acta 455(2): 322-31

Buton, X, Morrot, G, Fellmann, P and Seigneuret, M (1996)

"Ultrafast glycerophospholipid-selective transbilayer motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane."

J Biol Chem 271(12): 6651-7

Cevc, G (1990)

"Membrane electrostatics."

Biochim Biophys Acta 1031(3): 311-82

Chattopadhyay, A and London, E (1987)

"Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids."

Biochemistry 26(1): 39-45

Connor, J, Pak, CH, Zwaal, RF and Schroit, AJ (1992)

"Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process."

J Biol Chem 267(27): 19412-7

Crain, RC and Zilversmit, DB (1980a)

"Two nonspecific phospholipid exchange proteins from beef liver. 2. Use in studying the asymmetry and transbilayer movement of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and sphingomyelin in intact rat erythrocytes."

Biochemistry 19(7): 1440-7

Crain, RC and Zilversmit, DB (1980b)

"Two nonspecific phospholipid exchange proteins from beef liver. I. Purification and characterization."

Biochemistry 19(7): 1433-9

Crommelin, DJ (1984)

"Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes."

J Pharm Sci 73(11): 1559-63

Cui, Z, Vance, JE, Chen, MH, Voelker, DR and Vance, DE (1993)

"Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver."

J Biol Chem 268(22): 16655-63

Daleke, DL and Lyles, JV (2000)

"Identification and purification of aminophospholipid Flippases."

Biochim Biophys Acta 1486(1): 108-27

Dao, HN, McIntyre, JC and Sleight, RG (1991)

"Large-scale preparation of asymmetrically labeled fluorescent lipid vesicles."

Anal Biochem 196(1): 46-53

Denkins, YM and Schroit, AJ (1986)

"Phosphatidylserine decarboxylase: generation of asymmetric vesicles and determination of the transbilayer distribution of fluorescent phosphatidylserine in model membrane systems."

Biochim Biophys Acta 862(2): 343-51

Dern, T (2002). Analytik und präparative Trennung liposomaler Systeme mit Zonen-Free-Flow-Elektrophorese. Doktorarbeit in der Pharmazeutischen Technologie, Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität.

Disalvo, EA, Campos, AM, Abuin, E and Lissi, EA (1996)

"Surface changes induced by osmotic shrinkage on large unilamellar vesicles."

Chem Phys Lipids 84(1): 35-45

Dotsikas, Y and Loukas, YL (2002)

"Inclusional complex study between 6-p-toluidinylnaphthalene-2-sulfonate and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin."

J Biochem Biophys Methods 52(2): 121-34

Easter, JH, Detoma, RP and Brand, L (1978)

"Fluorescence measurements of environmental relaxation at the lipid-water interface region of bilayer membranes."

Biochim Biophys Acta 508(1): 27-38

- Eastman, SJ, Hope, MJ and Cullis, PR (1991)  
"Transbilayer transport of phosphatidic acid in response to transmembrane pH gradients."  
Biochemistry 30(7): 1740-5
- Eastman, SJ, Hope, MJ, Wong, KF and Cullis, PR (1992)  
"Influence of phospholipid asymmetry on fusion between large unilamellar vesicles."  
Biochemistry 31(17): 4262-8
- Egelhaaf, SU, Müller, M and Schurtenberger, P (1998)  
"Size determination of polymerlike micelles using cryo electron microscopy."  
Langmuir 14: 4345-4349
- Eisenberg, M, Gresalfi, T, Riccio, T and McLaughlin, S (1979)  
"Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids."  
Biochemistry 18(23): 5213-23
- Ellinger, I, Klapper, H, Courtoy, PJ, Vaerman, JP and Fuchs, R (2002)  
"Different temperature sensitivity of endosomes involved in transport to lysosomes and transcytosis in rat hepatocytes: analysis by free-flow electrophoresis."  
Electrophoresis 23(13): 2117-29
- Etemadi, AH (1980)  
"Membrane asymmetry. A survey and critical appraisal of the methodology. II. Methods for assessing the unequal distribution of lipids."  
Biochim Biophys Acta 604(3): 423-75
- Eytan, GD, Regev, R, Oren, G and Assaraf, YG (1996)  
"The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation."  
J Biol Chem 271(22): 12897-902
- Farge, E and Devaux, PF (1992)  
"Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids."  
Biophys J 61(2): 347-57
- Fischer, S and Graber, P (1999)  
"Comparison of  $\Delta$ pH- and  $\Delta$ pH<sub>i</sub>-driven ATP synthesis catalyzed by the H(+)-ATPases from *Escherichia coli* or chloroplasts reconstituted into liposomes."  
FEBS Lett 457(3): 327-32

Förster, T (1959)

"Transfer mechanisms of electronic excitation."

Discuss Faraday Soc 27: 7-17

Franck, PF, Op den Kamp, JA, Roelofsen, B and van Deenen, LL (1986)

"Does diamide treatment of intact human erythrocytes cause a loss of phospholipid asymmetry?"

Biochim Biophys Acta 857(1): 127-30

Fromherz, P (1983)

"Lipid-vesicle structure: size control by edge-active agents."

Chem Phys Lett 94: 259-266

Gallet, PF, Zachowski, A, Julien, R, Fellmann, P, Devaux, PF and Maftah, A (1999)  
"Transbilayer movement and distribution of spin-labelled phospholipids in the inner mitochondrial membrane."

Biochim Biophys Acta 1418(1): 61-70

Garcia, FL, Szyperski, T, Dyer, JH, Choinowski, T, Seedorf, U, Hauser, H and Wuthrich, K (2000)

"NMR structure of the sterol carrier protein-2: implications for the biological role."

J Mol Biol 295(3): 595-603

Gordesky, SE, Marinetti, GV and Segel, GB (1973)

"The interaction of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene with amino-phospholipids in membranes of intact erythrocytes, modified erythrocytes, and erythrocytes ghosts."

J Membr Biol 14(3): 229-42

Grossman, TH, Kawasaki, ES, Punreddy, SR and Osburne, MS (1998)

"Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability."

Gene 209(1-2): 95-103

Haest, CW, Oslender, A and Kamp, D (1997)

"Nonmediated Flipp-Flopp of anionic phospholipids and long-chain amphiphiles in the erythrocyte membrane depends on membrane potential."

Biochemistry 36(36): 10885-91

Heidrich, HG and Hannig, K (1989)

"Separation of cell populations by free-flow electrophoresis."

Methods Enzymol 171: 513-31

Hellwich, U and Schubert, R (1993)

"Concentration dependent binding of the chiral betablocker oxprenolol to isoelectric or negatively charged unilamellar vesicles."

Biochim Pharmacol 49: 511-517

Hill, WG, Rivers, RL and Zeidel, ML (1999)

"Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes, and gases."

J Gen Physiol 114(3): 405-14

Homan, R and Pownall, HJ (1988)

"Transbilayer diffusion of phospholipids: dependence on headgroup structure and acyl chain length."

Biochim Biophys Acta 938(2): 155-66

Hope, MJ, Bally, MB, Webb, G and Cullis, PR (1985)

"Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure - characterisation of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential."

Biochim Biophys Acta-Biomembranes 812(1): 55 - 65

Hope, MJ and Cullis, PR (1987)

"Lipid asymmetry induced by transmembrane pH gradients in large unilamellar vesicles."

J Biol Chem 262(9): 4360-6

Huang, C (1969)

"Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics."

Biochemistry 8(1): 344-52

Huang, H, Ball, JM, Billheimer, JT and Schroeder, F (1999a)

"Interaction of the N-terminus of sterol carrier protein 2 with membranes: role of membrane curvature."

Biochem J 344 Pt 2: 593-603

Huang, H, Ball, JM, Billheimer, JT and Schroeder, F (1999b)

"The sterol carrier protein-2 amino terminus: a membrane interaction domain."

Biochemistry 38(40): 13231-43

Huster, D, Muller, P, Arnold, K and Herrmann, A (2001)

"Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine."

Biophys J 80(2): 822-31

Jones, JD and Thompson, TE (1989)

"Spontaneous phosphatidylcholine transfer by collision between vesicles at high lipid concentration."

Biochemistry 28(1): 129-34

Kachel, K, Asuncion-Punzalan, E and London, E (1998)

"The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes."

Biochim Biophys Acta 1374(1-2): 63-76

Kahlenberg, A, Walker, C and Rohrlick, R (1974)

"Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the human erythrocyte membrane."

Can J Biochem 52(9): 803-6

Kornberg, RD and McConnell, HM (1971)

"Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes."

Biochemistry 10(7): 1111-20

Koynova, RD and Tenchov, BG (1983)

"Effect of ion concentration on phosphatidylethanolamine distribution in mixed vesicles."

Biochim Biophys Acta 727(2): 351-6

Krylov, AV, Pohl, P, Zeidel, ML and Hill, WG (2001)

"Water permeability of asymmetric planar lipid bilayers: leaflets of different composition offer independent and additive resistances to permeation."

J Gen Physiol 118(4): 333-40

Lohner, K (1991)

"Effects of small organic molecules on phospholipid phase transitions."

Chem Phys Lipids 57(2-3): 341-62

Loosley-Millman, ME, Rand, RP, Parsegian, VA (1982)

"Effects of monovalent ion binding and screening on measured electrostatic forces between charged phospholipid bilayers"

Biophys J 40(3): 221-32

Loseva, OI, Gavryushkin, AV, Osipov, VV and Vanyakin, EN (1998)

"Application of free-flow electrophoresis for isolation and purification of proteins and peptides."

Electrophoresis 19(7): 1127-34



Lutton, C and Zilversmit, DB (1976)  
"A new rat liver phospholipid exchange protein."  
Biochim Biophys Acta 441(3): 370-9

Manno, S, Takakuwa, Y and Mohandas, N (2002)  
"Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability."  
Proc Natl Acad Sci USA 99(4): 1943-8

McIntyre, JC and Sleight, RG (1991)  
"Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry."  
Biochemistry 30(51): 11819-27

McLean, LR and Phillips, MC (1984)  
"Kinetics of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine exchange between unilamellar vesicles."  
Biochemistry 23(20): 4624-30

McMurray, WC and Dawson, RM (1969)  
"Phospholipid exchange reactions within the liver cell."  
Biochem J 112(1): 91-108

Milsmann, MH, Schwendener, RA and Weder, HG (1978)  
"The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis."  
Biochim Biophys Acta 512(1): 147-55

Moss, RA and Bhattacharya, S (1995)  
"Transverse membrane asymmetry in model phospholipid bilayers: NBD-phosphatidylethanolamine and the separation of Flipp from Flopp."  
J Am Chem Soc 117(33): 8688-8690

Nath, S, Schutte, H, Hustedt, H, Deckwer, WD and Weber, G (1996)  
"Separation of enzymes from microorganism crude extracts by free-flow zone electrophoresis."  
Biotechnol Bioeng 51(1): 15-22

Negrete, HO, Rivers, RL, Goughs, AH, Colombini, M and Zeidel, ML (1996)  
"Individual leaflets of a membrane bilayer can independently regulate permeability."  
J Biol Chem 271(20): 11627-30

Nichols, JW (1987)

"Binding of fluorescent-labeled phosphatidylcholine to rat liver nonspecific lipid transfer protein."

J Biol Chem 262(29): 14172-7

Nichols, JW (1988)

"Kinetics of fluorescent-labeled phosphatidylcholine transfer between nonspecific lipid transfer protein and phospholipid vesicles."

Biochemistry 27(6): 1889-96

Nichols, JW and Pagano, RE (1982)

"Use of resonance energy transfer to study the kinetics of amphiphile transfer between vesicles."

Biochemistry 21(8): 1720-6

Nichols, JW and Pagano, RE (1983)

"Resonance energy transfer assay of protein-mediated lipid transfer between vesicles."

J Biol Chem 258(9): 5368-71

Olson, F, Hunt, CA, Szoka, FC, Vail, WJ and Papahadjopoulos, D (1979)

"Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes."

Biochim Biophys Acta 557(1): 9-23

Op den Kamp, JA (1979)

"Lipid asymmetry in membranes."

Annu Rev Biochem 48: 47-71

Overmeyer, JH and Waechter, CJ (1989)

"Assay for phosphatidylserine decarboxylase utilizing DEAE-cellulose column chromatography."

Anal Biochem 182(2): 452-6

Pagano, RE, Martin, OC, Schroit, AJ and Struck, DK (1981)

"Formation of asymmetric phospholipid membranes via spontaneous transfer of fluorescent lipid analogues between vesicle populations."

Biochemistry 20(17): 4920-7

Pan, SH and Malcolm, BA (2000)

"Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3)."

Biotechniques 29(6): 1234-8

Pantaler, E, Kamp, D and Haest, CW (2000)  
"Acceleration of phospholipid Flipp-Flopp in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length."  
Biochim Biophys Acta 1509(1-2): 397-408

Parlati, F, McNew, JA, Fukuda, R, Miller, R, Sollner, TH and Rothman, JE (2000)  
"Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion."  
Nature 407(6801): 194-8

Pedersen, JS, Egelhaaf, SU and Schurtenberger, P (1995)  
"Formation of polymer-like mixed micelles and vesicles in lecithin-bile salt solutions: a small-angle neutron-scattering study."  
J Phys Chem 99: 1299-1305

Peschka, R, Purmann, T and Schubert, R (1998)  
"Cross-flow filtration - an improved detergent removal technique for the preparation of liposomes."  
Int J Pharm 162: 177-183

Philippot, J, Mutaftschiev, S and Liautard, JP (1983)  
"A very mild method allowing the encapsulation of very high amounts of macromolecules into very large (1000 nm) unilamellar liposomes."  
Biochim Biophys Acta 734(2): 137-143

Philippot, JR, Mutaftschiev, S and Liautard, JP (1985)  
"Extemporaneous preparation of large unilamellar liposomes."  
Biochim Biophys Acta 821(1): 79-84

Plancon, L, Chami, M and Letellier, L (1997)  
"Reconstitution of FhuA, an Escherichia coli outer membrane protein, into liposomes. Binding of phage T5 to FhuA triggers the transfer of DNA into the proteoliposomes."  
J Biol Chem 272(27): 16868-72

Pohl, EE, Peterson, U, Sun, J and Pohl, P (2000)  
"Changes of intrinsic membrane potentials induced by Flipp-Flopp of long-chain fatty acids."  
Biochemistry 39(7): 1834-9

Poklar, N, Fritz, J, Macek, P, Vesnaver, G and Chalikian, TV (1999)  
"Interaction of the pore-forming protein equinatoxin II with model lipid membranes: A calorimetric and spectroscopic study."  
Biochemistry 38(45): 14999-5008

Poorthuis, BJ, Glatz, JF, Akeroyd, R and Wirtz, KW (1981)

"A new high-yield procedure for the purification of the non-specific phospholipid transfer protein from rat liver."

Biochim Biophys Acta 665(2): 256-61

Redelmeier, TE, Hope, MJ and Cullis, PR (1990)

"On the mechanism of transbilayer transport of phosphatidylglycerol in response to transmembrane pH gradients."

Biochemistry 29(12): 3046-53

Rhoden, V and Goldin, SM (1979)

"Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis."

Biochemistry 18(19): 4173-6

Ringsdorf, H, Sackmann, E, Simon, J and Winnik, FM (1993)

"Interactions of liposomes and hydrophobically-modified poly-(N-isopropylacrylamides): an attempt to model the cytoskeleton."

Biochim Biophys Acta 1153(2): 335-44

Rizzolo, LJ (1981)

"Kinetics and protein subunit interactions of Escherichia coli phosphatidylserine decarboxylase in detergent solution."

Biochemistry 20(4): 868-73

Rothman, JE and Dawidowicz, EA (1975)

"Asymmetric exchange of vesicle phospholipids catalyzed by the phosphatidylcholine exchange protein. Measurement of inside-outside transitions."

Biochemistry 14(13): 2809-16

Rothman, JE and Kennedy, EP (1977)

"Asymmetrical distribution of phospholipids in the membrane of Bacillus megaterium."

J Mol Biol 110(3): 603-18

Roy, MT, Gallardo, M and Estelrich, J (1997)

"Bilayer distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in lipid vesicles."

Bioconjug Chem 8(6): 941-5

Rueckert, DG and Schmidt, K (1990)

"Lipid transfer proteins."

Chem Phys Lipids 56(1): 1-20

Schroeder, F, Butko, P, Hapala, I and Scallen, TJ (1990)  
"Intermembrane cholesterol transfer: role of sterol carrier proteins and phosphatidylserine."  
Lipids 25(11): 669-74

Schubert, R (1989)  
"Relationship between the structure of bile salts and their interaction with membrane lipids."  
Proc MoBBEL 4: 1-17

Schubert, R (1991)  
"Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes."  
Chem Phys Lipids 58: 121-129

Schubert, R (2003)  
"Liposome preparation by detergent removal."  
Meth Enzymology 367: 46-70

Schurtenberger, P, Mazer, N and Känzig, W (1985)  
"Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salts and lecithin."  
J Phys Chem 89: 1042-1049

Schwendener, RA, Asanger, M and Weder, HG (1981)  
"n-Alkyl-glucosides as detergents for the preparation of highly homogeneous bilayer liposomes of variable sizes ( 60-240 nm) applying defined rates of detergent removal by dialysis."  
Biochem Biophys Res Commun 100(3): 1055-62

Seigneuret, M and Devaux, PF (1984)  
"ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes."  
Proc Natl Acad Sci USA 81(12): 3751-5

Sentandreu, E, Carbonell, JV and Sendra, JM (2002)  
"Monitoring of chemical and enzymatic hydrolysis of water-soluble proteins using flow-injection analysis with fluorescence detection and an aqueous eluant containing 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate as the fluorescent probe."  
Biotechnol Bioeng 78(7): 829-33

Sessa, G and Weissmann, G (1968)  
"Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes."  
J Lipid Res 9(3): 310-8

Singer, SJ and Nicolson, GL (1972)

"The fluid mosaic model of the structure of cell membranes."

Science 175(23): 720-31

Son, K and Alkan, H (1989)

"Liposomes prepared dynamically by interactions between bile salt and phospholipid molecules."

Biochim Biophys Acta 981(2): 288-94

Stauch, O, Uhlmann, T, Frohlich, M, Thomann, R, El-Badry, M, Kim, YK and Schubert, R (2002)

"Mimicking a cytoskeleton by coupling poly(N-isopropylacrylamide) to the inner leaflet of liposomal membranes: effects of photopolymerization on vesicle shape and polymer architecture."

Biomacromolecules 3(2): 324-32

Stauch, OB (2002). Auswirkungen eines inneren Polymerskeletts auf liposomale Membranen. Doktorarbeit in der Pharmazeutischen Technologie, Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität.

Stewart, JC (1980)

"Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate."

Anal Biochem 104(1): 10-14

Stolowich, NJ, Frolov, A, Atshaves, B, Murphy, EJ, Jolly, CA, Billheimer, JT, Scott, AI and Schroeder, F (1997)

"The sterol carrier protein-2 fatty acid binding site: an NMR, circular dichroic, and fluorescence spectroscopic determination."

Biochemistry 36(7): 1719-29

Struck, DK, Hoekstra, D and Pagano, RE (1981)

"Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion."

Biochemistry 20(14): 4093-9

Stryer, L (1978)

"Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler."

Annu Rev Biochem 47: 819-46

Szoka, F, Jr. and Papahadjopoulos, D (1980)

"Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)."

Annu Rev Biophys Bioeng 9: 467-508

Thomas, PD and Poznansky, MJ (1989)

"Curvature and composition-dependent lipid asymmetry in phosphatidylcholine vesicles containing phosphatidylethanolamine and gangliosides."

Biochim Biophys Acta 978(1): 85-90

Traikia, M, Warschawski, DE, Lambert, O, Rigaud, JL and Devaux, PF (2002)

"Asymmetrical membranes and surface tension."

Biophys J 83(3): 1443-54

Ulmius, J, Lindblom, G, Wennerstrom, H, Johansson, LB, Fontell, K, Soderman, O and Arvidson, G (1982)

"Molecular organization in the liquid-crystalline phases of lecithin-sodium cholate-water systems studied by nuclear magnetic resonance."

Biochemistry 21(7): 1553-60

Verkleij, AJ, Zwaal, RF, Roelofsen, B, Comfurius, P, Kastelijn, D and van Deenen, LL (1973)

"The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy."

Biochim Biophys Acta 323(2): 178-93

Voelker, DR, Ed. (2002). Lipid assembly into cell membranes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, Elsevier Science B.V.

Waarts, BL, Bittman, R and Wilschut, J (2002)

"Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion. Lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes."

J Biol Chem 277(41): 38141-7

Wang, Y, Grabowski, GA and Qi, X (2003)

"Phospholipid vesicle fusion induced by saposin C."

Arch Biochem Biophys 415(1): 43-53

Wieland, S, Schubert, R and Peschka-Süss, R (1999)

"Asymmetric membrane distribution of phosphatidylserine in different liposomal preparations."

J Liposome Res 9(4): 477-489

Wieland-Berghausen, S (1999). Präparation und Charakterisierung von Liposomen mit asymmetrischer Lipidverteilung. Doktorarbeit in der Pharmazeutischen Technologie, Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität.

Wimley, WC and Thompson, TE (1991)

"Transbilayer and interbilayer phospholipid exchange in dimyristoylphosphatidylcholine/dimyristoylphosphatidylethanolamine large unilamellar vesicles."

Biochemistry 30(6): 1702-9

Wolf, DE, Winiski, AP, Ting, AE, Bocian, KM and Pagano, RE (1992)

"Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogues by nonradiative fluorescence resonance energy transfer."

Biochemistry 31(11): 2865-73

Wu, H, Zheng, L and Lentz, BR (1996)

"A slight asymmetry in the transbilayer distribution of lysophosphatidylcholine alters the surface properties and poly(ethylene glycol)-mediated fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles."

Biochemistry 35(38): 12602-11

Zachowski, A (1993)

"Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement."

Biochem J 294 ( Pt 1): 1-14

Zumbuehl, O and Weder, HG (1981)

"Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles."

Biochim Biophys Acta 640(1): 252-62



Teile dieser Arbeit wurden an internationalen Kongressen vorgestellt:

1<sup>st</sup> Ameland Liposome Workshop, Hollum-Ameland/ The Netherlands, 18. - 22. September 2000

Vortrag: Lipid asymmetry achieved through liposome treatment with recombinant enzymes.

DPHG Jahrestagung 2001, Halle, 10. - 13. Oktober 2001

Poster: FRET assay of lipid transfer between vesicles mediated by the non-specific lipid transfer protein.

Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London/ GB, 17. - 21. Dezember 2001

Poster: Kinetics of protein mediated lipid transfer between liposomes measured with FRET.

15<sup>th</sup> Liposome Workshop Oberjoch/ Allgäu, 18. – 22 März 2002

Vortrag: Enzymatic modification of liposomal surfaces.

International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2004, Nürnberg, 15. - 18. März 2004

Poster: Liposomes with an asymmetrical lipid distribution: production and flip-flop measurements.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Joachim Momm  
Geburtsdatum: 03. August 1974  
Geburtsort: Winterthur (CH)  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: schweizerisch

## **Ausbildung**

### **Schule**

1980 - 1986 Primarschule Winterthur-Wülflingen  
1986 - 1993 Gymnasium Kantonsschule Rychenberg Winterthur

### **Studium**

1994 - 1996 Studium der Pharmazie an der Eidgenössischen  
Technischen Hochschule (ETH) in Zürich: Pharmazeutische  
Grundfächer  
1996 - 1997 Praktisches Jahr in der Sternen-Apotheke in Winterthur  
1997 - 1999 Studium der Pharmazie an der ETH Zürich: Pharmazeutische  
Spezialfächer  
Feb./März 1999 Praktikum am R.W. Johnson Pharmaceutical Research  
Institute der Cilag AG in Schaffhausen bei Dr. D. Bachmann  
Dez. 1999 Erlangung des Eidgenössischen Diploms als Apotheker

### **Promotion**

Seit 02. 2000 Promotion als wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl  
für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg unter Prof. Dr. R.  
Schubert