

# Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Felicitas Schwörer, M.Sc.

aus Leonberg

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2017



**Charakterisierung von Lipid-Oligolagen nach  
Zugabe von Hyaluronsäure und polymeren  
Ersatzstoffen zur Aufklärung möglicher  
Wirkmechanismen in der Viskosupplementation**

Gutachter:

Prof. (apl.) Dr. Reiner Dahint

Prof. Dr. Joachim Spatz



## I. Kurzfassung

Die Wahrscheinlichkeit im Leben von Arthrose betroffen zu werden liegt in Deutschland bei etwa 20 %. Der Krankheit zugrunde liegt eine degenerative Veränderung an den Gelenken, bei der die den Knorpel bedeckenden Lipidschichten sowie der Knorpel selbst abgebaut und der darunterliegende Knochen freigelegt wird. Die Behandlung umfasst bislang vor allem schmerzlindernde Therapien und Krankengymnastik zur Erhaltung der Mobilität. Eine langfristige Lösung stellt nur ein künstlicher Gelenkersatz (Endoprothese) dar, welcher jedoch durch eine Operation eingesetzt und nach etwa 10 bis 15 Jahren ausgetauscht werden muss.

Seit den 90er Jahren gibt es die Behandlungsmethode der Viskosupplementation. Dieser nicht-operative Eingriff verspricht den Erhalt des eigenen natürlichen Gelenks bei gleichzeitiger Rückgewinnung dessen Funktionalität. Er basiert auf Studien an Gelenken, welche zeigten, dass das Volumen der Synovialflüssigkeit bei Erkrankung zu, die Konzentration und das Molekulargewicht (MW) der darin enthaltenen Hyaluronsäure jedoch abnimmt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch oberflächenaktive Phospholipide (PL) neben der HS eine große Rolle in der Gelenkschmierung spielen. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend erfolgt bei der Viskosupplementation eine intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure (HS) oder Mischungen aus HS und PL. Die Wirksamkeit der Methode ist jedoch umstritten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels eines einfachen Modellsystems die Wechselwirkungen der Hauptkomponenten in einem Gelenk zu untersuchen und zu prüfen, welche Auswirkungen HS und polymere Ersatzstoffe auf PL-Schichten haben, welche den Knorpel bedecken. Simultane *In-situ*-Neutronenreflexions (NR)- und Infrarot (IR)-Messungen am Messinstrument *BioRef* des Helmholtz-Zentrum-Berlins (HZB) sollten Einblick in die innere Struktur und Phasenzustände der Lipidschichten geben. Die Entwicklung einer passgenauen Scherzelle ermöglichte Scherung in Gelenken zu simulieren und Information über die Stabilität der Systeme zu gewinnen. Weitere systematische Untersuchungen zur Erforschung der Natur der Wechselwirkungen zwischen PLs und HS bzw. polymeren Ersatzstoffen erfolgten mittels ellipsometrischer Messungen.

Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen PLs und Polyelektrolyt (PE)- bzw. HS-Lösungen wurden in ersten Experimenten verschiedene Parameter der Lösungen verändert. Variiert wurden die Ladung, das Molekulargewicht und die Konzentration der PEs bzw. der HS, die Konzentration und Art zugesetzter Salze und der pH-Wert. Hierzu wurden die mit Lipid-Oligolagen beschichteten Silicium-Substrate zunächst als Referenz in reinem Wasser inkubiert und gemessen. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde das System den oben genannten Veränderungen ausgesetzt, erneut gemessen und mit der Referenzmessung verglichen.

Für geladene PEs wurde bei niedrigen Konzentrationen eine starke Zunahme der lamellaren Schichtdicke der Lipide gefunden, die mit zunehmender PE-Konzentration

## Kurzfassung

---

wieder abnahm. Ungeladene Polymere induzierten nur geringes Quellen, das mit steigender PE-Konzentration leicht zunahm. Dies gab Hinweise darauf, dass das starke Quellverhalten der Lipidschichten auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert. Angenommen wurde eine selektive Adsorption der PEs an den Lipid-Bilagen, welche für eine elektrostatische Aufladung der Schichten sorgt. Experimente zur Ladungsabschirmung durch Salz-Lösungen und Änderungen des pH-Werts sowie die Modellierung von NR-Daten konnten diese Vermutung weiter bestätigen.

Die genaue Lokalisierung der PE- bzw. HS-Moleküle innerhalb der Lipid-Lagen sollte in dieser Arbeit mittels NR-Messungen ermöglicht werden. Modellierungen der Reflektivitätsverläufe ergaben für Polyallylaminhydrochlorid (PAH) mit dem mittleren MW von 58 kDa einen Einbau in die Kettenbereiche. Mittels geschickter Kontrastvariationen in den Systemen durch Verwendung von deuterierten Lipiden war auch ein direkter, nicht auf Modellrechnungen basierender Nachweis des Einbaus von PAH in das Schichtsystem möglich, so dass eventuelle Fehlerquellen bei der Modellierung ausgeschlossen werden konnten. Ein solcher Einbau legt eine Verbrückung der Lipid-Schichten durch HS und PEs nahe, welche zur Ausbildung einer hydrogelartigen Struktur führen kann und möglicherweise den Knorpel schützt.

Gemäß den Vorstellungen zur Wirkungsweise der Viskosupplementation konnte eine Stabilisierung der Lipid-Schichten bei Zugabe von HS bzw. dem polymeren Ersatzstoff PAH gegenüber Scherung festgestellt werden. Dabei konnte jedoch nicht die erwartete MW-Abhängigkeit festgestellt werden. HS zeigte einen stärkeren Stabilisierungseffekt als das PAH, allerdings erst bei deutlich längeren Inkubationszeiten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HS und polymere Ersatzstoffe einen stabilisierenden Effekt auf die Lipid-Bedeckung der Gelenke zeigen, welcher eventuell zu einer Regenerierung der reibungsarmen Gelenkbewegung führen kann. Die Idee der Viskosupplementation scheint grundlegend vielversprechend zu sein und durch Berücksichtigung von weiteren Komponenten wie die Proteoglykane oder Knorpelbeschichtung wird in Zukunft eine wirkungsvolle nicht-operative Behandlung der Arthrose möglich sein.

## II. Abstract

The probability of being affected by osteoarthritis during lifetime is about 20 % in Germany. The disease originates from a degenerative alteration of joints in which the lipid layers covering the cartilage and the cartilage itself are depleted, and the underlying bone is exposed. The treatment mainly includes pain-relieving therapies and physiotherapy for maintaining mobility. A long-term solution is only an artificial joint replacement (endoprosthesis) which, however, has to be inserted by surgery and must be replaced after about 10 to 15 years.

Since the 90s a new treatment called viscosupplementation exists. This non-surgical procedure promises to preserve one's own natural joint while at the same time recovering its functionality. It is based on studies on diseased joints, which showed that the volume of the synovial fluid increases while the concentration and the molecular weight (MW) of the contained hyaluronic acid (HS) decrease. Further investigations indicate that surface-active phospholipids (PLs) play an important role in joint lubrication in addition to the HS. Based on these findings, an intra-articular injection of hyaluronic acid (HS) or mixtures of HS and PL is used during viscosupplementation. However, the effectiveness of the method is discussed controversially.

The aim of this work was, therefore, to investigate the interactions of the main components in a joint by means of a simplified model system, and to examine the impact of HS and polymeric substitutes on PL layers covering the cartilage. Simultaneous *in-situ* neutron reflection (NR) and infrared (IR) measurements at the instrument *BioRef* at Helmholtz-Zentrum-Berlin (HZB) should provide insights into the internal structure and phase behavior of the lipid layers. The development of a custom-fit shear cell allows to simulate shear in joints and to gain information on the stability of the systems. Further systematic studies on the nature of interactions between PLs and HS or polymeric substitutes were carried out by means of ellipsometric measurements.

For the investigation of the interaction between PLs and polyelectrolyte (PE) or HS solutions, different parameters of the solutions were deliberately changed in the first experiments. In particular, the charge, the molecular weight and the concentration of the PEs or the HS, the concentration and type of added salts and the pH were varied. For this purpose, silicon substrates coated with lipid oligolayers and exposed to water were first characterized and served as an internal reference. After reaching equilibrium, the system was subjected to the above-mentioned changes, measured again and compared with the reference measurement.

For charged PEs, a strong increase in the lamellar layer thickness of the lipids was found at low concentrations, which decreased with increasing PE concentration. Uncharged polymers induced only low swelling, which increased slightly with increasing PE concentration. This indicated that the strong swelling behavior of the lipid layers is based on electrostatic interactions. It was assumed that the selective adsorption of the PEs on the lipid bilayers electrostatically charges the layers. Experiments on charge shielding by

## Abstract

---

exposure to salt solutions and changes in pH as well as the modeling of NR data further confirmed this assumption.

The exact localization of the PE or HS molecules within the lipid layers should be facilitated by NR measurements. Modeling of the reflectivity curves for polyallylamine hydrochloride (PAH) with an average MW of 58 kDa showed an integration into the chain regions. By means of appropriate contrast variation in the systems utilizing deuterated lipids, a direct, model independent detection of the incorporation of PAH into the layer system was feasible so that possible sources of error during modeling could be excluded. Such incorporation suggests bridging of the lipid layers by HS and PEs, which can lead to the formation of a hydrogel-like structure possibly protecting the cartilage.

In line with the concept of the viscosupplementation, a stabilization of the lipid layers against shear could be determined upon addition of HS or the polymeric substitute PAH. However, the expected MW dependency could not be verified. HS showed a stronger stabilizing effect than the PAH, but only after markedly longer incubation times.

In the present work it was shown that HS and polymeric substitutes show a stabilizing effect on the lipid coating of the joints, which can possibly lead to a reconstitution of low-friction joint movement. The idea of viscosupplementation appears to be promising, and by taking other components such as proteoglycans or cartilage coatings into consideration, an effective non-operative treatment of osteoarthritis should be possible in the future.



## III. Inhaltsverzeichnis

I. Kurzfassung.....	V
II. Abstract .....	VII
III. Inhaltsverzeichnis .....	1
1. Motivation und Zielsetzung.....	5
2. Theoretischer Teil.....	7
2.1. Natürliche Gelenkbewegung .....	7
2.1.1. Gelenkaufbau.....	7
2.1.2. Modelle zur Beschreibung der Schmierung in Gelenken.....	8
2.1.3. Gelenkerkrankungen und Therapien .....	10
2.2. Modellsystem Gelenk.....	12
2.2.1. Phospholipid (PL).....	12
2.2.2. Hyaluronsäure (HS) und Polyelektrolyte (PEs) als Ersatzstoffe .....	17
2.2.3. Aufbau eines Modellsystems.....	21
2.2.4. Wechselwirkung zwischen Lipiden und Makromolekülen .....	22
2.2.5. Wechselwirkung zwischen Lipiden und Ionen.....	24
2.3. Analytik .....	28
2.3.1. Reflexionsmessungen .....	28
2.3.2. Röntgen- und Neutronenreflektometrie.....	30
2.3.3. Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR).....	35
2.3.4. Spektrale Ellipsometrie.....	37
2.3.5. Rasterkraftmikroskop (AFM).....	39
2.3.6. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	41
3. Experimenteller Teil.....	43
3.1. Verwendete Chemikalien und Substrate .....	43
3.2. Probenpräparation .....	45
3.3. Geräte zur Analytik .....	46
3.3.1. Röntgenreflektometrie .....	46
3.3.2. Neutronenreflektometrie.....	47
3.3.3. ATR-FTIR .....	49
3.3.4. Spektrale Ellipsometrie.....	51
3.3.5. AFM.....	52

# Inhaltsverzeichnis

---

3.3.6.	DSC .....	53
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	55
4.1.	Probenpräparation .....	55
4.1.1.	Charakterisierung der verwendeten Lipide mittels DSC-Messungen .....	55
4.1.2.	Charakterisierung mittels AFM.....	57
4.1.3.	Charakterisierung mittels XRR .....	60
4.2.	Quellexperimente .....	63
4.2.1.	Abhängigkeit des Quellverhaltens von der Konzentration polymerer Ersatzstoffe .....	66
4.2.2.	Abhängigkeit des Quellverhaltens vom Molekulargewicht .....	82
4.2.3.	Quellverhalten der Lipid-Oligolagen bei Anwesenheit ein- und zweiwertiger Ionen.....	86
4.2.4.	Variation der Salzkonzentration nach Inkubation mit HS und PEs.....	90
4.2.5.	Variation des pH-Werts .....	98
4.2.6.	Diskussion der Quellexperimente.....	103
4.3.	Lokalisierung von PAH und HS-Molekülen in DMPC-Oligolagen .....	105
4.4.	Temperaturabhängigkeiten.....	113
4.5.	Scherexperimente .....	115
4.5.1.	Messungen gegen D <sub>2</sub> O .....	116
4.5.2.	Messungen gegen PAH-Lösungen .....	120
4.5.3.	Messungen gegen PAH- und NaCl-Lösungen.....	127
4.5.4.	Messungen gegen HS-Lösungen .....	128
4.5.5.	Modellierung der Neutronendaten.....	131
4.5.6.	Diskussion der Schermessungen .....	135
4.6.	System-Betrachtungen unter physiologischen Bedingungen .....	139
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
6.	Literaturverzeichnis.....	145
7.	Anhang .....	i
7.1.	Kurven aus IR-, XRR und NR-Messungen .....	i
7.1.1.	NR-Kurven, ihre Fits und die dazugehörigen SLDs aus den Schermessungen.....	i
7.1.2.	IR-Messungen aus den Scherversuchen .....	vi
7.2.	Abkürzungsverzeichnis .....	x

## Inhaltsverzeichnis

---

7.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	xii
7.4. Danksagung.....	xxiv
7.5. Erklärung.....	xxv

# Inhaltsverzeichnis

---

## 1. Motivation und Zielsetzung

Die durchschnittliche Lebenserwartung in Deutschland ist in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen. Im Jahr 2013 betrug sie 77.7 Jahre für die männliche und 82.7 Jahre für die weibliche Bevölkerung.<sup>1</sup> Begünstigende Faktoren sind Friedenszeiten, höherer Lebensstandard, bessere Ernährungslage und auch der medizinische Fortschritt. Aufgrund der höheren Lebenserwartung gewinnen altersassoziierte Krankheiten immer mehr an Bedeutung. Um dem Menschen in hohem Alter einen gewissen Lebensstandard zu bewahren, welcher sich unter anderem über eine gut erhaltene Gesundheit definiert, müssen wirkungsvolle Behandlungsformen für altersbedingte Krankheiten entwickelt werden.

Eine dieser altersassoziierten Krankheiten stellt die Arthrose dar. Sie bezeichnet eine degenerative Veränderung an den Gelenken, bei der die den Knorpel bedeckenden Lipidschichten sowie der Knorpel selbst abgebaut und der darunterliegende Knochen freigelegt wird. Eine Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) ergab eine Lebenszeitprävalenz für Arthrose von etwa 20 %.<sup>1</sup> Die Behandlung umfasst bislang vor allem schmerzlindernde Therapien und Krankengymnastik zur Erhaltung der Mobilität. Eine langfristige Lösung stellt nur ein künstlicher Gelenkersatz (Endoprothese) dar, welcher jedoch durch eine Operation eingesetzt werden muss. Neben dem operativen Risiko beläuft sich die Lebensdauer einer Prothese auf etwa 10 bis 15 Jahre, nach welcher sie auszutauschen ist.

Seit den 90er Jahren gibt es die Behandlungsmethode der Viskosupplementation. Dieser nicht-operative Eingriff verspricht den Erhalt des eigenen natürlichen Gelenks bei gleichzeitiger Rückgewinnung dessen Funktionalität. Er basiert auf Studien an Gelenken, welche zeigten, dass das Volumen der Synovialflüssigkeit bei Erkrankung zu, die Konzentration und das Molekulargewicht (MW) der darin enthaltenen Hyaluronsäure jedoch abnimmt.<sup>2-4</sup> Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch oberflächenaktive Phospholipide (PL) neben der HS eine große Rolle in der Gelenkschmierung spielen.<sup>5-7</sup> Auf diesen Erkenntnissen aufbauend erfolgt bei der Viskosupplementation eine intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure (HS) oder Mischungen aus HS und PL. Diese Form der Therapie ist jedoch bis heute umstritten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels eines einfachen Modellsystems die Wechselwirkungen der Hauptkomponenten in einem Gelenk zu untersuchen und zu prüfen, welche Auswirkungen HS und polymere Ersatzstoffe auf PL-Schichten haben, welche den Knorpel bedecken. Im Gegensatz zu anderen Publikationen, welche sich ebenfalls mit derlei Wechselwirkungen beschäftigen, wurden hier nicht die durch HS-Zugabe verbesserten Schmiereigenschaften bestimmt, sondern vor allem strukturelle Veränderungen der Lipidschicht und deren mögliche Stabilisierung in den Vordergrund gerückt. Simultane *In-situ*-Neutronenreflexions (NR)- und Infrarot (IR)-Messungen am Messinstrument *BioRef* des Helmholtz-Zentrum-Berlins (HZB) sollten Einblick in die innere Struktur und Phasenzustände der Lipidschichten geben. Die Entwicklung einer

passgenauen Scherzelle ermöglichte Scherung in Gelenken zu simulieren und Information über die Stabilität der Systeme zu gewinnen. Weitere systematische Untersuchungen zur Erforschung der Natur der Wechselwirkungen zwischen PLs und HS bzw. polymeren Ersatzstoffen erfolgten mittels ellipsometrischer Messungen. All diese Ergebnisse sollten später Argumente für oder gegen die Viskosupplementation liefern und die Diskussionen um die Wirksamkeit der Therapie voranbringen.

## 2. Theoretischer Teil

Zum allgemeinen Verständnis soll in diesem Abschnitt zunächst auf die natürliche Gelenkbewegung von Säugetieren eingegangen werden. Es werden der Gelenkaufbau und verschiedene Modelle der Schmierung vorgestellt. Auch soll kurz das Thema Gelenkerkrankungen besprochen und die für diese Arbeit ausschlaggebende Behandlungsform der Viskosupplementation herausgestellt werden. Die für das Gelenk-Modellsystem wichtigen Komponenten werden vorgestellt und es wird auf die bereits bekannten Wechselwirkungen dieser mit verschiedenen Makromolekülen und Salzen eingegangen. Im letzten Teil werden die analytischen Methoden beschrieben.

### 2.1. Natürliche Gelenkbewegung

Zur Mobilisierung unserer Knochen benötigen wir neben Muskeln auch eine Verbindung zwischen den Knochen, welche flexible und reibungsarme Bewegungsvorgänge zulässt. Solch eine Verbindung zwischen zwei oder mehreren Knochen wird als Gelenk bezeichnet. In diesem Abschnitt sollen das Gelenk und einige Theorien zur Gelenkschmierung vorgestellt werden.

#### 2.1.1. Gelenkaufbau

Ein echtes Gelenk setzt sich aus den zwei Knochenenden und dem Gelenkspalt zusammen. Je nach Gelenkart variieren die Formen der Endflächen. Beim sogenannten Kugelgelenk beispielsweise sind die Flächen kugelschalenähnlich und der Gelenkkopf ist in die Gelenkpfanne eingepasst. Diese Art findet sich in Hüft- und Schultergelenken. Die Endflächen sind mit einer Knorpelschicht umhüllt und das gesamte Gelenk ist von einer Gelenkkapsel umgeben, welche einen Hohlraum bildet, der wiederum mit einer Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit) gefüllt ist. Diese besteht zu einem großen Teil aus HS, dem Protein Aggrecan, Aggregaten aus HS und Aggrecan und dem Protein Lubricin (aus der Tabelle von Klein<sup>8</sup> entnommen). Die Knorpelschicht besteht aus Knorpelzellen und einem Matrixgewebe aus Kollagen und Kohlenhydraten. In ihr ist viel Wasser gebunden und die Oberfläche ist mit 60 Å großen Poren sehr rau.<sup>9</sup> Weiterhin ist bekannt, dass die Knorpelschicht mit PLs bedeckt ist, welche in Form von Oligo- bzw. Multilagen adsorbiert vorliegen.<sup>10-11</sup> Eine schematische Anordnung der Kompartimente innerhalb eines Gelenks ist in Abb. 2.1 zu sehen. Der Mechanismus des reibungsarmen Ablaufs von Gelenkbewegungen ist bis heute noch nicht geklärt, wohl aber ist sicher, dass die Gelenkflüssigkeit und die Lipide eine große Rolle spielen.

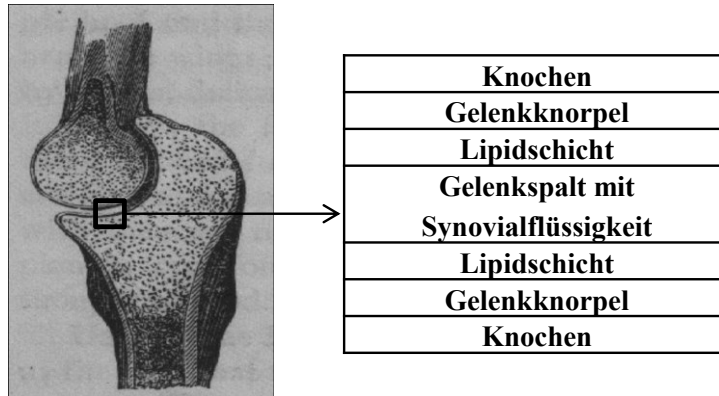


Abb. 2.1: Skizze eines Scharniergelenks (Ellbogen)<sup>12</sup> und schematische Darstellung eines Gelenks. Im Gelenkspalt befindet sich die Synovialflüssigkeit. Die Knochen sind von einer Knorpelschicht umgeben, welche wiederum mit einer Lipidschicht bedeckt ist.

## 2.1.2. Modelle zur Beschreibung der Schmierung in Gelenken

Als Schmierung wird die Reduktion von Reibung und damit von Verschleiß zwischen zwei Teilen bezeichnet. In Abhängigkeit von der Dicke des Schmierfilms wird bei klassischen Werkstoffen zwischen Flüssigfilm- und Grenzflächenschmierung unterschieden.<sup>13</sup> Mit zunehmender Relativgeschwindigkeit brechen Kontaktstellen der Oberflächen auf und es erfolgt der Übergang von der Grenzflächen- zur Flüssigfilmschmierung. Letztere tritt auf, wenn der Film dicker als die maximale Höhe der Oberflächenunebenheiten ist. In solch einem System ist der Reibungskoeffizient<sup>i</sup>  $\mu$  abhängig von der Viskosität des Schmiermittels  $\eta$  und die Reibungskraft  $F_R$  kann über die Navier-Stokes Gleichung beschrieben werden:<sup>14</sup>

$$F_R = \mu F_N = \frac{A}{d} \eta v \quad (2.1)$$

$F_N$  steht dabei für die Normalkraft, welche senkrecht zu den Oberflächen steht.  $A$  bezeichnet die Fläche der Kontaktebenen und  $d$  den Abstand der beiden Flächen zueinander.  $v$  steht für die Geschwindigkeit mit der sie sich gegeneinander bewegen. Dabei wird von laminarer Strömung ausgegangen, welche für dünne Filme vorliegt. Außerdem gilt die Gleichung nur für Newtonsche Flüssigkeiten, welche von der Scherrate unabhängiges Viskositätsverhalten zeigen.

Ein Stribeck-Diagramm zeigt die Abhängigkeit der Reibungskoeffizienten von der Geschwindigkeit der gegeneinander reibenden Flächen (s. Abb. 2.2). Bei höheren Gleitgeschwindigkeiten liegt die eben vorgestellte Flüssigfilmschmierung (hydro-

<sup>i</sup> Der Reibungskoeffizient ist ein Maß für die Reibungskraft in Abhängigkeit zur Anpresskraft und ist eine dimensionslose Größe.



dynamische Schmierung) vor. Bei Zunahme der Geschwindigkeit steigt die Reibung linear, da die internen Reibungen des Schmiermittels berücksichtigt werden müssen.<sup>14</sup>

Bei geringer Gleitgeschwindigkeit bricht die hydrodynamische Schmierung zusammen und an ihre Stelle tritt die Grenzflächenschmierung (s. Abb. 2.2). Die Reibungskoeffizienten steigen dabei typischerweise um einen Faktor von 100, trotz allem ist dieser Wert immer noch geringer als bei Reibung ohne Schmiermittel, da ein molekularer Film auf den Grenzflächen für Schmierung sorgt. Anstelle der Viskosität ist nun die chemische Beschaffenheit der Grenzflächen von Bedeutung.<sup>14</sup>

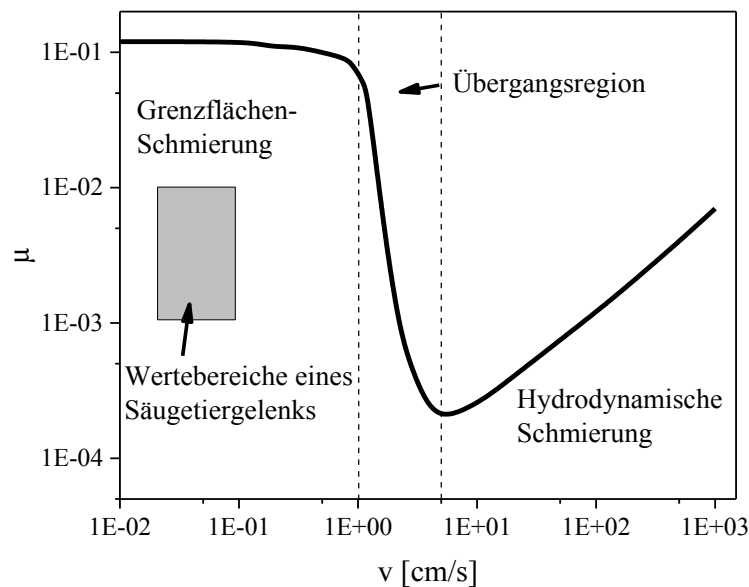


Abb. 2.2: Klassisches Stribeck-Diagramm. Der Reibungskoeffizient  $\mu$  ist in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit dargestellt.<sup>14</sup> Der Wertebereich für ein Säugetiergelenk ist gemäß der Literatur gekennzeichnet.<sup>7</sup>

Dass dieser Ansatz für klassische Werkstoffe nicht gänzlich auf ein natürliches Gelenk übertragbar ist, zeigt sich am Reibungskoeffizienten, welcher für gesunde Gelenke ermittelt wurde. Bei typischen Geschwindigkeiten kleiner 1 cm/s sollte eine Grenzflächenschmierung vorliegen, jedoch wurden Koeffizienten zwischen 0.002 und 0.006 gefunden.<sup>7</sup> Damit sind diese um einen Faktor von 100 geringer als erwartet. Diskutiert wird, ob es sich bei der Gelenkschmierung trotz der zu geringen Geschwindigkeit um eine hydrodynamische Schmierung handelt oder ob es ein Grenzflächenschmiermittel gibt, welches den Koeffizienten drastisch reduzieren kann.<sup>7</sup> Denkbar wäre es, dass die klassischen Vorstellungen modifiziert werden müssen und so gibt es mehrere erweiterte Modelle zum Mechanismus der Schmierung in natürlichen Gelenken.

Eine veränderte Theorie der hydrodynamischen Schmierung liefern McCutchen *et al.* mit dem Prinzip der nassen Schmierung („weeping lubrication“).<sup>15</sup> Dabei wird während der Bewegung die Synovialflüssigkeit aus dem Knorpel gepresst und fungiert als Flüssigfilm.

Die Grenzflächenschmierung hingegen wurde von Dowson *et al.* mit der Theorie der verstärkten Schmierung („boosted lubrication“) erweitert.<sup>16</sup> Hierbei wird angenommen, dass bei Belastung der Gelenke Wasser in den Knorpel gezogen wird, sodass sich die Konzentration der Schmierstoffe erhöht.

Es sind auch Kombinationen aus Flüssigfilm- und Grenzflächenschmierung denkbar. Doch über den genauen Mechanismus der Gelenkschmierung ist bisher noch keine Einigkeit erzielt. Vor allem darüber, ob es sich um eine Flüssigkeitsschmierung oder eine Grenzflächenschmierung handelt, wird bislang kontrovers diskutiert.<sup>7-8,17-18</sup> Bekannt ist, dass das Gelenk eines Säugetiers auch unter Drücken bis zu mehreren 10 bar und bei Scherraten bis  $10^7 \text{ s}^{-1}$  eine gute Schmierung mit Reibungskoeffizienten zwischen 0.001 und 0.01 gewährleisten kann.<sup>8</sup>

### 2.1.3. Gelenkerkrankungen und Therapien

Um Rückschlüsse auf die Funktionsweise der Schmierung eines Gelenkes zu erhalten, lohnt es sich Krankheitserscheinungen, bei denen die Gelenkbewegung beeinträchtigt ist, zu betrachten.

Hierzu zählen vor allem die entzündliche Gelenkerkrankung Arthritis und die nicht-entzündliche Arthrose, welche allgemein auf einer degenerativen Veränderung des Knorpels beruht. Für diese Arbeit interessant ist demnach vor allem die Arthrose, welche nicht durch eine Entzündung hervorgerufen wird, sondern durch eine grundsätzliche Änderung im Aufbau des Gelenks entsteht. Die degenerative Veränderung führt zu einer Erhöhung der Reibung und damit zu weiterem Abrieb an den Gelenken. In der Altersgruppe zwischen 55 bis 64 Jahren sind bereits 40 % der männlichen und 60 % der weiblichen Bevölkerung an Arthrose erkrankt.<sup>19</sup> Dabei kann jedes Gelenk von Arthrose betroffen sein, wobei vor allem Finger-, Hand-, Knie- und Hüftgelenke anfällig sind.<sup>19</sup> Arthrose kann sowohl symptomlos als auch mit großen Schmerzen verbunden auftreten.

Bislang kann Arthrose nicht geheilt werden, sondern lediglich therapiert. Dabei beschränken sich die durch die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft belegten Formen auf die Wirksamkeit von Analgetika, welche lediglich symptomatisch wirken, und die Funktionsverbesserung und die Verlangsamung der degenerativen Gelenkveränderung durch Krankengymnastik oder ähnlichem. Es gibt auch bereits Hinweise auf eine mögliche Schmerzlinderung durch Akkupunktur.<sup>20</sup>

Eine Wiederherstellung der schmerzfreien Gelenkbewegung ist jedoch bislang nur durch operativen Gelenkersatz möglich. Vor allem bei Knie- und Hüftgelenken kommen solche Endoprothesen zum Einsatz. Diese Prothesen reichen nicht an die Möglichkeiten eines gesunden, natürlichen Gelenks heran. Schon der Aufbau bedingt eine schnelle Abnützung

der künstlichen Gelenke. Die Gelenkkugel besteht meist aus Edelstahl und die Pfanne aus einem Kunststoff. Beide Kompartimente reiben gegeneinander, sodass nach 10 bis 15 Jahren das Implantat so beschädigt ist, dass es ausgetauscht werden muss.<sup>21</sup> Die in natürlichen Gelenken im Gelenkspalt befindliche Synovialflüssigkeit, welche in vielen Theorien die Schmierung im Gelenk ausmacht, wurde in Implantaten bislang nicht nachempfunden.

Durch Beschichtung der Endoprothesen soll eine reibungsarme Gelenkbewegung möglich gemacht werden. Es gibt bereits Arbeiten, welche durch Beschichtung mit Poly(vinylalkohol)acrylamiden oder mit dem biokompatiblen PL 2-Methacryloyloxyethylphosphocholin eine Reduktion der Belastung und der Schäden an den Implantaten erzielen können.<sup>22-23</sup> Ein weiteres Experiment beschreibt die Beschichtung von Titanoberflächen mit Lipidlagen.<sup>24</sup> Die Idee der Verbesserung von Implantaten mittels einer künstlichen Synovialflüssigkeit wurde bereits patentiert.<sup>25</sup>

Trotz der Möglichkeit der weiteren Verbesserung der Endoprothesen und ihrer bisherigen Erfolge als Gelenkersatz, wäre es wünschenswert das natürliche Gelenk zu erhalten und wieder funktionstüchtig zu machen. Daher wird nach einer nicht-operativen Behandlungsform geforscht, welche die volle Funktionalität des erkrankten Gelenks wiederherstellen kann. Dabei halfen Studien an Gelenken, welche zeigten, dass das Volumen der Synovialflüssigkeit bei Erkrankung zu, die Konzentration und das Molekulargewicht (MW) der darin enthaltenen HS jedoch abnimmt.<sup>2-4</sup> Bislang wird angezweifelt, ob die abnehmende Konzentration der HS einen Einfluss auf die Schmierung im Gelenk hat.<sup>26</sup>

Um dem Konzentrationsverlust an HS in Gelenken entgegenzuwirken, kann HS ins Gelenk injiziert werden. Diese Idee wird von der sogenannten Viskosupplementation aufgegriffen.<sup>27-29</sup> Der Nutzen einer solchen intraartikulären Injektion wird jedoch kontrovers diskutiert.<sup>30</sup> Eindeutig von Nachteil ist die kurze Halbwertszeit der HS im Gelenk von einem Tag, welche eine mögliche therapeutische Wirkung nur für kurze Dauer zulässt.<sup>31</sup> Untersuchungen zur Bedeutung von Konzentration, MW und Behandlungsdauer kommen zu teils unterschiedlichen Ergebnissen und auch eine signifikante Verbesserung in der Gelenkbewegung erkrankter Gelenke durch Viskosupplementation von HS gegenüber von Placebo-Behandlungen konnte bislang nicht immer nachgewiesen werden.<sup>32-35</sup> Wohl aber gibt es auch Studien, die Erfolge mit der Viskosupplementation aufzeichnen.<sup>33,36-37</sup> Neuere Untersuchungen ergaben, dass bei Zugabe von HS und oberflächenaktiven PLs, welche in natürlichen Gelenken sowohl auf dem Knorpel als auch in der Gelenkflüssigkeit zu finden sind, ein besserer Schutz gewährleistet ist als bei einer Viskosupplementation mit reiner HS.<sup>38-39</sup> Dies deckt sich mit der Annahme von Hills und Gale, dass neben der HS auch PLs eine große Rolle in der Gelenkschmierung spielen.<sup>5-7</sup>

## 2.2. Modellsystem Gelenk

Zur Untersuchung der Hintergründe einer möglichen Therapiewirkung der Viskosupplementation wurde für diese Arbeit ein simples physikalisches System benötigt. Hauptaugenmerk sollte auf der HS, welche während der Behandlung intraartikulär verabreicht wird, und den PLs liegen, die die Knorpelschicht bedecken und im Krankheitsverlauf der Arthrose allmählich abgebaut werden. In diesem Abschnitt sollen die einzelnen Komponenten vorgestellt, die Zusammensetzung des verwendeten Modells beschrieben und schon bekannte Wechselwirkungen aufgezeigt werden.

### 2.2.1. Phospholipid (PL)

Vor allem in Biomembranen, welche als Trennschichten in Organismen wirken, finden sich PLs. Daher werden ihre Doppelschichten zur Simulierung von biologischen Membranen verwendet und sind demnach häufig Gegenstand der aktuellen Forschung.<sup>40</sup> Grundlegendes zu den PLs wurde der Literatur entnommen.<sup>41-43</sup> Charakterisierend für PLs ist, dass sie amphiphil<sup>ii</sup> sind und in wässrigen Lösungen unterschiedliche Strukturen, abhängig von der Art des PL und dem Wassergehalt der Dispersion, ausbilden können. Neben der Doppelschicht einer Biomembran ist auch die Bildung von Mizellen und Liposomen (Vesikel; sowohl uni- als auch multilamellare) möglich (s. Abb. 2.3).

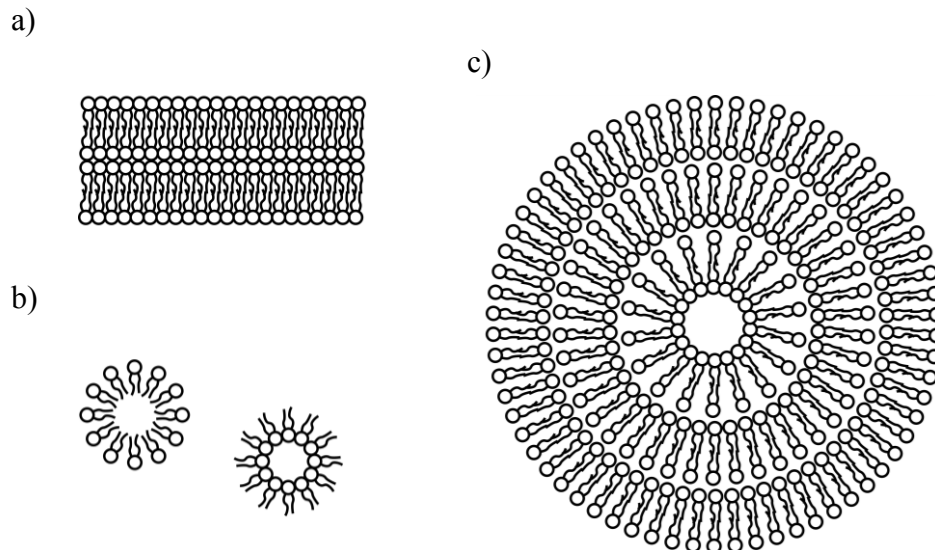


Abb. 2.3: Mögliche Strukturen der PLs in wässriger Lösung. a) Zwei Lipiddoppelschichten übereinander, b) Mizellen und c) multilamellare Vesikel.

---

<sup>ii</sup> Amphiphil bezeichnet die chemische Eigenschaft sowohl hydrophile als auch lipophile Anteile zu besitzen. Phospholipide setzen sich dabei aus hydrophilem Kopf- und hydrophobem Kettenanteil zusammen.

## Theoretischer Teil

Die Bildung solcher Strukturen ist auf den hydrophoben Effekt zurückzuführen. Prinzipiell basiert er auf entropischen Betrachtungen in denen die starken Wasserstoffbrücken-Bindungen von Wasser eine Rolle spielen.<sup>44</sup>

Grundlegend können die PLs gemäß ihres chemischen Aufbaus in zwei Gruppen unterteilt werden; die Phosphoglyceride besitzen Glycerin als Grundbaustein, während die Sphingomyeline von Sphingosin abgeleitet werden können (s. Abb. 2.4). Das DPPC zählt hierbei zur ersten Gruppe (s. Abb. 2.5) und konnte in der Gelenkflüssigkeit mit einem Anteil von 45 % am gesamten PL-Gehalt nachgewiesen werden.<sup>45</sup> Die Kopfgruppe enthält eine Cholin-Gruppe, während die Reste  $R_1$  und  $R_2$  von der Palmitinsäure abgeleitet werden.

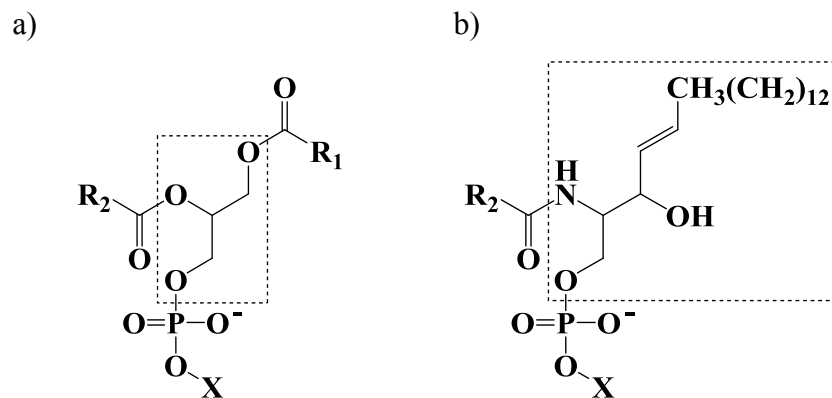


Abb. 2.4: a) Glycerophospholipide und b) Sphingophospholipide. Die Grundstrukturen Glycerin und Sphingosin sind umrahmt.

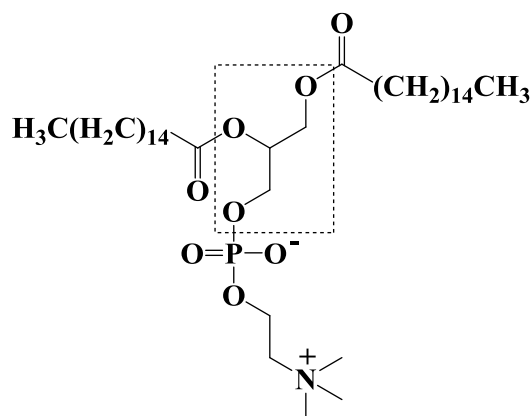


Abb. 2.5: Struktur von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC). Die Glycerin-Grundstruktur ist umrahmt.

Solche Phosphatidylcholone bilden bei einem Wassergehalt kleiner als 30 Gew.-% lamellare Phasen aus parallel übereinandergestapelten Doppelschichten aus. Bei Erhöhung des Gehalts entsteht eine heterogene Dispersion aus geschlossenen, multilamellaren Strukturen, welche bei einem Wasseranteil von über 95 Gew.-% zu multilamellaren Vesikeln übergehen. Nach Ultraschallbehandlung werden unilamellare Vesikel erhalten. Es existieren auch nichtlamellare lyotrope<sup>iii</sup> Zustände, auf die hier aber nicht weiter eingegangen wird.

Ein weiterer Polymorphismus zeigt sich bei Änderung der Temperatur (s. Abb. 2.6).<sup>46-47</sup> Bei niedrigen Temperaturen liegt die  $L_{\beta}$ -Phase vor. Sie ist gelartig und zeigt eine eindimensionale lamellare Anordnung, in der die Kohlenstoffketten gestreckt in *trans*-Konformation vorliegen. Sie sind dabei um  $30^{\circ}$  gegen die Membran geneigt. Die langreichweitige zweidimensionale Ordnung bedingt eine Anordnung der Lipide in einem quasi-hexagonalen Gitter. Ähnliches gilt bei leicht höheren Temperaturen für die gelartige  $P_{\beta}$ -Phase deren Kohlenstoffketten sich im Winkel von  $30^{\circ}$  -  $50^{\circ}$  gegen die Membran neigen. Die Überlagerung einer lateralen wellenartigen Anordnung führt zur Ausbildung einer „Ripple-Struktur“. Die Lipide sind in einem hexagonalen Gitter angeordnet. Beide Phasen werden als Gelphasen bezeichnet, während die  $L_{\alpha}$ -Phase bei hohen Temperaturen die flüssigkristalline-Phase darstellt. Die Kohlenstoffketten weisen hier eine hohe Beweglichkeit auf und sind nicht mehr gestreckt. Die Dicke der Doppelschicht ist im Vergleich zu den Gelphasen geringer. Beim Phasenübergang von  $L_{\beta}$  zu  $P_{\beta}$  handelt es sich nur um eine Vorumwandlung, während der Hauptphasenübergang in der Umwandlung zu  $L_{\alpha}$  zu finden ist. Die Phasenübergänge sind für verschiedene Lipide abhängig von der Struktur der Kopfgruppe, von der Länge und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoff-Ketten und für geladene Lipide auch von pH-Wert und der Ionenstärke.

Das Phasendiagramm von 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) in Abhängigkeit des Wassergehalts und der Temperatur ist in Abb. 2.6 zu sehen. Mit zunehmendem Wassergehalt sinkt die Übergangstemperatur bis ein Grenzwert bei etwa 25 - 30 Gew.-% Wasser erreicht wird. Die Wasserbindungskapazität ist an diesem Punkt erschöpft und es kann keine weitere Wasseranlagerung an die Kopfgruppen der Lipide erfolgen.

Für DPPC konnten in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 50 °C zwei Phasenübergänge beobachtet werden. Die Änderung der spezifischen Wärmekapazität und der Enthalpie in Abhängigkeit von der Temperatur sind in Abb. 2.7 dargestellt.<sup>48</sup> Bei etwa 34 °C erfolgt eine Vorumwandlung, während bei 42 °C der Hauptphasenübergang stattfindet. Da für die Messungen dieser Arbeit auch das Verhalten der Lipide am Phasenübergang untersucht werden sollte, wurde statt des DPPC das DMPC verwendet. Mit einer Hauptphasenübergangstemperatur von etwa 24 °C liegt diese im Bereich der

---

<sup>iii</sup> Als lyotrop bezeichnet man Stoffe, welche in Abhängigkeit des Lösungsmittels verschiedenes Verhalten zeigen können.

# Theoretischer Teil

Raumtemperatur und ist somit bei der experimentellen Durchführung leichter zu kontrollieren. Dieses Lipid unterscheidet sich im Aufbau von DPPC nur in der Länge der Kohlenstoff-Ketten (s. Abb. 2.8) um jeweils 2  $\text{CH}_2$ -Einheiten.

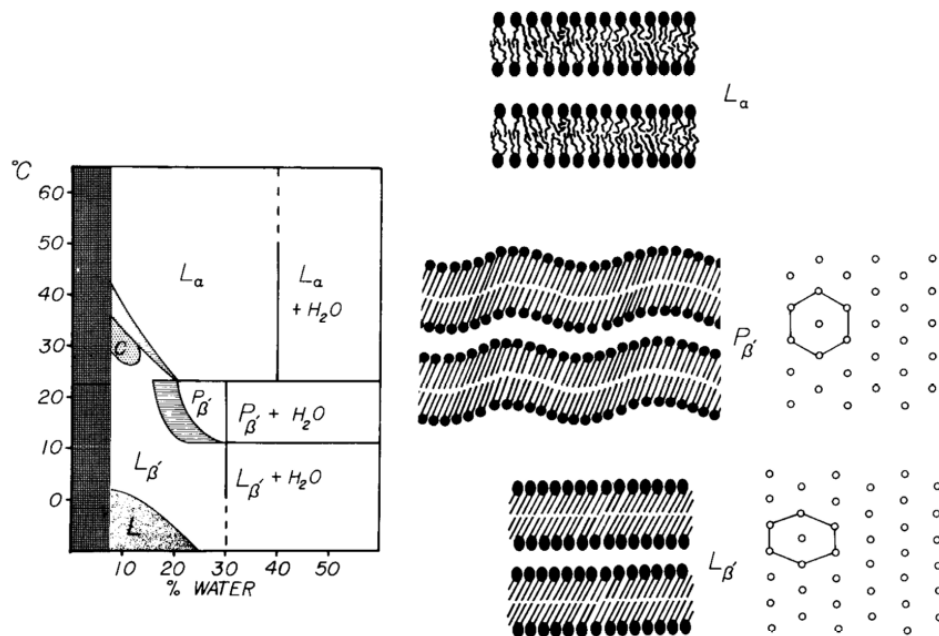


Abb. 2.6: Phasendiagramm von DMPC in Abhängigkeit des Wassergehalts und der Temperatur. Die Abbildung wurde der Literatur entnommen.<sup>47</sup>

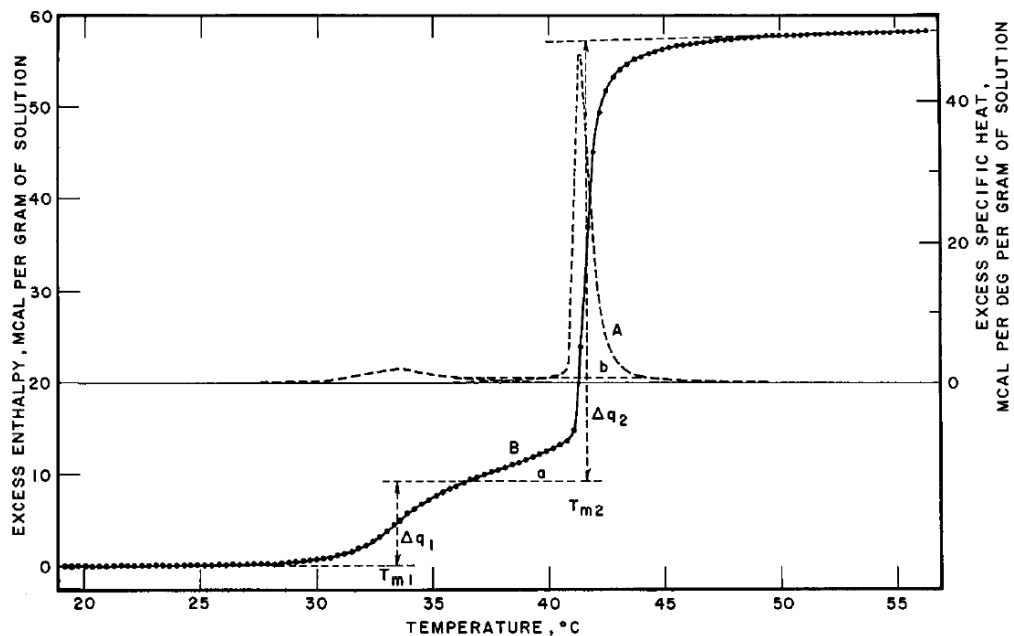


Abb. 2.7: Dynamische differenzkalorimetrische Messungen an DPPC. Die gestrichelte Linie zeigt die Änderung der spezifischen Wärmekapazität und die durchgezogene Linie stellt die Änderung der Enthalpie dar. Die Abbildung wurde der Literatur entnommen.<sup>48</sup>

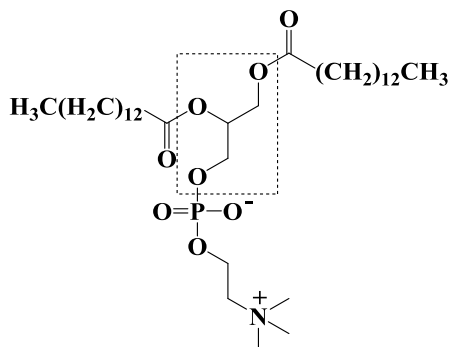


Abb. 2.8: Strukturformel von DMPC. Die Glycerin-Grundstruktur ist umrahmt.

In dieser Arbeit wurden Oligolagen verwendet. Sie setzen sich aus mehreren übereinander gestapelten Bilagen zusammen. Eine physikalische Beschreibung von Oligoschicht-Systemen kann über die DLVO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) erfolgen. Betrachtet wird das Gleichgewicht zwischen den Hydratationskräften, welche durch eine kurzreichweitige Abstoßung der hydratisierten Kopfgruppen entstehen, und den attraktiven Van-der-Waals-Kräften.<sup>49-50</sup> Hinzu kommen repulsive, thermodynamische Fluktuationen<sup>51</sup> und bei geladenen Molekülen noch repulsive, elektrostatische Kräfte.<sup>52</sup> Näher behandelt wird die DLVO Theorie in 2.2.5.

Mit steigender Temperatur nehmen die repulsiven Kräfte durch thermodynamische Fluktuationen zu und es kann ein Ablösen der Schichten festgestellt werden. Dabei kann je nach System zwischen symmetrischen und asymmetrischen Lipidstapeln unterschieden werden.<sup>50</sup> Letzteres liegt vor, wenn die Lagen festkörpergestützt aufgebracht wurden. Die Ablösetemperatur ( $T_U$ ) ist dabei abhängig vom Abstand der jeweiligen Schicht vom Substrat. Für hohe Schichtdicken ist der Unterschied zwischen den Temperaturen gering, sodass die Ablösung diskontinuierlich erscheint.<sup>49</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass sich festkörpergebundene Lipidlagen ab einer bestimmten Temperatur von der Oberfläche ablösen. Dabei herrscht bislang Uneinigkeit über den Mechanismus und die exakte Ablösetemperatur. Während Vogel *et al.* von einem beginnenden Prozess ab 95 °C berichteten,<sup>53</sup> wurde in anderen Arbeiten eine Ablösetemperatur nahe des Hauptphasenübergangs festgestellt.<sup>54-56</sup> Auch Pozo-Navas *et al.* konnten ein Ablösen der Lipide nahe dieser Temperatur feststellen, beobachtete aber zeitgleich, dass der Prozess durch Temperaturniedrigung reversibel ist.<sup>57</sup> Vermutet wird eine kinetische Hemmung, denn die Ablösetemperatur scheint abhängig von der Zahl der adsorbierten Bilagen und der Heizrate zu sein.<sup>58-60</sup> Pabst *et al.* zweifelten dabei an, dass das System für derartige Untersuchungen geeignet ist, da nicht klar ist, ob es im thermischen Gleichgewicht vorliegt.<sup>60</sup>

Seit den 1980er Jahren wurden neben der HS auch Lipide als wichtige Parameter in der Gelenkschmierung untersucht. Im Gelenk konnte vorwiegend das zwitterionische DPPC gefunden werden. Der Hauptphasenübergang ist bei 42 °C, das heißt im menschlichen Körper liegt das Lipid in der Gel- und nicht in der Flüssigphase vor. Ein Versuch von



Little *et al.* zeigt deutlich, dass das Lipid einen Einfluss auf die Schmierung im Gelenk hat. Sie vermaßen die Reibung zwischen jeweils gereinigten und Lipid-bedeckten Knorpeln und stellten fest, dass bei ersteren die Reibung um 150 % im Vergleich zu dem intakten Knorpel anstieg.<sup>61</sup> Hill berechnete für die Bedeckung der Knorpel 6 - 7 Lipidmonolagen die übereinander gestapelt liegen. Diese Lipid-Oligolagen sollen bei der Schmierung der Gelenke einen entscheidenden Einfluss haben.<sup>10-11</sup> In der Synovialflüssigkeit gesunder Gelenke beträgt die Lipidkonzentration nur 0.15 g/L und steigt für kranke Gelenke auf 1 g/L.<sup>62</sup> Es wird angenommen, dass die Erhöhung der Konzentration auf ein Ablösen der Schichten von der Knorpeloberfläche zurückzuführen ist.<sup>63</sup>

## 2.2.2. Hyaluronsäure (HS) und Polyelektrolyte (PEs) als Ersatzstoffe

Da HS neben den PLs eine wichtige Rolle bei der Gelenkbewegung spielt, wird sie bei der Viskosupplementation intraartikulär gespritzt und soll die Funktionalität des Gelenks wiederherstellen. HS ist ein Polysaccharid bestehend aus Monomereinheiten, welche durch eine 1,3-glycosidische Bindung von *D*-Glucuronsäure mit *N*-Acetyl-*D*-glucosamin (s. Abb. 2.9) gebildet werden. Für wissenschaftliche Zwecke gewonnen wird HS noch heute durch die von Lowther und Rogers 1955 beschriebene biotechnologische Methode HS durch Streptokokken-Bakterien herzustellen.<sup>64</sup>

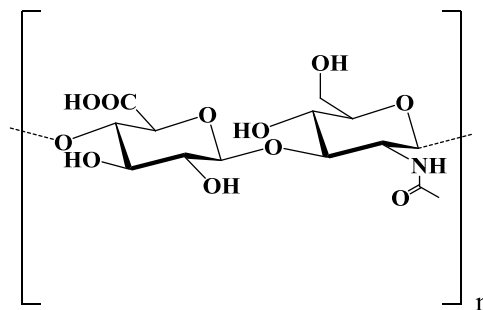


Abb. 2.9: Monomereinheit der HS. Sie besteht aus einer 1,3-glycosidischen Bindung von *D*-Glucuronsäure mit *N*-Acetyl-*D*-glucosamin.

Für die Synovialflüssigkeit wurde eine durchschnittliche Konzentration an HS von 2.85 g/L, und ein Volumen von 0.2 bis 1 mL pro Gelenk bestimmt.<sup>4,65</sup> Erkrankte Gelenke zeigten eine Zunahme des Volumens der Flüssigkeit und eine Abnahme der HS-Konzentration.<sup>4</sup> Auch eine Reduktion des MW in erkrankten und alten Gelenken konnte festgestellt werden,<sup>66-67</sup> jedoch besteht die Annahme, dass die Konzentration einen größeren Einfluss auf die Schmierung nimmt.<sup>2</sup> HS liegt mit einem  $pK_s$ -Wert der Carboxylgruppe von 3.21<sup>68</sup> im physiologischen pH-Bereich (7.4 - 7.8) in dissoziierter Form negativ geladen vor und besitzt seinen isoelektrischen Punkt bei pH 8.6.<sup>69</sup> *In vivo* handelt es sich daher um ein Polyanion.

## Theoretischer Teil

Mit der physikalischen Chemie der HS setzten sich Balazs *et al.* auseinander.<sup>4,68</sup> Sie reinigten HS zunächst von Proteinen, bestimmten das MW der HS auf zwischen  $5 \cdot 10^4$  bis  $8 \cdot 10^6$  Da und untersuchten das nicht-Newtonsche-Verhalten der Lösungen. Sie fanden, dass sich HS-Moleküle bei Einwirkung von Scherkräften strecken und dass dieser Effekt mit steigendem MW zunimmt.

Neben der HS wurden in dieser Arbeit weitere PEs verwendet, welche durch Unterschiede in Ladung, MW, Gegenionen und molekularer Zusammensetzung Hinweise auf die Hintergründe der Wechselwirkung von DMPC-Oligolagen mit der HS liefern sollten. Die Monomere der verwendeten PEs sind in Abb. 2.10 dargestellt. Polyethylenimin (PEI) und Polyallylaminhydrochlorid (PAH) liegen dabei mit  $pK_s$ -Werten von 7.1<sup>70</sup> bzw. zwischen 8 und 9<sup>71</sup> *in vivo* weitestgehend neutral bzw. positiv geladen vor, während die Polystyrolsulfonsäure als starker PE, dessen Dissoziationsgrad unabhängig vom pH-Wert ist, negativ geladen ist. Verwendet wurde das Natriumsalz der Polystyrolsulfonsäure (PSS).

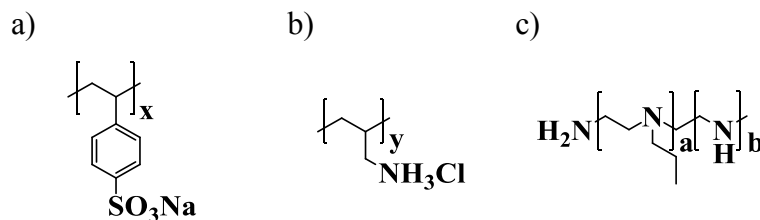


Abb. 2.10: Strukturformeln der Monomere der polymeren Ersatzstoffe für HS. Dargestellt sind a) das Natriumsalz der Polystyrolsulfonsäure (PSS), b) das Polyethylenimin (PEI) und c) das Polyallylaminhydrochlorid (PAH).

Bei diesen Verbindungen handelt es sich einschließlich der HS um Polymere. Eine schwach geladene Polymerkette liegt gestreckt vor. Beschrieben werden kann diese über das Knäuelmodell.

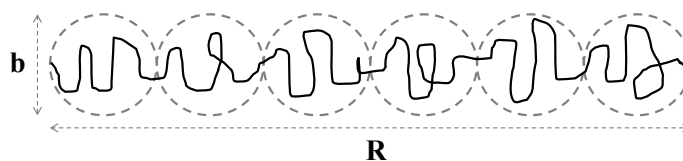


Abb. 2.11: Darstellung des Knäuel-Modells eines Polymers.

Diese Kette setzt sich aus Knäulen, sogenannten „Blobs“, mit Durchmesser  $b$  zusammen. Unter der Annahme von kugelförmigen Monomeren als Blobs kann bei Kenntnis über die Dichte  $\rho$  und das Molekulargewicht  $M_W$  des Monomers der Durchmesser  $b$  wie folgt berechnet werden:

$$b = \sqrt[3]{\frac{3M_W}{4\pi\rho N_A}} \cdot 2 \quad (2.2)$$

Die Konturlänge  $R$  ergibt sich dann aus der Multiplikation des Durchmessers  $b$  mit der Monomeren-Anzahl  $N$ .

Bei den hier verwendeten Polymeren handelt es sich um PEs. Jedes Monomer steuert dabei ein Gegenion bei. Durch die Erhöhung der Ionenstärke der Lösung wird die Abschirmlänge kleiner und die nun abgeschirmten elektrostatischen Repulsionen können nicht mehr zur vollständigen Streckung der Kette führen. Die Kette liegt geknäuelte vor. Die Persistenzlänge beschreibt hierbei die Anzahl der Blobs, über welche das Polymer gestreckt vorliegen kann. Sie ist damit ein Maß für die Polymer-Steifigkeit. Die effektive Persistenzlänge  $l_{eff}$  beinhaltet neben dem elektrostatischen  $l_{OSF}^{iv}$  auch den sterischen Anteil  $l_0$  des ungeladenen Polymers:

$$l_{eff} = l_0 + l_{OSF} \quad (2.3)$$

Die sterische Persistenzlänge entspricht dabei dem Monomer-Durchmesser  $b$ , während der elektrostatische Teil folgendermaßen ermittelt werden kann:<sup>72</sup>

$$l_{OSF} = \frac{\lambda_B \tau^2}{4\kappa^2} \quad (2.4)$$

Hierin bezeichnet  $\lambda_B$  die Bjerrum-Länge<sup>v</sup>,  $\tau$  die Ladungsdichte bestimmt durch den Polymerisierungsgrad der Monomere und ihrer Größe und  $\kappa^{-1}$  die Abschirmlänge. Letztere gibt an, ab wann das elektrische Potential einer Ladung auf das 1/e-fache abgefallen ist. Für ein monovalentes Salz in Wasser bei 25 °C gilt:<sup>14</sup>

$$\kappa^{-1} = 3.04 \text{ \AA} / \sqrt{I \left( \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right)} \quad (2.5)$$

---

<sup>iv</sup> Der elektrostatische Anteil  $l_{OSF}$  wurde nach Odijk, Skolnick und Fixman bestimmt.

<sup>v</sup> Die Bjerrum-Länge bezeichnet den Abstand zweier Ladungen, für den die elektrostatische Energie vergleichbar mit der thermischen Energie ist.

$I$  steht dabei für die Ionenstärke der Lösung. Sie ist eine zentrale Größe in der Debye-Hückel-Theorie, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen von Ionen in Elektrolytlösungen beschreibt. Die Ionenverteilung ist in Lösungen nicht regelmäßig wie in einem Ionengitter. Dies führt zur Ausbildung von entgegengesetzt geladenen Ionenwolken um eine Ladung. Diese Coulombschen Anziehungs- und Abstoßungskräfte bewirken, dass die Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkung in einer Lösung je nach Abschirmung der Ladungen variiert.

Der PE wird nun als Lösung von kleinen Polymerstückchen der Länge  $l_{eff}$  und des Durchmessers  $d_{p0}$  betrachtet. Ihre Wechselwirkung untereinander kann nun gemäß Netz und Andelman<sup>72</sup> mit deren jeweiligen zweiten Virialkoeffizienten  $v_2$  beschrieben werden:

$$v_2 \sim l_{eff}^2 d_{p0} \quad (2.6)$$

Bei geringer Ionenstärke können die Durchmesser der geladenen Polymere gleich der Abschirmlänge gesetzt werden. Damit lässt sich der End-zu-End-Abstand  $R_E$  der Polymere wie folgt berechnen:

$$R_E \sim \left( \frac{v_2}{l_{eff}} \right)^{1/5} (bN)^{3/5} \sim (\kappa^{-1})^{2/5} (bN)^{3/5} \quad (2.7)$$

Eine Besonderheit zeigen stark geladene PEs. Die sogenannte Manning-Kondensation beschreibt die Kondensation von Gegenionen auf dem Polymer bei geringen Konzentrationen.<sup>73</sup> Sie tritt ein, wenn der Abstand geladener Monomere  $l_{charge}$  geringer wird als die Bjerrum-Länge. Ist dies der Fall so überwiegen die attraktiven Coulombkräfte  $\Gamma$  die thermodynamischen Fluktuationen und es tritt Kondensation ein. Dadurch kommt es zur erhöhten Ladungsabschirmung, welche dem Quellprozess entgegenwirkt.

$$\Gamma = \frac{\lambda_B}{l_{charge}} > 1 \quad (2.8)$$

Für Monomerabstände zwischen 5 und 10 Å der hier verwendeten PE entspricht das Verhältnis der Längen etwa 1. Daher kann der Effekt vernachlässigt werden.

## 2.2.3. Aufbau eines Modellsystems

Um Einblick in die Wirkungsweise der Viskosupplementation zu erlangen, sollten die Wechselwirkungen der eben vorgestellten HS und der polymeren Ersatzstoffe mit den PLs untersucht werden. Hierzu wurde ein im Aufbau möglichst einfaches, reproduzier- und mit gängigen Methoden charakterisierbares System benötigt, welches näherungsweise dem natürlichen Gelenk entspricht.

Gewählt wurde, basierend auf den Überlegungen von Hills,<sup>10-11</sup> ein festkörpergestütztes Oligolagen-Lipid-System, welches die eine Seite des Gelenks repräsentieren soll (s. Abb. 2.12). Das häufigste Lipid in Gelenken ist das DPPC, welches jedoch aufgrund der Überlegungen in 2.2.1 durch DMPC ersetzt wurde. Da der Schwerpunkt der Experimente auf der Wechselwirkung zwischen HS und PL lag, wurde auf eine Knorpel-Schicht verzichtet, da letztere ohnehin von den Lipiden bedeckt wäre. Möchte man eine Knorpel-Schicht einführen, so wäre es nahezu unmöglich eine ausreichend dünne und glatte Schicht aufzubringen, welche der natürlichen entspräche. Verwendet werden könnte eine PE-Multischicht, welche wie auch der Knorpel einen hohen Wassergehalt von etwa 40 Vol.-% aufweist.<sup>74-75</sup> Als Substrat, den Knochen repräsentierend, wurde Silicium gewählt, welches für Reflexionsmessungen gut geeignet ist. Für Neutronen- und IR-Strahlung ist es im gewünschten Wellenlängenbereich durchlässig.

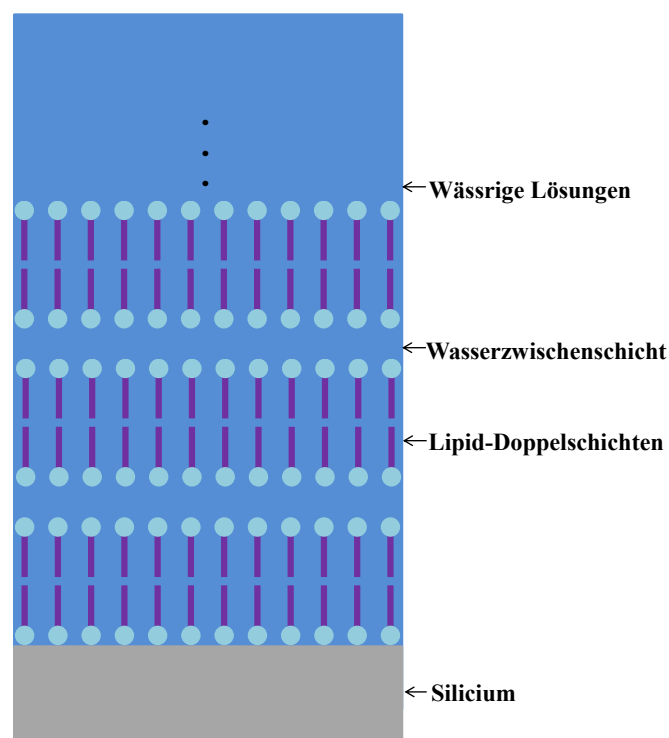


Abb. 2.12: Vereinfachtes Modellsystem eines Gelenkteils. Silicium repräsentiert den Knochen. Es ist wie in natürlichen Gelenken mit Lipid-Oligoschichten bedeckt, jedoch fehlt der Knorpel. Die Synovialflüssigkeit wird durch eine wässrige HS- oder PE-Lösung ersetzt.

Um die Wechselwirkung zwischen Lipidschichten und Synovialflüssigkeit zu untersuchen, wurde das System in verschiedenen wässrigen Lösungen inkubiert. Neben der in der Dissertation von Kreuzer untersuchten HS<sup>54</sup> sollten hier vor allem polymere Ersatzstoffe verwendet werden. Ein Vorteil der PEs gegenüber der HS liegt vor allem in der Gleichgewichtseinstellung. Während Kreuzer eine Dauer von bis zu 43 Tagen einplanen musste,<sup>54</sup> stellte sich bei der Zugabe der Ersatzstoffe ein Gleichgewicht innerhalb von 20 Minuten bis 2 Tagen ein.

Neben der Charakterisierung der Proben vor und nach der Inkubation, sollte auch die Stabilität der Systeme überprüft werden. Hierzu wurde eine Scherzelle verwendet, welche Scherraten zwischen 0 und 6000 rpm (Umdrehungen pro Minute) aufrechterhalten kann. Physiologische Scherraten eines Gelenks reichen von 150 °/Sekunde (25 rpm), welche im Knie während des Aufstehens erzeugt werden, bis hin zu 7400 °/Sekunde (1233 rpm) im Schultergelenk bei einem Aufschlag während eines Tennisspiels.<sup>76</sup>

### 2.2.4. Wechselwirkung zwischen Lipiden und Makromolekülen

HS und PL sind wichtige Bestandteile des natürlichen Gelenks und die reibungsarme Gelenkbewegung scheint durch sie unterstützt zu werden. Die Viskosupplementation beruht auf dieser Beobachtung und ihr therapeutischer Ansatz beinhaltet die intraartikuläre Injektion beider Stoffe. Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Lipiden und Makromolekülen ist damit ein wichtiger Bestandteil zur Aufklärung der Mechanismen während der Gelenkschmierung und damit auch der Wirkungsweise der Viskosupplementation.

Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen HS und PL konnten bereits in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden.<sup>77-81</sup> Dabei lag der Schwerpunkt der Experimente auf Wechselwirkungen von Lipid-Vesikeln mit HS. Ghosh *et al.* untersuchten diese unter anderem mittels Photometrie und fanden für Mischungen aus HS und DPPC eine Zunahme des HS-Radius bei Zugabe von DPPC.<sup>77</sup> Aus ihren Daten schlossen sie, dass DPPC an die hydrophoben Zentren der HS bindet. Auch Pasquali-Ronchetti *et al.* fanden Wechselwirkungen zwischen DPPC und HS.<sup>78</sup> Sie erhielten Unterschiede im Verhalten für verschiedene MWs. Verwendet wurde HS mit MWs zwischen 170 und 1900 kDa. Die geringeren MWs bewirkten einen Abbau der Liposome, während die größeren MWs eine Aggregation von DPPC und Ausbildung von Schichten induzierten. Eine weitere Arbeit mit DPPC-Liposomen zeigte supramolekulare Komplexe aus DPPC und HS. Aufgenommen wurden diese von Crescenzi *et al.* mit Hilfe eines Elektronenmikroskops.<sup>79</sup>

Die Versuche von Ionov<sup>80</sup> und Wieland<sup>81</sup> *et al.* wurden hingegen mit Monolagen durchgeführt. Während sich erstere vor allem mit geladenen Lipiden auseinandersetzten, verwendeten letztere das zwitterionische DPPC. Sie fanden ebenfalls Unterschiede im Wechselwirkungsverhalten für verschiedene HS-MWs. Während HS mit geringerem MW

sich eher zwischen die Kopfgruppen anlagert, adsorbiert HS mit höherem MW auf den Kopfgruppen.

Versuche mit Lipid-Oligoschichten bzw. -Multilagen und HS-Lösungen wurden bereits von Kreuzer *et al.* durchgeführt.<sup>54-55</sup> Sie fanden bei Kontakt mit HS-Lösungen (769 kDa) der Konzentration 3 g/L ein enormes Quellen der Schichten um das 3- bis 4-fache der Ausgangsschichtdicke in reinem Wasser. Ein Gleichgewicht konnte erst nach 43 Tagen erreicht werden. Das Quellen wurde auf ein Ausdehnen der wässrigen Zwischenschichten zurückgeführt (s. Abb. 2.13).

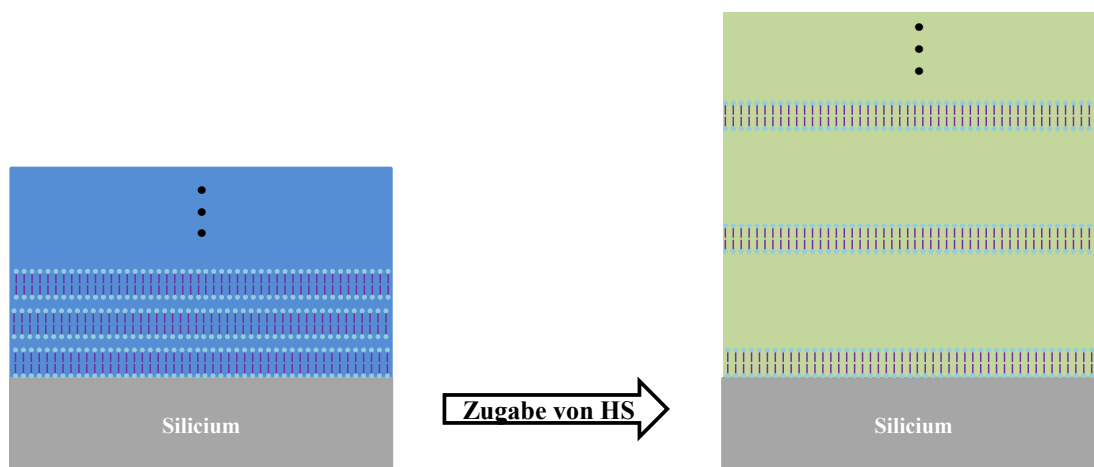


Abb. 2.13: Lipid-Oligoschichten nach Zugabe von Wasser (links) und wässrigen HS-Lösungen (rechts). Die HS bewirkt eine starke Quellung der Lipid-Schichten. Dies wurde auf ein Ausdehnen der wässrigen Zwischenschichten zurückgeführt.

Neutronendaten deuten darauf hin, dass neben dem Eindringen von Wasser auch HS eindringt und sich auf den Kopfgruppen anlagert. Eine dadurch ermöglichte Vernetzung der Lipidschichten könnte zur Bildung eines Hydrogels und damit zur Stabilisierung der Schichten beitragen. Nachweisen konnte er eine Anlagerung der HS auf den Lipid-Kopfgruppen.<sup>54-55</sup> Zudem konnte er gegenüber dem in reinem Wasser inkubierten System eine erhöhte Stabilität des Schichtsystems gegenüber Scherung, Drücken und Temperatur aufzeigen.<sup>54-55,82</sup> Von einer solchen Anlagerung und einer Stabilisierung von DPPC-Bilagen durch HS wurde auch in anderen Publikationen berichtet.<sup>81,83</sup>

Eine weitere Veröffentlichung von Kreuzer *et al.* bildet eine wesentliche Grundlage der vorliegenden Arbeit.<sup>84</sup> Dabei ersetzten sie HS durch PAH. Gefunden wurde ein mit HS und DMPC vergleichbares Quellverhalten. Der Ersatz von HS durch den PE PAH führte jedoch zu einem schnelleren Einstellen des Gleichgewichtszustandes und kann somit die benötigten Messzeiten enorm verkürzen.

Weitere durch Makromoleküle initiierte Lipid-Schichtdickenänderungen wurden auch für Pullulan beobachtet.<sup>85</sup> Hier zeigte sich jedoch eine Reduktion des Lamellenabstandes aufgrund der Tatsache, dass die Größe des Pullulans ein Eindringen in die Schichten

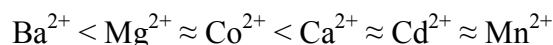
verhindert und dem System Wasser entzogen wird. Ähnliches beobachtete Mennicke, welche das Verhalten von DMPC-Multilagen mit Hilfe eines durch Polyethylenglycol (PEG) eingestellten osmotischen Drucks untersuchte.<sup>86</sup> Auch sie fand, dass mit Zunahme der PEG-Konzentration die Schichtdicken sinken. Ein Experiment mit dem negativ geladenen Lipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylserin (POPS) und PSS zeigte, dass auch elektrostatische Ladungen ein Eindringen von PSS in die Schichten verhindern können, obgleich der lamellare Abstand letzteres erlauben würde. Die Gegenionen des PSS ermöglichen die Stabilisierung der ansonsten instabilen POPS-Filme.<sup>86</sup>

Die Durchlässigkeit von Lipidfilmen konnte von Wong *et al.* nachgewiesen werden.<sup>87</sup> Er zeigte, dass das PEI DMPC-Doppelschichten überwinden kann und zwischen Substrat und Lipidschicht ein Polyelektrolytkissen ausbildet.

### 2.2.5. Wechselwirkung zwischen Lipiden und Ionen

Um dem Mechanismus des Quell- und Stabilisierungs-Verhaltens der Lipid-Oligolagen bei Kontakt mit den verschiedenen Makromolekülen auf den Grund zu gehen, sollten in dieser Arbeit deren Ladungen durch Zugabe von Salzlösungen abgeschirmt werden. Ziel war es, den Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Filmeigenschaften zu untersuchen. Aber auch reine Salz-Lösungen haben Einfluss auf die Lipid-Oligolagen. Diese sollen in diesem Abschnitt vor allem hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit zwitterionischen Lipiden beschrieben werden.

Es wird angenommen, dass Kationen bevorzugt mit der Phosphatgruppe im Lipid wechselwirken und tatsächlich konnte über Neutronen-Diffraktionsmessungen gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  sich vor allem in der Nähe der Phosphat-Gruppe anlagert.<sup>88</sup> Im Allgemeinen wurde Adsorption von zweiwertigen Kationen an Phosphatidylcholin-Bilagen festgestellt.<sup>89</sup> Wahrscheinlich ist, dass polyvalente Ionen eine Änderung in der Konformation von Phosphatidylcholin-Kopfgruppen bei Bindung induzieren.<sup>90-93</sup> Auch wird vermutet, dass diese Ionen verbrückend auf die Lipide wirken und über Komplexbildung stabilere Verbände ausbilden können.<sup>63</sup> Bei Zugabe von divalenten Salzen kommt es zu einer Quellung der Lipid-Bilagen.<sup>89,94-96</sup> Mit zunehmender Konzentration nimmt der Grad der Quellung wieder ab. Das Ausmaß der Anlagerung in Abhängigkeit von der Art der Kationen wurde für DPPC wie folgt bestimmt:<sup>94</sup>

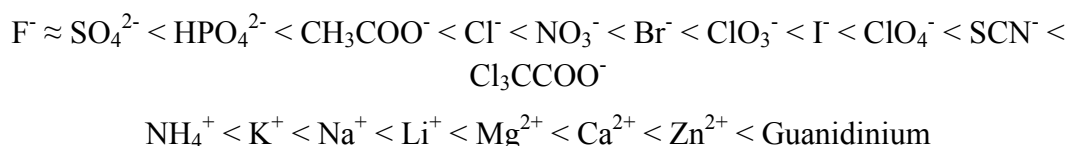


Die Reihenfolge ist dabei nicht nur abhängig vom Lipid sondern auch von der eingesetzten Konzentration und somit der Ladung zwischen den Bilagen.<sup>97</sup>



Die Auswirkungen von monovalenten Salzen wie NaCl auf Lipid-Bilagen werden in der Literatur vor allem für hohe Konzentrationen behandelt. Valley *et al.* berichteten, dass laut ihren Simulationen NaCl mit Konzentrationen unter 1 M die Bilagen-Struktur nicht verändert. Die Salze induzieren jedoch eine langreichweitige Ordnung von Ionen und Wasser. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Natrium- als auch Chlorid-Ionen an die Phosphatidylcholin-Kopfgruppen lagern.<sup>98</sup> Weitere Arbeiten an DMPC-Multilagen lassen für Konzentrationen größer 1 M vermuten, dass eine Phasen-Separation bei Zugabe von NaCl-Lösungen eintritt.<sup>99</sup> Dabei steigt der lamellare Abstand um einen Faktor von etwa 1.14 bei Zugabe von monovalenten Ionen. Erklärt wird dies in einer weiteren Arbeit über die Abschwächung von Van-der-Waals Kräften zwischen den Lipidlagen durch die hinzugefügten Ionen.<sup>100</sup> Gurtovenko *et al.* berechneten eine starke Komplexierung von DMPC durch Na<sup>+</sup>, welches an die Carbonylregion bindet. Kalium-Ionen verhalten sich ähnlich, zeigen jedoch aufgrund ihrer Größe eine reduzierte Anlagerung.<sup>101</sup> Bei niedrigen Konzentrationen konnte kein Quellen der Lipidlagen bei Zufügen von monovalenten Salzen beobachtet werden.<sup>95-96</sup>

Für die Betrachtung der Wechselwirkung von Lipiden mit Ionen interessant ist die empirische Hofmeister-Reihe. Sie beschreibt die unterschiedliche Fällungswirkung von Salzen und dient damit der Einschätzung der chaotropen<sup>vi</sup> Wirkung von Ionen auf Makromoleküle in wässriger Lösung. In der Reihe links stehende Ionen verstärken hydrophobe Kräfte, während die rechten chaotropen Stoffe diese vermindern. Die Löslichkeit von unpolaren Verbindungen in Wasser wird durch chaotrope Substanzen erhöht. Für Anionen und Kationen gilt:<sup>102</sup>



Abhängig von Konzentration und Ladungsdichte konnten aber auch bereits inverse Hofmeister-Serien verzeichnet werden.<sup>97,103</sup>

Eine quantitative Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Lipiden und Ionen kann über die DLVO-Theorie erfolgen. Sie beschreibt Systeme auf der Grundlage von attraktiven und repulsiven Kräften. Es wird von geladenen Oberflächen ausgegangen, deren Teilchenoberflächen als Kondensatorplatten beschrieben werden. An ihnen bildet sich dann in einer Elektrolytlösung eine elektrostatische Doppelschicht (s. Abb. 2.14). Bei Annäherung der Teilchen führt dies zu ihrer Abstoßung, da die repulsiven Kräfte eine größere Reichweite als die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte besitzen. Die DLVO-Theorie beschreibt das Wechselspiel zwischen anziehenden Van-der-Waals-Kräften und der elektrostatischen Abstoßung resultierend aus der ausgebildeten Doppelschicht.<sup>104</sup>

---

<sup>vi</sup>Chaotrope Substanzen stören geordnete Wasserstoffbrückenbindungen in wässrigen Systemen

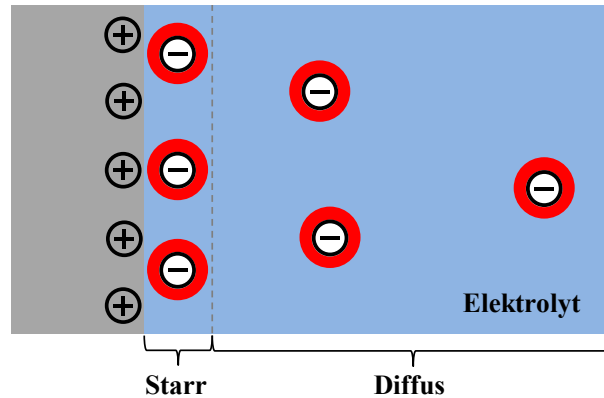


Abb. 2.14: Skizze einer elektrostatischen Doppelschicht. Die hier positive Ladung der Oberfläche induziert die Bildung einer starren Helmholtz-Schicht und eines diffusen Anteils. Die Hydrathülle ist in Rot dargestellt.

Hinsichtlich des hier vorliegenden Systems werden zwei Bilagen der Oligolagen-Struktur betrachtet. Da mit dem zwitterionischen DMPC gearbeitet wird, liegen diese ungeladen vor. Trotzdem muss davon ausgegangen werden, dass eine spezifische Ionen-Adsorption vorliegt, welche zu einer Oberflächenladungsdichte  $\sigma$  führt, welche wiederum die Abstoßung der Lipidlagen durch die eben gebildete elektrostatische Doppelschicht induziert (s. Abb. 2.15).

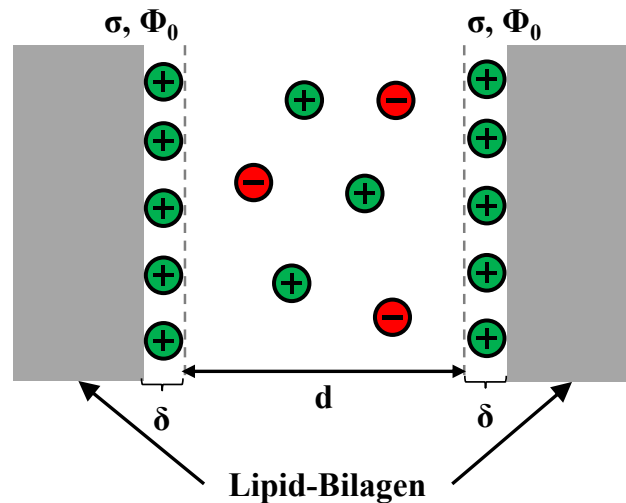


Abb. 2.15: Skizze zweier Lipid-Bilagen im Abstand  $d_0 = d + 2\delta$  voneinander. Die Kationen werden von den Bilagen adsorbiert, während die Anionen weiterhin verteilt vorliegen. Aus der Adsorption resultieren eine Oberflächenladungsdichte  $\sigma$  und ein Oberflächenpotential  $\phi_0$ .

Ein metastabiles Gleichgewicht mit Abstand  $d_0$  zwischen den Bilagen wird aus der Wechselwirkung zwischen den elektrostatischen Kräften und den attraktiven Van-der-Waals-Kräften erhalten. Die gesamte Wechselwirkungsenergie  $V_{ges}(d)$  setzt sich aus dem

elektrostatischen Anteil  $V_{el}(d)$  und dem durch die Hamaker<sup>vii</sup>-Konstante  $H$  bestimmten attraktiven Teil  $V_H(d)$  zusammen:

$$V_{ges}(d) = V_{el}(d) + V_H(d) \quad (2.9)$$

Für die auf einer Dipol-Dipol basierenden Wechselwirkung der Van-der-Waals-Kräfte skaliert die potentielle Energie mit  $d^{-2}$ ,<sup>105</sup> während die potentielle Energie des elektrostatischen Teils gemäß der Debye-Hückel-Theorie mit  $\exp(-\kappa d)$  abnimmt.<sup>106</sup>  $\kappa$  steht dabei für die inverse Abschirmlänge. Ein globales Minimum wird bei Kontakt der Bilagen erreicht.<sup>106</sup>

Neben der Zugabe von Salz-Lösungen zur Untersuchung der Natur der Wechselwirkungen zwischen PLs und HS sollte auch der pH-Wert variiert werden. Auch diese Änderung kann die Lipidlagen beeinflussen. Die Protonierung der Phosphatidylcholin-Kopfgruppen verändert zum einen die Ladung der Membran und andererseits die Polarität, welches zu einer Änderung in der Hydratation des Lipids führt. Meist sinkt diese mit zunehmender Protonierung und die Hauptphasenübergangstemperatur nimmt zu. Für DMPC ist sie in einem weiten pH-Bereich (pH = 2 - 14) konstant.<sup>42</sup>

---

<sup>vii</sup> Die Hamaker-Konstante ist proportional zur Größe der Van-der-Waals-Kraft die zwischen zwei Teilchen wirkt. Sie ist dabei abhängig von den Teilchen und ihrer Umgebung.

## 2.3. Analytik

Grundlegend bei der Auswahl der eingesetzten Messmethoden waren Kriterien die zur Charakterisierung der Probe erfüllt sein mussten. Wichtig war es die Techniken *in situ* durchführen zu können. Messungen unter Wasser sollten mit allen Methoden möglich sein. Da die Beschichtung der Proben nach Kontakt mit Wasser an Luft nicht mehr stabil war, war es wichtig *In-situ*-Methoden zu finden, welche eine permanente Inkubation in Wasser ermöglichen und unter Umständen sequenzielle Messungen der Probe mit verschiedenen Techniken erlauben. Bei Schichtdicken von wenigen 100 Nanometern sollte die Analytik auch möglichst oberflächensensitiv sein.

### 2.3.1. Reflexionsmessungen

Viele der verwendeten Methoden basieren auf der Reflexion. Daher soll zunächst auf die Grundlagen<sup>107</sup> hierzu eingegangen und im weiteren Verlauf die dazugehörigen Techniken und ihre Eigenarten vorgestellt werden.

Eine Reflexion bezeichnet das Zurückwerfen einer Welle bzw. eines Teilchens an einer Grenzfläche. An letzterer erfolgt eine Veränderung des Wellenwiderstandes bzw. des Brechungsindex im Ausbreitungsmedium. Wird eine Welle reflektiert, so gilt bei gerichteter Reflexion, bei der die Rauigkeit der Oberfläche klein im Vergleich zur Wellenlänge ist, dass der Ausfallswinkel gleich dem Einfallswinkel ist und beide mit dem Lot der Oberfläche in einer Ebene liegen (s. Abb. 2.16, rot). Bei Reflexion muss die Wellenlänge größer sein als die Abstände der Streuzentren zueinander, da sonst Beugung eintritt.

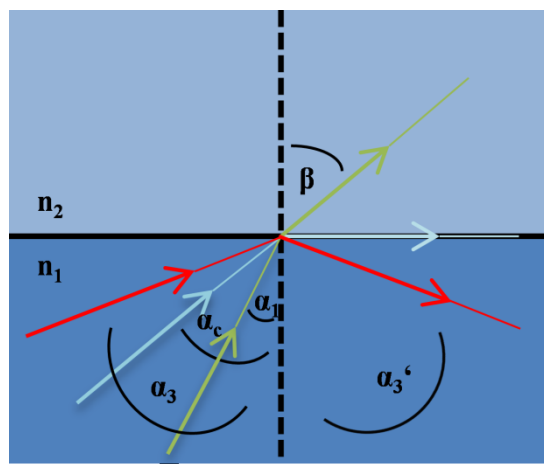


Abb. 2.16: Interne Reflexion. Licht trifft vom optisch dichteren auf ein optisch dünneres Medium. Rot und hellblau stellen Totalreflexion dar, während der grüne Strahl teilweise reflektiert (nicht dargestellt) und transmittiert wird.

Neben der Reflexion tritt meist auch ein Teil der Welle in das angrenzende Medium ein. Die Richtungsänderung des Lichtstrahls beim Übergang von einem Medium des Brechungsindex  $n_1$  in ein anderes mit Brechungsindex  $n_2$  wird durch das Snelliussche Brechungsgesetz (2.10) beschrieben. Dabei beschreibt  $\alpha$  den Winkel, in dem der Lichtstrahl im jeweiligen Medium vom Lot gebrochen wird. Bei einem Übergang vom optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium ( $n_1 > n_2$ ) wird der Strahl vom Einfallslot weg gebrochen und umgekehrt.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.10)$$

In ersterem Fall tritt ab einem kritischen Winkel  $\alpha_C$  Totalreflexion ein. Bei nicht ideal transparenten Materialien kommt es zu einer abgeschwächten Totalreflexion (ATR), welche in der ATR-Infrarot-Technik ausgenutzt wird (s. 2.3.3). Dabei werden bestimmte Strahlungsanteile durch die nicht transparenten Materialien absorbiert und der frequenz- und materialabhängige Absorptionsanteil fehlt im reflektierten Strahl.

Die Verhältnisse der Amplituden des elektrischen Feldes der Reflexion  $E_r$  und der Transmission  $E_t$  zu dem des einfallenden Lichts  $E_0$  können mit den fresnelschen Formeln, hergeleitet aus den Maxwell'schen-Gleichungen berechnet werden. Die folgenden vier Formeln beschreiben die Koeffizienten für Reflexion ( $r$ ) und Transmission ( $t$ ) für die jeweilige Polarisation (s. 2.3.4) senkrecht ( $s$ ) bzw. parallel ( $p$ ) zur Ebene.

$$\left(\frac{E_t}{E_0}\right)_s = t_s = \frac{2N_1 \cos \alpha}{N_1 \cos \alpha + \frac{\mu_{r1}}{\mu_{r2}} N_2 \cos \beta} \quad (2.11)$$

$$\left(\frac{E_r}{E_0}\right)_s = r_s = \frac{N_1 \cos \alpha - \frac{\mu_{r1}}{\mu_{r2}} N_2 \cos \beta}{N_1 \cos \alpha + \frac{\mu_{r1}}{\mu_{r2}} N_2 \cos \beta} \quad (2.12)$$

$$\left(\frac{E_t}{E_0}\right)_p = t_p = \frac{2N_1 \cos \alpha}{\frac{\mu_{r1}}{\mu_{r2}} N_2 \cos \alpha + N_1 \cos \beta} \quad (2.13)$$

$$\left(\frac{E_r}{E_0}\right)_p = r_p = \frac{\frac{\mu_{r1}}{\mu_{r2}} N_2 \cos \alpha - N_1 \cos \beta}{\frac{\mu_{r1}}{\mu_{r2}} N_2 \cos \alpha + N_1 \cos \beta} \quad (2.14)$$

Dabei steht  $N$  für den komplexen Brechungsindex ( $N = n + iK$ ),  $\mu_r$  für die magnetische Permeabilität,  $\alpha$  für den Winkel zwischen gebrochenem Strahl und Normale und  $\beta$  für den des reflektierten Strahls (s. Abb. 2.17). Für nicht magnetische Materialien kann für die magnetischen Permeabilitäten 1 eingesetzt werden und bei dielektrischen Filmen entfällt der Absorptionskoeffizient  $K$  und die Brechungsindizes liegen nicht mehr komplex vor ( $N = n$ ).

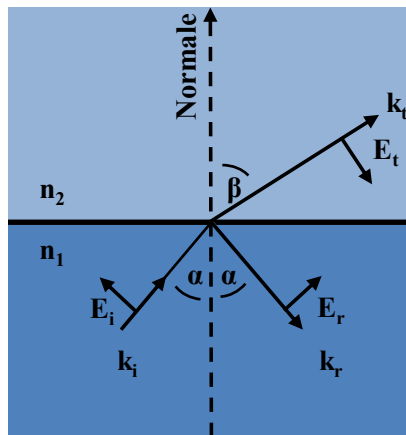


Abb. 2.17: Geometrie der Reflexion einer parallel polarisierten Welle mit  $k$  als Wellenvektor.

### 2.3.2. Röntgen- und Neutronenreflektometrie

Die Röntgen- und Neutronenreflektometrie unterscheiden sich im Wesentlichen nur durch die Art der Strahlung. Grundlage beider Techniken<sup>108-111</sup> ist die Bestrahlung einer Probe unter einem Einfallswinkel nahe  $90^\circ$  (streifender Einfall) und die Detektion der gerichteten Reflexion, mit der es möglich ist Auskünfte über die Beschaffenheit der Oberfläche zu erhalten.

Die Brechungsindizes  $n$  sind für beide Methoden, für den Fall dass keine Magnetisierung vorliegt, gemäß (2.15) definiert.

$$n = 1 - \delta + i\beta \quad (2.15)$$

Dabei beschreibt  $\delta$  die Dispersion in der Größenordnung von  $10^{-6}$  und  $\beta$  die meist vernachlässigbare Absorption im Größenbereich von  $10^{-12}$ . Der Brechungsindex  $n$  aller Materialien ist für Röntgen- und Neutronenstrahlung kleiner als 1 (Wert für Vakuum), wogegen im sichtbaren Bereich die Werte deutlich über 1 liegen. Beim Übergang von Vakuum zu Materie ist im sichtbaren Spektralbereich keine Totalreflexion möglich, während dies für Röntgen- und Neutronenstrahlung aufgrund des kleineren Brechungsindex gegeben ist.

## Theoretischer Teil

---

Da Röntgenstrahlung mit den Elektronen und Neutronenstrahlung nur mit den Atomkernen wechselwirkt, müssen für erstere Elektronendichte ( $\rho_e$ ) und der sogenannte Thomson Radius ( $r_e$ ) berücksichtigt werden, während für die Neutronenstrahlung neben der Atomdichte  $\rho_n$  eine kohärente Streulänge  $b$  der Neutronen ausschlaggebend ist, welche für jedes Element experimentell ermittelt werden muss. Die Dispersion eines Materials für Elektronen ( $\delta_{XR}$ ) bzw. für Neutronen ( $\delta_{Ne}$ ) kann laut (2.16) und (2.17) wiedergegeben werden.  $\lambda$  steht hier für die jeweilige Wellenlänge der eingesetzten Strahlung.

$$\delta_{XR} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_e r_e \quad (2.16)$$

$$\delta_{Ne} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_n b \quad (2.17)$$

Die ermittelten Dispersionswerte gelten nur für ein Element und sind für Neutronen sogar isotopenspezifisch. Soll die Dispersion für eine Schicht bestimmt werden, welche mehr als nur ein Element enthält, so muss über die verschiedenen Parameter der im Molekül vorhandenen Elemente gemittelt werden. Daraus ergibt sich dann die Streulängendichte (SLD), welche für Neutronenstrahlung nach (2.18) berechnet werden kann.  $V$  steht für das Volumen des Moleküls und  $N$  für die Anzahl der Atome. SLDs werden in [ $\text{\AA}^{-2}$ ] angegeben.

$$SLD_{Ne} = \frac{\sum_{i=1}^N b_i}{V} \quad (2.18)$$

Für die Berechnung der SLD bei Einsatz von Röntgenstrahlung wird der Elektronenradius multipliziert mit der Ordnungszahl des jeweiligen Atoms  $Z_i$  aufaddiert:

$$SLD_{XR} = \frac{\sum_{i=1}^N Z_i r_e}{V} \quad (2.19)$$

Da die SLD für Röntgenstrahlung von der Elektronendichte abhängt, steigt sie linear mit der Ordnungszahl eines Elements. Dies gilt nicht für Neutronenstrahlung. Daher ist es möglich Isotope mit Neutronenreflexions (NR)-Messungen zu unterscheiden. Dies wird vor allem bei *In-situ*-Messungen an wasserstoffhaltigen Molekülen unter Wasser ausgenutzt. Um einen Kontrast zwischen dem Wasserstoff des zu untersuchenden Moleküls und dem des umgebenden Wassers zu erhalten, wird deuteriertes Wasser

## Theoretischer Teil

---

verwendet. Wie in Tab. 2.1 zu sehen ist, variieren die SLDs für Röntgenstrahlung für beide Arten von Wasser nur wenig, während sich die SLDs für Neutronen stark unterscheiden. Durch gezielte Deuterierung bestimmter funktioneller Gruppen ist es ferner möglich diese mit NR-Messungen zu beobachten.

	SLD <sub>Ne</sub> [Å <sup>-2</sup> ]	SLD <sub>XR</sub> [Å <sup>-2</sup> ]
H <sub>2</sub> O	-0.56E-06	9.41E-06
D <sub>2</sub> O	6.38E-06	9.37E-06

Tab. 2.1: SLDs von Wasser und schwerem Wasser für Neutronen- und Röntgenstrahlung. Gerechnet wurde mit Wellenlängen von 4.66 Å für Neutronen- und von 1.54 Å für Röntgenstrahlung.

Bei Messung der spekularen Reflektivität entspricht der Eintrittswinkel des Strahls am Detektor dem des Einstrahlwinkels. Der Betrag des Wellenvektors ist gegeben durch:

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.20)$$

Der Impulsübertrag  $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_r$  steht senkrecht zur Oberfläche (s. Abb. 2.18) und dessen Betrag kann in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$  und dem Einfallswinkel  $\theta$  wie folgt berechnet werden:

$$q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (2.21)$$

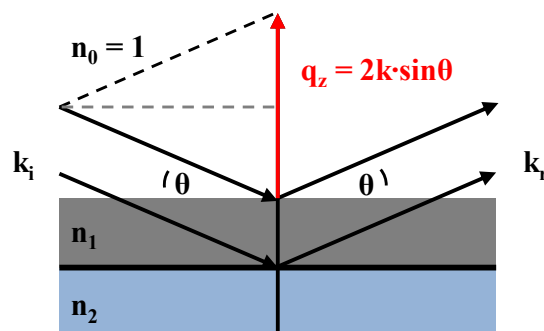


Abb. 2.18: Streugeometrie einer idealen, glatten Oberfläche. Der Impulsübertrag steht senkrecht zur Oberfläche.  $z$  bezeichnet die Richtung der Oberflächennormalen.

In den Messdaten wird die jeweilige Intensität gegen den Impulsübertrag dargestellt. Befindet sich nun ein Film auf einem Substrat, so entstehen Interferenzmuster zwischen



## Theoretischer Teil

---

den am Substrat und an der Filmschicht reflektierten Strahlen. Diese werden Kiessig-Oszillationen genannt und ermöglichen die Bestimmung der Schichtdicke des Films  $d_{ges}$  (s. Abb. 2.19) über:

$$d_{ges} = \frac{2\pi}{\Delta q_z} \quad (2.22)$$

$\Delta q_z$  steht dabei für den Abstand zweier aufeinanderfolgenden Minima oder Maxima der Kiessig-Oszillationen.

Bei Anwesenheit von mehreren sich wiederholenden Lagen können zusätzliche Interferenzen entstehen. Anhand dieser Bragg-Peaks ist es dann möglich die Dicke der einzelnen Filme  $d_{einzel}$  über (2.24) zu ermitteln. Für konstruktive Interferenz muss

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2.23)$$

gelten, wobei  $n$  eine ganze Zahl, die sogenannte Ordnung des Bragg-Peaks, darstellt. Daraus folgt für die Schichtdicken:

$$d_{einzel} = n \frac{2\pi}{q_{z,n}} \quad (2.24)$$

$q_{z,n}$  bezeichnet dabei das Maximum des Bragg-Peaks  $n$ -ter Ordnung.

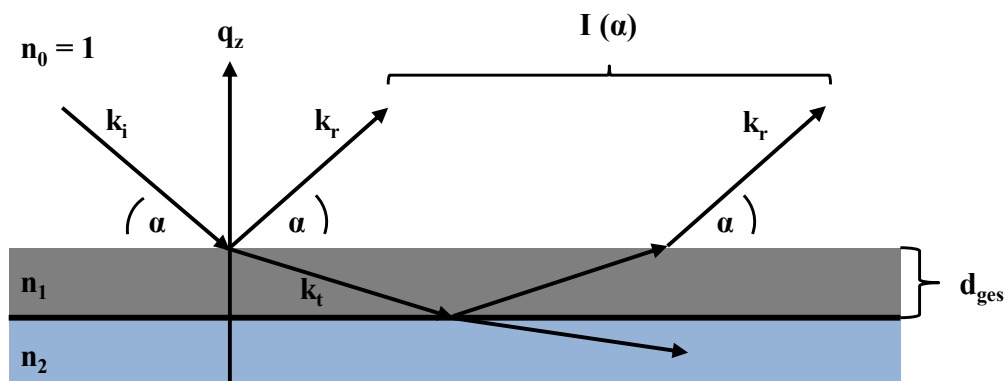


Abb. 2.19: Streugeometrie an dünnen Filmen mit  $n_0 < n_1 < n_2$ . Konstruktive Interferenz der Reflexionen führen zu Kiessig-Oszillationen mit einer Intensität  $I(\alpha)$ .

Mit dem Parratt-Algorithmus ist es möglich die Reflektivität eines Mehrschichtensystems auf Basis der Fresnelschen Formeln rekursiv zu beschreiben. Die Rekursionsgleichung setzt die Amplituden der reflektierten und transmittierten Strahlung  $R_j$  und  $T_j$  an der Grenzfläche zwischen den Schichten  $j$  und  $j+1$  ins Verhältnis  $X_j$ :

$$X_j = \frac{R_j}{T_j} = e^{-2ik_{z,j}z_j} \frac{r_{j,j+1} + X_{j+1}e^{2ik_{z,j+1}z_j}}{1 + r_{j,j+1} + X_{j+1}e^{2ik_{z,j+1}z_j}} \quad (2.25)$$

$$r_{j,j+1} = \frac{k_{z,j} - k_{z,j+1}}{k_{z,j} + k_{z,j+1}} \quad (2.26)$$

Wobei  $k_z$  die  $z$ -Komponenten der Wellenvektoren des einfallenden Strahles beschreibt. Die Koordinate  $z_j$  beschreibt die Lager der  $j$ -ten Grenzfläche.

Es wird von einem halbumendlichen Substrat ausgegangen, sodass keine reflektierte Welle aus diesem Bereich zurücklaufen kann. Die Rechnung beginnt für ein Schichtsystem mit  $N$  Lagen bei  $R_{N+1} = 0$ . Hiervon ausgehend lassen sich dann sukzessive  $X_j$  bis zur letzten Grenzfläche berechnen. Rauigkeiten ( $\sigma$ ), welche kleiner sind als die jeweiligen Schichtdicken, können im Parratt-Formalismus berücksichtigt werden:

$$r_{j,j+1}^{rauh} = \frac{k_{z,j} - k_{z,j+1}}{k_{z,j} + k_{z,j+1}} e^{-2ik_{z,j}k_{z,j+1}\sigma_j^2} \quad (2.27)$$

Bei größeren Rauigkeiten ist diese Methode jedoch nicht mehr anwendbar.

Durch die Möglichkeit der Berechnung der Reflektivität eines Systems können Messungen mit theoretischen Modellen verglichen werden. Hierzu wird ein Modell mit parallelen Schichten entwickelt. Für diese Schichten werden Annahmen bezüglich Streulängendichten und Rauigkeit getroffen. Rauigkeiten können zur besseren Beschreibung des nicht idealen Systems berücksichtigt werden. In einer iterativen Fit-Prozedur werden die angenommenen Parameter solange variiert, bis die berechnete Kurve so gut wie möglich mit den Messwerten übereinstimmt.

In dieser Arbeit wurden die Oligoschichten in einzelne Boxen unterteilt, die parallel zur Oberfläche verlaufen. Für jede einzelne Box wurde dann eine durchschnittliche Streulängendichte, eine Rauigkeit und eine Schichtdicke vorgegeben, welche in einer iterativen Parameterschätzung angepasst wurden, bis die gemessene Reflektivität am besten durch die berechnete Kurve beschrieben wurde. Verwendet wurde dafür das Programm Motofit,<sup>112</sup> welches in IGOR Pro implementiert ist. Dem Programm liegt der Parratt-Algorithmus zugrunde.

## 2.3.3. Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Grundlage dieser Technik bildet die IR-Spektroskopie.<sup>41</sup> Bei ihr handelt es sich um eine Absorptionstechnik basierend auf Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 2.5 und 250  $\mu\text{m}$ . Anregungen von Molekülrotationen und -schwingungen ergeben ein IR-Absorptionsspektrum. Dabei können Rotationsbanden nur in der Gasphase aufgelöst werden, während Schwingungsspektren auch von Flüssigkeiten und Festkörpern aufgenommen werden können. Das Lambert-Beersche Gesetz und die Übergangsdipolmomente bestimmen dabei die Intensität der Absorptionsbanden. Nur bei Änderung des Dipolmoments ist eine Schwingung IR-aktiv und somit im Spektrum sichtbar. Zur Anregung einer solchen Schwingung kann im nahen und mittleren Infrarotbereich unter anderem ein Globar (Siliciumcarbid) verwendet werden. Es handelt sich dabei um einen thermischen Strahler mit einer Betriebstemperatur zwischen 980 und 1650 K.

In dispersiven Messgeräten wird die Strahlung in Wellenlängenbereiche zerlegt, welche dann einzeln auf die Probe treffen und detektiert werden. In einem Fourier-Transformations-IR-Spektrometer hingegen ermöglicht ein Michelson-Interferometer ein zeitgleiches Aufnehmen der Intensitäten im gesamten Wellenlängenbereich. Hierzu wird im Interferometer der einfallende Strahl im Strahlteiler in zwei Teilstrahlen zerlegt. Der erste Strahl wird von einem festen Spiegel reflektiert, während der zweite durch einen beweglichen Spiegel ebenfalls reflektiert und mit dem ersteren wieder zusammengeführt wird (s. Abb. 2.20). Abhängig vom Spiegelweg und der Frequenzen beider Strahlen wird ein Interferogramm erhalten, welches über eine Fourier-Transformation in ein Spektrum umgewandelt wird. Durch die im Vergleich zu dispersiven Geräten schnellere Datenerfassung, werden mit dem IR-Spektrometer kinetische Messungen möglich.

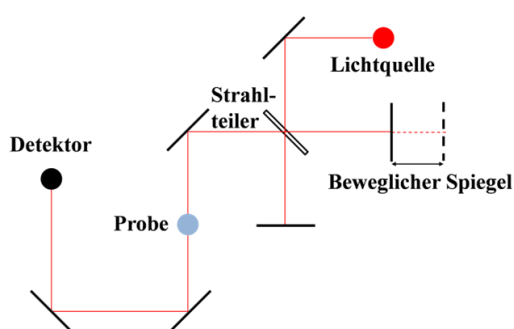


Abb. 2.20: Schematischer Aufbau eines FTIR mit Michelson-Interferometer.

Die Detektion kann mittels zwei verschiedener Detektoren erfolgen. Der DTGS (deuteriertes Triglycinsulfat)-Detektor ist ein Ferroelektrikum, welches unterhalb seiner Curie-Temperatur spontan elektrisch polarisiert. Bei Erwärmung durch IR-Strahlung verändert sich die Polarisation durch Änderung der Abstände im Kristallgitter. Die

entstehende Ladung auf der Oberfläche kann dann als elektrisches Signal detektiert werden. Vorteilhaft ist, dass der Detektor keine externe Kühlung benötigt. Die Betriebstemperatur von  $-40\text{ °C}$  kann mit einem internen Peltier-Element eingestellt werden. Durch die Linearität des Detektors ist es auch möglich die Intensitäten analytisch mittels einer Eichkurve auszuwerten. Im Unterschied dazu handelt es sich bei dem MCT (Quecksilber-Cadmium-Tellurid)-Detektor um einen nichtlinearen Detektor, welcher vor der Messung auf  $-196\text{ °C}$  gekühlt werden muss. Jedoch ist das Signal zu Rausch-Verhältnis um 1 - 2 Größenordnungen besser und die Aufnahmezeit der Spektren ist um ein fünffaches geringer, sodass mit diesem Detektor Kinetikmessungen durchgeführt werden können. Dabei wird, basierend auf dem inneren photoelektrischen Effekt, die elektrische Leitfähigkeit des Halbleiterdetektors, welche abhängig von der eingestrahlten Energie ist, zur Detektion verwendet.

Für *In-situ*-Messungen unter Wasser muss die Technik der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) angewendet werden, da sonst das Spektrum durch Wasserbanden zwischen  $3500$  und  $4000\text{ cm}^{-1}$  und  $1500$  und  $2000\text{ cm}^{-1}$  dominiert wird. Es handelt sich um eine Reflexionsmessung (s. 2.3.1) bei der der Lichtstrahl durch ein ATR-Element auf die eigentliche Probe gelenkt wird. In einem solchen Element wird Strahlung über Totalreflexion geführt. Bei Totalreflexion bildet sich hinter der reflektierenden Grenzfläche ein evaneszentes Feld aus, welches dann mit der Probe wechselwirken kann. Totalreflexion an der Grenzfläche tritt nur auf, wenn der Brechungsindex der ATR-Einheit  $n_1$  größer als der Brechungsindex der Probe  $n_2$  (s. 2.3.1) ist. Die Eindringtiefe  $d_p$ , an der die Amplitude des evaneszenten Feldes auf  $1/e$  abgefallen ist, ist abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$ , dem Einfallswinkel  $\theta$  und den Brechungsindices  $n_i$ . Sie wird durch folgende Formel wiedergegeben:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}} \quad (2.28)$$

Durch die ATR-Technik werden oberflächensensitive Messungen unter Wasser möglich, da der Lichtstrahl nicht mehr durch Wasser gelenkt wird, sondern nur noch bis in eine Tiefe von etwa  $d_p$  in die angrenzende Schicht eindringt. Hierdurch werden überdeckende Wasserbanden im Spektrum vermieden. Die Bandenposition der Spektren entspricht denen der Transmissionsspektren. Unterschiede werden nur deutlich in der Form der Banden. So zeigen diese im Vergleich zur Transmissionsmessung mit zunehmender Wellenlänge breitere und intensivere Banden, da die Eindringtiefe zunimmt.

## 2.3.4. Spektrale Ellipsometrie

Mit der Technik der Ellipsometrie ist es möglich bei Kenntnis der dielektrischen Eigenschaften einer Beschichtung deren Schichtdicke zu bestimmen.<sup>113-114</sup> Umgekehrt ist es auch möglich die dielektrischen Eigenschaften eines Adsorbats bei bekannter Schichtdicke zu ermitteln. Für die Ellipsometrie kann ein breites Frequenzspektrum gewählt werden, sodass Messungen mit Wellenlängen zwischen 300 nm und 1500 nm an verschiedenen Apparaturen durchgeführt werden können. Grundlage der Technik ist die Änderung des Polarisationszustandes von Licht bei Reflexion oder Transmission an einer Oberfläche.

Die Polarisation beschreibt die zeitliche und räumliche Entwicklung des elektrischen und des magnetischen Feldes einer elektromagnetischen Welle. Da beide orthogonal zueinander stehen, genügt es eines der Felder zu betrachten. Die Felder bewegen sich immer orthogonal zur Ausbreitungsrichtung fort und können dadurch jeweils durch zwei Komponenten, beispielsweise x- und y-Richtung, beschrieben werden. Bei der Ellipsometrie kommt entweder linear- oder zirkular-polarisiertes Licht zum Einsatz. Abb. 2.21 zeigt wie die orthogonal zueinander stehenden Wellen phasenverschoben sein müssen, um die gewünschte Polarisation zu erzielen. Für lineare Polarisation müssen die Wellen in Phase schwingen, während die Amplitudenverhältnisse die Richtung bestimmen. Für zirkular polarisiertes Licht muss eine Phasenverschiebung der Wellen von  $90^\circ$  bei gleicher Amplitude vorliegen. Bei Kombination willkürlicher Phasen und Amplituden von orthogonal zueinander stehenden Wellen wird elliptisch polarisiertes Licht erhalten.

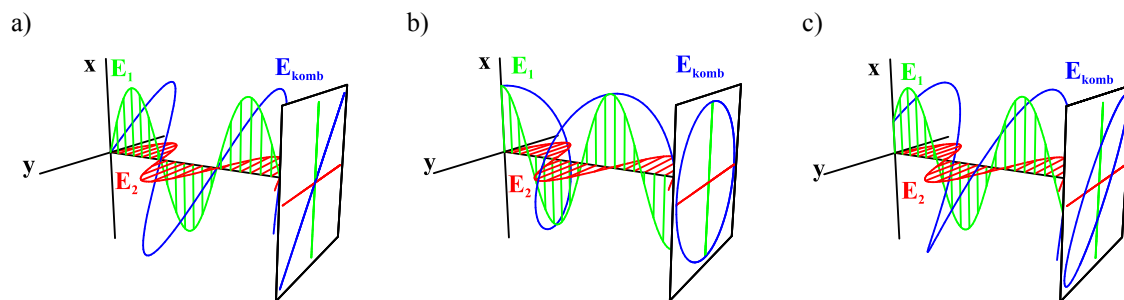


Abb. 2.21: Kombinationen von orthogonalen Wellen zur Veranschaulichung von Polarisation. Mit freundlicher Genehmigung von Florian Salopiata. Die Abbildung zeigt: (a) linear, (b) zirkular und (c) elliptisch polarisiertes Licht.

Bei der gerichteten Reflexion von linear oder zirkular polarisiertem Licht an einer Grenzfläche wird dieses, wie aus den Fresnel-Gleichungen hervorgeht, im Allgemeinen elliptisch polarisiert. Die Änderung der Polarisation wird detektiert. Dabei wird das Verhältnis  $\rho$  zwischen den totalen Reflexionskoeffizienten  $R_i$  von parallel und senkrecht polarisiertem Licht gebildet. Sie ergeben sich aus den fresnelschen Formeln, welche bereits in Abschnitt 2.3.1 eingeführt wurden. Das Verhältnis  $\rho$  kann auch über die ellipsometrischen Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  dargestellt werden:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan \Psi e^{i\Delta} \quad (2.29)$$

$\Delta$  beschreibt dabei die schichtbedingte Änderung der Phasendifferenz zwischen s- und p-polarisiertem Licht, während  $\tan \Psi$  dem Betrag von  $\rho$  und damit dem Amplitudenverhältnis von parallel zu senkrecht polarisiertem Strahl entspricht. Da nur die Änderung der Polarisation detektiert wird, ist diese Methode unabhängig von Intensitätsschwankungen des eingestrahlt Lichts und es sind keine Referenzmessungen nötig.

Die Reflexion kann über die totalen Reflexionskoeffizienten ( $R$ ) beschrieben werden, welche sich aus der Summe der einzelnen fresnelschen Koeffizienten ( $r_i$ ) (s. 2.3.1) ergeben. Bei Betrachtung der Reflexion eines Films auf einem Substrat (s. Abb. 2.22) ergibt sich:

$$R^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-2i\delta)}{1 + r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-2i\delta)} \quad (2.30)$$

$$R^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-2i\delta)}{1 + r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-2i\delta)} \quad (2.31)$$

mit der sogenannten Filmphasendicke  $\delta$ :

$$\delta = 2\pi \frac{d}{\lambda} n_2 \cos(\beta) \quad (2.32)$$

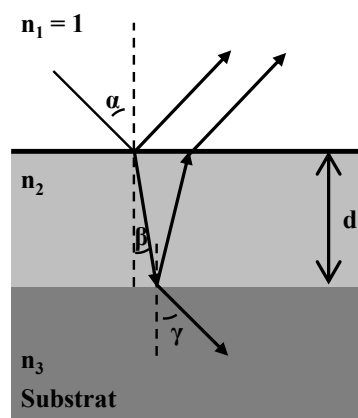


Abb. 2.22: Reflexion und Transmission eines Films auf einem Substrat.

Die gesuchte Schichtdicke  $d$  des Films ist in der Filmphasendicke enthalten. Die gemessenen ellipsometrischen Parameter ( $\Psi$  und  $\Delta$ ) können nicht direkt in die gesuchten optischen Konstanten und Schichtdicken umgewandelt werden. Hierzu muss eine Regressionsanalyse durchgeführt werden. In einer iterativen Prozedur werden hierbei die Parameter der totalen Reflexionskoeffizienten solange variiert bis die berechneten Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  mit den gemessenen so gut wie möglich übereinstimmen. Der mittlere quadratische Fehler (MSE) zeigt die Abweichung der Messung von den berechneten Werten an. Das beste Modell zeigt den geringsten MSE. Die Werte des Modellsystems werden über die fresnelschen Formeln (s. 2.3.1) berechnet. Zur Bestimmung von geringen Schichtdicken (nm-Bereich) sollten die optischen Konstanten bekannt sein. Diese sind abhängig von der jeweiligen Wellenlänge und können für verschiedene Materialien in Tabellen nachgelesen werden. Sind die Brechungsindices nicht bekannt, so müssen Annahmen getroffen werden. Für transparente Materialien, deren Brechungsindices keinen Absorptionskoeffizient  $K$  enthalten ( $K = 0$ ), kann zur Beschreibung des Brechungsindex  $n$  in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$  das Cauchy-Modell verwendet werden:

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} + \dots \quad (2.33)$$

$A$ ,  $B$  und  $C$  beschreiben dabei die Cauchy-Parameter, welche solange vom Programm angepasst werden, bis das Modell mit der Messung gut übereinstimmt.  $A$  entspricht dabei dem Brechungsindex für den Grenzfall großer Wellenlängen. *In-situ*-Messungen unter Wasser sind mit dem ellipsometrischen Verfahren sehr gut möglich. Durch die schnelle Datenerfassung können Quellkinetiken aufgenommen werden.

### 2.3.5. Rasterkraftmikroskop (AFM)

Mit einem AFM können Oberflächenstrukturen abgebildet werden. Grundlage hierzu ist die mechanische Abtastung von Oberflächen bei gleichzeitiger Messung von atomaren Kräften.<sup>115</sup>

Während der Messung rastert der sogenannte Cantilever mit einer nanoskopischen Spitze über die Probe. Die Auflösung dieser Methode ist abhängig vom Krümmungsradius der verwendeten Spitze, welcher zwischen 10 und 20 nm liegt und laterale Auflösung von 0.1 bis 10 nm erlaubt. Durch die Oberflächenstruktur wird der Cantilever verbogen und über die Detektion dieser Auslenkung ist es möglich die Oberfläche abzubilden. Dies erfolgt meist über einen Laserstrahl der auf die Spitze gerichtet ist. Der reflektierte Strahl wird dann mit einem Photodetektor detektiert (s. Abb. 2.23a).

Bei großem Abstand zwischen Spitze und Oberfläche überwiegen anziehende Van-der-Waals-Kräfte und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, während bei geringerer Entfernung

## Theoretischer Teil

repulsive Kräfte wie Pauli- und Coulomb-Abstoßung zunehmen. Das Lennard-Jones-Potential beschreibt das Wirken der Kräfte. In Abb. 2.23b ist das Potential  $V$  in Abhängigkeit von der Entfernung  $R$  zwischen Probe und Spitze dargestellt.  $R_0$  bezeichnet dabei den Gleichgewichtsabstand.

Je nach Bewegung der Spitze können drei Betriebsmodi des AFM unterschieden werden. Beim Kontakt-Modus sitzt die Spitze im direkten Kontakt zur Probe. Nun kann entweder die Auslenkung der Spitze direkt detektiert werden oder sie wird konstant gehalten. Die Kraft die hierfür benötigt wird, wird detektiert und gibt Auskunft über das Höhenprofil der Probe. Eine für Probe und Cantilever schonendere Methode ist der Intermittierende-Modus in dem die Spitze in Schwingung versetzt wird. Die Schwingungsfrequenz liegt nahe der Resonanzfrequenz des eingesetzten Cantilevers. Die Spitze berührt nur am Umkehrpunkt der Schwingung die Probe. Der intermittierende Modus wird vor allem für *In-situ*-Experimente verwendet. Messungen unter Flüssigkeit können somit auch mit einem AFM durchgeführt werden. Im Nicht-Kontakt-Modus schwingt der Cantilever mit seiner Eigenresonanz und berührt die Probe dabei nicht. Detektiert wird die Frequenzverschiebung bei Wechselwirkung des Cantilevers mit der Oberfläche. Neben der Oberflächentopographie, welche in dieser Arbeit mittels AFM gemessen wurde, können auch weitere Messgrößen bestimmt werden. Unter anderem können lokale Magnetstärken und Reibungskräfte vermessen werden. Bei nicht bildgebenden Methoden, den spektroskopischen Verfahren, können Kraft-Abstands-Kurven aufgezeichnet und damit Adhäsionskräfte bestimmt werden.

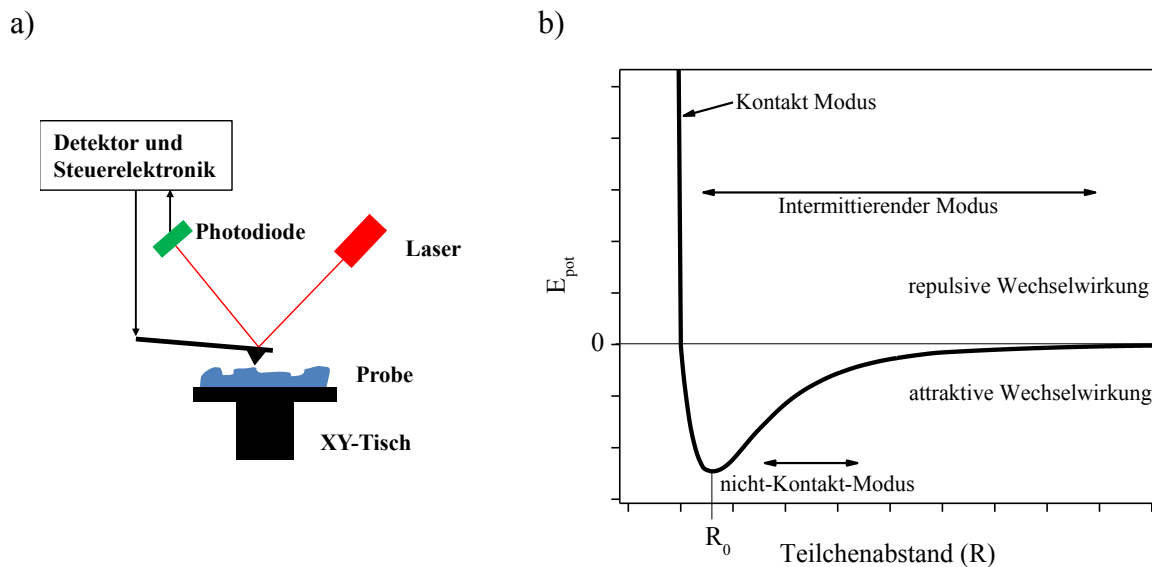


Abb. 2.23: a) Funktionsprinzip eines AFMs und b) Lennard-Jones-Potential. Gezeigt sind verschiedene Modi der AFM-Messung in Abhängigkeit vom Abstand zur Probe.  $R_0$  bezeichnet dabei den Gleichgewichtsabstand.



### 2.3.6. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die Technik der DSC kann zur quantitativen kalorimetrischen Untersuchung von Biomolekülen verwendet werden.<sup>43,116</sup> Hierzu wird ein Tiegel mit der Probe und ein weiterer identischer mit einer Referenz in einem Wärmebad dem gleichen Temperaturänderungsprogramm ausgesetzt. Aufgrund der Wärmekapazität der Stoffe kommt es nun bei endothermen und exothermen Prozessen, und somit auch bei Phasenänderungen, zu Temperaturdifferenzen zwischen Probe und Referenz. Um die Temperaturen der Probe und der Referenz wieder anzugleichen, muss die Heizleistung an Probe und Referenz unterschiedlich gewählt werden. Diese Differenz wird detektiert und ist proportional zum Unterschied der Wärmekapazität zwischen Referenz und Probe ( $\Delta C_p$ ). Aufgetragen wird die Wärmekapazität gegen die Temperatur ( $T$ ). Über die Integration des untergrundkorrigierten Signals zwischen Anfangs- ( $T_1$ ) und Endtemperatur ( $T_2$ ) kann die Umwandlungsenthalpie ( $\Delta H$ ) erhalten werden:

$$\int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p(T) dT = \Delta H \quad (2.34)$$

In dieser Arbeit wurden mit der Methode die Phasenübergangstemperaturen von Lipiden bestimmt.



## 3. Experimenteller Teil

### 3.1. Verwendete Chemikalien und Substrate

Die in dieser Arbeit verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit Reinstwasser eines spezifischen Widerstandes von 18.2 M $\Omega$ ·cm aus einer Millipore-Wasseraufbereitungsanlage (Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland) hergestellt. Wässrige PE- und Salz-Lösungen wurden mit variierenden Konzentrationen angesetzt. Vor den Messungen am Ellipsometer wurden die Lösungen 30 min im Ultraschallbad (Sonomatic 300PC, Michael Böhm Ziehsteintechnik, Altenstadt, Deutschland) entgast. Für die NR-Messungen erfolgte eine Entgasung des D<sub>2</sub>O durch die Erzeugung von Unterdruck.

Chemikalie	Bezugsquelle	Reinheit oder MW
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, US)	> 99 %
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin-N,N,N-trimethyl-D9 (DMPC-d9)	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, US)	k. A.
1,2-Dimyristoyl-D54- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DMPC-d54)	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, US)	k. A.
1,2-Dimyristoyl-D54- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin-1,1,2,2-D4-N,N,N-trimethyl-D9 (DMPC-d67)	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, US)	k. A.
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	Mit 0.6 % Ethanol stabilisiert
Chloroform p.a. (CHCl <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)	Uvasol
Ethanol p.a. (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	99.8 %
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	99.9 atom % D
Natriumsalz der Hyaluronsäure (HS)	Novozymes (Bagsvaerd, Dänemark), Calbiochem (San Diego, Kalifornien, US)	769, 850 kDa
Polyallylaminhydrochlorid (PAH)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	15, 58, 900 kDa

## Experimenteller Teil

Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	0.8, 25 kDa
Natriumsalz der Polystyrolsulfonsäure (PSS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	70 kDa, 1 MDa
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	> 99 %
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	99.5 %
Kaliumchlorid (KCl)	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	> 99.5 %
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	> 98 %
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	> 93 %
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	p.a.
Natriumhydroxid (NaOH)	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	99 %
Salzsäure (HCl)	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	0.1 mol/L
di-Phosphorpentoxid	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	98 %
Ammoniak	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	25 % in Wasser
Wasserstoffperoxid	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg	30 % in Wasser

Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien, Bezugsquelle und Reinheitsgrad bzw. MW.

Die Größe und die Bearbeitung der verwendeten Substrate variierten je nach Ansprüchen der Messapparatur. Bei allen Substraten handelte es sich um Silicium der Orientierung (100) mit einer nativen SiO<sub>x</sub>-Schicht. Silicium ist dabei für Neutronen im gewählten Wellenlängenbereich von 1.8 - 12.2 Å und für IR-Strahlung (1500 - 6000 cm<sup>-1</sup>) transparent. Während für Messungen am Ellipsometer und am Röntgenreflektometer beliebig große Stücke (aber nicht kleiner als 20 mm x 20 mm mit einer Dicke von 0.5 mm) zugeschnitten werden konnten, wurden für Messungen der Neutronenreflektivität (NR)- und ATR-FTIR-Versuche runde Wafer mit einem Durchmesser von

60 mm und einer Dicke von 10 mm verwendet. Die Kristalle für die ATR-Messungen besaßen zusätzlich polierte Seiten, welche im 45° Winkel zur Probenoberfläche geneigt waren. Die Substrate wurden von Siliciumbearbeitung Holm (Tann/Ndb., Deutschland), Sil'tronix (Archamps, Frankreich) und Siegert Wafer (Aachen, Deutschland) bezogen.

### 3.2. Probenpräparation

Der Lipid-Beschichtung ging immer eine Reinigung der Substrate voraus. Sie wurden zunächst mit Chloroform gespült, im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und für eine Stunde in Ethanol gereinigt. Dann wurden die Platten mit Ethanol abgespült und abermals mit N<sub>2</sub> getrocknet.

Waren die Substrate zuvor mit Lipiden beschichtet, wurden sie mit Chloroform gereinigt, getrocknet und einer RCA-Reinigung (Reinigungsprozess wurde im Auftrag der Radio Corporation of America entwickelt) unterzogen. Hierzu wurden sie 10 min lang in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %), Ammoniak (25 %) und Wasser im Verhältnis von 1:1:5 bei 75 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt, das Substrat 20-mal mit reinem Wasser gespült, eine Stunde in Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet.

Für die Lipid-Oligobilagen-Präparation wurden die Substrate nach dem Reinigungsprozess mit einer Lösung von DMPC in Chloroform mittels eines Spin-Coaters beschichtet (s. Abb. 3.1a). Hierzu wurden zwei verschiedene DMPC-Konzentrationen verwendet. Während Substrate für NR-Messungen mit 10 g/L-Lösungen und hochreinem Chloroform präpariert wurden, konnten die restlichen Messungen mit Ethanol stabilisiertem Chloroform und einer Konzentration von 5 g/L durchgeführt werden. In Berlin wurde mit einem Spin-Coater des Modells 6708D gearbeitet und in Heidelberg stand das Modell G3P-8 zur Verfügung; beide stammen von Special Coating Systems (Indianapolis, Indiana, US). Die Rotation wurde direkt nach Benetzung der gesamten Substrat-Oberfläche mit einer Geschwindigkeit von 500 rpm für 1 Sekunde gestartet. Danach folgte für die Dauer von 40 Sekunden eine Umdrehungszahl von 4000 rpm. Die Probenpräparation entsprach im Wesentlichen der Vorgehensweise von Mennicke und Salditt.<sup>117</sup> Vor Beschichtung mit der DMPC-Lösung wurde das Substrat dreimal mit reinem Chloroform und dem gleichen Rotations-Programm vorgespült.

Multilamellare Lipid-Beschichtungen wurden mit der Airbrush-Methode aufgebracht. Sie wurden präpariert, um das Signal der NR-Messungen gegebenenfalls zu verstärken. Sie mussten jedoch nicht verwendet werden. Die Charakterisierung der Proben zeigte jedoch, dass es möglich ist solche multilamellaren Strukturen herzustellen (s. 4.1.3). Hierzu wurde eine DMPC-Lösung mit einer Konzentration von 10 g/L in Chloroform mit einem konstanten Stickstoffstrom auf das Substrat gesprüht (s. Abb. 3.1b).

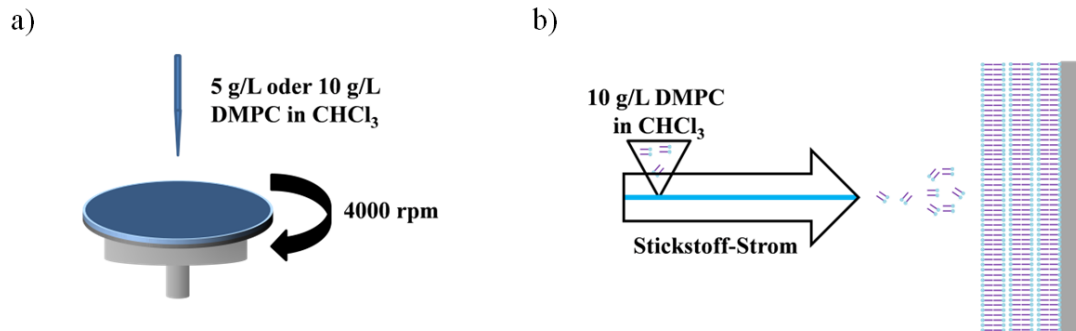


Abb. 3.1: Vorgehensweise bei der Lipid-Beschichtung mittels Spin-Coater- und Airbrush-Methode. a) Oligolamellare Schichten wurden mittels Spin-Coater erhalten. Das Substrat wurde zunächst vollständig mit der jeweiligen DMPC-Lösung bedeckt und dann bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 4000 rpm beschichtet. b) Multilamellare Beschichtungen erfolgten mithilfe der Airbrush-Technik. Die DMPC-Lösung wurde mit einem konstanten Stickstoffstrom auf das Substrat gesprüht.

## 3.3. Geräte zur Analytik

Zur Untersuchung des Verhaltens von Lipid-Oligolagen in HS-, PE- und Salz-Lösungen wurden neben Charakterisierungsmethoden der trockenen Oberfläche auch *In-situ*-Messmethoden benötigt, welche es ermöglichten Proben unter Wasser zu messen. Die jeweilige Methodik wurde bereits in 2.3 beschrieben. Im Folgenden sollen die korrespondierenden Geräte vorgestellt werden.

### 3.3.1. Röntgenreflektometrie

Für diese Messungen wurde ein Gerät am Helmholtz-Zentrum-Berlin (HZB) verwendet. Es diente vor allem der Vorcharakterisierung trockener Proben für spätere NR-Messungen. Gemessen wurde mit einem am HZB konstruierten, dreiachsigen Diffraktometer mit einer Kupferanode, deren Röntgenstrahlung über einen Graphitkristall monochromatisiert wird. Verwendet wird das Dublett der CuK<sub>α</sub>-Strahlung mit einer Wellenlänge von 1.54 Å (gewichtetes Mittel) und einer Energie von 8045.7 eV. Der Strahl wird durch einen Spalt mit den Dimensionen 0.04 mm x 8 mm begrenzt, trifft dann auf die Probe und gelangt durch eine Apertur von 0.2 mm zum Detektor.<sup>118</sup> Zum Schutz des Detektors wird der Strahl im Bereich der Totalreflexion ( $q_z < 0.143 \text{ \AA}^{-1}$ ) durch einen Nickelabsorber abgeschwächt. Es wird eine Auflösung von  $\delta q_z = 0.003 \text{ \AA}^{-1}$  erhalten. Alle Daten wurden auf die Eingangsintensität normiert. Die variierende Ausleuchtung der Probe in Abhängigkeit des Winkels wurde berücksichtigt.

Um bei konstanter Luftfeuchtigkeit messen zu können wurde eine nach außen hin abgedichtete Zelle verwendet (s. Abb. 3.2). Die Probe wurde in der Zelle senkrecht eingespannt und ein Gefäß am Fuße der Probe diente einer konstanten Einstellung der Luftfeuchtigkeit (0 % bei Befüllung mit Phosphorpentoxid und nahezu 100 % bei Befüllung mit Wasser). Der Strahleintritt und -austritt wurde durch zwei Kaptonfenster gewährleistet.

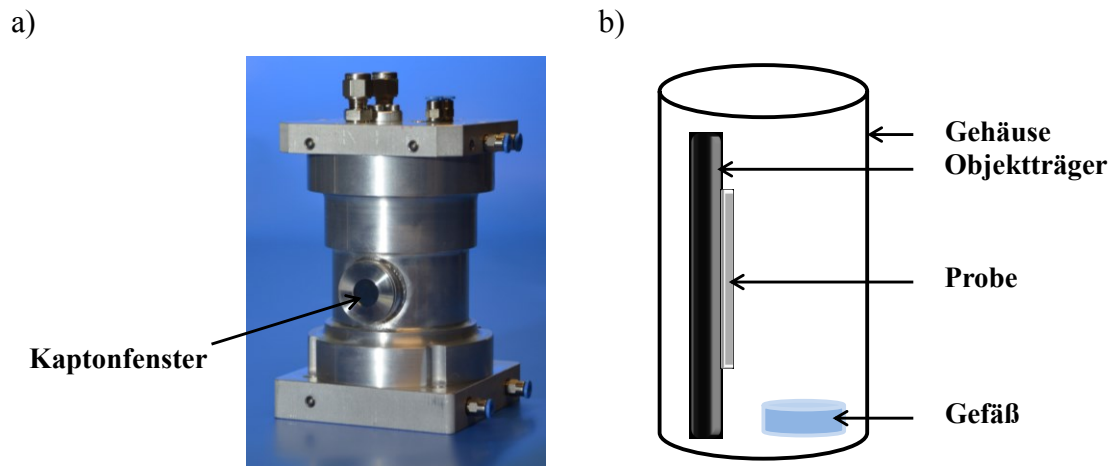


Abb. 3.2: Luftfeuchtigkeitszelle für Röntgenreflektivitätsmessungen in Berlin. Die Feuchtigkeit kann über die Füllung des Gefäßes kontrolliert werden. Die Probe ist auf einen Objektträger gespannt und der Strahl wird durch zwei Kaptonfenster geleitet. a) Foto der Feuchtigkeitszelle und b) schematische Skizze des Schnitts durch die Zelle.

### 3.3.2. Neutronenreflektometrie

Messungen wurden hauptsächlich an der Neutronenquelle BERII am HZB durchgeführt. Hier wurde hauptsächlich am Instrument V18 gemessen (s. Abb. 3.3).<sup>119</sup> Dies ist ein Flugzeit (TOF)-Reflektometer zur Untersuchung von weicher Materie. Kernstück des Gerätes sind die Chopper (FZJ, Jülich, Deutschland), welche eine zeit- und geschwindigkeitsaufgelöste Detektion der Neutronen ermöglichen. Chopper 1, 2a und 2b schnüren dabei Neutronenpakete aus dem kontinuierlichen Strahl der Neutronenquelle. Die Neutronen in diesen Pulsen haben unterschiedliche Geschwindigkeiten und der Strahl zieht sich in die Länge. Chopper 3 verhindert, dass zu schnelle oder zu langsame Neutronen in den Puls davor oder danach laufen. Diese Neutronenpulse treffen auf die Probe, werden reflektiert und über einen Positions-sensitiven Detektor registriert. Ein Goniometer, auf dem die Probe sitzt, ermöglicht die Abdeckung eines  $q_z$ -Bereiches bis zu  $0.4 \text{ \AA}^{-1}$ .  $q_z$  ist dabei abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  und dem Streuwinkel  $\theta$ . Die Gesamtauflösung setzt sich aus der Wellenlängen- und der Winkelauflösung zusammen, welche im optimalen Fall beide gleich eingestellt sind. In dieser Arbeit wurde mit Wellenlängenaufösungen zwischen 1 % und 10 % gemessen, die zu Gesamtauflösungen von 1.4 % bis 14 % führen. Um einen möglichst breiten  $q_z$ -Bereich abzudecken, wurden bis zu 3 Winkeleinstellungen gewählt bei Messzeiten von bis zu 5 Stunden für eine komplette Kurve.

Off-spekulare-Daten wurden aufgrund einer fehlenden Strahlblockierung, welche den Direktstrahl bei geöffneter Blende ausfiltern kann, nicht aufgenommen, da die Messdaten bei geringer Blendenweite der Blende 4 aufgenommen wurden. Näheres zum Aufbau wird in der weiterführenden Literatur beschrieben.<sup>54,119-121</sup> Wenn nicht anders vermerkt, wurde dieses Gerät verwendet.

## Experimenteller Teil

Weiterhin wurde ein TOF-Instrument (D17) am Institut Laue-Langevin (ILL) in Grenoble verwendet.<sup>122</sup> Mit Hilfe zweier Chopper wird der Strahl gepulst. Abgedeckt wurde ein  $q_z$ -Bereich bis zu  $0.4 \text{ \AA}^{-1}$  bei Winkeleinstellungen von  $0.8^\circ$  und  $3.8^\circ$  und einer Messzeit von 1.5 Stunden. Die Auflösung ist abhängig von der Wellenlänge und kann zwischen 0.5 und 20 % bezüglich  $q_z$  eingestellt werden. Detektiert wird mit einem zwei-dimensionalen Detektor der Größe  $250 \text{ mm} \times 500 \text{ mm}$ .

Geräte mit fixen Wellenlängen von  $0.466$  bzw.  $0.428 \text{ nm}$  wurde mir am HZB mit V6<sup>123</sup> und am Heinz Maier-Leibnitz Zentrum (HMLZ) mit NREX<sup>124</sup> zur Verfügung gestellt. Durch Drehung der Probe wird der Einfallswinkel und somit  $q_z$  variiert. Die Gesamtauflösung für  $q_z > 0.06 \text{ \AA}^{-1}$  beträgt  $0.002 \text{ \AA}^{-1}$ . Detektiert wurde am NREX mit einem Positions-sensitiven Detektor der Größe  $200 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$ . Am V6 wurde hauptsächlich mit einem Lineardetektor gearbeitet.

Messungen erfolgten zur Minimierung des Hintergrunds durch inkohärente Streuung vorwiegend in  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Reduktion und Normierung der Daten wurde mit der jeweiligen betriebseigenen Software durchgeführt. Die Rohdaten wurden dabei auf die Intensität des Direktstrahls normiert. Zur Datenanalyse wurde das Fitprogramm Motofit<sup>112</sup> verwendet. Erste Fitparameter (Anzahl der Schichten, trockene Schichtdicke, bekannte SLDs) konnten über Messungen der Röntgenreflektivität (XRR) der Proben und aus der Literatur erhalten werden.

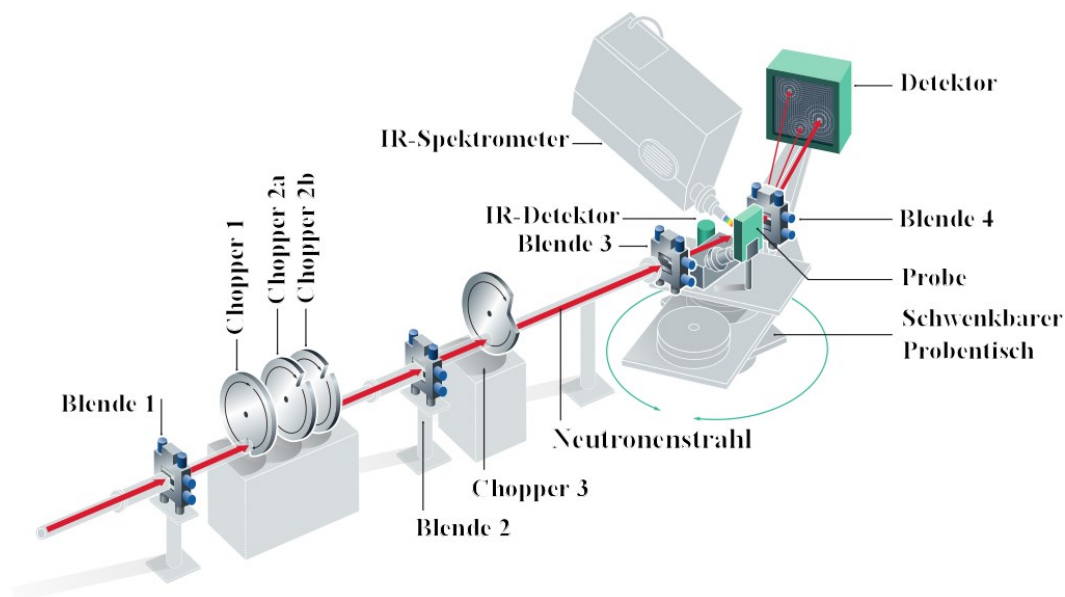


Abb. 3.3: Aufbauskeizze des V18 am HZB in Berlin. Bildquelle: HZB / E. Strickert.<sup>125</sup> Es handelt sich dabei um ein TOF-Reflektometer. Das Chopper-System ermöglicht eine zeit- und geschwindigkeitsaufgelöste Detektion von Neutronen. Der von links einfallende Neutronenstrahl trifft auf die Probe, welche mit einem Goniometer unter verschiedenen Winkel positioniert kann, und wird dann auf einen Positions-sensitiven Detektor gelenkt.



### 3.3.3. ATR-FTIR

In Berlin wurden ATR-FTIR-Spektren in Kombination mit NR-Messungen an V18 aufgenommen. Hierzu diente ein Infrarotspektrometer der Firma Bruker (Vertex 70, Bruker Optik GmbH, Deutschland), dessen Strahlengang senkrecht zum Neutronenstrahl verläuft. Der IR-Strahl wird über eine Linse mit Brennweite 400 mm auf das ATR-Eintrittsfenster des Lipid-beschichteten ATR-Kristalls fokussiert und mehrfach im Kristall reflektiert, wobei das evaneszente elektrische Feld Molekülschwingungen in der Lipidschicht anregt. Nach Austritt aus dem ATR-Kristall wird der IR-Strahl über eine gleiche Linse wieder verbreitert und anschließend mittels einer Linse der Brennweite 43 mm auf den Detektor fokussiert. Der genaue Aufbau findet sich in der Literatur.<sup>54-55,82,119-120</sup> Als Substrat und gleichzeitig ATR-Kristall wurde ein runder Silicium-Block mit Eintrittsfenstern im Winkel von  $45^\circ$  verwendet. Bei einem Durchmesser von 60 mm und einer Dicke von 10 mm wird der Strahl dreimal intern reflektiert bevor er wieder austritt (s. Abb. 3.4).

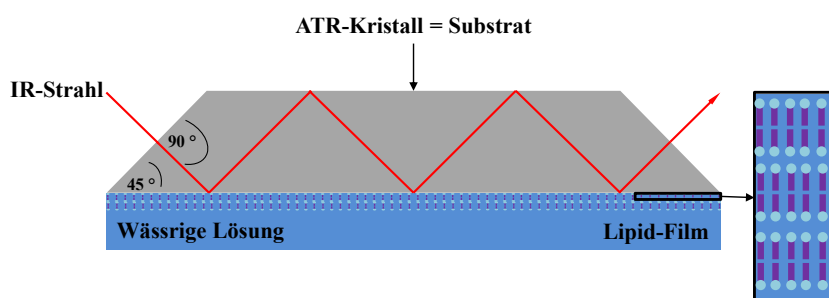


Abb. 3.4: IR-Strahlengang durch den ATR-Kristall aus Silicium.

Detektiert wurde die IR-Strahlung mit einem D(La)TGS-Detektor. Die DTGS-Kristalle sind zur Verbesserung der pyroelektrischen Eigenschaften mit L-Alanin (La) dotiert. Dabei wird die Empfindlichkeit der Kristalle erhöht und eine dauerhafte Depolarisation bei Erwärmung über die Curie-Temperatur minimiert. Während der Messung wurde das Geräteinnere mit getrocknetem Stickstoff gespült um die Wasser- ( $3500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ ) und Kohlenstoffdioxid-Banden (bei  $2340 \text{ cm}^{-1}$ ) der Atmosphäre zu reduzieren. Für jede Messung wurde über 128 Scans gemittelt, die Auflösung betrug 4 bzw.  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Vor den eigentlichen Messungen wurde ein Hintergrundspektrum mit mindestens 128 Scans aufgenommen. Hierfür wurde ein unbeschichteter Silicium-Kristall gegen  $\text{D}_2\text{O}$  vermessen. Als Lichtquelle wurde eine MIR (mittleres Infrarot)-Strahlungsquelle verwendet. Im Interferometer kam ein KBr-Strahlenteiler zum Einsatz. Die Daten wurden mit der Software Opus 6.5 (Bruker Optik GmbH) ausgewertet.

Für zeitgleiche NR- und IR-Messungen wurden zwei verschiedene Messzellen verwendet. Bei der ersten handelt es sich um eine Flüssigkeitszelle (s. Abb. 3.5a) zur temperaturkontrollierten Messung unter Flüssigkeiten. Sie wurde in der Werkstatt des HZB angefertigt. Die Inkubationslösung wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (MCP

# Experimenteller Teil

Standard, Ismatec, Wertheim, Deutschland) in einem geschlossenen Kreislauf über die Probe geleitet. Durch Zugabe zusätzlicher Stoffe in ein externes Ausgleichsgefäß konnte dabei die Zusammensetzung der Inkubationslösung sukzessive variiert werden.

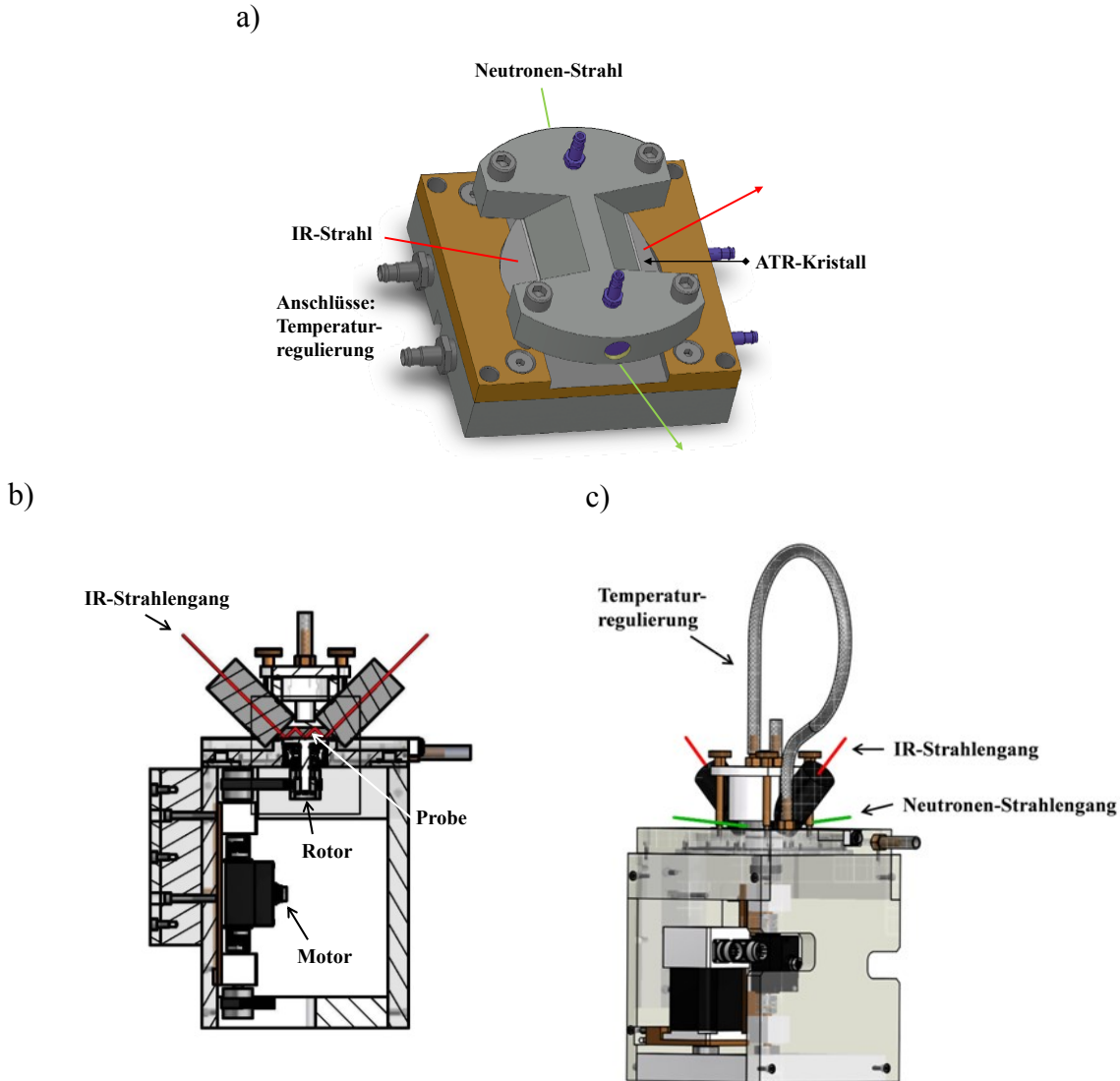


Abb. 3.5: a) Schematische Darstellung der Flusszelle und (b, c) der Scherzelle. Beide Zellen ermöglichen eine zeitgleiche Erhebung von NR- und IR-Daten. Die jeweiligen Strahlengänge sind für IR-Strahlung in Rot und für NR-Strahlung in Grün eingezeichnet. Mit der Scherzelle können Scherraten zwischen 0 - 6000 rpm realisiert werden. Ein Schnitt durch die Scherzelle ist in b) zu sehen.

Eine zweite Messzelle ermöglichte neben einer temperaturkontrollierten *In-situ*-Messung auch das Applizieren von Scherraten zwischen 0 und 6000 rpm an der eingebauten Probe. Dabei konnte jedoch kein Flüssigkeitsaustausch erfolgen. Durch die Kegelgeometrie des Scherkopfs wurde gewährleistet, dass die Scherrate an allen Stellen der Oberfläche gleich groß ist. Der Abstand von Kegel zum Substrat steigt dabei mit zunehmender Entfernung vom Drehzentrum linear an. Der Einfluss der ansteigenden Bahngeschwindigkeit wird

## Experimenteller Teil

somit durch den zunehmenden Abstand kompensiert. Der Durchmesser des Kegels betrug 43 mm, sein Öffnungswinkel  $177.2^\circ$  und der Abstand seiner Spitze vom Substrat 0.5 mm. Ein Wasserkreislauf durch die Ummantelung des Probenkopfs ermöglichte eine Temperaturregulierung zwischen 5 und  $60^\circ\text{C}$  mit einer Genauigkeit von  $0.1^\circ\text{C}$ . Die Temperaturmessung erfolgte mit einem Pt100-Sensor nahe der Probe. Die Scherzelle wurde in der feinmechanischen Werkstatt der Angewandten Physikalischen Chemie (APC) der Universität Heidelberg nach den technischen Zeichnungen von R. Jehle angefertigt (s. Abb. 3.5b, c).

### 3.3.4. Spektrale Ellipsometrie

Gemessen wurde mit einem spektroskopischen Ellipsometer M44<sup>®</sup> der Firma J. A. Woollam Co. Inc. (Lincoln, USA) unter einem Einfallswinkel von  $75^\circ$ . Linear polarisiertes Licht, welches von der Probe reflektiert wird, wird mit einem Calcit-Kristall erzeugt. Nach der Reflexion passiert das Licht einen Analysator (Polarisator, welcher mit 60 Hz rotiert) und trifft dann auf den Detektor, welcher das Signal simultan für 44 verschiedene Wellenlängen erfasst (s. Abb. 3.6). Eine Xenon-Bogenlampe mit einem Spektralbereich von  $\lambda = 400 - 800\text{ nm}$  diente als Lichtquelle.

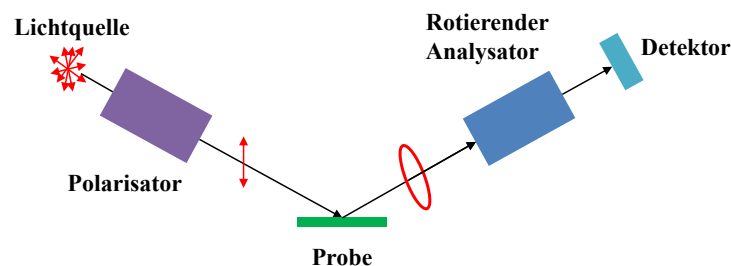


Abb. 3.6: Apparativer Aufbau eines Ellipsometers mit rotierendem Analysator. Die Polarisationsebene des Lichts ist in Rot dargestellt.

Zur Kalibrierung und Bestimmung des exakten Einfallswinkels wurde ein thermisch oxidiertes Silicium-Kristall verwendet (Schichtdicke  $\text{SiO}_2$ : 25 nm). Die Bestimmung der Schichtdicken erfolgte mit der Herstellersoftware WVASE32<sup>TM</sup> über ein Cauchy-Modell mit variierenden Parametern  $A$  und  $B$ . Für Messungen am Silicium-Wafer wurde das Modell  $\text{Si\_Jell}$  verwendet. Dieses enthält die optischen Konstanten für Silicium, basierend auf den Untersuchungen von Jellison *et al.*<sup>126</sup> Für Messungen unter Wasser wurde der entsprechende Parameter der Software auf Wasser gesetzt. Kinetikmessungen wurden innerhalb einer Flüssigzelle, gebaut in der feinmechanischen Werkstatt der APC und entworfen durch R. Jehle, durchgeführt (s. Abb. 3.7). Mögliche Probenmaße liegen, beschränkt durch die Dimensionen der Zelle, bei einem Durchmesser von 50 mm und einer Höhe von 3 mm. Die gesamte Zelle fasst etwa 10 mL Flüssigkeit. Die Strahlführung

## Experimenteller Teil

erfolgt über Fenster aus synthetischem Quarzglas mit einem Durchmesser von 12.5 mm und einer Dicke von 2 mm.

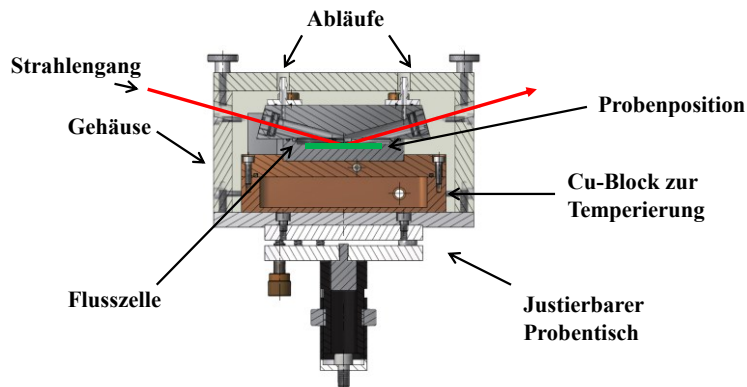


Abb. 3.7: Schnitt durch die Flüssigzelle für Kinetikmessungen unter Flüssigkeit am Ellipsometer. Der Zufluss befindet sich mittig am Fuß der Flusszelle und ist durch den Schnitt nicht zu sehen.

Zur Temperierung wurde ein wasserdurchflossener Messtisch eingesetzt, welcher Temperaturen zwischen 20 - 40 °C aufrechterhalten kann. Kernstück ist ein Kupferblock, welcher die Wärme speichert und für eine konstante Temperatur in der Flüssigzelle sorgt. Ein Gehäuse aus Plexiglas stabilisierte zusätzlich die Temperaturen. Ein weiterer interner Kreislauf wurde über eine Peristaltik-Pumpe (MCP Standard, Ismatec, Wertheim, Deutschland) unterhalten und ermöglichte Konzentrationsänderungen der Inkubationsflüssigkeit.

### 3.3.5. AFM

AFM-Messungen wurden mit einem SOLVER NEXT SPM von NT-MDT (Moskau, Russland) durchgeführt. Messungen erfolgten im Nicht-Kontakt-Modus mit einem Silicium-Cantilever des Typs NSG01 (von NT-MDT) mit leitender Goldbeschichtung. Die Ausmaße des Cantilevers betragen 125 x 30 x 2 µm mit einer Resonanzfrequenz von typischerweise 150 kHz und eine Kraftkonstante von 5.1 N/m. Die Größe der gescannten Bereiche lag zwischen 30 und 50 µm mit einer Punktdichte von einem Pixel pro 0.1 µm. Gescannt wurde mit einer Frequenz von 0.5 Hz. Die Auswertung und Darstellung der Bilder erfolgte mithilfe der Software Gwyddion (Version 2.31).

### 3.3.6. DSC

DSC-Messungen wurden an einem MicroCal VP-DSC der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland) durchgeführt, das freundlicherweise von Prof. Tanaka (Physikalische Chemie von Biosystemen, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Das Volumen der Tiegel betrug etwa 0.5 mL. Es wurde mit Lipidkonzentrationen zwischen 0.3 und 1 mM gearbeitet. Die Lösungen wurden mittels eines Vortexers für 10 min bei Raumtemperatur suspendiert und dann mit einer Heizrate von 20 °C pro Stunde gemessen. Wasser diente als Referenzprobe.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Probenpräparation

Die Probenpräparation der Lipid-Oligolagen erfolgte wie in 3.2 beschrieben. Eine Charakterisierung der Oberflächen fand vor den NR-Messungen über XRR-Messungen statt. Betrachtungen der Proben vor den ellipsometrischen Untersuchungen erfolgten teilweise über AFM-Messungen. Die Phasenübergangstemperaturen der verwendeten Lipide wurden mittels DSC-Messungen bestimmt. Die Ergebnisse der Charakterisierungen sollen in diesem Kapitel dargestellt werden.

#### 4.1.1. Charakterisierung der verwendeten Lipide mittels DSC-Messungen

Um sicher zu gehen, dass das verwendete DMPC nicht verunreinigt war, wurden DSC-Messungen durchgeführt. Dabei wurden die Phasenübergangstemperaturen für undeutertes, kopfdeutertes, kettendeutertes und vollständig deutertes DMPC bestimmt, da auch mit deuterierten Lipiden gearbeitet wurde (s. 4.3). Die ermittelten Temperaturen gaben den Temperaturbereich für die weiteren Messungen vor. Experimente wurden mit Lipiden in der Gelpase durchgeführt, das heißt, die Temperatur der Messungen sollte unterhalb der Hauptphasenübergangstemperatur liegen.

Abb. 4.1 zeigt eine DSC-Messung von undeutertem DMPC. Es konnte ein Signal bei  $T_m = 24.25 \text{ °C}$ , entsprechend dem Hauptphasenübergang, erhalten werden, welcher laut Literatur in einem Bereich zwischen  $22.5$  und  $25 \text{ °C}$  liegt.<sup>127</sup> Dieser tritt beim Übergang von der  $P_{\beta'}$  zur  $L_{\alpha}$  Phase ein. Eine Vorumlagerung, gemäß des Übergangs von  $L_{\beta'}$  zu  $P_{\beta'}$ , konnte bei  $T_{pre} = 14.05 \text{ °C}$  beobachtet werden. Dies liegt ebenfalls im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte ( $9 - 18 \text{ °C}$ ).<sup>127</sup> Über die Integration der erhaltenen Kurven kann die Änderung der Enthalpie ( $\Delta H$ ) bei Phasenübergängen bestimmt werden. Dabei hängt ihr Wert von den gewählten Integrationsgrenzen ab und variiert in der Literatur stark.<sup>43,127</sup> Es finden sich Werte der Enthalpieänderung für den Hauptphasenübergang des vollprotonierten DMPCs in einem Bereich zwischen  $4.5$  und  $7.5 \text{ kcal/mol}$  ( $18.8 - 31.4 \text{ kJ/mol}$ ).<sup>127-128</sup> In dieser Arbeit wurden Werte von  $5.94 \text{ kcal/mol}$  für den Hauptübergang bzw.  $0.92 \text{ kcal/mol}$  für die Vorumlagerung erhalten.

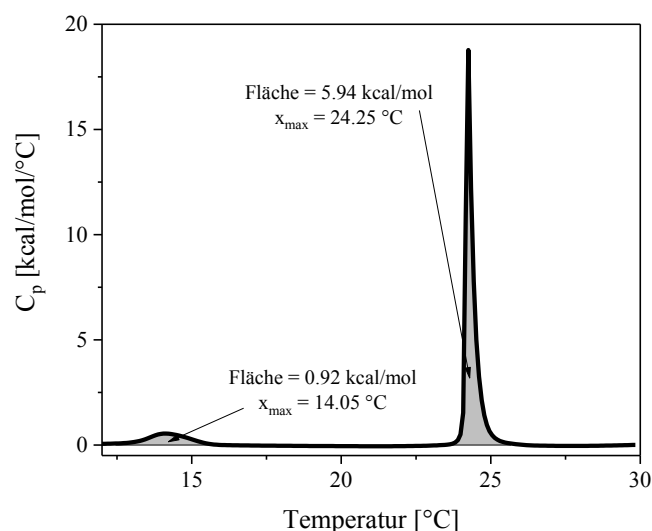


Abb. 4.1: DSC-Messung an DMPC. Aufgetragen ist die Wärmekapazität gegen die Temperatur. DMPC der Konzentration 1 mM wurde in Lösung gebracht und bei einer Heizrate von 20 °C pro Stunde gegen Wasser gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit Microcal Origin der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland).

Für die Messungen zur Lokalisierung von PAH bzw. HS in den Lipiden (s. 4.3) wurden deuterierte Lipide benötigt. Zur korrekten Einstellung der Temperatur während der Messung wurden DSC-Messungen an den verschiedenen deuterierten Proben durchgeführt (s. Abb. 4.2). Die ermittelten Temperaturen zu den Phasenübergängen finden sich in Tab. 4.1. Mit zunehmendem Deuterierungsgrad sinken diese. Für die Phasenübergangstemperatur des kettendeuterierten Lipids DMPC-d54 findet sich in der Literatur ein Wert von etwa 20 °C.<sup>129-130</sup> Dieser Wert liegt ungefähr 4 bis 5 °C unter dem des vollprotonierten DMPCs und stimmt gut mit der in dieser Arbeit gefundenen Temperatur von 20.13 °C überein.

Die erhaltenen Enthalpieänderungen sind ebenfalls in Tab. 4.1 zu sehen. Für DMPC-d54 ist ein Literaturwert für  $\Delta H$  des Hauptphasenübergangs von 14.5 kJ/mol (3.46 kcal/mol) bekannt.<sup>130</sup> Damit liegt der Wert etwas unter dem hier erhaltenen von 4.8 kcal/mol, jedoch wurde bereits erwähnt, dass die Wahl der Integrationsgrenzen die Enthalpieänderung stark beeinflussen.<sup>43,127</sup> Die Temperaturen des Phasenübergangs und deren Enthalpieänderungen nehmen mit zunehmendem Deuterierungsgrad ab. Dies wurde auch in der Literatur gefunden. Für verschiedene Phospholipide wurde für den Hauptphasenübergang eine Enthalpieabnahme pro deuterierter CH<sub>2</sub>-Ketten-Gruppe von 272 J/mol angegeben. Die Temperatur des Hauptphasenübergangs liegt für deuterierte Lipide 3 - 5 °C unter der Temperatur für korrespondierende nicht-deuterierte Lipide.<sup>131</sup>

Die DSC-Messungen zeigten für alle Lipide die erwarteten Phasenübergänge. Das DMPC konnte somit ohne weitere Aufarbeitung verwendet werden. Des Weiteren war es möglich durch die Bestimmung der Hauptphasenübergänge der verschiedenen Lipide die Temperatur während der Experimente so einzustellen, dass das DMPC in der  $P_{\beta}$ -Phase vorlag.



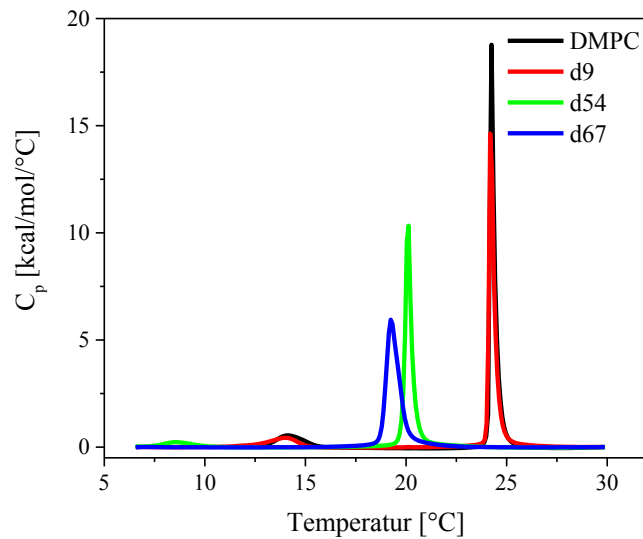


Abb. 4.2: DSC-Messungen an undeutertem und deuteriertem DMPC. Aufgetragen ist die Wärmekapazität gegen die Temperatur. DMPC wurde in einer Konzentration von 0.3 mM für das deuterierte DMPC und 1 mM für das undeuterte DMPC in Lösung gebracht und bei einer Heizrate von 20 °C pro Stunde gegen Wasser gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit Microcal Origin der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland).

	$T_m$ [°C]	$T_{pre}$ [°C]	$\Delta H_m$ [kcal/mol]
DMPC	24.3	14.1	5.9
DMPC-d9	24.2	14.0	5.3
DMPC-d54	20.1	8.6	4.8
DMPC-d67	19.2	-	4.8

Tab. 4.1: Aus DSC-Messungen ermittelte Phasenübergangstemperaturen und Enthalpieänderungen. Gemessen wurden unterschiedlich deuterierte Lipide. Ermittelt wurden Hauptphasenübergangs- ( $T_m$ ) und Vorumlagerungstemperatur ( $T_{pre}$ ) sowie die Enthalpieänderung ( $\Delta H_m$ ) während des Hauptphasenübergangs. Die Datenanalyse erfolgte mit Microcal Origin der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland).

## 4.1.2. Charakterisierung mittels AFM

AFM-Messungen dienen der Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit. Durch einen feinen Kratzer in der Beschichtung sollte es möglich sein, die Schichtdicke der Probe ungefähr zu bestimmen und diese dann mit den ellipsometrischen Messungen zu vergleichen. Abb. 4.3 zeigt die AFM-Messung einer Probe, welche mit einer DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L rotationsbeschichtet wurde. Der Kratzer (linke Seite, obere Ecke) sollte die Bestimmung der Schichtdicke ermöglichen. Im Übergangsbereich zwischen Kratzer und intakter Lipid-Beschichtung wurde Lipid aufgehäuft, so dass hier eine erhöhte Schichtdicke von etwa 1100 nm ermittelt wurde (s. Höhenprofil 1). Aus der Differenz der Höhe der intakten Lipid-Beschichtung und des Kratzers konnte eine Dicke  $d$  von etwa 120 nm ausgelesen werden.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Höhenprofile der AFM-Messungen zeigten, dass Löcher in den Filmen existieren, die vermutlich teilweise bis fast auf das Substrat reichten und so eine weitere Möglichkeit der Schichtdickenbestimmung boten. Neben den tiefsten Löchern (80 nm, Profil 2) zeigten sich weitere Löcher unterschiedlicher Tiefe (s. Profil 4). Das Profil für die Strecke 3 zeigte hingegen eine sehr homogene Beschichtung.

Ellipsometrische Messungen an derselben Probe ergaben eine Schichtdicke von  $(76.9 \pm 0.1)$  nm. Die gemessene Schichtdicke ist wesentlich geringer, als die aus dem Höhenprofil 1 ausgelesene. Dies liegt eventuell an einer Beschädigung und Abtragung des Substrats durch den Kratzer. Die ermittelte Schichtdicke der Beschichtung wird dadurch größer. Die ellipsometrisch bestimmte Dicke ist jedoch mit der Lochtiefe aus Profil 2 vergleichbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Löcher bis auf das Substrat gehen. Aus dem Höhenprofil der tiefsten Löcher kann dann die Schichtdicke bestimmt werden.

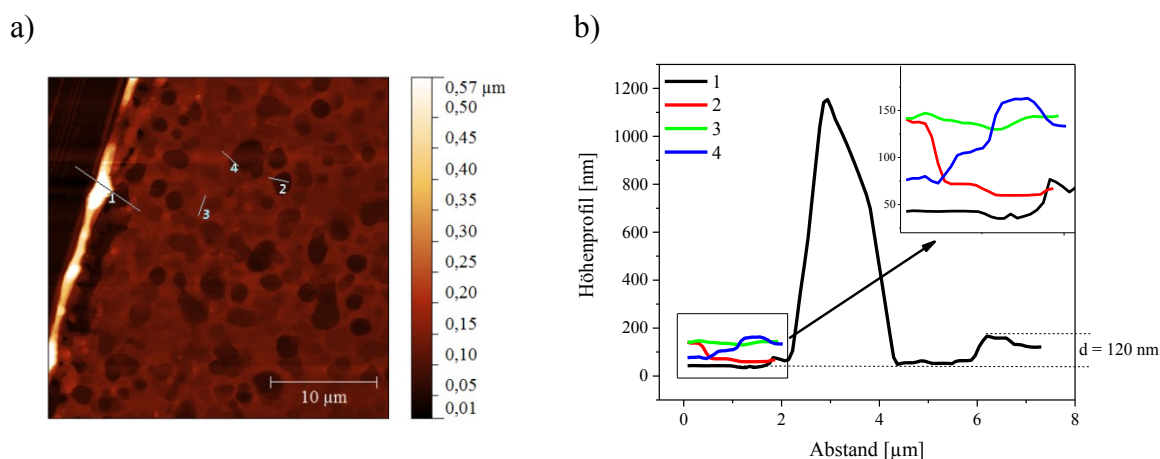


Abb. 4.3: a) AFM-Messung und b) Höhenprofile einer rotationsbeschichteten Probe. Verwendet wurde eine DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L. Der Kratzer (linke Seite, obere Ecke) sollte die Bestimmung der Schichtdicke ermöglichen. An der Grenzfläche des Kratzers zur Probe wurde jedoch Lipid aufgehäuft, so dass hier eine erhöhte Schichtdicke ermittelt wurde. Eine Beschädigung des Substrats durch den Kratzer führt auch außerhalb der Lipid-Anhäufung zu erhöhten Werten der Schichtdicken. Anhand der Löcher im Inneren des Films konnte eine Dicke von etwa 80 nm ausgelesen werden (s. Höhenprofil 2).

Ähnliche Profile wurden auch für Proben mit geringerer Schichtdicke erhalten (s. Abb. 4.4b). Ellipsometrische Messungen ergaben eine Schichtdicke von etwa 30 nm. Es wurden wieder kleine Löcher aufgenommen, welche über die gesamte Probenoberfläche verteilt waren und wahrscheinlich wieder bis auf das Substrat herunterreichten. Vermutlich entstanden sie bei der Präparation durch verdampfendes Chloroform. Unterschiedlich tiefe Löcher wie in Abb. 4.3 konnten hier nicht beobachtet werden. Die hellen Flecken im Bild sind Staubpartikel, welche sich nach der Präparation auf die Probe legten und dabei festtrockneten.

Abb. 4.4c zeigt das AFM-Bild der gleichen Probe nach 16 Tagen Lagerung unter nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit. Dabei konnte ein Zusammenwachsen der Löcher festgestellt

## Ergebnisse und Diskussion

werden. Ellipsometrische Messungen zeigten dabei aber keine Abnahme der Schichtdicke. Eine Umlagerung der Fehlstellen konnte bei sehr geringer Luftfeuchtigkeit (nahe 0 %) nicht beobachtet werden.

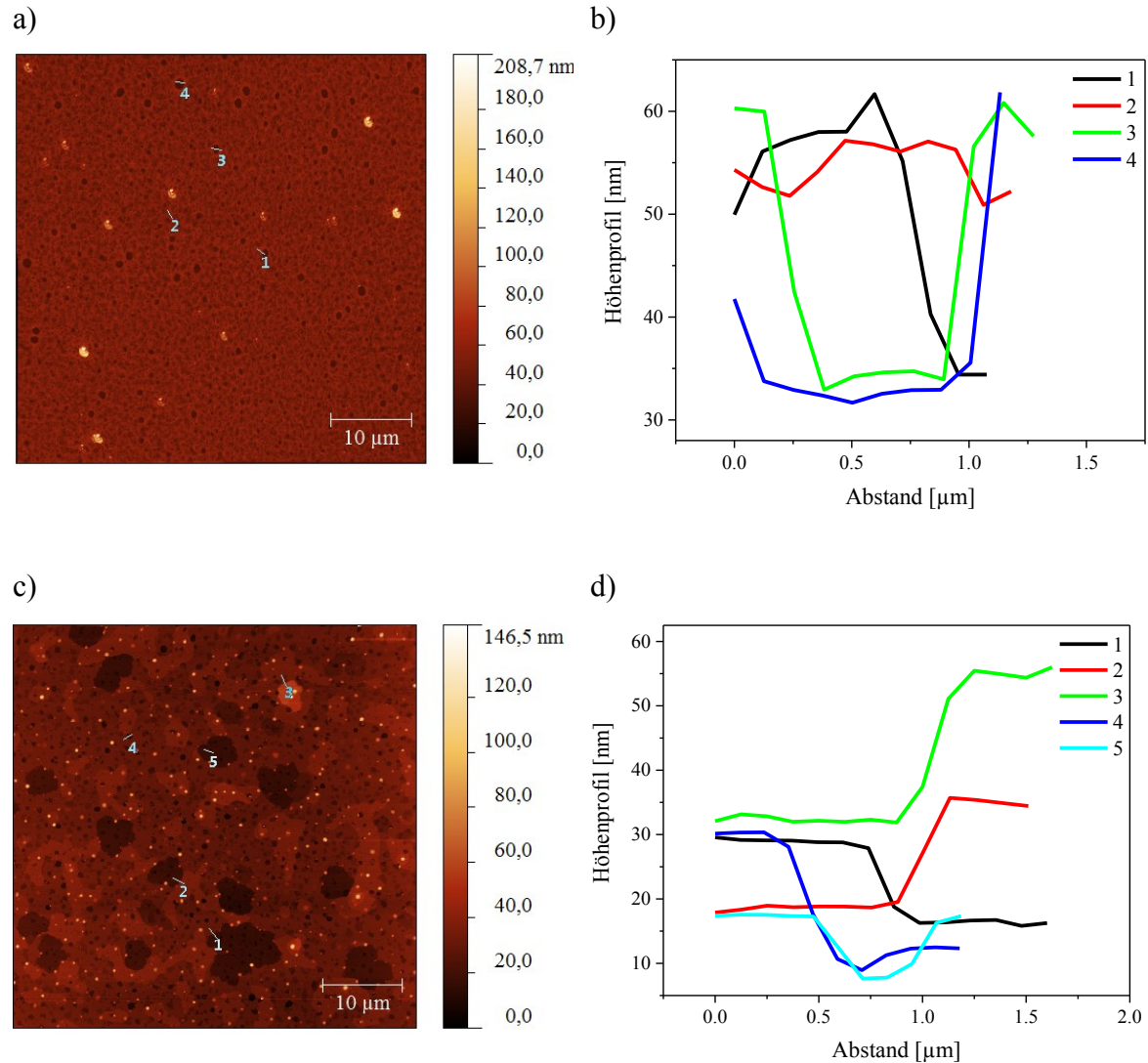


Abb. 4.4: a), c) AFM-Messungen und b), d) Höhenprofile einer rotationsbeschichteten Probe. Verwendet wurde eine DMPC-Lösung der Konzentration 5 g/L. Vermessen wurde die Probe direkt nach der Präparation (a, b) und nach 16 Tagen bei Lagerung unter 100 %iger Luftfeuchtigkeit (c, d).

Die Bestimmung der Schichtdicke mittels AFM ist nicht sehr genau. Daher wurden Schichtdickenbestimmungen vor allem am Ellipsometer durchgeführt. Das AFM gibt jedoch ein Höhenprofil der Probe wieder, welches wiederum nicht mittels Ellipsometer bestimmt werden konnte. Es gibt Aufschluss über die Homogenität der Proben und ihre Änderung bei Lagerung.

In der Literatur wurden AFM-Bilder sowohl von Mono- bzw. Bilagen<sup>132</sup> als auch von Multilagen<sup>133-134</sup> aufgenommen. Für die Multilagen konnte eine ähnliche Lochstruktur

gefunden werden. Erklärt wurde diese über eine Ausdünnung des Lipidfilms während der Rotationsbeschichtung, welche zu Brüchen der äußeren Lipidschichten und Lochformationen führt. Simonsen *et al.* gelang es auch die Strukturen *in situ* unter Wasser zu messen.<sup>133</sup> Verwendet wurden Mischungen aus verschiedenen Lipiden. Sie beobachteten dabei die Gruppierung der Lipide in Domänen bei Hydratisierung. Auch Perino-Gallice *et al.* fanden ein Zusammenwachsen der Lochstruktur nach Hydratisierung der multilamellaren Proben.<sup>135</sup> Die hier hergestellten Proben ähnelten denen aus der Literatur. Die Präparation mittels der Rotationsbeschichtung ist reproduzierbar.

### 4.1.3. Charakterisierung mittels XRR

XRR-Charakterisierungen der Proben erfolgten immer vor der eigentlichen NR-Messung. Über diese Experimente konnten erste Fit-Parameter wie Schichtanzahl und lamellare Schichtdicke der trockenen Probe ermittelt werden.

Aus der Lage der Bragg-Peaks kann die lamellare Schichtdicke, aus den Kiessig-Oszillationen die Gesamtschichtdicke und aus beiden wiederum die Anzahl der Schichten bestimmt werden. Für die Berechnungen wurden die Formeln (2.24) bzw. (2.22) verwendet. In Abb. 4.5a ist die Reflektivitätsmessung der Probe PAH900\_1 (s. 4.5) zu sehen. Die Position der Signale wurde über eine Regression mit einer Gauß-Funktion bestimmt. In Rot ist der Fit des Bragg-Peaks zu sehen, während die grünen Gaußkurven die Kiessig-Oszillationen zeigen. Die jeweiligen  $q_z$ -Werte der Oszillationen wurden entsprechend ihrer Ordnung  $n$  aufgetragen (s. Abb. 4.5b) und aus der Steigung wurde die Gesamtschichtdicke ermittelt. Im dargestellten Beispiel wurde ein Steigungs-Wert von  $(-112.4 \cdot 10^{-4} \pm 2.3 \cdot 10^{-4}) \text{ \AA}^{-1}$  erhalten, welcher einer Gesamtschichtdicke von  $(559 \pm 10) \text{ \AA}$  entspricht. Über die Position des Bragg-Peaks konnte ein lamellarer Abstand von  $(53.75 \pm 0.04) \text{ \AA}$  ermittelt werden. Aus den beiden Schichtdicken folgte dann eine Bilagen-Anzahl von  $10.40 \pm 0.02$ .

Die erhaltene Einzelschichtdicke entspricht den Literaturwerten von etwa  $53 \text{ \AA}$ .<sup>117</sup> Verwendet wurden DMPC-Lösungen mit einer Konzentration von 10 g/L. Diese wurden mit einer Geschwindigkeit von 4000 rpm auf das Substrat rotiert. In der Literatur wurde dieses Verfahren bei Verwendung verschiedener Konzentrationen und Rotationsgeschwindigkeiten beschrieben.<sup>117</sup> Durch Variation dieser Parameter können Oligobilagen unterschiedlicher Schichtdicke hergestellt werden.

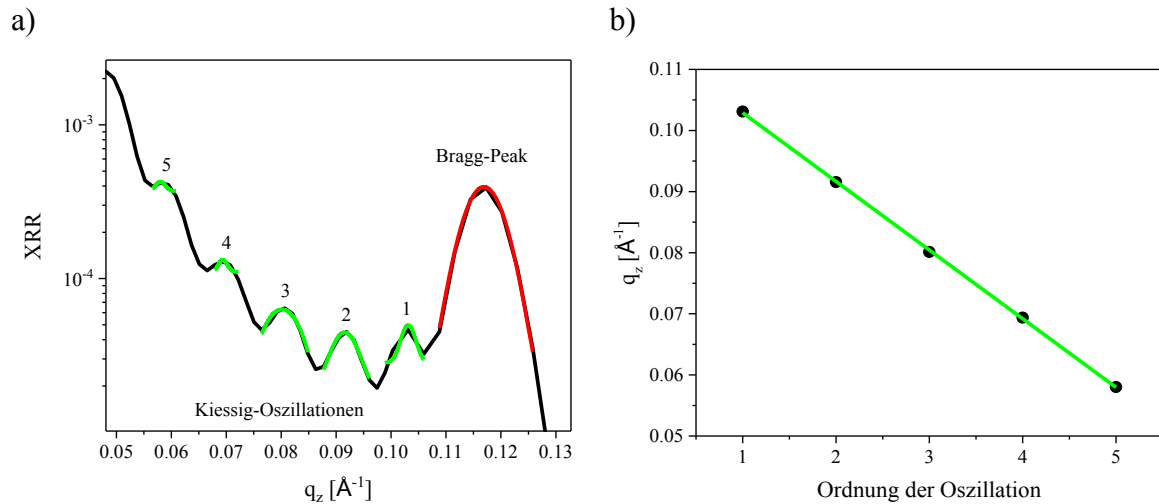


Abb. 4.5: a) Intensität des XRR-Signals in Abhängigkeit von  $q_z$  für die Probe PAH900\_1 (s. 4.5) und b) Auftragung der Positionen der Kiessig-Oszillationen in Abhängigkeit ihrer Ordnung. Positionsbestimmungen der Kiessig-Oszillationen und des Bragg-Peaks erfolgten über eine Regression mit einer Gauß-Funktion. Die zugehörigen Funktionen sind für den Bragg-Peak in Rot und für die Kiessig-Oszillationen in Grün dargestellt. Aus den Positionen ergeben sich die Gesamtschichtdicke der Probe und der lamellare Abstand. Die Probe wurde mit einer DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L rotationsbeschichtet.

Abb. 4.6 zeigt Reflektivitätskurven von Proben mit unterschiedlicher Gesamtschichtdicke. Die Oligolagen wurden durch Verwendung unterschiedlicher Lipidkonzentrationen mittels Rotationsbeschichtung aufgebracht, während die Multilagen mit der Airbrush-Methode appliziert wurden. Die Lage der Bragg-Peaks ändert sich nicht, jedoch verändert sich ihre Intensität und die Anzahl der Kiessig-Oszillationen. Während die Intensität des ersten Bragg-Peaks mit abnehmender Schichtanzahl geringer wurde, wurden die Kiessig-Oszillationen ausgeprägter. Ausnahme bildete die Adsorption zweier Bilagen (0.1 g/L, schwarze Kurve), welche weder einen ausgeprägten Bragg-Peak noch Kiessig-Oszillationen aufwies.

Die Intensität der Bragg-Peaks ist aber nicht nur von der Menge des adsorbierten Lipids abhängig, sondern wird vor allem auch durch die Ordnung der Lipidlagen bestimmt. Je mehr Peaks höherer Ordnung zu sehen sind, desto geringer ist die Rauigkeit der Probe. Die multilamellare Probe (blau) scheint somit auch gut geordnet gewesen zu sein und zeigte demnach eine geringe Rauigkeit. Die lamellaren Abstände betragen  $(54.36 \pm 0.23) \text{\AA}$ . Die Gesamtschichtdicke konnte anhand der XRR-Messung nicht mehr ermittelt werden, da die Kiessig-Oszillationen bei hohen Schichtdicken nicht mehr aufgelöst werden können. Somit blieb die Anzahl der Schichten für die multilamellare Probe unbekannt.

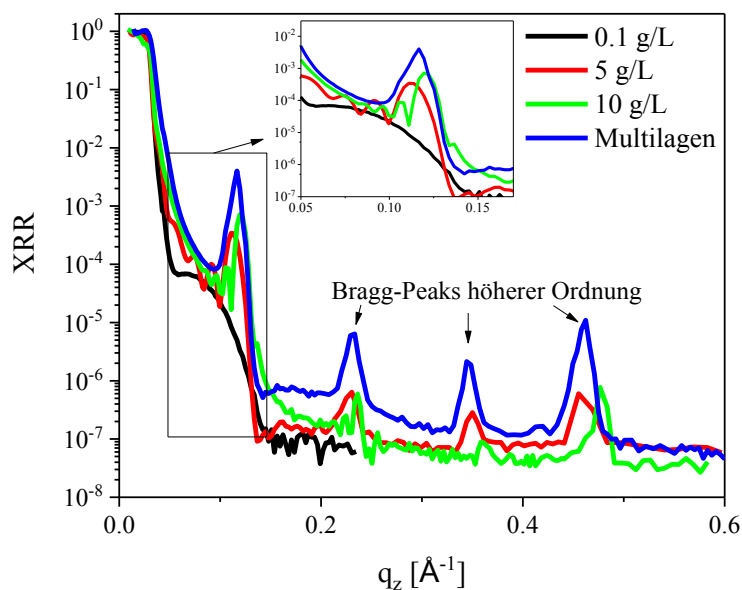


Abb. 4.6: XRR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für Proben variierender Lipid-Bilagenanzahl. Die Proben wurden rotationsbeschichtet. Die Konzentrationen variierten zwischen 0.1 und 10 g/L. Multilagen wurden mit der Airbrush-Technik aufgebracht. Es werden Bragg-Peaks erster und höherer Ordnung gezeigt.

Neben der Abhängigkeit der Reflektivität von der Anzahl der Schichten ist die Luftfeuchtigkeit der Umgebung von entscheidender Bedeutung. Abb. 4.7 zeigt Reflektivitäten einer Probe bei unterschiedlicher relativer Luftfeuchtigkeit (RH). Um diese zu erzeugen, wurde die Probe in eine Luftfeuchtigkeitszelle gespannt (s. 3.3.1). Der Behälter der Zelle wurde je nach gewünschter RH unterschiedlich befüllt. Wasser erzeugte eine nahezu 100 %ige RH, während Phosphorpentoxid die RH auf 0 % reduzierte. Die RH im Raum betrug etwa 26 %. Die lamellaren Schichtdicken variierten zwischen  $(53.2 \pm 0.2)$  Å für 0 % RH und  $(55.7 \pm 0.3)$  Å bei 100 % RH. Die Schichtanzahl blieb mit  $7.5 \pm 1$  konstant. Ein deutlicher Unterschied ist bei den Bragg-Peaks höherer Ordnung zu sehen. Bei 0 % RH konnte nur ein Peak 1. Ordnung aufgenommen werden, während mit zunehmender Luftfeuchtigkeit auch die Bragg-Peaks höherer Ordnung erscheinen. Wie bereits aus der Literatur bekannt, scheint die lamellare Ordnung mit zunehmender RH zu steigen und der Abstand der Lamellen nimmt leicht zu.<sup>136</sup>

Die Charakterisierungen der Proben zeigten eine reproduzierbare Präparation. Da die Proben später in wässriger Umgebung untersucht werden sollten, spielte die RH keine Rolle. Daher wurden alle weiter verwendeten Proben unter Raumbedingungen gelagert. Die Präparation erfolgte jeweils zeitnah vor der Messung.

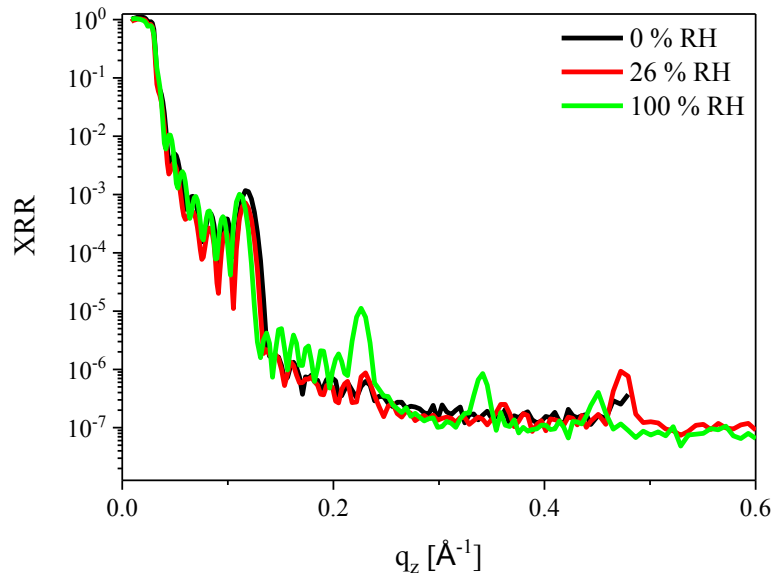


Abb. 4.7: XRR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für eine Probe in unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit. Verwendet wurde eine rotationsbeschichtete Probe. Die Konzentration der verwendeten DMPC-Lösung betrug 10 g/L. Zur Erzeugung unterschiedlicher RH wurde die Probe in eine Luftfeuchtigkeitszelle gespannt (s. 3.3.1). Der Behälter der Zelle wurde je nach benötigter RH unterschiedlich befüllt. Wasser erzeugte eine nahezu 100 %ige RH, während Phosphorpentoxid die RH auf 0 % reduzierte. Die RH im Raum betrug etwa 26 %.

## 4.2. Quellexperimente

Um die Hintergründe der Wechselwirkungen zwischen HS und PL besser zu verstehen, wurden in ersten Versuchen verschiedene Parameter variiert. Unter anderem sollte der Einfluss von elektrostatischen Wechselwirkungen auf das Quellverhalten durch Zugabe von Salzen und Änderung des pH-Werts der Inkubationslösung untersucht werden. Des Weiteren wurden auch verschiedene polymere Ersatzstoffe verwendet. Abermals lag hier der Schwerpunkt auf der unterschiedlichen Ladung der Moleküle und ihren elektrostatischen Wechselwirkungen. Untersucht wurde aber auch der Einfluss des MW und der Konzentration der PEs, welche in der Viskosupplementation für HS eine große Rolle zu spielen scheinen.

Aufgrund der Vielzahl der Versuche und der begrenzten Möglichkeit zur Durchführung von NR-Experimenten, wurde ein Großteil der Daten über ellipsometrische Messungen erhalten. Lediglich für PAH- und NaCl-Zugabe wurden NR-Messreihen zur Bestimmung der inneren Struktur durchgeführt. Mit ellipsometrischen Daten konnten keine Werte für den lamellaren Abstand der Bilagen ( $d_{lam,gequ}$ ) ermittelt werden. Dieser konnte nur über die mit dem Ellipsometer vermessene Gesamtschichtdicke ( $d_{ges,gequ}$ ) abgeschätzt werden. Da nur die Gesamtschichtdicke vermessen werden konnte, musste bei ellipsometrischen Messungen davon ausgegangen werden, dass die Lipidschichten während den Messungen stabil auf dem Substrat verbleiben. Bei Änderung der Anzahl der Bilagen,  $N$ , könnte keine quantitative Aussage über das Quellverhalten getroffen werden. Da die

Oligobilagen im Allgemeinen bei Inkubation stabil auf der Oberfläche bleiben, ist diese Annahme sinnvoll und es gilt:

$$N = \frac{d_{ges}}{d_{lam}} = \text{konst.} \quad (4.1)$$

Zur Berechnung der lamellaren Abstände im gequollenen Zustand  $d_{lam,gequ}$  wird die Anzahl der Bilagen benötigt, welche aus Schichtdickenmessungen ( $d_{ges,tr}$ ) an der jeweiligen trockenen Probe vor Inkubation und Kenntnissen über den lamellaren Abstand ( $d_{lam,tr}$ ) im trockenen Zustand berechnet werden konnten (Bezeichnungen s. Abb. 4.8). In der Literatur finden sich für lamellare Abstände von DMPC im trockenen Zustand Werte von etwa 53 Å.<sup>117</sup> Der gesuchte lamellare Abstand der gequollenen Probe wurde dann wie folgt berechnet:

$$d_{lam,gequ} = \frac{d_{ges,gequ} \cdot d_{lam,tr}}{d_{ges,tr}} = \frac{d_{ges,gequ}}{N} \quad (4.2)$$

Der Übersichtlichkeit halber wird jedoch meist der Quellkoeffizient ( $S$ ) angegeben, der aus dem Verhältnis der gequollenen Schichtdicke und der Dicke im trockenen Zustand gebildet wird:

$$S = \frac{d_{ges,gequ}}{d_{ges,tr}} \quad (4.3)$$

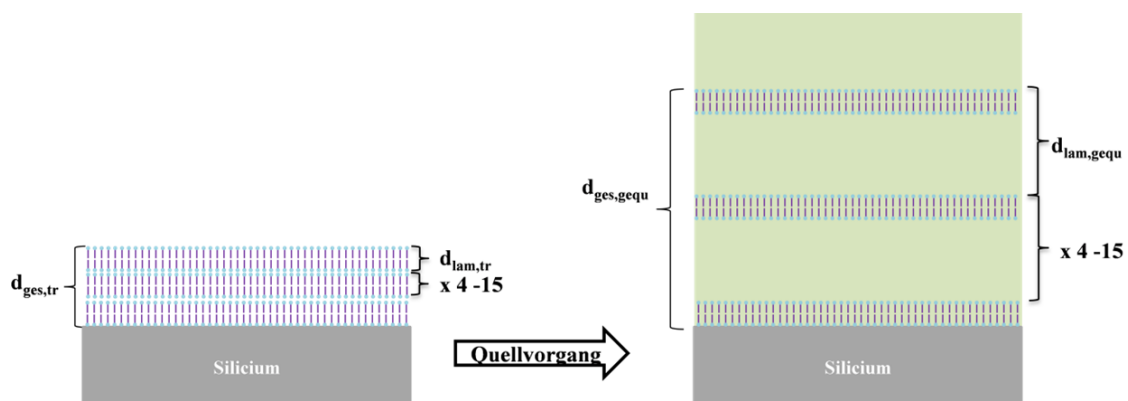


Abb. 4.8: Bezeichnung der verschiedenen Schichtdicken.

Zunächst sollte das Quellverhalten der Lipid-Oligolagen in reinem Wasser untersucht werden. Abb. 4.9 zeigt beispielhaft die Parameter einer Kinetikmessung in Abhängigkeit



## Ergebnisse und Diskussion

von der Zeit, welche aus dem Cauchy-Modell berechnet wurden. Zunächst wurde die Probe in trockenem Zustand vermessen. Nach Einstellen des Gleichgewichtswert (0 min) wurde Wasser hinzugefügt. Nach etwa 5 Stunden wurde ein neuer Gleichgewichtswert erreicht. Für die hier gezeigte Quellkinetik von Lipid-Oligolagen in Wasser wurde im Gleichgewichtszustand ein Quellfaktor von  $1.41 \pm 0.07$  ermittelt. Somit wurden für die ellipsometrischen Messungen höhere Werte erhalten, als aus den Literaturwerten der lamellaren Schichtdicke zu erwarten wäre. Für lamellare Abstände von  $53 \text{ \AA}$  im trockenen Zustand und von  $65 \text{ \AA}$  des hydratisierten Systems müssten Quellkoeffizienten von 1.23 erhalten werden. Tatsächlich ergaben sich in den meisten Fällen aus den ellipsometrischen Messungen etwas größere Koeffizienten.

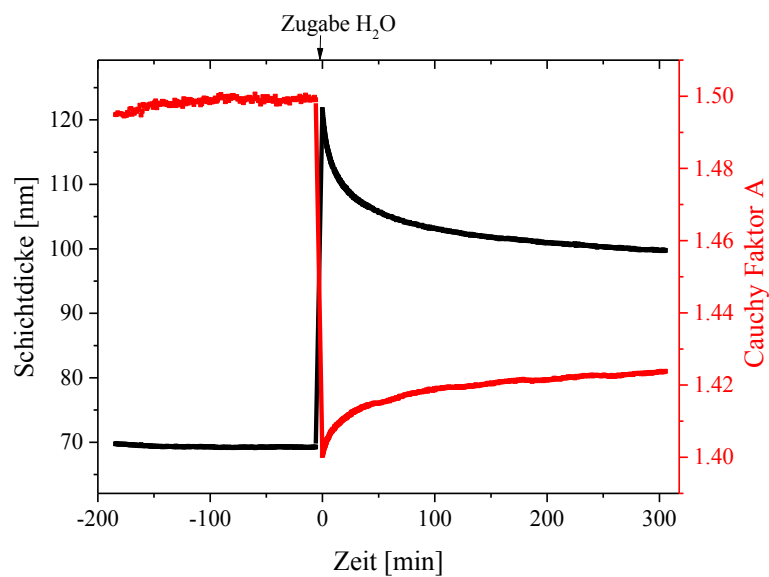


Abb. 4.9: Quellkinetik von DMPC-Oligolagen in reinem Wasser. Aufgetragen sind die Schichtdicke und der Brechungsindex  $A$  in Abhängigkeit von der Zeit, welche über ein Cauchy-Modell berechnet wurden.

Neben dem etwas höheren Koeffizienten fällt vor allem auf, dass direkt nach der Inkubation in Wasser eine sehr große Schichtdicke erhalten wurde. Diese sinkt dann mit zunehmender Zeit langsam auf einen Gleichgewichtswert mit einem Quellfaktor von etwa 1.41. Der Cauchy-Faktor  $A$  (entspricht für große Wellenlängen dem Brechungsindex), welcher mit zunehmendem Wassergehalt in den Lipidschichten sinken sollte, war zunächst relativ gering und suggerierte ebenfalls ein größeres Quellverhalten zu Beginn der Messung.

Die Skizze in Abb. 4.10 ist eine mögliche Erklärung zu den Vorgängen während der Inkubation. Substratgebundene DMPC-Oligolagen sind an Luft stabiler, wenn die Ketten-Regionen nach oben weisen. Wird jedoch Wasser hinzugegeben, so ist es günstiger, wenn die Kopfgruppen nach oben zeigen. Dies bedeutet nun, dass das Wasser beim Eindringen in die Schichten die oberste Monolage langsam ablöst. Dabei schiebt sich immer mehr Wasser zwischen die oberste Schicht und die Oligolagen. Dies wurde zunächst als

Quellen beobachtet, woraufhin der langsame Abtrag der gesamten Monolage begann. Wird nicht die gesamte Monolage im Gleichgewicht abgetragen, so kann es zu einer Vergrößerung des Quellkoeffizienten kommen, da nicht der einzelne lamellare Abstand sondern nur die Gesamtschichtdicke durch ellipsometrische Messungen ermittelt werden kann. Dieser Effekt scheint auch den Verlust einer Monolage und eine damit einhergehende Verringerung des Quellkoeffizienten überzukompensieren, sodass ein leicht erhöhter Koeffizient erhalten wird.

Weitere Artefakte können auftreten, wenn Schichten verloren gehen. Ist dies der Fall, so werden geringere Quellkoeffizienten erhalten.

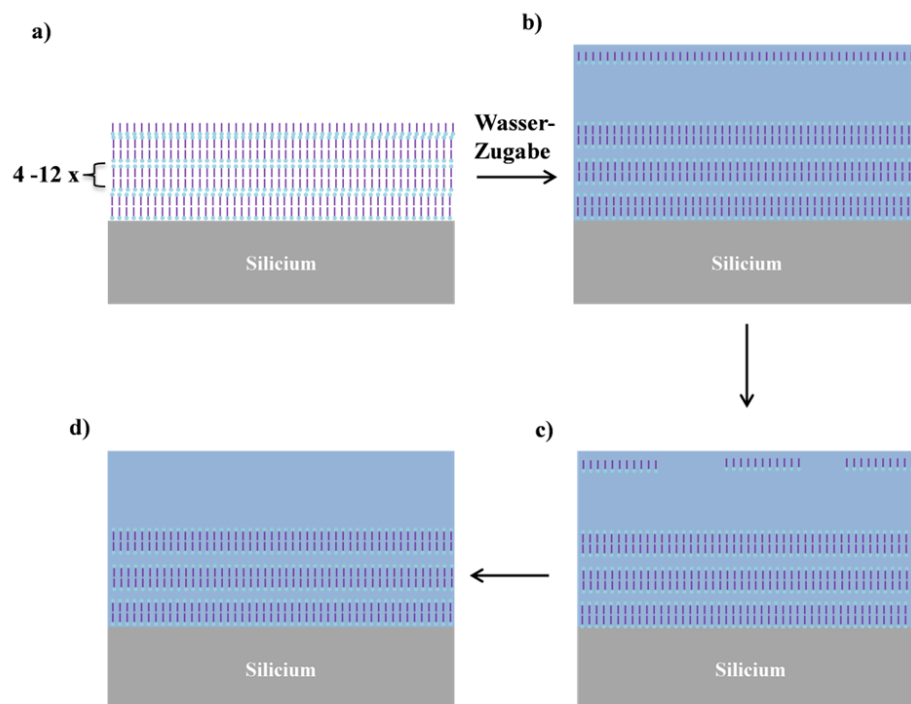


Abb. 4.10: Angenommene Vorgänge während des Quellvorgangs. a) Die trockene Probe wird b) in Wasser inkubiert. Die oberste Monolage löst sich und wird c) teilweise abgetragen. In d) ist die gesamte Monolage abgetragen.

### 4.2.1. Abhängigkeit des Quellverhaltens von der Konzentration polymerer Ersatzstoffe

HS liegt in einem gesunden Gelenk mit einer Konzentration von 2.85 g/L vor.<sup>4,65</sup> Bei Erkrankung an Arthrose nimmt die Konzentration ab.<sup>4</sup> In diesem Abschnitt soll daher das Quellverhalten der PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der PE-Konzentration betrachtet werden. Verwendet wurden dabei vor allem PEs als polymere Ersatzstoffe der HS. Neben einer schnelleren Gleichgewichtseinstellung der in PE inkubierten Systeme, ermöglichte der Einsatz unterschiedlicher Polymere Einblicke in die Art der Wechselwirkung, welche zur Stabilisierung und Quellung der PL-Systeme führt. Während HS und PSS bei

neutralem pH-Wert negativ geladen vorliegen, handelt es sich bei PAH um ein positiv geladenes und bei PEI um ein ungeladenes Makromolekül. Die Konzentrationen der verwendeten Lösungen sind im Folgenden zur Vergleichbarkeit in  $\text{monomol}^{\text{viii}}/\text{L}$  angegeben, werden jedoch zur Vereinfachung als mol/L oder M bezeichnet. Konzentrationsänderungen wurden durch Zugabe bzw. Verdünnung von PE- bzw. HS-Lösungen in einem ansonsten geschlossenen Kreislauf variiert. Die Umwälzung erfolgte über eine Peristaltik-Pumpe. Die Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt, sodass die PLs immer in der Gelphase vorlagen.

### HS

Zunächst wurden Quelleexperimente mit HS des MW 769 kDa durchgeführt. Über ellipsometrische Messungen konnte nach 24 Stunden Inkubation bei einer Konzentration von 2.5 mM (0.5 g/L) ein Quellkoeffizient von 2.8 erhalten werden. Da jedoch bekannt war, dass die Gleichgewichtseinstellung der in HS inkubierten Systeme um die 43 Tage benötigt,<sup>54-55</sup> wurde die Probe nach 2 und 4 Wochen erneut vermessen. Es wurde ein neuer Quellkoeffizient von 7.8 bzw. 7.5 erhalten. Somit scheint die Gleichgewichtseinstellung nach 2 Wochen abgeschlossen zu sein. Bei anschließender Variation der HS-Konzentration stellte sich das Gleichgewicht sofort ein. Eine Erhöhung der Konzentration über 2.5 mM hinaus führte zu einer Verringerung der Schichtdicke, während bei erneuter Verdünnung die Quellkoeffizienten wieder steigen. Die erhaltenen Quellkoeffizienten sind in Abhängigkeit von der HS-Konzentration in Abb. 4.11 zu sehen.

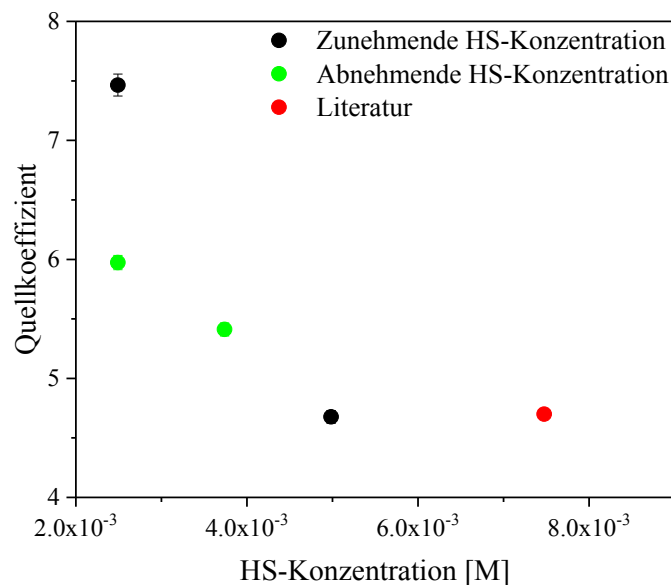


Abb. 4.11: Quellkoeffizienten von PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der HS-Konzentration. Gezeigt sind die aus ellipsometrischen Messungen erhaltenen Daten in Schwarz bzw. Grün (HS 769 kDa) und der Literaturwert<sup>54-55</sup> in Rot (769 kDa).

<sup>viii</sup> Die Einheit monomol bezeichnet die Stoffmenge der jeweiligen Monomereinheit.

Kreuzer fand für HS-Konzentrationen von 3 g/L (7.5 mM mit einem Monomergewicht von 401.3 g/mol) und ein MW von 769 kDa Quellkoeffizienten um 4.7.<sup>54-55</sup> Unter der Annahme eines Grenzwerts bei hohen Konzentrationen, deckt sich dies mit den vorliegenden Messergebnissen (s. Abb. 4.11).

### PSS

PSS ist ebenso wie HS negativ geladen. Ellipsometrische Messungen wurden mit einem MW von 1 MDa durchgeführt. Die Gleichgewichtseinstellung nach Zugabe von PSS erfolgte hier schon nach etwa 20 Minuten (s. Abb. 4.12), während bei Änderung der PSS-Konzentration die Gleichgewichtseinstellung direkt nach Vermischung erfolgte. Ähnlich zu den HS-Messungen zeigte sich bei geringen Konzentrationen ein starkes Quellen, welches mit zunehmendem PSS-Anteil der Lösung zurückging (s. Abb. 4.13). Bei Erhöhung der PSS-Konzentration erreicht der Quellfaktor einen Grenzwert von etwa 3. Im Vergleich zur HS-Messung erfolgte die Sättigung erst ab einem höheren PSS-Anteil.

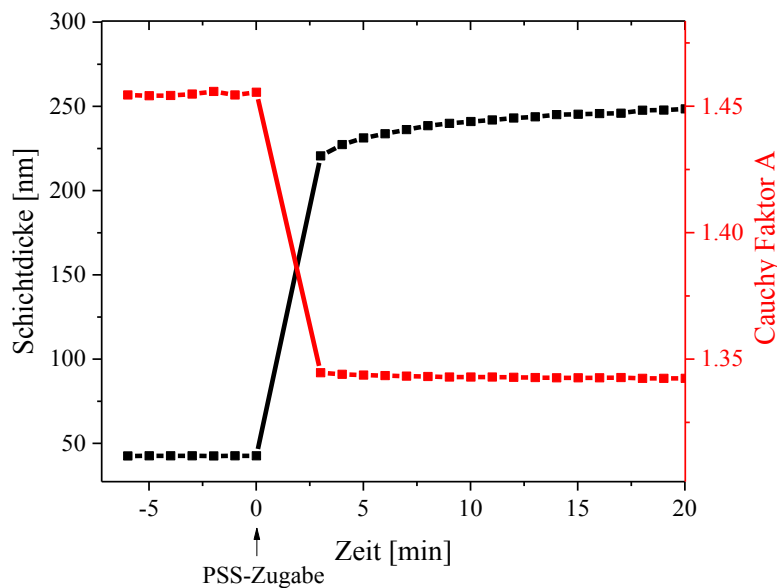


Abb. 4.12: Ellipsometrisch gemessene Quellkinetik von DMPC-Oligolagen bei Zugabe von einer wässrigen Lösung aus PSS der Konzentration 1 g/L (4.8 mM). Aufgetragen sind die Schichtdicke und der Brechungsindex A in Abhängigkeit von der Zeit. Direkt nach PSS-Zugabe konnte keine Messung durchgeführt werden, da das System erst kalibriert werden musste. Erst nach etwa 3 Minuten erfolgte die erste Messung. Die Messpunkte sind zur besseren Veranschaulichung verbunden.

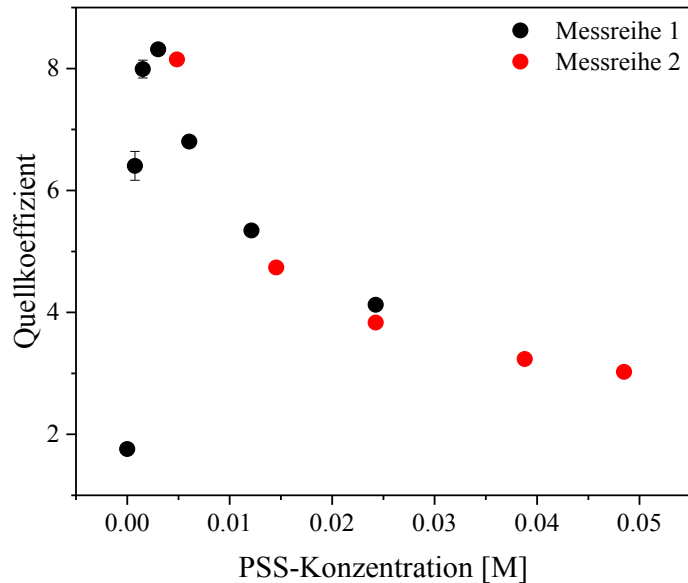


Abb. 4.13: Quellkoeffizienten von PL-Oligolagen aus ellipsometrischen Messungen in Abhängigkeit von der PSS-Konzentration (1 MDa).

### ***PAH***

Zum Vergleich wurde das positiv geladene PAH untersucht und die Abhängigkeit der Quellung der PLs von der Konzentration des PAH getestet. Verwendet wurde PAH mit einem MW von 15 kDa und mit einer Konzentration von 3 g/L. Die 3 g/L entsprechen bei Monomergewichten von 93.55 g/mol etwa 32 mM. Daten wurden sowohl mittels Ellipsometer als auch durch NR-Messungen erhoben. Die NR-Messungen erfolgten aus messtechnischen Gründen unter D<sub>2</sub>O, während die ellipsometrischen Versuche unter H<sub>2</sub>O durchgeführt wurden.

Die Gleichgewichtseinstellung für PAH erfolgte laut ellipsometrischen Daten nach etwa drei Stunden. Eine Kinetikmessung ist in Abb. 4.14 zu sehen. Nach der Gleichgewichtseinstellung in reinem Wasser wurde eine wässrige Lösung von PAH mit dem MW von 15 kDa und der Konzentration 10 g/L hinzugegeben (0 min). Eine erste Quellung um den Faktor 1.8 (entsprechend 70 nm Schichtdicke) konnte direkt beobachtet werden, während der Gleichgewichtswert mit einem Quellkoeffizienten von 3 erst nach insgesamt 2.5 h erreicht wurde. Daher wurde angenommen, dass zwei verschiedene Prozesse ablaufen. Im ersten schnellen Schritt erfolgt möglicherweise das Eindringen der Gegenionen in die PL-Lagen, welches zu einer elektrostatischen Abstoßung der Schichten führt, während der zweite Schritt das Einbauen des Makromoleküls zwischen und in die Schichten beinhaltet. Der Brechungsindex  $A$  fiel, aufgrund des zunehmenden Wassergehalts, im gleichen Maße wie die Schichtdicke zunahm.

Bei weiterer Zugabe oder Verdünnung stellte sich das Gleichgewicht nahezu sofort ein. Ähnliches konnte auch in NR-Experimenten beobachtet werden. Hier benötigte die Gleichgewichtseinstellung jedoch zwischen 3 und 12 Stunden, während weitere

## Ergebnisse und Diskussion

Konzentrationsänderungen ebenfalls zu einem direkten Einstellen des Gleichgewichts führten. Vermutet wurde, dass die Zeitdiskrepanz der Messmethoden durch innere Umordnung verursacht wurde. Während dies in NR-Experimente beobachtet werden konnte, geben ellipsometrische Messungen nur Auskunft über die totale Schichtdicke und es erfolgte eine scheinbar schnellere Gleichgewichtseinstellung.

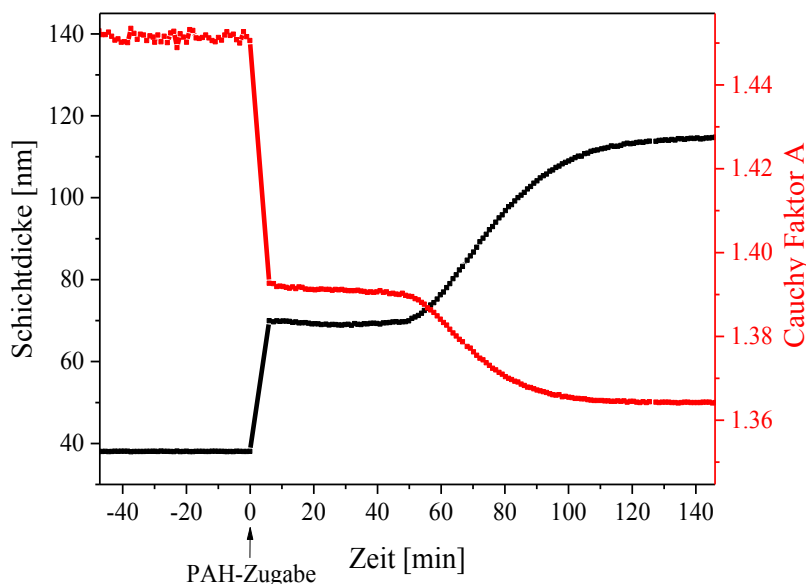


Abb. 4.14: Ellipsometrisch gemessene Quellkinetik von DMPC-Oligolagen nach Zugabe einer wässrigen Lösung aus PAH mit dem MW 15 kDa und der Konzentration 10 g/L. Aufgetragen sind die Schichtdicke und der Brechungsindex A in Abhängigkeit von der Zeit. Direkt nach PAH-Zugabe konnte keine Messung durchgeführt werden, da das System erst kalibriert werden musste. Erst nach etwa 6 Minuten erfolgte die erste Messung. Die Messpunkte sind zur besseren Veranschaulichung verbunden.

Die aus den ellipsometrischen Messungen erhaltenen Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der Konzentration sind in Abb. 4.15a dargestellt. Dabei wurden für jede Konzentration 1 - 8 Proben vermessen. Die erhaltenen Koeffizienten wurden gemittelt. Die Standardabweichung gibt den Fehler der Messungen an. Die über NR-Experimente erhaltenen lamellaren Abstände einer einzelnen Messreihe sind in Abb. 4.15b einzusehen. Ein Vergleich der ellipsometrischen und NR-Werte wird in Abb. 4.15c gezeigt.

Mit abnehmender Konzentration nahmen die Quellkoeffizienten zu. Bei 2 mM konnte in NR-Experimenten ein Quellfaktor von 25 gefunden werden. Mit weiter abnehmender Konzentration schoben sich die Bragg-Peaks in die Totalreflexionskante (s. Abb. 4.16). Bei zu hohen Quellkoeffizienten war daher keine Auswertung mehr möglich. Auch die Messmöglichkeiten am Ellipsometer waren begrenzt. Es konnten Quell-Koeffizienten von bis zu einem Maximalwert von 10 ermittelt werden. Vermutlich lag dies am Kontrastverlust durch das starke Eindringen von Wasser, sodass nicht mehr zwischen Beschichtung und Umgebung unterschieden werden konnte. Bei hohen Konzentrationen strebte das System einem Quellkoeffizient-Grenzwert von etwa 3 entgegen.

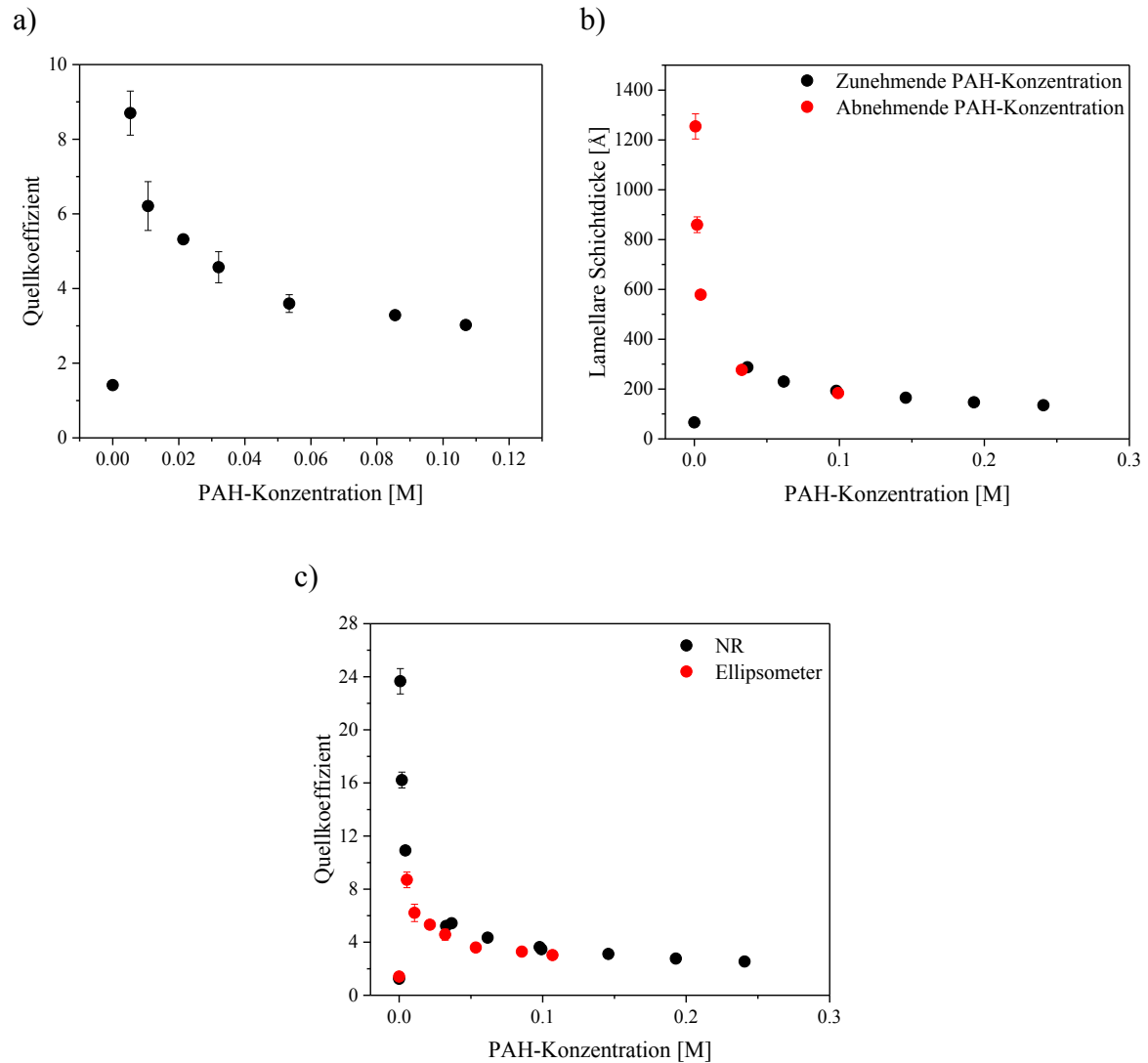


Abb. 4.15: Quellkoeffizient aus ellipsometrischen und NR-Messungen in Abhängigkeit von der Konzentration. Verwendet wurde PAH mit einem MW von 15 kDa. a) Ellipsometrische Messungen: Jede Konzentration beinhaltet zwischen 1 und 8 Messungen, über welche gemittelt wurde. Der angegebene Fehler stammt aus der Standardabweichung. Für die Konzentrationen 0,02, 0,08 und 0,10 M existiert jeweils nur eine Messung. b) Lamellarer Abstand aus NR-Messungen in Abhängigkeit von der Konzentration. Beide Messreihen erfolgten an der gleichen Probe. Zunächst wurde die PAH-Konzentration erhöht (schwarze Datenpunkte). In einem weiteren Schritt erfolgten Verdünnungen der Lösung (rote Datenpunkte). Die Fehler ergeben sich aus der Mittelung der lamellaren Abstände, welche aus den Bragg-Peaks errechnet wurden. c) Ellipsometrische und NR-Messungen im Vergleich. Die Quellkoeffizienten ergaben sich aus der Normierung auf die trockene Probe für ellipsometrische Messungen bzw. auf den Literaturwert des lamellaren Abstands einer trockenen Probe von 53 Å für NR-Messungen.

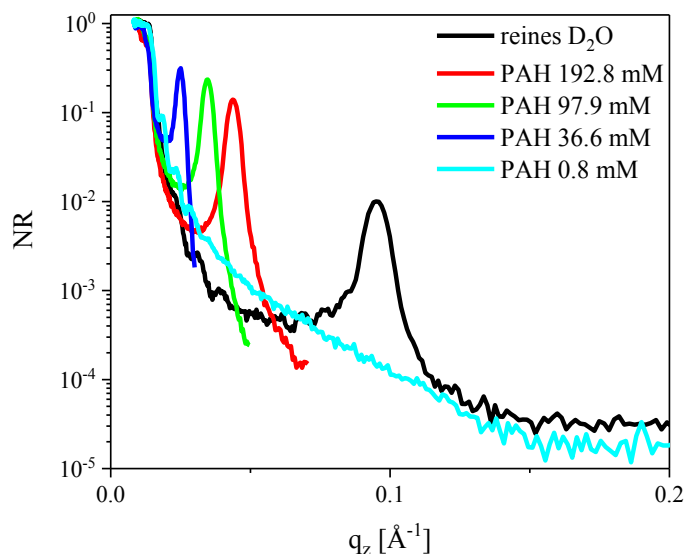


Abb. 4.16: NR-Kurven für verschiedene PAH-Konzentrationen (15 kDa). Mit abnehmender Konzentration verschieben sich die Bragg-Peaks nach links. Für die höheren Konzentrationen ist jeweils nur der vorderste noch sichtbare Bragg-Peak dargestellt.

Die NR-Messungen zeigten, dass die Quellungen für den gewählten Konzentrationsbereich reversibel waren, jedoch konnte in ellipsometrischen Messungen kein komplettes Ausspülen des PAH erreicht werden. Die Quellkoeffizienten erreichten hier nie den Ausgangswert der Quellung in reinem Wasser. Der Vergleich der beiden Messmethoden zeigte die gute Übereinstimmung der erhaltenen Quellfaktoren in Abhängigkeit von der PAH-Konzentration und rechtfertigte damit weitere ellipsometrische Messungen als Ersatz für die zeitaufwendigen NR-Experimente. In der Literatur existieren bereits NR-Messungen von in PAH inkubierten Lipid-Oligogalen. Verwendete wurde nur eine Konzentration von 3 g/L (32 mM), die vergleichbare Quellkoeffizienten zwischen 4 und 5 lieferte.<sup>84</sup>

Um interne Parameter der Schichten zu bestimmen, sollten die NR-Messungen mit einem mathematischen Modell beschrieben werden. Es wurde ein möglichst einfaches Modell gesucht, welches den gesamten Datensatz konsistent abbildet (s. Tab. 4.2). Da der innere Aufbau von großem Interesse ist, wurde das DMPC in Kopf- und Kettengruppe unterteilt. Box 2 stellt dabei den inneren Kern bestehend aus 11 Wiederholeinheiten dar. Die Anzahl der Lipid-Bilagen wurde zuvor über XRR-Charakterisierung der Probe ermittelt. Die Streulängendichten der Kopf- und Kettengruppen und deren Schichtdicken wurden mithilfe der Literatur bestimmt.<sup>55,137</sup> Der Volumenanteil des eindringenden Wassers in die Kopfgruppen wurde aus der Messung in reinem Wasser bestimmt und konnte für alle folgenden PAH-Konzentrationen konstant gesetzt werden. Der Wasseranteil in den Kettengruppen stieg bei PAH-Zugabe und musste daher variiert werden. Des Weiteren unbekannt waren die Schichtdicken des auf den Kopfgruppen angelagerten PAH und die Wasserschichtdicken, welche den hohen Quellgrad des Systems bestimmen. Diese Werte wurden variiert. Rauigkeitswerte konnten aufgrund der geringen Schichtdicken der



## Ergebnisse und Diskussion

einzelnen Lagen vernachlässigt werden. Abb. 4.17 zeigt die NR-Kurven und deren zugehörige Fits.

	Box-Nr.	Material	$d_i$ [Å]	$SLD_i$ [ $10^{-6} \text{Å}^{-2}$ ]	$\varphi_w$	Anzahl
	0	Si	-	2.07		1
	1	SiO <sub>x</sub>	13	3.48		1
	2	Kopfgruppe	$12.7 \pm 1$	$3.88 \pm 0.1$	$0.24 \pm 0.09^*$	11
		Ketten- gruppe	30.3	-0.409	$x_1$	
		Kopfgruppe	$12.7 \pm 1$	$3.88 \pm 0.1$	$0.24 \pm 0.09^*$	
		PAH- Schicht	$x_2$	0	$x_4$	
		Wasser- Schicht	$x_3$	5.8	1	
	PAH- Schicht	$x_2$	0	$x_4$		
	3	Kopfgruppe	$16.6 \pm 4.5$	$4.46 \pm 0.4$	$0.19 \pm 0.06$	1
		Ketten- gruppe	30.3	-0.409	$x_5$	
		Kopfgruppe	$16.6 \pm 4.5$	$4.46 \pm 0.4$	$0.19 \pm 0.06$	
PAH- Schicht		$x_2$	0	$x_4$		
Umge- bung	Wässrige Phase	-	5.8		1	

Tab. 4.2: Modell 1: Parameter des Fits für konzentrationsabhängige NR-Messungen an DMPC-Oligolagen mit PAH (15 kDa). Die freien Parameter für die Modellschätzung sind mit  $x_i$  markiert. Die mit \* markierten Parameter wurden für Konzentrationen kleiner 0.03 M zusätzlich variiert.

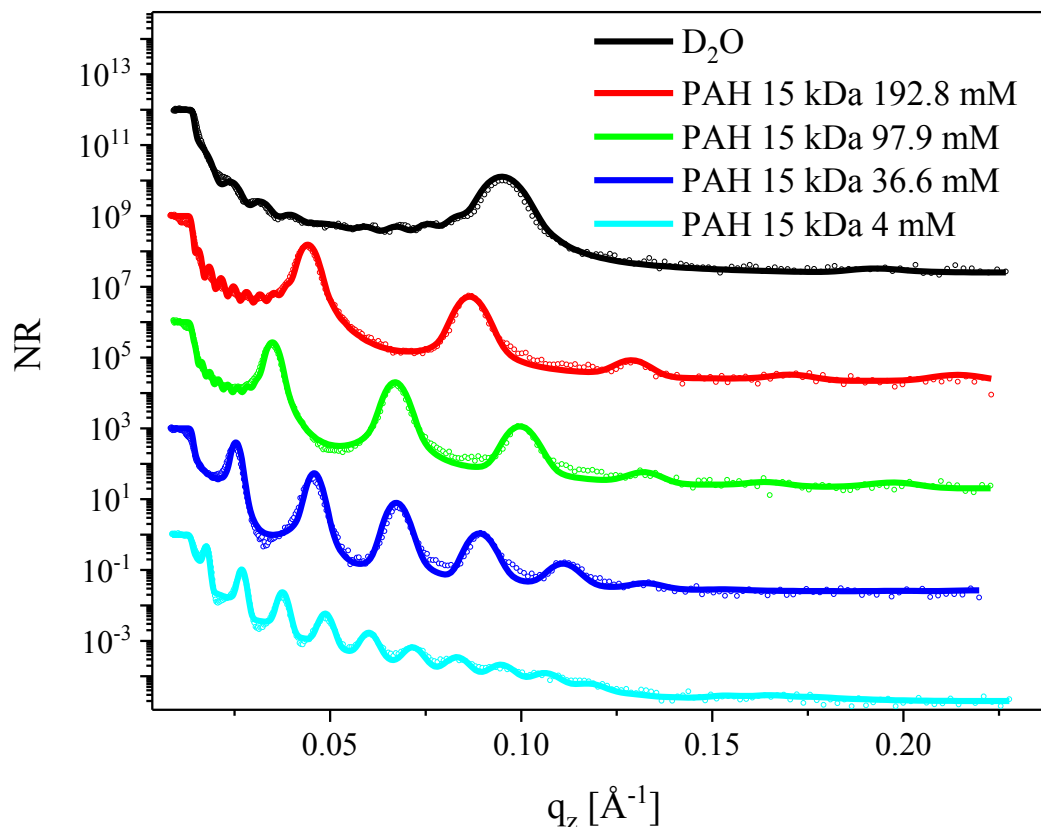


Abb. 4.17: NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) für DMPC-Oligolagen inkubiert in PAH (MW 15 kDa) unterschiedlicher Konzentration. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal gegeneinander verschoben.

Die erhaltenen Parameter zeigt Abb. 4.18. Deutlich zu sehen ist, dass die Schichtdicken der wässrigen Zwischenschicht mit abnehmender Konzentration zunehmen. Dies ist konsistent mit den vorangegangenen Beobachtungen. Zuvor konnte jedoch keine Aussage über die innere Struktur der Zwischenschichten getroffen werden. Nun konnten neben der Gesamtschichtdicke auch die Wasserschichtdicke und die auf den Kopfgruppen adsorbierte PAH-Schichtdicke bestimmt werden. Letztere betrug zwischen 5 und 96  $\text{\AA}$ . Der Wert der Schichtdicke bei einer Konzentration von 0.03 M (17  $\text{\AA}$ ) entspricht dabei den Ergebnissen für HS von Kreuzer *et al.*<sup>55</sup> Der Volumenanteil von Wasser in diesen Schichten variierte zwischen 97.5 und 62.5 %. Diese Werte entsprechen ebenfalls denen für HS von Kreuzer *et al.* (77 %).<sup>55</sup> Dies zeigt, dass eine zu HS vergleichbare Anlagerung von PAH stattfand. Bei geringeren PAH-Konzentrationen wurden höhere Werte für die PAH-Schichtdicke und deren Wasser-Volumenanteil gefunden. Dies ist wahrscheinlich auf geringere Abschirmungskräfte bei niedrigeren Konzentrationen zurückzuführen. Die PAH-Schicht dehnt sich aus. Somit nehmen die Schichtdicke und der Volumenanteil an Wasser zu.

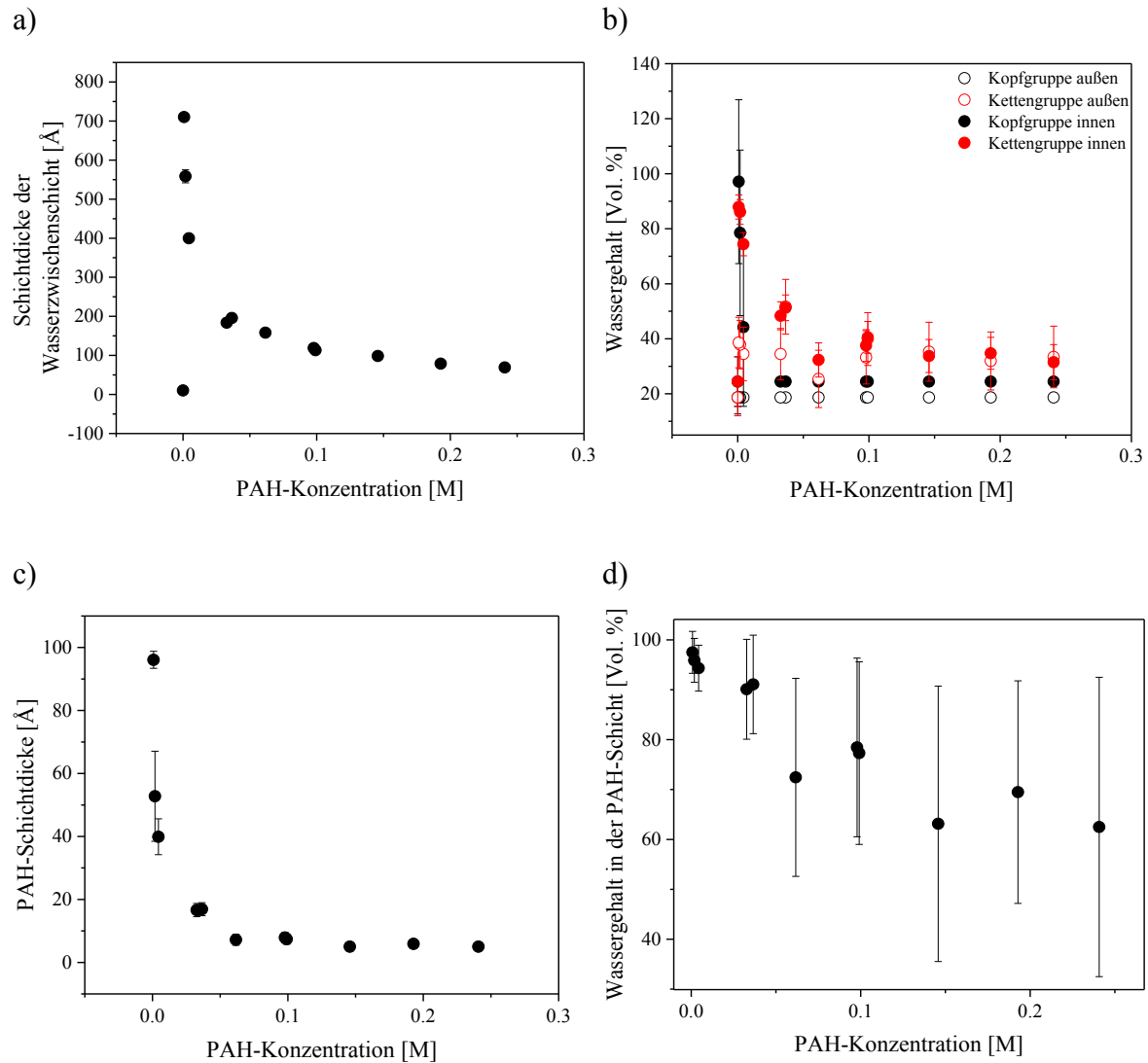


Abb. 4.18: Aus den Fits erhaltene Parameter der PAH-induzierten Quellung von DMPC-Oligolagen. Gezeigt sind a) die Schichtdicken der wässrigen Zwischenschicht, b) der jeweilige Wassergehalt der DMPC-Lagen, c) die Schichtdicke der adsorbierten PAH-Schicht und d) der zugehörige Wassergehalt dieser adsorbierten Schicht.

Eine weitere interessante Größe war der Wassergehalt in den DMPC-Bilagen. Vermutlich durch Fehlstellen in den Lipidmembranen kam es zu einem Wassergehalt von konstanten 20 % an den Kopfgruppen. Für die Kettengruppen stieg der Wassergehalt bei Zugabe von PAH von 20 auf 35 % und blieb über einen weiten Konzentrationsbereich konstant (100 bis 240 mM). Ein möglicher Einbau von PAH, welcher in dieser Konstellation aufgrund des fehlenden Streulängenkontrasts nicht detektiert werden konnte, könnte eventuell zu einem zusätzlichen Eindringen von Wasser in die Kettenbereiche führen.<sup>ix</sup> Aus Arbeiten

<sup>ix</sup> Der Fragestellung nach einem möglichen Einbau von PAH bzw. HS in die Lipid-Oligolagen wird in einem eigenen Kapitel nachgegangen (Lokalisierung von PAH- und HS-Molekülen in DMPC Oligolagen, s. 4.3).

mit PAH/PSS-Multischichten ist bekannt, dass PAH mit etwa 2.5 Wassermolekülen pro Monomer hydratisiert vorliegt.<sup>75</sup> Die Fits ergaben etwa 15 % mehr Wasseranteil in den Kettenbereichen im Vergleich zu den Kopfgruppen. Dies lässt sich über das hydratisierte PAH erklären, welches teilweise in die Ketten eindringt. Bei einem angenommenen Volumen pro Wassermolekül<sup>x</sup> von  $30 \text{ \AA}^3$  und einem Kettenvolumen<sup>137</sup> von  $356 \text{ \AA}^3$  würden etwa 2 Moleküle Wasser pro Kette zu einem Wasseranteil von 16 % führen. Das heißt pro Kettengruppe lagert sich etwa ein hydratisiertes Monomer PAH ein.

Für Konzentrationen kleiner als 0.1 M nahm der Wassergehalt sowohl im Ketten- als auch im Kopfbereich zu. Dies lässt sich über eine Zunahme der Unordnung und einem damit einhergehenden Kontrastverlust erklären. Geht man davon aus, dass die Lipidschichten nicht mehr parallel angeordnet sind, sondern stufenweise versetzt, werden die SLDs der Bilagen aus dem Mittelwert der SLDs der Umgebung und der Bilagen erhalten (s. Abb. 4.19). Die Auswirkung auf die SLD der Wasserzwichenschicht kann dabei vernachlässigt werden, da letztere im Vergleich zur Lipidschicht sehr dick ist. Bei Erhöhung der Konzentration erhöht sich die Ordnung, sodass der Wassergehalt der Lipid-Bilagen abermals sinkt.

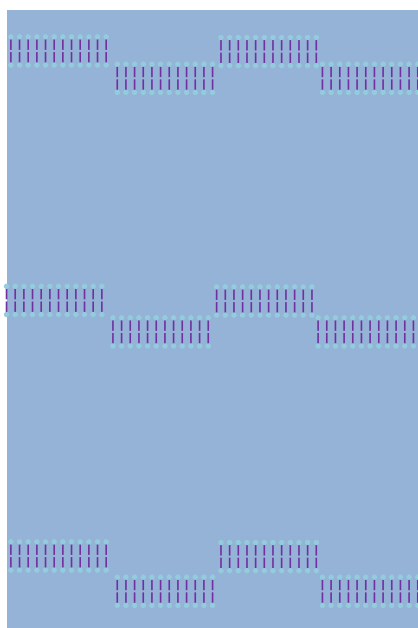


Abb. 4.19: Schematische Darstellung der Lipidschichten in stark gequollenen Systemen. Die Lipidlagen sind nicht mehr parallel angeordnet sondern liegen stufenweise versetzt vor.

Neben den NR-Messungen konnten an derselben Probe simultan IR-Daten aufgenommen werden. In Abb. 4.20 sind die zugehörigen IR-Spektren der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungs-Regionen dargestellt. Eine Verschiebung der Signale konnte nicht beobachtet werden, jedoch eine Änderung der Intensität. Mit zunehmender PAH-Konzentration und damit

---

<sup>x</sup> Berechnet über die Dichte ( $1 \text{ g/cm}^3$ ) und die molare Masse ( $18 \text{ g/mol}$ ) von Wasser.

## Ergebnisse und Diskussion

abnehmender Schichtdicke nahm diese zu. Das größte Signal wurde bei Messungen in Wasser erhalten. Bei abnehmender Konzentration quollen die Bilagen und die Intensität der IR-Banden sank. Dies lag wahrscheinlich an der endlichen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes der IR-Strahlung  $d_p$ , welche mit der Formel (4.4) berechnet wurde.  $n_1$  steht dabei für den Brechungsindex von Silicium und  $n_2$  für den des Wassers. Die verwendeten Parameter zur Berechnung der Eindringtiefen im IR-Bereich der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbänder und die daraus erhaltenen Werte sind in Tab. 4.3 aufgelistet. Die ermittelten Tiefen geben den Abstand zur Grenzfläche an, bei dem die Amplitude des elektrischen Feldes noch 1/e-tel der Ausgangsamplitude beträgt.

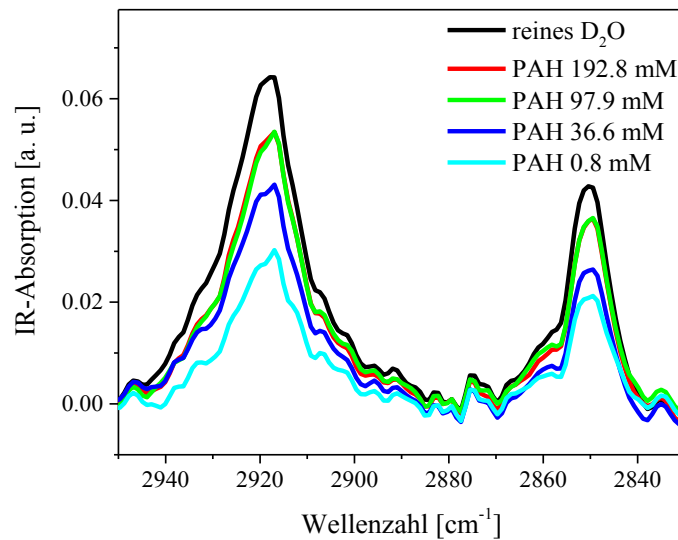


Abb. 4.20: IR-Spektren der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen bei verschiedenen PAH-Konzentrationen (15 kDa).

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n_1^2(\sin(45^\circ))^2 - n_2^2)}} \quad (4.4)$$

Wellenzahl [cm <sup>-1</sup> ]	Wellenlänge [nm]	$n_1^{138}$	$n_2^{139}$	Eindringtiefe [nm]
2918	3427.00	3.4326	1.4146	213.44
2850	3508.77	3.4321	1.3988	217.83

Tab. 4.3: Verwendete Parameter und daraus errechnete Eindringtiefe für beide Absorptions-Wellenlängenbereiche der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbänder.

Abb. 4.21 zeigt die ermittelten Integrale der IR-Banden resultierend aus asymmetrischer und symmetrischer CH<sub>2</sub>-Streckschwingung. Die Werte wurden dabei auf die Integrale aus der Messung in reinem Wasser normiert. Bei Annahme, dass die begrenzte Eindringtiefe die entscheidende Rolle bei den Intensitäts-Veränderungen spielte, kann das Abklingen

## Ergebnisse und Diskussion

der Intensität der IR-Strahlung  $I_{IR}$  mit zunehmendem Abstand zum Substrat  $z$  berechnet werden. Sie ist gegeben durch:

$$I_{IR} = E_0^2 \cdot e^{\frac{-2z}{d_p}} \quad (4.5)$$

Weicht die Theorie von der Messung ab, so liegt vermutlich ein Lipid-Verlust vor. Die komplementäre IR-Messung ermöglicht somit eine Abschätzung des Schichtverlusts.

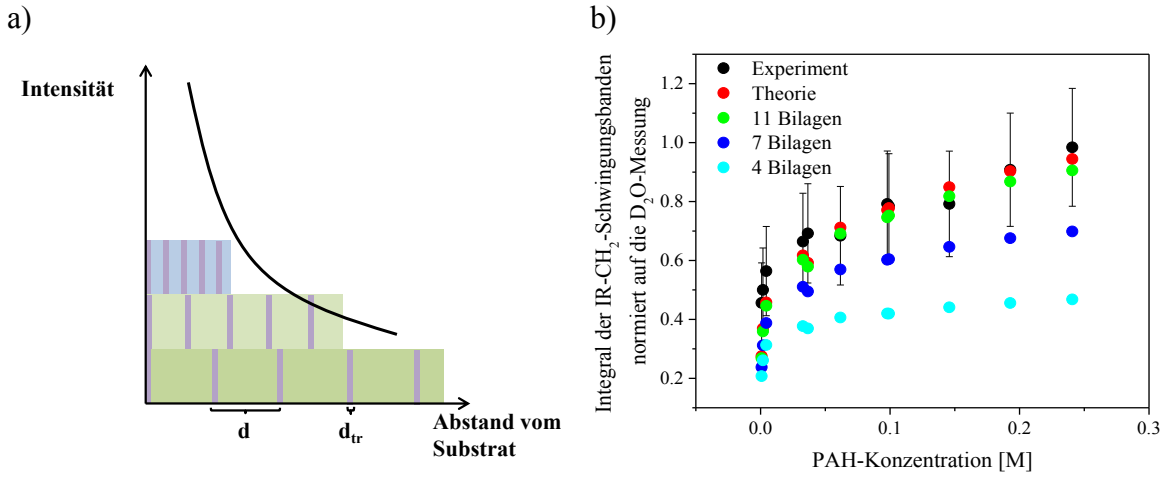


Abb. 4.21: a) Schichtdicke und IR-Intensität in Abhängigkeit vom Substratabstand für schwach (oben) und stark (unten) gequollene Filme und b) Gesamtintegral der IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen. Gezeigt sind die auf die D<sub>2</sub>O-Messung normierten Gesamtintegrale der experimentellen und berechneten Werte (für 12 Bilagen, in Rot) in Abhängigkeit von der PAH-Konzentration (15 kDa). Außerdem sind Berechnungen für 11, 7 und 4 Bilagen gezeigt.

Sowohl Lipide als auch PAH besitzen CH<sub>2</sub>-Gruppen und tragen somit zum IR-Signal der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungsbanden bei.

DMPC findet sich in den Schichtdickenintervallen  $[nd; nd + d_{tr}]$  mit  $n = 0, \dots, N-1$  (s. Abb. 4.21).  $d_{tr}$  beschreibt dabei die Schichtdicke einer trockenen DMPC-Bilage, während  $d$  für die lamellare Schichtdicke steht.  $N$  ist die Anzahl der Schichten. Aus der XRR-Vorcharakterisierung wurden für die vorliegende Probe eine Schichtanzahl von 12 und eine Schichtdicke  $d_{tr}$  von 53 Å bestimmt. Der Beitrag der Lipide jedes Intervalls zum IR-Signal wird mit  $C = KfE_0^2 \frac{d_p}{2}$  wie folgt berechnet:

$$I_n^{lip} = KE_0^2 \rho_{CH_2}^{lip} f \int_{nd}^{nd+d_{tr}} e^{\frac{-2z}{d_p}} dz = -C \rho_{CH_2}^{lip} \left( e^{-\frac{2(nd+d_{tr})}{d_p}} - e^{-\frac{2nd}{d_p}} \right) \quad (4.6)$$

## Ergebnisse und Diskussion

---

Die Ausleuchtung der Probe durch die IR-Strahlung wird mit  $f$  gekennzeichnet.  $K$  ist ein Proportionalitätsfaktor und  $\rho_{CH_2}^{lip}$  beschreibt die Dichte der  $CH_2$ -Gruppen im Lipid. Die aus den Lipiden resultierende gesamte IR-Intensität ergibt sich aus der Summierung:

$$I_{theo}^{lip} = \sum_{n=0}^{N-1} I_n^{lip} \quad (4.7)$$

Das PAH befindet sich sowohl gelöst in der Inkubationsflüssigkeit der Probe als auch als adsorbierte PAH-Schicht auf den Kopfgruppen. Analog zu den Gleichungen (4.6) und (4.7) entspricht deren Beitrag zur IR-Intensität

$$\begin{aligned} I_{theo}^{ads} &= \sum_{n=0}^{N-1} KE_0^2 \rho_{CH_2}^{ads} f \int_{nd+d_{tr}}^{nd+d_{tr}+d_{ads}} e^{-\frac{2z}{d_p}} dz \\ &\quad + \sum_{n=0}^{N-2} KE_0^2 \rho_{CH_2}^{ads} f \int_{(n+1)d-d_{ads}}^{(n+1)d} e^{-\frac{2z}{d_p}} dz \\ &= -C \rho_{CH_2}^{ads} \sum_{n=0}^{N-1} \left( e^{-\frac{2(nd+d_{tr}+d_{ads})}{d_p}} - e^{-\frac{2(nd+d_{tr})}{d_p}} \right) \\ &\quad - C \rho_{CH_2}^{ads} \sum_{n=0}^{N-2} \left( e^{-\frac{2(n+1)d}{d_p}} - e^{-\frac{2((n+1)d-d_{ads})}{d_p}} \right) \end{aligned} \quad (4.8)$$

für adsorbiertes PAH und

$$\begin{aligned} I_{theo}^{gelöst} &= \sum_{n=0}^{N-2} KE_0^2 \rho_{CH_2}^{gelöst} f \int_{nd+d_{tr}+d_{ads}}^{(n+1)d-d_{ads}} e^{-\frac{2z}{d_p}} dz \\ &\quad + KE_0^2 \rho_{CH_2}^{gelöst} f \int_{(N-1)d+d_{tr}+d_{ads}}^{\infty} e^{-\frac{2z}{d_p}} dz \\ &= -C \rho_{CH_2}^{gelöst} \sum_{n=0}^{N-2} \left( e^{-\frac{2((n+1)d-d_{ads})}{d_p}} - e^{-\frac{2(nd+d_{tr}+d_{ads})}{d_p}} \right) \\ &\quad + C \rho_{CH_2}^{gelöst} e^{-\frac{2((N-1)d+d_{tr}+d_{ads})}{d_p}} \end{aligned} \quad (4.9)$$

für gelöstes PAH.  $\rho_{CH_2}^{ads}$  und  $\rho_{CH_2}^{gelöst}$  beschreiben dabei die jeweiligen  $CH_2$ -Dichten für adsorbiertes und gelöstes PAH.  $d_{ads}$  steht für die Schichtdicke des adsorbierten PAH.

## Ergebnisse und Diskussion

---

$d$  und  $d_{ads}$  werden aus dem Fit basierend auf Modell 1 erhalten. Die Dichten  $\rho_{CH_2}^{lip}$ ,  $\rho_{CH_2}^{ads}$  und  $\rho_{CH_2}^{gelöst}$  werden über folgende Formel berechnet:

$$\rho_{CH_2}^i = ZcN_A \quad (4.10)$$

$Z$  steht dabei für die Anzahl der  $CH_2$ -Gruppen pro Monomer bzw. Lipid (PAH:  $Z = 4$ , DMPC:  $Z = 24$ ),  $c$  für die molare Konzentration der Monomere und  $N_A$  für die Avogadro-Konstante.  $c$  ist für die Lipide konstant und kann über die Lipiddichte  $\rho_{dicht}^{lip}$  in einer dichtgepackten Bilage, den Volumenanteil von Wasser  $\varphi_w^{lip} \approx 0.25$  in der Bilage und das MW  $M_{DMPC} = 677.93$  g/mol von DMPC berechnet werden:

$$c_{lip} = \frac{\rho_{dicht}^{lip}}{M_{DMPC}} \cdot (1 - \varphi_w^{lip}) = 1.2 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{cm}^3} \quad (4.11)$$

Die PAH-Konzentrationen des adsorbierten PAH  $c_{PAH}^{ads}$  variieren je nach Volumenanteil des Wassers in den PAH-Schichten  $\varphi_w^{PAH}$ , welcher aus den Fits der NR-Daten bekannt ist.  $\rho_{rein}^{PAH} = 1.43$  g/cm<sup>3</sup> steht für die Dichte von reinem PAH und  $M_{PAH} = 93.55$  g/mol steht für das Molekulargewicht eines PAH-Monomers. Die jeweiligen Konzentrationen werden wie folgt berechnet:

$$c_{PAH}^{ads} = \frac{\rho_{rein}^{PAH}}{M_{PAH}} \cdot (1 - \varphi_w^{PAH}) \quad (4.12)$$

Die variierende Konzentration des gelösten PAH  $c_{PAH}^{gelöst}$  wird über die PAH-Konzentration der Lösung  $c_{PAH}$  berechnet:

$$c_{PAH}^{gelöst} = \frac{c_{PAH}}{M_{PAH}} \quad (4.13)$$

Sowohl berechnete als auch experimentell erhaltene Daten wurden auf die Berechnung bzw. Messung der Intensitäten in reinem Wasser normiert. Dadurch entfällt die Konstante  $C$ . Abb. 4.21b zeigt, dass die experimentellen Werte gut mit der Theorie übereinstimmen. Nur bei sehr geringen PAH-Konzentrationen weichen die berechneten etwas von den experimentellen Werten ab. Die Abweichung bei geringen



Konzentrationen lässt sich über DMPC-Verunreinigungen auf der Substratunterseite erklären, die bei der verwendeten ATR-Konfiguration ebenfalls zum IR-Signal beitragen. Bei höheren Konzentrationen sollten diese nicht ins Gewicht fallen. Sie gewinnen jedoch mit Abnahme der aus Lipiden resultierenden Signale bei abnehmender Konzentration - bedingt durch das Quellen der Filme - zunehmend an Bedeutung. Weitere Berechnungen für 11, 7 und 4 Bilagen zeigen, dass IR-Messungen zur Bestimmung von Lipidverlust eingesetzt werden können. Im Gegensatz zu NR-Messungen ist die IR-Intensität nicht abhängig vom Ordnungsgrad der Lipide und zeigt ab einem Lipidverlust von mehr als 5 Lagen deutliche Abweichungen von den berechneten Werten.

### **PEI**

Die geladenen Makromoleküle PAH und PSS haben trotz unterschiedlicher Ladung den gleichen Effekt auf DMPC-Oligolagen. Mit zunehmender Konzentration nahm die zunächst starke Quellung bis auf einen Grenzwert ab.

Um den Einfluss der elektrostatischen Kräfte zu untersuchen, wurde nun das ungeladene PEI mit einem MW von 25 kDa verwendet. In Abb. 4.22 sind die Quellkoeffizienten von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit von der PEI-Konzentration zu sehen. Im Gegensatz zum Verhalten der geladenen Polymere zeigte sich hier eine Zunahme der Quellkoeffizienten bei Zugabe von PEI. Auch hier wurde ein Grenzwert bei hohen Konzentrationen von etwa 3.5 erreicht. Dies war aber nicht wie bei den anderen Molekülen der geringste, sondern der höchstmögliche Grad der Quellung.

Durchgeführte Langzeitmessungen zeigten ebenfalls keine größere Quellung. Die Vermutung einer wie bei HS längeren Gleichgewichtseinstellung konnte somit nicht bestätigt werden, die Quellkoeffizienten blieben innerhalb von 2 Wochen konstant. Die Modellbeschreibung der ellipsometrischen Daten wurde mit der Zeit jedoch schlechter. Angenommen wurde, dass die Lipid-Oligolagen mit der Zeit von PEI durchdrungen und teilweise zerstört werden, sodass nach einiger Zeit keine homogene Oberfläche mehr vorliegt. Wong *et al.* berichteten über Diffusion von PEI durch DMPC-Lipid-Bilagen.<sup>87</sup> Diese Annahme deckt sich auch mit den großen Probe-zu-Probe Variationen der Quellkoeffizienten. Eine teilweise Zerstörung der Oberfläche führte zu Schichtverlusten und da über ellipsometrische Messungen nur die Gesamtschichtdicke vermessen werden kann, können über die Quellkoeffizienten keine Aussagen über den lamellaren Abstand der einzelnen Bilagen gemacht werden.

Die Messungen mit PEI konnten verdeutlichen, dass die Art der Ladung (positiv oder negativ) nicht ausschlaggebend für das Quellverhalten sind, jedoch Ladungen an sich erst zu einer erhöhten Quellung führen. Es scheint, dass die Quellung hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen induziert wird. Das leichte Quellen der in PEI inkubierten Lipidschichten lässt sich über einen mit zunehmender Konzentration vermehrten Einbau von PEI und deren geringem Ionisierungsgrad von 7 % bei einem pH-Wert von etwa 8 erklären.<sup>140</sup>

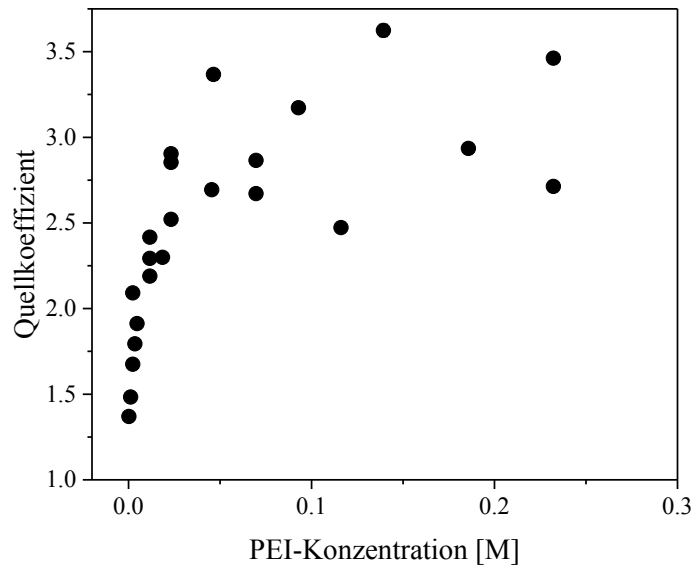


Abb. 4.22: Quellkoeffizienten aus ellipsometrischen Messungen von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit der PEI-Konzentration (25 kDa).

### 4.2.2. Abhängigkeit des Quellverhaltens vom Molekulargewicht

Wird von einem Einbau der Makromoleküle zwischen die einzelnen Lipid-Bilagen ausgegangen, so liegt die Vermutung nahe, dass auch das MW der Moleküle entscheidende Auswirkungen auf das Ausmaß der Quellung zeigt.

In Tab. 4.4 sind die verwendeten Moleküle, deren MWs und weitere Werte zur Berechnung des End-zu-End-Abstandes ( $R_E$ ) gegeben. Er ist, wie in 2.2.2 beschrieben, für geladene Polymere abhängig von der Abschirmlänge aufgrund der eingebrachten Gegenionen. Je höher die Konzentration, desto besser die Abschirmung und desto kleiner die Abschirmlänge. Die geladenen Bereiche können dichter zusammenrücken und somit verkleinert sich der End-zu-End-Abstand der Moleküle. Aber nicht nur die Konzentration sondern auch die MWs der Makromoleküle haben Einfluss auf den Radius.  $R_E$  ist dabei proportional zu  $(b \cdot N)^{3/5}$ .  $b$  beschreibt dabei das Volumen eines Monomers und  $N$  die Anzahl der Monomere im Polymer.

## Ergebnisse und Diskussion

	MW [kDa]	MW Monomer [Da]	Anzahl Monomere $N$	Dichte Monomere [g/cm <sup>3</sup> ] <sup>141</sup>	$b$ [Å]	Konturlänge $b \cdot N$ [Å]	End-zu-End-Abstand $R_E$ [Å] für 3 g/L
<b>HS</b>	680	401.30	1694.48	1.00	10.84	18363.19	1396
<b>PSS</b>	70	206.19	339.49	1.18	8.21	2788.52	424
	1000	206.19	4849.80	1.18	8.21	39835.98	2093
<b>PAH</b>	15	93.55	160.34	1.15	6.37	1020.74	200
	58	93.55	619.99	1.15	6.37	3946.87	450
	900	93.55	9620.52	1.15	6.37	61244.57	2312
<b>PEI</b>	0.8	43.07	18.57	1.05	5.07	94.12	40
	25	43.07	580.45	1.03	5.10	2960.04	322

Tab. 4.4: Die verwendeten Makromoleküle, deren unterschiedliche MWs und weitere Parameter zur Berechnung des End-zu-End-Abstandes. Der End-zu-End-Abstand  $R_E$  wurde für Konzentrationen von 3 g/L berechnet.

### PSS

Die Messungen der in PSS inkubierten Proben zeigten bis zu einer Konzentration von etwa 14.6 mM (3 g/L) keinen Unterschied der Quellkoeffizienten bei gleichem PSS-Anteil und unterschiedlichem MW (s. Abb. 4.23).

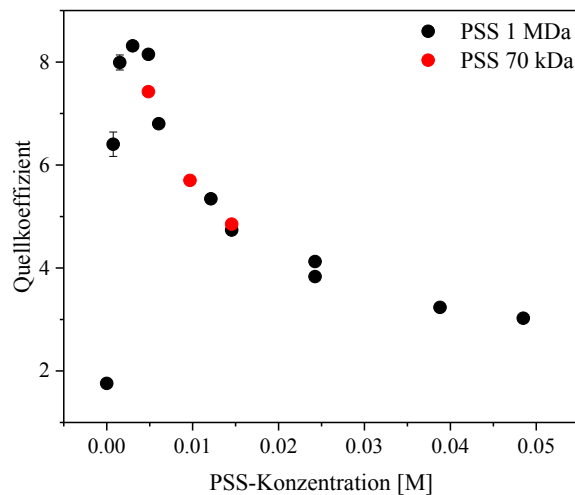


Abb. 4.23: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der PSS-Konzentration für verschiedene MWs.

Jedoch konnten bei höheren Konzentrationen für das PSS mit dem MW von 70 kDa keine Gleichgewichtswerte mit dem Ellipsometer ermittelt werden. Festgestellt wurde, dass eine Temperaturerhöhung und ein damit verbundener Phasenübergang zur flüssig-kristallinen Phase wieder zu einer vermessbaren Probe führt. Die Gründe hierfür sind

bislang unbekannt. Quellmessungen mit PSS des MW von 1 MDa strebten für hohe Konzentrationen einem Gleichgewichtswert entgegen. Für Konzentrationen unter 14.6 mM zeigte sich für beide MWs ein vergleichbares Verhalten.

### PAH

Für PAH mit unterschiedlichem MW sind die Abhängigkeiten der Quellkoeffizienten von der PAH-Konzentration in Abb. 4.24 dargestellt. Die Quellexperimente am Ellipsometer zeigten, dass die Messwerte für alle MWs auf derselben Kurve lagen. Es konnte kein Unterschied im Quellverlauf zwischen den verschiedenen MWs festgestellt werden. Auch die NR-Experimente in Abb. 4.25 zeigten bei konstanter PAH Konzentration von 0.03 M (3 g/L) und variierendem MW (15, 58 und 900 kDa) vergleichbare lamellare Abstände. Abweichungen der Schichtdicken werden vermutlich von Probe-zu-Probe-Variationen verursacht. Während sich die Quellkoeffizienten konzentrationsabhängig verändern, zeigt das MW keinen Einfluss. Auch die Gleichgewichtseinstellung erfolgte für alle MWs im Vergleich zur langsamen Kinetik der Quellung in HS ähnlich schnell. Selbst für das hochmolekulare PAH 900 kDa, welches eine etwa dreimal größere Konturlänge als HS besitzt, werden nur wenige Stunden statt mehrere Tage zum Erlangen des Gleichgewichts benötigt. In der Literatur wurden ebenfalls MW-abhängige Messungen von PAH durchgeführt.<sup>84</sup> Verwendet wurden MWs von 15 und 58 kDa bei Konzentrationen von 3 g/L. Es wird über ein mögliches MW-abhängiges Ausmaß der Quellung berichtet. Jedoch wurden nur zwei verschiedene Proben vermessen, welche nur geringe Abweichungen der Quellkoeffizienten zeigten. Die ellipsometrischen und NR-Messungen dieser Arbeit wiesen im Gegensatz dazu keine MW-Abhängigkeiten der Quellungen auf.

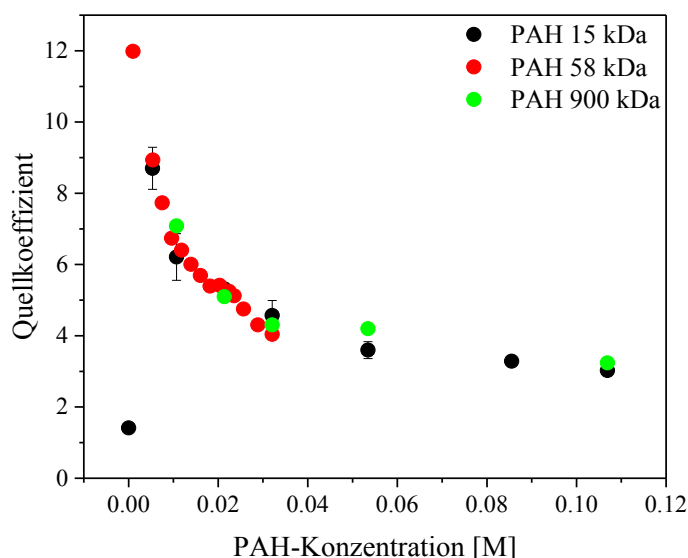


Abb. 4.24: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der PAH-Konzentration für verschiedene MWs.

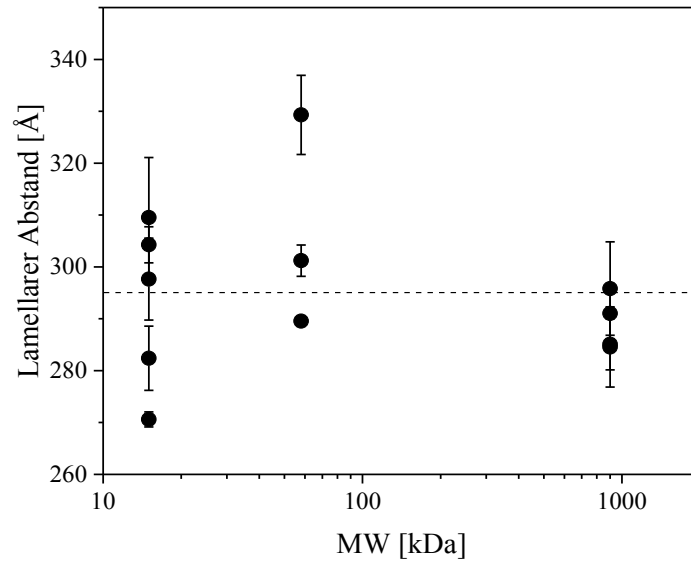


Abb. 4.25: Lamellare PL-Abstände aus NR-Experimenten bei Zugabe von 0.03 M (3 g/L) PAH mit verschiedenem MW (15, 58 und 900 kDa) für jeweils bis zu 4 Proben. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aller Proben an.

### PEI

Zuletzt wurde auch die MW-Abhängigkeit von PEI getestet. Dafür wurde dem MW von 25 kDa ein sehr geringes von 800 Da gegenübergestellt. Das Interesse lag hier vor allem in der Stabilität der gequollenen Proben, da davon ausgegangen wurde, dass das kurze PEI keine Verbrückung zwischen den PL-Schichten erlauben und bei Quellung ein Auseinanderfallen der DMPC-Oligolagen nicht verhindern kann. Erste ellipsometrische Messungen mit PEI mit dem MW von 800 Da kamen zu keinem Ergebnis. Die Messungen konnten nicht ausgewertet werden, was einem Totalverlust der Schichten zugeschrieben wurde. Nach Messung des pH-Werts konnte jedoch festgestellt werden, dass PEI-Lösungen mit dem MW 800 Da einen sehr hohen pH-Wert von 11 - 12 haben, wohingegen Lösungen mit einem MW von 25 kDa nur pH-Werte von 10 erreichen. In 4.2.5 wird die pH-Abhängigkeit der Quellkoeffizienten der Lipid-Oligolagen beschrieben. pH-abhängige Messungen zeigten für hohe pH-Werte ein starkes Quellen, welches zu ellipsometrisch nicht vermessbaren Proben führte. Bei Erniedrigung des pH-Werts auf 10 konnten bei gleichen Konzentrationen für PEI 800 Da ähnliche Messwerte wie für das PEI mit MW 25 kDa erhalten werden. Auch hier zeigte sich somit keine Abhängigkeit des Quellkoeffizienten vom MW.

### Startkonzentrationen der Quellung

Zusätzlich zu den Messungen bei hohen Konzentrationen wurden auch Experimente mit sehr geringen Konzentrationen (< 0.5 g/L) durchgeführt. Hier zeigten sich Unterschiede im Quellverhalten der geladenen Polymere in Abhängigkeit des verwendeten MW. Es wurde die Konzentration bestimmt, bei der die Quellung der Lipidlagen startete (s. Abb. 4.26). Für das PAH wurde bei hohem MW schon bei geringeren Konzentrationen ein Quellbeginn gemessen. Während das PAH mit einem MW von 15 kDa erst einen Anstieg

der Schichtdicke ab etwa 0.1 mM aufwies, begann die Quellung für das PAH mit dem MW 58 kDa bei 0.05 mM und für das MW von 900 kDa schon bei 0.005 mM. Auch das PSS wies mit zunehmendem MW eine Quellung bei geringeren Konzentrationen auf. DMPC-Lipidlagen in PSS mit dem MW von 70 kDa inkubiert zeigten erst ab 0.15 mM ein Quellverhalten an, während ein MW von 1 MDa bereits bei 0.005 mM ein Quellen induzierte.

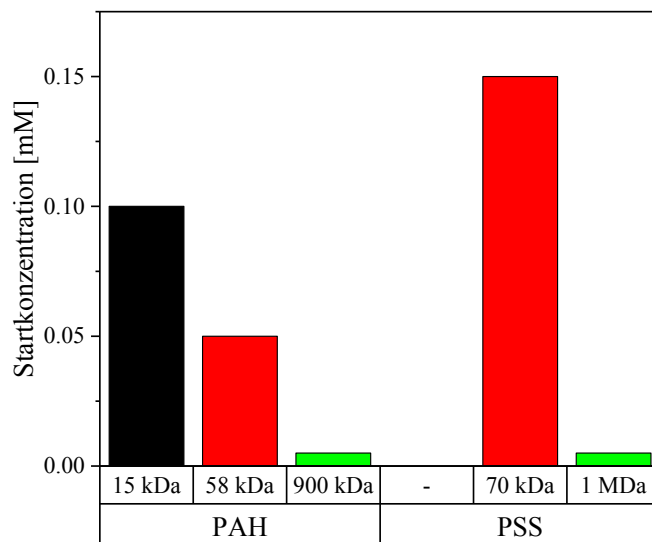


Abb. 4.26: Balkendiagramm für die Startkonzentration, welche nötig ist um eine Quellung der Lipidlagen zu induzieren. Für PAH wurden 3 MWs mit 15, 58 und 900 kDa verwendet. PSS war mit MWs von 70 kDa und 1 MDa verfügbar. Eine mit dem MW von 15 kDa vergleichbare Größe war nicht erhältlich.

Es zeigte sich, dass das Quellverhalten der Lipide bei höheren Konzentrationen unabhängig vom MW ist. Das Verhalten der Lipide ist jedoch von der Konzentration und der Ladung der PEs abhängig. Der Einfluss von Salzlösungen wird in den nächsten Kapiteln genauer untersucht.

### 4.2.3. Quellverhalten der Lipid-Oligolagen bei Anwesenheit ein- und zweiwertiger Ionen

Zur Bestimmung des Einflusses elektrostatischer Wechselwirkungen der PEs auf die Quellung der PL-Schichten sollte eine Abschirmung dieser Kräfte durch Salze bewirkt werden. Zunächst wurde ein System von Lipid-Oligolagen betrachtet, welches in reiner Salzlösung inkubiert wurde. Vor Einführung von Makromolekülen, welche das System verkomplizieren, sollten die elektrostatischen Wechselwirkungen reiner Salze auf die PL-Oligolage betrachtet werden. Dabei wurden sowohl mono- als auch divalente Salze verwendet.

### Einwertige Ionen

Anders als aus der Literatur erwartet,<sup>95-96,98,142-143</sup> induzierte NaCl eine Quellung der DMPC-Lipid-Oligolagen bei geringen Konzentrationen im mM-Bereich. Bei höheren Konzentrationen (zwischen 1 und 5 M) wird auch in der Literatur von einem Quellprozess berichtet.<sup>142</sup> Die Zunahme der Schichtdicke bei geringen NaCl-Konzentrationen konnte sowohl ellipsometrisch als auch in NR-Experimenten belegt werden (s. Abb. 4.27). Bei geringen Konzentrationen nahm die Schichtdicke der Lipidlagen zu. Höhere Konzentrationen führten zu Schichtdicken, die mit denen von in Wasser gequollenen DMPC-Lagen vergleichbar waren (Quellkoeffizient von 1.4 bei Normierung auf die Messung der trockenen Probe). Bei NaCl-Konzentrationen im mM-Bereich konnten ellipsometrisch Quellkoeffizienten von 2 - 2.5 festgestellt werden, während in NR-Messungen keine Bragg-Peaks erhalten wurden. Dies könnte an zu hoher Unordnung liegen. Erst bei 90 mM erschienen Bragg-Peaks erster und zweiter Ordnung in den NR-Experimenten. Aus ihnen konnte ein Quellkoeffizient von etwa 2.4 abgeschätzt werden. Dies entsprach nicht den Quellfaktoren aus den ellipsometrischen Daten, welche bei einer Konzentration von 90 mM sehr geringe Quellfaktoren von etwa 1.4 aufwiesen. Solche mit den Quellungen von DMPC-Oligolagen in reinem Wasser vergleichbaren Quellkoeffizienten wurden mittels NR-Messungen erst bei Konzentrationen von 1 M festgestellt.

Eine Erklärung für die Abweichung der Daten wurde nach Betrachtung der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden in IR-Spektren gefunden (s. Abb. 4.27). In 4.2.1 wurde gezeigt, dass mit zunehmender Schichtdicke die Intensität dieser Banden aufgrund der begrenzten Eindringtiefe des IR-Strahls abnimmt. Bei Zugabe von 1 mM wurde eine Quellung induziert. Die Lipidlagen wurden dicker und das Signal nahm ab. Bei Erhöhung der Konzentration konnte eine Verschiebung des Bragg-Peaks zu höheren  $q_z$ -Werten und somit zu geringeren lamellaren Abständen beobachtet werden. Die Intensität der IR-Banden wurde jedoch nicht im gleichen Maße zurückgewonnen. Diese Beobachtung spricht für ein Ablösen der Lipide vom Substrat. Eine Auswertung der Integrale ergab eine Abnahme von etwa 50 % der Intensität und somit ein Verlust von ungefähr der Hälfte der Lipide. Auch die Intensität der NR-Signale nahm ab, dies könnte jedoch auch an zunehmend ungeordneten Schichten liegen. Die IR-Daten legen jedoch einen Verlust an Lipiden nahe.

Da über ellipsometrische Messungen nur eine Bestimmung der Gesamtschichtdicke ermöglicht wurde, wurden aufgrund des Ablösevorgangs der Lipide verfälschte Quellkoeffizienten erhalten. Unter der Annahme von 50 % weniger Lipiden werden ähnliche Quellkoeffizienten wie für NR-Messungen erhalten. Ob auch in den NR-Messungen ein entsprechender Lipidverlust auftrat, lässt sich anhand der Messdaten nicht feststellen. Um Auskunft über den Anteil der abgelösten Lipidlagen treffen zu können, müsste mittels ellipsometrischer Untersuchungen die Gesamtschichtdicke bei einer NaCl-Konzentration gemessen werden, bei der die Quellkoeffizienten denen der Quellung in Wasser entsprechen. NR-Messungen zeigten, dass dies bei etwa 1 M der Fall ist. Bei so

## Ergebnisse und Diskussion

hohen NaCl-Konzentrationen kam es jedoch zur Trübung der Inkubations-Lösungen, sodass keine ellipsometrischen Daten aufgenommen werden konnten. Die abgelösten Lipidlagen verblieben als Vesikel in der Lösung und erschwerten die Messungen am Ellipsometer.

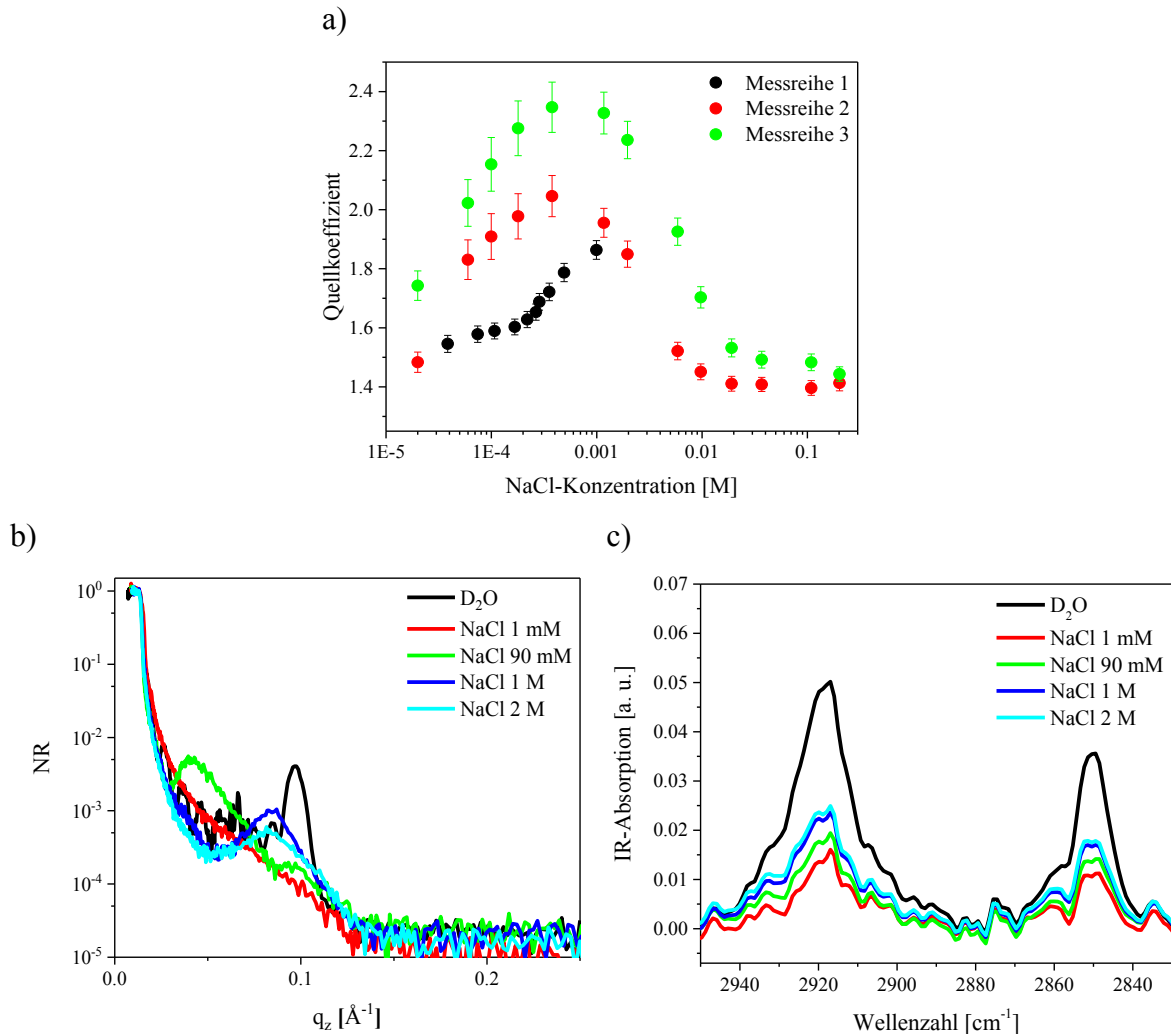


Abb. 4.27: Messungen an DMPC-Oligolagen bei Zugabe von NaCl. Abgebildet sind a) Quellkoeffizienten aus den ellipsometrischen Messungen, b) NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  und c) IR-Messungen der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden.

In der Literatur wird eine bevorzugte Adsorption von Kationen an die Phosphatgruppe beschrieben.<sup>88</sup> Wird angenommen, dass die hier beobachtete Quellung durch Adsorption der Na<sup>+</sup>-Ionen und die damit einhergehende Aufladung der Lipid-Oligolagen induziert wird, müsste bei Verwendung von KCl gemäß der Hofmeister-Reihe und der durch Gurtovenko *et al.* gefundenen schwächeren Anbindung von K<sup>+</sup> an PL<sup>144</sup> eine geringere Quellung festgestellt werden. Bei einem Vergleich der ellipsometrisch bestimmten Quellkoeffizienten in Abhängigkeit der NaCl- und der KCl-Konzentration (s. Abb. 4.28)



konnte jedoch aufgrund der großen Probe-zu-Probe-Variationen kein Unterschied festgestellt werden. Bei Erhöhung der KCl-Konzentration trübte sich die Lösung jedoch nicht. Das heißt, bei diesen Messungen konnte keine Ablösung der Lipide festgestellt werden. Bei den Experimenten mit NaCl erfolgte hingegen ein Verlust der DMPC-Lagen, sodass die hierbei erhaltenen Quellkoeffizienten zu gering ausfielen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die durch KCl induzierte Quellung weniger als 50 % der durch NaCl hervorgerufenen beträgt, sodass die durch KCl induzierte Quellung der PLs tatsächlich geringer ausfiel.

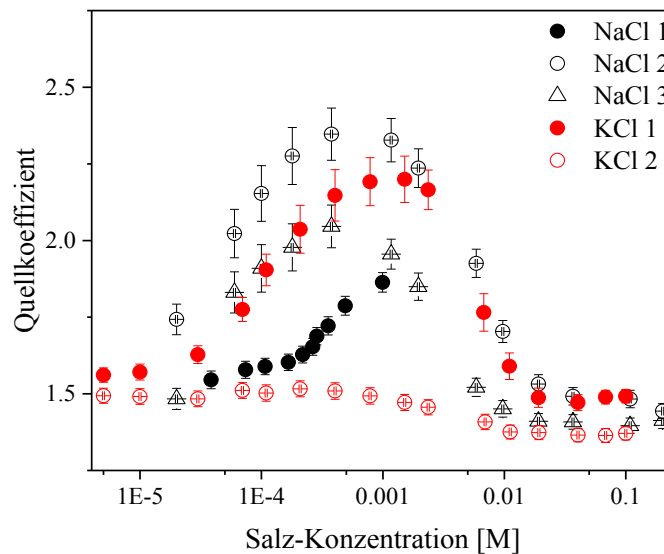
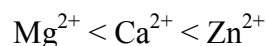


Abb. 4.28: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit von der NaCl- und der KCl-Konzentration. Gezeigt sind 2 bzw. 3 Messreihen für KCl und NaCl.

### Zweiwertige Ionen

Während für monovalente Ionen in der Literatur keine Quellung bei niedrigen Konzentrationen gefunden wurde, gibt es Berichte von Quellungen der PLs durch Konzentrationen von zweiwertigen Ionen im mM-Bereich.<sup>89,94-96</sup> In dieser Arbeit konnte im Einklang hierzu eine Zunahme der Lipidschichtdicken bei Zugabe von  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  beobachtet werden (s. Abb. 4.29). Gemäß der Hofmeister-Reihe müsste eine Zunahme der Quellung wie folgt beobachtet werden:



Im Vergleich zu den einwertigen Ionen war in ellipsometrischen Messungen zunächst eine deutliche Quellung zu sehen. Auch eine Trübung der Lösung bei zunehmender Konzentration und eine damit einhergehende Ablösung von Lipidlagen konnte nicht beobachtet werden. Jedoch war es nicht möglich eine Änderung im Quellverhalten gemäß

der Hofmeister-Reihe festzustellen. Vermutet wird, dass die Vorhersagen der Reihe stark abhängig von der jeweiligen Konzentration sind. Ähnliches wurde von Schwierz *et al.* beobachtet.<sup>97</sup> Sie berichteten eine Umkehrung der Reihenfolge bei höherer Oberflächenladung. Für das hier betrachtete System könnte vermutet werden, dass durch Erhöhung der Ionenkonzentration die Lipidschichten stärker aufgeladen werden und eventuell ähnliche Effekte beobachtet werden können.

Literaturwerte für die Quellkoeffizienten bei Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$  liegen für Konzentrationen von 10 mM bei 3 und sind somit weit unter den hier bestimmten Werten von 7.<sup>95</sup> Diese Arbeiten verwendeten jedoch keine festkörpergestützten Systeme. Die Messungen wurden an gelösten Lipiden durchgeführt. Inwiefern die Verwendung von festkörpergestützten Lipiden in der vorliegenden Arbeit zu Abweichungen von den erwarteten Quellkoeffizienten führen, ist bisher noch unklar.

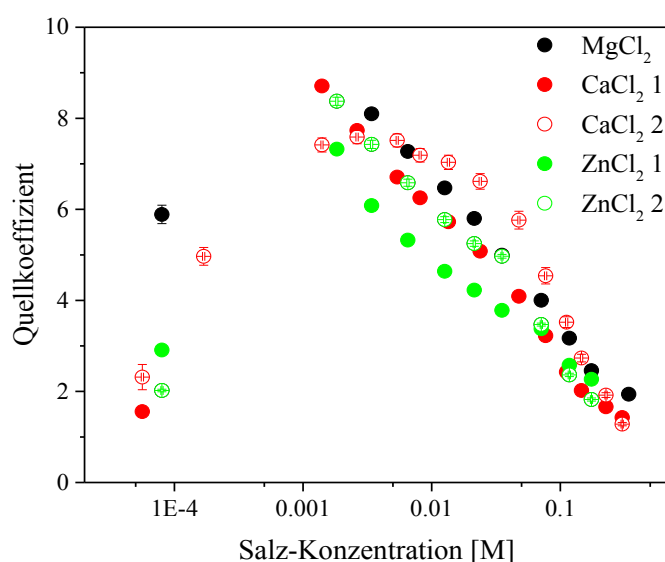


Abb. 4.29: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit von der Konzentration der zweiwertigen Ionen  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ .

#### 4.2.4. Variation der Salzkonzentration nach Inkubation mit HS und PEs

Lagern sich HS bzw. polymere Ersatzstoffe an die Kopfgruppen der Lipide an,<sup>54-55</sup> so entsteht eine repulsive Kraft zwischen den Lipid-Doppellagen aufgrund der Aufladung durch die PEs. Es wird erwartet, dass diese repulsiven Kräfte bei Abschirmung der Ladungen zurückgehen und die lamellaren Schichtdicken kleiner werden. Durch Zugabe von freien Ladungsträgern sollte diese Annahme überprüft werden.

Nach Debye (s. Formel (2.10)) werden bei NaCl-Konzentrationen von 10 - 1000 mM Abschirmlängen zwischen 3 und 0.3 nm erhalten. Je größer die Konzentration desto geringer ist der Abstand, in dem das elektrostatische Potential einer Ladung auf das 1/e-fache abgefallen ist. Mit zunehmender Konzentration nimmt somit die Ladungsrepulsion ab und gegensätzlich geladene Moleküle können sich näher kommen.

Zur Untersuchung der Auswirkung der Salzkonzentration wurde die jeweilige Probe zunächst in eine PE bzw. HS-Lösung bestimmter Konzentration inkubiert. Nach Erreichen des Gleichgewichts wurde bei konstanter PE-Konzentration die Konzentration der Salze variiert. Die Konzentration ist jeweils in Molar angegeben. Sie bezieht sich auf die jeweilige Gegenionen-Konzentration, welche sich aus der PE- und der Salzkonzentration zusammensetzt. Bei Verwendung des zweiwertigen  $\text{CaCl}_2$  wurde statt der Konzentration die Ionenstärke angegeben, welche für einwertige Salze der Konzentration, aber für zweiwertige dem dreifachen Wert der Konzentration entspricht.

### HS

Erste Messungen wurden mit HS durchgeführt. Nach Verdünnen der Lösungen auf eine Konzentration von 2.5 mM (1 g/L HS) wurde die NaCl-Konzentration sukzessive erhöht. Die Konzentration der HS wurde konstant gehalten. In Abb. 4.30 sind die Quellkoeffizienten für diesen Versuch in Rot dargestellt. Zum Vergleich ist eine Messreihe mit variierender HS-Konzentration zu sehen (s. Abb. 4.30, schwarz, besprochen in Abschnitt 4.2.1). Die erhaltenen Koeffizienten bei etwa 5 mM stimmen für beide Messreihen überein. Mit zunehmender NaCl-Konzentration nahm der Quellkoeffizient bis auf einen Grenzwert von 2 ab. Die Zugabe von NaCl zeigte die gleiche Wirkung wie eine Erhöhung des HS-Anteils. Von Kreuzer wurde ebenfalls ein Experiment mit HS zur Ladungsabschirmung durchgeführt. Er verwendete dabei HS-Lösungen der Konzentration 3 g/L und gab 1 M NaCl hinzu.<sup>54</sup> Er erhielt einen lamellaren Abstand von 68 Å, welcher mit einem Quellfaktor von 1.28 nahe dem des Wassers ist. Es scheint, dass der Grenzwert, trotz Einbettung von HS, PAH oder anderen Ionen, doch den Wert von in Wasser gequollenen DMPC-Oligolagen erlangen kann (s. 4.2.1).

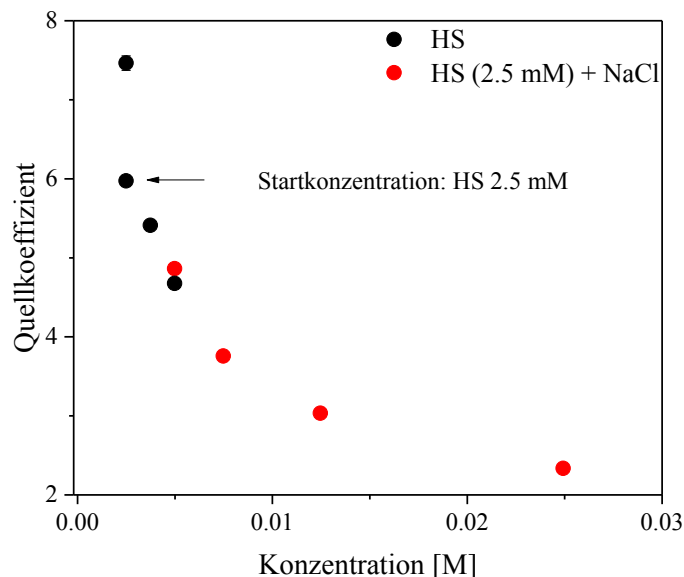


Abb. 4.30: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der NaCl- bzw. von der HS-Konzentration. Es wurde HS mit einem MW von 769 kDa verwendet. Die Zugabe von NaCl erfolgte nach der Messung in reiner HS mit der Konzentration 2.5 mM.

### PSS

Auch für PSS konnte Ähnliches beobachtet werden. Bei einer konstanten PSS-Konzentration von 15 mM (3 g/L) wurde NaCl bzw. KCl hinzugegeben. Beide Salze zeigten mit zunehmender Konzentration eine Reduktion des Quellkoeffizienten auf einen Grenzwert von 2 (s. Abb. 4.31). Im Vergleich zu Messungen mit variierender PSS-Konzentration (s. Abb. 4.31, schwarz, besprochen in Abschnitt 4.2.1) ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Salz-Konzentration den gleichen Effekt wie die Zugabe von PSS hat.

Wurde in einem weiteren System jedoch mit  $\text{CaCl}_2$  ein zweiwertiges Salz hinzugefügt, so nahm der Quellkoeffizient bereits bei geringen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen sehr stark ab. Dabei sank er noch unter den Grenzwert von 2 (s. Abb. 4.32). Erklärt wurde dies über eine starke Komplexbildung des PSS mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Unter der Annahme, dass die PE einschließlic PSS in die DMPC-Schichten einbauen, ist es unwahrscheinlich, dass die Komplexbildung zu einem Herauslösen des PSS führte. Daher wurde angenommen, dass die Komplexbildung des  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Bindung an das PSS zu einer sehr starken Ladungsabschirmung und somit zu einem starken Rückgang des Quellkoeffizienten führt.

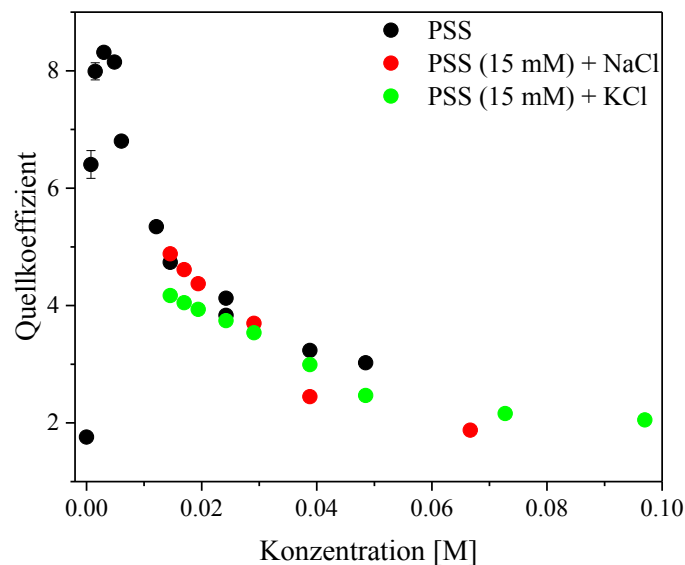


Abb. 4.31: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten bei variierender PSS- (70 kDa), NaCl- und KCl-Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PSS-Konzentration konstant bei 15 mM gehalten.

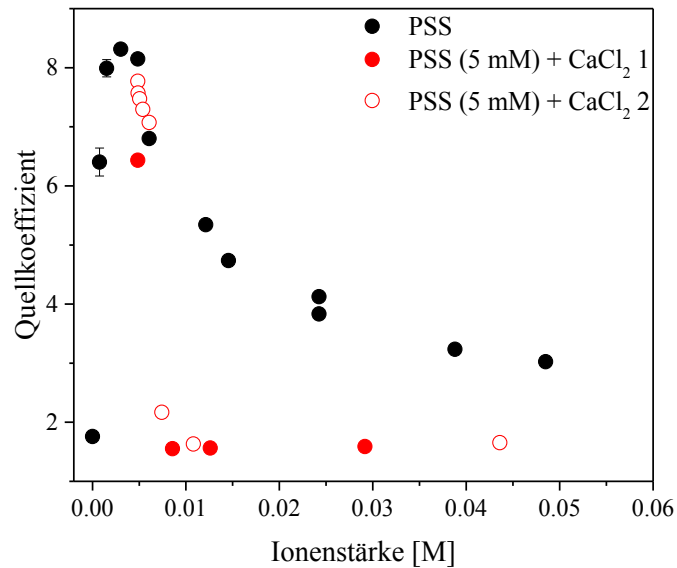


Abb. 4.32: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten bei variierender PSS- (70 kDa) bzw. CaCl<sub>2</sub>-Konzentration. Für die CaCl<sub>2</sub>-Zugabe sind zwei verschiedene Messreihen gezeigt. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PSS-Konzentration konstant bei 5 mM gehalten.

### PAH

Bei Zugabe von NaCl zu PAH-Lösungen (32 mM) konnte ebenfalls eine Verringerung der Quellkoeffizienten festgestellt werden. Abb. 4.33 und Abb. 4.34 zeigen ellipsometrische bzw. NR-Messungen und die daraus erhaltenen Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der zugegebenen NaCl-Konzentration. Begonnen wurde jeweils bei einer im Verlauf konstant gehaltenen PAH-Konzentration von 32 mM (3 g/L). Bei Erhöhung der NaCl-Konzentration sinkt der Quellkoeffizient. Die Bragg-Peaks der NR-Kurven schieben nach links (s. Abb. 4.34a). Ein Vergleich mit Messreihen variierender PAH-Konzentration (s. Abb. 4.33, schwarz, besprochen in Abschnitt 4.2.1) zeigt, dass sowohl die Erhöhung von PAH- als auch von NaCl-Konzentration einen Rückgang der Quellkoeffizienten in gleichem Maße induzieren.

Es scheint, dass die Abhängigkeit des Quellverhaltens von der PAH- bzw. der NaCl-Konzentration nur durch Ladungen bzw. ihre Abschirmung erzeugt wird. Dies lässt vermuten, dass eine vollständige Sättigung der DMPC-Kopfgruppen mit PAH bereits bei sehr geringen PAH-Konzentrationen vorlag und dass weitere Zugabe von PAH bzw. NaCl nur noch zur Abschirmung von elektrostatischen Repulsionen zwischen dem angelagerten PAH und den DMPC-Lagen führte.

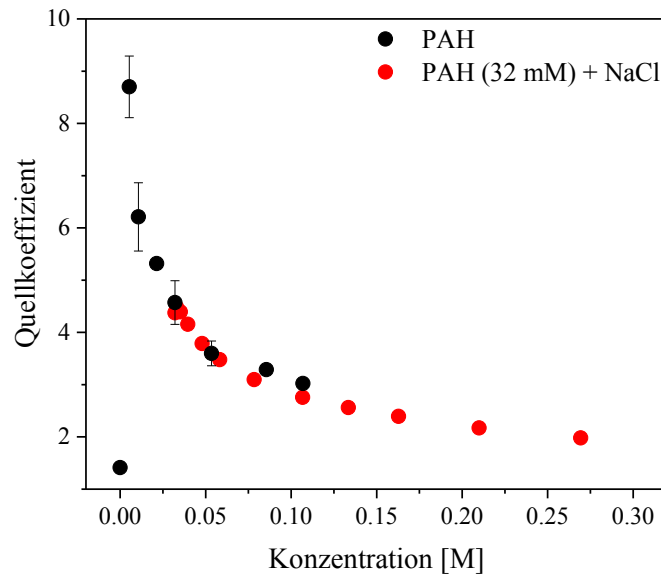


Abb. 4.33: Ellipsometrische Messungen zum Quellverhalten der PL-Oligolagen bei Zugabe von PAH (15 kDa) und NaCl. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten.

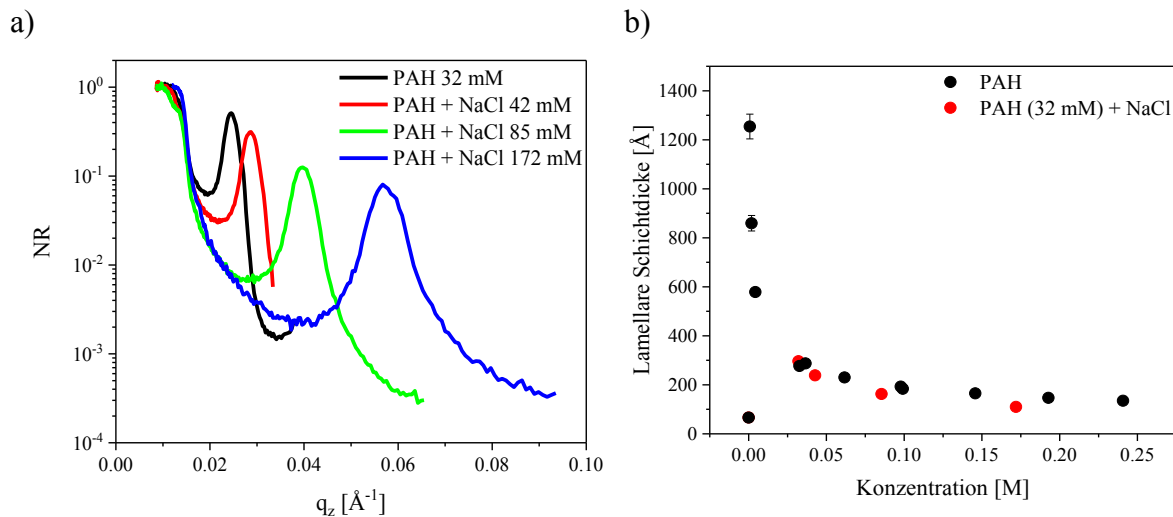


Abb. 4.34: a) NR-Messungen zum Quellverhalten der PL-Oligolagen bei Zugabe von PAH (58 kDa) und NaCl. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten. Mit zunehmender NaCl-Konzentration schieben die Bragg-Peaks nach rechts. Es ist jeweils nur der erste Bragg-Peak dargestellt. b) Auftragung der lamellaren Schichtdicke gegen die PAH- bzw. NaCl-Konzentration.

IR-Messungen der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden und die Auswertung der Integrale ergab ebenfalls eine Reduktion des Quellfaktors mit zunehmender NaCl-Konzentration (s. Abb. 4.35). Die Abbildung zeigt die Intensität der IR-Banden resultierend aus der asymmetrischen und der symmetrischen CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden normiert auf das Integral der reinen Wassermessung.

## Ergebnisse und Diskussion

Theoretische Berechnungen zu den IR-Daten basierend auf der begrenzten Eindringtiefe des evaneszenten Feldes der IR-Strahlung (s. 4.2.1) zeigten ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den experimentell erhaltenen Daten (s. Abb. 4.35b). Auch hier tragen sowohl Lipide als auch PAH zum IR-Signal der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsbanden bei. Die Zunahme der Intensität bei Zugabe von NaCl beruht auf der geringeren Abstoßung und der daraus resultierenden kleineren Quellung des Gesamtsystems.

DMPC findet sich in den Schichtdickenintervallen  $[nd; nd + d_w]$  mit  $n = 0, \dots, N-1$ .  $d_w$  beschreibt dabei die Schichtdicke einer trockenen DMPC-Bilage, während  $d$  für die lamellare Schichtdicke steht.  $N$  ist die Anzahl der Schichten. Der Beitrag der Lipide jedes Intervalls zum IR-Signal wird mit den Gleichungen (4.6) und (4.7) berechnet. Der Beitrag des PAH setzt sich aus dem gelösten und dem adsorbierten Anteil zusammen. Ersterer ist dabei konstant, da nur die NaCl- nicht aber die PAH-Konzentration variiert wurde. Berechnung erfolgten nach Gleichungen (4.8) - (4.13).

Im Gegensatz zum PSS ist das PAH positiv geladen und es kann erwartet werden, dass mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen keine Komplexbildung stattfinden kann. Ellipsometrische Messungen müssten demnach bei Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  die gleichen Effekte wie bei Erhöhung der NaCl- oder der PAH-Konzentration zeigen. Die Experimente hierzu sind in Abb. 4.36 zu sehen. Bei der Darstellung der Ionenstärke gegen den Quellkoeffizienten lagen die zur Variation der PAH-, der NaCl- und der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration zugehörigen Kurven nahezu übereinander und bestätigten damit die Vermutungen.

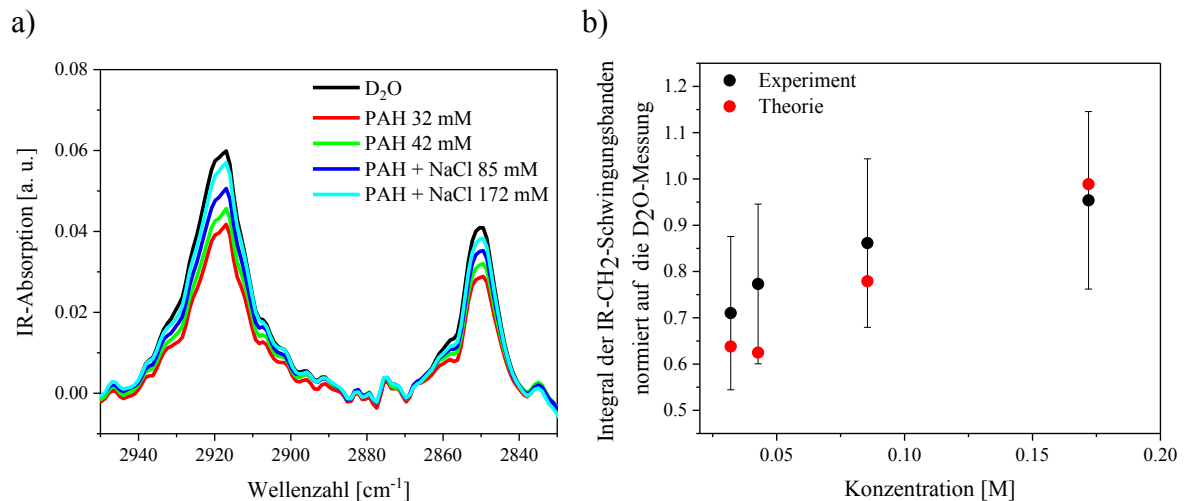


Abb. 4.35: IR-Messungen in Abhängigkeit von PAH- (58 kDa) bzw. NaCl-Konzentration. a) IR-Spektren der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen bei variierender PAH- und NaCl-Konzentration und b) Gesamtintegral der IR-Intensitäten der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen. Gezeigt sind die auf die  $\text{D}_2\text{O}$ -Messung normierten Gesamtintegrale der experimentellen und berechneten Werte in Abhängigkeit von PAH- bzw. NaCl-Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten.

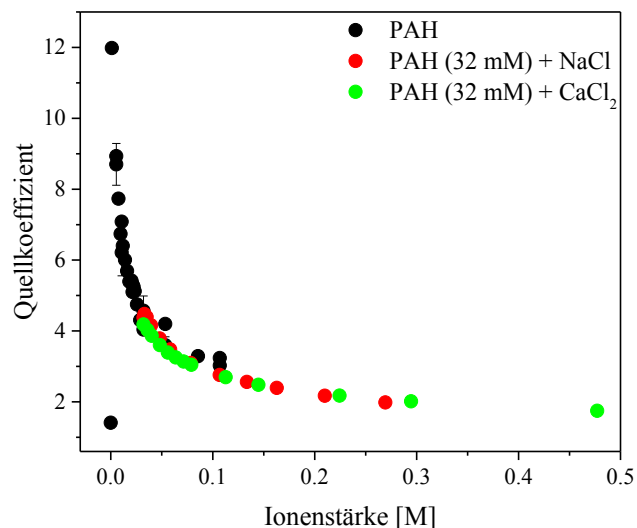


Abb. 4.36: Ellipsometrische Messungen des Quellkoeffizienten der PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der PAH-, NaCl- und der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten.

Ein Fit der NR-Daten nach dem in 4.2.1 entwickelten Modell 1 und die erhaltenen Parameter sind in Abb. 4.37 bzw. Abb. 4.38 zu sehen. Die Gesamtschichtdicke und die Wasserschichtdicke nahmen wie bei der Zugabe von PAH auch bei Erhöhung der NaCl-Konzentration ab. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte eine Änderung der PAH-Zwischenschichtdicke von 18 auf 5 Å bei gleichzeitiger Reduktion des Wassergehalts von 90 % auf 70 % beobachtet werden. Wie in 4.2.1 (Variation der PAH-Konzentration) scheint sich die PAH-Schichtdicke mit zunehmender Ladungsträger-Konzentration zu verringern. Der PAH-Anteil nimmt zu.

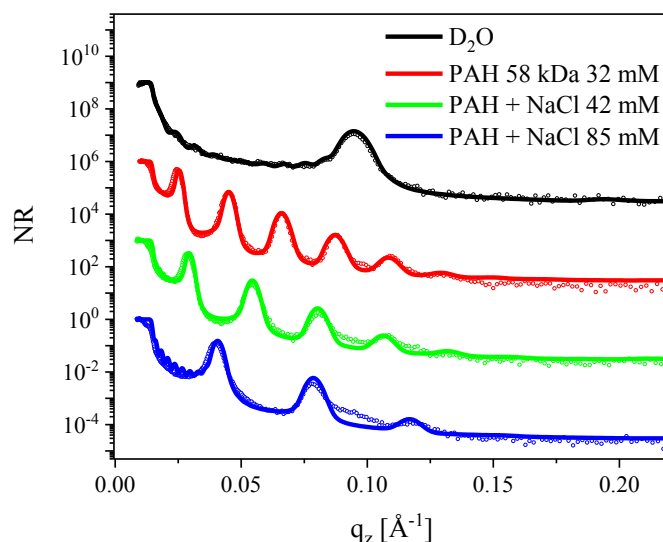


Abb. 4.37: NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie basierend auf Modell 1 (Linie) für DMPC-Oligolagen in PAH mit dem MW 58 kDa (32 mM) und variierender NaCl-Konzentration inkubiert. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal verschoben.



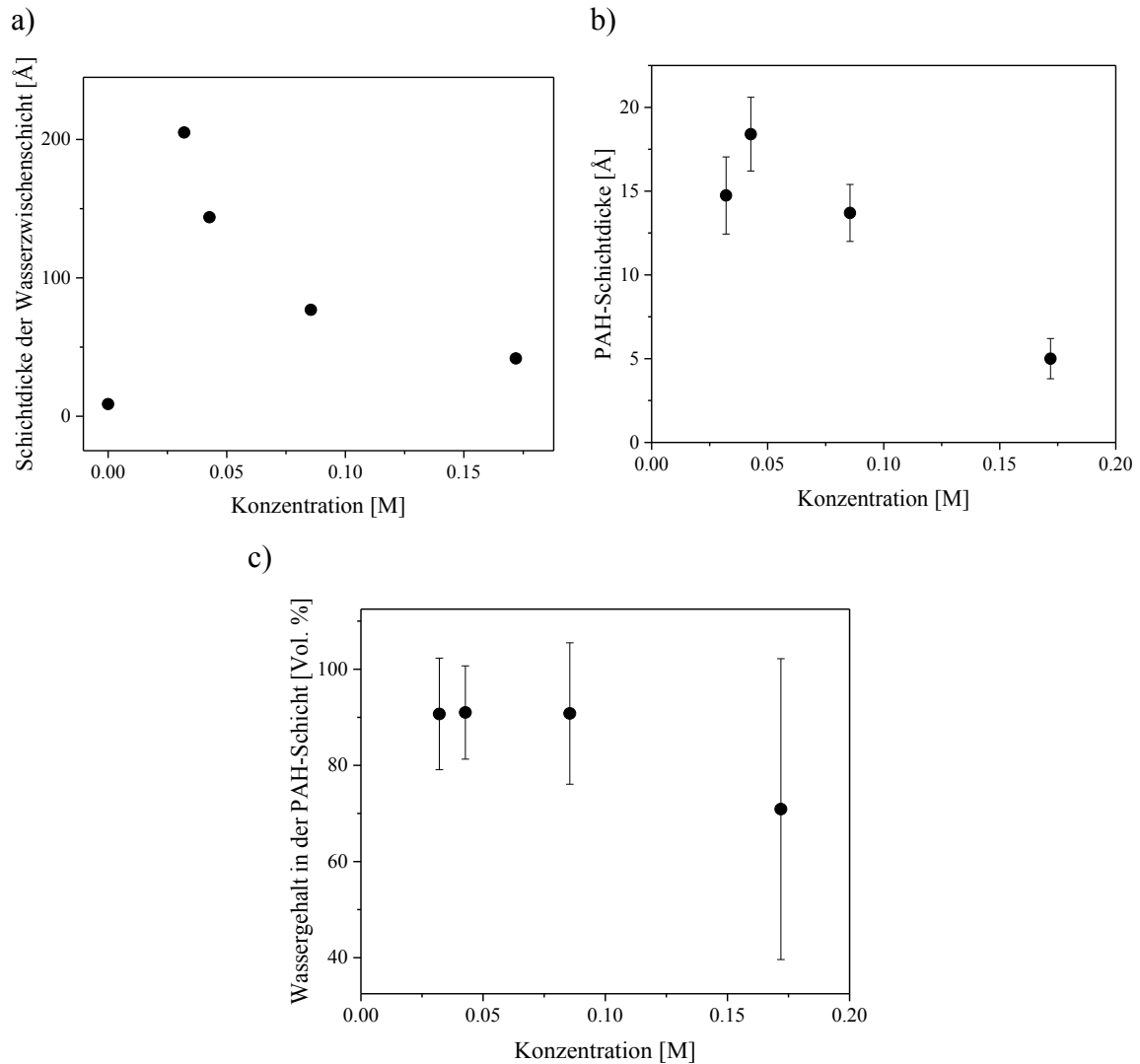


Abb. 4.38: Aus Modell 1 erhaltene Parameter der PAH-induzierten Quellung von DMPC-Oligolagen. Angegeben sind a) die Schichtdicke der Wasserzwichenschicht, b) der adsorbierten PAH-Schicht und c) der Wassergehalt der PAH-Schicht in Abhängigkeit von der PAH (58 kDa)- und NaCl-Konzentration.

## PEI

Ellipsometrische Experimente für das ungeladene PEI wurden ebenfalls bei gleichbleibender PEI-Konzentration von 70 mM (3 g/L) durchgeführt (s. Abb. 4.39). Eine Zugabe von NaCl bewirkte zunächst eine schwache Quellung des Systems, vermutlich hervorgerufen durch Einlagerung von Ionen, welche eine Abstoßung der Lipidlagen induzierten. Bei höheren NaCl-Konzentrationen war das System ellipsometrisch nicht mehr messbar. Da PEI die Lipidlagen unterwandern kann<sup>87</sup> wurde davon ausgegangen, dass das System zerstört wurde. Die Zugabe von wässriger NaCl-Lösung zu reinen Lipidfilmen zeigte bereits eine teilweise Zerstörung des Systems (s. 4.2.3). Die fehlende Stabilisierung durch PEI bewirkte vermutlich auch hier ein Ablösen der Lipidschichten bei Zugabe von NaCl.

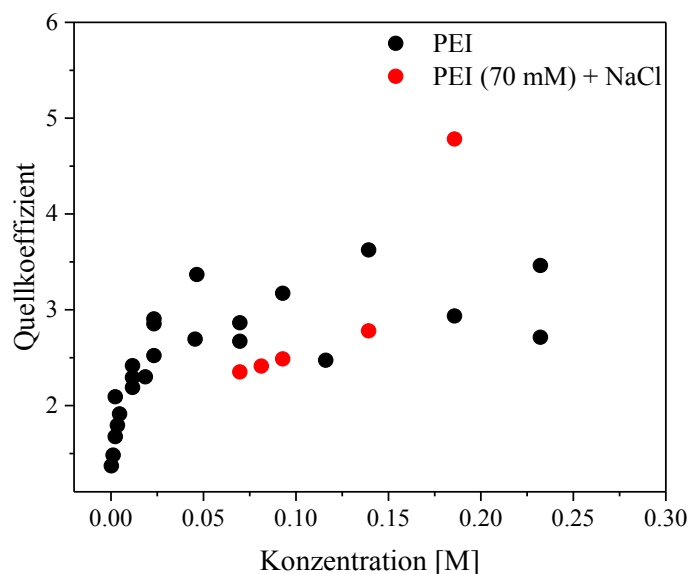


Abb. 4.39: Ellipsometrische Messungen des Quellkoeffizienten der PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der PEI- (25 kDa) bzw. der NaCl-Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PEI-Konzentration konstant bei 70 mM gehalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PAH, PSS und HS die Lipidlagen gegen NaCl stabilisieren können, während ungeladene PEs wie PEI keine Stabilisierung der Lipidlagen bewirkt. Zudem scheint ab einer relativ geringen PE-Konzentration die Adsorption der PEs an die Lipidlagen gesättigt zu sein. Zugabe von weiterem PE oder Salzen führt bei geladenen PEs zu einer Reduktion der Quellkoeffizienten. Dieser Effekt lässt sich über die Abschirmungskräfte der PE-Gegenionen erklären.

#### 4.2.5. Variation des pH-Werts

Auch die Änderung des pH-Werts über NaOH- und HCl-Zugabe kann zu Ladungsreduktionen der an den Lipid-Kopfgruppen adsorbierten Polymerschichten führen. Dies sollte ebenfalls zu einer verminderten Repulsion führen. Entscheidend für die Beurteilung der vorliegenden Ladungen sind die  $pK_S$ -Werte der PEs. Entspricht der vorliegende pH-Wert dem  $pK_S$ -Wert, so liegen die Säure und ihre korrespondierende Base in gleicher Konzentration vor und es besteht Ladungsneutralität. Der  $pK_S$ -Wert von PAH liegt zwischen 8 und 9,<sup>71</sup> der von PEI bei 7.1.<sup>70</sup> PSS ist ein starker PE, dessen Dissoziationsgrad in wässriger Lösung unabhängig vom pH-Wert ist. Für die HS, welche zwitterionisch vorliegt, ist der sogenannte isoelektrische Punkt charakterisierend. Er liegt für HS bei einem pH-Wert von 8.6.<sup>69</sup> An ihm liegen gleich viel negativ wie positiv geladene funktionelle Gruppen vor. An diesem Punkt sollte somit das geringste Quellen der PLs beobachtet werden können. Wässrige PEI-Lösungen haben einen pH-Wert von 10 und können als neutral geladen betrachtet werden.

Neben dem Einfluss des pHs auf die PEs sollte aber auch ein möglicher pH-Einfluss auf die Lipid-Oligolagen nicht außer Acht gelassen werden. In der Literatur findet sich zwar,

## Ergebnisse und Diskussion

dass die Phasenübergangstemperatur über einen weiten pH-Bereich von 2 - 14 für DMPC stabil bleibt,<sup>42</sup> aber es muss ebenfalls davon ausgegangen werden, dass pH-Änderungen nicht nur die Ladungen der PEs beeinflussen sondern auch die der Lipide.

Daher wurde zunächst eine mit DMPC beschichtete Probe in reinem Wasser inkubiert. Es erfolgte keine PE-Zugabe. In weiteren Schritten wurde der pH-Wert durch Zugabe von NaOH und HCl variiert. Die sich aus ellipsometrischen Messungen ergebenden Quellkoeffizienten sind in Abb. 4.40 zu sehen. In einem breiten pH-Bereich von etwa 4.2 bis 10.3 schien die pH-Änderung keinen Einfluss auf die Quellung der PL-Oligolagen zu nehmen. Erst ab pH-Werten größer 10.3 waren keine ellipsometrischen Messungen mehr möglich. Dies könnte von einer pH-Wert induzierten starken Quellung der Lipidlagen, welche zu einem in diesem Ausmaße nicht messbaren Schichtdicke führte, verursacht werden. Die starke negative Aufladung der PLs könnte im basischen Milieu nicht mehr abgeschirmt werden.

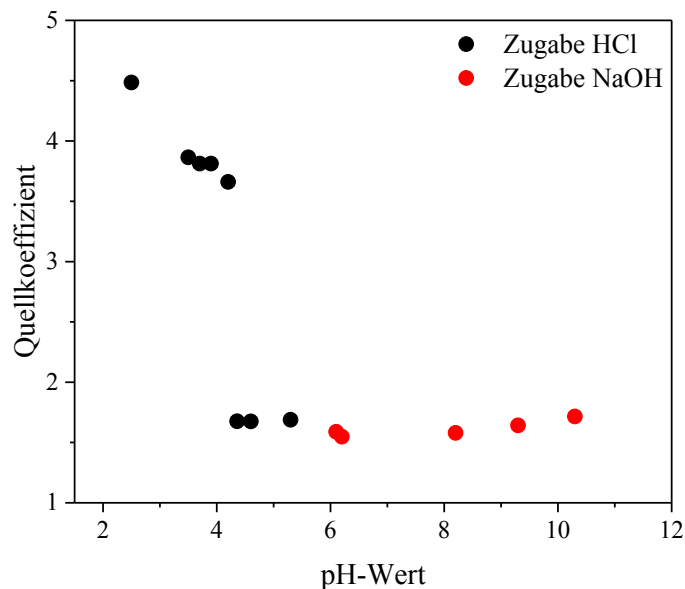


Abb. 4.40: Ellipsometrisch ermittelte Quellkoeffizienten der in Wasser inkubierten PL-Oligolagen bei variierendem pH-Wert.

Ähnliches wurde auch bei geringen pH-Werten beobachtet. Die Quellung begann hier schon bei einem pH-Wert von etwa 4.2. Das DMPC, welches wie die HS zwitterionisch vorliegt, besitzt seinen isoelektrischen Punkt bei pH 4.15.<sup>145</sup> Hier liegen gleich viel negativ wie positiv geladene Gruppen vor. Bei geringerem pH-Wert überwiegt die positive Ladung, welche schlecht abgeschirmt zu einer Quellung der Lipidlagen führt. Eigentlich sollte vermutet werden, dass ein ähnliches Verhalten auch ab pH-Werten größer 4.2 eintritt. Es konnte jedoch erst bei sehr viel höheren Werten von 10.3 ein starkes Quellen vermutet werden, welches jedoch nicht mehr im Messbereich des Ellipsometers lag. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die quartäre Ammoniumverbindung ( $\text{NR}_4^+$ ) im DMPC auch im basischen nicht deprotoniert werden kann,

während eine Protonierung der Phosphatgruppe im sauren Milieu möglich ist. Die zusätzlich mögliche Adsorption von Na-Ionen in den Schichten führte wahrscheinlich zu einer starken Abschirmung der negativen Ladungen und es kam erst bei sehr hohen pH-Werten zu einer durch negative Ladung induzierten Abstoßung zwischen den Bilagen. Die Lipid-Oligolagen zeigten somit ein pH-induziertes Quellverhalten, welches bei der PE-Zugabe berücksichtigt werden musste.

In weiteren Experimenten wurden die PL-Oligolagen in verschiedene PE-Lösungen inkubiert. Durch Zugabe von HCl bzw. NaOH wurden abermals die pH-Werte variiert. Die PE-Konzentration wurde dabei konstant gehalten. Die ellipsometrisch erhaltenen Quellkoeffizienten sind in Abb. 4.41 zu finden. Der pH-Wert der PSS- und PAH-Lösungen (1 bzw. 3 g/L) betrug 5 bzw. 4, während der pH der PEI-Lösung (3 g/L) bei 10 lag.

### **PSS**

Für PSS 70 kDa wurde eine Konzentration von 4.85 mM (1 g/L) verwendet. Eine Erniedrigung des pH-Werts führte schon ab pH-Werten von 4.5 zu einer geringeren Quellung mit einem Quellkoeffizient von 1.8 (s. Abb. 4.41a). Die weitere Erniedrigung des pH-Werts bewirkte keine Änderungen der Schichtdicke. Die Zugabe von HCl führte demnach zu einer Reduktion der Lipid-Schichtdicke. Die durch das negativ geladene PSS induzierte Abstoßung zwischen den Lagen schien abzunehmen. Die Zugabe von NaOH hingegen unterstützte das Quellen. Ab einem pH-Wert von 9 waren keine ellipsometrischen Messungen mehr möglich, da das System stark gequollen war.

Die Erhöhung des pH-Werts ermöglicht, induziert durch die stärkere negative Aufladung des PSS, ausgeprägtere Abstoßungen zwischen den Lipidlagen. Da PSS ein starker Polyelektrolyt ist, sollte dessen Dissoziationsgrad unabhängig vom pH-Wert sein, sodass dieses pH-abhängige Verhalten nicht erwartet wurde. Es kann nur über die Beteiligung der PL-Lagen erklärt werden. Eine Erniedrigung des pH-Werts führt zu einer positiven Aufladung der Bilagen, welche der Abstoßung durch die adsorbierten negativ geladenen PEs entgegenwirkt, während die Zugabe von NaOH die Lagen ebenfalls negativ auflädt und zu einer Verstärkung der durch das ebenfalls negativ geladenen PSS induzierten Quellung führt.

### **PAH**

Auch mit in PAH 15 kDa inkubierten PL-Lagen einer Konzentration von 32.1 mM (3 g/L) wurden ähnliche Experimente durchgeführt (s. Abb. 4.41b). Durch die Zugabe von PAH lag der pH-Wert der Lösung bereits bei etwa 4. Eine weitere Erniedrigung des Wertes führte ab einem pH-Wert von 2 zu einer langsamen Abnahme der Quellung. Der Quellkoeffizient lag mit etwa 2.8 noch deutlich über dem von PSS bei gleichem pH-Wert. In Kombination mit dem positiv geladenen PAH sollten die PL-Lagen bei geringerem pH-Wert eher quellen. In der Literatur wird jedoch von einer Änderung der Phasenübergangstemperatur ab einem pH-Wert von 2 berichtet.<sup>42</sup> Möglicherweise sind Messungen an PL-Lagen unterhalb eines pH-Werts von 2 mit Änderungen in der Lipid-

Struktur verbunden. Darum sollen im weiteren Verlauf nur Messungen oberhalb eines pHs von 2 betrachtet werden.

Im Bereich von pH 2 bis 6 konnte ein Plateau der Quellmessungen beobachtet werden. Unterschiede in den Plateauhöhen ergaben sich lediglich aus Probe-zu-Probe-Variationen. Mit zunehmendem pH-Wert und dem Erreichen des  $pK_S$ -Werts (zwischen 8 und 9) von PAH wurde, wie zu erwarten, ein Minimum im Quellkoeffizienten von etwa 1.8 erhalten. Hier liegen gleich viel geladene wie ungeladenen Gruppen der PAH vor. Ein ähnliches Zurückgehen der Quellung des Systems wurde ebenfalls in der Literatur bei pH 9 beobachtet.<sup>84</sup> Mit zunehmendem pH-Wert konnte in der vorliegenden Arbeit eine erneute Quellung durch Abstoßung der nun negativ aufgeladenen Lipidlagen beobachtet werden. Die Ladung des PAH ist dabei nahezu neutral.

### **PEI**

Messungen mit PEI 25 kDa einer Konzentration von 69.7 mM (3 g/L) zeigten ein ähnliches pH-abhängiges Verhalten (s. Abb. 4.41c). In einem pH-Wert-Bereich von 8 - 10 lag das Minimum des Quellkoeffizienten. Das PEI liegt dort größtenteils ungeladen vor. Mit abnehmendem pH-Wert nahm die positive Aufladung von PEI zu und damit auch die Abstoßung zwischen den Lipidlagen. Mit einem aus der Literatur bekannten  $pK_S$ -Wert für PEI von etwa 7<sup>70</sup> wurde zwar mit einer bei geringeren pH-Werten einsetzenden Quellung gerechnet, aber für den Start der Quellung reichen anscheinend bereits wenige geladenen funktionelle Gruppen. Der Anstieg der Quellung bei höheren pH-Werten lässt sich hier ebenfalls durch die negative Aufladung der Lipidlagen und der damit einhergehenden Abstoßung erklären. Bei sehr hohen pH-Werten konnten keine ellipsometrischen Messungen durchgeführt werden. Grund hierfür war eine zu starke Quellung der Schichten.

Dies ist auch die Erklärung für die unterschiedliche Auswirkung von PEI 25 kDa im Vergleich zu PEI 800 Da. Während Messungen mit reinem PEI 25 kDa möglich waren, konnten mit PEI 800 Da keine Daten erhalten werden. Dies lässt sich über den unterschiedlichen pH-Wert der beiden Inkubationslösungen erklären. Während Messungen mit PEI 25 kDa um den pH-Wert von 10 durchgeführt wurden, lag der Start-pH der PEI 800 Da-Lösungen bei etwa 13. Die daraus resultierende starke Quellung konnte ellipsometrisch nicht bestimmt werden. Bei Verringerung des pH-Werts konnten messbare Proben erhalten werden.

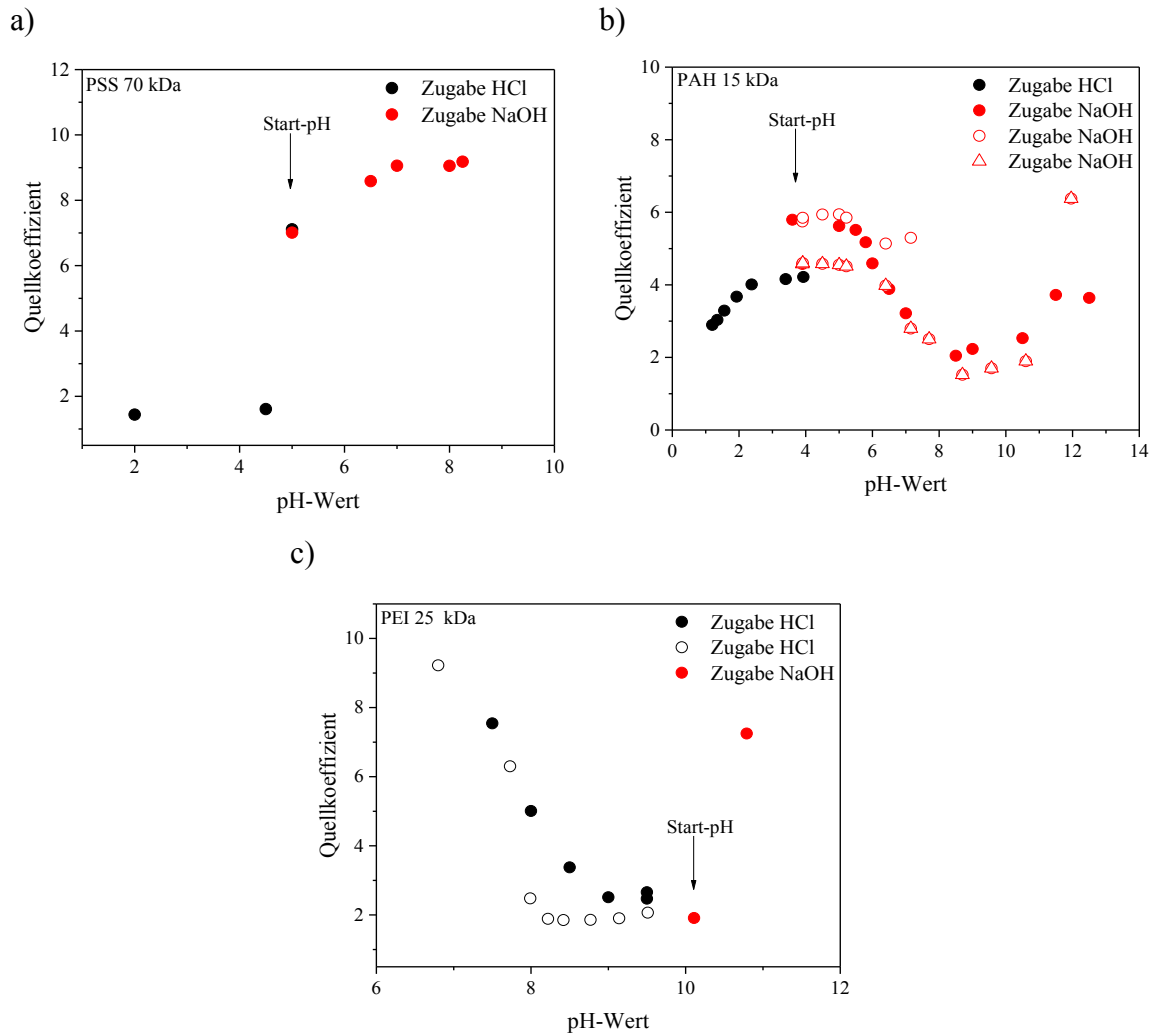


Abb. 4.41: Ellipsometrisch ermittelte Quellkoeffizienten der in Wasser und PE inkubierten PL-Oligolagen bei variierendem pH-Wert. Proben wurden inkubiert in a) PSS 70 kDa der Konzentration 4.85 mM (1 g/L), b) PAH 15 kDa der Konzentration 32.1 mM (3 g/L) und c) PEI 25 kDa der Konzentration 69.7 mM (3 g/L). Die Zugabe von NaOH bzw. HCl erfolgte immer an einer neuen Probe. Die verschiedenen Markierungen zeigen die unterschiedlichen Proben an.

Abb. 4.42 gibt einen schematischen Überblick über mögliche Erklärungen des pH-abhängigen Quellverhaltens der in verschiedenen PE-Lösungen inkubierten DMPC-Oligolagen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch pH-Wert-Änderungen ebenfalls Einfluss auf das Quellverhalten genommen werden kann. Elektrostatistische Wechselwirkungen spielen hierbei eine große Rolle. Der wechselseitige Einfluss des pH-Werts sowohl auf die DMPC-Lagen als auch auf die PEs erschwerte jedoch die Interpretation der Ergebnisse.

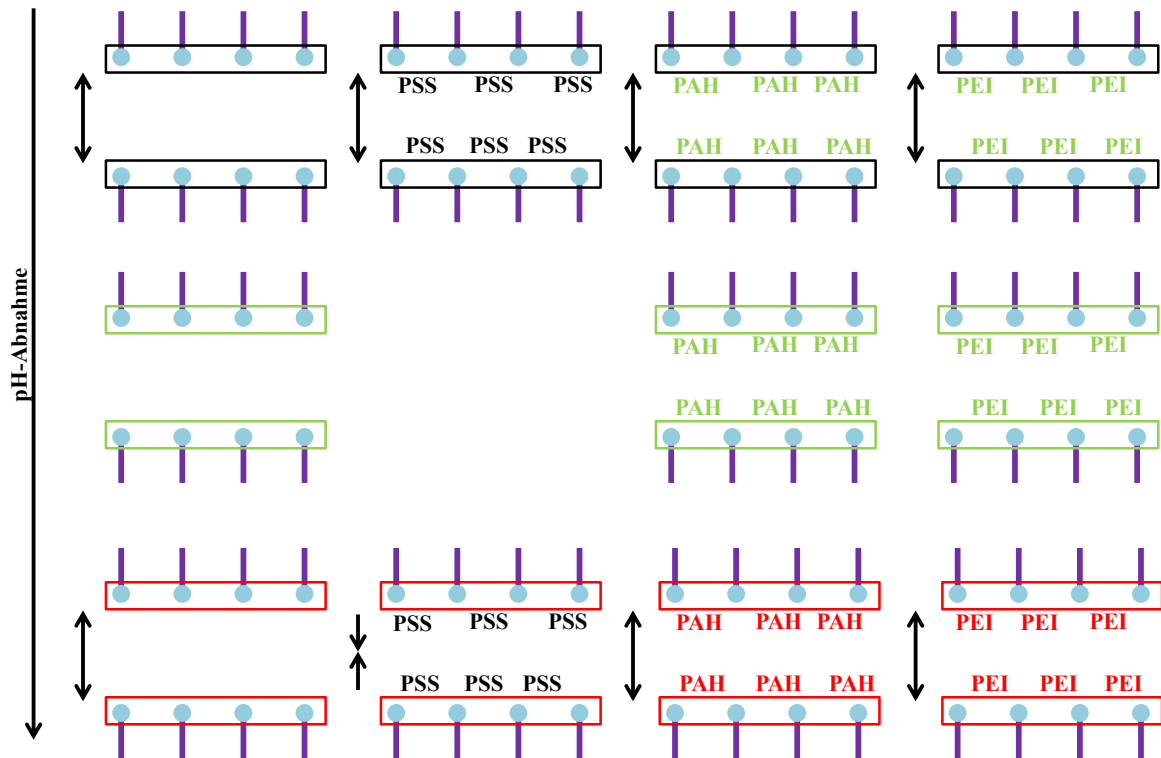


Abb. 4.42: Mögliche Erklärungen zum pH-abhängigen Quellverhalten. Rote Markierungen bzw. Schrift deuten auf positive Ladungen, schwarze auf negative Ladungen und grüne auf Ladungsneutralität hin. Die Richtungen der kleinen Pfeile zeigen einen Quell- bzw. Schrumpfprozess der Bilagen an. Die DMPC-Oligolagen sind von links nach rechts in reinem Wasser, PSS, PAH und PEI inkubiert. Der pH-Wert der Lösungen nimmt von oben nach unten ab.

## 4.2.6. Diskussion der Quellexperimente

Die vorangegangenen Quellexperimente der PL-Oligolagen zeigten für alle eingesetzten PEs ein konzentrationsabhängiges Verhalten. Weitere Versuche mit variierender Salzkonzentration und sich änderndem pH-Wert zeigten, dass die Effekte vorwiegend elektrostatischer Natur sind. Für positiv und negativ geladene PEs nahmen die Quellkoeffizienten mit zunehmender Konzentration ab, während sie für ungeladene PEs leicht zunahm. Für geringe Konzentrationen konnte für geladene Polymere ein starkes Quellen beobachtet werden. Das Vorzeichen der Ladung schien dabei keine Rolle zu spielen. So zeigte die negativ geladene HS ein ähnliches Quellverhalten wie das positiv geladene PAH.

In weiteren Experimenten wurde gefunden, dass das MW der eingesetzten PEs keinen Einfluss auf die Quellkoeffizienten nahm. So zeigte zum Beispiel bei gleicher Monomeren-Konzentration PAH mit dem MW von 15 kDa ähnliche Quellkoeffizienten wie das PAH mit einem MW von 900 kDa, welches 60-mal längere Ketten aufweist. Unterschiede im Quellverhalten zwischen gleichen PEs mit unterschiedlichem MW zeigten sich nur bei sehr geringen Konzentrationen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Quellung für höhere MWs schon bei geringeren Konzentrationen einsetzte. Es scheint, dass nur ein kleiner Volumenanteil in die Schichten eingebaut wird und dort ein

## Ergebnisse und Diskussion

Quellen induziert. Das weitere Quellverhalten wird bei höheren Konzentrationen nicht mehr vom MW des Polymers bestimmt. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt instantan und ist reversibel.

In Übereinstimmung mit diesem Verhalten zeigten Messungen mit variierendem Salzgehalt, dass es ab Konzentrationen von etwa 1 g/L keinen Unterschied im Quellverhalten der Lipide macht, ob weiteres PE oder Salz hinzugegeben wurde. Dies führte zur Annahme, dass das Abschirmverhalten der PE-Gegenionen das Quellverhalten der PL bei höheren Konzentrationen bestimmt. Wird der Quellkoeffizient der geladenen PE gegen die Konzentration in g/L aufgetragen, kann festgestellt werden, dass die Kurven der verschiedenen Polymere bei Konzentrationen ab 1 g/L dicht beieinander liegen (s. Abb. 4.43). Da die Konzentration nicht auf das Monomer-Gewicht normiert wurde, ist hier die Abhängigkeit des Quellkoeffizienten von der Menge der Gegenionen dargestellt. Nur bei geringeren Konzentrationen variieren die erhaltenen Faktoren aufgrund der Unterschiede in den PEs.

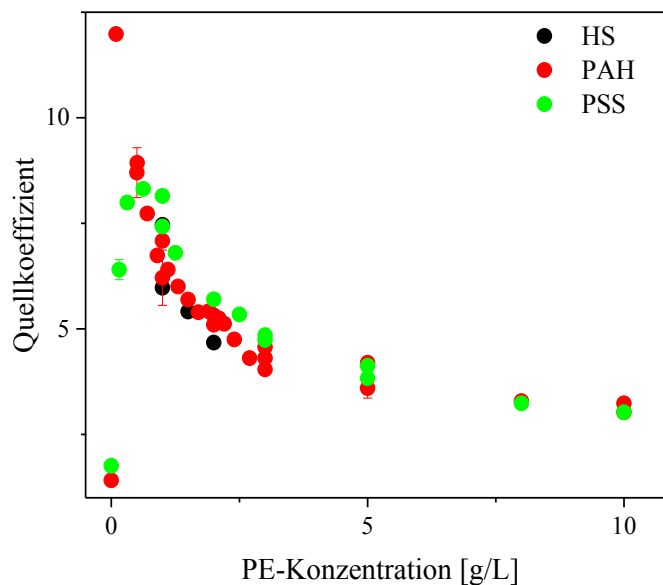


Abb. 4.43: Ellipsometrisch ermittelte Quellkoeffizienten für geladene PEs im Vergleich.

Weiterhin konnte durch Änderung des pH-Werts und der damit einhergehenden variierenden Ladung der adsorbierten PE-Schichten eine Änderung der Quellkoeffizienten bewirkt werden und somit indirekt nachgewiesen werden, dass die angenommene Adsorption der PEs auf den Lipidlagen eintritt. Im nächsten Abschnitt soll nun die genaue Lokalisierung der PEs in den Lipiden erfolgen.



## 4.3. Lokalisierung von PAH und HS-Molekülen in DMPC-Oligolagen

In seiner Arbeit schlägt Kreuzer eine Art Verbrückung der Lipide sowohl innerhalb der einzelnen Schichten als auch zwischen den Bilagen vor. Die Ausbildung eines solchen hydrogelartigen Gebildes soll zu einer Stabilisierung der substratgebundenen Lipide führen. In seinem Modell konnte er zwar eine Anlagerung der HS an die Lipid-Kopfgruppen (s. Abb. 4.44, 1) über eine Modellierung seiner Daten bestätigen, jedoch fehlten Hinweise auf einen möglichen Einbau in die Lipid-Bilagen.<sup>54-55</sup> Der Streulängenkontrast zwischen Lipid-Kettengruppen und HS genügte nicht, um Auskunft über ein eventuelles Eindringen der HS in die Kettengruppen zu geben (s. Abb. 4.44, 3). Eine solche Durchdringung könnte zu einer Verbrückung der Lipidschichten untereinander führen (s. Abb. 4.44, 4) und würde damit einen entscheidenden Beitrag zur erhöhten Stabilität der Lipidschichten leisten.

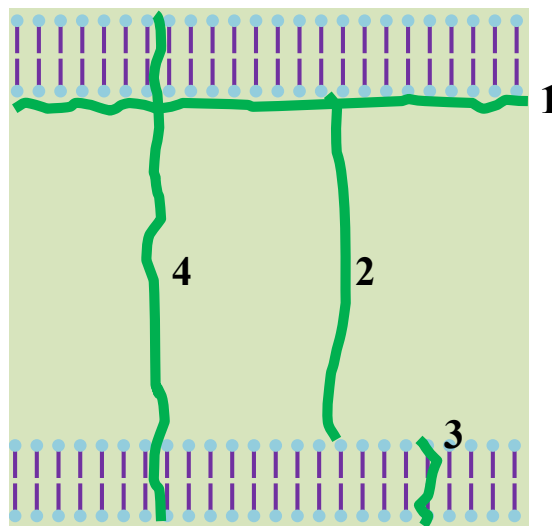


Abb. 4.44: Schematische Zeichnung der möglichen Verbrückungen durch PEs zwischen den Bilagen. Die Polymere liegen in Lösung geknäuelnd vor. Dargestellt ist für 2, 3 und 4 nur die mögliche vertikale Ausdehnung eines Polymers hinsichtlich seines End-zu-End-Abstands. 1 zeigt nur die horizontale Anlagerung der Polymere auf den Kopfgruppen.

Ob die verbrückenden Konstellationen möglich sind, lässt sich über die Berechnung der End-zu-End-Abstände von PAH bzw. HS bestimmen. Für eine Konzentration von 3 g/L lassen sich für PAH Abstände von 200, 450 und 2312 Å für MWs von 15, 58 bzw. 900 kDa bestimmen. Der End-zu-End-Abstand der HS mit dem MW von 850 kDa liegt bei etwa 1400 Å.<sup>xi</sup> Jedes der Moleküle kann somit eine Lipid-Bilage mit etwa 53 Å durchdringen und ermöglicht somit die Konstellation 3 (s. Abb. 4.44).

Bei einer Konzentration von 3 g/L liegen Quellfaktoren von etwa 5 vor. Somit müssten in Szenario 2 mindestens 212 Å und in Konstellation 4 318 Å überbrückt werden (s. Abb.

<sup>xi</sup> Für die Berechnungen siehe Tab. 4.4.

4.44). Dies wäre für PAH mit dem MW von 58 und 900 kDa und für die verwendete HS möglich. Nur für das geringste MW von PAH wurde hierfür ein zu geringer End-zu-End-Abstand berechnet.

In diesem Teil der Arbeit sollte durch Verwendung von kettendeutertem DMPC der Kontrast zwischen Lipid und PE verstärkt werden, sodass die Volumenfraktion von PE in den Kettengruppen des DMPCs bestimmt werden konnte. Die jeweiligen PE-Lösungen lagen mit einer Konzentration von 3 g/L vor. Abb. 4.45 zeigt die Simulation der NR-Kurven für verschiedenen Grade an HS-Einbau in die Ketten- und Kopfgruppen. Die für die Berechnung benötigten SLDs wurden der Literatur entnommen und basieren auf den Untersuchungen von Kreuzer *et al.*<sup>54-55,146</sup> Dieser fand eine 20 Å dicke HS-Adsorbatschicht auf den Lipid-Kopfgruppen mit einem HS-Volumenanteil von 23 %. In der vorliegenden Arbeit interessiert aber vor allem ein möglicher HS- bzw. PAH-Einbau in die Kettenbereiche. Daher wurde nur die SLD der Kettenbereiche variiert, während die anderen Parameter fixiert wurden.

Die Simulationen zeigten, dass mit zunehmender HS-Konzentration in den Membranen der zweite Bragg-Peak stark an Intensität verliert. Bei einem Anteil von 20 % der HS verschwindet dieser gänzlich. Ein Einbau der HS in die Ketten- und Kopfgruppen sollte demnach schon ab 5 Vol. % nachweisbar sein (s. Abb. 4.45).

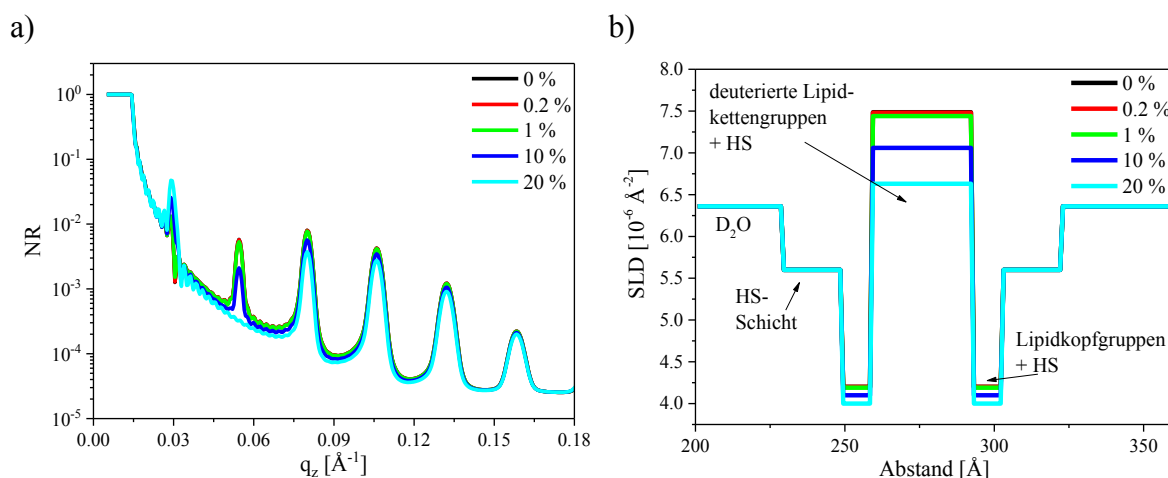


Abb. 4.45: Simulation der Quellmessung mit HS bei Kontraständerung durch deuterierte Lipide. a) Simulierte NR-Kurven für unterschiedlichen HS-Gehalt in kettendeutertem DMPC-Doppelschichten. b) Zugehöriges Streulängendichteprofil für eine Lipid-Lamelle. Entsprechend früheren Ergebnissen<sup>55</sup> wurde die HS-Konzentration in der Volumenphase und den Wasserzwichenschichten als 0.2 % angenommen, in der HS-Adsorbatschicht auf den Lipid-Kopfgruppen als 23 %. Variiert wurde ausschließlich der Gehalt von HS in den Lipidmembranen.

Die ersten Messungen wurden mit dem polymeren Ersatzstoff PAH durchgeführt, da die Gleichgewichtseinstellung wesentlich schneller verläuft als mit HS. In vorigen und späteren Messungen konnte gezeigt werden, dass die beiden Moleküle sich hinsichtlich der Quellung und der Stabilisierung von Lipidlagen ähnlich verhalten. Daher wurde

## Ergebnisse und Diskussion

---

angenommen, dass auch ähnliches Einbauverhalten der Moleküle in die Membranen beobachtet werden kann. Für die Messungen mit PAH wurden MWs von 15, 58 und 900 kDa verwendet.

Zunächst wurde die jeweilige Probe in reinem D<sub>2</sub>O inkubiert und vermessen. So konnten die später verwendeten Streulängendichten ohne PE-Adsorption bestimmt und gegebenenfalls verifiziert werden. Zudem konnte bei normalem Quellverhalten der Probe in Wasser ausgeschlossen werden, dass die Probe beschädigt war und sich in späteren Messungen anders verhält. Danach wurde das D<sub>2</sub>O gegen die jeweilige wässrige PE-Lösung ausgetauscht. Inkubiert wurde in Konzentrationen von 3 g/L. Die Proben wurden entsprechend ihrer im Vergleich zu undeuterten Lipiden erniedrigten Hauptphasenübergangstemperatur bei 17 °C (vgl. 4.1.1) aufbewahrt und vermessen.

Die Messungen erfolgten bei einer Gesamtauflösung von 7 %. Tab. 4.5 zeigt die verwendeten Proben bei der Lokalisierung der PEs in den Lipidschichten und ihre Parameter resultierend aus der XRR-Vorcharakterisierung.

	Probenbezeichnung	Lamellarer Abstand [Å]	Schichtanzahl
PAH 15 kDa	PAH15	52.70 ± 0.02	7.65 ± 0.07
PAH 58 kDa	PAH58	52.48 ± 0.02	9.15 ± 0.01
PAH 900 kDa	PAH900	52.65 ± 0.03	9.57 ± 0.02

Tab. 4.5: Probenübersicht der Lokalisierungsexperimente. Aufgelistet ist der lamellare Abstand der trockenen Proben und die Anzahl der Schichten ermittelt aus vorangegangener XRR-Charakterisierung.

Abb. 4.46a zeigt die NR-Kurven der Proben in reinem D<sub>2</sub>O. Zu sehen ist, wie erwartet, ein erster Bragg-Peak bei etwa 0.1 Å<sup>-1</sup>, welcher dem lamellaren Abstand des in D<sub>2</sub>O gequollenen Schichtsystems von etwa 62.83 Å entspricht. Neben diesem ist jedoch noch ein weiterer Bragg-Peak bei etwa 0.12 Å<sup>-1</sup> zu sehen. Unter der Annahme eines weiteren Signals erster Ordnung konnte ein lamellarer Abstand von 52.36 Å errechnet werden. Solche Distanzen lassen auf einen ungequollenen Zustand schließen. Vermutet wurde, dass durch die Deuterierung des DMPC die Hamaker-Konstante<sup>xii</sup> dahingehend verändert wurde, dass eine Quellung des Systems durch D<sub>2</sub>O nur teilweise geschehen kann. Die starke Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Bilagen verhindert die Quellung des Systems.

Mit zunehmendem Deuterierungsgrad scheint diese Wechselwirkung verstärkt zu sein. So konnte bei Verwendung des volldeuterten DMPC-d67 keine Quellung des Systems beobachtet werden. Die Hamaker-Konstante scheint dabei noch größer zu werden.

---

<sup>xii</sup> Die Hamaker-Konstante beschreibt die Kraft, die aufgrund von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen zwei Teilchen herrscht. Sie ist dabei nicht nur abhängig von den Teilchen selbst, sondern auch von dem umgebenden Medium.

## Ergebnisse und Diskussion

Gefundene Literaturwerte liegen zwischen  $3$  und  $7 \cdot 10^{-21}$  J.<sup>135,147-148</sup> Zur Stützung der These konnten leider keine genauen Hamaker-Konstanten in Abhängigkeit vom Deuterierungsgrad gefunden werden. Erschwerend kommt hinzu, dass die Umgebung der Lipide die Hamaker-Konstante ebenfalls maßgeblich beeinflussen kann.

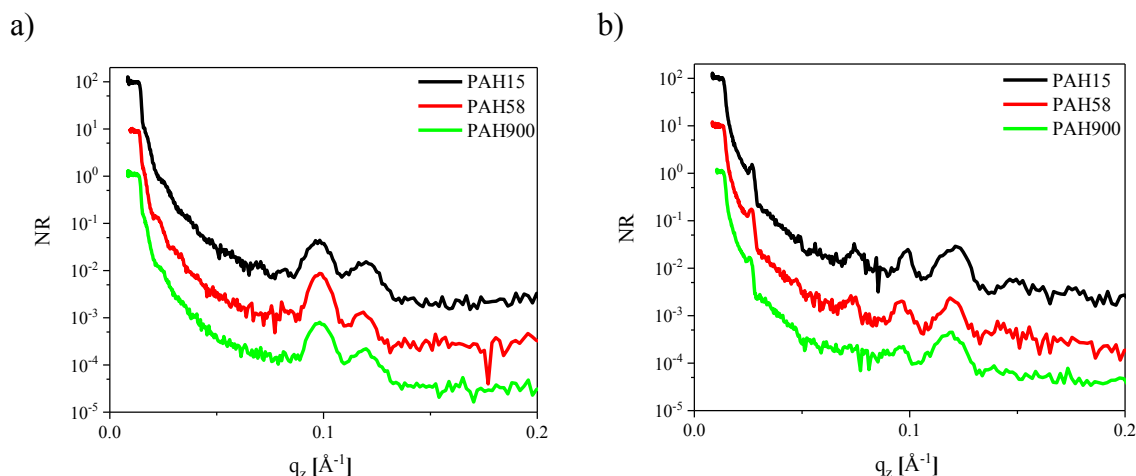


Abb. 4.46: Gemessene NR-Kurven zur Lokalisierung des PAHs in den Lipid-Ketten. a) Proben in reinem D<sub>2</sub>O und b) dieselben Proben in wässrigen PAH-Lösungen mit verschiedenem MW (15, 58 und 900 kDa) inkubiert. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal verschoben.

Zur Auswertung der NR-Kurven wurden die Daten mithilfe von Motofit simuliert. Hierzu wurde Modell 2 verwendet, welches wie in Modell 1 die Unterteilung der Lipide in Kopf- und Kettengruppe berücksichtigt jedoch aufgrund der Deuterierung der Kettengruppe in deren SLDs abweicht (s. Tab. 4.6). Es basiert auf dem von Kreuzer verwendeten Modell und enthält die von ihm gefundene HS- bzw. PE-Adsorptionsschicht auf den Lipid-Kopfgruppen.<sup>54-55</sup> Die Anzahl der Bilagen ergab sich aus der XRR-Vorcharakterisierung. Der Bereich des Signals, der aus dem ungequollen Teil der Probe resultierte, wurde während des Fitprozesses ausgespart und bleibt im Folgenden unberücksichtigt.

Abb. 4.47 zeigt die Kurven, deren Fits und die resultierenden SLDs, während Tab. 4.6 die angenommenen Parameter beispielhaft für die Probe PAH58 beinhaltet. Alle mit einem  $x_i$  markierten Parameter wurden mit dem Modell angepasst. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Fits der Messungen in reinem Wasser mit denen verglichen, die nach Austausch von D<sub>2</sub>O gegen wässrige PE-Lösungen erhalten wurden. Vor allem die Änderung der SLD im Kettengruppenbereich sollte nun Aufschluss über das Maß der Einlagerung des PE in die Kettenbereiche der Lipide geben.

## Ergebnisse und Diskussion

Box-Nr.	Material	$d_i$ [Å]	$SLD_i$ [ $10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ]	$\varphi_w$	Anzahl
0	Si	-	2.07		1
1	SiO <sub>x</sub>	13	3.48		1
2	Kopfgruppe	$16.7 \pm 1.5$	$4.47 \pm 0.2$	$0.56 \pm 0.1$	8
	Ketten- gruppe	30.3	$7.49 \pm 0.5$	$0.56 \pm 0.1$	
	Kopfgruppe	$16.7 \pm 1.5$	$4.47 \pm 0.2$	$0.56 \pm 0.1$	
	PAH- Schicht	$x_1$	0	$x_3$	
	Wasser- Schicht	$x_2$	5.5		
	PAH- Schicht	$x_1$	0	$x_3$	
3	Kopfgruppe	$16.7 \pm 1.5$	$4.47 \pm 0.2$	$0.82 \pm 0.3$	1
	Ketten- gruppe	30.3	$7.49 \pm 0.5$	$0.82 \pm 0.3$	
	Kopfgruppe	$16.7 \pm 1.5$	$4.47 \pm 0.2$	$0.82 \pm 0.3$	
	PAH- Schicht	$x_1$	0	$x_3$	
Umge- bung	Wässrige Phase	-	5.5		1

6 - 8 x

Tab. 4.6: Modell 2: Parameter des Fits für NR-Messungen zum Einbau von PAH in die Kettenbereiche der Lipide für PAH58 ( $x_i$ : freie Parameter für Modellschätzung).

## Ergebnisse und Diskussion

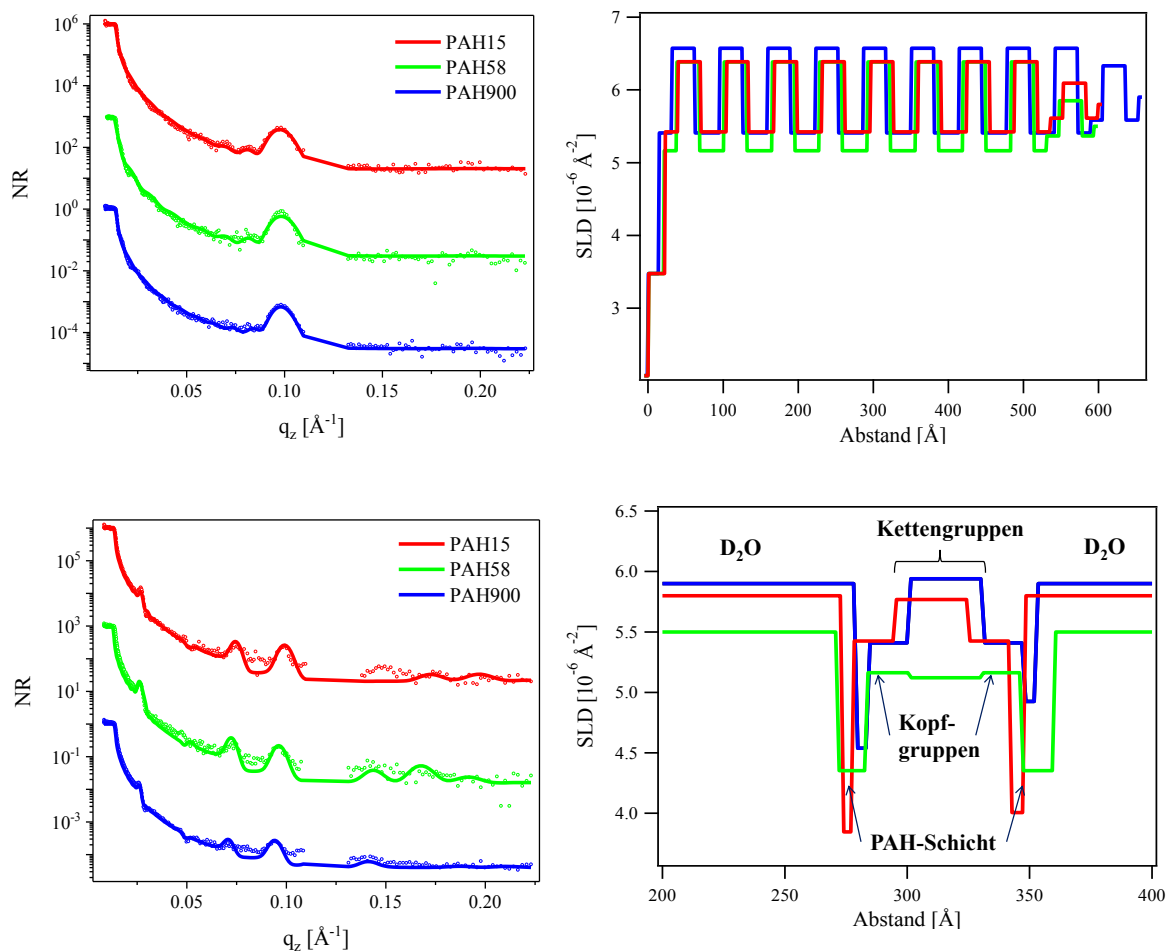


Abb. 4.47: Gemessene NR-Kurven, deren Fits und die zugehörigen SLDs. Oben: Proben in reinem D<sub>2</sub>O. Unten: Proben in den jeweiligen wässrigen PAH-Lösungen.

In Tab. 4.7 sind die erhaltenen SLDs und die daraus ermittelte Einlagerung von PAH in Volumenprozent für die jeweiligen Proben angegeben. Der Anteil der PAH-Einlagerung in die Lipid-Ketten  $\phi_{PAH}$  wurde über die Formel (4.14) berechnet. Dabei stehen  $SLD_{Ketten,D_2O}$  und  $SLD_{Ketten,PAH}$  für die durch Fit bestimmten SLD-Werte der Kettenbereiche für die in reinem D<sub>2</sub>O inkubierten Proben und nach Austausch mit PAH-Lösung. Die Streulängendichte des reinen PAH ( $SLD_{PAH}$ ,  $-0.09 \cdot 10^{-6} \text{\AA}^{-2}$ ) wurde über die einzelnen SLDs der Atome und die Dichte gemäß Formel (2.18) berechnet. Aufgrund des geringen Werts kann  $SLD_{PAH}$  vernachlässigt werden.

Es ergab sich, dass eine Einlagerung zwischen 20 und 38 Vol.-% PAH in die Ketten erfolgte. Es zeigte sich außerdem, dass die Durchdringung der Kettenbereiche durch PAH vor allem für das PAH mit dem mittleren MW ausgeprägt ist, während für das höher- und niedermolekulare PAH eine geringere Intrusion stattfand. Der Einbau der PEs in die Kettengruppen erhärtet den Verdacht der Ausbildung eines Hydrogels und der dadurch intern vernetzten Lipid-Bilagen.

$$\varphi_{PAH} = 1 - \frac{SLD_{Ketten,PAH} - SLD_{PAH}}{SLD_{Ketten,D2O} - SLD_{PAH}} \approx 1 - \frac{SLD_{Ketten,PAH}}{SLD_{Ketten,D2O}} \quad (4.14)$$

	SLD Ketten nach Zugabe PAH [ $10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ]	Vol.- % PAH in Kette
PAH15	$5.7 \pm 0.6$	$23.9 \pm 9.5$
PAH58	$4.6 \pm 0.4$	$37.9 \pm 6.7$
PAH900	$5.9 \pm 0.6$	$19.9 \pm 9.6$

Tab. 4.7: Mit Modell 2 erhaltene SLDs für den Kettenbereich der Proben und daraus ermittelter Anteil von in die Kettengruppen eingelagertem PAH.

Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass in den Fits davon ausgegangen wurde, dass der Wasseranteil in den Bilagen beim Hinzufügen von PAH sowohl für den Ketten- als auch für den Kopfbereich konstant bleibt. Bei Betrachtung der Quellexperimente in 4.2.1 fällt jedoch auf, dass bei Zugabe von PAH der Wasseranteil in den Ketten um etwa 15 % zunahm. Da die SLDs von Wasser und PAH beide niedrigere Werte als die Kettengruppen besitzen, kann im hier vorliegenden Experiment nicht zwischen dem Eindringen beider unterschieden werden. Die berechneten Werte zum Eindringen des PAHs sind daher quantitativ nicht aussagekräftig. Nur die SLD der Kettenbereiche für die Probe PAH58 liegt deutlich unter der SLD von D<sub>2</sub>O, sodass hier eindeutig ein Eindringen des PAH in die Kettengruppen nachgewiesen werden konnte.

Aus diesem Grunde wurde ein Experiment entworfen, bei dem das Eindringen von Wasser nicht detektiert wird. Hierzu muss die SLD des Wassers gleich der SLD der Lipid-Ketten sein. Zusätzlich sollten auch die SLDs von Ketten und Kopfbereich übereinstimmen, sodass die NR-Kurven nur sensitiv auf den Kontrast zwischen PAH und dem Grundgerüst sind (s. Abb. 4.48). Um dies zu ermöglichen wurden DMPC-d54 und undeutertes DMPC im Verhältnis von 28.4 % zu 71.6 % gemischt, sodass sowohl für Ketten- als auch Kopfbereiche eine SLD von  $1.82 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  erhalten wurde. Anschließend wurden 34.5 Vol. % D<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O gemischt, sodass eine Umgebungs-SLD von ebenfalls  $1.82 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  erhalten wurde. Bei richtigen Mischungsverhältnissen sollte nur das an- und eingelagerte PAH einen Kontrast mit der Umgebung bilden.

Die Simulationen zeigten, dass mit zunehmendem PAH-Einbau die Intensitäten des 1. und 2. Bragg-Peaks zu und die des 3. und 4. Bragg-Peaks abnehmen. Demnach könnte die Einlagerung von PAH in diesem Experiment einwandfrei nachgewiesen werden.

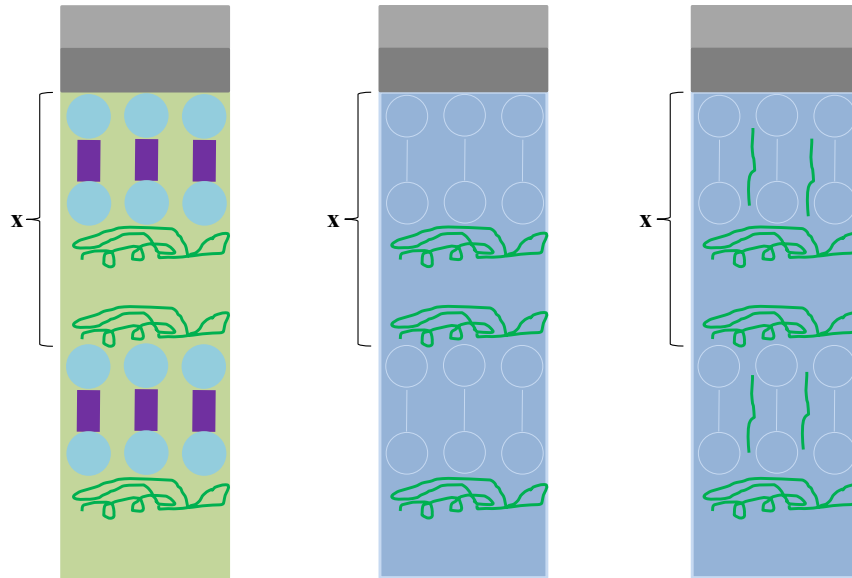


Abb. 4.48: Kontrastverhältnisse für Lipid-Systeme in PE-Lösungen. Links: DMPC undeutert in  $D_2O$ , Mitte: DMPC gemischt (undeutert und deutert) in Kontrast-angepasster PAH-Lösung (PAH in  $D_2O/H_2O$ -Mischung) und rechts: System nach möglichem PAH-Einbau in die Kettenbereiche der Lipide. Gleichfarbige Strukturen ergeben keinen Kontrast. In den beiden letzten Abbildungen sind die Lipide nur zur Übersichtlichkeit angedeutet.

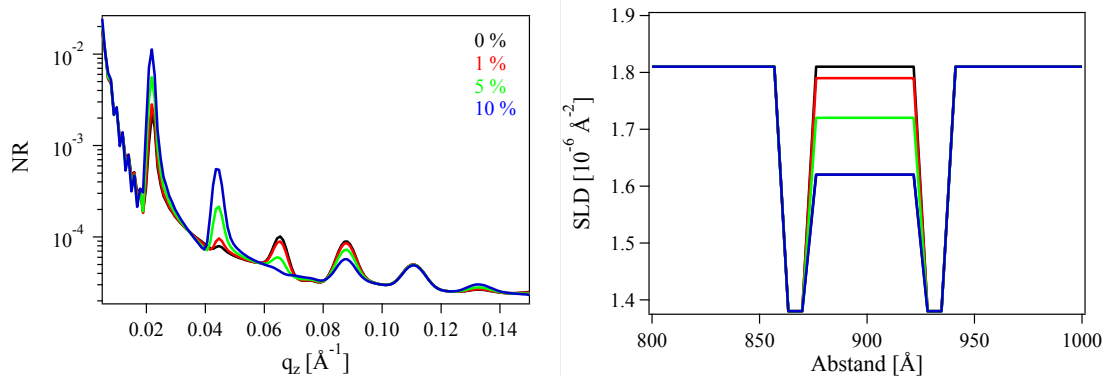


Abb. 4.49: Simulation der Quellmessung mit PAH bei Kontraständerung durch deuterte und undeuterte Lipide,  $D_2O$  und  $H_2O$ . Links: Simulierte NR-Kurven für unterschiedlichen PAH-Gehalt in den Kettenbereichen der DMPC-Doppelschichten. Rechts: Zugehöriges Streulängendichteprofil für eine Lipid-Lamelle.

Eine erste Messung am ILL konnte die Durchführbarkeit eines solchen Experiments bestätigen. Zunächst erfolgte eine Kontrast-Anpassung des Systems. Deutertes und undeutertes DMPC wurden im richtigen Verhältnis gemischt und über eine Rotationsbeschichtung auf das Substrat übertragen. Die Probe wurde dann in reinem  $D_2O$  inkubiert. Die Messung hierzu ist in Abb. 4.50a (schwarze Datenpunkte) zu sehen. Dann wurde dem System  $H_2O$  hinzugefügt, sodass die SLD der Umgebung der SLD der Lipidlagen gleich. Die roten Datenpunkte in Abb. 4.50a zeigen, dass die Kontrast-Anpassung erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Reflektivitätskurve enthält keinen Bragg-Peak mehr. Nach Zugabe von PAH mit dem MW 15 kDa konnte der Bragg-Peak zurückgewonnen werden. Dies spricht eindeutig für eine Anlagerung



und/oder Einlagerung des PAH in die Schichten. Die Versuchsanordnung ermöglichte somit erstmals einen direkten Nachweis des PAH im System. Bislang konnte hierüber nur mittels modellhafter Annahmen, welche fehlerbehaftet sein können, Aussagen getroffen werden.

Eine Unterscheidung zwischen an- bzw. eingelagertem PAH scheiterte daran, dass die Messkurven aus bisher unbekanntem Gründen nicht modellmäßig angepasst werden können. Der theoretische Abfall der Kurven verläuft wesentlich schneller als der gemessene. Die Daten konnten somit nicht quantitativ ausgewertet werden. An einer Lösung des Problems wird weiterhin gearbeitet.

In den nächsten beiden Kapiteln sollen die Stabilitäten der Systeme vor und nach Zugabe von PEs bzw. HS untersucht werden.

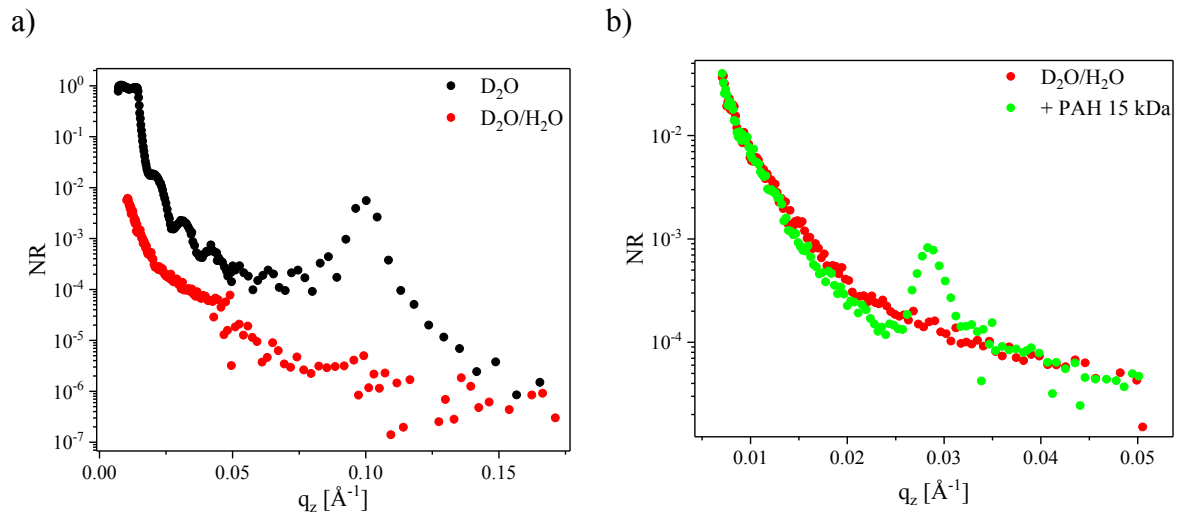


Abb. 4.50: NR-Messungen zur Lokalisierung von PAH. a) Messungen der Probe in reinem  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  Mischungen (Kontrast-angepasst). b) NR-Daten des Kontrast-angepassten Systems vor und nach Zugabe von PAH mit einem MW von 15 kDa.

## 4.4. Temperaturabhängigkeiten

Kreuzer *et al.* fand eine erhöhte Stabilität der Lipid-Oligolagen nach Zugabe von HS gegenüber Temperaturerhöhungen.<sup>54-55</sup> In reinem Wasser kam es nach Überschreiten der Hauptphasenübergangstemperatur zu einer Ablösung der Lipidschichten.

Dies konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. NR-Experimente zeigten stabile Probenbeschichtungen in reinem Wasser auch nach Überschreiten der Hauptphasenübergangstemperatur. Abb. 4.51 zeigt die dabei erhaltenen NR- und simultan gemessenen IR-Kurven für Temperaturen unter- und oberhalb der Phasenübergangstemperatur. Der Bragg-Peak erster Ordnung verschiebt sich beim Erwärmen zu höheren  $q_z$ -Werten. Dies entspricht dem in der Literatur gefundenem Verhalten von Lipid-Bilagen, bei denen beim Übergang vom gel- in den flüssigkristallinen Zustand die Ketten nicht mehr im ge-

streckten Zustand vorliegen, sondern geknäuelte.<sup>47</sup> In der dargestellten Probe änderte sich der lamellare Abstand beim Heizen von 66.12 auf 61.14 Å. Die Intensität des Bragg-Peaks blieb erhalten, jedoch verschwanden die Kiessig-Oszillationen, welche bei 20 °C eine Gesamtschichtdicke von etwa 616 Å bzw. eine Bilagen-Anzahl von etwa 11.6 aufweisen. Der Verlust der Oszillationen bei 38 °C spricht für eine Zunahme der Rauigkeit der obersten Schicht. Eventuell lag hier ein teilweises Ablösen der ersten Lipidschicht vor, jedoch kam es nicht zu einem ausgeprägten Verlust an Lipiden.

Die IR-Daten zeigten eine Abnahme der Intensität der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden, jedoch konnte auch hier kein Totalverlust des Signals und somit der Lipide beobachtet werden. Die IR-Spektren wiesen eine Verschiebung der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden auf, was auf einen vorliegenden Phasenübergang der Lipide hindeutet. Beim Übergang vom gel- zum flüssigkristallinen-Zustand erfolgte eine Verschiebung der Banden  $\nu_{as}$  von 2919.4 zu 2921.4 cm<sup>-1</sup> und  $\nu_s$  von 2850.5 zu 2852.2 cm<sup>-1</sup>. Ähnliche Verschiebungen wurden ebenfalls in der Literatur gefunden.<sup>54-55,149</sup>

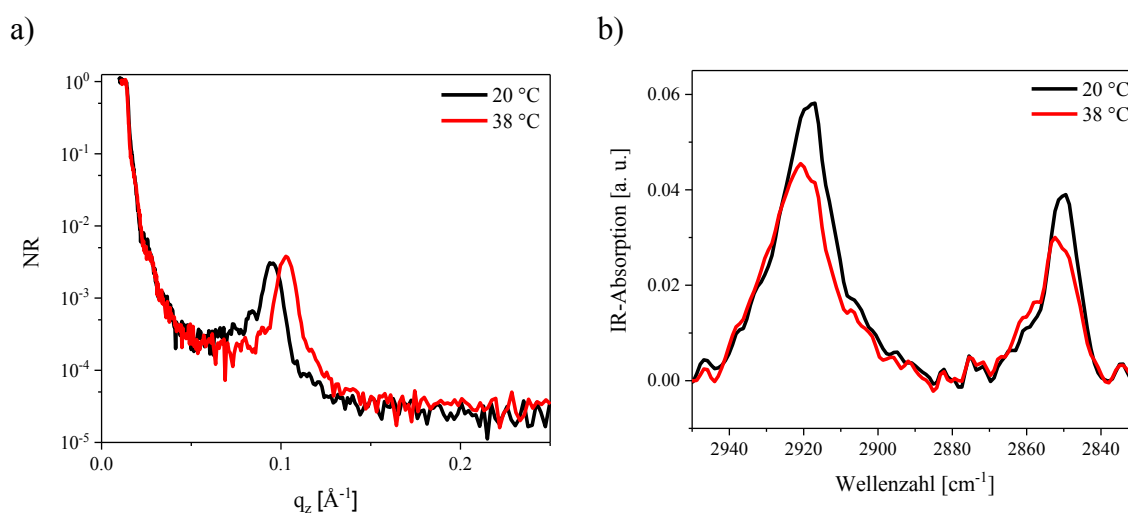


Abb. 4.51: a) NR-Intensitäten in Abhängigkeit von  $q_z$  und b) zeitgleiche IR-Messungen der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungsbanden von substratgebundenen Lipid-Oligolagen bei 20 °C und 38 °C. Die Probe wurde mit einer DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L rotationsbeschichtet.

Von Kreuzer wurde festgestellt, dass bei Erwärmen über den Hauptphasenübergang der Lipide die Oligolagen mit Ausnahme einer Mono- oder Bilage in Lösung gehen.<sup>54-55</sup> Mennicke hingegen berichtete in ihrer Dissertation, dass beim Aufheizen von ursprünglich 17 Bilagen durchschnittlich 8 Bilagen zurückblieben,<sup>86</sup> während Vogel *et al.* noch bei über 50 °C Bragg-Peaks resultierend aus Lipidlagen in XRR- und NR-Messungen aufnahmen.<sup>53</sup>

Da in dieser Arbeit die Bedingungen innerhalb des Gelenks nachempfunden werden sollten, ist die Stabilität der Lipidlagen oberhalb der Phasenübergangstemperatur ohnehin von geringerer Bedeutung. Das vorwiegend vorliegende Lipid DPPC des Gelenks liegt

bei Kernkörpertemperaturen des Menschen zwischen 36.3 und 37.4 °C in der Gelphase vor und unterliegt erst ab 42 °C dem Hauptphasenübergang.

### 4.5. Scherexperimente

Zur Untersuchung der Schichtsysteme unter typischen mechanischen Belastungen, wie sie in natürlichen Gelenken auftreten, wurden mittels einer Scherzelle Scherkräfte auf ausgewählte Proben übertragen. Für simultane ATR-FTIR- und NR-Messungen wurde eine geeignete Scherzelle entworfen, welche *In-situ*-Schermessungen unter Wasser erlaubte. Die Scherstabilität der Lipidschichten sollte in reinem D<sub>2</sub>O und nach Zugabe von HS- bzw. PE-Lösungen untersucht werden.

Scherexperimente am *BioRef* erfolgten immer bei zeitgleicher Aufnahme von NR-Kurven und IR-Daten bei einer Temperatur von 20 °C. Vermessen wurden Proben, welche sowohl in reinem D<sub>2</sub>O als auch in PAH- und HS-Lösungen einer Konzentration von 3 g/L inkubiert vorlagen. Für das PAH wurden drei verschiedene MWs von 15, 58 und 900 kDa verwendet, während für HS MWs von 769 und 850 kDa zum Einsatz kamen. Alle Proben wurden zuvor im trockenen Zustand mittels XRR-Messungen charakterisiert. Sie wurden mit DMPC-Lösungen der Konzentration 10 g/L rotationsbeschichtet. Die Schichtanzahl belief sich zwischen 9 und 15 mit lamellaren Abständen von 52 bis 55 Å. Tab. 4.8 gibt eine Übersicht der in den Scherexperimenten verwendeten Proben mit Angaben zu den lamellaren Abständen, der Schichtanzahl, der Gesamtauflösung der NR-Messung in [%], der Inkubationsdauer vor der Scherung und der gemittelten Dauer des Wechsels zwischen zwei Scherraten  $\Delta t$ . Ein Teil der Messungen wurde bereits publiziert.<sup>150</sup>

Zeitgleiche Aufnahmen von NR- und IR-Daten sollten neben dem inneren Schichtaufbau, welcher aus NR-Messungen erhalten werden kann, auch Rückschlüsse auf die Konformation der Lipid-Moleküle in den Bilagen ermöglichen. Außerdem sollte damit eine komplementäre Methode zur Detektion eines eventuellen Ablösens der Lipidlagen gegeben sein. Die symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingungen der Lipid-Alkylgruppen zeigten dabei ausgeprägte Banden bei  $\nu_s \sim 2851$  bzw.  $\nu_{as} \sim 2920$  cm<sup>-1</sup>, welche hinsichtlich ihrer Intensität und ihrer Position untersucht werden sollten.

## Ergebnisse und Diskussion

Inkubationslösung	Probenname	Auflösung [%]	Inkubationsdauer [h]	$\Delta t$ [h]	Lamellarer Abstand [Å]	Schichtanzahl
D <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O_1	1.4	-	8	52.76 ± 0.38	11.7 ± 0.3
	D <sub>2</sub> O_2	7	-	5	51.97 ± 0.02	11.9 ± 0.0
	D <sub>2</sub> O_3	V6 <sup>xiii</sup>	-	5	54.78 ± 0.03	13.4 ± 0.7
PAH 15 kDa	PAH15_1	1.4	20	8	52.89 ± 0.03	9.9 ± 0.8
	PAH15_2	1.4	22	9 - 17	53.99 ± 0.05	10.9 ± 1.4
	PAH15_3	7	42	9 - 17	52.69 ± 0.02	12.0 ± 0.0
	PAH15_4	7	12	9 - 17	52.42 ± 0.03	9.8 ± 0.0
	PAH15_5	7	22	9 - 17	52.68 ± 0.08	10.5 ± 0.0
PAH 58 kDa	PAH58_1	14	2	0.5	52.63 ± 0.53	11.3 ± 0.4
	PAH58_2	14	8	0.5	52.66 ± 0.45	12.5 ± 0.5
	PAH58_3	7	12	5 - 17	52.42 ± 0.06	9.8 ± 0.0
	PAH58 + NaCl	7	12	6	53.04 ± 0.04	14.7 ± 0.7
PAH 900 kDa	PAH900_1	7	15	6 - 22	53.75 ± 0.04	10.4 ± 0.0
	PAH900_2	7	21	5 - 8	54.63 ± 0.08	9.26 ± 0.0
	PAH900_3	7	22	6 - 29	53.00 ± 0.33	11.2 ± 0.1
	PAH900_4	7	120	6 - 29	52.77 ± 0.03	9.3 ± 0.0
HS 769 kDa	HS769	7	336	6	52.68 ± 0.03	10.52 ± 0.0
HS 850 kDa	HS850_1	7	672	6	51.59 ± 1.22	11.0 ± 0.0
	HS850_2	7	12	6	53.93 ± 0.05	9.7 ± 0.0

Tab. 4.8: Übersicht der in den Scherexperimenten eingesetzten Proben. Aufgelistet ist die Gesamtauflösung der NR-Messung in [%], die Inkubationsdauer vor Scherung, die gemittelte Dauer des Wechsels zwischen zwei Scherraten  $\Delta t$ , der lamellare Abstand der trockenen Proben und die Anzahl der Schichten ermittelt aus vorangegangener XRR-Charakterisierung.

### 4.5.1. Messungen gegen D<sub>2</sub>O

Abb. 4.52 zeigt die Kurven der NR-Messung dreier in D<sub>2</sub>O inkubierter Proben (D<sub>2</sub>O\_1, D<sub>2</sub>O\_2 und D<sub>2</sub>O\_3). Nach Inkubation der Proben in D<sub>2</sub>O und deren Gleichgewichtseinstellung wurden lamellare Abstände von  $(52.07 \pm 0.02)$  Å,  $(64.78 \pm 0.02)$  Å bzw.  $(64.74 \pm 0.08)$  Å ermittelt. Dabei entspricht der Wert von D<sub>2</sub>O\_1 eher dem lamellaren Abstand einer trockenen Probe. Dies könnte von einer nur teilweise benetzten Probe verursacht worden sein. Nach Applizieren einer Scherung von 30 rpm gelang eine vollständige Benetzung und der Bragg-Peak verschob sich zu kleineren  $q_z$ -Werten. Es wurde ein lamellarer Schichtabstand von  $(61.44 \pm 0.02)$  Å erhalten. Aufgrund der höheren Gesamtauflösung, welche die Beobachtung von Kiessig-Oszillationen erlaubte,

<sup>xiii</sup> Die Probe wurde am V6 vermessen. Die Gesamtauflösung für  $q_z > 0.06$  Å<sup>-1</sup> beträgt  $0.002$  Å<sup>-1</sup> und somit variiert die prozentuale Auflösung.

## Ergebnisse und Diskussion

konnte für D<sub>2</sub>O\_2 eine Schichtanzahl von  $9.3 \pm 1.2$  ermittelt werden. Diese ist etwas geringer als die der trockenen Probe und lässt auf einen geringen Schichtverlust bei Inkubation in D<sub>2</sub>O schließen.

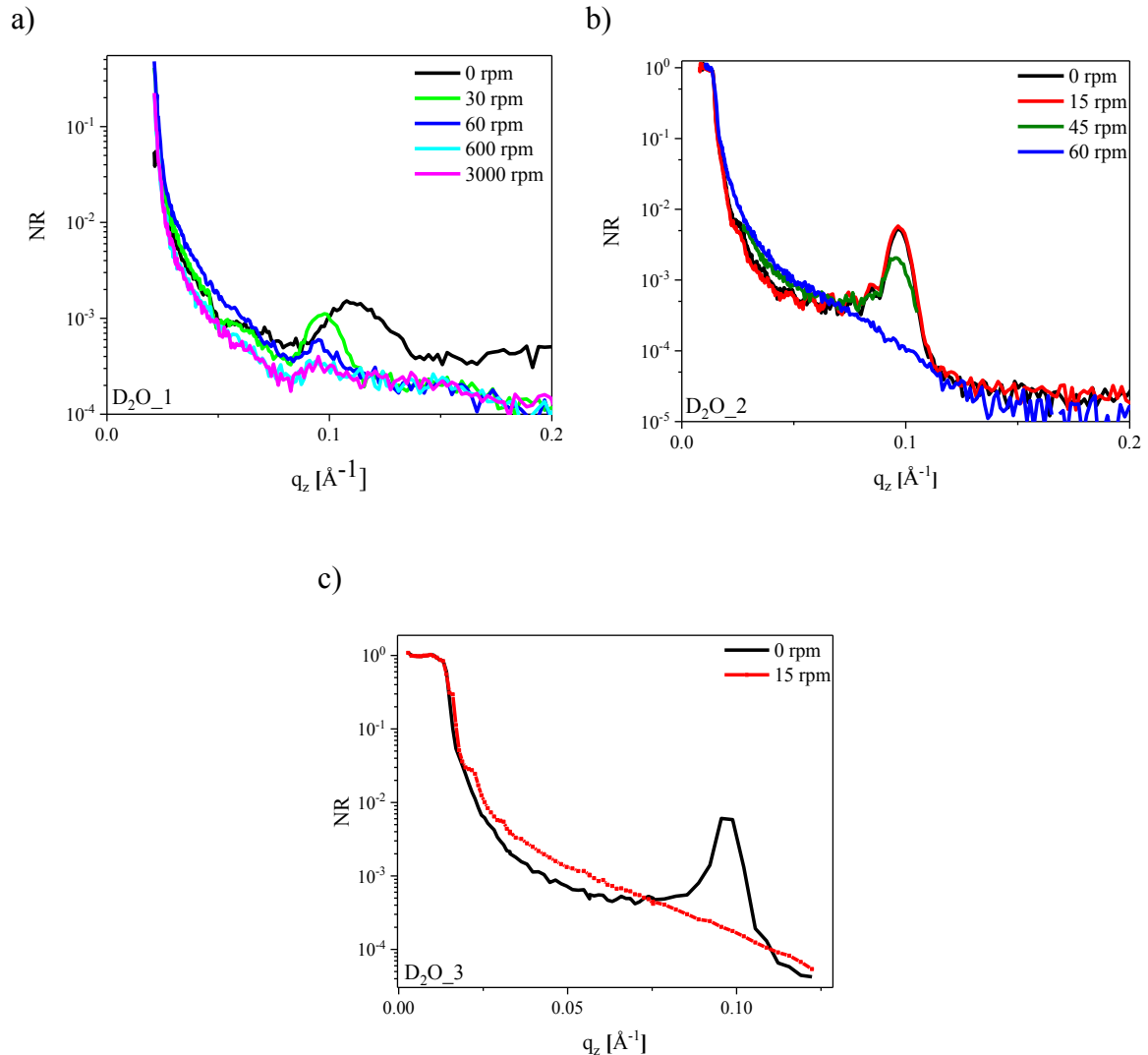


Abb. 4.52: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  bei Scherung von DMPC-Oligolagen in D<sub>2</sub>O. Proben a) D<sub>2</sub>O\_1, b) D<sub>2</sub>O\_2 und c) D<sub>2</sub>O\_3 zeigen eine Abnahme des Bragg-Peaks mit zunehmender Scherrate.

Die Scherexperimente zeigten, dass ab 15 bzw. 60 rpm keine ausgeprägten Bragg-Peaks erhalten werden konnten. Die Lipide liegen nicht mehr als substratgebundene Oligolagen vor. Die Probe D<sub>2</sub>O\_1 weist noch geringes Restsignal bei 3000 rpm auf, welches für eine zurückgebliebene Lipid-Bilage oder Monolage spricht. Zur quantitativen Auswertung wurde die Intensität des 1. Bragg-Peaks bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden für D<sub>2</sub>O\_2 und D<sub>2</sub>O\_3 auf den Bragg-Peak bei 0 rpm und für D<sub>2</sub>O\_1 auf den Bragg-Peak der benetzten Probe bei 30 rpm normiert (s. Abb. 4.53). Intensitätsverhältnisse größer eins lassen sich über einen durch Scherung induzierten Ordnungseffekt der Lagen erklären. Die höhere Ordnung der Lagen führte zu einem stärker ausgeprägten Bragg-Peak.

## Ergebnisse und Diskussion

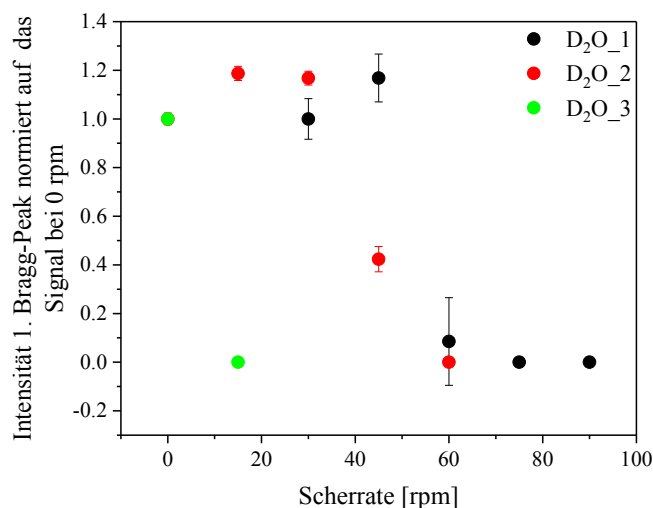


Abb. 4.53: Intensitäten des 1. Bragg-Peaks normiert auf das Signal bei 0 bzw. 30 rpm. Alle Proben wurden in D<sub>2</sub>O inkubiert und zeigen bei 15 bzw. 60 rpm einen vollständigen Verlust der Intensität.

An den Proben D<sub>2</sub>O\_1 und D<sub>2</sub>O\_2 konnten zusätzlich IR-Messungen durchgeführt werden. Die IR-Spektren zeigten einen ähnlichen Intensitäts-Rückgang wie die der NR-Kurven (s. Abb. 4.54). Für D<sub>2</sub>O\_2 konnte ebenfalls ein totaler Verlust der Signale bei 60 rpm ausgemacht werden, während für Probe D<sub>2</sub>O\_1 kein vollständiger Signal-Verlust verzeichnet werden konnte. Ein Grund hierfür könnte eine Verunreinigung der Substrat-Rückseite durch Lipide sein. Da der ATR-Kristall auf beiden Seiten sensitiv ist, würde eine solche Verunreinigung zum Messsignal beitragen. Die NR-Messungen zeigten aber auch einen noch schwach ausgeprägten Bragg-Peak der auf eine zurückgebliebene Lipid-Bilage oder Monolage hindeutet.

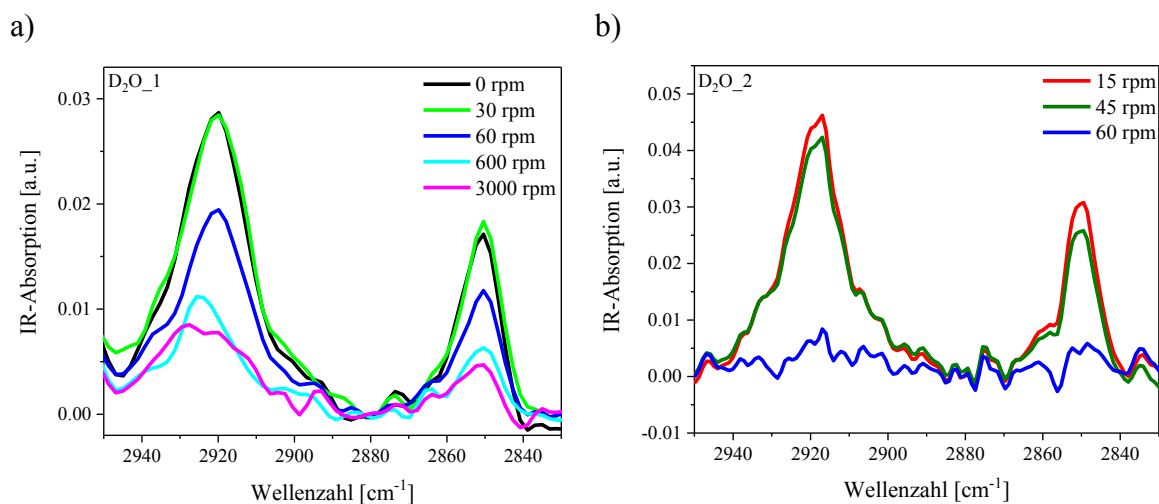


Abb. 4.54: IR-Spektren für verschiedene Scherraten unter D<sub>2</sub>O für a) D<sub>2</sub>O\_1 und b) D<sub>2</sub>O\_2. Abgebildet ist die Region der asymmetrischen und der symmetrischen Streckschwingung der CH<sub>2</sub>-Gruppen.

## Ergebnisse und Diskussion

Die quantitative Auswertung der IR-Signale (s. Abb. 4.55) ergab, dass etwa 27 % des Ausgangssignals übrig blieben. Bei einer Lipid-Bilagenanzahl von 11 - 12 ergibt sich, dass 3 Bilagen stabil auf dem Substrat verblieben. Da die NR-Messungen nur maximal eine Bilage vermuten lassen, ist es wahrscheinlich, dass die Verunreinigung der Substrat-Rückseite auch einen Teil zum Signal beiträgt.

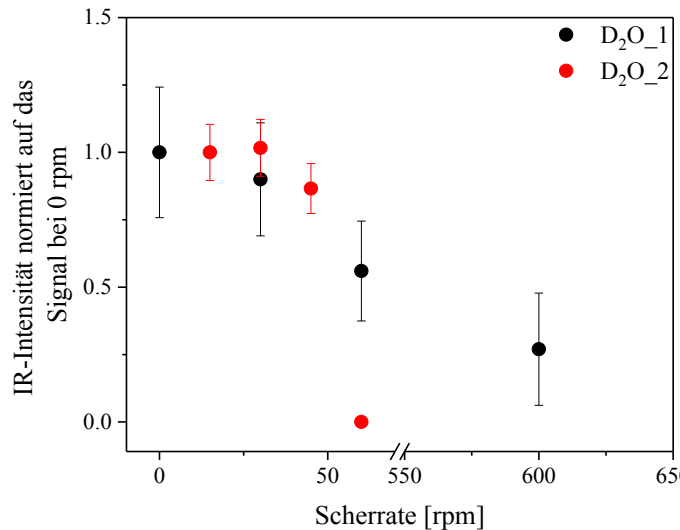


Abb. 4.55: Gesamtintensität der Signale resultierend aus symmetrischer und asymmetrischer CH<sub>2</sub>-Streckschwingung normiert auf die Intensität bei 0 rpm in Abhängigkeit von der Scherrate. Die Proben D<sub>2</sub>O\_1 und D<sub>2</sub>O\_2 wurden in D<sub>2</sub>O inkubiert.

Neben dem erwarteten Rückgang der Intensitäten konnte teilweise auch eine Verschiebung der IR-Signale der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen beobachtet werden. Vor allem bei höheren Scherraten von 600 rpm konnte sowohl für die asymmetrische als auch die symmetrische Schwingungsbande eine Erhöhung der jeweiligen Wellenzahl gemessen werden. In Abb. 4.56 sind die Positionen der Streckschwingungsbanden für D<sub>2</sub>O\_1 und D<sub>2</sub>O\_2 in Abhängigkeit von der Scherrate dargestellt. Für die symmetrische und asymmetrische Streckschwingung wurde für D<sub>2</sub>O\_1 eine Veränderung von  $\Delta\nu_s \sim 1 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $\Delta\nu_{as} \sim 3 - 4 \text{ cm}^{-1}$  festgestellt. Eine solche Verschiebung wurde bereits von Kreuzer *et al.* bei Temperaturexperimenten dokumentiert. Sie beobachteten bei Überschreiten der Hauptphasenübergangstemperatur eine Verschiebung der symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingung von 2850 auf 2852  $\text{cm}^{-1}$  bzw. von 2918 auf 2921  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>54-55</sup> Ein solches Phänomen wurde ebenfalls von Hübner *et al.* beschrieben<sup>149</sup> und auch Cheng *et al.* berichteten von CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen bei 2922 und 2853  $\text{cm}^{-1}$ , welche charakteristisch für konformell ungeordnete Kohlenwasserstoff-Ketten und somit für eine flüssigkristalline-Phase des DMPCs sind.<sup>151</sup> Es scheint hier ein scherinduzierter Phasenübergang der Lipide vorzuliegen. D<sub>2</sub>O\_2 zeigt bis zu 45 rpm wie erwartet Signale bei etwa 2850 und 2919  $\text{cm}^{-1}$ . Bei höheren Scherraten konnten keine Signale gemessen werden, sodass für höhere Scherraten keine Verschiebung der Positionen ausgewertet werden konnte.

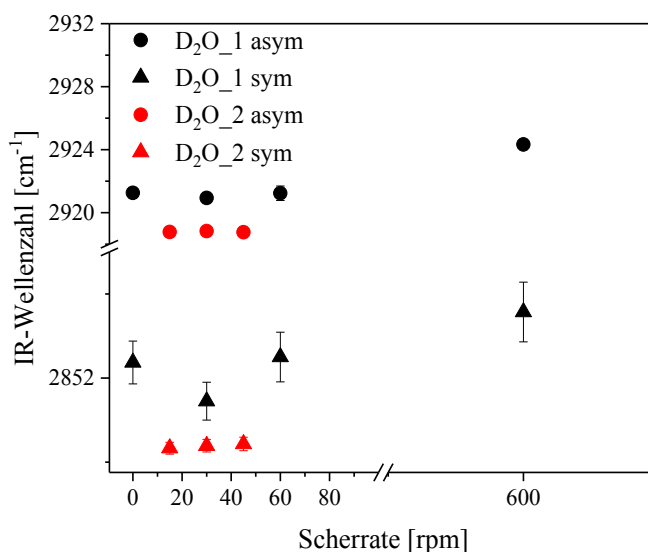


Abb. 4.56: Verschiebungen der IR-Banden mit zunehmender Scherrate. Dargestellt sind die Positionen für die asymmetrische und die symmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung für D<sub>2</sub>O<sub>1</sub> und D<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Abhängigkeit von der Scherrate. Die Proben wurden in D<sub>2</sub>O inkubiert.

### 4.5.2. Messungen gegen PAH-Lösungen

Bei Inkubation der Proben in PAH-Lösungen konnte neben einem starken Quellen um den Faktor 4 - 5 im Vergleich zur trockenen Probe auch eine Stabilisierung der Lipidlagen gegen Scherung festgestellt werden. Verwendet wurden drei verschiedene MWs (15, 58 und 900 kDa). Für jedes MW ist jeweils eine NR-Messreihe mit ausgewählten Scherraten zu sehen (s. Abb. 4.57). Andere zur Auswertung hinzugezogene Messreihen sind im Anhang zu finden (s. 7.1.1).

Alle in PAH inkubierten Proben zeigten eine erhöhte Stabilität gegen Scherung im Vergleich zu den in reinem Wasser inkubierten Proben. Eine Auftragung der auf das Signal bei 0 rpm normierten Intensität des Bragg-Peaks erster Ordnung in Abhängigkeit von der Scherrate sind für alle Proben und MWs in Abb. 4.58 zu sehen. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu den Messungen in reinem Wasser die Intensität des 1. Bragg-Peaks bei 60 rpm für den Großteil der Probe unverändert wenn nicht gar größer ist. Die Erhöhung des Bragg-Peaks für einige Proben bei Applizieren einer Scherung konnte auf eine durch die Scherung induzierte verbesserte Ordnung der Lagen untereinander zurückgeführt werden. Auch die Proben, bei denen bei 60 rpm ein Intensitätsverlust verzeichnet worden war, zeigten trotz allem ein ausgeprägtes Signal.

Die Intensitätsänderung in Abhängigkeit von der Scherrate scheint bislang nur für das MW von 58 kDa reproduzierbar zu sein. Auch zeigten diese Proben im Vergleich zu den anderen die höchste Stabilität gegenüber Scherung. Während die Hälfte der Signal-Intensität erst bei etwa 300 - 580 rpm verloren ging, war dies für ein MW von 15 kDa, abhängig von der Probe, zwischen 50 und 230 rpm der Fall. Für das MW von 900 kDa war die Intensität für PAH900\_1 auch bereits für 60 rpm auf unter die Hälfte des



## Ergebnisse und Diskussion

Ausgangswerts gesunken, während für PAH900\_2 noch etwa 70 % bei der 10-fachen Scherrate von 600 rpm erhalten blieb.

Vermutet wurde, dass die Inkubationszeit vor der Scherung vor allem für größere MWs eine Rolle spielt. Daher wurde PAH900\_3 wie PAH900\_2 für etwa 20 h und nicht wie PAH900\_1 nur für 15 h inkubiert. Die Messungen konnten jedoch keine Erhöhung der Stabilität aufgrund der Inkubationszeit bestätigen. Es wurde vermutet, dass auch Probe-zu-Probe-Variationen einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Probe nehmen.

Es scheint, dass PAH mit dem MW von 58 kDa die Proben besser stabilisierte als das PAH mit einem MW von 15 kDa. Messungen mit höherem MW konnten jedoch keinen zunehmend stabilisierenden Effekt mit zunehmendem MW nachweisen, wohl aber zeigten alle Messungen, dass der Einsatz der PEs zur Scherstabilisierung der Oligolagen beiträgt. Ein Vergleich mit den in reinem Wasser inkubierten Proben zeigte eine deutliche Verbesserung der Stabilität bei Inkubation in PAH (s. Abb. 4.58d).

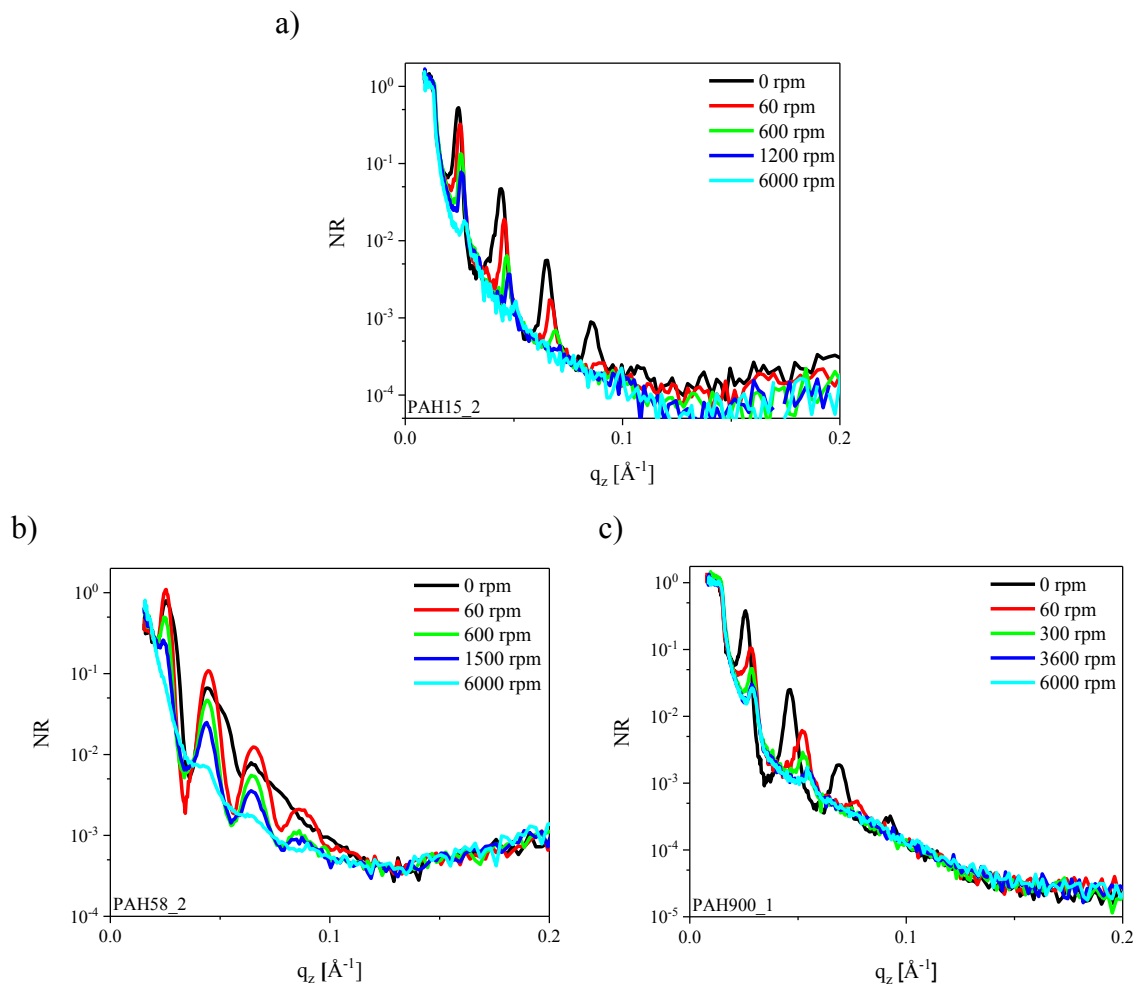


Abb. 4.57: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  bei Scherung von in wässrigen PAH-Lösungen inkubierten DMPC-Oligolagen. Für jedes MW wird eine Messreihe gezeigt. Andere zur Auswertung hinzugezogene Messreihen sind im Anhang zu finden (s. 7.1.1). Zu sehen sind folgende Proben: a) PAH15\_2 (PAH 15 kDa), b) PAH58\_2 (PAH 58 kDa) und c) PAH900\_1 (PAH 900 kDa).

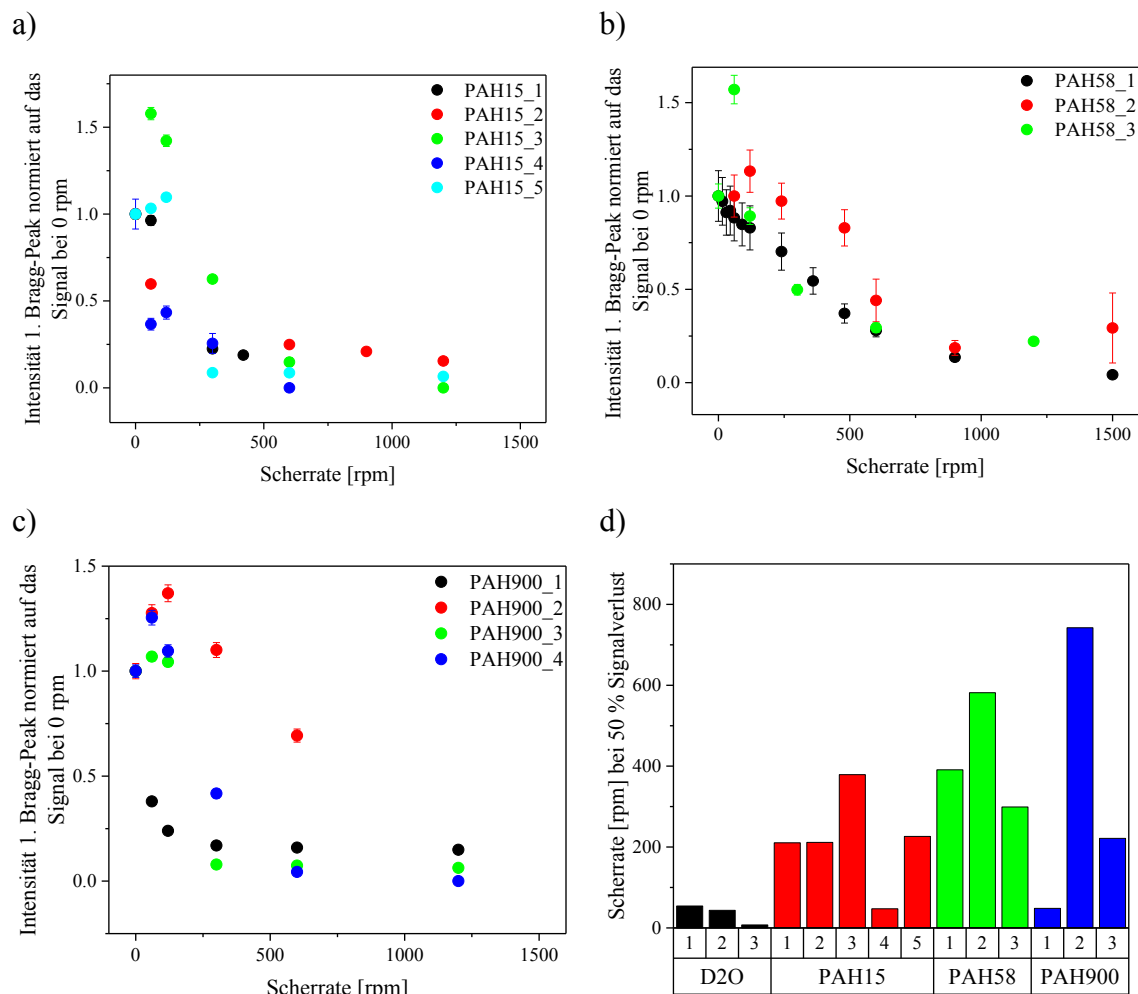


Abb. 4.58: Intensitäten des 1. Bragg-Peaks als Funktion der Scherrate normiert auf das Signal bei 0 rpm. Gezeigt sind die Auswertungen für alle Proben und MWs von PAH: a) 15 kDa, b) 58 kDa und c) 900 kDa. d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust für alle in PAH inkubierten Proben im Vergleich zu in reinem Wasser inkubierten Proben in einem Balkendiagramm. Die Werte wurden über lineare Interpolierungen erhalten.

Neben der höheren Scherstabilität konnte für die Inkubation in PAH eine Scherstauchung mit zunehmender Drehzahl beobachtet werden (s. Abb. 4.59). Eine Zugabe von PAH mit der Konzentration von 3 g/L führt zu einer Quellung um einen Faktor 3.5 - 5 bezogen auf den lamellaren Abstand einer in Wasser inkubierten Probe (s. 4.2.1). In Bezug auf eine trockene Probe erhöht sich dieser Faktor entsprechend auf 4.3 - 6.3. Zu Beginn der Messung konnten demnach lamellare Abstände für alle MWs zwischen 230 und 335 Å ermittelt werden. Mit zunehmender Scherrate nimmt dieser Abstand für die meisten Proben ab. Reduktionen zwischen 20 und 40 Å des lamellaren Abstandes konnten festgestellt werden. Von einer solchen scherinduzierten Ausdünnung wurde bereits in der Literatur berichtet.<sup>152-153</sup> Für die Proben in reinem D<sub>2</sub>O konnte ein ähnliches Verhalten nicht beobachtet werden.

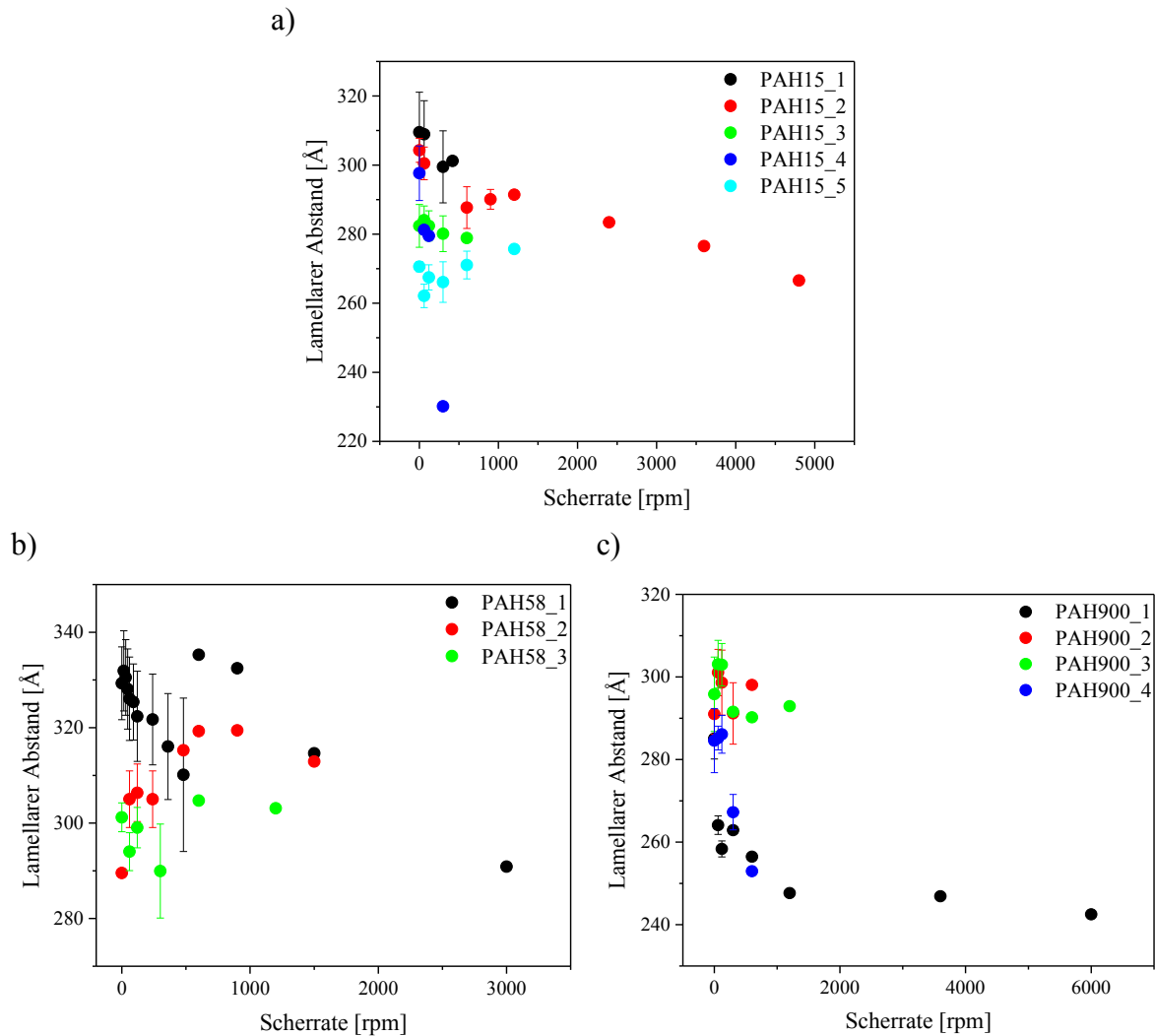


Abb. 4.59: Auftragung des lamellaren Abstands in Abhängigkeit von der Scherrate. Auswertung für die folgenden MWs der wässrigen PAH-Inkubationslösungen: a) 15 kDa, b) 58 kDa und c) 900 kDa.

Auch für die IR-Messungen der in PAH inkubierten Proben wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Es zeigte sich, dass mit höherer Scherrate die IR-Intensität der  $\text{CH}_2$ -Schwingungsbanden abnahm, doch selbst bei höchster Umdrehungszahl, bei der die NR-Signale verschwanden, konnten teilweise immer noch IR-Banden detektiert werden. Lediglich bei den Proben PAH15\_3, PAH15\_5 und PAH900\_3 konnte tatsächlich ein im untersuchten Bereich signalfreies Spektrum erhalten werden (s. Anhang 7.1.2).

Drei für die jeweiligen MWs repräsentativ ausgesuchte Spektren sind in Abb. 4.60 zu sehen. Für PAH mit dem MW von 15 und 58 kDa konnte bei 60 rpm nur eine kleine Signalabnahme verzeichnet werden. Dies spricht für die erhöhte Stabilität der Lipide. Bei 60 rpm lag bei den meisten Proben das DMPC substratgebunden vor. Für das PAH mit einem MW von 900 kDa wurde jedoch für die hier dargestellte Probe bei 60 rpm ein starker Intensitätsverlust gemessen. Trotz einer Abnahme des Bragg-Peaks in den NR-Daten bei Erhöhung der Scherraten zeigte sich hier keine weitere Variation in den IR-

Kurven. Für die Probe PAH900\_2 zeigten sowohl NR- als auch IR-Messungen nur geringe Änderungen bis zu 600 rpm. Die Signale bei sehr hohen Drehzahlen lassen sich über adsorbierte, ungeordnete DMPC- und auch PAH-Strukturen erklären. Die  $\text{CH}_2$ -Schwingungsbanden konnten detektiert werden, jedoch kam es zu keiner Ausbildung von Bragg-Peaks, da die Strukturen ungeordnet vorlagen. Auch wird angenommen, dass auf der Rückseite der Kristalle präparationsbedingt Rückstände von DMPC blieben, welche bei der eingesetzten ATR-Konfiguration auch zum IR-Messsignal beitragen konnten und so einen konstanten Offset lieferten.

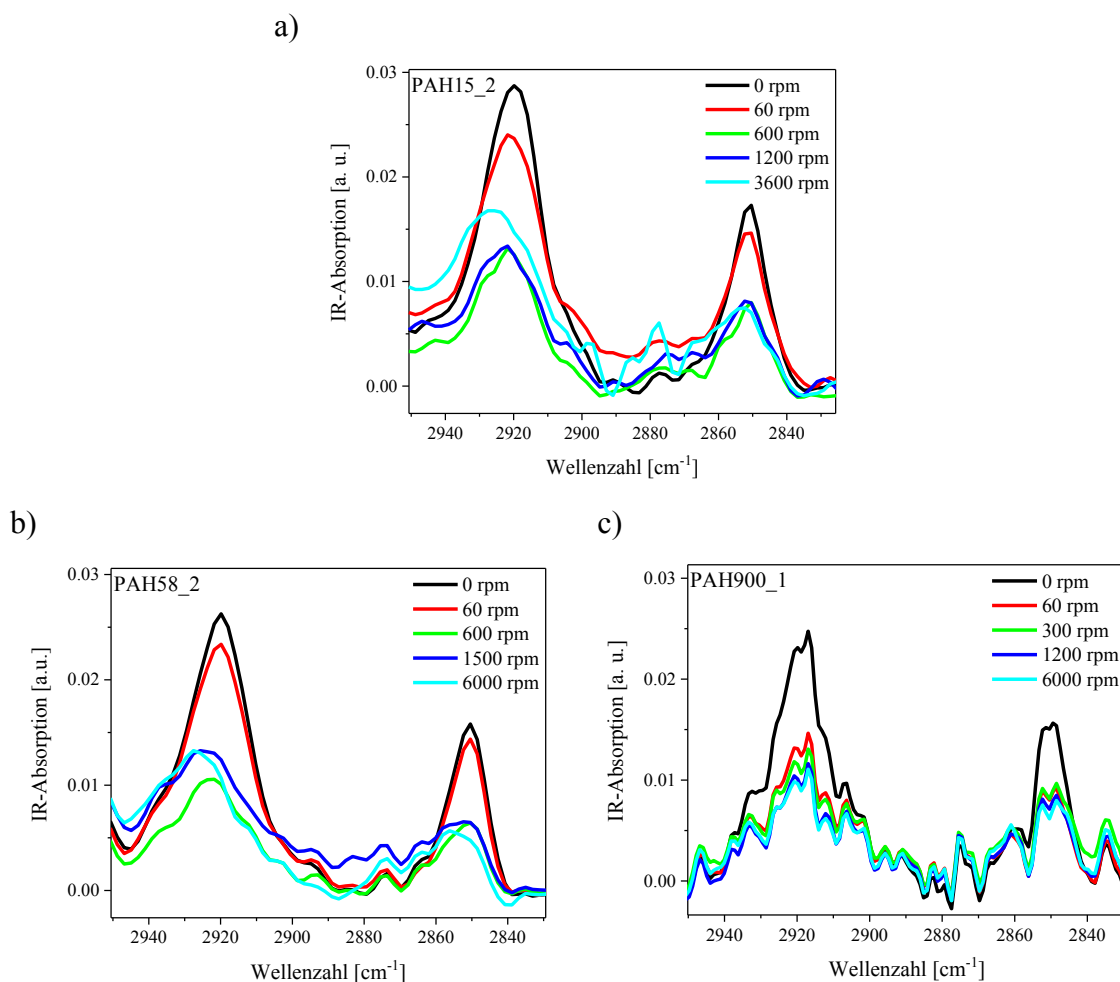


Abb. 4.60: IR-Absorptions-Kurven bei Scherung von DMPC-Oligolagen in Kontakt mit PAH-Lösungen. Abgebildet ist die Region der asymmetrischen und der symmetrischen Streckschwingung der  $\text{CH}_2$ -Gruppen für folgende Proben: a) PAH15\_2 (PAH 15 kDa), b) PAH58\_2 (PAH 58 kDa) und c) PAH900\_1 (PAH 900 kDa).

Eine quantitative Auswertung der Intensitäten der  $\text{CH}_2$ -Schwingungsbanden zeigt Abb. 4.61. Dabei wurde die Gesamtintensität der asymmetrischen und der symmetrischen Bande summiert und auf die Intensität des Signals bei 0 rpm normiert. Die Auswertungen zeigen, dass die Werte bei relativ hohen Scherraten zwischen 50 und 100 % abnehmen. Für in PAH mit dem MW 15 kDa inkubierte Proben reduzierte sich das Signal zwischen

## Ergebnisse und Diskussion

300 und 600 rpm um 50 %, wobei das Signal für die meisten Proben nicht geringer als 50 % des Ausgangssignals wurde. Für PAH 58 kDa lag die Scherrate, bei der 50 % des IR-Signals verloren gingen, zwischen 540 und 1200 rpm. Damit scheint das PAH mit dem MW von 58 kDa eine bessere Stabilisierung der Proben hervorzurufen. Für die in PAH 900 kDa inkubierten Oligolagen variierten die Scherraten, bei denen 50 % des Ausgangssignal verloren wurde, noch stärker. Während PAH900\_1 und PAH900\_3 schon zwischen 80 und 250 rpm 50 % Signalverlust zeigten, reduzierte sich die Intensität der Probe PAH900\_2 erst bei 900 rpm um 50 %. Sowohl IR- als auch NR-Daten zeigten starke Variationen in der Stabilität der Proben. Nur für in PAH mit dem MW von 58 kDa inkubierte Proben, waren die Stabilisierungen ansatzweise reproduzierbar.

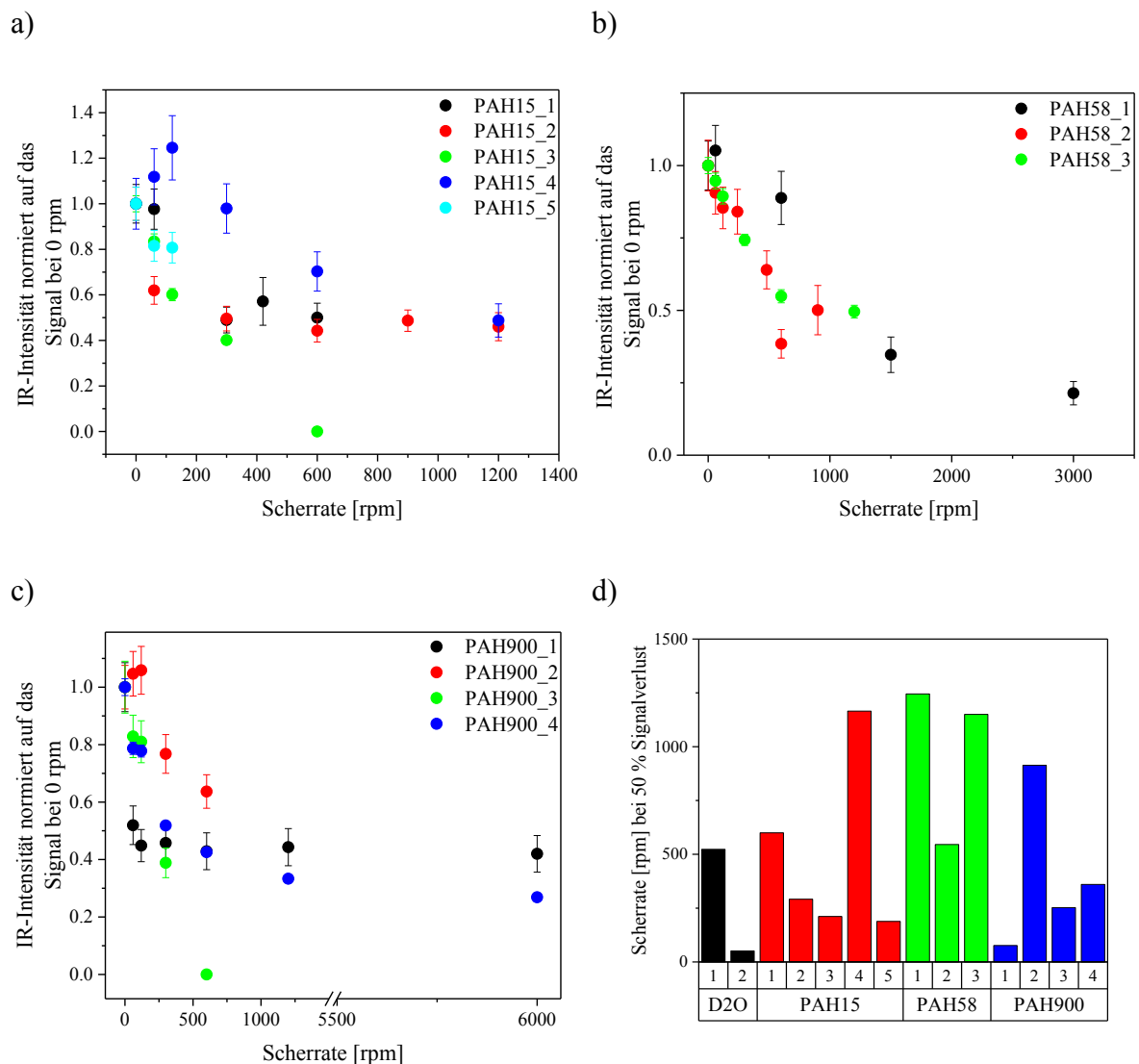
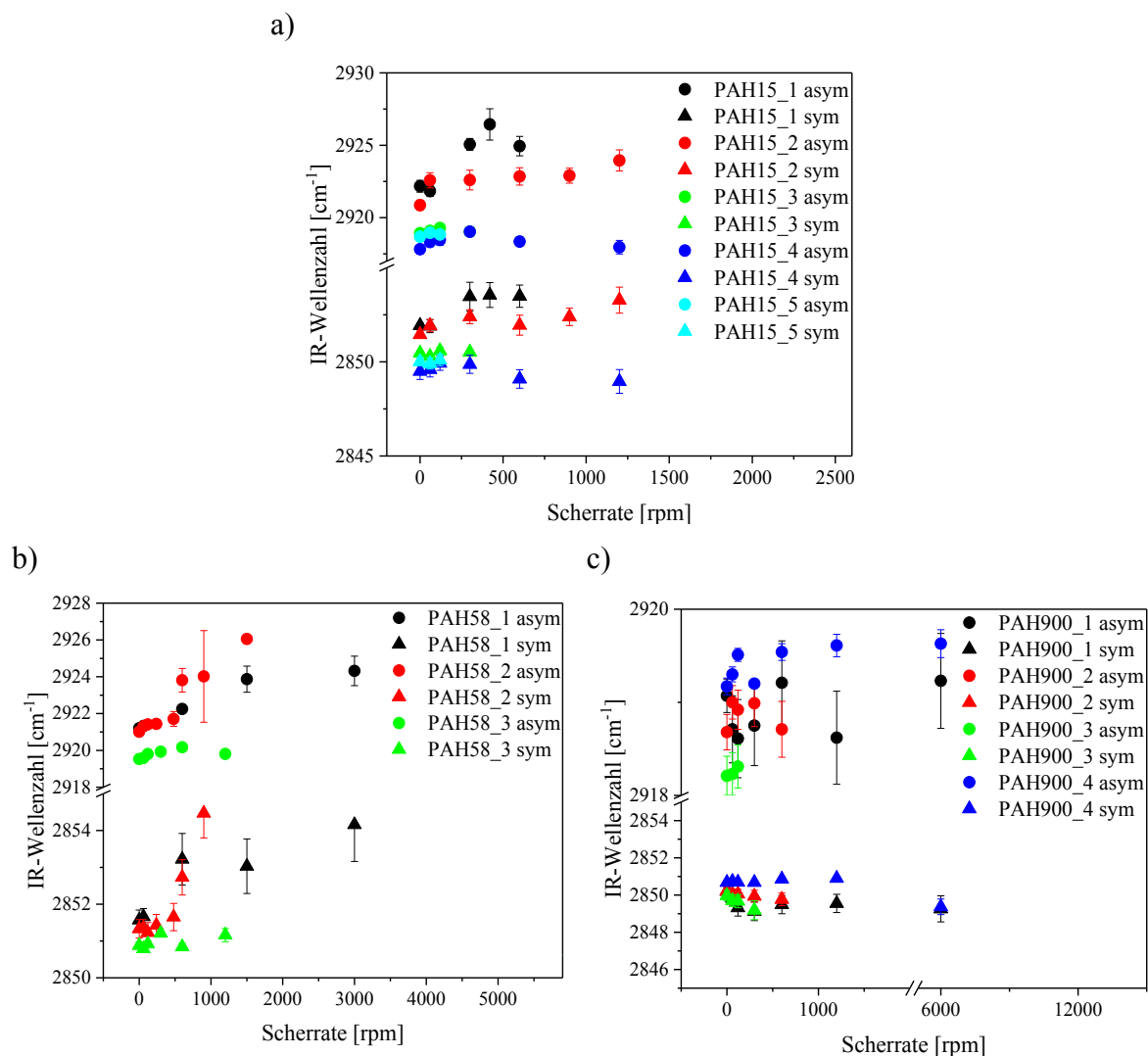


Abb. 4.61: Integrierte IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden als Funktion der Scherrate. Normiert wurde auf die Signale der Messung bei 0 rpm. Dargestellt sind die Auswertungen für die folgenden Proben: a) PAH 15 kDa, b) PAH 58 kDa und c) PAH 900 kDa. d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust für alle in PAH inkubierten Proben im Vergleich zu in reinem Wasser inkubierten Proben in einem Balkendiagramm. Die Werte wurden über lineare Interpolationen erhalten.

## Ergebnisse und Diskussion

Neben der Bandenintensität wurde die Position der Signale bestimmt und ebenfalls in Abhängigkeit von der Scherrate aufgetragen (s. Abb. 4.62). Für die in PAH inkubierten Proben konnte mit zunehmender Scherung meist eine Verschiebung der Banden zu höherer Wellenzahl für beide Streckschwingungen beobachtet werden. Für die asymmetrische und symmetrische Streckschwingung wurde eine Veränderung von  $\Delta v_{as}$  bis zu  $4 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $\Delta v_s$  bis zu  $5 \text{ cm}^{-1}$  gefunden. Somit konnte auch hier ein durch Scherung induzierter Phasenübergang der Lipide festgestellt werden.

Es scheint jedoch nicht immer ein Phasenübergang einzutreten. So zeigt beispielsweise PAH15\_4 mit zunehmender Umdrehungszahl einen leicht gegenteiligen Effekt. Die vorherige Verschiebung zu höheren Wellenzahlen kehrt sich wieder um. Möglich wäre, dass das PAH mit dem Lipid interagiert und es so modifiziert, dass keine Phasenänderung induziert werden kann.



## 4.5.3. Messungen gegen PAH- und NaCl-Lösungen

Die Synovialflüssigkeit im Gelenk hat eine ähnliche Elektrolytzusammensetzung wie Blutplasma.<sup>154</sup> Demnach liegt unter anderem ein erhöhter NaCl-Anteil vor. Daher wurden auch bei physiologischer Elektrolytkonzentration (154 mM NaCl) und Zugabe von 3 g/L PAH mit dem MW von 58 kDa Scherstabilitäten der Lipidlagen vermessen und diese mit den entsprechenden Messungen ohne NaCl-Zugabe verglichen.

Zunächst fiel auf, dass bei erhöhter NaCl-Konzentration ein geringeres Quellen der Lipidschichten vorlag. Dies konnte mittels Abschirmung von elektrostatischen Repulsionskräften erklärt werden (s. 4.2.4). Eine vollständige Quellung erfolgte erst bei Scherung (60 rpm) (s. Abb. 4.63). Es wurde ein Quellkoeffizient von etwa 3 erhalten.

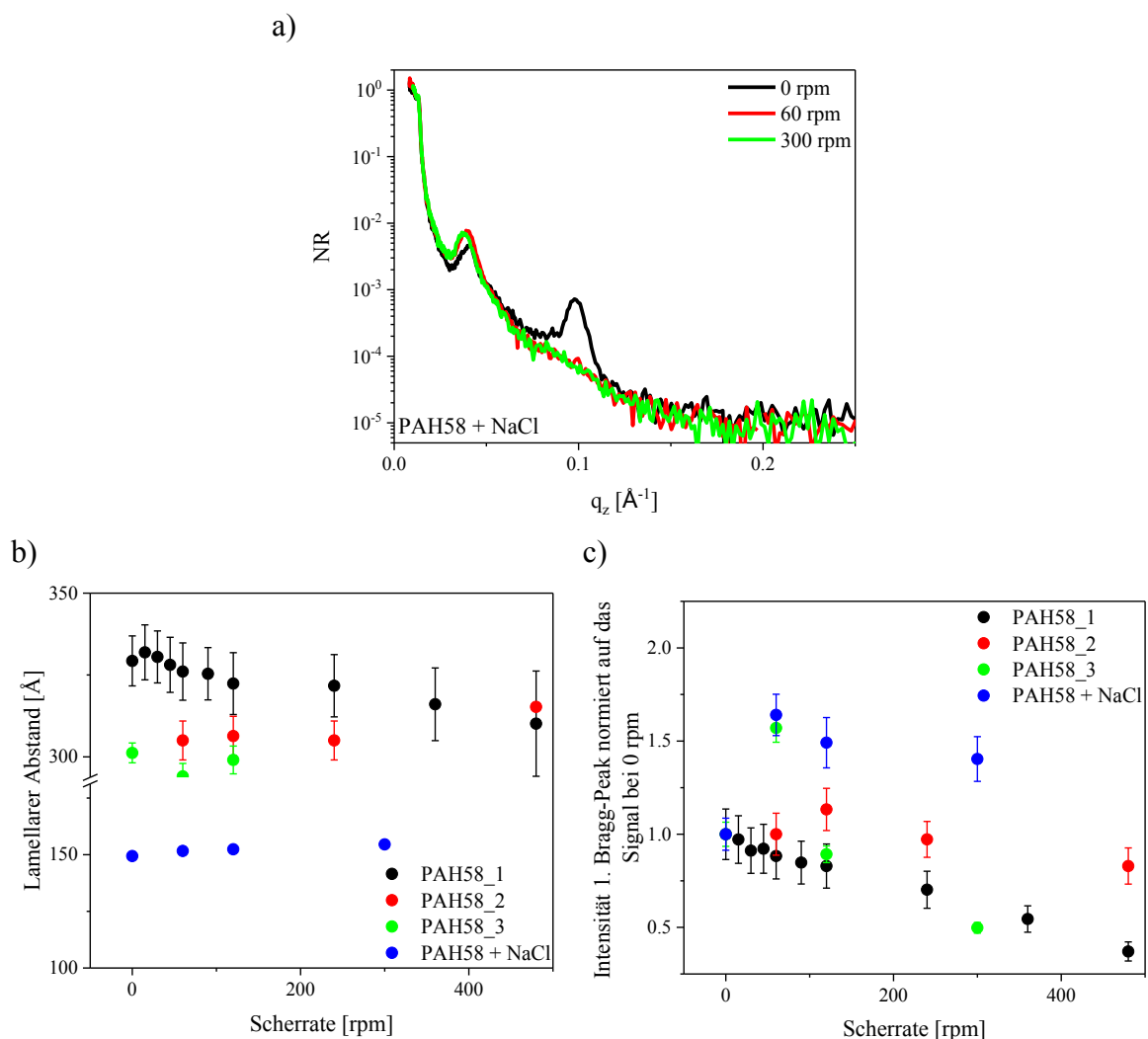


Abb. 4.63: NR-Messungen der Probe PAH58 + NaCl (3 g/L PAH, 154 mM NaCl) bei verschiedenen Scherraten und zugehörige Auswertungen im Vergleich zu PAH58-Proben ohne NaCl-Zusatz (s. 4.5.2). a) NR-Kurven der Probe PAH58 + NaCl, b) lamellare Abstände in Abhängigkeit von der Scherrate für die Proben PAH58 aus 4.5.2 und PAH58 + NaCl und c) Intensität des 1. Bragg-Peaks normiert auf das Signal bei 0 rpm für die Proben PAH58 aus 4.5.2 bzw. PAH58 + NaCl.

Aufgrund der geringeren Quellung wurde vermutet, dass ein gegenüber Scherung noch stärker stabilisiertes System vorliegt. Bei Auswertung der Bragg-Peaks konnte auch tatsächlich sogar ein Anstieg des Signals ermittelt werden. Dies liegt jedoch vor allem zunächst an der bei 0 rpm noch nicht stattgefundenen Gleichgewichtseinstellung und nicht an einer erhöhten Scherstabilität.

Dass dies so ist, zeigen die komplementären IR-Messungen. Sie wiesen eine deutliche Abnahme der Intensitäten auf (s. Abb. 4.64), was darauf hindeutet, dass die Erhöhung der Bragg-Peaks tatsächlich auf Ordnungs-Effekten beruhte. Die Auswertung der IR-Signale zeigt mit zunehmender Scherrate einen ähnlichen Intensitätsverlust wie die der in reinem PAH inkubierten Proben, sodass von keiner erhöhten Scherstabilität der Lipide bei geringerer Quellung ausgegangen werden konnte. Eine Verschiebung der Schwingungs-Banden, resultierend aus einem scherinduzierten Phasenübergang, konnte nicht festgestellt werden.

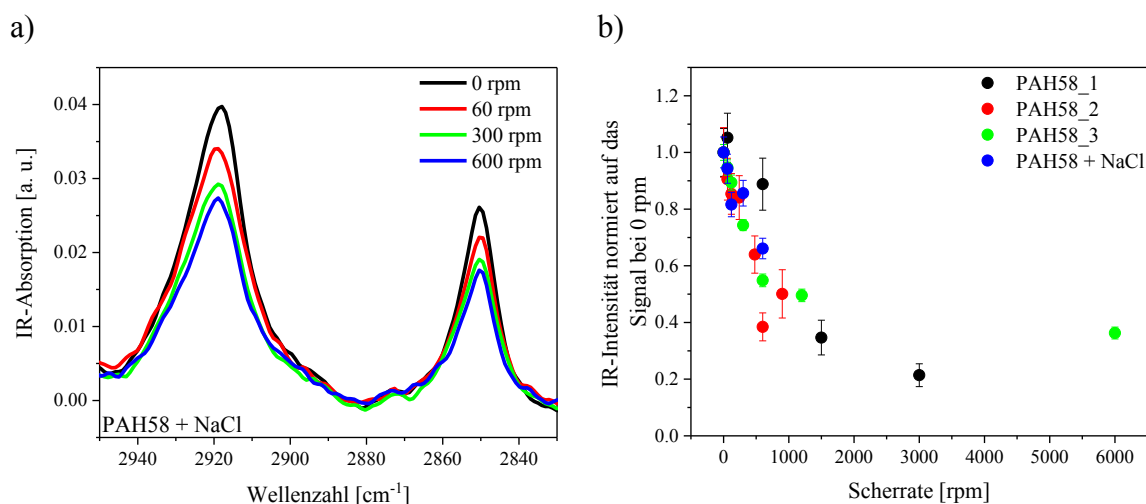


Abb. 4.64: IR-Messungen der Probe PAH58 + NaCl (3 g/L PAH, 154 mM NaCl) bei verschiedenen Scherraten und zugehörige Auswertungen im Vergleich zu PAH58-Proben (s. 4.5.2). a) IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen für die Probe PAH58 + NaCl und b) IR-Intensität normiert auf das Signal bei 0 rpm für die Proben PAH58 (s. 4.5.2) und PAH58 + NaCl.

#### 4.5.4. Messungen gegen HS-Lösungen

Scherexperimente sollten auch mit der im Gelenk vorkommenden HS durchgeführt werden. Hierzu wurde HS mit dem MW 769 (HS769) bzw. 850 kDa (HS850\_1 und HS850\_2) mit der Konzentration 3 g/L verwendet.

Zunächst konnte ein starkes Quellen um einen Faktor von 4 beobachtet werden. Die Bragg-Peaks waren aber noch sehr schwach ausgeprägt. Ein Gleichgewichtszustand wurde noch nicht erreicht. Nach 2 bzw. 4 Wochen ging der Quellkoeffizient auf etwa 1.4 zurück. Ein ähnlicher Rückgang bei einer für 18 Stunden inkubierten Probe (HS850\_2) konnte bei einsetzender Scherung beobachtet werden (s. Abb. 4.65). Es scheint, dass der stark gequollene Zustand ein metastabiles Gleichgewicht einnimmt, während sich die



## Ergebnisse und Diskussion

schwach gequollenen Lipide in einem stabilen Gleichgewicht befinden. Ähnliches konnte in der Dissertation von Kreuzer nicht festgestellt werden.<sup>54</sup> Die Auswertung der Bragg-Peaks aus den NR-Daten ergab eine Scherstabilität bis 3600 rpm, wiederum bezogen auf 50% des Ausgangssignals. Die Probe HS850\_1, welche am längsten vorinkubiert wurde, zeigte sogar bis zu 6000 rpm keinen größeren Lipid-Verlust.

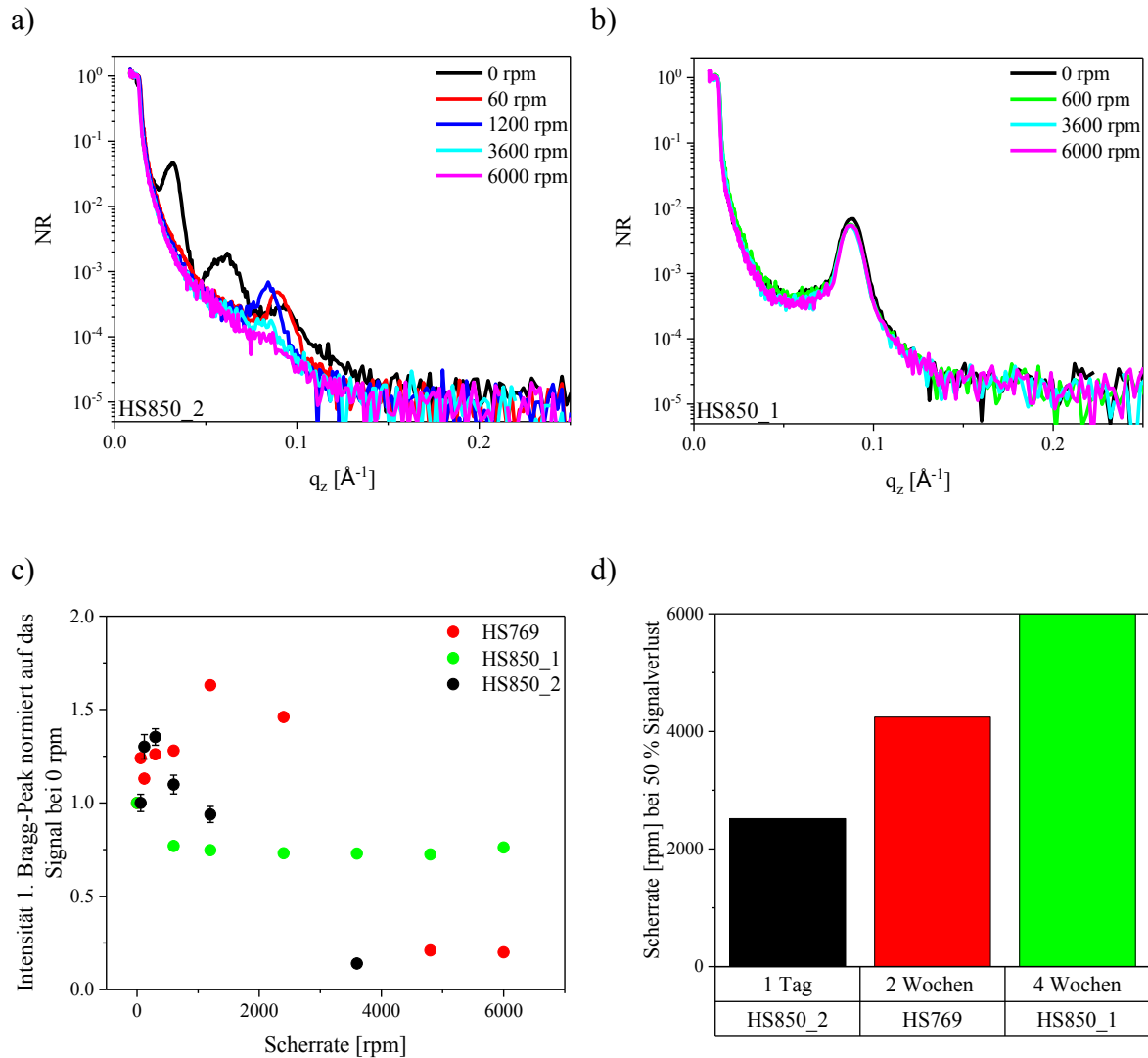


Abb. 4.65: NR-Kurven der Proben a) HS850\_2 und b) HS850\_1 und c) und d) Auswertung der Bragg-Peak-Intensität. c) zeigt die normierten Intensitäten und d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust in einem Balkendiagramm. Maximale Scherrate im Experiment waren 6000 rpm. Während die Probe HS850\_2 lediglich 18 h in HS inkubierte, hatten die Proben HS769 und HS850\_1 2 bzw. 4 Wochen Zeit für die Gleichgewichtseinstellung.

IR-Messungen zeigen Ähnliches (s. Abb. 4.66). Anhand der IR-Daten wird deutlich, dass die Probe HS850\_2, welche nur 18 Stunden inkubiert wurde, am Anfang einen starken Lipid-Verlust verzeichnete. Aus den NR-Daten konnte dies nicht geschlossen werden, da die Probe bei 0 rpm noch nicht im Gleichgewicht vorlag und der Intensitäts-Rückgang

## Ergebnisse und Diskussion

durch Lipid-Ablösung über einen Gewinn an Ordnung kompensiert wurde. Die IR-Daten zeigten jedoch deutlich, dass mit zunehmender Inkubationszeit stabilere Lipidschichten erhalten wurden. Aufgrund der Messungen an PAH58 + NaCl (s. 4.5.3) konnte auch ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Stabilität auf ein geringeres Quellen zurückzuführen ist.

Daher lässt sich folgern, dass HS gegenüber PAH eine verbesserte Scherstabilität der Lipide gewährleisten kann. Eine Verschiebung der Schwingungs-Banden, resultierend aus einem scherinduzierten Phasenübergang, konnte in den IR-Daten nicht festgestellt werden. Eventuell verhindert die Zugabe von HS einen Phasenübergang und stabilisiert die Lipide.

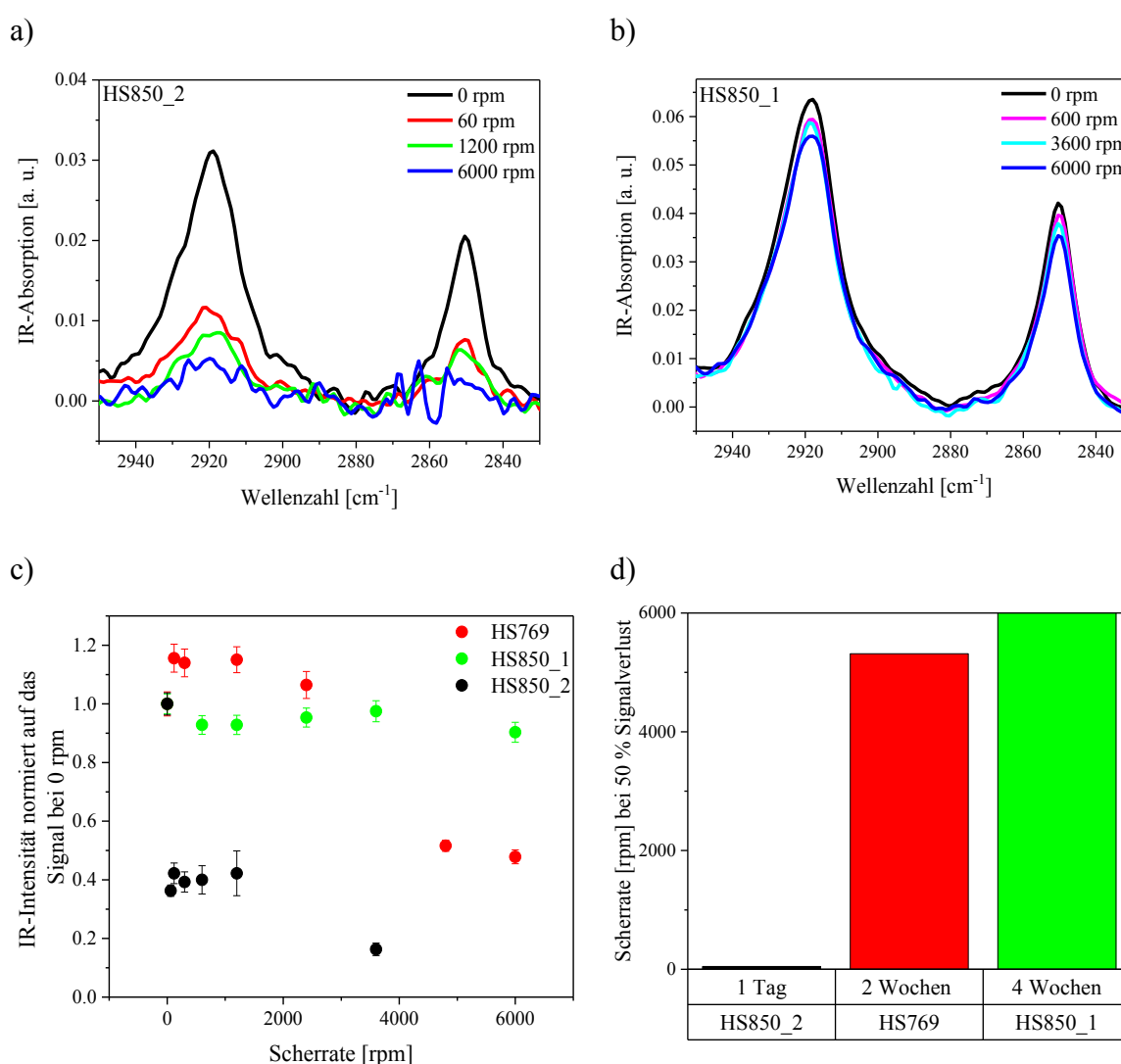


Abb. 4.66: IR-Kurven der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen für die Proben a) HS850\_2 und b) HS850\_1 und c) und d) Auswertung der IR-Intensität. c) zeigt die normierten IR-Intensitäten und d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust in einem Balkendiagramm. Maximale Scherrate im Experiment waren 6000 rpm. Während die Probe HS850\_2 lediglich 18 h in HS inkubierte, hatten die Proben HS769 und HS850\_1 2 bzw. 4 Wochen Zeit für die Gleichgewichtseinstellung.

### 4.5.5. Modellierung der Neutronendaten

Mittels eines vereinfachten Modells sollte ein umfassender Fit des gesamten Datensatzes der Schermessungen angefertigt werden, um die jeweilige interne Struktur der Schichtsysteme aufzuklären. Das Modell (s. Tab. 4.9) besteht aus dem Substrat Silicium, durch welches der Neutronenstrahl eintritt, gefolgt von einer nativen  $\text{SiO}_x$ -Schicht. Anschließend folgt eine erste DMPC-Bilage, bei der Ketten- und Kopfgruppe als nicht aufgelöst betrachtet werden, und eine wässrige Zwischenschicht. Eine Multischicht bestehend aus mehreren aufeinander folgenden Wiederholeinheiten von DMPC-Bilage und wässriger Zwischenschicht gemäß der ermittelten Schichtanzahl repräsentiert den Kern der Proben. Abgeschlossen wird das System durch eine letzte Einheit aus wässriger Zwischenschicht und DMPC-Bilage gefolgt von der wässrigen Umgebung. Zugunsten einer konsistenten Beschreibung eines großen Datensatzes wurde auf die Auflösung von Kopf-, Kettengruppe und Polymerschicht in einer DMPC-Bilage verzichtet. Dies ist möglich, da die minimal direkt auflösbare Dicke  $t_{min}$  auf  $52 \text{ \AA}$  beschränkt ist. Dies wird über den experimentell maximal erreichbaren  $q_z$ -Wert von  $0.12 \text{ \AA}^{-1}$  definiert ( $t_{min} = 2\pi/q_{z,max}$ ). Über das Einführen von Membran-Rauigkeiten von  $\sigma = 13 \text{ \AA}$  konnte die verringerte Auflösung berücksichtigt werden.

Die verwendeten Parameter für die Probe PAH15\_2 sind in Tab. 4.9 zusammengefasst.  $x_i$  beschreibt dabei voneinander unabhängig variierende Parameter,  $d_i$  gibt die Schichtdicke der jeweiligen Schicht an,  $\varphi_w$  beschreibt den Wasseranteil einer Schicht in Volumenprozent und  $\sigma$  die Rauigkeit. Die SLDs der jeweiligen Schichten wurden der Literatur entnommen.<sup>137,155-158</sup> Die SLD für DMPC-Bilagen wurde über folgende Formel ermittelt:

$$SLD_{DMPC} = \sum_i \frac{b_i}{V_M} = \frac{3.096 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}}{1043 \text{ \AA}^3} \quad (4.15)$$

Dabei steht  $b_i$  für die einzelnen Streulängen der Atome und  $V_M$  für das Volumen, welches sie beanspruchen. Die Schichtdicken der Lagen gaben teilweise unterschiedliche Werte für das statische und das gescherte System. So stieg beispielsweise der entsprechende Wert der Probe PAH15\_2 von  $60$  auf  $78 \text{ \AA}$ . Die im Vergleich zur SLD von purem  $\text{D}_2\text{O}$  ( $6.38 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) teilweise niedrigeren SLDs der wässrigen Zwischenschichten und der Umgebung resultierten aus Verunreinigung durch leichtes Wasser ( $\varphi_{H_2O} = 0 - 0.094$ ). Der Zusatz von PAH ( $\varphi_{PAH} = 0.002$ ) ist hingegen vernachlässigbar. Es ergibt sich:

$$SLD_w = (1 - \varphi_{H_2O}) \cdot SLD_{D_2O} + \varphi_{H_2O} \cdot SLD_{H_2O} \quad (4.16)$$

## Ergebnisse und Diskussion

Alle restlichen Werte wurden aus individuellen Fits durch Mittelwertbildung erhalten und konstant gesetzt. Für Proben, welche mit hoher Gesamtauflösung von 1.4 % bzw. 7 % gemessen wurden, musste eine Auflösung von 5 % bzw. 12 % für das Modell angenommen werden. Dies lag vermutlich an langwelligigen Undulationen der Schichten auf der Mikrometerskala, die zu einer Verschlechterung der Winkelauflösung im Experiment führten.



Box-Nr.	Material	$d_i$ [Å]	$SLD_i$ [ $10^{-6}$ Å <sup>-2</sup> ]	$\varphi_w$	$\sigma$ [Å]	Anzahl
Substrat	Si	-	2.07	0	2	1
1	SiO <sub>x</sub>	13	3.48	0	5	1
2	DMPC-Bilage	49	0.3	0	13	1
3	Wässrige Zwischen-schicht	$x_1$	5.72	1	13	9
4	DMPC-Bilage	60 78	0.3	$x_2$	13	
5	Wässrige Zwischen-schicht	$x_1$	5.72	1	13	1
6	DMPC-Bilage	60 78	0.3	$x_3$	13	1
Umgebung	Wässrige Phase	-	5.72	1	13	1

Tab. 4.9: Modell 3: Parameter des Modells für NR-Messungen der Probe PAH15\_2. Die freien Parameter für die Modellschätzung sind mit  $x_i$  markiert. Spezielle Werte für das ungescherte bzw. gescherte System sind mit Blau und Grün gekennzeichnet.

Da hier letztlich nur 3 Parameter variiert wurden (die Schichtdicken für Box 3 und 5 sind gleich), war es möglich den gesamten Datensatz der Schermessungen konsistent zu beschreiben. Die Daten mit der optimalen Modelltrajektorie und der dazugehörigen SLDs für PAH15\_2 sind in Abb. 4.67 zu sehen. Abb. 4.68 zeigt die Veränderungen der Schichtdicken und des jeweiligen Wassergehalts bei zunehmender Scherung.

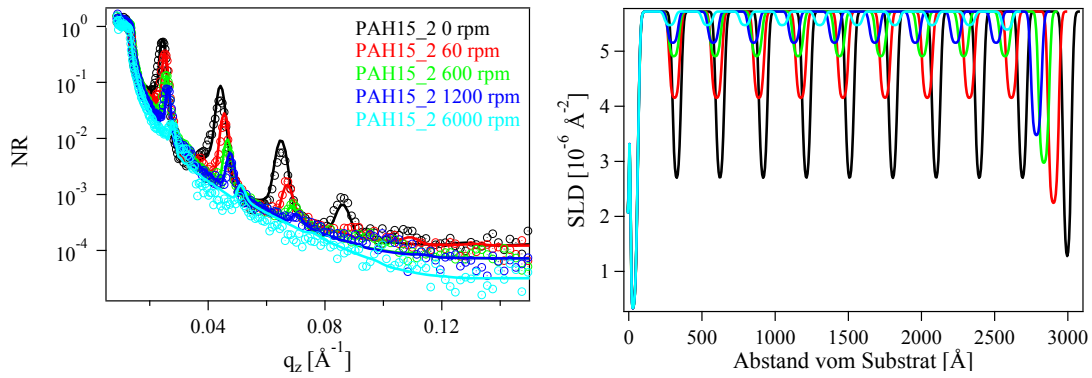


Abb. 4.67: Die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Probe PAH15\_2. Die Daten für die verschiedenen Scherraten wurden mit dem obengenannten Modell verglichen.

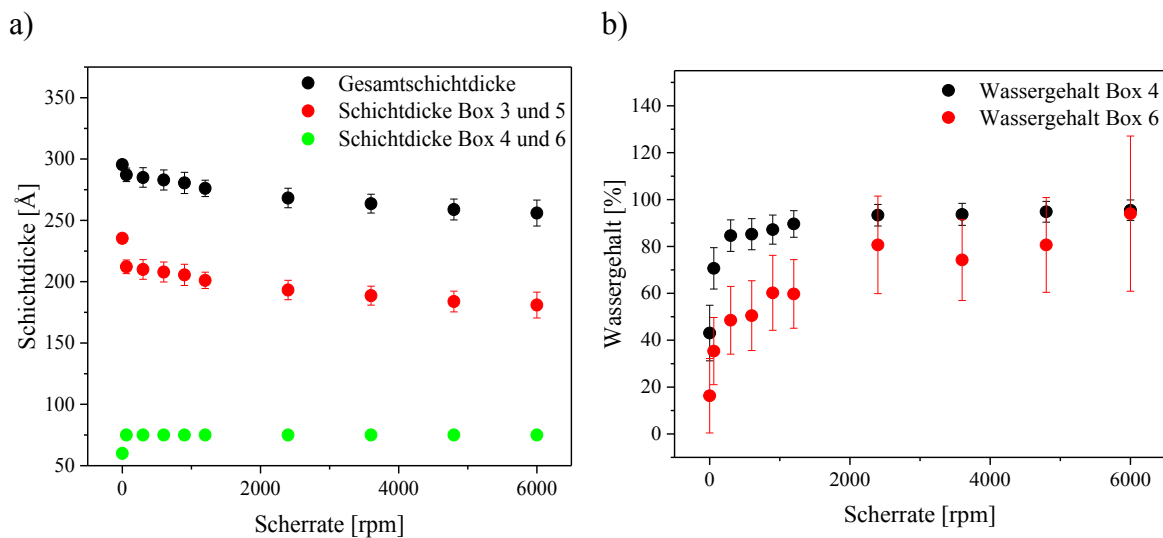


Abb. 4.68: a) Die Schichtdicken und b) Wassergehalt bei zunehmender Scherrate resultierend aus dem Modell 3 für die Probe PAH15\_2.

Zu Beginn der Scherung nahm die Schichtdicke der DMPC-Bilagen zunächst von 60 auf 78 Å zu. Der Wert der Schichtdicke blieb danach konstant, wohingegen die Dicken der wässrigen Zwischenschicht aus Box 3 und 5 kontinuierlich von 236 auf 181 Å fielen. Zudem dargestellt ist der Wassergehalt der Lipid-Bilagen, welcher bei größeren Scherraten zunahm. Der Gehalt stieg sowohl für die äußere als auch für die innere Bilage auf einen End-Wert von 95 % bei einer Scherrate von 6000 rpm. Der Wassergehalt im Kern nahm dabei am Anfang viel schneller zu als der der äußeren Lage. Diese Zunahme hatte einen starken Kontrastverlust zur Folge. Dieser Kontrastverlust kann in Abb. 4.67 anhand der SLD gezeigt werden. Bei Zunahme des Wassergehalts um einen Faktor von ca. 2 sinkt der Kontrast etwa auf die Hälfte. Die Kontrast-Abnahme trägt wiederum zum Intensitätsverlust des Bragg-Peaks mit zunehmender Scherung bei. Auf die starke Zunahme des Wassergehalts in den Lipidschichten bei erhöhter Scherung wird später noch näher eingegangen (s. 4.5.6).

## Ergebnisse und Diskussion

Auch für die Proben, welche in PAH-Lösungen mit höherem MW inkubiert wurden, konnten ähnliche Fits erhalten werden (s. Abb. 4.69 und Abb. 4.70). Für das MW von 58 kDa (PAH58\_2) bzw. 900 kDa (PAH900\_1) konnte mit zunehmender Scherrate ein erhöhter Wassergehalt der Kern-Bilage von 90 % festgestellt werden. Die Schichtdicke der Bilage nahm nur bei PAH58\_2 von 50 auf 55 Å leicht zu während sie für PAH900\_1 und auch alle anderen in PAH 900 kDa inkubierten Proben einen konstanten Wert (hier 60 Å) anzeigte. Ein Ausdünnen der wässrigen Zwischenschicht in Box 5 konnte nur leicht bis gar nicht bei den in PAH 58 kDa inkubierten Proben festgestellt werden, wohingegen PAH 15 kDa und 900 kDa deutlich zu einem Schrumpfen dieser Zwischenlage führten. Weitere Messungen und Fits können im Anhang unter 7.1 nachgesehen werden.

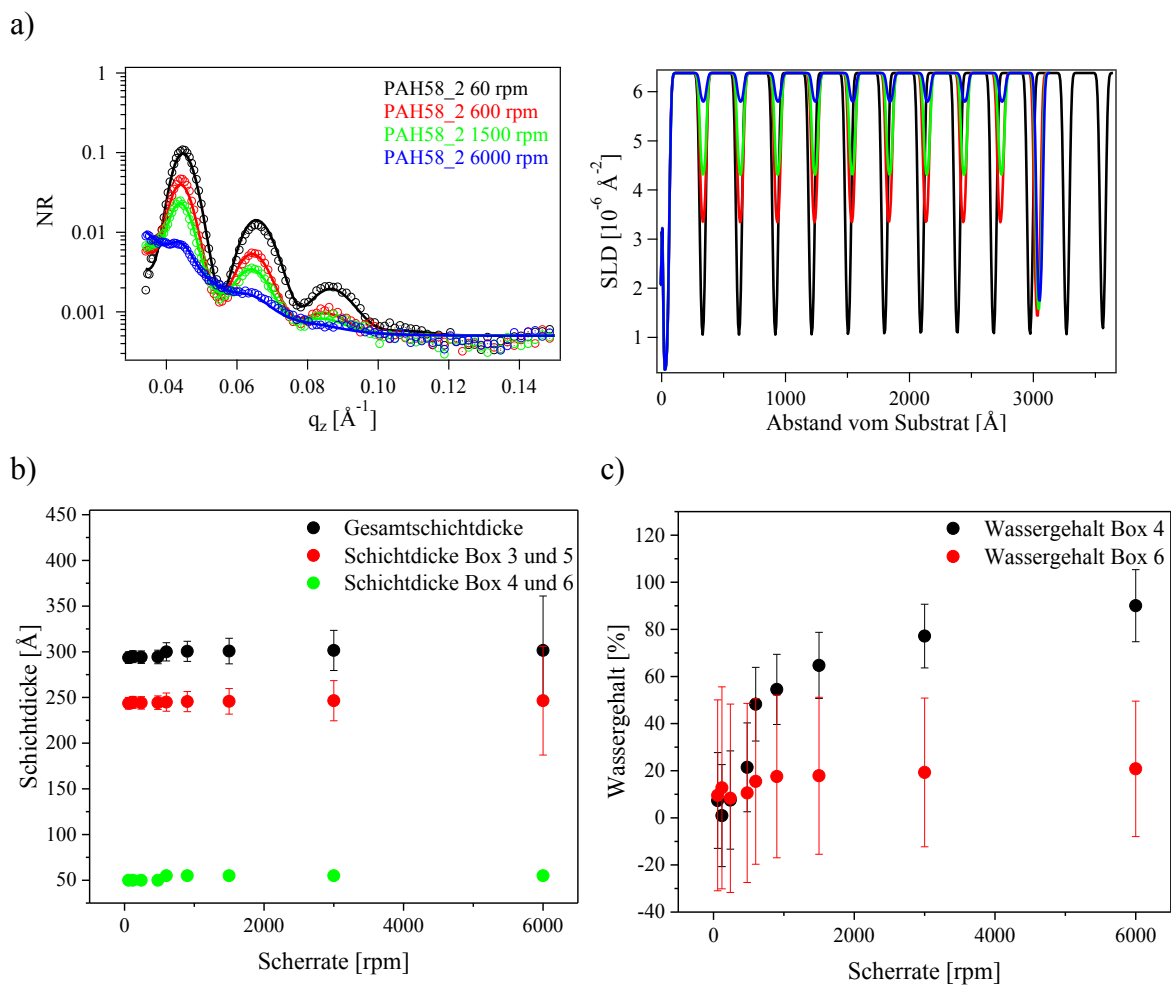


Abb. 4.69: Gezeigt sind a) die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs sowie b) die Schichtdicken und c) Wassergehalt bei zunehmender Scherrate resultierend aus dem Modell 3 für die Probe PAH58\_2.

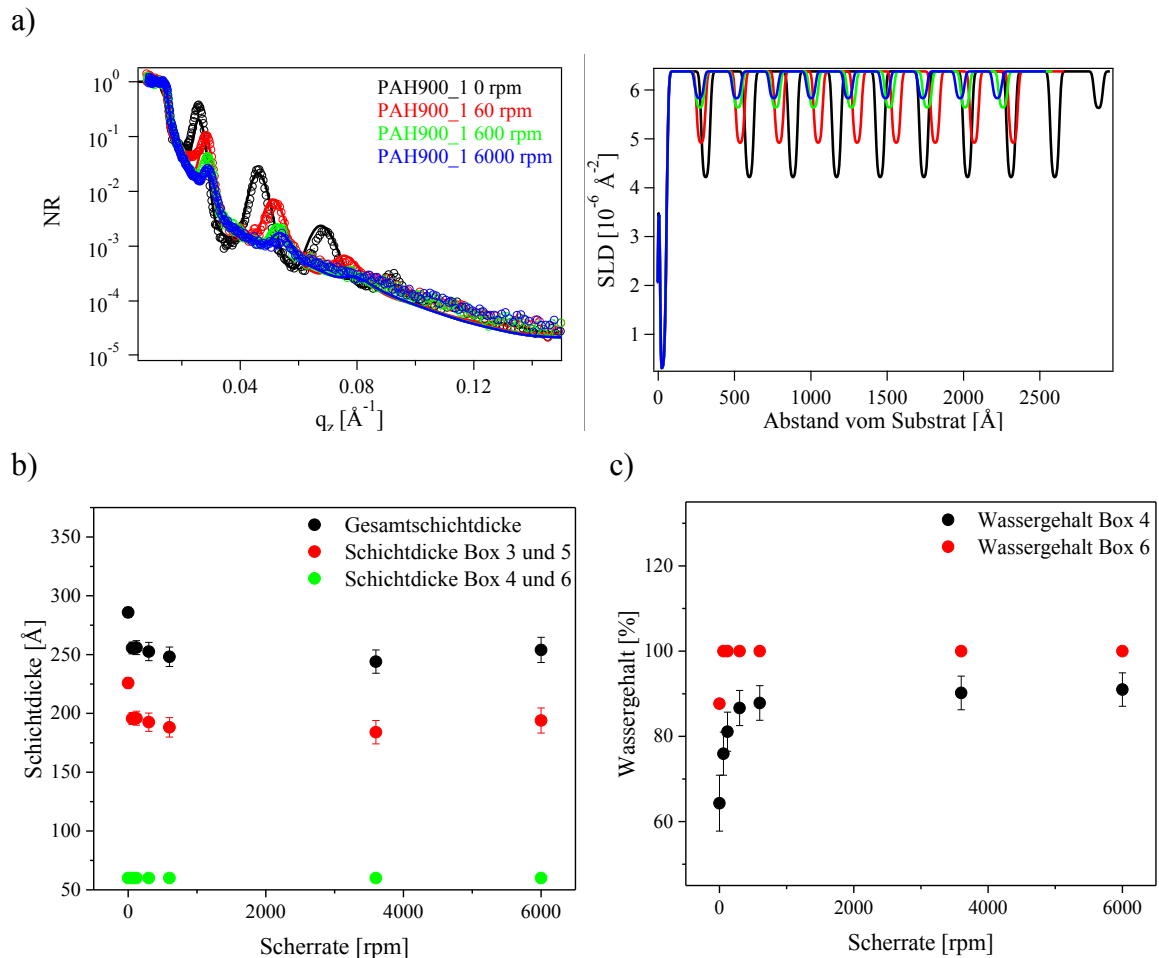


Abb. 4.70: Gezeigt sind a) die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs sowie b) die Schichtdicken und c) Wassergehalt bei zunehmender Scherrate resultierend aus dem Modell 3 für die Probe PAH900\_1.

## 4.5.6. Diskussion der Schermessungen

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Schermessungen zusammengefasst und erläutert werden, inwieweit die durchgeführten Untersuchungen zu einer Klärung der Mechanismen der Viskosupplementation beitragen können. Im Vordergrund der Untersuchung stand eine mögliche Stabilisierung von Lipid-Oligolagen durch Zugabe von HS oder polymeren Ersatzstoffen.

Die Referenzmessungen in Wasser konnten zur Validierung des Modellsystems verwendet werden. Hierzu finden sich Literaturdaten, welche mit den gemessenen Parametern übereinstimmten. Die lamellare Gitterkonstante von in Wasser inkubierten DMPC-Bilagen bei 20 °C hat einen Wert von 65 bzw. 66 Å für ausgerichtete bzw. nicht ausgerichtete Strukturen.<sup>159-160</sup> Dies entspricht den Werten von 65 Å, welche für die Proben in D<sub>2</sub>O gemessen wurden.

Mit Applizieren einer Scherung lösten sich die substratgebundenen oligolamellaren DMPC-Strukturen mehr oder weniger stark von der Oberfläche. Dies konnte bereits durch M. Kreuzer bestätigt werden.<sup>55,82</sup> In der hier vorliegenden Arbeit war bei Inkubation in reinem D<sub>2</sub>O nach 60 rpm ein Großteil der DMPC-Beschichtung abgelöst, was zu einem Verlust des Bragg-Peaks führte.

Kreuzer fand bei Zugabe von HS in die wässrige Phase eine Steigerung der Scherstabilität der Lipidlagen.<sup>54</sup> In dieser Arbeit konnte auch bei Zugabe von polymeren Ersatzstoffen wie PAH ein gegenüber Scherung stabilisierender Effekt nachgewiesen werden. Inkubiert wurde mit verschiedenen MW von 15, 58 und 900 kDa bei Konzentrationen von 3 g/L. Dies bewirkt eine Quellung um das 3 - 4-fache der Probenschichtdicke in purem Wasser (bzw. um das 4 - 5-fache im Vergleich zur trockenen Probe). Die Lipid-Beschichtung quillt dabei zu einem hydrogelartigen Gebilde auf. Wie in der Arbeit von Kreuzer *et al.* für HS beschrieben, wird eine elektrostatische Repulsion vermutet, welche eine Vergrößerung des lamellaren Abstandes bewirkt.<sup>54-55</sup> Diese Abstoßung entsteht vermutlich durch die Anlagerung von PAH an die Kopfgruppen der Lipide, welche dadurch aufgeladen werden. Dies ist konsistent mit der DLVO-Theorie von Ohshima *et al.* und Izumitani, welche zusätzlich Van-der-Waals-Kräfte sowie Hydratations- und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Membranen berücksichtigen (Näheres s. 4.2).<sup>52,161</sup>

Die PAH-Lösungen aller MWs zeigen unter Einwirkung von Scherkräften einen stabilisierenden Effekt auf die Lipid-Oligobilagen gegenüber reinem Wasser. Dabei scheint das MW von 58 kDa über einen größeren Scherbereich stabilisierend zu wirken als das niedermolekulare. Eine Zunahme der Stabilität in Abhängigkeit vom MW konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die Proben, welche in PAH mit dem MW von 900 kDa inkubiert wurden, zeigten mehrfach nicht reproduzierbare Stabilitäten der Lipide. Die durchgeführten Experimente lassen vermuten, dass die Inkubationszeit vor Scherung insbesondere für höhere MWs eine Rolle spielt, jedoch konnte dies nicht hinreichend bestätigt werden. Um diese Hypothese zu bestätigen wurde vor Vermessung der in PAH des MWs 900 kDa inkubierten Probe PAH900\_4 für 120 h inkubiert (etwa 6-mal länger als gewöhnlich). Eine erhöhte Stabilität konnte für diese Inkubationsdauer nicht beobachtet werden. Messungen mit Hyaluronsäure zeigten jedoch, dass eine längere Inkubationszeit (ein Monat im Vergleich zu einem Tag) einen positiven Effekt auf die stabilisierende Wirkung hat. Proben, welche in HS inkubiert vorlagen, waren gegenüber Scherung noch weitaus stabiler als die in PAH inkubierten Proben.

Der zeitliche Faktor erschwert jedoch die Beurteilung der Scherstabilität. Neben der Inkubationsdauer kommt zusätzlich auch die Wartezeit während der Schervorgänge hinzu. Zusätzlich zur Schergeschwindigkeit könnte zudem die Scherdauer von Bedeutung sein. Diese variierten je nach Dauer der Gleichgewichtseinstellung zwischen 30 Minuten und 28.5 Stunden (s. Tab. 4.8). Eine neue Scherrate wurde erst nach Erreichen eines Gleichgewichts appliziert. Abb. 4.71 zeigt die NR-Messung der Probe PAH900\_4, welche in PAH des MW 900 kDa inkubiert wurde. Die Kurven wurden alle bei einer



## Ergebnisse und Diskussion

Scherrate von 300 rpm aufgenommen. Eine Datenreihe benötigt dabei 3.75 h Messzeit. Selbst nach 26.25 h wurde ein Unterschied zwischen zwei aufeinander folgenden Kurven (Pink und Ocker) festgestellt. Das Gleichgewicht konnte selbst nach dieser Zeit nicht erreicht werden. Während der Messungen verloren die Bragg-Peaks an Intensität und die lamellare Schichtdicke nahm ab. Fraglich ist nun, ob der Lipid-Verlust kinetisch gehemmt ist und die Abnahme der Bragg-Peaks nicht nur durch Scherung sondern auch durch die Scherdauer bedingt ist.

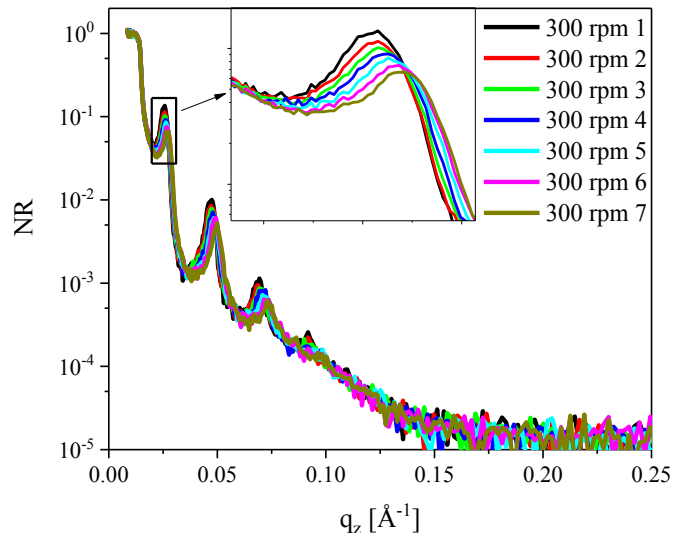


Abb. 4.71: Gleichgewichtseinstellung bei 300 rpm der Probe PAH900\_4 inkubiert in PAH mit einem MW von 900 kDa. Die Zeitdifferenz zwischen den Aufnahmen der einzelnen Kurven beträgt 3.75 h. Die Probe befindet sich selbst nach 26.25 h nicht im Gleichgewicht.

In einigen Messungen konnte zudem gezeigt werden, dass der Lipid-Verlust irreversibel ist. Nach Beendigung der Scherung konnte keine Readsorption der Lipide festgestellt werden.

Die Fits zeigten während des Schervorgangs für die in PAH 15 kDa inkubierte Probe PAH15\_2 eine Vergrößerung der Schichtdicke der DMPC-Bilage von 60 auf 78 Å. Interpretiert wurde dies als eine Biege-Deformation der Bilagen-Membranen. Diese Verformung ist in Abb. 4.72 links zu sehen. Mit zunehmender Scherrate (bis zu 6000 rpm) blieb die Dicke der Lipid-Bilagen jedoch konstant. Von einer solchen Deformation wurde bereits von Hanasaki *et al.* berichtet.<sup>152</sup> Beschrieben wurde die Instabilität von Lipid-Bilagen in Wasser bei Scherung durch eine molekulardynamische Simulation. Sie stellten ebenfalls eine Erhöhung der Bilagen-Dicke und des Wasseranteils in den Lagen fest. Die Zunahme des Wasseranteils lässt sich über Kelvin-Helmholtz-artige Instabilitäten erklären. Dabei entstehen in den Membranen Unterbrechungen, in welche das Wasser eindringen kann (s. Abb. 4.72). Diese Brüche innerhalb einer Membran können nicht aus den NR-Messungen bestimmt werden. Hierfür ist die laterale Auflösung nicht ausreichend. Die Abstände zwischen den Membranfragmenten ist kleiner

als die Kohärenzlänge des Neutronenstrahls ( $\leq 67 \mu\text{m}$ ).<sup>162</sup> Auch bei einer Scherrate von 6000 rpm konnten keine größeren Unterbrechungen der Filme festgestellt werden. Ein Schichtverlust von 3 bis 4 Bilagen für Scherraten von 4800 und 6000 rpm könnte möglich sein, jedoch waren Fits auch mit der ursprünglichen Anzahl an Bilagen möglich.

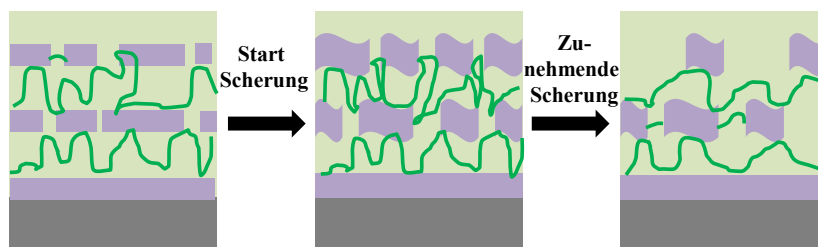


Abb. 4.72: Skizze des möglichen Verhaltens der Oligolagen bei zunehmenden Scherraten. Bei beginnender Scherung tritt eine Biege-Deformation der Bilagen auf. Mit zunehmender Scherung ändert sich die Biege-Deformation nicht, aber Teile der DMPC-Bilagen werden durch Wasser ersetzt. Zusammengehalten werden die Membranen über PAH-Vernetzungen.

Letztendlich ändern sich bei Scherung hauptsächlich die Menge an Lipidmolekülen innerhalb der Membranen und die Morphologie letzterer. Dies hat eine Erhöhung des Wasseranteils von bis zu 95 % zur Folge und damit einer Reduktion des Kontrastes für NR-Messungen. Der Intensitäts-Verlust in IR- und NR-Messungen wurde damit nicht durch Schichtverlust induziert, sondern vielmehr durch eine Verringerung der Flächendichte der Lipidmoleküle innerhalb der Schichten hervorgerufen.

Die Stabilisierung der Proben gegen Scherkräfte durch PAH lässt sich durch die Existenz von Rückstellkräften erklären, welche auf die DMPC-Membran-Fragmente wirken. Dabei dienen die makromolekularen PAH-Moleküle als Brücken und verbinden dabei die individuellen DMPC-Bilagen-Membranen (s. Abb. 4.72). Nach dieser Theorie müsste mit höherem MW die Verbrückung zunehmen und somit zu einer erhöhten Stabilität führen. Dies konnte jedoch durch diese Messungen nicht bestätigt werden. Eine erhöhte Stabilisierung zeigte das PAH 58 kDa, während PAH 900 kDa mit einem höheren MW nur ähnliche Lipidlagen-Verstärkungen wie das PAH 15 kDa aufwies. Dies ist mit der in 4.3 gefundenen Durchdringung der Kettenbereiche konsistent, welche für das MW von 58 kDa am stärksten war.

Die Viskosupplementation verwendet HS mit hohem MW im Bereich von 1000 kDa. Es wird vermutet, dass eine Stabilisierung über verbrückende Makromoleküle zu einem gelenkschonenden Bewegungsablauf führt. In dieser Arbeit konnte jedoch keine erhöhte Stabilisierung durch höheres MW nachgewiesen werden. Vielmehr wurde für das PAH mit dem MW von 58 kDa im Vergleich zu dem MW von 900 kDa eine erhöhte Durchdringung der Lipid-Bilagen festgestellt (s. 4.3). Weitere Publikationen zeigten, dass HS mit niedrigem MW eine höhere biologische Aktivität aufweist und vermehrt in die Membran-Bilagen integriert wird.<sup>32,81</sup> In der Viskosupplementation werden inzwischen effizientere HS-Mischungen aus hohem und niedrigem MW injiziert.<sup>163</sup> In dieser Arbeit

konnten Schermessungen mit HS mit hohem MW (769 - 850 kDa) eine erhebliche Scherstabilitätserhöhung im Vergleich zu den in PAH inkubierten Proben nachweisen. Es zeigte sich, dass das PAH als polymerer Ersatzstoff eine stabilisierende Wirkung auf Lipidschichten hat, diese aber bei Weitem von der HS, welche im Gelenk zu finden ist, übertroffen wird. Nachteilig im Falle von HS ist jedoch die lange Inkubationsdauer, die benötigt wird, um geeignete Stabilitäten zu erreichen (ca. 2 Wochen).

### 4.6. System-Betrachtungen unter physiologischen Bedingungen

Abschließend soll diskutiert werden, welche Schlussfolgerungen aus den gewonnenen Erkenntnissen für die Funktionsweise eines Gelenks unter physiologischen Bedingungen gezogen werden können.

Wir verwenden abermals das vereinfachte Modell, welches auf einem festkörpergestützten Lipid-Oligolagensystem basiert. Verwendet hierfür wurde das Lipid DMPC, welches sich vom häufigsten Lipid im Gelenk (DPPC) nur in 2 CH<sub>2</sub>-Gruppen in den Kettenbereichen unterscheidet. Es wird davon ausgegangen, dass sich beide Lipide hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit HS nicht unterscheiden. Weiterhin wurde auf eine Knorpel-Schicht zwischen Lipid und Knochen/Silicium verzichtet, da erstere ohnehin von den Lipiden bedeckt wäre.

Das vorliegende System wurde in verschiedenen wässrigen Lösungen inkubiert. Auch in einem natürlichen Gelenk befindet sich eine Flüssigkeit im Gelenkspalt. Diese wird Synovialflüssigkeit genannt. In ihr wurde HS mit einer durchschnittlichen Konzentration von 2.85 g/L und einem MW zwischen  $5 \cdot 10^4$  und  $8 \cdot 10^6$  Da gefunden.<sup>4,65,68</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde HS mit einem MW von etwa  $8 \cdot 10^5$  Da verwendet. HS liegt mit einem pK<sub>s</sub>-Wert der Carboxylgruppe von 3.21<sup>68</sup> im physiologischen pH-Bereich (7.4 - 7.8) in dissoziierter Form negativ geladen vor und besitzt seinen isoelektrischen Punkt bei pH 8.6.<sup>69</sup> *In vivo* handelt es sich daher um ein Polyanion. Außerdem hat die Synovialflüssigkeit im Gelenk eine ähnliche Elektrolytzusammensetzung wie Blutplasma.<sup>154</sup> Demnach liegt unter anderem ein erhöhter NaCl-Anteil vor (Na<sup>+</sup>: 135 - 150 mM, Cl<sup>-</sup>: 99 - 112 mM). Unter physiologischen Bedingungen wäre somit zu erwarten, dass die Lipidschichten trotz einer HS-Konzentration von etwa 3 g/L kaum gequollen vorliegen, da die Elektrolyte die Ladung der HS abschirmen.

Scherexperimente zeigten, dass bei Zugabe von HS-Lösungen mit einem MW von etwa 800 kDa ein im Vergleich zu dem System in reinem Wasser stabilisierender Effekt der Lipidlagen eintritt. Es wurden Scherraten zwischen 0 und 6000 rpm appliziert und die in HS inkubierten Lipid-Beschichtungen blieben teilweise bis 6000 rpm stabil. Diese Umdrehungszahl liegt über den physiologischen Scherraten welche bis zu 7400 °/Sekunde (1233 rpm) reichen.<sup>76</sup>



### 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollten die Grundlagen der Viskosupplementation untersucht werden. Diese nicht-operative Behandlung der Arthrose, eine degenerative Veränderung an den Gelenken, bei der die den Knorpel bedeckenden Lipidschichten sowie der Knorpel selbst abgebaut und der darunterliegende Knochen freigelegt wird, verspricht den Erhalt des eigenen natürlichen Gelenks bei gleichzeitiger Rückgewinnung dessen Funktionalität. Sie basiert auf Studien an Gelenken, welche zeigten, dass das Volumen der Synovialflüssigkeit bei Erkrankung zu, die Konzentration und das MW der darin enthaltenen Hyaluronsäure jedoch abnimmt.<sup>2-4</sup> Weitere Untersuchungen ergaben, dass auch oberflächenaktive PL neben der HS eine große Rolle in der Gelenkschmierung spielen.<sup>5-7</sup> Auf diesen Erkenntnissen aufbauend erfolgt bei der Viskosupplementation eine intraartikuläre Injektion von HS oder Mischungen aus HS und PL. Diese Form der Therapie ist jedoch bis heute umstritten. Im Fokus dieser Arbeit stand daher die Wechselwirkung der HS und polymerer Ersatzstoffe mit substratgebundenen PLs, um mögliche Wirkungsmechanismen der Viskosupplementation auf molekularer Ebene zu untersuchen. Im Gegensatz zu den meisten Arbeiten wurden hier jedoch nicht die Schmiereigenschaften der Gemische untersucht, sondern vielmehr die sich bei HS-Kontakt ausbildende Schichtstruktur sowie die Stabilisierung der Lipide gegenüber Scherung in den Vordergrund gerückt.

Als Modell für Gelenke wurde zunächst ein auf substratgebundenen Lipid-Oligolagen basierendes System etabliert und mittels XRR, Ellipsometrie und AFM charakterisiert. Verwendet wurden planare Siliciumträger, welche mit DMPC-Oligolagen rotationsbeschichtet wurde. Diese Strukturen wurden dann in wässrige HS- bzw. PE-Lösungen inkubiert und untersucht.

Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen PLs und PE- bzw. HS-Lösungen wurden in ersten Experimenten verschiedene Parameter der Lösungen verändert. Variiert wurden die Ladung, das Molekulargewicht und die Konzentration der PEs bzw. der HS, die Konzentration und Art zugesetzter Salze und der pH-Wert. Hierzu wurden die mit DMPC-Oligolagen beschichteten Silicium-Substrate zunächst als Referenz in reinem Wasser inkubiert und gemessen. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde das System den oben genannten Veränderungen ausgesetzt, erneut gemessen und mit der Referenzmessung verglichen.

Für geladene PEs wurde bei niedrigen Konzentrationen eine starke Zunahme der lamellaren Schichtdicke der Lipide gefunden, die mit zunehmender PE-Konzentration wieder abnahm. Ungeladene Polymere induzierten nur geringes Quellen, das mit steigender PE-Konzentration leicht zunahm. Dies gab Hinweise darauf, dass das starke Quellverhalten der Lipidschichten auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert. Dabei sorgt eine selektive Adsorption der PEs an den Lipid-Bilagen für eine Aufladung der Schichten. Experimente zur Ladungsabschirmung durch Salz-Lösungen und Änderungen des pH-Werts konnten diese Vermutung weiter bestätigen.

## Zusammenfassung und Ausblick

---

Unter physiologischen Bedingungen liegen die Lipidschichten wahrscheinlich kaum gequollen vor. Bei einer HS-Konzentration von 3 g/L enthält das Gelenk eine mit dem Blutplasma vergleichbare Elektrolytzusammensetzung ( $\text{Na}^+$ : 135 - 150 mM,  $\text{Cl}^-$ : 99 - 112 mM) und somit eine hohe Ionenkonzentration, sodass das System kaum gequollen vorliegt.

Von Kreuzer *et al.* wurde eine Stabilisierung der Lipidlagen über Verbrückung durch HS-Moleküle vermutet. Die genaue Lokalisierung der PE- bzw. HS-Moleküle innerhalb der Lipid-Lagen sollte in dieser Arbeit mittels NR-Messungen ermöglicht werden. Modellierungen der Reflektivitätsverläufe ergaben für PAH mit dem mittleren MW von 58 kDa einen Einbau in die Kettenbereiche. Mittels geschickter Kontrastvariationen in den Systemen durch Verwendung von deuterierten Lipiden war auch ein direkter, nicht auf Modellrechnungen basierender Nachweis des Einbaus von PAH in das Schichtsystem möglich, so dass eventuelle Fehlerquellen bei der Modellierung ausgeschlossen werden konnten. Ein solcher Einbau legt eine Verbrückung der Schichten durch HS und PEs nahe, welche zur Ausbildung einer hydrogelartigen Struktur führen kann. Aus bisher unbekanntem Gründen konnten die Messkurven jedoch nicht mit modellhaften Beschreibungen in Einklang gebracht werden. Der theoretisch erwartete Abfall der Kurven verläuft wesentlich schneller als der gemessene. Aus diesem Grund konnte keine quantitative Analyse der internen Filmstruktur erfolgen.

Die von Kreuzer gefundene Stabilisierung der Lipide durch Zugabe von HS bei Temperaturerhöhung konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da die Lipid-Beschichtung generell bei Erhöhung der Temperatur stabil blieb. Aufgrund der Tatsache, dass die Lipide im Gelenk in der Gelphase vorliegen und niemals in den Bereich des flüssig-kristallinen Zustands rücken, ist die Frage der Temperaturstabilisierung jedoch von geringerer Bedeutung für die Viskosupplementation.

Bei Betrachtung der Scherstabilität der Lipidlagen nach Zugabe von HS und PE konnte hingegen im Vergleich zum System in reinem Wasser eine Stabilisierung gefunden werden. Dabei zeigte sich, dass HS die Lipide besser gegen Scherung stabilisiert als PAH. Während PAH eine Stabilisierung bereits nach kurzen Inkubationszeiten von weniger als einem Tag gewährt, müssen Proben allerdings bis hin zu einem Monat in HS inkubiert werden bevor ein ausgeprägter stabilisierender Effekt eintritt. MW-abhängige Messungen zur Stabilisierung der Lipidlagen durch HS wurden noch nicht durchgeführt sind jedoch in Planung. Für PAH wies das Ausmaß der Stabilisierung keine monotone Abhängigkeit vom MW auf. Während PAH mit dem MW von 58 kDa die Lipidschichten besser stabilisierte als das niedermolekulare PAH mit 15 kDa, zeigte PAH mit einem MW von 900 kDa eine ähnliche Stabilisierung wie das niedermolekulare PAH. Mit der erhöhten Stabilität des Systems für PAH 58 kDa konnte die Theorie der Viskosupplementation zum MW somit nicht bestätigt werden. Die erhöhte Stabilisierung mit dem MW von 58 kDa steht jedoch im Einklang mit dem gefundenen Einbau des PAH 58 in die Kettenbereiche. Dies entspricht nicht der ursprünglichen Erwartung, da in medizinischen Studien beschrieben wurde, dass bei von Arthrose betroffenen Gelenken das MW der HS

abnimmt. Daher wurde gefolgert, dass Zugabe von höhermolekularem HS zu einer Verbesserung der Gelenkbewegung führen kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HS und polymere Ersatzstoffe einen stabilisierenden Effekt auf die Lipid-Bedeckung der Gelenke zeigen, welcher eventuell zu einer Regenerierung der reibungsarmen Gelenkbewegung führen kann. Jedoch ist fraglich, ob die reibungsarme Funktionsweise eines realen Gelenks, welches durch die Arthrose in seinem Gleichgewicht deutlich gestört wurde, lediglich durch Injektion von HS-Lösungen zurückgewonnen werden kann. In dieser Arbeit konnte nämlich auch gezeigt werden, dass nach Beendigung der Scherung abgelöste Lipid-Schichten nicht zurückgewonnen werden konnten. Die Lipide blieben in Lösung und es kam nicht wieder zur Readsorption. Für die Wirkungsweise der Viskosupplementation muss daher zusätzlich ein Mechanismus zur Neuausbildung von Lipidschichten auf den Knorpel gegeben sein. Hinzu kommt das nur geringe Heilungsvermögen der Knorpelschicht.<sup>164</sup> Jung *et al.* geben in ihrer Arbeit einen Überblick über eine mögliche Kombination aus Viskosupplementation und chirurgischem Eingriff, um die Erfolgsaussichten der Methode zu verbessern.<sup>165</sup> Mit letzterem soll die zerstörte Knorpelschicht wieder repariert werden.

In ihrer Arbeit vermuten sie, dass der Grad der Degeneration des jeweiligen Gelenks eine Rolle bei einer möglicherweise erfolgreichen Behandlung spielt.<sup>165</sup> Sehr deutlich wird dies schon in dieser Arbeit, in der mit einfachen physikalischen Modellen gearbeitet worden ist. Trotz der Vermeidung komplexer biologischer Systeme konnte hier vor allem bei den Scherexperimenten sehr starke Probe-zu-Probe-Variationen bei der Stabilität der Lipide festgestellt werden. Vermutet wurde, dass eine teilweise inhomogene Lipid-Bedeckung der Substrate zu geringeren Stabilitäten führte. Dies könnte auch erklären weshalb Studien zur Viskosupplementation sehr unterschiedlich ausfallen. Zudem beziehen sich diese auch auf verschiedene Gelenke (Knie, Hüfte, Knöchel...), welche sich zwar in ihrer prinzipiellen Funktionsweise nicht unterscheiden, jedoch in unterschiedlicher Weise beansprucht werden.

Für die Entwicklung einer Arthrose-Therapie basierend auf der Viskosupplementation sollte in künftigen Untersuchungen neben den Lipidschichten auch die Knorpelschicht berücksichtigt werden. Diese wurde in dieser Arbeit vernachlässigt, da zunächst das detaillierte Verständnis der Wechselwirkungen der Lipidlagen mit der HS notwendig ist, bevor komplexere Systeme untersucht werden können. Die Idee der Viskosupplementation scheint grundlegend vielversprechend zu sein und durch Berücksichtigung von weiteren Komponenten wie die Proteoglykane oder Knorpelbeschichtung<sup>166-168</sup> wird in Zukunft eine wirkungsvolle nicht-operative Behandlung der Arthrose möglich sein.





## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Robert Koch-Institut (Hrsg) (2015) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin.
- (2) Dahl, L.; Dahl, I.; Engström-Laurent, A.; Granath, K. *Annals of the rheumatic diseases* **1985**, *44*, 817-822.
- (3) Takahashi, T.; Tominaga, K.; Takano, H.; Ariyoshi, W.; Habu, M.; Fukuda, J.; Maeda, H. *J. Oral Pathol. Med* **2004**, *33*, 224-229.
- (4) Balazs, E. A.; Watson, D.; Duff, I. F.; Roseman, S. *Arthritis Rheum.* **1967**, *10*, 357-376.
- (5) Gale, L. R.; Collier, R.; Hargreaves, D. J.; Hills, B. A.; Crawford, R. *Tribol. Int.* **2007**, *40*, 601-606.
- (6) Gale, L. R., Queensland University of Technology, 2007.
- (7) Hills, B. A. *Proc. Instn. Mech. Engrs H* **2000**, *214*, 83-94.
- (8) Klein, J. *Proc. I. Mech. E* **2006**, *220*, 691-710.
- (9) Dowson, D.; Wright, V. *Biomedical Engineering* **1996**, *4*, 160-165.
- (10) Hills, B. A. *J. Rheumatol.* **1989**, *16*, 82-91.
- (11) Hills, B. A. *Journal of Applied Physiology* **1992**, *73*, 1034-1039.
- (12) [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scharniergelenk\\_Ellbogen.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scharniergelenk_Ellbogen.jpg) (23.05.2017).
- (13) Unsworth, A. *Tribol. Int.* **1995**, *28*, 485-495.
- (14) Butt, H. J.; Graf, K.; Kappl, M. *Physics and Chemistry of Interfaces*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2003.
- (15) McCutchen, C. W. *Nature* **1959**, *184*, 1284-1285.
- (16) Walker, P. S.; Dowson, D.; Longfield, M. D.; Wright, V. *Ann. Rheum. Dis.* **1968**, *27*, 512-520.
- (17) Hills, B. A. *J. Rheumatol.* **2002**, *29*, 200-205.
- (18) Hills, B. A. *Int. Med. J.* **2002**, *32*, 170-178.
- (19) Rabenberg, M. In *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*; Arthrose; Robert Koch Institut: Berlin, 2013; Vol. 54.
- (20) Höffler, D.; Lasek, R.; Gugler, R.; Niebling, W. In *Arzneiverordnung in der Praxis*; Empfehlungen zur Therapie von degenerativen Gelenkerkrankungen; Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2008.
- (21) <http://www.med-library.com/kuenstliches-kniegelenk-haltbarkeit-lebensdauer-tipps> (10.11.2015).
- (22) Bodugoz-Senturk, H.; Macias, C. E.; Kung, J. H.; Muratoglu, O. K. *Biomaterials* **2009**, *30*, 589-596.
- (23) Moro, T.; Takatori, Y.; Ishihara, K.; Konno, T.; Takigawa, Y.; Matsushita, T.; Chung, U.-I.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 829-836.
- (24) Golub, M.; Lott, D.; Watkins, E. B.; Garamus, V.; Luthringer, B.; Stoermer, M.; Schreyer, A.; Willumeit, R. *Biointerphases* **2013**, *8*, 1-11.
- (25) Laico, J. P. United States, 2012.
- (26) Swann, D. A.; Bloch, K. J.; Swindell, D.; Shore, E. *Arthritis Rheum* **1984**, *27*, 552-556.
- (27) Balazs, E. A.; Denlinger, J. L. *J. Rheumatol.* **1993**, *20*, 3-9.
- (28) Bellamy, N.; Campbell, J.; Robinson, V.; Gee, T.; Bourne, R.; Wells, G. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**
- (29) Divine, J. G.; Shaffer, M. D. *Current Sports Medicine Reports* **2011**, *10*, 279-284.

- (30) Lo, G. H.; LaValley, M.; McAlindon, T.; Felson, D. T. *Journal of the American Medical Association* **2003**, *290*, 3115-3121.
- (31) Denlinger, J. L. Dissertation, University of Lille, 1982.
- (32) Ghosh, P.; Guidolin, D. *Semin. Arthritis Rheu.* **2002**, *32*, 10-37.
- (33) Huskisson, E. C.; Donnelly, S. *Rheumat.* **1999**, *38*, 602-607.
- (34) Karlsson, J.; Sjörgen, L. S. *Rheumat.* **2002**, *41*, 1240-1248.
- (35) Walker-Bone, K.; Javaid, K.; Arden, N.; Cooper, C. *Brit. Med. J.* **2000**, *321*, 936-940.
- (36) Lohmander, L. S.; Dalen, N.; Englund, G. *Ann. Rheum. Dis.* **1996**, *55*, 424-431.
- (37) Kotz, R.; Kolarz, G. *Am. J. Orthop.* **1999**, *28*, 5-7.
- (38) Kawano, T.; Miura, H.; Mawatari, T.; Moro-Oka, T.; Nakanishi, Y.; Higaki, H.; Iwamoto, Y. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48*, 1923-1929.
- (39) Forsey, R. W.; Fisher, J.; Thompson, J.; Stone, H. M.; Bell, C.; Ingham, E. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4581-4590.
- (40) Heberle, F. A.; Myles, D. A. A.; Katsaras, J. *Chemistry and Physics of Lipids* **2015**
- (41) Galla, H.-J. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, 1988.
- (42) Cevc, G.; Marsh, D. *Phospholipid Bilayers - Physical Principles and Models*; John Wiley & Sons, Inc.: United States of America, 1987.
- (43) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*; Wiley-VCH, 2007.
- (44) Chandler, D. *Nature* **2005**, *437*, 640-647.
- (45) Williams III, P. F.; Powell, G. L.; LaBerge, M. *J. Eng. Med.* **1993**, *207*, 59-66.
- (46) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. *Biochem.* **1976**, *15*, 4575-4580.
- (47) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6068-6078.
- (48) Hinz, H.-J.; Sturtevant, J. M. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6071-6075.
- (49) Lipowsky, R. *Z. Phys. B* **1995**, *97*, 193-203.
- (50) Netz, R. R.; Lipowsky, R. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 3596-3599.
- (51) Tanaka, M.; Schneck, E.; Yoshikawa, H. Y.; Rossetti, F. F. *An Asian Journal* **2011**, *6*, 1728-1738.
- (52) Ohshima, H.; Mitsui, T. *Journal of Colloid and Interface Science* **1978**, *63*, 525-537.
- (53) Vogel, M.; Münster, C.; Fenzl, W.; Salditt, T. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 390-393.
- (54) Kreuzer, M. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2012.
- (55) Kreuzer, M.; Strobl, M.; Reinhardt, M.; Hemmer, M. C.; Hauß, T.; Dahint, R.; Steitz, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 2648-2659.
- (56) Lecuyer, S.; Charitat, T. *Europhys. Lett.* **2006**, *75*, 652-658.
- (57) Pozo-Navas, B.; Raghunathan, V. A.; Katsaras, J.; Rappolt, M.; Lohner, K.; Pabst, G. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 028101.
- (58) Salditt, T. *Curr. Opin. Colloid. In.* **2000**, *5*, 19-26.
- (59) Salditt, T. *J. Phys.: Condens. Matter* **2005**, *17*, R287.
- (60) Pabst, G.; Katsaras, J.; Raghunathan, V. A. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 1281011-1281014.
- (61) Little, T.; Freeman, M. A. R.; Swanson, S. A. R. *Lubrication and Wear in Joints* **1996**, 110-116.
- (62) Gatter, R. A.; Schumacher, H. R. *A practical handbook of joint fluid analysis*; Lea und Febiger, 1991.
- (63) Kaltofen, T. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2008.
- (64) Lowther, D. A.; Rogers, H. J. *Nature* **1955**, *175*, 435.
- (65) Sundblad, L. *Acta orthopaedica Scandinavica* **1950**, *20*, 105-113.

- (66) Bjelle, A. *Conn. Tiss. Res.* **1975**, *3*, 141.
- (67) Bjelle, A.; Anderson, T.; Granath, K. *Journal of Rheumatology* **1982**, *12*, 133-138.
- (68) Balazs, E. A. *Federation Proceedings* **1958**, *17*, 1086-1093.
- (69) <http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/%28webtds2%29/100735>  
(23.05.2017).
- (70) Mady, M. M.; Mohammed, W. A.; El-Guendy, N. M.; Elsayed, A. A. *Romanian J. Biophys.* **2011**, *21*, 151-165.
- (71) Choi, J.; Rubner, M. F. *Macromol.* **2005**, *38*, 116-124.
- (72) Netz, R. R.; Andelman, D. In *Encyclopedia of Electrochemistry*; Polyelectrolytes in solution and at surfaces; Wiley-VCH: Weinheim, 2002; Vol. 1.
- (73) Manning, G. S. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *51*, 924-933.
- (74) Lösche, M.; Schmitt, J.; Decher, G.; Bouwman, W. G.; Kjaer, K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 8893-8906.
- (75) Schönhoff, M.; Ball, V.; Bausch, A. R.; Dejngnat, C.; Delorme, N.; Glinel, K.; v. Klitzing, R.; Steitz, R. *Colloids Surf., A* **2007**, *303*, 14-29.
- (76) Knudson, D. *Fundamentals of Biomechanics*; Springer, 2007.
- (77) Ghosh, P.; Hutadilok, N.; Adamand, N.; Lentini, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, *16*, 237.
- (78) Pasquali-Ronchetti, I.; Quaglino, D.; Mori, G.; Bacchelli, B.; Ghosh, P. *J. Struct. Biol.* **1997**, *120*, 1-10.
- (79) Crescenzi, V.; Taglienti, A.; Pasquali-Ronchetti, I. *Colloids Surf., A* **2004**, *245*, 133-135.
- (80) Ionov, R.; El-Abed, A.; Goldmann, M.; Peretti, P. *BBA* **2004**, *1667*, 200-207.
- (81) Wieland, D. C.; Degen, P.; Zander, T.; Gayer, S.; Raj, A.; An, J.; Dedinaite, A.; Claesson, P.; Willumeit-Romer, R. *Soft Matter* **2015**
- (82) Kreuzer, M.; Kaltofen, T.; Steitz, R.; Zehnder, B. H.; Dahint, R. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 1.
- (83) Zander, T.; Wieland, D. C.; Raj, A.; Wang, M.; Nowak, B.; Krywka, C.; Dedinaite, A.; Claesson, P. M.; Garamus, V. M.; Schreyer, A.; Willumeit-Romer, R. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2016**, *142*, 230-238.
- (84) Kreuzer, M.; Trapp, M.; Dahint, R.; Steitz, R. *Membranes* **2015**, *6*
- (85) Demé, B.; Dubois, M.; Zemb, T.; Cabane, B. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3828-3838.
- (86) Mennicke, U. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2003.
- (87) Wong, J. Y.; Majewski, J.; Seitz, M.; Park, C. K.; Israelachvili, J. N.; Smith, G. S. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1445-1457.
- (88) Herbet, L.; Napolitano, C. A.; McDaniel, R. V. *Biophys. J.* **1984**, *46*, 677-685.
- (89) Lis, L. J.; Parsegian, V. A.; Rand, R. P. *Biochem.* **1981**, *20*, 1761-1770.
- (90) Arnold, K.; Hofmann, A. *Stud. Biophys.* **1976**, *59*, 139-147.
- (91) Hauser, H.; Guyer, W.; Levine, B.; Skrabla, P.; Williams, R. J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *508*, 450-463.
- (92) Söderman, O.; Arvidson, G.; Lindblom, G.; Fontell, K. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *134*, 309-314.
- (93) Westman, J.; Eriksson, L. E. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *557*, 62-78.
- (94) Lis, L. J.; Lis, T. W.; Parsegian, V. A.; Rand, R. P. *Biochem.* **1981**, *20*, 1771-1777.
- (95) Inoko, Y.; Yamaguchi, T.; Furuya, K.; Mitsui, T. *BBA* **1975**, *413*, 24-32.
- (96) Ohshima, H.; Mitsui, T. *Journal of Colloid and Interface Science* **1977**, *63*, 525-537.

- (97) Schwierz, N.; Netz, R. R. *Langmuir* **2012**, *28*, 3881-3886.
- (98) Valley, C. C.; Perlmutter, J. D.; Braun, A. R.; Sachs, J. N. *J. Membrane. Biol.* **2011**, *244*, 35-42.
- (99) Fukada, K.; Miki, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 439-445.
- (100) Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Harries, D.; Kucerka, N.; Nagle, J. F.; Parsegian, V. A. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 302-309.
- (101) Gurtovenko, A. A.; Miettinen, M.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21126-21134.
- (102) Kherb, J.; Flores, S. C.; Cremer, P. S. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 7389-97.
- (103) Zhang, Y.; Cremer, P. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 15249-15253.
- (104) Schwarz, U. *Theory of Soft and Biomatter*: <https://www.thphys.uni-heidelberg.de/~biophys/PDF/Skripte/SoftMatter.pdf> (12.05.2015).
- (105) Israelachvili, J. N.; Wennerstroem, H. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 520-531.
- (106) Israelachvili, J. N. *Academic Press* **2011**
- (107) Meschede, D.; Vogel, H. *Gerthsen Physik*; Springer Verlag: Berlin, 2006.
- (108) Sivia, D. S. *Elementary Scattering Theory For X-Ray and Neutron Users*; Oxford University Press Inc.: United States, 2011.
- (109) Russell, T. P. *X-Ray and neutron reflectivity for the investigation of polymers*; Elsevier Science Publisher B. V.: North-Holland, 1990.
- (110) Press, W.; Tolan, M. *Institut für Experimentalphysik, Universität Kiel* **1999**
- (111) Gibaud, A.; Vignaud, G. In *X-ray and Neutron Reflectivity*; Specular Reflectivity from Smooth and Rough Surfaces; Daillant, J., Gibaud, A., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2009; Vol. 770.
- (112) Nelson, A. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 273-276.
- (113) Tompkins, H. G. *A user's guide to ellipsometry*; Academic Press Inc.: Boston, 1993.
- (114) [http://www.jawoollam.com/tutorial\\_1.html](http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html) (12.09.2014).
- (115) Mironov, V. L. *Fundamentals of Scanning Probe Microscopy*; The Russian Academy of Science: Nizhniy Novgorod, 2004.
- (116) Winter, R.; Noll, F. *Methoden der biophysikalischen Chemie*; Teubner: Stuttgart, 1998.
- (117) Mennicke, U.; Salditt, T. *Langmuir* **2002**, *18*, 8172-8177.
- (118) Rehfeldt, F.; Steitz, R.; Armes, S. P.; Klitzing, R. v.; Gast, A. P.; Tanaka, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9171-9176.
- (119) Strobl, M.; Steitz, R.; Kreuzer, M.; Rose, M.; Herrlich, H. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 1.
- (120) Strobl, M.; Steitz, R.; Kreuzer, M.; Nawara, A.; Mezei, F.; Rose, M.; Amitesh, P.; Grunze, M.; Dahint, R. *J. Phys. Conf. Ser.* **2010**, *251*
- (121) van Well, A. A. *Physica B* **1992**, *180 & 181*, 959 - 961.
- (122) Cubitt, R.; Fragneto, G. *Appl. Phys. A* **2002**, *74*, S329-S331.
- (123) Mezei, F.; Golub, M.; Klose, F.; Toews, H. *Physica B* **1995**, *213&214*, 898-900.
- (124) Max-Planck-Institut für Festkörperforschung et al. (2015). NREX: Neutron reflectometer with X-ray option. Journal of large-scale research facilities, 1, A38.
- (125) Strickert E. (HZB) [https://www.helmholtz-berlin.de/media/media/oea/bildarchiv/forschung/neutronen/v18\\_bioref\\_hzb.jpg](https://www.helmholtz-berlin.de/media/media/oea/bildarchiv/forschung/neutronen/v18_bioref_hzb.jpg) (23.05.2017).
- (126) Jellison, G. E.; Chisholm, M. F.; Gorbatskin, S. M. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62*, 3348-3350.

- (127) Caffrey, M.; Hogan, J. *Chemistry and Physics of Lipids* **1992**, *61*, 1-109.
- (128) Kell, H. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2006.
- (129) Naumann, C.; Brumm, T.; Bayerl, T. M. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1314-1319.
- (130) Fidorra, M.; Heimburg, T.; Seeger, H. M. *BBA* **2009**, *1788*, 600-607.
- (131) Guard-Friar, D.; Chen, C.-H.; Engle, A. S. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1810-1813.
- (132) Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2000**, 1806-1815.
- (133) Simonsen, A. C.; Bagatolli, L. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 9720-9728.
- (134) Yamada, N. L.; Torikai, N.; Nakai, T.; Hishida, M.; Sakurai, K.; Seto, H. *Physica B* **2006**, *385-386*, 719 -721.
- (135) Perino-Gallice, L.; Fragneto, G.; Mennicke, U.; Salditt, T.; Rieutord, F. *Eur. Phys. J. E* **2002**, *8*, 275-282.
- (136) Smith, G. S.; Sirota, E. B.; Safinya, C. R.; Plano, R. J.; Clark, N. A. *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 4519-4529.
- (137) Tristram-Nagle, S.; Liu, Y.; Legleiter, J.; Nagle, J. F. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3324-3335.
- (138) Edwards, D. F.; Ochoa, E. *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 4130-4131.
- (139) Hale, G. M.; Querry, M. R. *Appl. Opt.* **1973**, *12*, 555-563.
- (140) Suh, J.; Paik, H. J.; Hwang, B. K. *Bioorg. Chem.* **1994**, *22*, 318-327.
- (141) Fanun, M. *Colloids in Biotechnology*; CRC Press, 2010.
- (142) Pabst, G.; Hodzic, A.; Strancar, J.; Danner, S.; Rappolt, M.; Laggner, P. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2688-2696.
- (143) Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Harries, D.; Kucerka, N.; Nagle, J. F.; Parsegian, V. A. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 302-309.
- (144) Gurtovenko, A. A.; Vattulainen, I. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1953-1962.
- (145) Petelska, A. D.; Figaszewski, Z. A. *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 812-817.
- (146) Smith, M. B.; McGillivray, D. J.; Genzer, J.; Lösche, M.; Kilpatrick, P. K. *Soft Matter* **2010**, *6*, 862-865.
- (147) Anderson, T. H.; Min, Y.; Weirich, K. L.; Zeng, H.; Fygenon, D.; Israelachvili, J. N. *Langmuir* **2009**, *25*, 6997-7005.
- (148) Petrache, H. I.; Gouliarov, N.; Tristram-Nagle, S.; Zhang, R.; Suter, R. M.; Nagle, J. F. *Physical Review E* **1998**, *57*, 7014-7024.
- (149) Hübner, W.; Mantsch, H. H. *Biophys. J.* **1991**, *58*, 1261-1272.
- (150) Schwörer, F.; Trapp, M.; Ballauff, M.; Dahint, R.; Steitz, R. *Langmuir* **2015**, *31*, 11539-11548.
- (151) Cheng, Y.; Boden, N.; Bushby, R. J.; Clarkson, S.; Evans, S. D.; Knowles, P. F.; Marsh, A.; Miles, R. E. *Langmuir* **1998**, *14*, 839-844.
- (152) Hanasaki, I.; Walther, J. H.; Kawano, S.; Koumoutsakos, P. *Physical Review E* **2010**, *82*, 051602.
- (153) Khoshnood, A.; Noguchi, H.; Gompper, G. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *132*, 025101.
- (154) Schünke, M. *Funktionelle Anatomie - Topographie und Funktion des Bewegungssystems*; Thieme, 2000.
- (155) Fragneto, G.; Lu, J. R.; McDermott, D. C.; Thomas, R. K.; Rennie, A. R.; Gallagher, P. D.; Satija, S. K. *Langmuir* **1996**, *12*, 477-486.
- (156) Lu, J. R.; Lee, E. M.; Thomas, R. K.; Penfold, J.; Flitsch, S. L. *Langmuir* **1993**, *9*, 1352-1360.
- (157) McDermott, D. C.; Lu, J. R.; Lee, E. M.; Thomas, R. K.; Rennie, A. R. *Langmuir* **1992**, *8*, 1204-1210.
- (158) Sears, V. F. *Neutron News* **1992**, *3*, 26-37.

## Literaturverzeichnis

---

- (159) Eisenblätter, J.; Winter, R. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 956-966.
- (160) Harroun, T. A.; Nieh, M.-P.; Watson, M. J.; Raghunathan, V. A.; Pabst, G.; Morrow, M. R.; Katsaras, J. *Phys. Rev. E* **2004**, *69*
- (161) Izumitani, Y. *J. Colloid Interf. Sci.* **1996**, *182*, 6-16.
- (162) Toperverg, B. P. *Physica B: Condensed Matter* **2001**, *297*, 160-168.
- (163) Schiraldi, C.; Stellavato, A.; de Novellis, F.; La Gatta, A.; De Rosa, M. *Clin Cases Miner Bone Metab* **2016**, *13*, 36-7.
- (164) Hunter, W. *Philosophical Transactions* **1742**, *42*, 514-521.
- (165) Jung, S.; Petelska, A.; Beldowski, P.; Auge, W. K., 2nd; Casey, T.; Walczak, D.; Lemke, K.; Gadomski, A. *Colloid. Polym. Sci.* **2017**, *295*, 403-412.
- (166) Abubacker, S.; Dorosz, S. G.; Ponjevic, D.; Jay, G. D.; Matyas, J. R.; Schmidt, T. A. *Annals of biomedical engineering* **2015**
- (167) Li, F.; Wang, A.; Wang, C. *Journal of materials science. Materials in medicine* **2016**, *27*, 87.
- (168) Lin, H. R.; Wang, S. H.; Chiang, C. C.; Juang, Y. C.; Yu, F. A.; Tsai, L. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **2015**, *26*, 534-44.

## 7. Anhang

### 7.1. Kurven aus IR-, XRR und NR-Messungen

7.1.1. NR-Kurven, ihre Fits und die dazugehörigen SLDs aus den Schermessungen

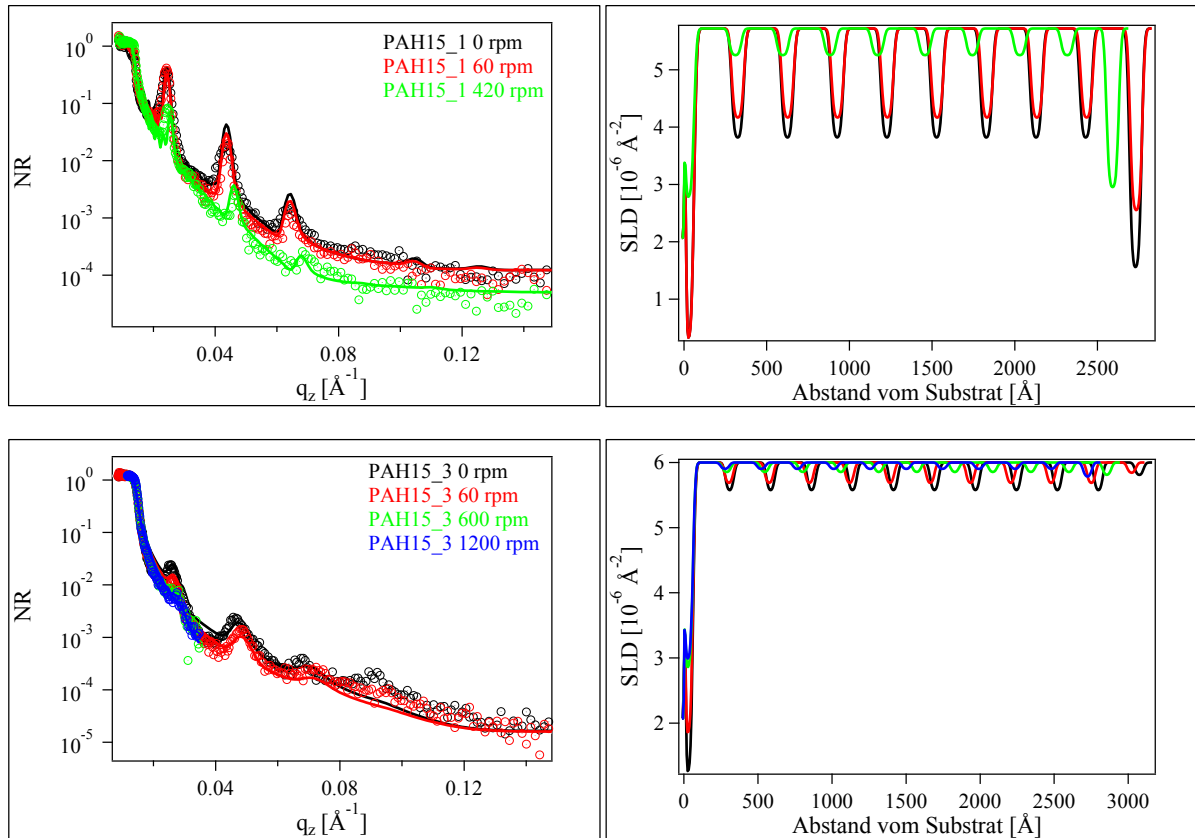


Abb. 7.1: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 15 kDa. Proben von oben nach unten: PAH15\_1 und PAH15\_3.

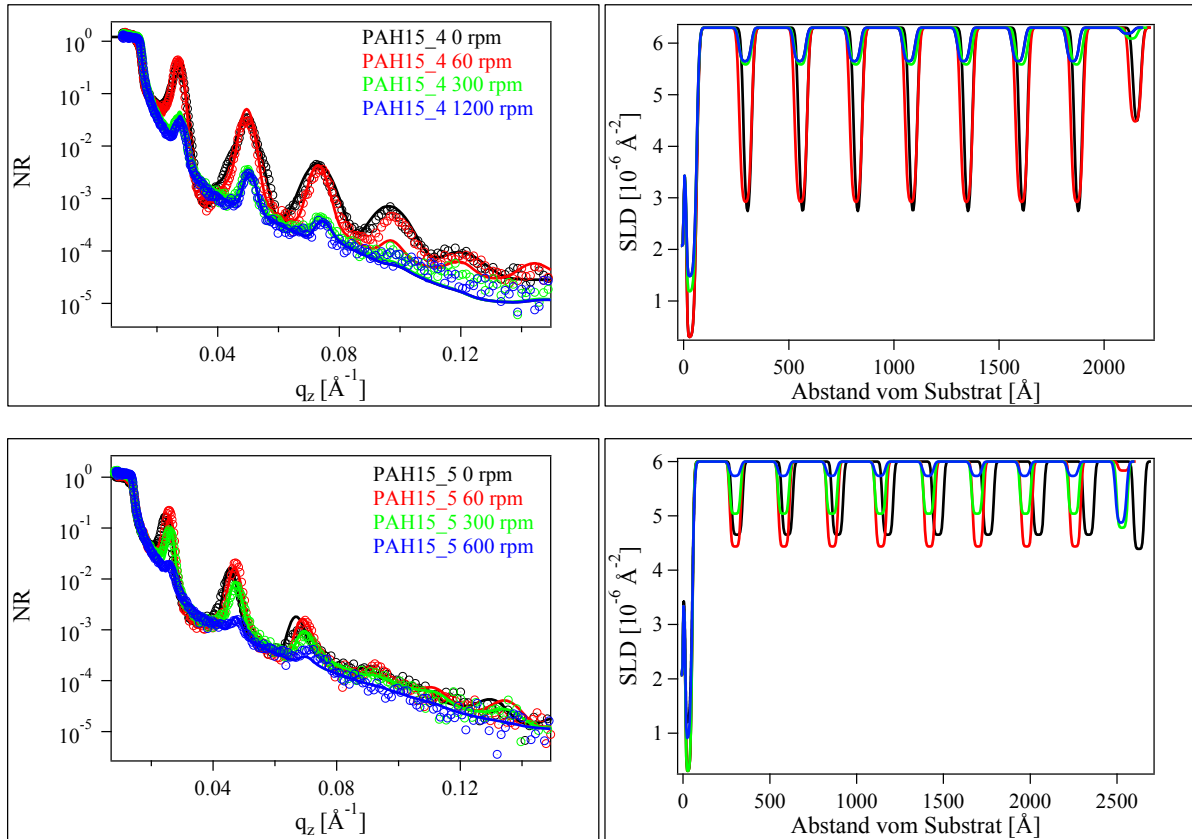


Abb. 7.2: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 15 kDa. Proben von oben nach unten: PAH15\_4 und PAH15\_5.



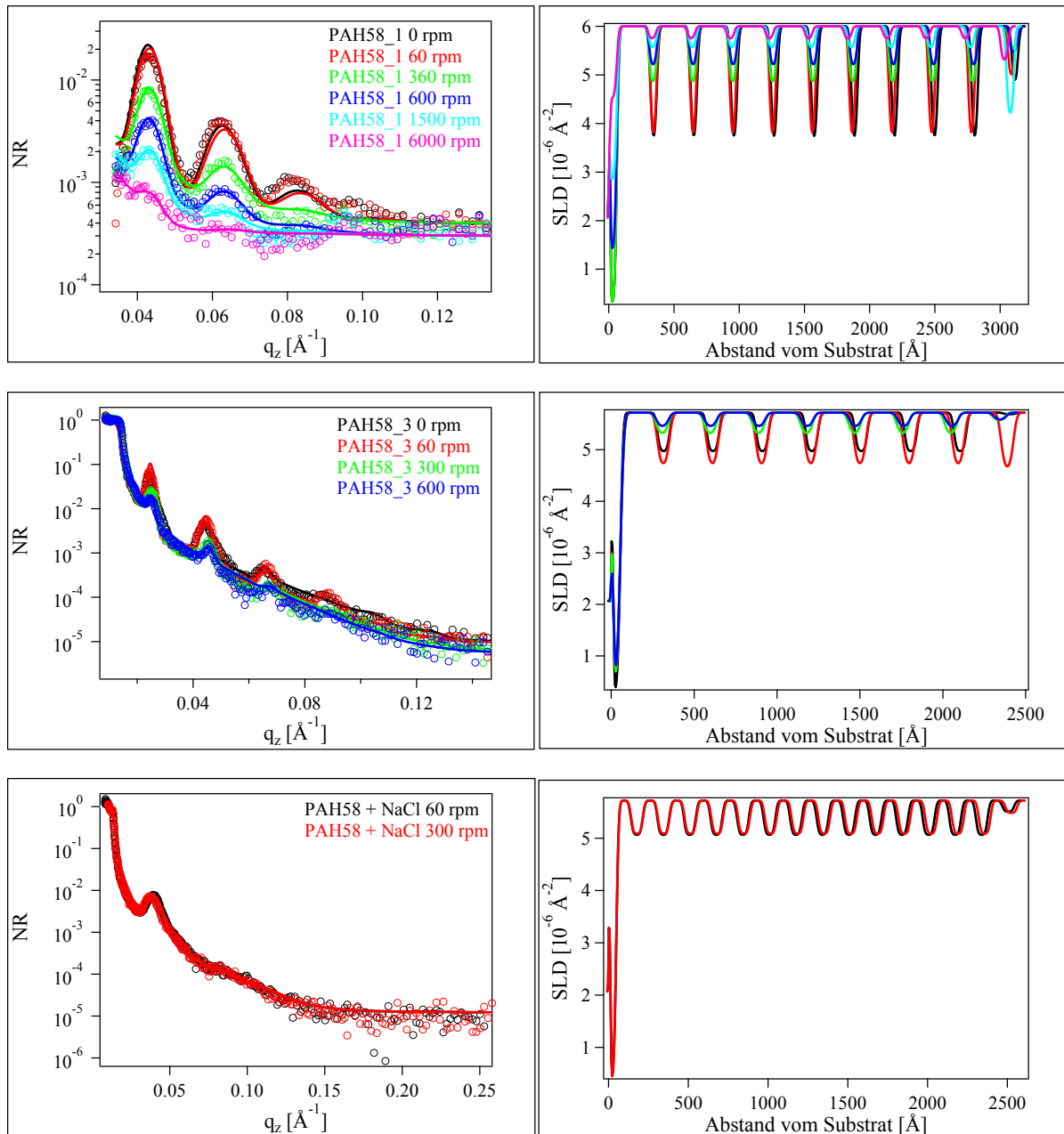


Abb. 7.3: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 58 kDa. Von oben nach unten: PAH58\_1, PAH58\_3, PAH58 + NaCl (154 mM).

# Anhang

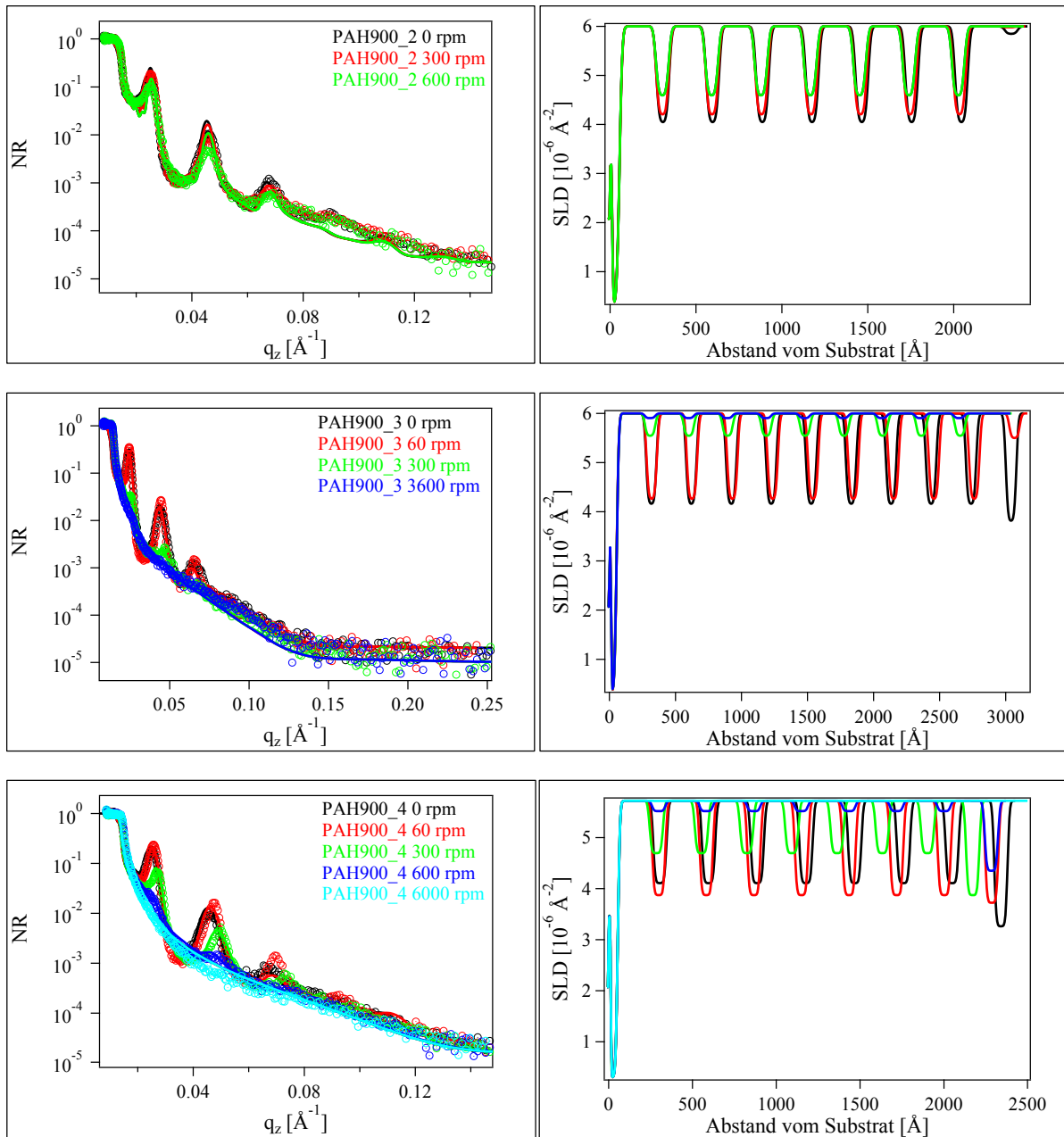


Abb. 7.4: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 900 kDa. Von oben nach unten: PAH900\_2, PAH900\_3, PAH900\_4.

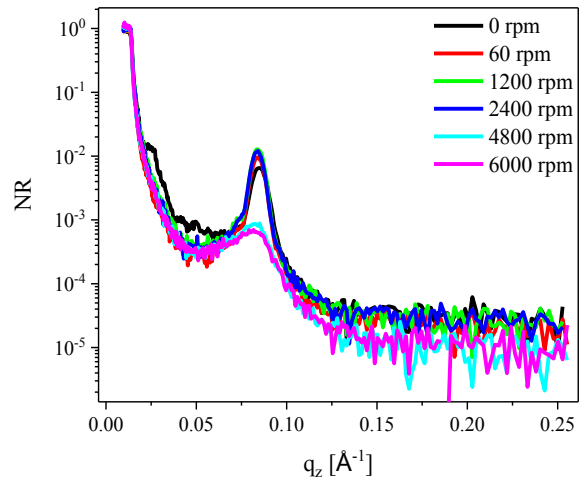


Abb. 7.5: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für in wässrigen HS-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die Messungen für ein MW von 769 kDa (HS769).

## 7.1.2. IR-Messungen aus den Scherversuchen

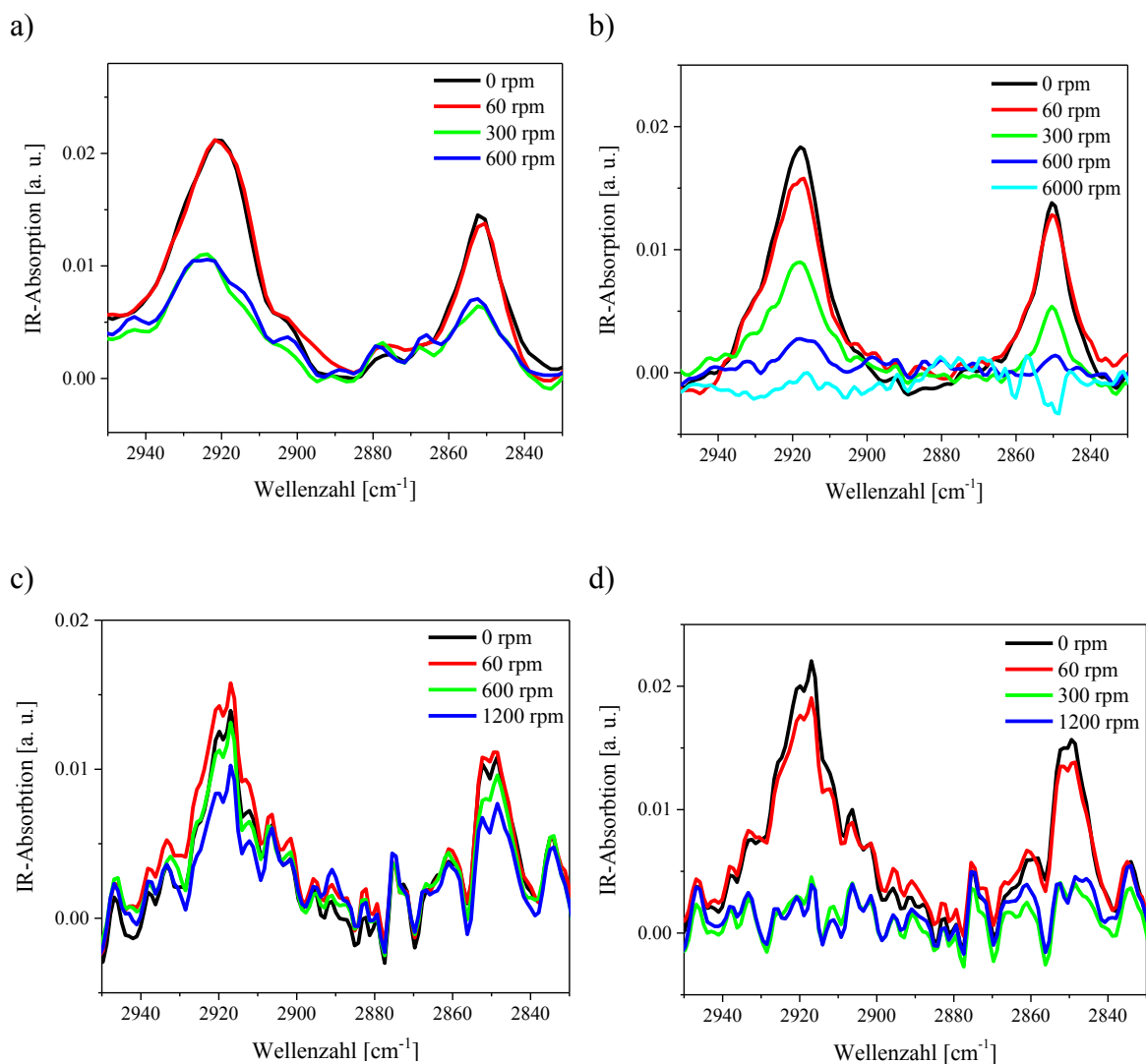


Abb. 7.6: IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen unter Scherung. Inkubiert wurde in wässrigen PAH-Lösungen mit einem MW von 15 kDa. Proben wie folgt: a) PAH15\_1, b) PAH15\_3, c) PAH15\_4 und d) PAH15\_5.

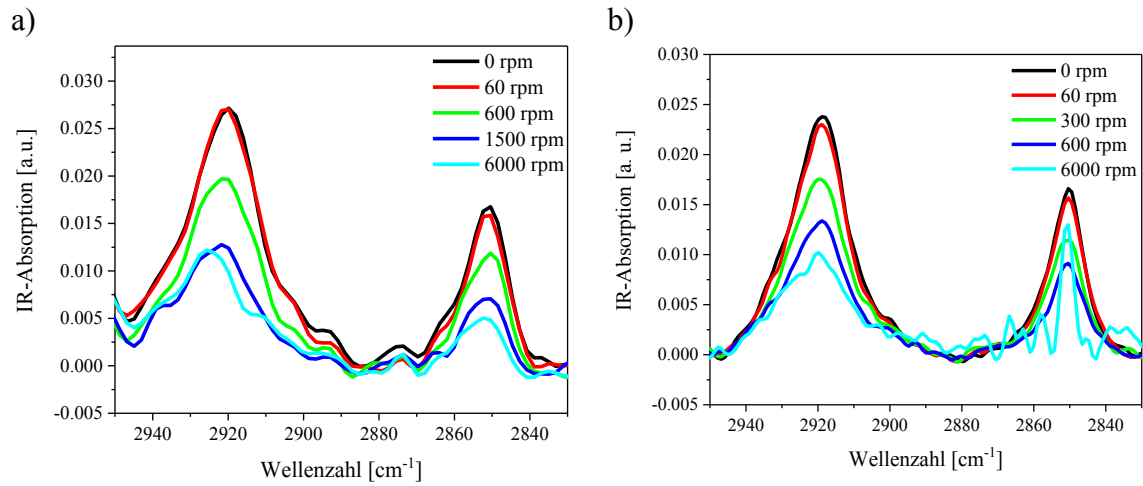


Abb. 7.7: IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen unter Scherung. Inkubiert wurde in wässrigen PAH-Lösungen mit einem MW von 58 kDa. Proben wie folgt: a) PAH58\_1 und b) PAH58\_3.

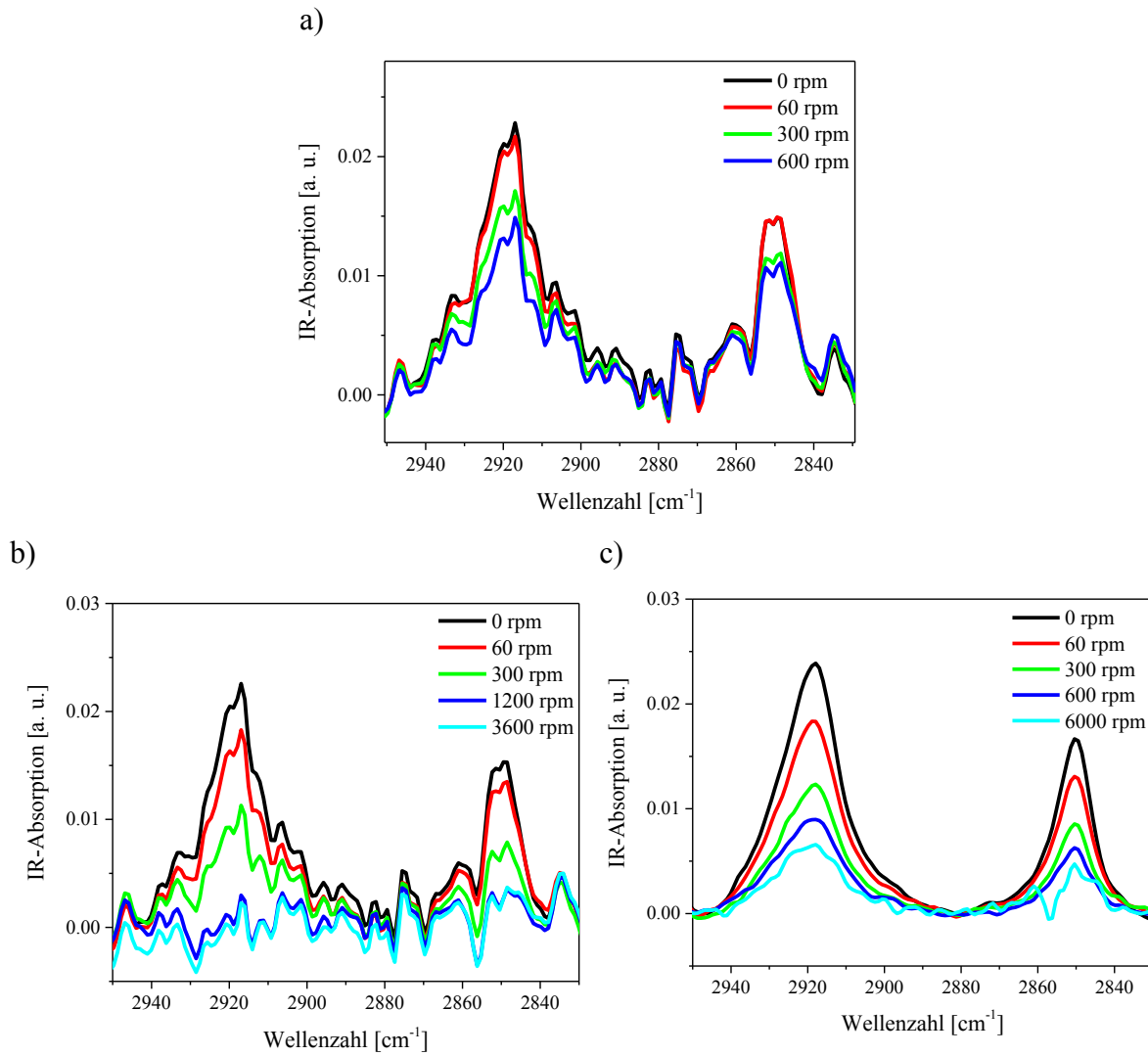


Abb. 7.8: IR-Intensitäten der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen inkubiert in wässrigen PAH-Lösungen mit einem MW von 900 kDa. Proben wie folgt: a) PAH900\_2, b) PAH900\_3 und c) PAH900\_4.

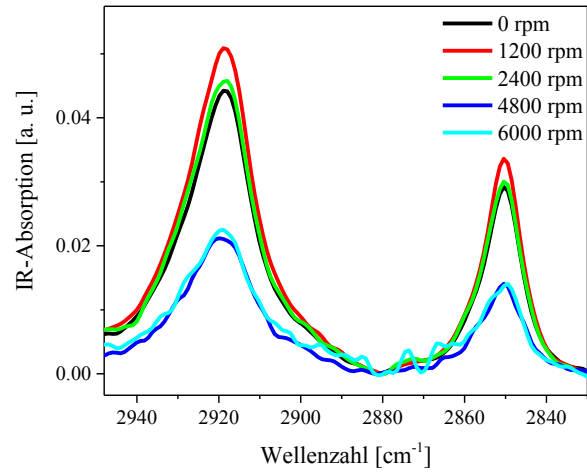


Abb. 7.9: IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen inkubiert in wässrigen HS-Lösungen mit einem MW von 15 kDa. Proben wie folgt: IR-Kurven von DMPC-Oligolagen inkubiert in HS-Lösungen mit MW 769 kDa (HS769).

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie (Engl. Atomic Force Microscopy)
APC	Angewandten Physikalischen Chemie der Universität Heidelberg
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (Engl. Attenuated Total Reflection)
DLVO-Theorie	Theorie ist benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (Engl. Differential Scanning Calorimetry)
DTGS	Deutertes Triglycinsulfat
FT	Fourier Transform
HMLZ	Heinz Maier-Leibnitz Zentrum
HS	Hyaluronsäure
ILL	Institut Laue-Langevin
IR	Infrarot
HZB	Helmholtz-Zentrum-Berlin
MCT	Quecksilber (Engl. Mercury)-Cadmium-Tellurid
MIR	Mittleres Infrarot
MSE	Mittlere Quadratische Fehler (Engl. Mean Square Error)
MW	Molekulargewicht (Engl. Molecular Weight)
NR	Neutronenreflektivität(s)/Neutronenreflexion(s)
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PE	Polyelektrolyt
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglycol
PL	Phospholipid
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylserin
PSS	Natriumsalz der Polystyrolsulfonsäure
PSI	Paul Scherrer Institut
RCA-Reinigung	Reinigungsprozess wurde im Auftrag der Radio Corporation of America entwickelt
RH	Relative Luftfeuchtigkeit (Engl. Relative Humidity)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Engl. Revolutions per Minute)
SLD	Streulängendichte



## Anhang

---

TOF	Flugzeit (Engl. Time of Flight)		
XRR	Röntgenreflektivität(s)/Röntgenreflexion(s) Reflectivity)	(Engl.	X-Ray

## 7.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2.1: Skizze eines Scharniergelenks (Ellbogen) <sup>12</sup> und schematische Darstellung eines Gelenks. Im Gelenkspalt befindet sich die Synovialflüssigkeit. Die Knochen sind von einer Knorpelschicht umgeben, welche wiederum mit einer Lipidschicht bedeckt ist.....	8
Abb. 2.2: Klassisches Stribeck-Diagramm. Der Reibungskoeffizient $\mu$ ist in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit dargestellt. <sup>14</sup> Der Wertebereich für ein Säugetiergelenk ist gemäß der Literatur gekennzeichnet. <sup>7</sup> .....	9
Abb. 2.3: Mögliche Strukturen der PLs in wässriger Lösung. a) Zwei Lipiddoppelschichten übereinander, b) Mizellen und c) multilamellare Vesikel.....	12
Abb. 2.4: a) Glycerophospholipide und b) Sphingophospholipide. Die Grundstrukturen Glycerin und Sphingosin sind umrahmt. ....	13
Abb. 2.5: Struktur von 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DPPC). Die Glycerin-Grundstruktur ist umrahmt. ....	13
Abb. 2.6: Phasendiagramm von DMPC in Abhängigkeit des Wassergehalts und der Temperatur. Die Abbildung wurde der Literatur entnommen. <sup>47</sup> .....	15
Abb. 2.7: Dynamische differenzkalorimetrische Messungen an DPPC. Die gestrichelte Linie zeigt die Änderung der spezifischen Wärmekapazität und die durchgezogene Linie stellt die Änderung der Enthalpie dar. Die Abbildung wurde der Literatur entnommen. <sup>48</sup> .....	15
Abb. 2.8: Strukturformel von DMPC. Die Glycerin-Grundstruktur ist umrahmt. ....	16
Abb. 2.9: Monomereinheit der HS. Sie besteht aus einer 1,3-glycosidischen Bindung von <i>D</i> -Glucuronsäure mit <i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -glucosamin.....	17
Abb. 2.10: Strukturformeln der Monomere der polymeren Ersatzstoffe für HS. Dargestellt sind a) das Natriumsalz der Polystyrolsulfonsäure (PSS), b) das Polyethylenimin (PEI) und c) das Polyallylaminhydrochlorid (PAH). ....	18
Abb. 2.11: Darstellung des Knäuel-Modells eines Polymers. ....	18
Abb. 2.12: Vereinfachtes Modellsystem eines Gelenkteils. Silicium repräsentiert den Knochen. Es ist wie in natürlichen Gelenken mit Lipid-Oligoschichten bedeckt, jedoch fehlt der Knorpel. Die Synovialflüssigkeit wird durch eine wässrige HS- oder PE-Lösung ersetzt. ....	21
Abb. 2.13: Lipid-Oligoschichten nach Zugabe von Wasser (links) und wässrigen HS-Lösungen (rechts). Die HS bewirkt eine starke Quellung der Lipid-Schichten. Dies wurde auf ein Ausdehnen der wässrigen Zwischenschichten zurückgeführt. ....	23
Abb. 2.14: Skizze einer elektrostatischen Doppelschicht. Die hier positive Ladung der Oberfläche induziert die Bildung einer starren Helmholtz-Schicht und eines diffusen Anteils. Die Hydrathülle ist in Rot dargestellt.....	26

Abb. 2.15: Skizze zweier Lipid-Bilagen im Abstand $d_0 = d + 2\delta$ voneinander. Die Kationen werden von den Bilagen adsorbiert, während die Anionen weiterhin verteilt vorliegen. Aus der Adsorption resultieren eine Oberflächenladungsdichte $\sigma$ und ein Oberflächenpotential $\phi_0$ .	26
Abb. 2.16: Interne Reflexion. Licht trifft vom optisch dichteren auf ein optisch dünneres Medium. Rot und hellblau stellen Totalreflexion dar, während der grüne Strahl teilweise reflektiert (nicht dargestellt) und transmittiert wird.	28
Abb. 2.17: Geometrie der Reflexion einer parallel polarisierten Welle mit $k$ als Wellenvektor.	30
Abb. 2.18: Streugeometrie einer idealen, glatten Oberfläche. Der Impulsübertrag steht senkrecht zur Oberfläche. $z$ bezeichnet die Richtung der Oberflächennormalen.	32
Abb. 2.19: Streugeometrie an dünnen Filmen mit $n_0 < n_1 < n_2$ . Konstruktive Interferenz der Reflexionen führen zu Kiessig-Oszillationen mit einer Intensität $I(\alpha)$ .	33
Abb. 2.20: Schematischer Aufbau eines FTIR mit Michelson-Interferometer.	35
Abb. 2.21: Kombinationen von orthogonalen Wellen zur Veranschaulichung von Polarisation. Mit freundlicher Genehmigung von Florian Salopiata. Die Abbildung zeigt: (a) linear, (b) zirkular und (c) elliptisch polarisiertes Licht.	37
Abb. 2.22: Reflexion und Transmission eines Films auf einem Substrat.	38
Abb. 2.23: a) Funktionsprinzip eines AFMs und b) Lennard-Jones-Potential. Gezeigt sind verschiedene Modi der AFM-Messung in Abhängigkeit vom Abstand zur Probe. $R_0$ bezeichnet dabei den Gleichgewichtsabstand.	40
Abb. 3.1: Vorgehensweise bei der Lipid-Beschichtung mittels Spin-Coater- und Airbrush-Methode. a) Oligolamellare Schichten wurden mittels Spin-Coater erhalten. Das Substrat wurde zunächst vollständig mit der jeweiligen DMPC-Lösung bedeckt und dann bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 4000 rpm beschichtet. b) Multilamellare Beschichtungen erfolgten mithilfe der Airbrush-Technik. Die DMPC-Lösung wurde mit einem konstanten Stickstoffstrom auf das Substrat gesprüht.	46
Abb. 3.2: Luftfeuchtigkeitszelle für Röntgenreflektivitätsmessungen in Berlin. Die Feuchtigkeit kann über die Füllung des Gefäßes kontrolliert werden. Die Probe ist auf einen Objektträger gespannt und der Strahl wird durch zwei Kaptonfenster geleitet. a) Foto der Feuchtigkeitszelle und b) schematische Skizze des Schnitts durch die Zelle.	47
Abb. 3.3: Aufbauskitze des V18 am HZB in Berlin. Bildquelle: HZB / E. Strickert. <sup>125</sup> Es handelt sich dabei um ein TOF-Reflektometer. Das Chopper-System ermöglicht eine zeit- und geschwindigkeitsaufgelöste Detektion von Neutronen. Der von links einfallende Neutronenstrahl trifft auf die Probe, welche mit einem Goniometer unter verschiedenen Winkel positioniert kann, und wird dann auf einen Positions-sensitiven Detektor gelenkt.	48
Abb. 3.4: IR-Strahlengang durch den ATR-Kristall aus Silicium.	49

Abb. 3.5: a) Schematische Darstellung der Flusszelle und (b, c) der Scherzelle. Beide Zellen ermöglichen eine zeitgleiche Erhebung von NR- und IR-Daten. Die jeweiligen Strahlengänge sind für IR-Strahlung in Rot und für NR-Strahlung in Grün eingezeichnet. Mit der Scherzelle können Scherraten zwischen 0 - 6000 rpm realisiert werden. Ein Schnitt durch die Scherzelle ist in b) zu sehen. ....	50
Abb. 3.6: Apparativer Aufbau eines Ellipsometers mit rotierendem Analysator. Die Polarisationssebene des Lichts ist in Rot dargestellt. ....	51
Abb. 3.7: Schnitt durch die Flüssigzelle für Kinetikmessungen unter Flüssigkeit am Ellipsometer. Der Zufluss befindet sich mittig am Fuß der Flusszelle und ist durch den Schnitt nicht zu sehen. ....	52
Abb. 4.1: DSC-Messung an DMPC. Aufgetragen ist die Wärmekapazität gegen die Temperatur. DMPC der Konzentration 1 mM wurde in Lösung gebracht und bei einer Heizrate von 20 °C pro Stunde gegen Wasser gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit Microcal Origin der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland). ....	56
Abb. 4.2: DSC-Messungen an undeutertem und deutertem DMPC. Aufgetragen ist die Wärmekapazität gegen die Temperatur. DMPC wurde in einer Konzentration von 0.3 mM für das deuterte DMPC und 1 mM für das undeuterte DMPC in Lösung gebracht und bei einer Heizrate von 20 °C pro Stunde gegen Wasser gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit Microcal Origin der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland). ....	57
Abb. 4.3: a) AFM-Messung und b) Höhenprofile einer rotationsbeschichteten Probe. Verwendet wurde eine DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L. Der Kratzer (linke Seite, obere Ecke) sollte die Bestimmung der Schichtdicke ermöglichen. An der Grenzfläche des Kratzers zur Probe wurde jedoch Lipid aufgehäuft, so dass hier eine erhöhte Schichtdicke ermittelt wurde. Eine Beschädigung des Substrats durch den Kratzer führt auch außerhalb der Lipid-Anhäufung zu erhöhten Werten der Schichtdicken. Anhand der Löcher im Inneren des Films konnte eine Dicke von etwa 80 nm ausgelesen werden (s. Höhenprofil 2). ....	58
Abb. 4.4: a), c) AFM-Messungen und b), d) Höhenprofile einer rotationsbeschichteten Probe. Verwendet wurde eine DMPC-Lösung der Konzentration 5 g/L. Vermessen wurde die Probe direkt nach der Präparation (a, b) und nach 16 Tagen bei Lagerung unter 100 %iger Luftfeuchtigkeit (c, d). ....	59
Abb. 4.5: a) Intensität des XRR-Signals in Abhängigkeit von $q_z$ für die Probe PAH900_1 (s. 4.5) und b) Auftragung der Positionen der Kiessig-Oszillationen in Abhängigkeit ihrer Ordnung. Positionsbestimmungen der Kiessig-Oszillationen und des Bragg-Peaks erfolgten über eine Regression mit einer Gauß-Funktion. Die zugehörigen Funktionen sind für den Bragg-Peak in Rot und für die Kiessig-Oszillationen in Grün dargestellt. Aus den Positionen ergeben sich die Gesamtschichtdicke der Probe und der lamellare Abstand. Die Probe wurde mit einer DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L rotationsbeschichtet. ....	61

- Abb. 4.6: XRR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für Proben variierender Lipid-Bilagenanzahl. Die Proben wurden rotationsbeschichtet. Die Konzentrationen variierten zwischen 0.1 und 10 g/L. Multilagen wurden mit der Airbrush-Technik aufgebracht. Es werden Bragg-Peaks erster und höherer Ordnung gezeigt. ....62
- Abb. 4.7: XRR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  für eine Probe in unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit. Verwendet wurde eine rotationsbeschichtete Probe. Die Konzentration der verwendeten DMPC-Lösung betrug 10 g/L. Zur Erzeugung unterschiedlicher RH wurde die Probe in eine Luftfeuchtigkeitszelle gespannt (s. 3.3.1). Der Behälter der Zelle wurde je nach benötigter RH unterschiedlich befüllt. Wasser erzeugte eine nahezu 100 %ige RH, während Phosphorpentoxid die RH auf 0 % reduzierte. Die RH im Raum betrug etwa 26 %. ....63
- Abb. 4.8: Bezeichnung der verschiedenen Schichtdicken. ....64
- Abb. 4.9: Quellkinetik von DMPC-Oligolagen in reinem Wasser. Aufgetragen sind die Schichtdicke und der Brechungsindex  $A$  in Abhängigkeit von der Zeit, welche über ein Cauchy-Modell berechnet wurden. ....65
- Abb. 4.10: Angenommene Vorgänge während des Quellvorgangs. a) Die trockene Probe wird b) in Wasser inkubiert. Die oberste Monolage löst sich und wird c) teilweise abgetragen. In d) ist die gesamte Monolage abgetragen. ....66
- Abb. 4.11: Quellkoeffizienten von PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der HS-Konzentration. Gezeigt sind die aus ellipsometrischen Messungen erhaltenen Daten in Schwarz bzw. Grün (HS 769 kDa) und der Literaturwert<sup>54-55</sup> in Rot (769 kDa). ....67
- Abb. 4.12: Ellipsometrisch gemessene Quellkinetik von DMPC-Oligolagen bei Zugabe von einer wässrigen Lösung aus PSS der Konzentration 1 g/L (4.8 mM). Aufgetragen sind die Schichtdicke und der Brechungsindex  $A$  in Abhängigkeit von der Zeit. Direkt nach PSS-Zugabe konnte keine Messung durchgeführt werden, da das System erst kalibriert werden musste. Erst nach etwa 3 Minuten erfolgte die erste Messung. Die Messpunkte sind zur besseren Veranschaulichung verbunden. ....68
- Abb. 4.13: Quellkoeffizienten von PL-Oligolagen aus ellipsometrischen Messungen in Abhängigkeit von der PSS-Konzentration (1 MDa). ....69
- Abb. 4.14: Ellipsometrisch gemessene Quellkinetik von DMPC-Oligolagen nach Zugabe einer wässrigen Lösung aus PAH mit dem MW 15 kDa und der Konzentration 10 g/L. Aufgetragen sind die Schichtdicke und der Brechungsindex  $A$  in Abhängigkeit von der Zeit. Direkt nach PAH-Zugabe konnte keine Messung durchgeführt werden, da das System erst kalibriert werden musste. Erst nach etwa 6 Minuten erfolgte die erste Messung. Die Messpunkte sind zur besseren Veranschaulichung verbunden. ....70
- Abb. 4.15: Quellkoeffizient aus ellipsometrischen und NR-Messungen in Abhängigkeit von der Konzentration. Verwendet wurde PAH mit einem MW von 15 kDa. a) Ellipsometrische Messungen: Jede Konzentration beinhaltet zwischen 1 und 8 Messungen, über welche gemittelt wurde. Der angegebene Fehler stammt aus der

Standardabweichung. Für die Konzentrationen 0.02, 0.08 und 0.10 M existiert jeweils nur eine Messung. b) Lamellarer Abstand aus NR-Messungen in Abhängigkeit von der Konzentration. Beide Messreihen erfolgten an der gleichen Probe. Zunächst wurde die PAH-Konzentration erhöht (schwarze Datenpunkte). In einem weiteren Schritt erfolgten Verdünnungen der Lösung (rote Datenpunkte). Die Fehler ergeben sich aus der Mittelung der lamellaren Abstände, welche aus den Bragg-Peaks errechnet wurden. c) Ellipsometrische und NR-Messungen im Vergleich. Die Quellkoeffizienten ergaben sich aus der Normierung auf die trockene Probe für ellipsometrische Messungen bzw. auf den Literaturwert des lamellaren Abstands einer trockenen Probe von 53 Å für NR-Messungen. .... 71

Abb. 4.16: NR-Kurven für verschiedene PAH-Konzentrationen (15 kDa). Mit abnehmender Konzentration verschieben sich die Bragg-Peaks nach links. Für die höheren Konzentrationen ist jeweils nur der vorderste noch sichtbare Bragg-Peak dargestellt. .... 72

Abb. 4.17: NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) für DMPC-Oligolagen inkubiert in PAH (MW 15 kDa) unterschiedlicher Konzentration. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal gegeneinander verschoben. .... 74

Abb. 4.18: Aus den Fits erhaltene Parameter der PAH-induzierten Quellung von DMPC-Oligolagen. Gezeigt sind a) die Schichtdicken der wässrigen Zwischenschicht, b) der jeweilige Wassergehalt der DMPC-Lagen, c) die Schichtdicke der adsorbierten PAH-Schicht und d) der zugehörige Wassergehalt dieser adsorbierten Schicht. .... 75

Abb. 4.19: Schematische Darstellung der Lipidschichten in stark gequollenen Systemen. Die Lipidlagen sind nicht mehr parallel angeordnet sondern liegen stufenweise versetzt vor. .... 76

Abb. 4.20: IR-Spektren der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen bei verschiedenen PAH-Konzentrationen (15 kDa). .... 77

Abb. 4.21: a) Schichtdicke und IR-Intensität in Abhängigkeit vom Substratabstand für schwach (oben) und stark (unten) gequollene Filme und b) Gesamtintegral der IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen. Gezeigt sind die auf die D<sub>2</sub>O-Messung normierten Gesamtintegrale der experimentellen und berechneten Werte (für 12 Bilagen, in Rot) in Abhängigkeit von der PAH-Konzentration (15 kDa). Außerdem sind Berechnungen für 11, 7 und 4 Bilagen gezeigt. .... 78

Abb. 4.22: Quellkoeffizienten aus ellipsometrischen Messungen von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit der PEI-Konzentration (25 kDa). .... 82

Abb. 4.23: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der PSS-Konzentration für verschiedene MWs. .... 83

Abb. 4.24: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der PAH-Konzentration für verschiedene MWs. .... 84

- Abb. 4.25: Lamellare PL-Abstände aus NR-Experimenten bei Zugabe von 0.03 M (3 g/L) PAH mit verschiedenem MW (15, 58 und 900 kDa) für jeweils bis zu 4 Proben. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aller Proben an.....85
- Abb. 4.26: Balkendiagramm für die Startkonzentration, welche nötig ist um eine Quellung der Lipidlagen zu induzieren. Für PAH wurden 3 MWs mit 15, 58 und 900 kDa verwendet. PSS war mit MWs von 70 kDa und 1 MDa verfügbar. Eine mit dem MW von 15 kDa vergleichbare Größe war nicht erhältlich. ....86
- Abb. 4.27: Messungen an DMPC-Oligolagen bei Zugabe von NaCl. Abgebildet sind a) Quellkoeffizienten aus den ellipsometrische Messungen, b) NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  und c) IR-Messungen der CH<sub>2</sub>-Schwingungsbanden.....88
- Abb. 4.28: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit von der NaCl- und der KCl-Konzentration. Gezeigt sind 2 bzw. 3 Messreihen für KCl und NaCl. ....89
- Abb. 4.29: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten von DMPC-Oligolagen in Abhängigkeit von der Konzentration der zweiwertigen Ionen Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup>.....90
- Abb. 4.30: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten in Abhängigkeit von der NaCl- bzw. von der HS-Konzentration. Es wurde HS mit einem MW von 769 kDa verwendet. Die Zugabe von NaCl erfolgte nach der Messung in reiner HS mit der Konzentration 2.5 mM.....91
- Abb. 4.31: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten bei variierender PSS- (70 kDa), NaCl- und KCl-Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PSS-Konzentration konstant bei 15 mM gehalten. ....92
- Abb. 4.32: Ellipsometrisch bestimmte Quellkoeffizienten bei variierender PSS- (70 kDa) bzw. CaCl<sub>2</sub>-Konzentration. Für die CaCl<sub>2</sub>-Zugabe sind zwei verschiedene Messreihen gezeigt. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PSS-Konzentration konstant bei 5 mM gehalten. ....93
- Abb. 4.33: Ellipsometrische Messungen zum Quellverhalten der PL-Oligolagen bei Zugabe von PAH (15 kDa) und NaCl. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten.....94
- Abb. 4.34: a) NR-Messungen zum Quellverhalten der PL-Oligolagen bei Zugabe von PAH (58 kDa) und NaCl. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten. Mit zunehmender NaCl-Konzentration schieben die Bragg-Peaks nach rechts. Es ist jeweils nur der erste Bragg-Peak dargestellt. b) Auftragung der lamellaren Schichtdicke gegen die PAH- bzw. NaCl-Konzentration. .94
- Abb. 4.35: IR-Messungen in Abhängigkeit von PAH- (58 kDa) bzw. NaCl-Konzentration. a) IR-Spektren der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen bei variierender PAH- und NaCl-Konzentration und b) Gesamtintegral der IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen. Gezeigt sind die auf die D<sub>2</sub>O-Messung normierten Gesamtintegrale der experimentellen

und berechneten Werte in Abhängigkeit von PAH- bzw. NaCl-Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten. ....	95
Abb. 4.36: Ellipsometrische Messungen des Quellungskoeffizienten der PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der PAH-, NaCl- und der CaCl <sub>2</sub> -Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PAH-Konzentration konstant bei 32 mM gehalten. ....	96
Abb. 4.37: NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie basierend auf Modell 1 (Linie) für DMPC-Oligolagen in PAH mit dem MW 58 kDa (32 mM) und variierender NaCl-Konzentration inkubiert. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal verschoben. ....	96
Abb. 4.38: Aus Modell 1 erhaltene Parameter der PAH-induzierten Quellung von DMPC-Oligolagen. Angegeben sind a) die Schichtdicke der Wasserzweischenschicht, b) der adsorbierten PAH-Schicht und c) der Wassergehalt der PAH-Schicht in Abhängigkeit von der PAH (58 kDa)- und NaCl-Konzentration. ....	97
Abb. 4.39: Ellipsometrische Messungen des Quellungskoeffizienten der PL-Oligolagen in Abhängigkeit von der PEI- (25 kDa) bzw. der NaCl-Konzentration. Bei Variation der Salzkonzentrationen wurde die PEI-Konzentration konstant bei 70 mM gehalten. ....	98
Abb. 4.40: Ellipsometrisch ermittelte Quellungskoeffizienten der in Wasser inkubierten PL-Oligolagen bei variierendem pH-Wert. ....	99
Abb. 4.41: Ellipsometrisch ermittelte Quellungskoeffizienten der in Wasser und PE inkubierten PL-Oligolagen bei variierendem pH-Wert. Proben wurden inkubiert in a) PSS 70 kDa der Konzentration 4.85 mM (1 g/L), b) PAH 15 kDa der Konzentration 32.1 mM (3 g/L) und c) PEI 25 kDa der Konzentration 69.7 mM (3 g/L). Die Zugabe von NaOH bzw. HCl erfolgte immer an einer neuen Probe. Die verschiedenen Markierungen zeigen die unterschiedlichen Proben an. ....	102
Abb. 4.42: Mögliche Erklärungen zum pH-abhängigen Quellverhalten. Rote Markierungen bzw. Schrift deuten auf positive Ladungen, schwarze auf negative Ladungen und grüne auf Ladungsneutralität hin. Die Richtungen der kleinen Pfeile zeigen einen Quell- bzw. Schrumpfprozess der Bilagen an. Die DMPC-Oligolagen sind von links nach rechts in reinem Wasser, PSS, PAH und PEI inkubiert. Der pH-Wert der Lösungen nimmt von oben nach unten ab. ....	103
Abb. 4.43: Ellipsometrisch ermittelte Quellungskoeffizienten für geladene PEs im Vergleich. ....	104
Abb. 4.44: Schematische Zeichnung der möglichen Verbrückungen durch PEs zwischen den Bilagen. Die Polymere liegen in Lösung geknäuel vor. Dargestellt ist für 2, 3 und 4 nur die mögliche vertikale Ausdehnung eines Polymers hinsichtlich seines End-zu-End-Abstands. 1 zeigt nur die horizontale Anlagerung der Polymere auf den Kopfgruppen. ....	105



- Abb. 4.45: Simulation der Quellmessung mit HS bei Kontraständerung durch deuterierte Lipide. a) Simulierte NR-Kurven für unterschiedlichen HS-Gehalt in kettendeuterierten DMPC-Doppelschichten. b) Zugehöriges Streulängendichteprofil für eine Lipid-Lamelle. Entsprechend früheren Ergebnissen<sup>55</sup> wurde die HS-Konzentration in der Volumenphase und den Wasserzwichenschichten als 0.2 % angenommen, in der HS-Adsorbatschicht auf den Lipid-Kopfgruppen als 23 %. Variiert wurde ausschließlich der Gehalt von HS in den Lipidmembranen. .... 106
- Abb. 4.46: Gemessene NR-Kurven zur Lokalisierung des PAHs in den Lipid-Ketten. a) Proben in reinem D<sub>2</sub>O und b) dieselben Proben in wässrigen PAH-Lösungen mit verschiedenem MW (15, 58 und 900 kDa) inkubiert. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven vertikal verschoben. .... 108
- Abb. 4.47: Gemessene NR-Kurven, deren Fits und die zugehörigen SLDs. Oben: Proben in reinem D<sub>2</sub>O. Unten: Proben in den jeweiligen wässrigen PAH-Lösungen. .... 110
- Abb. 4.48: Kontrastverhältnisse für Lipid-Systeme in PE-Lösungen. Links: DMPC undeutert in D<sub>2</sub>O, Mitte: DMPC gemischt (undeutert und deutert) in Kontrastangepasster PAH-Lösung (PAH in D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O-Mischung) und rechts: System nach möglichem PAH-Einbau in die Kettenbereiche der Lipide. Gleichfarbige Strukturen ergeben keinen Kontrast. In den beiden letzten Abbildungen sind die Lipide nur zur Übersichtlichkeit angedeutet. .... 112
- Abb. 4.49: Simulation der Quellmessung mit PAH bei Kontraständerung durch deuterierte und undeuterierte Lipide, D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O. Links: Simulierte NR-Kurven für unterschiedlichen PAH-Gehalt in den Kettenbereichen der DMPC-Doppelschichten. Rechts: Zugehöriges Streulängendichteprofil für eine Lipid-Lamelle. .... 112
- Abb. 4.50: NR-Messungen zur Lokalisierung von PAH. a) Messungen der Probe in reinem D<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O Mischungen (Kontrastangepasst). b) NR-Daten des Kontrastangepassten Systems vor und nach Zugabe von PAH mit einem MW von 15 kDa. .... 113
- Abb. 4.51: a) NR-Intensitäten in Abhängigkeit von  $q_z$  und b) zeitgleiche IR-Messungen der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungsbanden von substratgebundenen Lipid-Oligolagen bei 20 °C und 38 °C. Die Probe wurde mit einer DMPC-Lösung der Konzentration 10 g/L rotationsbeschichtet. .... 114
- Abb. 4.52: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  bei Scherung von DMPC-Oligolagen in D<sub>2</sub>O. Proben a) D<sub>2</sub>O\_1, b) D<sub>2</sub>O\_2 und c) D<sub>2</sub>O\_3 zeigen eine Abnahme des Bragg-Peaks mit zunehmender Scherrate. .... 117
- Abb. 4.53: Intensitäten des 1. Bragg-Peaks normiert auf das Signal bei 0 bzw. 30 rpm. Alle Proben wurden in D<sub>2</sub>O inkubiert und zeigen bei 15 bzw. 60 rpm einen vollständigen Verlust der Intensität. .... 118
- Abb. 4.54: IR-Spektren für verschiedene Scherraten unter D<sub>2</sub>O für a) D<sub>2</sub>O\_1 und b) D<sub>2</sub>O\_2. Abgebildet ist die Region der asymmetrischen und der symmetrischen Streckschwingung der CH<sub>2</sub>-Gruppen. .... 118

Abb. 4.55: Gesamtintensität der Signale resultierend aus symmetrischer und asymmetrischer CH<sub>2</sub>-Streckschwingung normiert auf die Intensität bei 0 rpm in Abhängigkeit von der Scherrate. Die Proben D<sub>2</sub>O\_1 und D<sub>2</sub>O\_2 wurden in D<sub>2</sub>O inkubiert.

..... 119

Abb. 4.56: Verschiebungen der IR-Banden mit zunehmender Scherrate. Dargestellt sind die Positionen für die asymmetrische und die symmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung für D<sub>2</sub>O\_1 und D<sub>2</sub>O\_2 in Abhängigkeit von der Scherrate. Die Proben wurden in D<sub>2</sub>O inkubiert.

..... 120

Abb. 4.57: NR-Intensität in Abhängigkeit von  $q_z$  bei Scherung von in wässrigen PAH-Lösungen inkubierten DMPC-Oligolagen. Für jedes MW wird eine Messreihe gezeigt. Andere zur Auswertung hinzugezogene Messreihen sind im Anhang zu finden (s. 7.1.1). Zu sehen sind folgende Proben: a) PAH15\_2 (PAH 15 kDa), b) PAH58\_2 (PAH 58 kDa) und c) PAH900\_1 (PAH 900 kDa).

..... 121

Abb. 4.58: Intensitäten des 1. Bragg-Peaks als Funktion der Scherrate normiert auf das Signal bei 0 rpm. Gezeigt sind die Auswertungen für alle Proben und MWs von PAH: a) 15 kDa, b) 58 kDa und c) 900 kDa. d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust für alle in PAH inkubierten Proben im Vergleich zu in reinem Wasser inkubierten Proben in einem Balkendiagramm. Die Werte wurden über lineare Interpolierungen erhalten.

..... 122

Abb. 4.59: Auftragung des lamellaren Abstands in Abhängigkeit von der Scherrate. Auswertung für die folgenden MWs der wässrigen PAH-Inkubationslösungen: a) 15 kDa, b) 58 kDa und c) 900 kDa.

..... 123

Abb. 4.60: IR-Absorptions-Kurven bei Scherung von DMPC-Oligolagen in Kontakt mit PAH-Lösungen. Abgebildet ist die Region der asymmetrischen und der symmetrischen Streckschwingung der CH<sub>2</sub>-Gruppen für folgende Proben: a) PAH15\_2 (PAH 15 kDa), b) PAH58\_2 (PAH 58 kDa) und c) PAH900\_1 (PAH 900 kDa).

..... 124

Abb. 4.61: Integrierte IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Schwingsbands als Funktion der Scherrate. Normiert wurde auf die Signale der Messung bei 0 rpm. Dargestellt sind die Auswertungen für die folgenden Proben: a) PAH 15 kDa, b) PAH 58 kDa und c) PAH 900 kDa. d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust für alle in PAH inkubierten Proben im Vergleich zu in reinem Wasser inkubierten Proben in einem Balkendiagramm. Die Werte wurden über lineare Interpolierungen erhalten.

..... 125

Abb. 4.62: Verschiebungen der symmetrischen und asymmetrischen CH<sub>2</sub>-Schwingsbands in Abhängigkeit von der Scherrate. Dargestellt sind die Auswertungen für die folgenden Proben: a) PAH 15 kDa, b) PAH 58 kDa und c) PAH 900 kDa.

..... 126

Abb. 4.63: NR-Messungen der Probe PAH58 + NaCl (3 g/L PAH, 154 mM NaCl) bei verschiedenen Scherraten und zugehörige Auswertungen im Vergleich zu PAH58-Proben ohne NaCl-Zusatz (s. 4.5.2). a) NR-Kurven der Probe PAH58 + NaCl, b) lamellare

- Abstände in Abhängigkeit von der Scherrate für die Proben PAH58 aus 4.5.2 und PAH58 + NaCl und c) Intensität des 1. Bragg-Peaks normiert auf das Signal bei 0 rpm für die Proben PAH58 aus 4.5.2 bzw. PAH58 + NaCl. .... 127
- Abb. 4.64: IR-Messungen der Probe PAH58 + NaCl (3 g/L PAH, 154 mM NaCl) bei verschiedenen Scherraten und zugehörige Auswertungen im Vergleich zu PAH58-Proben (s. 4.5.2). a) IR-Intensitäten der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen für die Probe PAH58 + NaCl und b) IR-Intensität normiert auf das Signal bei 0 rpm für die Proben PAH58 (s. 4.5.2) und PAH58 + NaCl. .... 128
- Abb. 4.65: NR-Kurven der Proben a) HS850\_2 und b) HS850\_1 und c) und d) Auswertung der Bragg-Peak-Intensität. c) zeigt die normierten Intensitäten und d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust in einem Balkendiagramm. Maximale Scherrate im Experiment waren 6000 rpm. Während die Probe HS850\_2 lediglich 18 h in HS inkubierte, hatten die Proben HS769 und HS850\_1 2 bzw. 4 Wochen Zeit für die Gleichgewichtseinstellung. .... 129
- Abb. 4.66: IR-Kurven der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen für die Proben a) HS850\_2 und b) HS850\_1 und c) und d) Auswertung der IR-Intensität. c) zeigt die normierten IR-Intensitäten und d) veranschaulicht die Scherrate bei 50 % Signalverlust in einem Balkendiagramm. Maximale Scherrate im Experiment waren 6000 rpm. Während die Probe HS850\_2 lediglich 18 h in HS inkubierte, hatten die Proben HS769 und HS850\_1 2 bzw. 4 Wochen Zeit für die Gleichgewichtseinstellung. .... 130
- Abb. 4.67: Die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Probe PAH15\_2. Die Daten für die verschiedenen Scherraten wurden mit dem obengenannten Modell verglichen. .... 133
- Abb. 4.68: a) Die Schichtdicken und b) Wassergehalt bei zunehmender Scherrate resultierend aus dem Modell 3 für die Probe PAH15\_2. .... 133
- Abb. 4.69: Gezeigt sind a) die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs sowie b) die Schichtdicken und c) Wassergehalt bei zunehmender Scherrate resultierend aus dem Modell 3 für die Probe PAH58\_2. .... 134
- Abb. 4.70: Gezeigt sind a) die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs sowie b) die Schichtdicken und c) Wassergehalt bei zunehmender Scherrate resultierend aus dem Modell 3 für die Probe PAH900\_1. .... 135
- Abb. 4.71: Gleichgewichtseinstellung bei 300 rpm der Probe PAH900\_4 inkubiert in PAH mit einem MW von 900 kDa. Die Zeitdifferenz zwischen den Aufnahmen der einzelnen Kurven beträgt 3.75 h. Die Probe befindet sich selbst nach 26.25 h nicht im Gleichgewicht. .... 137
- Abb. 4.72: Skizze des möglichen Verhaltens der Oligolagen bei zunehmenden Scherraten. Bei beginnender Scherung tritt eine Biege-Deformation der Bilagen auf. Mit zunehmender Scherung ändert sich die Biege-Deformation nicht, aber Teile der DMPC-

Bilagen werden durch Wasser ersetzt. Zusammengehalten werden die Membranen über PAH-Vernetzungen.....	138
Abb. 7.1: NR-Intensität in Abhängigkeit von $q_z$ für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 15 kDa. Proben von oben nach unten: PAH15_1 und PAH15_3.....	i
Abb. 7.2: NR-Intensität in Abhängigkeit von $q_z$ für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 15 kDa. Proben von oben nach unten: PAH15_4 und PAH15_5.....	ii
Abb. 7.3: NR-Intensität in Abhängigkeit von $q_z$ für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 58 kDa. Von oben nach unten: PAH58_1, PAH58_3, PAH58 + NaCl (154 mM). ....	iii
Abb. 7.4: NR-Intensität in Abhängigkeit von $q_z$ für in wässrigen PAH-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die NR-Daten (Kreise) mit der optimalen Modelltrajektorie (Linie) und die dazugehörigen SLDs für die Proben bei Verwendung von PAH mit dem MW 900 kDa. Von oben nach unten: PAH900_2, PAH900_3, PAH900_4.....	iv
Abb. 7.5: NR-Intensität in Abhängigkeit von $q_z$ für in wässrigen HS-Lösungen inkubierte DMPC-Oligolagen unter Scherung. Gezeigt sind die Messungen für ein MW von 769 kDa (HS769). ....	v
Abb. 7.6: IR-Intensitäten der $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen unter Scherung. Inkubiert wurde in wässrigen PAH-Lösungen mit einem MW von 15 kDa. Proben wie folgt: a) PAH15_1, b) PAH15_3, c) PAH15_4 und d) PAH15_5.....	vi
Abb. 7.7: IR-Intensitäten der $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen unter Scherung. Inkubiert wurde in wässrigen PAH-Lösungen mit einem MW von 58 kDa. Proben wie folgt: a) PAH58_1 und b) PAH58_3. ....	vii
Abb. 7.8: IR-Intensitäten der $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen inkubiert in wässrigen PAH-Lösungen mit einem MW von 900 kDa. Proben wie folgt: a) PAH900_2, b) PAH900_3 und c) PAH900_4. ....	viii
Abb. 7.9: IR-Intensitäten der $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen von DMPC-Oligolagen inkubiert in wässrigen HS-Lösungen mit einem MW von 15 kDa. Proben wie folgt: IR-Kurven von DMPC-Oligolagen inkubiert in HS-Lösungen mit MW 769 kDa (HS769). ....	ix

Tab. 2.1: SLDs von Wasser und schwerem Wasser für Neutronen- und Röntgenstrahlung. Gerechnet wurde mit Wellenlängen von 4.66 Å für Neutronen- und von 1.54 Å für Röntgenstrahlung. ....	32
Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien, Bezugsquelle und Reinheitsgrad bzw. MW.....	44
Tab. 4.1: Aus DSC-Messungen ermittelte Phasenübergangstemperaturen und Enthalpieänderungen. Gemessen wurden unterschiedlich deuterierte Lipide. Ermittelt wurden Hauptphasenübergangs- ( $T_m$ ) und Vorumlagerungstemperatur ( $T_{pre}$ ) sowie die Enthalpieänderung ( $\Delta H_m$ ) während des Hauptphasenübergangs. Die Datenanalyse erfolgte mit Microcal Origin der Malvern Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland). ....	57
Tab. 4.2: Modell 1: Parameter des Fits für konzentrationsabhängige NR-Messungen an DMPC-Oligolagen mit PAH (15 kDa). Die freien Parameter für die Modellschätzung sind mit $x_i$ markiert. Die mit * markierten Parameter wurden für Konzentrationen kleiner 0.03 M zusätzlich variiert. ....	73
Tab. 4.3: Verwendete Parameter und daraus errechnete Eindringtiefe für beide Absorptions-Wellenlängenbereiche der CH <sub>2</sub> -Schwingungsbanden. ....	77
Tab. 4.4: Die verwendeten Makromoleküle, deren unterschiedliche MWs und weitere Parameter zur Berechnung des End-zu-End-Abstandes. Der End-zu-End-Abstand $R_E$ wurde für Konzentrationen von 3 g/L berechnet. ....	83
Tab. 4.5: Probenübersicht der Lokalisierungsexperimente. Aufgelistet ist der lamellare Abstand der trockenen Proben und die Anzahl der Schichten ermittelt aus vorangegangener XRR-Charakterisierung. ....	107
Tab. 4.6: Modell 2: Parameter des Fits für NR-Messungen zum Einbau von PAH in die Kettenbereiche der Lipide für PAH58 ( $x_i$ : freie Parameter für Modellschätzung). ....	109
Tab. 4.7: Mit Modell 2 erhaltene SLDs für den Kettenbereich der Proben und daraus ermittelter Anteil von in die Kettengruppen eingelagertem PAH. ....	111
Tab. 4.8: Übersicht der in den Scherexperimenten eingesetzten Proben. Aufgelistet ist die Gesamtauflösung der NR-Messung in [%], die Inkubationsdauer vor Scherung, die gemittelte Dauer des Wechsels zwischen zwei Scherraten $\Delta t$ , der lamellare Abstand der trockenen Proben und die Anzahl der Schichten ermittelt aus vorangegangener XRR-Charakterisierung. ....	116
Tab. 4.9: Modell 3: Parameter des Modells für NR-Messungen der Probe PAH15_2. Die freien Parameter für die Modellschätzung sind mit $x_i$ markiert. Spezielle Werte für das ungescherte bzw. gescherte System sind mit Blau und Grün gekennzeichnet. ....	132

## 7.4. Danksagung

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Reiner Dahint für die Ermöglichung einer Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis und seine fortwährende Unterstützung. Zusätzlich begleitete er mich auf mehrere Messzeiten um mich beim Entwurf und bei der Ausführung der verschiedenen Messreihen zu unterstützen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Joachim Spatz bedanken, der sich die Zeit nahm meine Arbeit zu beurteilen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Marcus Trapp, der „Local Contact“ am *BioRef*, welcher neben tatkräftiger Unterstützung während diverser Messzeiten auch unter anderem ein paar Tage/Wochen/Monaten vorher Proben inkubierte damit sie zur Messzeit bereit waren.

Dr. Roland Steitz möchte ich für seine Kommentare und seine große Erfahrung beim Fitten der Neutronendaten danken, welche mir bei meinen eigenen Fits sehr hilfreich waren. Auch das Wissen von Dr. Thomas Hauß über Lipide und Neutronenreflexionsmessungen war mir sehr aufschlussreich.

Den Kontaktpersonen am PSI Dr. Thomas Geue, am HMLZ Dr. Olaf Soltwedel und am ILL Dr. Philipp Gutfreund gilt mein großer Dank für die Unterstützung bei meinen Neutronenreflexionsmessungen.

Für die Entwürfe meiner verwendeten Zellen durch Herrn Reinhold Jehle und deren Umsetzung durch die feinmechanischen Werkstatt an der Angewandten Physikalischen Chemie in Heidelberg bin ich sehr dankbar, denn ohne diese hätte ich u. a. kein einziges Scherexperiment durchführen können.

Herrn Peter Jeschka und Herrn Günther Meinus möchte ich für die Bereitstellung und Installierung von Software und Hardware danken.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Motomu Tanaka und seinem Arbeitskreis bedanken, welcher mir die Möglichkeit gab XRR- und DSC-Messungen durchzuführen. Behilflich waren mir dabei vor allem Dr. Stefan Kaufmann, Dr. Alexandra Burk, Dr. Nataliya Frenkel und Dr. Wasim Abuillan.

Herr Benjamin Scherke, Frau Swetlana Duchnay und Frau Karin Jordan danke ich für sämtliche Verwaltungstätigkeiten.

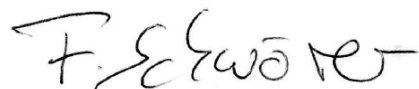
Außerdem bedanke ich mich für anregende Konversationen am HZB bei Kaffee und Kakao und mit meiner Bürokollegin Dr. Anna Grab, welche auch über die Forschung hinausgingen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinem Florian für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung danken.

## 7.5. Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbständig angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir genannten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, den 26.05.2017



Felicitas Schwörer

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Universität Heidelberg**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Charakterisierung von Lipid-Oligolagen nach Zugabe von

\_\_\_\_\_

Hyaluronsäure und polymeren Ersatzstoffen zur Aufklärung

\_\_\_\_\_

möglicher Wirkmechanismen in der Viskosupplementation

\_\_\_\_\_

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich wie folgt<sup>1)</sup> bislang nicht<sup>1)</sup> an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Titel der Arbeit: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Hochschule und Jahr: \_\_\_\_\_

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung: \_\_\_\_\_

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, 26.5.17  
Ort und Datum

F. Schwörer  
\_\_\_\_\_  
Unterschrift

<sup>1)</sup> Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung.