

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und  
Transplantationschirurgie Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Einfluss von Phosphatidylserin auf den  
durch Glycolipidtransferprotein katalysierten  
Gluco- und Galactocerebrosidtransfer  
zwischen Liposomen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin**

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Hans Dannert  
aus Tübingen  
2005**

Dekan : Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter : Professor Dr. Dr. K. H. Schmidt  
2. Berichterstatter : Privatdozent Dr. G. Eschweiler

**Meiner Mutter**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung .....	8
1.1. Aufbau von Plasmamembranen eukaryonter Zellen .....	8
1.2. Phosphatidylserin .....	11
1.3. Künstliche Membransysteme .....	14
1.4. Lipidtransferproteine (LTP) .....	18
1.5. Resonanz-Energie-Transfer (RET) .....	20
1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	23
1.6.1. Ziele und Aufgabenstellung im Einzelnen sind .....	24
2. Material und Methoden .....	25
2.1. Material.....	25
2.1.1. Chemikalien .....	25
2.1.2. Filter und Dialysematerial.....	26
2.1.3. Lösungen .....	26
2.1.4. Geräte.....	27
2.1.5. Tiermaterial .....	27
2.2. Methoden .....	28
2.2.1. Liposomenpräparation und -charakterisierung .....	28
2.2.1.1. Theorie zur Liposomenpräparation.....	28
2.2.1.2. Bestimmung der Liposomengröße und Polydispersität .....	29
2.2.2. Akzeptorliposomen.....	29
2.2.2.1. Verschiedene Lipidzusammensetzungen .....	30
2.2.2.2. Verschiedene Detergentien.....	32
2.2.3. Donorliposomen.....	33
2.2.3.1. Prinzip des Resonanz-Energie-Transfers .....	33

2.2.3.2. Bestimmung des in Resonanzenergie stehenden Anteils der Fluorophore .....	34
2.2.3.3. Bestimmung der Sensitivität der Donorliposomen.....	35
2.2.4. Lipidtransferproteinisolierung und Proteinbestimmung .....	36
2.2.4.1. Gewebeaufschluss .....	36
2.2.4.2. Proteinisolierung mittels Amoniumsulfatfällung.....	36
2.2.4.3. Proteinbestimmung nach Lowry et al. ....	37
2.2.4.4. Proteineichkurve .....	39
2.2.4.5. Proteinbestimmung der GLTP-Lösung .....	39
2.2.5. Messung der GLTP-Aktivität mittels RET .....	40
2.2.5.1. Prinzip der fluometrischen Messung .....	40
2.2.5.2. NBD Eichkurven.....	40
2.2.6. Triton-Quench-Faktor .....	42
2.2.6.1. GLTP-Aktivitätsmessung.....	44
3. Ergebnisse .....	46
3.1. Größe der Akzeptorliposomen in Abhängigkeit Lipidzusammen- setzung und des verwendeten Detergenz .....	46
3.1.1. Mit Na-Cholat hergestellte Liposomen .....	46
3.1.2. Mit OG hergestellte Liposomen .....	49
3.1.3. Mit POE4 hergestellte Liposomen .....	51
3.2. Charakterisierung der Donorliposomen .....	55
3.2.1. Donorliposomen mit NBD-Glucocerebrosiden .....	56
3.2.1.1. Größe und Polydispersität.....	56
3.2.1.2. Emissionsmaxima.....	57
3.2.1.3. Anteil der im RET stehenden NBD-Glucocerebroside .....	57
3.2.1.4. Sensitivität der Donorliposomen mit NBD-Glucocerebroside .....	57
3.2.2. Donorliposomen mit NBD-Galactocerebrosiden .....	58
3.2.2.1. Größe und Polydispersität.....	59
3.2.2.2. Emissionsmaxima.....	59
3.2.2.3. Anteil der im RET stehenden NBD-Galactocerebroside .....	59
3.2.2.4. Sensitivität der Donorliposomen mit NBD-Galactocerebroside .....	59
3.3. Lipidtransferprotein.....	60

3.4. Lipidtransferproteinaktivität in Abhängigkeit der verwendeten Akzeptorliposomen und Donorliposomen.....	61
3.4.1. Lipidtransferraten bei mit Na-Cholat hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS, 100/0 bis 10/90 .....	61
3.4.1.1. Lipidtransferraten bei Einsatz von NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen.....	63
3.4.1.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen.....	63
3.4.2. Lipidtransferraten bei mit Na-Cholat hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PE, 90/10 bis 50/50 .....	64
3.4.2.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen.....	65
3.4.2.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen.....	66
3.4.3. Lipidtransferraten bei mit OG hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS, 100/0 bis 10/90 .....	66
3.4.3.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen.....	68
3.4.3.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen.....	68
3.4.4. Lipidtransferraten bei mit OG hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PE, 90/10 bis 50/50 .....	69
3.4.4.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen.....	70
3.4.4.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen.....	71
3.4.5. Lipidtransferraten bei mit POE4 hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS, 100/0 bis 10/90 .....	71
3.4.5.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen.....	73
3.4.5.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen.....	73
3.4.6. Lipidtransferraten bei mit POE4 hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PE, 90/10 bis 50/50 .....	74
3.4.6.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen.....	76
3.4.6.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen.....	76

---

4.	Diskussion.....	77
4.1.	Ergebnisdiskussion.....	77
4.1.1.	Einfluss der verwendeten Detergentien auf die Größe der Akzeptorliposomen.....	77
4.1.1.1.	Mit Na-Cholat als Detergenz hergestellte Liposomen.....	78
4.1.1.2.	Mit OG als Detergenz hergestellte Liposomen.....	78
4.1.1.3.	Mit POE4 als Detergenz hergestellte Liposomen.....	79
4.1.2.	Einfluss von Ladung und Größe der Akzeptorliposomen auf den Glycolipidtransfer.....	79
4.1.3.	Einfluss der Ladung der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer.....	80
4.1.4.	Einfluss der Größe der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer.....	82
4.1.5.	Optimale Zusammensetzung.....	83
4.2.	Gesamtbetrachtung.....	84
4.3.	Methodendiskussion.....	89
4.3.1.	Resonanz-Energie-Transfer (RET).....	89
4.3.2.	Liposomenherstellung.....	90
4.3.3.	Glycolipidtransferprotein (GLTP).....	90
4.4.	Eigene Betrachtungen.....	90
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Literaturverzeichnis.....	95

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lipidzusammensetzung der Akzeptorliposomen.....	31
Tabelle 2: Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils .....	47
Tabelle 3: Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils .....	48
Tabelle 4: Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils .....	49
Tabelle 5: Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils .....	50
Tabelle 6: Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils.....	52
Tabelle 7: Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils.....	53
Tabelle 8: Charakterisierung der Donorliposomen .....	55
Tabelle 9: Verteilung der NBD-Cerebroside in den Donorliposomen .....	55
Tabelle 10: Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PS.....	61
Tabelle 11: Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PE.....	64
Tabelle 12: Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PS.....	66
Tabelle 13: Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PE.....	69
Tabelle 14: Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PS.....	71
Tabelle 15: Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PE.....	74
Tabelle 16: Verhältnis Transferaktivität NBD-Glu/NBD-Gal .....	80
Tabelle 17: Ausgewählte Transferraten zur Darstellung des Größeneffektes.....	83

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Beispielhafte Darstellung einer Zellmembran.....	8
Abbildung 2:	Schematische Darstellung eines Liposoms.....	15
Abbildung 3:	Resonanz-Energie-Transfer.....	22
Abbildung 4:	Schematisierte Darstellung der Lipide .....	31
Abbildung 5:	Standardeichkurve der Lowry Proteinbestimmung .....	39
Abbildung 6:	Standardeichkurve für NBD-Galactocerebroside .....	41
Abbildung 7:	Standardeichkurve NBD-Glucocerebroside .....	41
Abbildung 8:	Triton-Quench NBD-Glucocerebroside .....	42
Abbildung 9:	Triton-Quench NBD-Galactocerebroside .....	43
Abbildung 10:	Beispiel der Lipid-Transfer-Aktivitätsmessungen .....	45
Abbildung 11:	Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils .....	47
Abbildung 12:	Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils .....	48
Abbildung 13:	Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils.....	50
Abbildung 14:	Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils.....	51
Abbildung 15:	Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils.....	53
Abbildung 16:	Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils.....	54
Abbildung 17:	Verteilung der NBD-Glucocerebroside .....	56
Abbildung 18:	Verteilung der NBD-Galactocerebroside .....	58
Abbildung 19:	Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PS.....	62
Abbildung 20:	Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PE.....	65
Abbildung 21:	Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PS.....	67
Abbildung 22:	Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PE.....	70
Abbildung 23:	Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PS .....	72
Abbildung 24:	Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PE .....	75

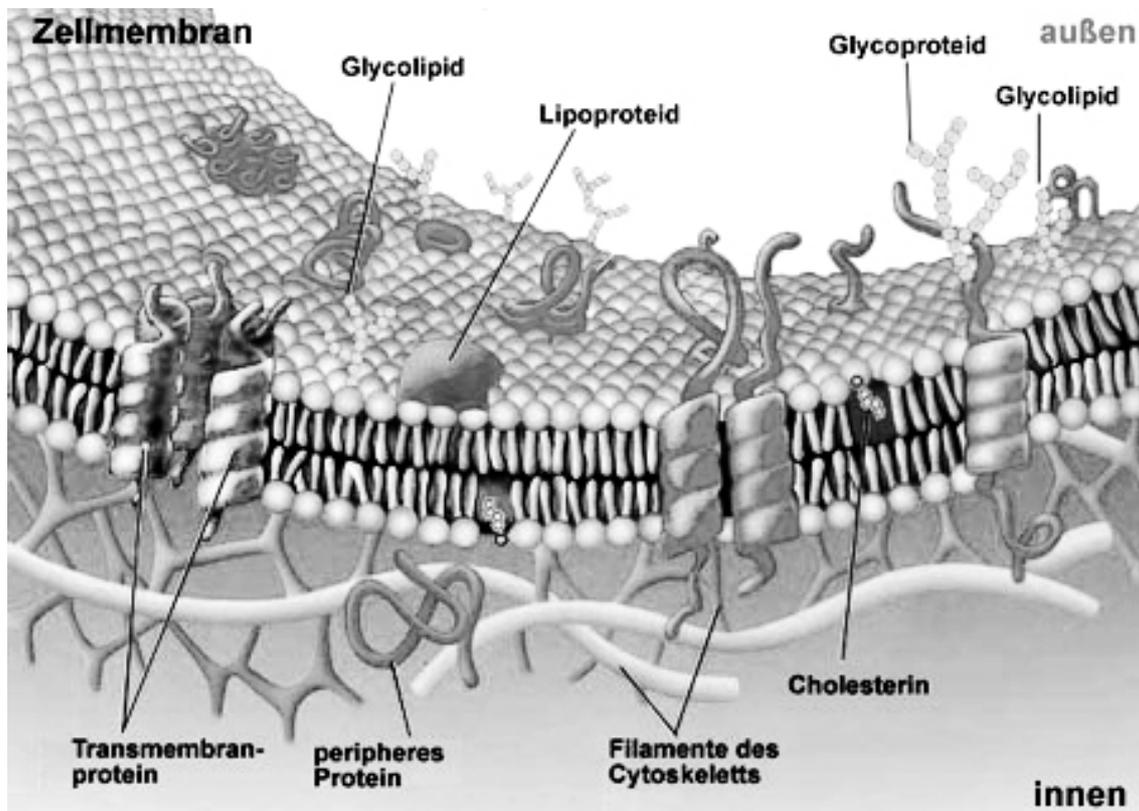
## Abkürzungsverzeichnis

GalCer	Galactosylcerebroside
GLTP	Glycolipidtransferprotein
GluCer	Glucosylcerebroside
LCB	long chain base
LTP	Lipidtransferprotein
LUV	large unilamellar vesicles
MLV	multilamellar large vesicles
Na-Cholat	Natriumcholat
NBD	Nitrobenzoxadiazol
NBD-Gal	NBD-Galactocerebroside
NBD-Glu	NBD-Glucocerebroside
ns-LTP	unspezifische Lipidtransferprotein
OG	N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
POE4	Tetraoxyethylenglykolmonoethylenester
PS	Phosphatidylserin
RET	Resonanz-Energie-Transfer
RhB	RhodaminB
RhB-PE	RhodaminB markiertes PE
SPH	Sphingomyelin
SUV	small unilamellar vesicles

# 1. Einleitung

## 1.1. Aufbau von Plasmamembranen eukaryonter Zellen

Tierische Zellen sind von einer Plasmamembran umschlossen, deren Grundsubstanz von Lipiden gebildet wird. Die Lipide sind amphiphil, das heißt sie bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe, an die sich zwei lange, hydrophobe Kohlenwasserstoffketten anschließen. Die monomeren Lipide lagern sich im Wasser spontan zu 4 bis 5 nm dicken Doppelschichten (Bilayer) zusammen, indem sich die hydrophilen Kopfgruppen außen, dem Wasser zugewandt, anordnen und die beweglichen, hydrophoben Acylketten aneinanderlagernd eine nicht wässrige Ölphase bilden [38]. Die aus der Lipiddoppelschicht bestehende Zellwand trennt die im Zytosol liegenden Zellorganellen von ihrer Umgebung und erlaubt durch Diffusion, aktive Transportmechanismen sowie Endo- und Exozytose den Stoffaustausch [38].



**Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung einer Zellmembran**

Quelle: Zentrum für Unterrichtsmedien im Internet e.V.

In die von der Lipiddoppelschicht gebildete Matrix der Plasmamembran lagern sich Proteine, Glycoproteine und -lipide sowie Steroide ein [123].

Das bekannteste Modell der Biomembranen ist das von Singer und Nicholson 1972 entworfene „fluid mosaic model of the structure of cell membranes“ [138]. In den letzten Jahren zeigten Studien zunehmend, dass die Lipide in den Membranen nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern Regionen bestehen, die einen erhöhten Anteil an bestimmten Lipiden ausweisen [20, 19, 136]. Man kann heute also eher von einem „mosaic of lipid domains“ sprechen [43].

Die monomeren, membranbildenden Lipide sind meist Phospholipide, wie das Phosphatidylcholin (PC), -ethanolamin (PE), -serin (PS), -inositol (PI), -glycerol (PG) und das Sphingomyelin (SPH). Die hydrophilen Kopfgruppen entscheiden über den Hydratationsgrad, die Ladung und über das Vorhandensein möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Molekülen. Bei neutralem pH liegen die Kopfgruppen entweder als neutrales Zwitterion (PC, PE) oder als einfach negativ geladenes Anion (PS, PG, PI) vor [123]. Das Grundgerüst der Phospholipide bildet Glycerol, an dessen C-1 und C-2 zwei Fettsäureketten unterschiedlicher Länge und Sättigungszustand hängen. Am C-3 ist ein Phosphorsäurerest mit einer Hydroxygruppe verestert. Die polaren Kopfgruppen können mittels Basenaustausch verändert werden [74]. Die Synthese von Phosphatidylserin in tierischen Zellen geschieht fast ausschließlich über den Austausch von L-Serin gegen Ethanolamin bei Phosphatidylethanolamin im endoplasmatischen Retikulum [150].

Vor allem im Nervengewebe haben die Glycolipide, wie z.B. die in der Studie verwendeten Glucosyl- (GluCer) und Galactosylcerebroside (GalCer) eine entscheidende funktionelle Bedeutung, u.a. als Membranstabilisatoren, Oberflächenantigene und für die Signalübertragung [43, 89]. Im Gegensatz zu den Phospholipiden bestehen die hydrophilen Kopfgruppen aus Oligosacchariden und die hydrophoben Anteile aus einer breiten Ceramidbasis an der eine Fettsäurekette angehängt ist. Die Einteilung der Glycolipide erfolgt anhand ihrer Kopfgruppen. Z.B. können neutrale Glycosphingolipide Glucose, Galactose, N-acetyl Galactosamin oder Fucose enthalten. In geladenen Glycosphingolipiden kann die Saccharidgruppe an Sulfat (Sulfatide) oder ein oder mehrere Sialin-

säuren (Ganglioside) gekoppelt sein. Die Ceramidfraktion besteht aus einer „long chain base“ (LCB). Bei Cerebrosiden und Sulfatiden sind die vorherrschende LCB Arten ungesättigtes C<sub>18</sub>-sphingosin und gesättigtes C<sub>18</sub>-sphingamin. Bei Gangliosiden finden sich vornehmlich C<sub>20</sub>-sphingosin und C<sub>20</sub>-sphingamin. An die LCB sind Fettsäureketten angekoppelt, welche in der Anzahl der C-Atome sowie dem Sättigungs- und Hydratationsgrad stark variieren [89].

Untersuchungen von Erythrozyten verschiedener Spezies stellen dar, dass die verschiedenen Lipide nicht gleichmäßig über die Membran verteilt sind, sondern äußere und innere Schicht des Bilayers unterschiedliche Lipidzusammensetzungen aufweisen können und auch innerhalb einer Schicht kann ein bestimmtes Lipid vermehrt vorkommen (Lipidasymmetrie) [93, 12]. Auch an Membranen von Zellorganellen werden Lipidasymmetrien beschrieben [145].

In Zellmembranen, vor allem des Nervengewebes konnten Regionen mit erhöhten Glycolipidanteilen gefunden werden. Darunter Einstülpungen der Membran „caveolae“ mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm und sogenannte „rafts“ [20, 19, 136], die am ehesten als frei schwimmende Inseln (Durchmesser 50 bis 70 nm) in den Membranen beschrieben werden können und neben Glycolipiden auch einen hohen Cholesterolanteil aufweisen. Die Detektion dieser Regionen erfolgte, da sie Lösungsmittel resistent sind, bzw. erschwert durch Detergentien aufgelöst werden können. Dabei wird dem Cholesterol die Fähigkeit zugesprochen, die Rigidität der Regionen zu erhöhen [89, 43]. Sowohl in den „caveolae“ als auch an die „rafts“ sind eine Reihe von Proteinen gebunden, GPI-Anchor-Proteine (z.B. IgE Rezeptor FcεRI, ein Transmembranprotein) [20], cholesterin-binding Protein Caveolin [139] oder acetylierte Protein Tyrosin Kinase [19]. Den „rafts“ und „caveolae“ konnten eine entscheidende Rolle bei dem Innerzellulären Stoffaustausch, der Signalübertragung von Nervenzellen, bei der Entstehung von Alzheimer, HIV und Prionerkrankungen sowie als „Eintrittspforten“ für Bakterien zugewiesen werden [als Review: 43, 89].

Weitere funktionelle Bedeutungen der Ungleichverteilung können in einem regulatorischen Einfluss auf die Fusion von Membranen im Sinne der Exo- oder Endozytose liegen. Es wird diskutiert, dass entweder vorhandene oder durch aktiven Prozess zusammengestellte Lipidasymmetrien der Bilayerstruktur eine

Fusion mit Vesikeln entweder fördern oder verhindern [40]. Dabei wird dem Phosphatidylserin eine Fusions erleichternde Fähigkeit zugesprochen [123]. Durch entsprechende Lipidkomposition kann die Membranfluidität beeinflusst [115] und die Phasenübergangstemperaturen von Membranen können verändert werden. Die Lipidkomposition bildet die Matrix für die Orientierung und Einlagerung von Proteinen. Somit hat sie auch eine wichtige Funktion bei der Wechselwirkung von Zellen untereinander und zwischen Vesikeln und Zellen. Sie hat eine grundlegende Funktion für die Zellabwehr und den Zellschutz [123]. Verlust der Asymmetrie der Lipiddoppelschicht führt bei McEvoy et al. zu erhöhter Phagozytose der betroffenen Erythrozyten durch Makrophagen [93]. Die Hypothesen zur Entstehung von Asymmetrien postulieren einerseits eine primäre Ungleichverteilung der Lipide bei der Membranbildung, andererseits entweder einen späteren Austausch bereits eingebauter Lipide innerhalb des Bilayers mit Hilfe von Enzymen (Flip - Flop - Mechanismus) [149] oder enzymkatalysierte Veränderung der hydrophilen Kopfgruppe der Lipide [123].

## 1.2. Phosphatidylserin

Das ubiquitär vorkommende und auch endogen gebildete Phospholipid Phosphatidylserin (PS) ist das wichtigste saure Phospholipid im Gehirn. Es wurde 1942 erstmals von Jordi Folch isoliert und charakterisiert. PS findet sich in allen biologischen Membranen von Menschen, Tieren, höheren Pflanzen und Mikroorganismen. Der Gesamtbestand an PS wird beim Menschen auf ca. 60 g geschätzt. Davon entfallen allein 30 g auf das Zentralnervensystem, wo es 15 % der Gesamtlipidmenge ausmacht. In anderen Geweben variiert der Anteil des PS am Gesamtlipidpool: Lunge (7,4 %); Testikel (6,4 %), Niere (5,7 %), Leber (3,8 %), Skelettmuskulatur (3,3 %), Herzmuskel (3,2 %) und Blutplasma (0,2 %) [68]. PS wird in die Zellmembran eingebettet und fungiert zusammen mit anderen Phospholipiden als deren Grundbaustein. Diese Membranphospholipide spielen eine zentrale Rolle für die interzelluläre Kommunikation und für die Übertragung biochemischer Signale in das Zellinnere, wo auf diese Weise zelluläre Reaktionen ausgelöst werden. Das einwandfreie Funktionieren dieser Prozesse ist insbesondere im Zentralnervensystem von entscheidender

Bedeutung. Theoretischen Überlegungen zufolge unterstützt PS den Zellstoffwechsel und die interzelluläre Kommunikation, indem es die Fluidität der Zellmembran beeinflusst [74, 75, 17].

Nachgewiesen sind die Auswirkungen einer oralen PS-Supplementation auf die neuronalen Membranen, auf den Zellstoffwechsel und die Enzymaktivität [31, 5, 25, 30]. So aktiviert PS die Proteinkinase C in der Großhirnrinde von alternden Ratten, ein Enzym der Neurotransmittersignalübertragungskaskade. Ebenso werden die Tyrosinhydrolase, die Acetylcholinesterase und die Na/K-ATPase aktiviert [71]. PS hat einen erheblichen Einfluss und auf spezifische Neurotransmittersysteme, darunter das Azetylcholin-, das Noradrenalin-, das Serotonin- und das Dopaminsystem [31, 30, 25, 5, 23]. Zahlreiche klinische Studien belegen, dass PS eine signifikante positive Wirkung auf die kognitiven Funktionen aufweist, insbesondere auf die Funktionen, die mit zunehmendem Alter tendenziell nachlassen, wie z.B. Gedächtnis- und Sprachleistung sowie Lern- und Konzentrationsfähigkeit.

Der Alterungsprozess ist häufig mit strukturellen und biochemischen Veränderungen im Gehirn verbunden. Hierzu gehören u.a. eine veränderte Lipidzusammensetzung der Nervenzellmembran, die Störung neuronaler Enzymaktivitäten, eine Verminderung der Synthese und des Abbaus von Neurotransmittern und/oder eine verminderte Synapsendichte [109]. Altersbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Nervenzellmembran können zu neurochemischen Störungen führen, die zu einem Anstieg der Membranviskosität beitragen und auf diese Weise enzymatische Aktivitäten reduzieren, die eine optimale Fluidität voraussetzen [75]. Diese Membranveränderungen können indirekt für die Störung von Enzymaktivitäten und Rezeptorfunktionen sowie für die Veränderung von Transmembran-Carrier-Proteinen und elektrischen Eigenschaften von Neuronen verantwortlich sein und so zu einer Beeinträchtigung von Verhalten, Gedächtnis und Lernfähigkeit führen [77].

Die Verabreichung von PS an alternde Ratten verhindert nicht nur den altersbedingten Verlust von dendritischen Dornen in den Pyramidenzellen des Hippocampus und eine Atrophie der cholinergen Zellen im basalen Vorderhirn, son-

dem verstärkt auch die Dopaminfreisetzung aus dem Corpus striatum und stimuliert die Freisetzung von Azetylcholin aus der Großhirnrinde [109, 71].

Klinische Studien, in denen bei Alzheimer-Patienten die Glucoseutilisation im Gehirn mittels PET untersucht wurde, ergaben eine erhöhte Glucoseutilisation bei PS-supplementierten Patienten, vornehmlich in den temporoparietalen Regionen, die besonders von der Alzheimer-Krankheit betroffen sind [61, 60, 77].

PS schützt die Zellen auch vor einer Schädigung durch freie Radikale. In Kulturen menschlicher Fibroblasten, die mit PS vorbehandelt waren, wurde eine signifikante Verminderung der Zellschädigung durch enzymatische Oxidation von Azetaldehyd unter Katalyse der Xanthinoxidase festgestellt [78].

Pharmakokinetische Studien zeigen, dass exogenes PS durch die Blut-Hirnschranke ins Gehirn gelangt, wo es eine besonders hohe Affinität zum Hypothalamus zu haben scheint. Bei oraler Verabreichung wird das Konzentrationsmaximum nach 1 bis 4 Stunden erreicht. Die orale LD50 bei Ratten beträgt >5 g/kg Körpergewicht. Hinweise auf teratogene Wirkungen bei Ratten oder Kaninchen liegen nicht vor. Auch Mutagenitätstests verliefen negativ. Eine Verträglichkeits- und Toxizitätsstudie an 130 Patienten ergab keine signifikanten Veränderungen von Blutbildwerten oder Serumchemie, mit Ausnahme einer signifikanten Abnahme von SGPT- und Harnsäurespiegeln [62, 24].

Studien zur Wirkung von Phosphatidylserin bei Patienten mit altersassoziierten Gedächtnisstörungen ergaben, dass PS ein wirksames Therapeutikum für diese verbreitete Alterserscheinung ist. In der größten dieser Studien, einer multizentrischen placebokontrollierten Studie mit 494 älteren Teilnehmern, war in der PS-Gruppe (300 mg/die) im Vergleich zur Placebogruppe eine signifikante Besserung von Verhaltensstörungen (Verlust von Motivation, Antrieb und Interesse an der Umwelt, gestörtes Sozialverhalten) sowie von Gedächtnisleistung und Lernfähigkeit zu beobachten [25]. Zahlreiche weitere Studien, in denen meist ebenfalls 300 mg/die PS verabreicht wurden, ergaben eine ähnlich signifikante Verbesserung von Lernfähigkeit, Gedächtnisleistung, Konzentrationsfähigkeit und Abrufbarkeit von Gedächtnisinhalten [137, 57, 119, 22, 3, 84, 120, 130, 133].

Gegenstand medizinischer Studien ist auch die Frage, ob Phosphatidylserin bei Alzheimer-Patienten eine positive Wirkung aufweist. In der Regel führt die

Verabreichung von PS zu einer signifikanten Besserung von Angstsymptomen, Antrieb, Gedächtnisleistung und kognitiven Fähigkeiten. In einer placebokontrollierten Studie erhielten 142 Alzheimer-Patienten PS (200 mg/die) über einen Zeitraum von drei Monaten. Die Nachbeobachtungszeit betrug 24 Monate. In einer Untergruppe von Patienten mit schwerer Beeinträchtigung der kognitiven Leistung wurde drei Monate nach Behandlungsende eine signifikante Besserung auf der Demenzbeobachtungsskala nach Blessed (Aktivitäten des täglichen Lebens, Informationsverarbeitung, Gedächtnis für Personen und Sachverhalte) registriert [6]. In anderen Studien, in denen meist 300 bis 400 mg täglich verabreicht wurden, war die Besserung tendenziell bei denjenigen Probanden am stärksten ausgeprägt, die weniger schwere kognitive Beeinträchtigungen aufwiesen [10, 9, 14]. In einer Studie war die Besserung nur vorübergehend und nach 16 Wochen nicht mehr erkennbar [30].

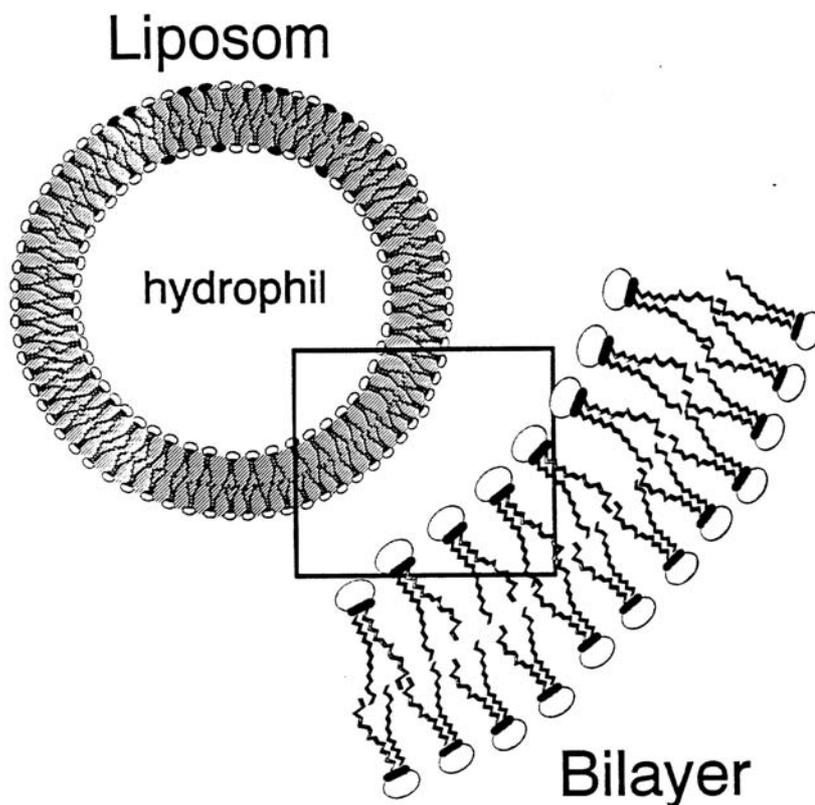
Maggioni und Mitarbeiter untersuchten die Wirkungen oraler PS-Gaben (300 mg täglich) auf depressive ältere Patienten ohne Zeichen einer Demenz und stellten nach 30 Tagen eine signifikante Besserung der depressiven Symptomatik fest. Auch Gedächtnis und Verhaltenssymptome besserten sich im Vergleich zu Placebo [141].

Offenbar moduliert PS die Freisetzung von Kortisol in Stress-Situationen. In einer Studie zu belastungsinduziertem Stress, lagen nach der Belastung die ACTH- und die Kortisolspiegel bei gesunden Probanden, die 800 mg PS täglich erhielten, niedriger als in der Placebogruppe. Vermutlich beeinflusst PS die hypothalamische Freisetzung von Corticotropin Releasing Faktor, der unter Stressbedingungen die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse aktiviert. Diese Beobachtung könnte auch die antidepressive Wirkung von PS erklären, da bei depressiven Patienten häufig ein Hyperkortisolismus zu beobachten ist [42, 44, 11, 112].

### **1.3. Künstliche Membransysteme**

Im Jahre 1964 beobachteten Bangham und Horn [10], dass sich Phospholipide in wässriger Lösung spontan zu lamellaren, konzentrischen Körpern, den Liposomen, zusammenschließen. Der Grund für das Selbstaggregationsverhalten

der Phospholipide beruht auf ihrer Zusammensetzung aus der hydrophoben Acylkette, dem zwischengeschobenen Glycerolrest und dem Phosphatester als hydrophilen Kopf. Die Summe der Wechselwirkungen von sich abstoßenden hydrophilen Kopfgruppen und der Anziehung der Moleküle durch die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten führt zur Ausbildung von Bilayerstrukturen, die in wässrigem Medium spontan liposomale Strukturen bilden. Besonders unter mechanischer Einwirkung bilden sich spontan auch multilamellare Liposomen [9].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Liposoms**

Abbildung nach Rückert [43]

Der Membranstruktur lebender Zellen sehr ähnlich, können sie mit Zellmembranen fusionieren, Lipide austauschen, an die Zelloberfläche adsorbieren und von ihnen phagozytiert werden [114].

Seither werden die Liposomen als künstliche Membranmodelle in der Biochemie und Molekularbiologie eingesetzt. Durch die Ähnlichkeit des Liposomenbilayers mit Zellmembranen weisen sie nur geringe Immunogenität auf und können mit Plasmalipoproteinen interagieren [8].

Durch die vor äußern Einflüssen schützende Lipidhülle eignen sich Liposomen als Medikamententräger für die intrazelluläre Therapie. Durch Inkorporierung nicht membrangängiger Substanzen in das Liposomeninnere erhofft man sich vor allem Schutz vor enzymatischem oder hydrolytischem Abbau. Mit Hilfe des Transportes in Liposomen soll das Pharmakon, um Nebenwirkungen zu verringern und einen höheren therapeutischen Effekt zu erreichen, gezielt seinen Wirkort erreichen. Über Phagozytose oder Membranfusion können die liposomal verkapselten Therapeutika intrazellulär aufgenommen werden. Dabei interagiert die äußere Lipidschicht der Liposomen mit den biologischen Membranen, Flüssigkeiten oder gelösten Stoffen, während die innere Lipidschicht vornehmlich mit den inkorporierten Substanzen wechselwirkt [70]. Liposomen werden parenteral, subkutan, oral und topisch appliziert [122].

Durch die kovalente Kopplung der Liposomenoberfläche mit Antikörpern [63], die an hydrophobe Anker-moleküle gekoppelt sind, oder Lektinen [7] kann ein gezieltes Drug Targeting vermittelt werden. Der gebundene Antikörper erkennt bestimmte Zellen und bringt sie durch Bindung mit dem Liposom in Kontakt. Das Liposom kann so seine inkorporierten Wirkstoffe vor Ort freigeben. Der Einbau von Monosialogangliosiden [50] oder an Polyethylenglykol gebundene Lipide [17] in den Lipidbilayer kann die Eliminierung der Liposomen durch das RES unterdrücken. Somit kann die Halbwertszeit im systemischen Kreislauf nach intravenöser Injektion verlängert werden. Die Liposomen-Zell-Interaktion ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Spezifische oder unspezifische Adsorption an die Zelloberfläche über Antikörper, Lektine oder bestimmte Rezeptoren, Endozytose der Liposomen, Fusion der liposomalen Lipiddoppelschicht mit der Zellmembran und der Austausch von Lipiden zwischen beiden Strukturen werden als die wichtigsten Prozesse angesehen [102, 66, 88].

Liposomen werden für die antimikrobielle und chemotherapeutische Therapie gegen parasitäre und fungide Infektionen sowie neoplastische Krankheiten eingesetzt [85, 49, 143, 14].

Nach der Definition der Proc. of Conference of the New York Academy of Sciences (1977) teilt man in drei Liposomentypen ein:

- kleine, unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUV), Größe 20 bis 50 nm
- große, unilamellare Vesikel (large unilamellar vesicles, LUV), Größe 60 bis 1000 nm
- multilamellare große Vesikel (multilamellar large vesicles, MLV), Größe 100 bis 5000 nm

Zur Herstellung der Liposomen können verschiedene Phospho- und Sphingolipide eingesetzt werden, wobei am häufigsten die Moleküle Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin, -glycerol, Sphingomyelin und Cholesterol zur Anwendung kommen.

Die Ladung der einzelnen Membranmonomere ergibt sich, wie in natürlichen Membransystemen, aus dem Zusammenwirken von einfach negativ geladenem Phosphorsäurerest des Glycerols und Ladung des angehängtem hydrophilen Kopfteiles.

Größe und Lamellarität der Liposomen variieren mit den unterschiedlichen Herstellungsmethoden, die von der einfachen Filmmethode [8] über mechanische Verfahren (wie z.B. Druckfiltration/Extrusion [91] oder Ultraschallbehandlung einer MLV-Suspension [64]), Lösungsmittelinjektion (bei denen in Ethanol oder Ether gelöste Lipide in Pufferlösungen eingebracht werden [33]) bis zu Gefrier-Tau-Verfahren [92] und der in vorliegender Studie verwendeten Mischzellen Dialyse [122] entwickelt worden sind. Die Dialyseverfahren beruhen auf dem Prinzip der Überführung von Mischmizellen, bestehend aus Phospholipiden und geeigneten Mengen und Typen von Detergentien, in unilamelläre Liposomen über Abdialysieren des Tensides. Das Verfahren ist ausschließlich thermodynamisch kontrolliert und nicht von äußeren Drücken, Scherkräften oder anderen Kräften zur Energieerzeugung abhängig, sodass seine milden Herstellungsbedingungen und der geringe Energieaufwand eine hohe Reproduzierbarkeit erzeugen [122, 100].

## 1.4. Lipidtransferproteine (LTP)

Lipidtransferproteine vermitteln den intrazellulären Transfer und Austausch von neutralen und geladenen Glycolipiden, Phospholipiden und neutralen Lipiden, wie Cholesterolester und Triglyceriden, zwischen Membranen [126, 153]. Ihre physiologische Aufgabe wird im Transport von Phospholipiden vom Ort ihrer Synthese im Endoplasmatischen Retikulum zu anderen Membranen der Zelle gesehen [36]. Die Proteine erfüllen vielleicht eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung zellulärer Membranen und in der Membranbiosynthese [36].

Abhängig von ihrer Lokalisation werden sie in extra- und intrazelluläre LTP klassifiziert. Extrazelluläre LTP findet man im Blutplasma einiger weniger Spezies. Obwohl sie auch Phospholipide transportieren, sind sie eher spezifisch für nicht membranbildende Lipide wie Triglyceride und Cholesterolester. Wahrscheinlich sind sie in vivo für den intravaskulären Transfer und Austausch von Fetten zwischen Plasmalipoproteinen oder zwischen Partikeln und Zellen zuständig. Intrazelluläre Phospholipidtransferproteine hingegen können aus vielen tierischen und pflanzlichen Geweben isoliert werden [126, 129].

Der intrazelluläre Austausch von Lipiden zwischen Mitochondrien und Mikrosomen aus der Rattenleber ist 1968 von Wirtz und Zilversmit erstmals beschrieben [154] und einige Jahre später ist LTP aus Rinderherz isoliert worden. Das intrazelluläre LTP ist in einer Vielzahl von Säugetieren, Pflanzen und Mikroorganismen nachgewiesen worden [126]. Abhängig von der Anzahl der spezifischen Lipide, die transportiert werden können, wird in mono-, oligo- und unspezifisches LTP unterschieden [129].

Metz und Radin [97] entdeckten 1980 erstmals Glycolipidtransferproteine (GLTP) die sie erst Cerebrosid-Aufnahme-Proteine nannten. Die Proteine katalysieren den Transfer von einer Vielzahl von neutralen oder geladenen Glycolipiden. Dabei sind die Transferraten invers zur Länge der Zuckerketten der Glycolipide korreliert [155]. Die ersten GLTP wurden aus Rindernieren isoliert und haben ein Molekulargewicht von 20.300 Dalton [98]. In der Folge konnten auch aus Rinderhirn [97, 54], Schweinehirn [11] und Rattenhirn [127] GLTP mit Molekulargewichten von 20.000 bis 23.000 [126] isoliert werden.

Obwohl die Funktionsmechanismen des LTP noch nicht vollständig verstanden sind, werden für einzelne LTP spezifische Reaktionsweisen diskutiert. Sasaki et al. [128] zeigten, dass GLTP mit den Glycolipiden einen intermediären wasserlöslichen Komplex bilden. Sie schneiden quasi die Lipide aus einer Membran, formen einen Komplex mit ihnen, transportieren das Lipid durch das wässrige Zellsoma – oder eine wässrige Lösung in vitro – und geben das Lipid dann an eine Akzeptormembran ab. Wahrscheinlich führen sie so einen Nettotransfer der Lipide von einer Donor- zu einer Akzeptormembran durch. Im Gegensatz zu bei unspezifischen LTP (ns-LTP) diskutierten Donormembran-LTP-Akzeptormembran-Komplexen, bei denen ein Austausch von „Donorlipiden“ gegen „Akzeptorlipiden“ diskutiert wird [126]. Kamp et al. beschreiben, wie Phosphatidylcholinspezifisches LTP sein Substrat in Form eines Komplexes bindet und das gebundene PC-Molekül mit einem anderen PC eines Monolayers austauschen kann [141, 72]. Oligospezifisches Phosphatidylinositol-Transportprotein, das als löslicher Lipidcarrier auch PC tragen kann, tauscht in Membranen mit geringem PI-Gehalt das mitgebrachte PI gegen PC der Membran aus [73]. Nichtspezifisches ns-LTP bindet Lipide nicht direkt [29, 147], sondern formt mit der Donor- und Akzeptormembran einen Komplex. Es ermöglicht und beschleunigt auf diese Weise den Austausch der Lipide von Membran zu Membran [147, 4, 96]. Nichols vermutet in Bezug auf den Lipidaustausch durch die ns-LTP einerseits einen monomeren als auch einen durch Kollision herbeigeführten Austausch [104].

Die physiologische Funktion der LTP wird im Membranaufbau und -erneuerung, als Carriersystem für nicht wasserlösliche Substanzen, die Substrate oder Produkte enzymatischer Reaktionen sind, und als Regulationsglied in der Biosynthese der Lipide vermutet.

Die LTP gestatten durch ihre vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten Einblick in die Verteilung der Lipide innerhalb biologischer Membranen zu nehmen, mit Hilfe des Einbaus radioaktiver Lipide Auskünfte über Asymmetrien und den Flip-Flop Mechanismus [47] zu erhalten und Vesikel/Zell – oder Zell/Zellwechselwirkungen zu beobachten. Sie geben Aufschluss über den Einfluss der Membranlipidzusammensetzung auf die Aktivität mikrosomaler Enzyme. Mittels

LTP-katalysiertem Einbau von Lysophosphatidylcholin in Rattenleber Mikrosomen beobachten Dyatlovitskaya et al. [39] Aktivitätssteigerung der Glucose-6-phosphat-Phosphohydrolase und Verringerung der Cytochrom P-450 Aktivität. Die Modifikation der Lipidzusammensetzung durch Einbringen von Phosphatidylinositol durch unspezifisches LTP in Plasmamembranen der Rinderschilddrüse führt zur Inhibition der TSH-stimulierten Adenylatcyclase [35]. Der Vorteil der Verwendung von LTP zur Herstellung zum Studium geeigneter Membransysteme besteht in der schonenden Modifikation, wobei keine membranzerstörenden Amphiphile wie das Lysophosphatidylcholin bei der Phospholipasebehandlung entstehen. Das Phospholipid-Protein-Verhältnis wird nicht, wie möglicherweise beim Einsatz von Phospholipidvesikeln, gestört und die Verwendung von LTP gestattet Inkubationsbedingungen, unter denen keine Veränderungen im Phospholipid-Cholesterolverhältnis entstehen. Änderungen im Cholesterolgehalt der Membran haben Effekte auf die Adenylatcyclaseaktivität gezeigt [35], deren physikochemischer Status die Komposition der Lipidumgebung beeinflusst [121].

### **1.5. Resonanz-Energie-Transfer (RET)**

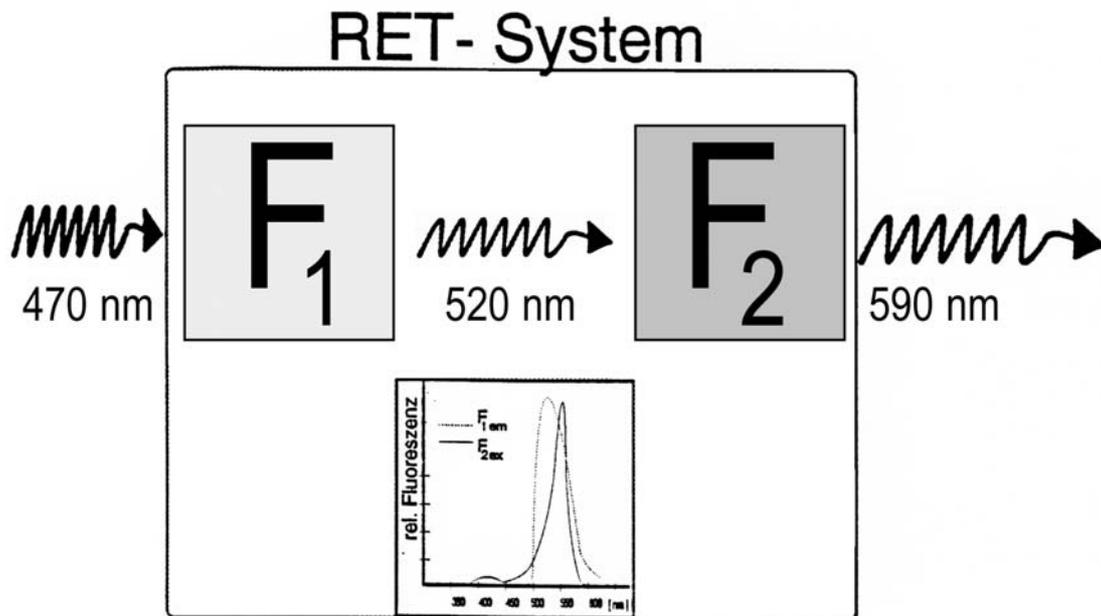
Der Austausch von Lipiden zwischen natürlichen und künstlichen Membranen unterschiedlichen Aufbaus mit Hilfe eines Lipidtransferproteins, kann durch unterschiedliche Testverfahren, NMR, ESR und Fluoreszenzspektroskopie [12], Antigeneinschluss in Liposomen und anschließende Trennung mittels Immunopräzipitation [41] und dem in vorliegender Studie verwendeten Energietransfersystem zwischen Nitrobenzoxadiazol (NBD) markierten Lipidanaloga und RhodaminB (RhB) markierten Lipiden [106] am Anstieg der Fluoreszenzemission dargestellt werden. Auch der Einbau pyrenmarkierter Lipide mit Quenchemolekülen wird im Fluoreszenztest gemessen [140]. Des Weiteren kann die Aktivität des Lipidtransferproteins mittels radioaktiver Markierung der zum Austausch anstehenden Lipide [35, 16] ermittelt werden.

Die Kinetik und Aktivität des Lipidtransfers zwischen Vesikeln messen Nichols und Pagano 1982 mit Hilfe einer Fluoreszenztechnik, die auf dem Resonanz-Energie-Transfer (RET) zwischen Nitrobenzoxadiazol (NBD) Acylkettenmar-

kierter Lipide und RhodaminB (RhB)-markierter Phospholipide beruht [105]. Die Auswertung des Assay bedarf im Gegensatz zu anderen Verfahren, die z.B. auf Radiomarkierung der Lipide beruhen, nicht der Separation der Donor- und Akzeptorvesikel.

Das Messprinzip beruht auf der räumlichen Nähe zweier Fluorophore, deren Emissions- und Anregungsspektren sich überlagern [106]. Fluorophore werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitationsbande) angeregt, d.h. mit Energie „aufgeladen“. Diese Energie strahlen sie als Licht bei einer anderen Wellenlänge (Emissionsbande) wieder ab. Dabei hat jede Fluorophorspezies für sie typische Exzitations- und Emissionsbande. Beim RET hat die Emissionsbande des von außen angeregten Fluorophors (Energiedonor) dieselbe Wellenlänge wie die Exzitationsbande des zweiten Fluorophors (Energieakzeptor). Die räumliche Nähe beider Fluorophore vorausgesetzt, absorbiert das zweite Fluorophor die vom ersten Fluorophor emittierten Energie komplett. Somit wird keine Emissionsbande im Abgabespektrum des ersten, sondern lediglich im Abgabespektrum des zweiten, erregten Fluorophors detektierbar. Nichols et al. geben einen Abstand von 5,58 nm für eine Energietransferrate von 50 % an [106], wogegen andere Autoren mögliche Abstände von 10 nm diskutieren [53]. Die Wechselwirkungsenergie zwischen angeregtem Donor und Akzeptor entspricht der zweier Dipole und nimmt mit der dritten Potenz des Molekülabstandes ab. Die Wahrscheinlichkeit für den Energieübertrag ist proportional zum Quadrat der Wechselwirkungsenergie und führt zu einer  $R^{-6}$ -Abhängigkeit. Somit dient der RET als empfindlicher Parameter für die räumliche Distanz zweier Fluorophore. Da die Dicke der Lipiddoppelschicht unilamellärer Liposomen 4,8 nm [123] beträgt, gibt es zwei Möglichkeiten der Anordnung von im RET stehender Fluorophore. Beide Fluorophore befinden sich in derselben Schicht oder eines ist im Außenlayer, das andere direkt gegenüber im Innenlayer lokalisiert. Durch den Einbau der Fluorophore NBD und RhB in Liposomen wird ihre benötigte Nähe erreicht. Stehen alle Fluorophore im RET wird lediglich Energie der höheren Emissionswellenlänge (bei 590 nm) frei. Durch Vergrößerung des Abstandes zwischen den Fluorophoren, wird auch Energie der Emissionswellenlänge des ursprünglich angeregten Fluorophors

(bei 520 nm) abgegeben. In Abhängigkeit von Vesikelgröße, Lipidzusammensetzung und Konzentration der Fluorophore wird der Abstand und die Orientierung zueinander und damit die Größe des Energietransfers beeinflusst [106].



**Abbildung 3: Resonanz-Energie-Transfer**

Abbildung nach Rückert [43]

## 1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Lipidzusammensetzungen in biologischen Membranen variieren. Dies führt unter anderem zu verschiedenen Ladungszuständen der Membrane. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Funktion des Phosphatidylseringehaltes und des Glycolipidgehaltes in biologischen Membranen, vor allem in Nervenzellmembranen gelegt. Mehrere Studien zeigten einen Einfluss von PS auf das Fusionsverhalten und den Lipidaustausch zwischen Membranen.

Liposomen sind seit 1964 bekannt. Seither dienen sie als Membranmodell und werden in den letzten Jahren zunehmend als Drug carrier eingesetzt. Liposomen besitzen die Eigenschaft mit anderen Liposomen, respektive Membranen Lipide austauschen zu können. Es konnte festgestellt werden, dass es mehrere Einflussgrößen auf die Lipidtransferfähigkeit der Liposomen gibt, wie z.B. Lipidzusammensetzung und Größe der Liposomen, Temperatur und pH im Medium und Ladungseigenschaften der Lipide.

Da sich hydrophobe Lipide im wässrigen Zellsoma nicht frei aufhalten können, übernehmen Lipidtransferproteine den Transport der Lipide durch das wässrige Milieu, z.B. von ihrem Entstehungsort (endoplasmatische Retikulum) zu den Zielmembranen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den Einfluss von Krümmung und Ladung biologischer Membrane auf den Lipidtransferprotein gestützten Lipidtransfer zwischen Membranen zu untersuchen.

Hierzu wird als in vitro Model der Transfer von Glycolipiden von Donorliposomen auf Akzeptorliposomen untersucht. Der Transfer wird durch die Zugabe von Glycolipidtransferprotein katalysiert. Die Zusammensetzung der Donorliposomen variiert ausschließlich bezüglich der verwendeten Glycolipide (Galactorespektive Glucocerebroside). Die verwendeten Akzeptorliposomen variieren sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Ladung. Die Transferaktivität wird mittels Resonanz-Energie-Transfer gemessen.

### 1.6.1. Ziele und Aufgabenstellung im Einzelnen sind

1. Herstellung und Charakterisierung zweier Donorliposomenspezies die das RET-System enthalten (NBD-Cerebroside und RhodaminB-PE),
2. Herstellung und Charakterisierung von insgesamt 45 verschiedenen Akzeptorliposomenspezies, die durch unterschiedlicher Lipidzusammensetzung in Größe (damit in ihrer Membrankrümmung) und Ladung variieren
  - Zur Variation im Ladungsverhalten werden 15 Lipidzusammensetzungen gewählt:
    - reine PC-Liposomen
    - PC/PS-Liposomen (Verhältnis 9/1 bis 1/9) und
    - PC/PE-Liposomen (Verhältnis 9/1 bis 5/5)
  - Zur Variation der Liposomendurchmesser werden die drei Detergentien OG, Na-Cholat und POE4 verwendet. Die Lipidzusammensetzung hat ebenfalls Einfluss auf die Liposomengröße
3. Gewinnung und Aufreinigung von Glycolipidtransferprotein aus Rinderhirn
4. Lipidtransferaktivitätsbestimmung des Systems Donorliposom-Akzeptorliposom-GLTP
5. des weiteren wird in der vorliegenden Arbeit, die Methode des Resonanz-Energie-Transfer als Testsystem für die Quantifizierung des Lipidtransfer überprüft.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Name	Abkürzungen	Herkunft
Salzsäure 1 N	HCl	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1 N	NaOH	Merck, Darmstadt
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumcholat	Na-Cholat	Merck, Darmstadt
Tetraoxyethylenglykolmonoethylester	POE <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-Cholin	PC	Sigma, St. Lois, USA
L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-Serin	PS	Sigma, St. Lois, USA
Methanol	MeOH	Merck, Darmstadt
N- Octyl- $\beta$ - D- Glucopyranosid	OG	Sigma, St. Lois, USA
Natriumchlorid	Na Cl	Merck, Darmstadt
3-[ N-Morpholino ] propansulfon Säure	MOPS	Sigma, St. Lois, USA
Aqua-dest		Fresenius AG
NBD-Glucocerebroside	NBD-Glu	Sigma, St. Lois, USA
NBD-Galactocerebroside	NBD-Gal	Sigma, St. Lois, USA
L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin	PE	Sigma, St. Lois, USA
N-(Lissamin-Rhodamin-B-sulfonyl)-diacyl Phosphatidylethanolamin	RhB-PE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Natriumdithionit	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Sigma, St. Lois, USA
Triton-X-100	Triton	Merck, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N-2-ethan-sulfonsäure	HEPES	Sigma, St. Lois, USA
Sucrose		Sigma, St. Lois, USA
Ethylendinitrolotetraessigsäure Tetranatriumsalz	EDTA	Serva, Heidelberg
3,6-Dioxaoctamethylendinitrolotetra-essigsäure	EGTA	Merck, Darmstadt

Di-Dithiotreitol	DTT	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Merck, Darmstadt
Amoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck, Darmstadt
Phenol-Reagenz nach Folin-Ciolcateu		Merck, Darmstadt
Natrium-Carbonat	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	$\text{Cu}_2\text{SO}_4$	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	K-Na-Tartrat	Merck, Darmstadt

### 2.1.2. Filter und Dialysematerial

Name	Herkunft
Millex-OR 0,22 µm Filter	Millipore S.A. (Molsheim/ France)
Millex-HA 0,45 µm Filter	Millipore S.A. (Molsheim/ France)
Dialysemembran, cutoff MG 10000 Dalton	Diachema (Appenzell/ Schweiz)
Dialyseschlauch, cutoff MG 10000 Dalton	Reichert (Heidelberg)

### 2.1.3. Lösungen

#### MOPS-Puffer:

10 mM MOPS Na-Salz

150 mM NaCl

mit HCl auf pH 7,35-7,40 eingestellt

#### Gewebeaufschlusspuffer:

10 mM HEPES

250 mM Suchrose

10 mM EDTA-Na-Salz

5 mM EGTA

0,2 mM DTT

1 mM PMSF

mit HCl auf pH 7,35-7,40 eingestellt

#### 2.1.4. Geräte

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
Rotationsverdampfer	Büchi, Schweiz
Lyophilisator Typ 1052	Christ®, Osterode, Deutschland
Lipoprep® - Dianorm	Diachem AG, Langenau, Schweiz
Nano-Sizer™ Coulter®	Coulter® Electronics LTD. Harpden, England
Liposomat Typ GD1	Diachem AG, Langenau, Schweiz
Fluorimeter SFM 25	Kontron Instruments, Rotkreuz, Schweiz
Messerhomogenisator	Edmund Bühler, Tübingen
Downshomogenisator	Edmund Bühler, Tübingen
Ultrazentrifuge Typ L 5-75	Beckmann, München
Zentrifuge Typ CEN-GPR	Beckmann, München
Rotor T 647,5	Sorvall Instruments, Wilmington, USA
Maxicoldlab 2021	Pharacia-LKB, Uppsala, Schweden
Easy Reader	SLT, Crailsheim

#### 2.1.5. Tiermaterial

Rinderhirn (schlachtfrisch)

Schlachthof, Tübingen

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Liposomenpräparation und -charakterisierung

#### 2.2.1.1. Theorie zur Liposomenpräparation

Alle in den Versuchen verwendeten Liposomen werden mit der Methode der schnellen, kontrollierten Detergenzdialyse nach Milsman und Schwendener hergestellt [123]. Die Methode beruht auf folgendem Prinzip:

Eine Phospholipid-Detergenz-Mischung wird in ein wenig Lösungsmittel (Methanol) gelöst und in einen Rundkolben gegeben. Am Rotationsverdampfer wird durch Unterdruck, mittels Wasserstrahlpumpe, das Lösungsmittel weitgehend entfernt. Anschließend wird der entstandene Phospholipid-Detergenz-Film über Nacht bei Unterdruck ( $\leq 0,2$  mbar) lyophilisiert, um die letzten Reste des Lösungsmittels zu entfernen. Der Phospholipid-Detergenz-Film wird in MOPS-Puffer aufgenommen. In diesem wässrigen Milieu entstehen gemischte Mizellen. Diese Mizellenlösung wird sterilfiltriert und in die Dialysekammer des jeweiligen Liposomaten gegeben. Zur Herstellung der Akzeptorliposomen wird der Liposomat Typ GD1 mit 5 Dialysekammern à 1 ml Volumen verwendet. Bis zur Liposomen Bildung nach ca. 3 bis 4 Stunden wird gegen 5 l MOPS-Puffer dialysiert, dann wird der Puffer erneuert und für weitere 20 Stunden dialysiert. Zur Herstellung der Donorliposomen wird die Mizellenlösung in die 8 ml fassende Kammer des Lipoprep<sup>®</sup> gegeben. Gegen MOPS-Puffer wird daraufhin für 6 Stunden dialysiert um das Detergenz zu entfernen. Die Pufferdurchflussrate beträgt während der ersten Stunde 250 ml/h und später 100 ml/h. Bei beiden Liposomaten hat die verwendete Dialysemembran eine Ausschlussgrenze von 10 kDa. In den Kammern befinden sich nun in Puffer gelöste unilamelläre Bilayer Liposomen homogener Größe. Die hergestellten Liposomen werden bei Raumtemperatur aufbewahrt, die Fluoreszenzliposomen werden vor Lichteinfall geschützt.

### **2.2.1.2. Bestimmung der Liposomengröße und Polydispersität**

Die Größe und Polydispersität der Liposomen werden mittels Photonenkorrelations-spektroskopie am Nanosizer<sup>®</sup> bestimmt [32]. Für die Messungen werden 10 µl Liposomen 1:100 mit MOPS-Puffer verdünnt und in ein Glasröhrchen gegeben. Das Gerät misst die durch die Brown'sche Bewegung verursachte Schwankung der Partikelstreuung. Aus der quantitativen Erfassung der Schwankungen der Streulichtintensität berechnet der Apparat den Vesikeldurchmesser. Dies geschieht über eine Autokorrelationsfunktion.

Mit diesem Verfahren können Partikelgrößen von 1 nm bis 5 µm bestimmt werden. Außerdem wird die Polydispersität von 0 bis 9 angegeben. Die Polydispersität ist ein Maß für die Schwankungsbreite der Streulichtintensität und damit für die Größenhomogenität der Partikelsuspension. Je kleiner die Polydispersität, desto einheitlicher sind die Liposomen. Aus jeweils 10 Messungen wird der Mittelwert errechnet.

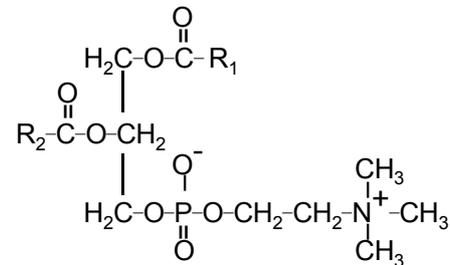
### **2.2.2. Akzeptorliposomen**

Um den Einfluss von Größe und Ladung der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer zu ermitteln, werden einerseits verschiedene Lipidzusammensetzungen und andererseits verschiedene Detergentien zur Herstellung der Akzeptorliposomen gewählt. Alle Akzeptorliposomen haben eine Gesamtlipidkonzentration von 17 mmol/l (= 13 mg). Pro Akzeptorliposomencharge wird ein 1 ml Ansatz gewählt.

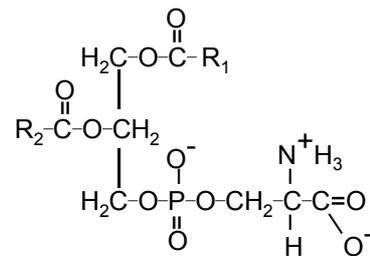
### 2.2.2.1. Verschiedene Lipidzusammensetzungen

In dieser Arbeit werden die folgenden drei Lipide verwendet.

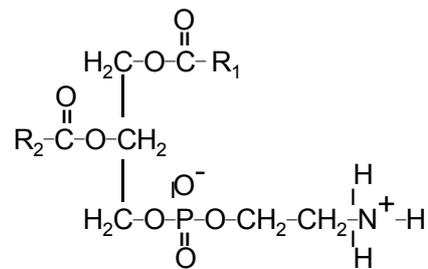
1. L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-Cholin (PC):



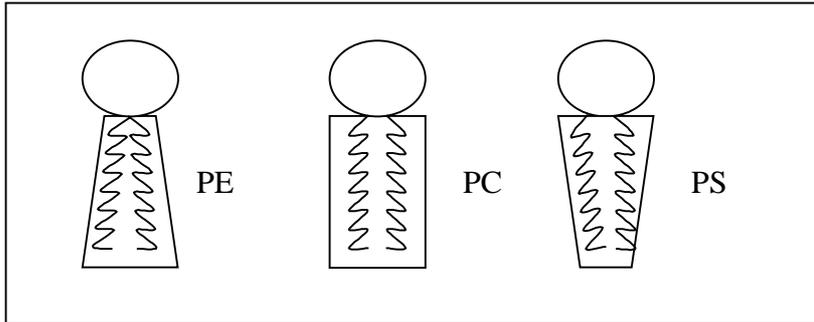
2. L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-Serin (PS):



3. L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin (PE):



Die räumliche Struktur der Lipide zeigt Unterschiede. PC hat eine zylindrische, PE eine konische Struktur. Dies führt dazu das PE sich hauptsächlich im Innenlayer anreichert und zur Entstehung größerer Liposomen beiträgt. Je höher der Anteil an PS, mit einer eher antikonischen Struktur, desto kleiner die Liposomen [80]. Bei einem pH von 7 bis 8 ist PS negativ geladen während PC und PE keine elektrische Ladung aufweisen.



**Abbildung 4: Schematisierte Darstellung der Lipide**

Die Lipidzusammensetzung der Akzeptorliposomen wird, wie in Tabelle 1, auf Seite 31 aufgelistet, gewählt.

**Tabelle 1: Lipidzusammensetzung der Akzeptorliposomen**

Lipide	Prozentuales Verhältnis
PC	100
PC/PS	90/10
PC/PS	80/20
PC/PS	70/30
PC/PS	60/40
PC/PS	50/50
PC/PS	40/60
PC/PS	30/70
PC/PS	20/80
PC/PS	10/90
PC/PE	90/10
PC/PE	80/20
PC/PE	70/30
PC/PE	60/40
PC/PE	50/50

### 2.2.2.2. Verschiedene Detergentien

Bei der kontrollierten Detergenzdialyse hat die Wahl des Detergenz einen wesentlichen Einfluss auf die Größe der generierten Liposomen. Je größer das verwendete Detergenz, desto größer die gebildeten Liposomen. In dieser Arbeit finden Natriumcholat, N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (OG) und Tetraoxyethylenglykolmonoethylenester (POE4) als Detergentien Verwendung.

Dabei wird pro Detergenz jede obengenannte Lipidzusammensetzung zur Herstellung von Akzeptorliposomen eingesetzt. So dass insgesamt 45 verschiedene Akzeptorliposomenarten zur Verfügung stehen.

Pro 1 ml Ansatz werden 12,5 mg Natriumcholat oder 25 mg OG bzw. 35 mg POE4 zu den 13 mg Lipid gegeben.

Natriumcholat wird aus Reinheitsgründen vorher 2fach umkristallisiert. Hierzu wird eine fast gesättigte Lösung von Natriumcholat in Methanol hergestellt. Diese wird auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und dann gesättigt. Nach Filtration durch einen Faltenfilter, wird das Filtrat am Rotationsverdampfer eingemengt bis erste Kristalle ausfallen. Es wird wenig Methanol hinzu gegeben und die Lösung wird in den Kühlschrank gestellt um auskristallisieren zu können. Nach erfolgter Auskristallisation wird per Nutsche und Wasserstrahlpumpe Methanol abgezogen. Über Nacht wird in einem Exicator, mittels Polyethylenglykol das restliche Methanol entfernt. Das so gewonnene Natriumcholat wird erneut umkristallisiert.

### 2.2.3. Donorliposomen

Zur Bestimmung des Lipidtransfers wird ein von Miller et al. entwickeltes Testverfahren verwendet [99]. Es beruht auf dem Resonanz-Energie-Transfer (RET) zweier Fluorophore. In der vorliegenden Arbeit werden fluoreszenz-markierte Lipide in Donorliposomen eingebaut. Die Donorliposomen werden mittels Detergenzdialyseverfahren hergestellt. Rückert [123] zeigte, dass ein Optimum des Lipidtransfers unter folgenden Bedingungen zu erreichen ist: Verhältnis PC zu PS von 7/3, Verhältnis NBD zu RhodaminB markiertem PE (RhB-PE) von 1/1 und einer Donorliposomengröße von 200 nm. Chattopadhyay empfiehlt [28] eine niedrige NBD Konzentration um 1 mol%, da NBD bei höheren Konzentrationen eine „Selbstausschöpfung“ (self quenching) der Fluoreszenz zeigt.

Bei einer Gesamtlipidkonzentration von 17 mmol/l wird deshalb folgende Lipidzusammensetzung gewählt: 68,95 % PC, 29,55 % PS, 1,75 % NBD-Gal (bzw. NBD-Glu-) und 1,75 % RhB-PE.

#### 2.2.3.1. Prinzip des Resonanz-Energie-Transfers

Zwei räumlich eng benachbarte Fluorophore überlagern sich in ihrem Anregungs- und Emissionsspektrum. Wird Fluorophor 1 bei  $\lambda = x$  angeregt, emittiert es Licht bei  $\lambda = y$ . Fluorophor 2 wird hierdurch bei  $\lambda = y$  angeregt wobei es das von Fluorophor 1 ausgestrahlte Licht komplett absorbiert. Seinerseits emittiert Fluorophor 2 Licht bei  $\lambda = z$ . Bei räumlicher Nähe und äquivalentem Verhältnis der Fluorophore 1 und 2 wird also nach Anregung bei  $\lambda = x$  Licht nur bei  $\lambda = z$  emittiert und nicht bei  $\lambda = y$ .

In dieser Arbeit wird als Fluorophor 1 Nitrobenzoxadiazol markierte Acylketten von einerseits Galactopyranosylceramiden (NBD-Gal) und andererseits von Glucopyranosylceramiden (NBD-Glu) verwendet. Diese beiden werden optimal bei  $\lambda = 472$  nm angeregt und emittieren ihrerseits dann Licht bei  $\lambda = 520$  nm. Als Fluorophor 2 dient N-(Lissamin-Rhodamin-B-sulfonyl) diacyl Phosphatidylethanolamine (RhB-PE). Wird RhB-PE bei  $\lambda = 510$  bis 530 nm angeregt,

emittiert es Licht bei 592 nm. Diese Fluorophore werden in Donorliposomen eingebaut, um die für den RET entscheidende Nähe der Fluorophore zu gewährleisten. Nichols et al. gibt einen Abstand von 5,58 nm für einen 50 % Energietransfer an. Laut Galler [53] ist ein RET über Abstände bis zu einem Bereich von 10 nm möglich. Die Wechselwirkungsenergie zwischen angeregtem Donor und Akzeptor entspricht der zweier Dipole und nimmt demzufolge mit der dritten Potenz des Molekülabstandes ab. Die Wahrscheinlichkeit für den Energieübergang ist proportional zum Quadrat der Wechselwirkungsenergie und führt zu einer  $R^{-6}$ -Abhängigkeit. Somit dient der RET als sehr empfindlicher Parameter für das „sich in der Nähe Befinden“ zweier Fluorophore. Da die Dicke der Lipiddoppelschicht unilamellärer Liposomen 4,8 nm [123] beträgt, gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten der Anordnung von im RET stehenden Fluorophoren. Entweder befinden sich beide Fluorophore nebeneinander in einer der zwei Lipidschichten oder ein Fluorophor befindet sich im Außenlayer, das andere sich direkt gegenüber im Innenlayer.

Erfüllen NBD-Glu (bzw. NBD-Gal) und RhB-PE zu 100 % die Bedingungen des RET-Systems, so wird bei einer Anregung  $\lambda = 472$  nm Licht im Maximum bei 595 nm emittiert, während bei 520 nm kein Licht detektiert werden kann. Werden die Fluorophore von einander getrennt, z.B. durch Lipidtransfer, so kann bei 520 nm Licht gemessen werden. Da RhB-PE unter diesen Bedingungen nicht transferiert wird, nimmt nur NBD-Glu (bzw. NBD-Gal) am Lipidaustausch der Donor- und Akzeptorliposomen teil. Die Zunahme der Emission bei 520 nm ist somit proportional zum NBD-Glu (bzw. NBD-Gal) Transfer.

### **2.2.3.2. Bestimmung des in Resonanzenergie stehenden Anteils der Fluorophore**

Der Anteil der in Resonanzenergie stehenden NBD-Fluorophore wird bestimmt, in dem Emissionsspektren vor und nach Zugabe von Triton X-100 aufgezeichnet wurden. Triton X-100 zerstört die liposomale Struktur der Donorliposomen. Die fluoreszenz-markierten Lipide gehen als Monomere in Lösung und befinden

sich dadurch nicht mehr in der nötigen Nähe. Ein RET findet nicht mehr statt. Als Monitor für den Energietransfer dient die Zunahme der relativen Fluoreszenz bei  $\lambda = 520$  nm, bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 472$  nm. Da Triton das emittierte Licht teilweise auslöscht („quenching“) muss der Triton-Quench-Faktor (siehe Abschnitt 2.2.6. auf Seite 42) miteingerechnet werden.

Versuchsaufbau:

Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 472$  nm

Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 520$  nm

Donorliposomen 20  $\mu\text{l}$

1. in Puffer 2000  $\mu\text{l}$
2. bzw. in Triton X-100 2 % 2000  $\mu\text{l}$

Der in Resonanzenergie stehende Anteil NBD lässt sich wie folgt berechnen:

$$E_{\%} = \left( 1 - \frac{F_p}{F_t \cdot Q} \right) \cdot 100$$

Mit  $E_{\%}$  = Anteil NBD in RET,  $F_p$  = relative Fluoreszenz bei 520 nm in Pufferlösung,  $F_t$  = relative Fluoreszenz bei 520 nm in 2 % Triton X-100 und  $Q$  = Triton-Quench-Faktor.

### 2.2.3.3. Bestimmung der Sensitivität der Donorliposomen

Die Sensitivität der Donorliposomen und damit des gesamten Testprinzips wird durch den Anteil der NBD-Cerebroside bestimmt, die sowohl im RET stehen als auch am Lipidtransfer teilnehmen können. Dies sind nur diejenigen, die sich im Außenlayer der Donorliposomen befinden. Zur Berechnung dieses Anteils verfolgt man die Reduktion der NBD-Nitrogruppe mit Na-Dithionit zur Aminogruppe. Der reduzierte Fluoreszenzfarbstoff Aminobenzdiazol (ABD) zeigt im Gegensatz zu NBD keine Fluoreszenz im untersuchten Spektrumsbereich. 100  $\mu\text{l}$  Donorliposomen werden in 2 ml Puffer gegeben und im Fluorimeter SFM 25 bei  $\lambda_{\text{ex}} = 472$  nm angeregt. Die Zugabe von bis zu 100  $\mu\text{l}$  1 %iger Na-Dithionit-Lösung führt nun zu einer Reduktion der sich im Außenlayer

befindenden NBD-Cerebroside. Dadurch stehen diese Fluorophore dem RET nicht mehr zur Verfügung. Es resultiert eine Abnahme der relativen Fluoreszenz bei  $\lambda_{em} = 595 \text{ nm}$ , die proportional zum im Außenlayer lokalisiertem Anteil des im RET stehenden NBD ist. Analog ist bei  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$  die Abnahme der Fluoreszenz proportional zum Außenlayeranteil des freien, d.h. nicht im RET stehenden NBD.

## **2.2.4. Lipidtransferproteinisolierung und Proteinbestimmung**

### **2.2.4.1. Gewebeaufschluss**

Ein Rinderhirn wird schlachtfrisch sofort auf Eis gekühlt, die Hirnhäute werden entfernt. Das Rinderhirn wird zum Transport in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Alle weiteren Arbeitsschritte werden fortan bei 0 bis  $4^{\circ}\text{C}$  Eiskühlung durchgeführt. 65 g Rinderhirn werden mit 260 ml Aufschlusspuffer (1/5 w/v) zuerst im Messerhomogenisator (15 s bei 20.000 U/min) und dann im Douncehomogenisator homogenisiert. Zur Entfernung der größeren Partikel wie Zelltrümmer, Zellkerne und nicht zerkleinerter Gewebestücke wird das Homogenisat bei 5.000 g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und in der Ultrazentrifuge bei 105.000 g 2 Stunden zentrifugiert. Hierbei werden RES, Mikrosomen und Mitochondrien sedimentiert. Im Überstand befinden sich jetzt die zytosolischen Komponenten.

### **2.2.4.2. Proteinisolierung mittels Amoniumsulfatfällung**

Der durch Gewebeaufschluss gewonnene Überstand wird dekantiert und einer zweistufigen Amoniumsulfatfällung unterzogen. Dazu wird zuerst Amoniumsulfat mittels Mörser fein zermahlen. Um die notwendigen 0 bis  $4^{\circ}\text{C}$  Versuchstemperatur zu garantieren erfolgen sämtliche Schritte der Amoniumsulfatfällung im Maxicoldlab.

**40 % Amoniumsulfatfällung:**

22,60 g Amoniumsulfat werden pro 100 ml Überstand unter ständigem Rühren hinzugegeben. Um lokale Überkonzentrationen zu vermeiden muss die Zugabe sehr langsam erfolgen. Die Lösung wird 2 Stunden gerührt. Der entstandene Niederschlag wird bei 15000 g für 15 min pelletiert und verworfen. Der Überstand hingegen wird dem zweiten Schritt der Amoniumsulfatfällung unterzogen.

**90 % Amoniumsulfatfällung:**

33,5 g Amoniumsulfat werden pro 100 ml Überstand wiederum unter ständigem Rühren, diesmal jedoch zügig, hinzugegeben. Die Lösung wird über Nacht gerührt und zentrifugiert (15.000 g, 15 min). Das entstandene Pellet wird in etwas MOPS-Puffer aufgenommen und 24 Stunden gegen MOPS-Puffer dialysiert. Die dazu verwendeten Dialyseschläuche werden vorher in EDTA-Na<sub>2</sub> ausgekocht:

Die so gewonnene Proteinlösung wird umgehend zur Versuchsdurchführung eingesetzt. Für die Versuche, die nicht umgehend durchgeführt werden, und für die Proteinbestimmung werden Aliquots bei -18°C eingefroren.

**2.2.4.3. Proteinbestimmung nach Lowry et al.**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Dialysat wird eine modifizierte Methode von Lowry angewendet [86]. Diese Methode kombiniert die Biuret-Reaktion von Proteinen mit der durch Tyrosin- und Tryptophanreste hervorgerufenen Reduktion des Phenol-Reagenz nach Folin-Ciocalteu.

Lösungen:

## A) Phenol-Reagenz nach Folin-Ciocalteu

Das Reagenz wird mit Aqua dest. 1:2 (V/V) verdünnt und in brauner Flasche bei 4°C aufbewahrt.

## B) Natrium-Carbonat-Lösung (2 %, 0,04 M)

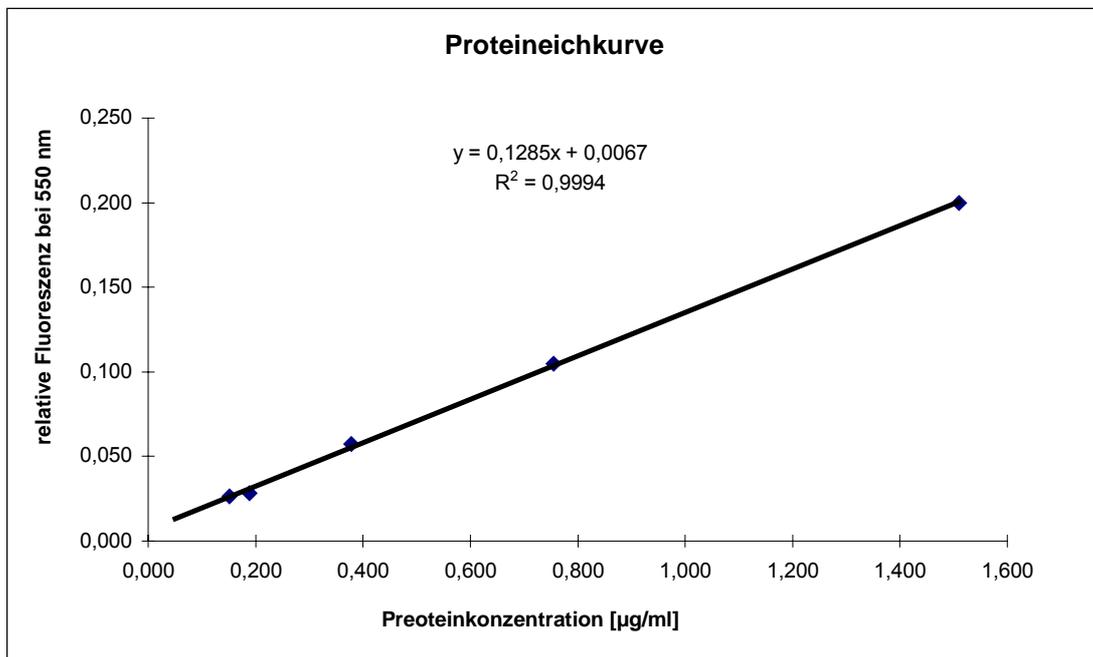
2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt; bei Raumtemperatur unbeschränkt haltbar.

- C) Kupfersulfat-Lösung (1 %, 0,04 M)  
1 g  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt; bei Raumtemperatur unbeschränkt haltbar.
- D) Kalium-Natrium-Tartat-Lösung (2 %, 0,071 M)  
2 g K-Na-Tartrat  $\times 4 \text{H}_2\text{O}$  werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt; bei Raumtemperatur unbeschränkt haltbar.
- E) Folin-Gebrauchslösung  
0,5 ml Lösung C + 0,5 ml Lösung D werden gut gemischt und auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösung muss vor jedem Gebrauch frisch angesetzt werden.

Zu 2 ml Folin-Gebrauchslösung werden 0,1 ml der Probe pipettiert (beim Leerwert 0,1 ml Aqua dest.), gut durchgemischt und nach 10 Minuten 0,2 ml des Phenol-Reagenz hinzugefügt.

Nach 30 Minuten wird die Extinktion gegen Aqua dest. bei 550 nm im Easy Reader gemessen. Da das Lambert-Beersche Gesetz nur im linearen [123] Messbereich gültig ist, müssen zu hohe Proteinkonzentrationen vor einer genauen Bestimmung entsprechend verdünnt werden.

#### 2.2.4.4. Proteineichkurve



**Abbildung 5: Standardeichkurve der Lowry Proteinbestimmung**

Eichlösung: 1,51 mg/ml Rinder Serum Albumin  
Mittelwerte jeweils aus  $n = 3$  Bestimmungen

Zur Erstellung der Proteineichkurve dient Rinder Serum Albumin von Bio Rad mit einer Stammkonzentration von 1,51 mg/ml als Standard. Dreifachbestimmungen werden für die Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:10 der Stamm-lösung durchgeführt. Aus diesen Werten kann dann eine Eichgerade berechnet werden. In der vorliegenden Arbeit ergibt sich die Proteineichgerade  **$y = 0,1285x + 0,0067$**  mit dem Regressionskoeffizienten  **$R^2 = 0,9994$** .

#### 2.2.4.5. Proteinbestimmung der GLTP-Lösung

Gleichzeitig mit der Eichkurven Erstellung werden Verdünnungen der GLTP-Lösung von 1:2, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:160 bearbeitet und im Easy Reader gemessen. Die gemessenen Extinktionen werden mit der Proteineichgeradengleichung in die Proteinkonzentration der Verdünnung umgerechnet. Teilt man diesen Wert durch das Verdünnungsverhältnis so erhält man die Protein-

konzentration der GLTP-Lösung. Da der Easy Reader verlässlich Werte nur für Extinktionen im Bereich 0,050 bis 0,300 liefert, werden nur Verdünnungen berücksichtigt, deren gemessene Extinktion zwischen 0,050 und 0,300 liegen.

## **2.2.5. Messung der GLTP-Aktivität mittels RET**

### **2.2.5.1. Prinzip der fluormetrischen Messung**

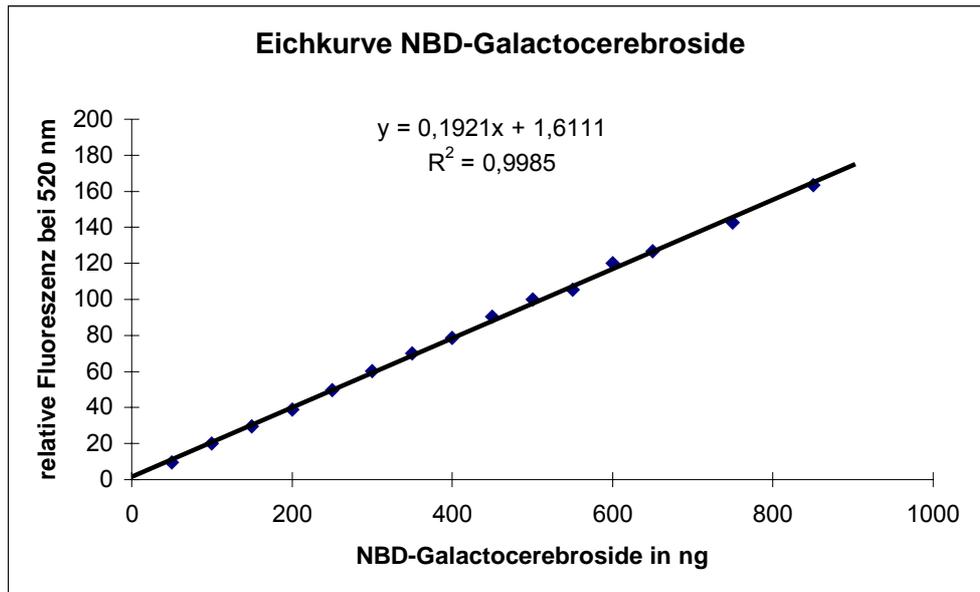
Donor- und Akzeptorliposomen definierter Mengen werden mit 2 ml Puffer in die Messkammer des Fluorimeter SFM 25 gegeben. Bei  $\lambda_{\text{ex}} = 427 \text{ nm}$  angeregt, entspricht eine Zunahme der Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  dem Anteil der mittels Lipidtransfer aus dem RET Verbund herausgelösten NBD-Cerebroside. Gemessen werden kann jedoch nur die Änderung der relativen Fluoreszenz in %. Um die gewünschte Maßeinheit von x ng NBD zu erlangen, muss der Fluorimeter in seiner Empfindlichkeit (High Voltage) geeicht werden. Der Fluorimeter SFM 25 reagiert bzgl. seiner Messempfindlichkeit auf die Raumtemperatur. Deshalb muss er vor und während jeder Messreihe geeicht werden.

### **2.2.5.2. NBD Eichkurven**

Da NBD-Cerebroside nicht wasserlöslich sind, wird zur Eichung des Fluorimeter folgende Eichlösung hergestellt:

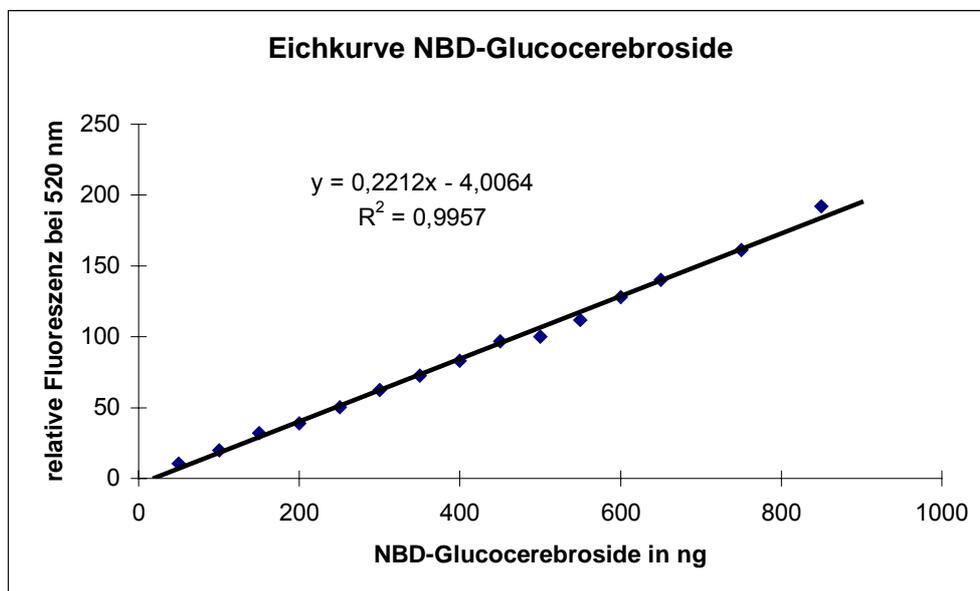
- 500  $\mu\text{g}$  NBD-Glu (bzw. NBD-Gal)
- in 1 ml Methanol
- in 99 ml 2 % Triton X-100 Lösung.

Dies entspricht einer Konzentration von  $c = 5000 \text{ ng NBD-Cerebroside/ml}$ .



**Abbildung 6: Standard Eichkurve für NBD-Galactocerebroside**

Eichlösung: in Methanol und Triton X-100 gelöste NBD Galactocerebroside mit einer Konzentration von  $c = 5.000$  ng/ml; Empfindlichkeit des Fluorimeters: High Voltage = 622 V; mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9985 lässt sich die Regressionsgerade  $y = 0,192x + 1,61$  darstellen.



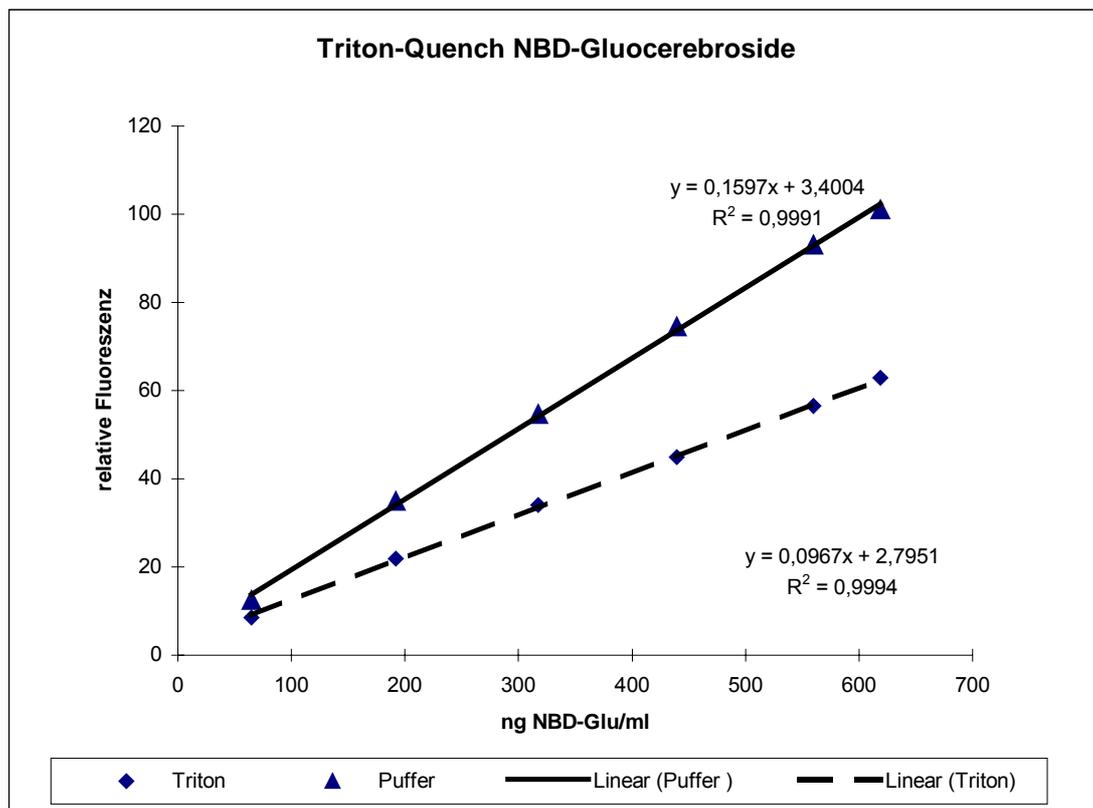
**Abbildung 7: Standard Eichkurve NBD-Glucocerebroside**

Eichlösung: in Methanol und Triton X-100 gelöste NBD Glucocerebroside mit einer Konzentration von  $c = 5.000$  ng/ml; Empfindlichkeit des Fluorimeters: High Voltage = 668 V; mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,996 lässt sich die Regressionsgerade  $y = 0,221x - 4,01$  darstellen.

### 2.2.6. Triton-Quench-Faktor

NBD-Cerebroside zeigen je nach Milieu unterschiedliche Fluoreszenzwerte. Das Detergenz Triton X-100 führt durch seine Anwesenheit zu einer Verminderung der Lichtemission (bei  $\lambda_{em} = 520$ ) nm von (bei  $\lambda_{ex} = 472$  nm) angeregten NBD-Cerebroside. Dies bezeichnet man als Triton-Quench. Zur Berechnung des Triton-Quench-Faktors werden 0,1 % NBD-Cerebroside enthaltende Eichliposomen hergestellt (Detergenzdialyseverfahren) und damit ebenfalls Eichkurven erstellt.

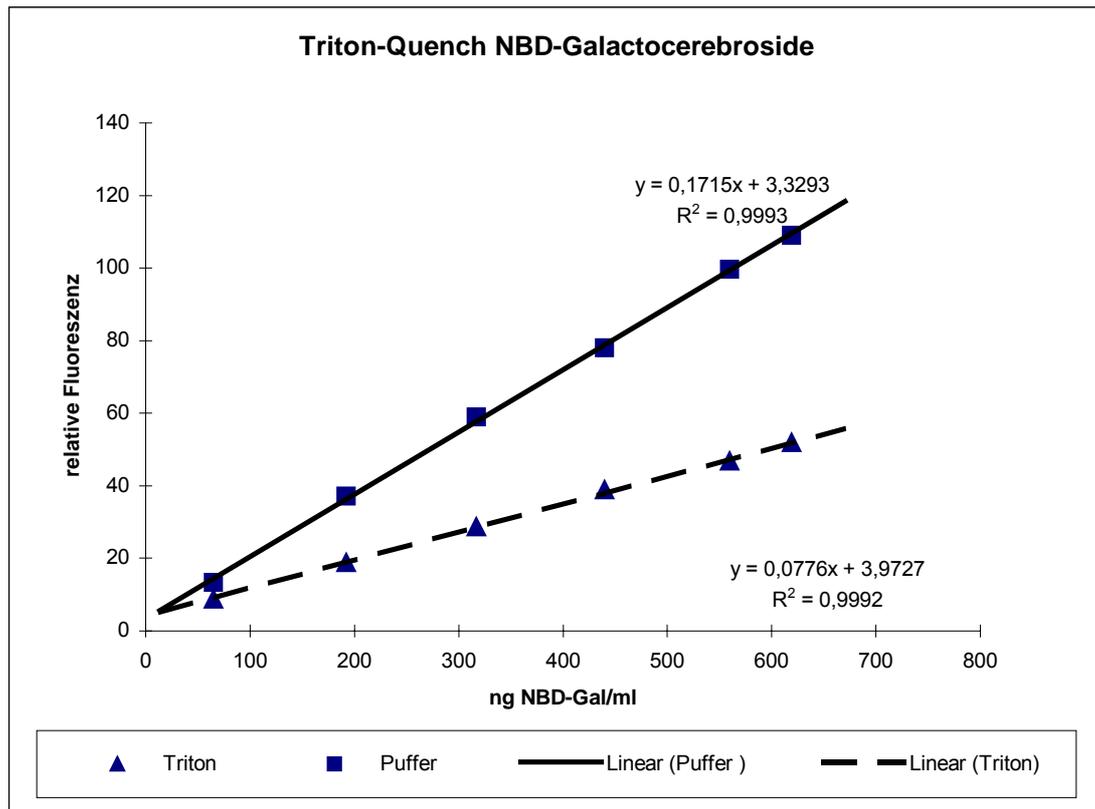
Eichliposomen 5 ml Ansatz: 125 mg OG, 64,94 mg PC, 0,071 mg NBD-Glu (bzw. NBD-Gal) in 5 ml Puffer aufgenommen



**Abbildung 8: Triton-Quench NBD-Gluocerebroside**

Standardeichkurven 0,1 % NBD-Gluocerebrosidliposomen vor und nach Zugabe von Triton X-100. Durch Division der Steigung der Näherungskurven vor (Steigung = 0,1597) und nach (Steigung = 0,0967) Zugabe von Triton X-100 lässt sich der Triton-Quench-Faktor bestimmen.

Ergebnis: Quench-Faktor = 1,65



**Abbildung 9: Triton-Quench NBD-Galactocerebroside**

Standardeichkurven 0,1 % NBD-Galactocerebrosidliposomen vor und nach Zugabe von Triton X-100. Durch Division der Steigung der Näherungskurven vor (Steigung = 0,1715) und nach (Steigung = 0,0776) Zugabe von Triton X-100 lässt sich der Triton-Quench-Faktor bestimmen.  
 Ergebnis: Quench-Faktor = 2,21

Durch Division der Steigung der Eichkurve 2 (NBD-Eichliposomen in Puffer) durch die Steigung der Eichkurve 1 (NBD-Eichliposomen in Triton) erhält man den Triton-Quench-Faktor. Da die jeweiligen x-Achsenabstände nur geringfügig voneinander abweichen (< 0,7 % relative Fluoreszenz) können sie bei der Berechnung vernachlässigt werden.

Somit ergibt sich für **NBD-Glu** ein **Quench-Faktor** von **1,65** und für **NBD-Gal** von **2,21**.

### 2.2.6.1. GLTP-Aktivitätsmessung

Zur Messung der Lipidtransferproteinaktivität wird das oben geschilderte RET-Testsystem verwendet. Als Versuchskomponenten dienen zwei Liposomenspezies:

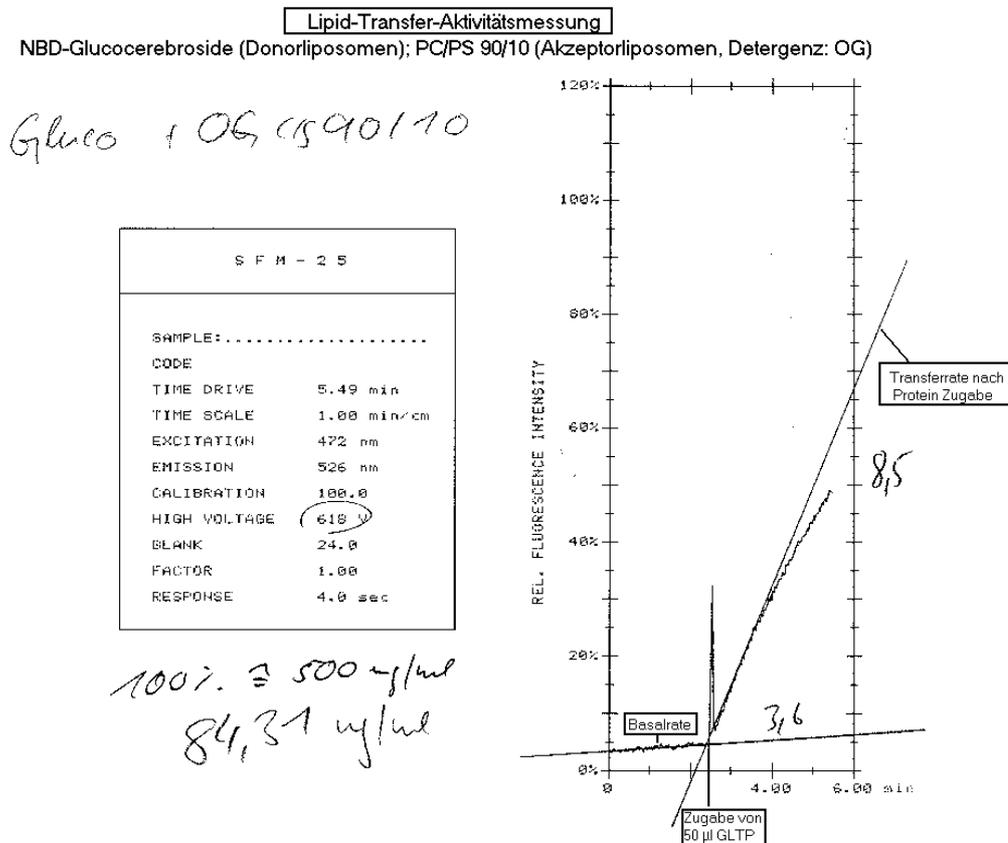
1. **Donorliposomen**, die das RET-System enthalten, und sich lediglich in der Art der NBD-Cerebroside (NBD-Glu bzw. NBD-Gal) unterscheiden und
2. **Akzeptorliposomen**, die in der Lipidzusammensetzung und verwendetem Detergenz variieren, und somit unterschiedliche Größe und elektrische Ladung aufweisen.

Werden Donor- und Akzeptorliposomen in die Kammer des Fluorimeters gegeben und bei  $\lambda_{\text{ex}} = 472 \text{ nm}$  angeregt, zeigt sich eine geringfügige Steigerung der Emission bei  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ , dies entspricht dem Basalaustausch. Dies entspricht dem nicht GLTP katalysierten Austausch von NBD-Cerebroside. Er kommt zu Stande durch Fusionsprozesse, Verdünnungseffekte und Lösung monomerer Lipideinheiten.

Durch Zugabe von GLTP in obige Lösung wird der eigentliche katalysierte Lipidtransfer induziert. Hierbei werden einerseits Lipidmoleküle (vornehmlich bei den hier verwendeten GLTP, NBD-Cerebroside) aus dem Membranverbund entfernt und andererseits Lipidmoleküle inseriert. Beide Aktionen führen dazu, dass die im RET stehenden Fluorophore von einander räumlich getrennt werden. Man kann nun einen steilen Anstieg der Emission bei  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  beobachten, der proportional zur transferierten NBD-Cerebrosidemenge ist. Wie oben geschildert, wird vor und während jeder Versuchsreihe der Fluorimeter je nach zu erwartender Lipidtransferrate auf 100 % relative Fluoreszenz = 250, 500 bzw. 1.000 ng NBD-Cerebroside geeicht.

Bestimmungsansatz:

Geräteeinstellung:  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ , High Voltage z.B. 599 V;  
Küvettenvolumen: 2170  $\mu\text{l}$ ; Donorliposomen: 20  $\mu\text{l}$ ; Akzeptorliposomen: 100  $\mu\text{l}$ ;  
GLTP: 50  $\mu\text{l}$  (bei niedriger Transferrate 100  $\mu\text{l}$ ); MOPS-Puffer: 2000  $\mu\text{l}$



**Abbildung 10: Beispiel der Lipid-Transfer-Aktivitätsmessungen**

Obige Abbildung zeigt beispielhaft den Scan der Messung der Transferaktivität. time drive = Dauer des Scans ( $t_0$  bis  $t_{\text{end}}$ ), time scale = Papiergeschwindigkeit, Excitationswellenlänge = 472 nm, Emissionswellenlänge = 526 nm, Kalibrierung 100 % = 500 ng NBD-Glucocerebroside/ml, Geräteempfindlichkeit = High Voltage = 618 V.  $t_0 = 0$  min: Beginn der Messung mit 20  $\mu\text{l}$  NBD-Glu-Donorliposomen und 100  $\mu\text{l}$  Akzeptorliposomen (PC/PS 90/10; Detergenz OG) in 2 ml Puffer;  $t_1 = 2,5$  min: Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  GLTP. Bei der Zugabe des GLTP wird die Kammer des Fluorimeters geöffnet, das einfallende Umgebungslicht verursacht auf dem Scan eine „scheinbare“ Emissionspitze (= systematischer Fehler). Basalrate von  $t_0$  bis  $t_1$ ; proteinkatalysierter Transfer von  $t_1$  bis  $t_{\text{end}} = 5,49$  min.

Aus dem Delta der Steigungen proteinkatalysierter Transfer zu Basalrate lässt sich die GLTP induzierte Transferaktivität berechnen. Da der Proteinkatalysierte Transfer eine Sättigungskurve zeigt, wird zur Bestimmung der maximalen Transferrate per Hand eine Gerade an die Anfangssteigung gelegt.

In obigem Beispiel ergibt sich ein proteinkatalysierter Transfer von 84,31 ng NBD-Glucocerebroside/ml Lösung in 1 min. 2,170 ml Lösung enthalten 50  $\mu\text{l}$  GLTP, somit enthält 1 ml 23  $\mu\text{l}$ , dies entspricht 0,52 mg GLTP. Bei einem Triton-Quench-Faktor von 1,65 errechnet sich die Transferrate folgendermaßen:  $X = (84,31 \text{ ng NBD}/(\text{ml} \cdot \text{min}))/0,52 \text{ mg GLTP}/\text{ml}) \cdot 1,65 = 267 \text{ ng NBD}/(\text{mg GLTP} \cdot \text{min})$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Größe der Akzeptorliposomen in Abhängigkeit Lipidzusammensetzung und des verwendeten Detergenz

##### 3.1.1. Mit Na-Cholat hergestellte Liposomen

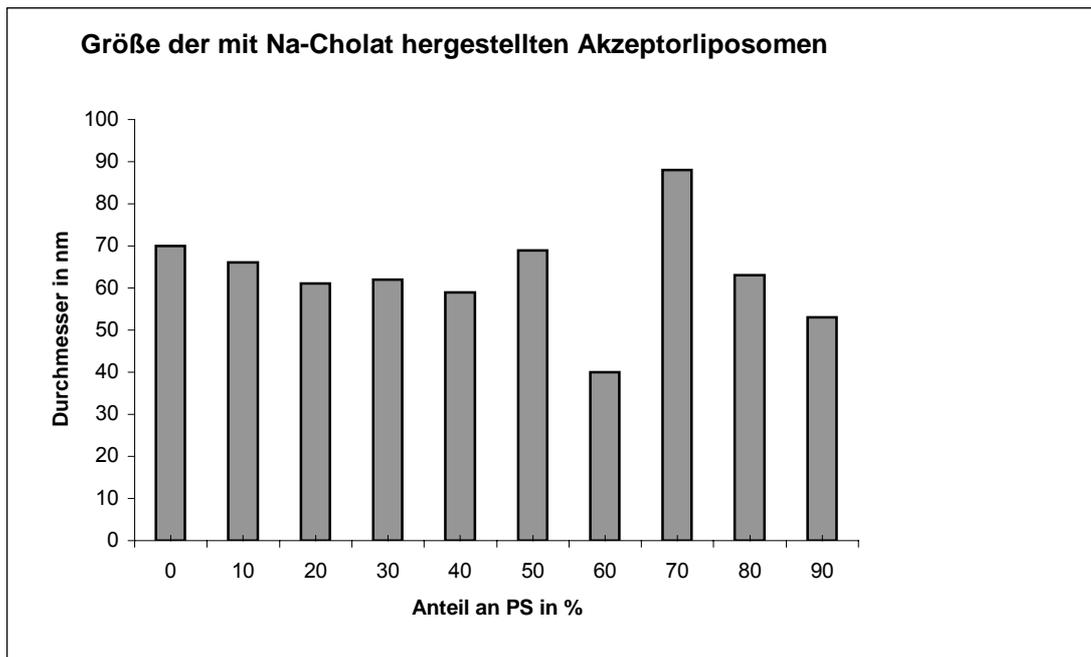
Alle mit **Na-Cholat** hergestellten Akzeptorliposomen weisen eine Polydispersität von null auf, d.h. jede Charge ist in sich optimal Größenhomogen.

Tabelle 2 auf Seite 47 und die dazugehörige Abbildung 11 auf Seite 47 zeigen die Größenverhältnisse der mit Na-Cholat hergestellten **PC/PS** Akzeptorliposomen. Bis auf die zwei „Ausreißer“ PC/PS 40/60 mit 40 nm und 30/70 mit 88 nm, schwanken die Größen zwischen 53 nm und 70 nm mit einer Standardabweichung von 12,3 nm um den Mittelwert von 63,1 nm. Eine Korrelation zwischen Größen und Lipidzusammensetzung ist nicht zu erkennen.

Wie aus Tabelle 3 auf Seite 48 und Abbildung 12 auf Seite 48 ersichtlich ist, schwankt die Größe der **PC/PE** Liposomen zwischen 66 nm und 92 nm um den Mittelwert von 76,2 nm mit einer Standardabweichung 10,6 nm. Eine Korrelation zwischen Größe und Lipidzusammensetzung ist hier ebenfalls nicht zu erkennen. PC/PE 50/50 weicht mit 195 nm stark von den anderen Liposomen dieser Klasse ab.

**Tabelle 2: Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils**

Anteil PC in %	Anteil PS in %	Größe in nm	Polydispersität
100	0	70	0
90	10	66	0
80	20	61	0
70	30	62	0
60	40	59	0
50	50	69	0
40	60	40	0
30	70	88	0
20	80	63	0
10	90	53	0

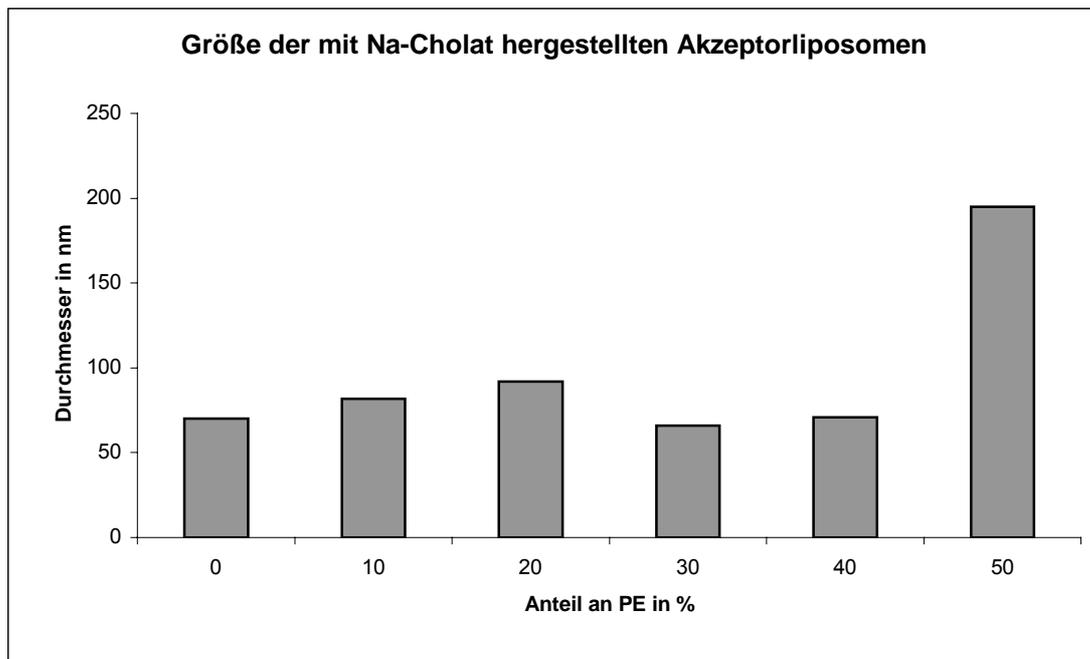


**Abbildung 11: Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils**

Größe der Akzeptorliposomen = Durchmesser der Liposomen;  
Mittelwerte aus je n = 10 Messungen; Detergenz: Na-Cholat

**Tabelle 3: Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils**

Anteil PC in %	Anteil PE in %	Größe in nm	Polydispersität
100	0	70	0
90	10	82	0
80	20	92	0
70	30	66	0
60	40	71	0
50	50	195	0



**Abbildung 12: Größe der Na-Cholat Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils**

Größe der Akzeptorliposomen = Durchmesser der Liposomen;  
Mittelwerte aus je n = 10 Messungen; Detergenz: Na-Cholat

### 3.1.2. Mit OG hergestellte Liposomen

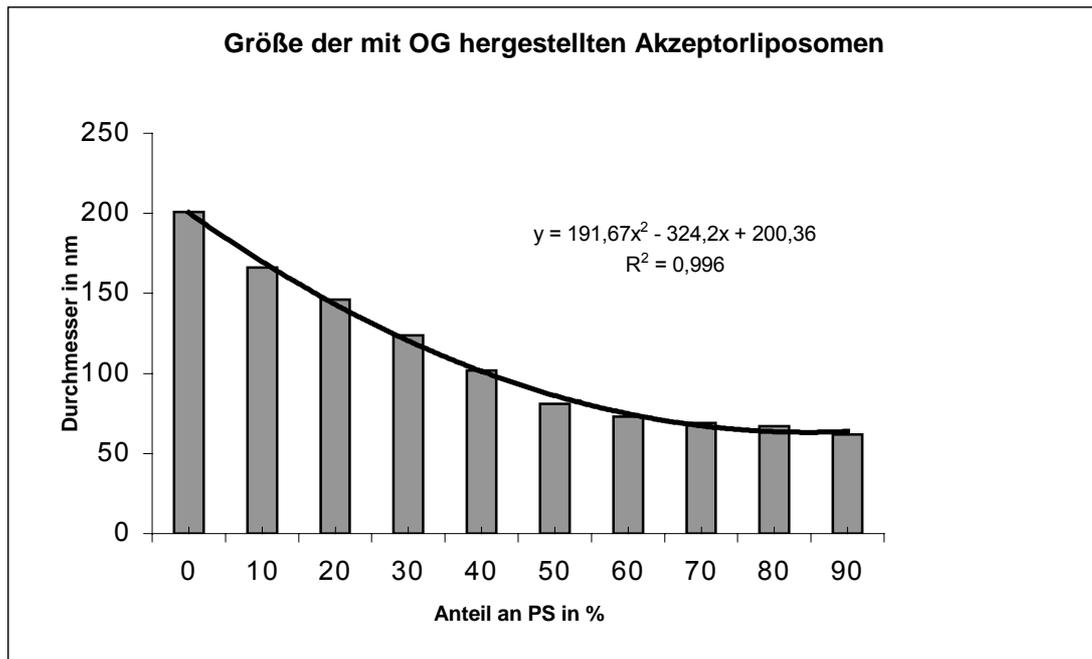
Alle mit **OG** hergestellten Akzeptorliposomen weisen ebenfalls eine Polydispersität von null auf. Sie sind im Durchschnitt etwas größer als die mit Na-Cholat hergestellten Liposomen.

Die Größen der **PC/PS** Liposomen sind in Tabelle 4 auf Seite 49 und der zugehörigen Abbildung 13 auf Seite 50 dargestellt. Die Größe dieser Liposomen nimmt von PC 100 mit 201 nm bis PC/PS 10/90 mit 62 nm ab. Für den Bereich PC 100 bis PC/PS 10/90 kann die Korrelation zwischen Größe der Liposomen ( $y$  in nm) und prozentuaalem Anteil an PS ( $x$ ) mit folgender Regressionsgeraden  $y = 191,67x^2 - 324,2x + 200,36$  dargestellt werden. Das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten  $R^2 = 0,996$  gibt ein sehr hohes Bestimmtheitsmaß an. Für den Bereich von 0 bis 90 % PS-Anteil gilt je größer der Anteil an PS desto kleiner die Liposomen.

Tabelle 5 auf Seite 50 und Abbildung 14 auf Seite 51 zeigen die Größenverhältnisse der mit OG hergestellten **PC/PE** Liposomen. Die Größen reichen von PC/PE 80/20 mit 184 nm bis PC/PE 70/30 mit 239 nm, mit einer Standardabweichung von 25,7 nm um den Mittelwert von 81,9 nm. Eine Korrelation Größe zum Anteil PE findet sich nicht.

**Tabelle 4: Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils**

Anteil PC in %	Anteil PS in %	Größe in nm	Polydispersität
100	0	201	0
90	10	166	0
80	20	146	0
70	30	124	0
60	40	102	0
50	50	81	0
40	60	73	0
30	70	69	0
20	80	67	0
10	90	62	0

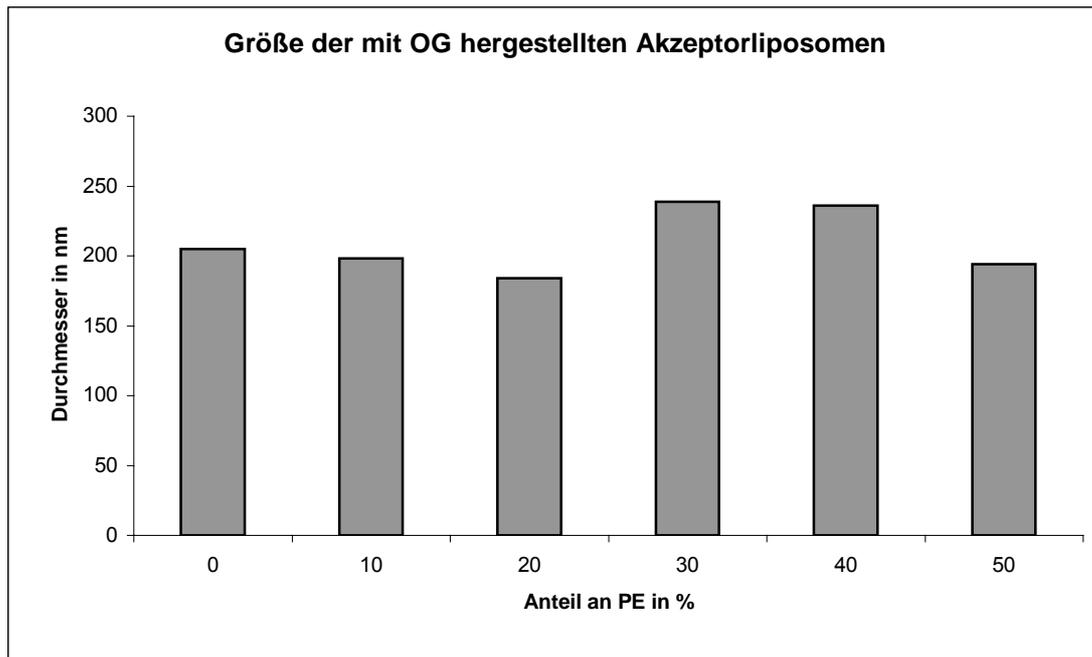


**Abbildung 13: Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils**

Größe der Akzeptorliposomen = Durchmesser der Liposomen;  
 Mittelwerte aus je n = 10 Messungen; Detergenz: OG.  
 Die Regressionsgerade hat mit 0,996 einen sehr hohen Korrelationskoeffizienten, sie wurde mit Microsoft Excel<sup>®</sup> errechnet.

**Tabelle 5: Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils**

Anteil PC in %	Anteil PE in %	Größe in nm	Polydispersität
100	0	201	0
90	10	198	0
80	20	184	0
70	30	239	0
60	40	236	0
50	50	194	0



**Abbildung 14: Größe der OG Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils**

Größe der Akzeptorliposomen = Durchmesser der Liposomen;  
 Mittelwerte aus je n = 10 Messungen; Detergenz: OG.  
 Eine Korrelation Durchmesser zum Anteil an PE konnte nicht gefunden werden.

### 3.1.3. Mit POE4 hergestellte Liposomen

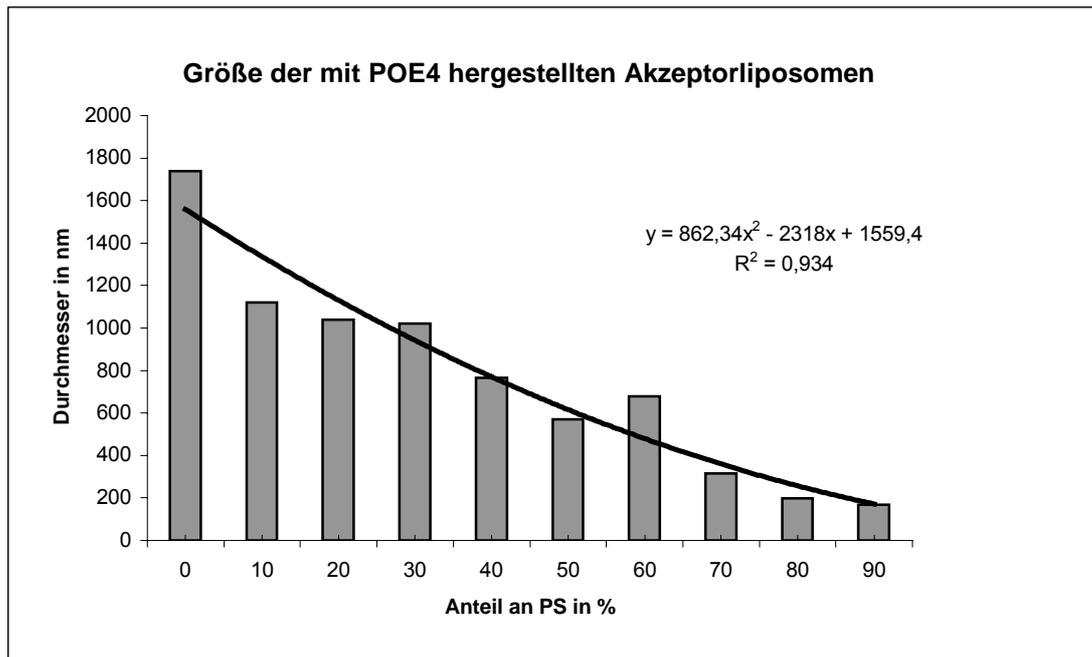
Auch alle mit **POE4** als Detergenz hergestellten Akzeptorliposomen haben eine Polydispersität von null. Sie sind deutlich größer (bis 2360 nm) als die mit Na-Cholat oder OG hergestellten Liposomen.

Aus Tabelle 6 auf Seite 52 und Abbildung 15 auf Seite 53 können die Größenwerte der **PC/PS** Liposomen entnommen werden. Die Größe dieser Liposomen nimmt von PC 100 mit 1740 nm bis PC/PS 10/90 mit 168 nm kontinuierlich ab. D.h. je größer der Anteil an PS desto kleiner die Liposomen. Für den Bereich PC 100 bis PC/PS 10/90 kann die Korrelation zwischen Größe der Liposomen (y in nm) und prozentuaalem Anteil an PS (x) mit folgender Regressionsgeraden  $y = 862,34x^2 - 2318x + 1559,4$  dargestellt werden. Das Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten  $R^2 = 0,934$  gibt ein hohes Bestimmtheitsmaß an.

Bei den **PC/PE** Liposomen findet sich im Gegensatz dazu, ebenso wie bei den mit Na-Cholat oder OG hergestellten PC/PE Liposomen, keine klare Korrelation zwischen Größen und PE-Anteil. Tabelle 7 auf Seite 53 und Abbildung 16 auf Seite 54 zeigen jedoch die Tendenz, dass mit Ausnahme von PC/PE 80/20 die Durchmesser der Akzeptorliposomen mit zunehmenden PE-Anteil von PC/PE 90/10 mit 2360 nm bis PC/PE 50/50 mit 1070 nm abnehmen.

**Tabelle 6: Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils**

Anteil PC in %	Anteil PS in %	Größe in nm	Polydispersität
100	0	1740	0
90	10	1120	0
80	20	1040	0
70	30	1020	0
60	40	767	0
50	50	572	0
40	60	680	0
30	70	314	0
20	80	199	0
10	90	168	0

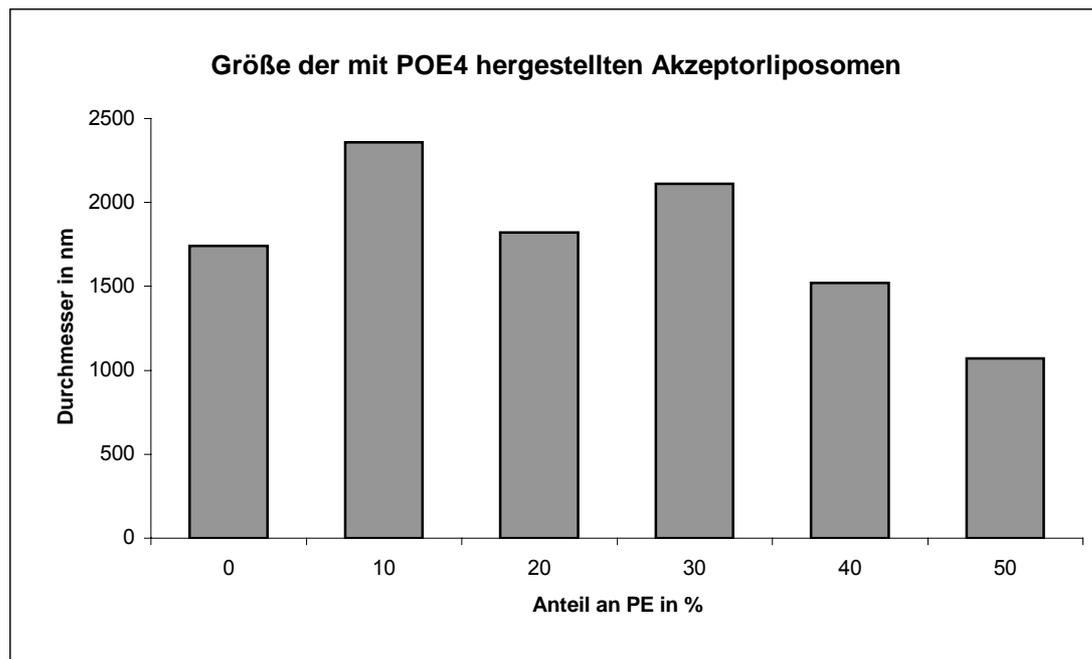


**Abbildung 15: Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PS-Anteils**

Größe der Akzeptorliposomen = Durchmesser der Liposomen;  
Mittelwerte aus je n = 10 Messungen; Detergenz: POE4.  
Die Regressionsgerade hat mit 0,934 einen hohen Korrelationskoeffizienten, sie wurde mit Microsoft Excel<sup>®</sup> errechnet.

**Tabelle 7: Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils**

Anteil PC in %	Anteil PE in %	Größe in nm	Polydispersität
100	0	1740	0
90	10	2360	0
80	20	1820	0
70	30	2110	0
60	40	1520	0
50	50	1070	0



**Abbildung 16: Größe der POE4 Liposomen in Abhängigkeit des PE-Anteils**

Größe der Akzeptorliposomen = Durchmesser der Liposomen;  
Mittelwerte aus je n = 10 Messungen; Detergenz: POE4. Eine Korrelation  
Durchmesser zum Anteil an PE konnte nicht gefunden werden.

### 3.2. Charakterisierung der Donorliposomen

**Tabelle 8: Charakterisierung der Donorliposomen**

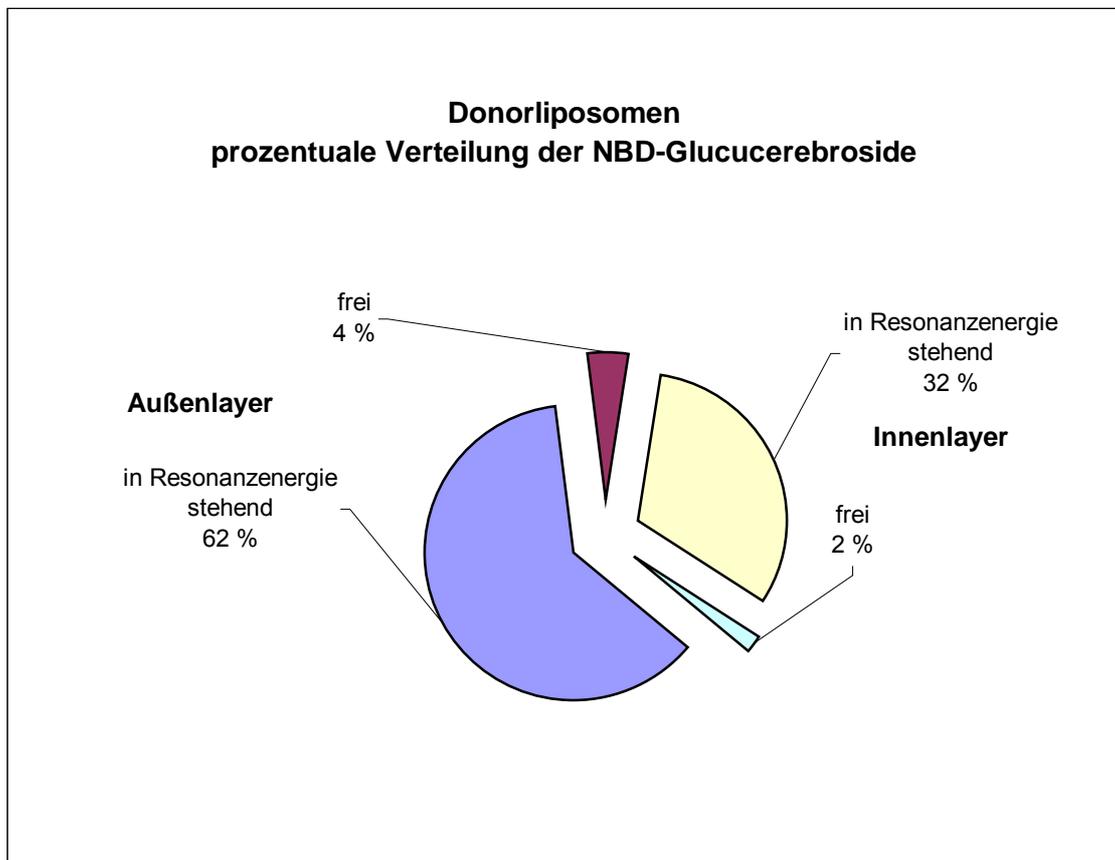
Charakterisierung der Donorliposomen mit		
	NBD-Glucocebrosiden	NBD-Galactoccebrosiden
Größe	193 nm	195 nm
Polydispersität	0	0
NBD-Emissionsmax.	520 nm	520 nm
RhodaminB-Emissionsmax.	592 nm	595 nm
Sensitivität	93,4 %	95 %

Die Sensitivität entspricht dem Verhältnis Anteil an NBD-Cerebrosiden des Außenlayers, die in Resonanzenergie – d.h. nah genug zu den Rhodamin PE Lipiden – stehen zu dem Anteil an freien NBD-Cerebrosiden im Außenlayer die nicht in Resonanzenergie stehen.

**Tabelle 9: Verteilung der NBD-Cerebroside in den Donorliposomen**

Verteilung der NBD-Cerebroside in % des Gesamt-NBD-Cerebrosidegehalts			
		NBD- Glucocebroside	NBD- Galactoccebroside
Außenlayer	in Resonanzenergie	62 %	58 %
	frei	4 %	3 %
Innenlayer	in Resonanzenergie	32 %	37 %
	frei	2 %	2 %
gesamt		100 %	100 %

### 3.2.1. Donorliposomen mit NBD-Glucocerebroside



**Abbildung 17: Verteilung der NBD-Glucocerebroside**

Für den Lipidtransfer stehen 66 % der gesamten NBD-Glucocerebroside, da sie sich im Außenlayer der Donorliposomen befinden, zur Verfügung. Insgesamt 62 % der gesamten oder 93,4 % der NBD-Glucocerebroside des Außenlayers befinden sich im Außenlayer und nah genug den RhodaminB-PE-Lipiden, diese stehen also dem RET-Testsystem zur Verfügung.

#### 3.2.1.1. Größe und Polydispersität

Die Größe und Polydispersität der Donorliposomen wurde im Nanosizer bestimmt. Eine Polydispersität von null bedeutet höchstmögliche Größenhomogenität einer Liposomencharge.

Die NBD-Glucocerebroside und als Fluorophorpartner RhodaminB enthaltenden Donorliposomen waren bei einer Polydispersität von null 193 nm groß.

### 3.2.1.2. Emissionsmaxima

Mittels Fluoreszenzscans konnten bei diesen Liposomen folgende Emissionsmaxima gefunden werden. NBD-Glucocerebroside hat sein Emissionsmaximum bei 520 nm und RhodaminB bei 592 nm.

### 3.2.1.3. Anteil der im RET stehenden NBD-Glucocerebroside

Wie viel der NBD-Cerebroside sich in Resonanzenergie befinden, lässt sich anhand folgender Gleichung berechnen. Es gilt:

$$E_{\%} = \left( 1 - \frac{F_p}{F_t \cdot Q} \right) \cdot 100$$

Relative Fluoreszenz Donorliposomen in 2 ml Puffer:  $F_p = 10,1 \%$

Relative Fluoreszenz Donorliposomen in 2 ml Triton:  $F_t = 159 \%$

Triton-Quench-Faktor NBD-Glucocerebroside:  $Q = 1,65$

Daraus folgt: 94 % der NBD-Glucocerebroside stehen in Resonanzenergie  
nur 6 % liegen als „freie“ NBD-Glucocerebroside vor.

### 3.2.1.4. Sensitivität der Donorliposomen mit NBD-Glucocerebroside

Die Sensitivität der Donorliposomen wird durch den Anteil der NBD-Cerebroside bestimmt, die sich im Außenlayer der Donorliposomen befinden und in Resonanzenergie zu RhodaminB stehen (siehe 2.2.3.3.).

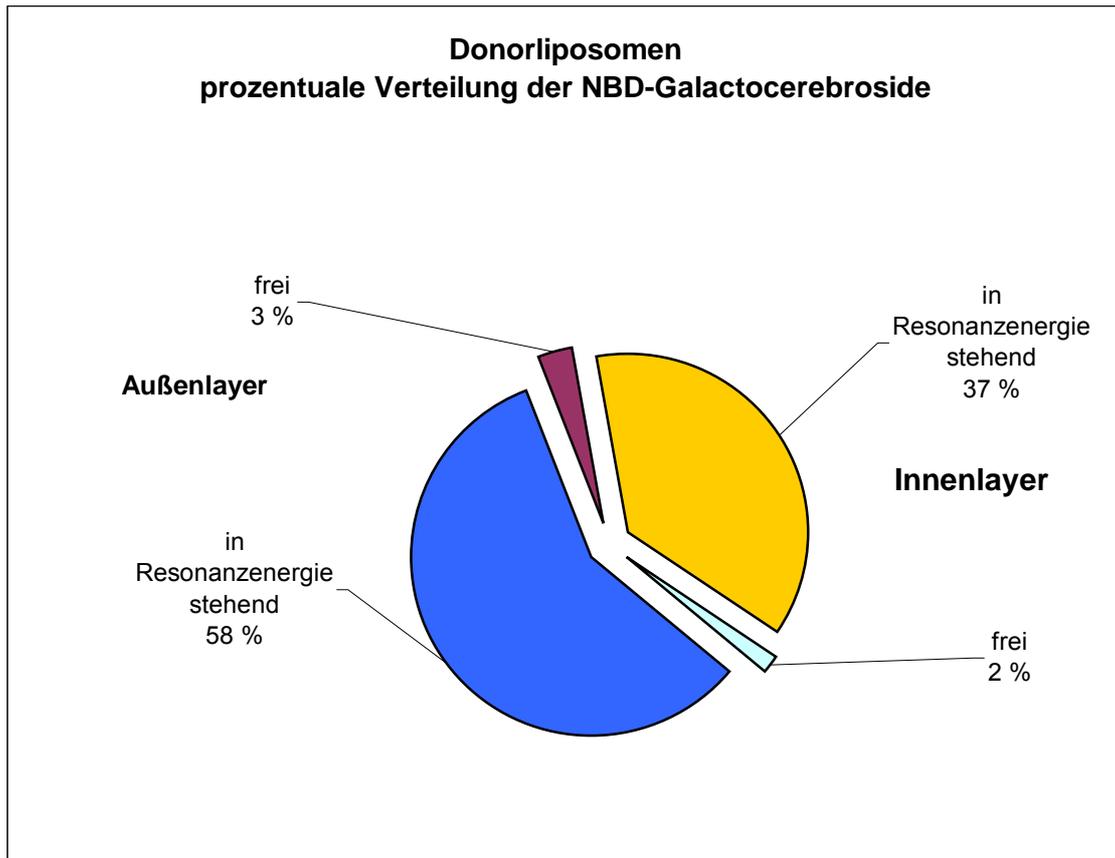
Durch Zugabe von Na-Dithionit zeigte sich eine Abnahme der relativen Fluoreszenz:

- bei  $\lambda = 592 \text{ nm}$  von 97 % auf 23 %, d.h. 66 % des NBD-Glucocerebroside-RhodaminB-RET-System befindet sich im Außenlayer, 34 % im Innenlayer.
- bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$  von 100 % auf 31 %, d.h. 69 % des freien NBD's sind im Außen- und 31 % im Innenlayer.

Die Kombination obiger Ergebnisse mit den Ergebnissen in 3.2.1.3. ergibt die in Tabelle 9 auf Seite 55 aufgeführte räumliche Verteilung der NBD-Glucocerebroside in den Donorliposomen. Hieraus lässt sich die Sensitivität berechnen.

**93,4 %** der NBD-Glucocerebroside im Außenlayer befinden sich in Resonanzenergie zu RhodaminB (siehe Tabelle 8 auf Seite 55). Bei einem Anteil an den Gesamtglucocerebroside von 62 %.

### 3.2.2. Donorliposomen mit NBD-Galactocerebroside



**Abbildung 18: Verteilung der NBD-Galactocerebroside**

Für den Lipidtransfer stehen 61 % der gesamten NBD-Galactocerebroside, da sie sich im Außenlayer der Donorliposomen befinden, zur Verfügung. Insgesamt 95 % der NBD-Glucocerebroside des Außenlayers oder 58 % der gesamten befinden sich im Außenlayer und nah genug den RhodaminB-PE-Lipiden, diese stehen also dem RET-Testsystem zur Messung der Transferaktivität zur Verfügung.

### 3.2.2.1. Größe und Polydispersität

Größe 195 nm bei einer Polydispersität von null.

### 3.2.2.2. Emissionsmaxima

Emissionsmaximum NBD-Galactocerebroside: 520 nm

Emissionsmaximum RhodaminB. 595 nm

### 3.2.2.3. Anteil der im RET stehenden NBD-Galactocerebroside

Es gilt:

$$E_{\%} = \left( 1 - \frac{F_p}{F_t \cdot Q} \right) \cdot 100$$

Relative Fluoreszenz Donorliposomen in 2 ml Puffer:  $F_p = 10,7 \%$

Relative Fluoreszenz Donorliposomen in 2 ml Triton:  $F_t = 104,3 \%$

Triton-Quench-Faktor NBD-Galactocerebroside:  $Q = 2,21$

Daraus ergibt sich: 95 % der NBD-Galactocerebroside sind im RET-System  
5 % liegen als freie NBD-Galactocerebroside vor.

### 3.2.2.4. Sensitivität der Donorliposomen mit NBD-Galactocerebroside

Durch Zugabe von Na-Dithionit erfolgt die Abnahme der relativen Fluoreszenz:

- bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  von 100 % auf 39 %, d.h. 61 % des RET-Systems befinden sich im Außenlayer und 39 % im Innenlayer,
- bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$  von 100 % auf 34 %, d.h. 66 % der freien NBD-Galactocerebroside sind im Außenlayer und 34 % im Innenlayer.

Tabelle 9 auf Seite 55 gibt die räumliche Verteilung der NBD-Galactocerebroside in den verschiedenen Schichten der Donorliposomen wieder. Hieraus lässt sich die Sensitivität berechnen. **95 %** der NBD-Galactocerebroside im Außenlayer befinden sich in Resonanzenergie zu RhodaminB (s. S. 55 Tabelle 8), bei einem Anteil von 58 % vom gesamt NBD-Galactocerebrosidegehalt.

### 3.3. Lipidtransferprotein

Verdünnung	Extinktion	STABW	Proteingehalt in mg/ml	
			der Verdünnung	der Ausgangslösung
1:2	0,914	0,082	7,06	14,12
1:10	0,314	0,053	2,39	23,91
1:20	0,151	0,01	1,12	22,46
1:40	0,079	0,006	0,56	22,51
1:160	0,017	0,002	0,08	12,82

Extinktion: Mittelwerte aus jeweils n = 10 Messungen.

STABW = Standardabweichung. Aufgrund der Gerätesensibilität können nur Werte bei Extinktionen zwischen 0,050 bis 0,300 herangezogen werden.

Das aus Rinderhirn mittels Gewebeaufschluss, Ultrazentrifugation und Ammoniumsulfatfällung isolierte GLTP wies einen Proteingehalt von 22,5 mg/ml auf. Aus einem schlachtfrischen Rinderhirn konnte ca. 21 ml GLTP-Lösung, d.h. ca. 470 mg GLTP gewonnen werden. Die GLTP-Lösung wurde um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden, in Portionen zu je 1 ml bei -18°C aufbewahrt.

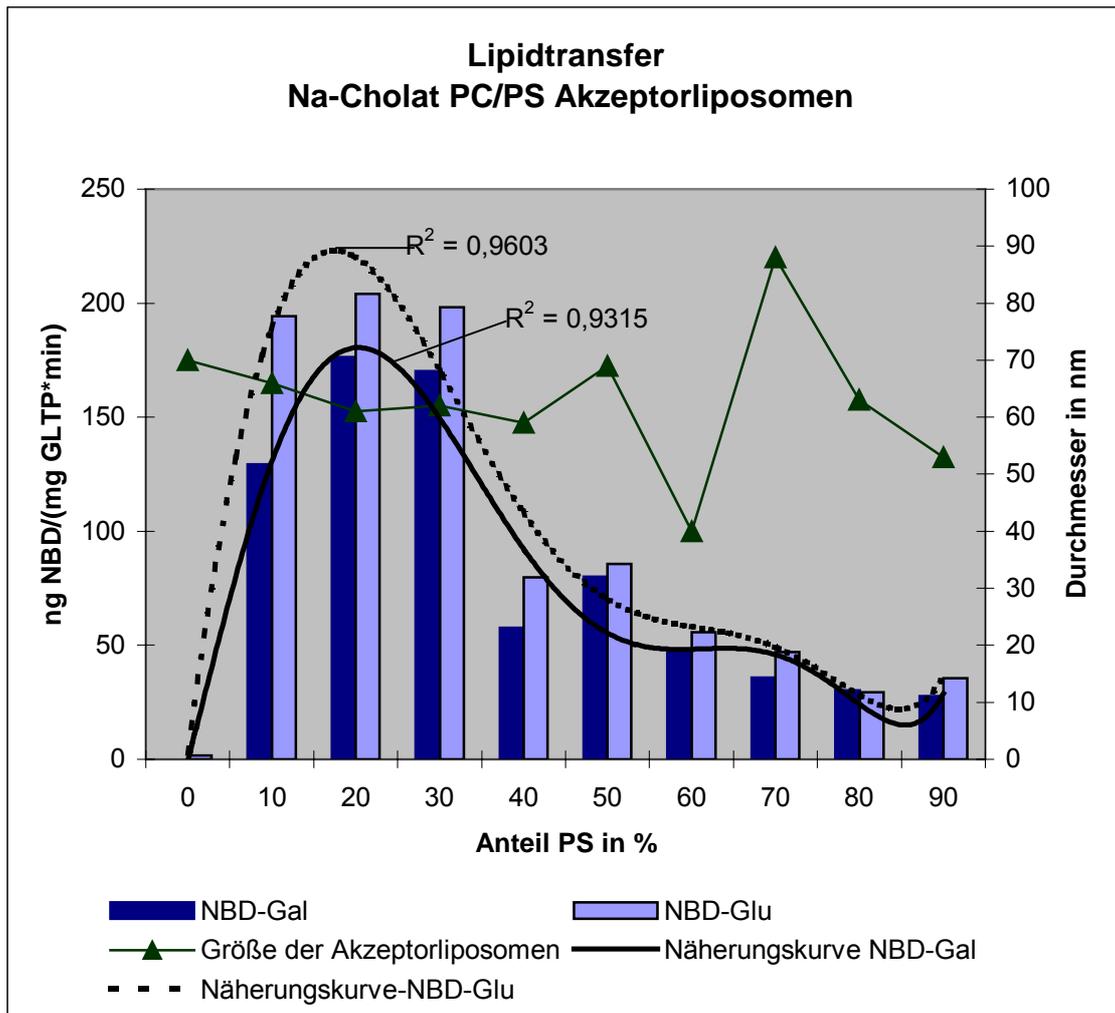
### 3.4. Lipidtransferproteinaktivität in Abhängigkeit der verwendeten Akzeptorliposomen und Donorliposomen

#### 3.4.1. Lipidtransferraten bei mit Na-Cholat hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS, 100/0 bis 10/90

**Tabelle 10: Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PS**

Lipidzusammensetzung und Größe der Akzeptorliposomen			Lipidtransfer in ng NBD/(mg GLTP*min) bei Donorliposomen mit	
PC in %	PS in %	Größe in nm	NBD-Gal	NBD-Glu
100	0	70	0	1,8
90	10	66	129,3	194,3
80	20	61	176,4	204,2
70	30	62	170,3	198,3
60	40	59	57,8	79,8
50	50	69	80,0	85,7
40	60	40	47,3	55,8
30	70	88	35,9	47,0
20	80	63	30,2	29,5
10	90	53	27,6	35,6

Übersicht über die proteinkatalysierten Lipidtransferraten, bei dem Einsatz von mit Na-Cholat hergestellten Akzeptorliposomen, bezogen auf deren PS-Anteil und den Einsatz von NBD-Glu oder NBD-Gal Donorliposomen. Für die Bestimmung des proteinkatalysierten Lipidtransfers wurden Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen herangezogen. Die Transferraten für NBD-Glu liegen durchschnittlich 22 % über den Transferraten für NBD-Gal Donorliposomen.



**Abbildung 19: Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PS**

Darstellung des Lipidtransfers in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der mit Na-Cholat hergestellten Akzeptorliposomen. Lipidtransferraten: Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen. Für den Lipidtransfer bei NBD-Glu Donorliposomen konnte mit Microsoft Excel® eine Näherungskurve  $y = 25197x^6 - 57500x^5 + 38177x^4 + 1713,5x^3 - 10190x^2 + 2836,4x + 2,4867$  mit dem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,96$  basierend auf der RKP (polynomische Regression) Statistikfunktion errechnet werden. Das rechnerische Maximum des Lipidtransfers ergibt sich für einen PS-Anteil von 17,5 % mit 223 ng NBD/(mg GLTP\*min). Für NBD-Gal Donorliposomen gilt die Näherungskurve  $y = 45448x^6 - 120257x^5 + 113555x^4 - 42203x^3 + 2338,4x^2 + 1394,7x - 0,4706$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,93$  mit dem Maximum 180,5 ng NBD/(mg GLTP\*min) bei Akzeptorliposomen mit einem PS-Anteil von 20 %. Die Größe der Akzeptorliposomen ist zur Veranschaulichung ihres Einflusses auf den Lipidtransfer aufgeführt. Die mit Na-Cholat hergestellten Akzeptorliposomen weisen keinen klaren Zusammenhang Größe zu PS-Anteil auf.

### 3.4.1.1. Lipidtransferraten bei Einsatz von NBD-Glucocerebroside Donorliposomen

Wie aus Tabelle 10 und Abbildung 19 (s.o.) ersichtlich, sind die Lipidtransferaten für die mit NBD-Glucocerebroside markierte Donorliposomen durchschnittlich ca. 22 % höher als bei mit NBD-Galactocerebroside markierten Donorliposomen.

Die höchste Transferate findet sich bei Akzeptorliposomen der Zusammensetzung PC/PS **80/20** mit **204,2 ng NBD-Glucocerebroside pro mg GLTP\*min**, dicht gefolgt von PC/PS 70/30 (198,3 ng NBD) und PC/PS 90/10 (194,3). Es besteht eine Korrelation PC/PS-Anteil und Lipidtransfer mit

$$y = 25197x^6 - 57500x^5 + 38177x^4 + 1713,5x^3 - 10190x^2 + 2836,4x + 2,4867$$

und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9603$ .

Der mittels Näherungsverfahren basierend auf der RKP (polynomische Regression) Statistikfunktion im Microsoft Excel<sup>®</sup> errechnete Hochpunkt liegt bei  $x = 17,5$  % PS und  $y = 223$  ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min.

Eine Korrelation Größe der Akzeptorliposomen zu Lipidtransfer ist nicht ersichtlich. Für PC 100 Akzeptorliposomen finden sich kaum messbare Lipidtransferaten von 1,8 ng NBD/(mg GLTP\*min).

### 3.4.1.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebroside Donorliposomen

Die höchste Transferate findet mit Akzeptorliposomen der Zusammensetzung PC/PS **80/20** sich mit **176,4 ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min** dicht gefolgt von PC/PS 70/30 (170,3 ng NBD) und mit etwas Abstand PC/PS 90/10 (129,3 ng NBD). Es besteht eine Korrelation PC/PS-Anteil und Lipidtransfer mit

$$y = 45448x^6 - 120257x^5 + 113555x^4 - 42203x^3 + 2338,4x^2 + 1394,7x - 0,4706$$

und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9315$ .

Der mittels Näherungsverfahren errechnete Hochpunkt liegt bei  $x = 20$  % PS und  $y = 180,5$  ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min.

Eine Korrelation Größe der Akzeptorliposomen zu Lipidtransfer ist nicht ersichtlich (siehe Abbildung 19, Seite 62).

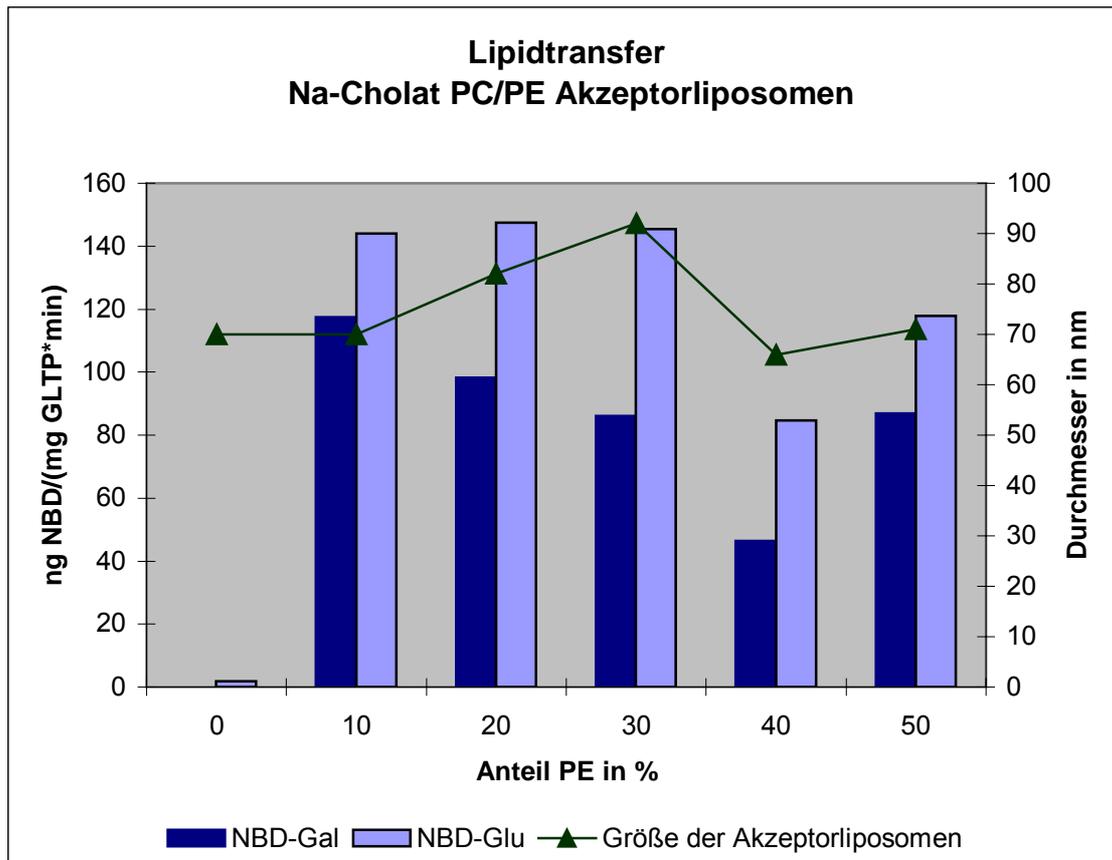
Für ausschließlich aus PC bestehende Akzeptorliposomen (PC 100) konnten keine über der Basalrate liegende Lipidtransferraten gefunden werden, dies entspricht einer bereinigten Transferrate von null.

### 3.4.2. Lipidtransferraten bei mit Na-Cholat hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PE, 90/10 bis 50/50

**Tabelle 11: Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PE**

Lipidzusammensetzung und Größe der Akzeptorliposomen			Lipidtransfer in ng NBD/(mg GLTP*min) bei Donorliposomen mit	
PC in %	PE in %	Größe in nm	NBD-Gal	NBD-Glu
100	0	70	0	1,8
90	10	82	117,6	143,9
80	20	82	98,2	147,5
70	30	66	86,0	145,4
60	40	71	46,4	84,7
50	50	195	86,9	117,9

Übersicht über die proteinkatalysierten Lipidtransferraten, bei dem Einsatz von mit Na-Cholat hergestellten Akzeptorliposomen, bezogen auf deren PE-Anteil und den Einsatz von NBD-Glu oder NBD-Gal Donorliposomen. Für die Bestimmung des proteinkatalysierten Lipidtransfers, wurden Mittelwerte aus je n = 3 Messungen herangezogen. Die Transferraten für NBD-Glu liegen durchschnittlich 51 % über den Transferraten für NBD-Gal Donorliposomen.



**Abbildung 20: Lipidtransfer Na-Cholat Akzeptorliposomen PC/PE**

Darstellung des Lipidtransfers in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der mit Na-Cholat hergestellten Akzeptorliposomen. Lipidtransferraten: Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen. Für die Korrelation PE-Anteil der Akzeptorliposomen zu Lipidtransfer bei NBD-Glu Donorliposomen sowie bei NBD-Gal Donorliposomen fand sich keine Näherungskurve mit ausreichendem Bestimmtheitsmaß. Die Größe der Akzeptorliposomen ist zur Veranschaulichung ihres Einflusses auf den Lipidtransfer aufgeführt. Die mit Na-Cholat hergestellten Akzeptorliposomen weisen keinen klaren Zusammenhang zwischen Größe und PE-Anteil auf.

### 3.4.2.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebroside Donorliposomen

Die Lipidtransferraten für NBD-Glucocerebroside markierte Donorliposomen liegen im Durchschnitt 51 % über den Transferraten bei dem Einsatz von NBD-Galactocerebroside Donorliposomen.

Die Lipidtransferraten reichen von 84,7 bis 147,5 ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min um den Mittelwert von 127,9 ng NBD pro mg GLTP\*min ohne ersichtliche Korrelation zu dem PE-Anteil der Akzeptorliposomen.

### 3.4.2.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebroside Donorliposomen

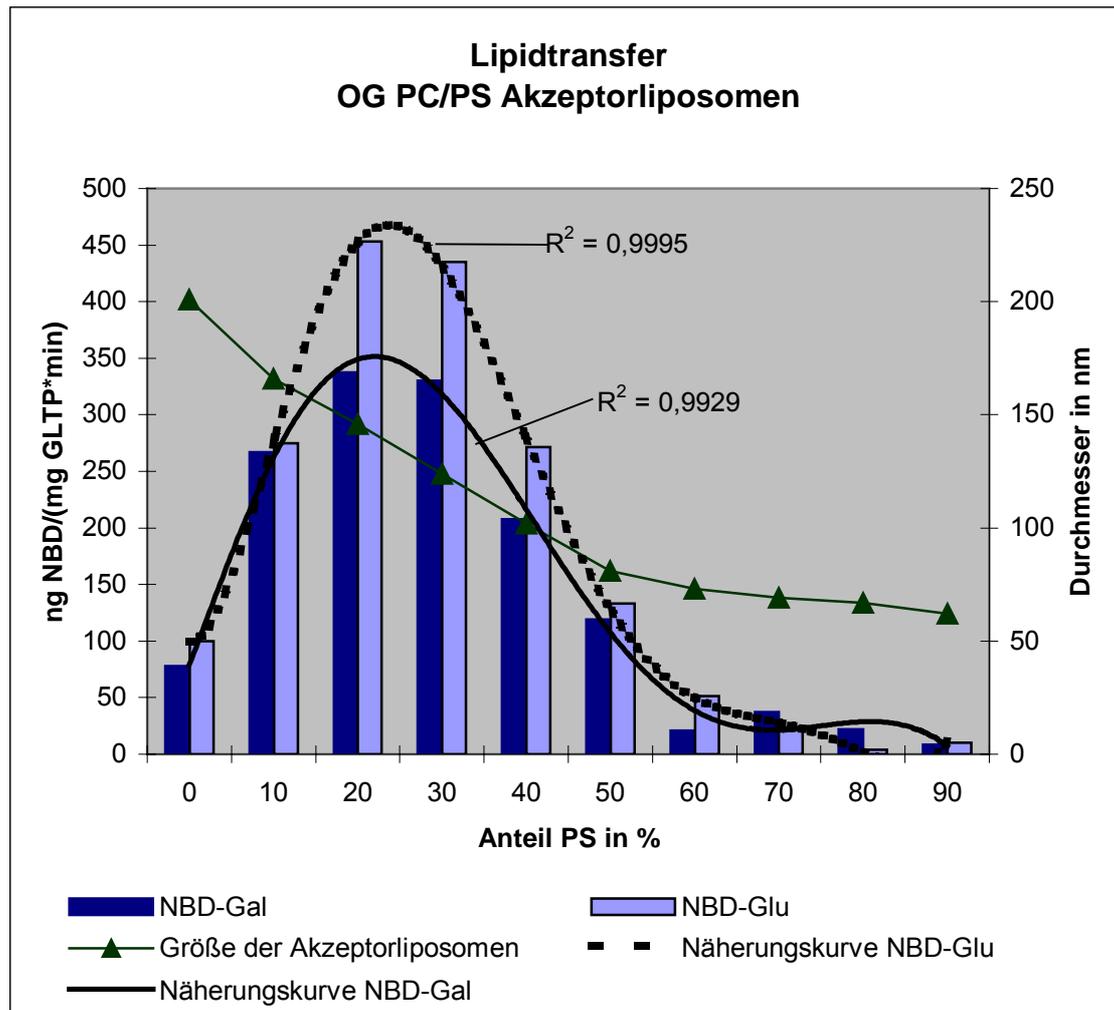
Die Lipidtransferraten reichen von 46,4 bis 117,6 ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min um den Mittelwert von 87 ng NBD mit einer Standardabweichung von 26 ohne ersichtliche Korrelation zu dem PE-Anteil der Akzeptorliposomen.

### 3.4.3. Lipidtransferraten bei mit OG hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS, 100/0 bis 10/90

**Tabelle 12: Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PS**

Lipidzusammensetzung und Größe der Akzeptorliposomen			Lipidtransfer in ng NBD/(mg GLTP*min) bei Donorliposomen mit	
PC in %	PS in %	Größe in nm	NBD-Gal	NBD-Glu
100	0	201	70,8	100,0
90	10	166	245,3	274,6
80	20	146	284,6	453,0
70	30	124	260,5	434,9
60	40	102	127,7	271,7
50	50	81	39,7	133,0
40	60	73	6,9	51,6
30	70	69	12,3	23,9
20	80	67	7,3	4,1
10	90	62	24,4	10,0

Übersicht über die proteinkatalysierten Lipidtransferraten, bei dem Einsatz von mit OG hergestellten Akzeptorliposomen, bezogen auf deren PS-Anteil und den Einsatz von NBD-Glu oder NBD-Gal Donorliposomen. Für die Bestimmung des proteinkatalysierten Lipidtransfers wurden Mittelwerte aus je n = 3 Messungen herangezogen. Die Transferraten für NBD-Glu liegen durchschnittlich 19 % über den Transferraten für NBD-Gal Donorliposomen.



**Abbildung 21: Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PS**

Darstellung des Lipidtransfers in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der mit OG hergestellten Akzeptorliposomen. Lipidtransferraten: Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen. Für den Lipidtransfer bei NBD-Glu Donorliposomen konnte mit Microsoft Excel<sup>®</sup> eine Näherungskurve

$y = 119101x^6 - 350179x^5 + 384605x^4 - 187299x^3 + 34226x^2 - 143,53x + 99,794$  mit dem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 1,0$  basierend auf der RKP (polynomische Regression) Statistikfunktion errechnet werden. Das rechnerische Maximum des Lipidtransfers ergibt sich für einen PS-Anteil von 24 % mit 467,5 ng NBD/(mg GLTP\*min). Für NBD-Gal Donorliposomen gilt die Näherungskurve

$y = 22090x^6 - 75309x^5 + 89423x^4 - 40455x^3 + 2143x^2 + 1937,9x + 78,948$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 1,0$  mit dem Maximum 351,4 ng NBD/(mg GLTP\*min) bei Akzeptorliposomen mit einem PS-Anteil von 22 %. Die Größe der Akzeptorliposomen ist zur Veranschaulichung ihres Einflusses auf den Lipidtransfer aufgeführt. Die mit OG hergestellten Akzeptorliposomen zeigen einen antiproportionalen Zusammenhang Größe zu PS-Anteil.

### 3.4.3.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebroside Donorliposomen

Die Lipidtransferraten unter Einsatz von NBD-Glucocerebroside markierten Donorliposomen sind durchschnittlich 20 % und für die maximalen Transferraten ca. 33 % höher als bei den mit NBD-Galactocerebroside markierten Donorliposomen.

Die höchste Transferrate findet mit Akzeptorliposomen der Zusammensetzung PC/PS **80/20** sich mit **453 ng NBD-Glucocerebroside pro mg GLTP\*min** dicht gefolgt von PC/PS 70/30 (434,9 ng NBD) und ca. 40 % niedriger für PC/PS 90/10 (274,6) und PC/PS 60/40 (271 ng NBD).

Es besteht eine Korrelation PC/PS-Anteil und Lipidtransfer mit

$$y = 119101x^6 - 350179x^5 + 384605x^4 - 187299x^3 + 34226x^2 - 143,53x + 99,794$$

und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9995$ .

Der mittels Näherungsverfahren errechnete Hochpunkt liegt bei  $x = 24$  % PS und  $y = 467,5$  ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min.

Eine Korrelation Größe der Akzeptorliposomen zu Lipidtransfer ist nicht ersichtlich.

Für PC 100 Akzeptorliposomen finden sich hier mittlere Lipidtransferraten von 100 ng NBD/(mg GLTP\*min).

### 3.4.3.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebroside Donorliposomen

Die höchste Transferrate findet mit Akzeptorliposomen der Zusammensetzung PC/PS **80/20** sich mit **284,6ng NBD-Glucocerebroside pro mg GLTP\*min** gefolgt von PC/PS 70/30 (260,5 ng NBD) und PC/PS 90/10 (245,3) und ca. 55 % niedriger für PC/PS 60/40 (128 ng NBD).

Es besteht eine Korrelation PC/PS-Anteil zum Lipidtransfer mit

$$y = 22090x^6 - 75309x^5 + 89423x^4 - 40455x^3 + 2143x^2 + 1937,9x + 78,948$$

und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9995$ .

Der mittels Näherungsverfahren errechnete Hochpunkt liegt bei  $x = 22$  % PS und  $y = 295$  ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min.

Eine Korrelation Größe der Akzeptorliposomen zu Lipidtransfer ist nicht ersichtlich.

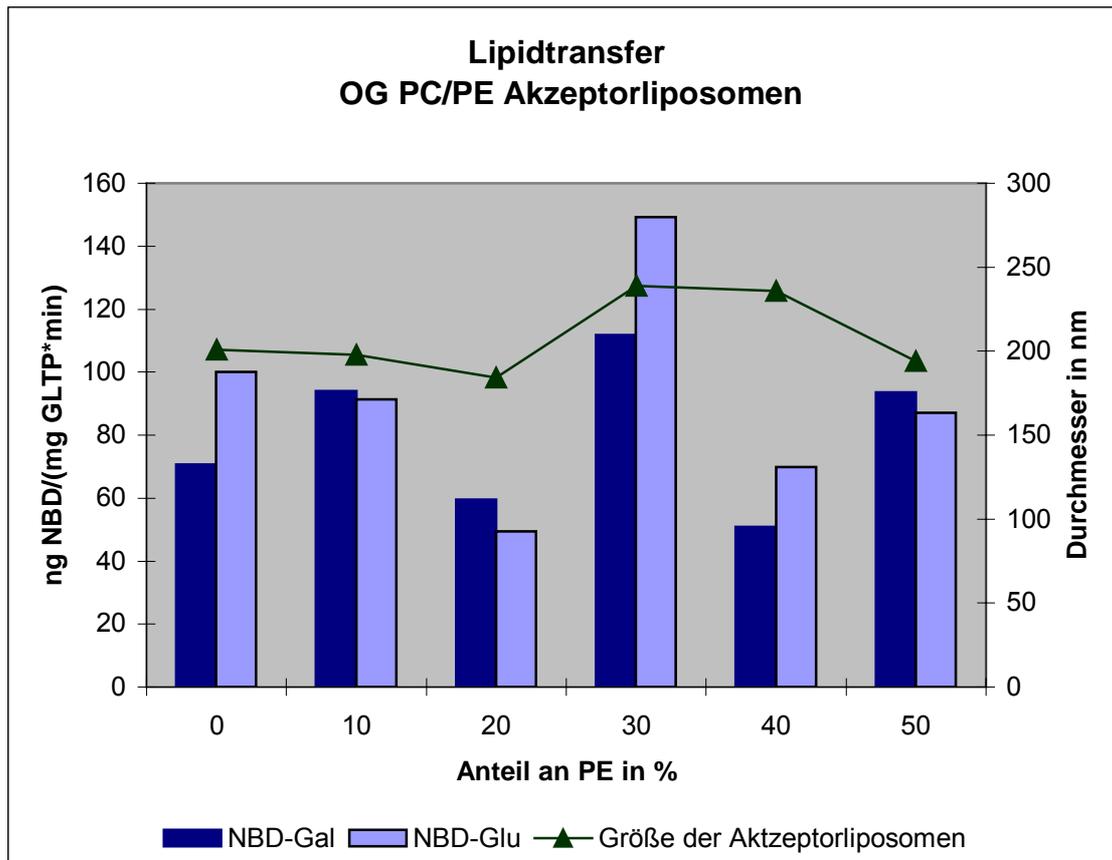
Für PC 100 Akzeptorliposomen finden sich hier mittlere Lipidtransferraten von 70,8 ng NBD/(mg GLTP\*min).

#### 3.4.4. Lipidtransferraten bei mit OG hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PE, 90/10 bis 50/50

**Tabelle 13: Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PE**

Lipidzusammensetzung und Größe der Akzeptorliposomen			Lipidtransfer in ng NBD/(mg GLTP*min) bei Donorliposomen mit	
PC in %	PE in %	Größe in nm	NBD-Gal	NBD-Glu
100	0	201	<b>70,8</b>	<b>100,0</b>
90	10	198	<b>93,9</b>	<b>91,3</b>
80	20	184	<b>59,5</b>	<b>49,5</b>
70	30	239	<b>111,8</b>	<b>149,4</b>
60	40	236	<b>50,8</b>	<b>69,9</b>
50	50	194	<b>93,6</b>	<b>87,0</b>

Übersicht über die proteinkatalysierten Lipidtransferraten, bei dem Einsatz von mit OG hergestellten Akzeptorliposomen, bezogen auf deren PE-Anteil und den Einsatz von NBD-Glu oder NBD-Gal Donorliposomen. Für die Bestimmung des proteinkatalysierten Lipidtransfers wurden Mittelwerte aus je n = 3 Messungen herangezogen. Die Transferraten für NBD-Glu liegen durchschnittlich 15 % über den Transferraten für NBD-Gal Donorliposomen.



**Abbildung 22: Lipidtransfer OG Akzeptorliposomen PC/PE**

Darstellung des Lipidtransfers in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der mit OG hergestellten Akzeptorliposomen.

Lipidtransferraten: Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen. Für die Korrelation PE-Anteil der Akzeptorliposomen zu Lipidtransfer bei NBD-Glu Donorliposomen sowie bei NBD-Gal Donorliposomen, fand sich keine Näherungskurve mit ausreichendem Bestimmtheitsmaß. Die Größe der Akzeptorliposomen ist zur Veranschaulichung ihres Einflusses auf den Lipidtransfer aufgeführt. Die mit OG hergestellten Akzeptorliposomen weisen keinen klaren Zusammenhang zwischen Größe und PE-Anteil auf.

#### 3.4.4.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebroside Donorliposomen

Wie aus Tabelle 13 und Abbildung 22 ersichtlich sind die Lipidtransferraten für NBD-Glucocerebroside markierte Donorliposomen durchschnittlich **15 %** höher als bei NBD-Galactocerebroside markierten Donorliposomen.

Die Lipidtransferraten reichen von 49,5 bis 149,4 ng NBD-Glucocerebroside pro mg GLTP\*min um den Mittelwert von 89,4 ng NBD pro mg GLTP\*min ohne ersichtliche Korrelation zu dem PE-Anteil der Akzeptorliposomen.

### 3.4.4.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebroside Donorliposomen

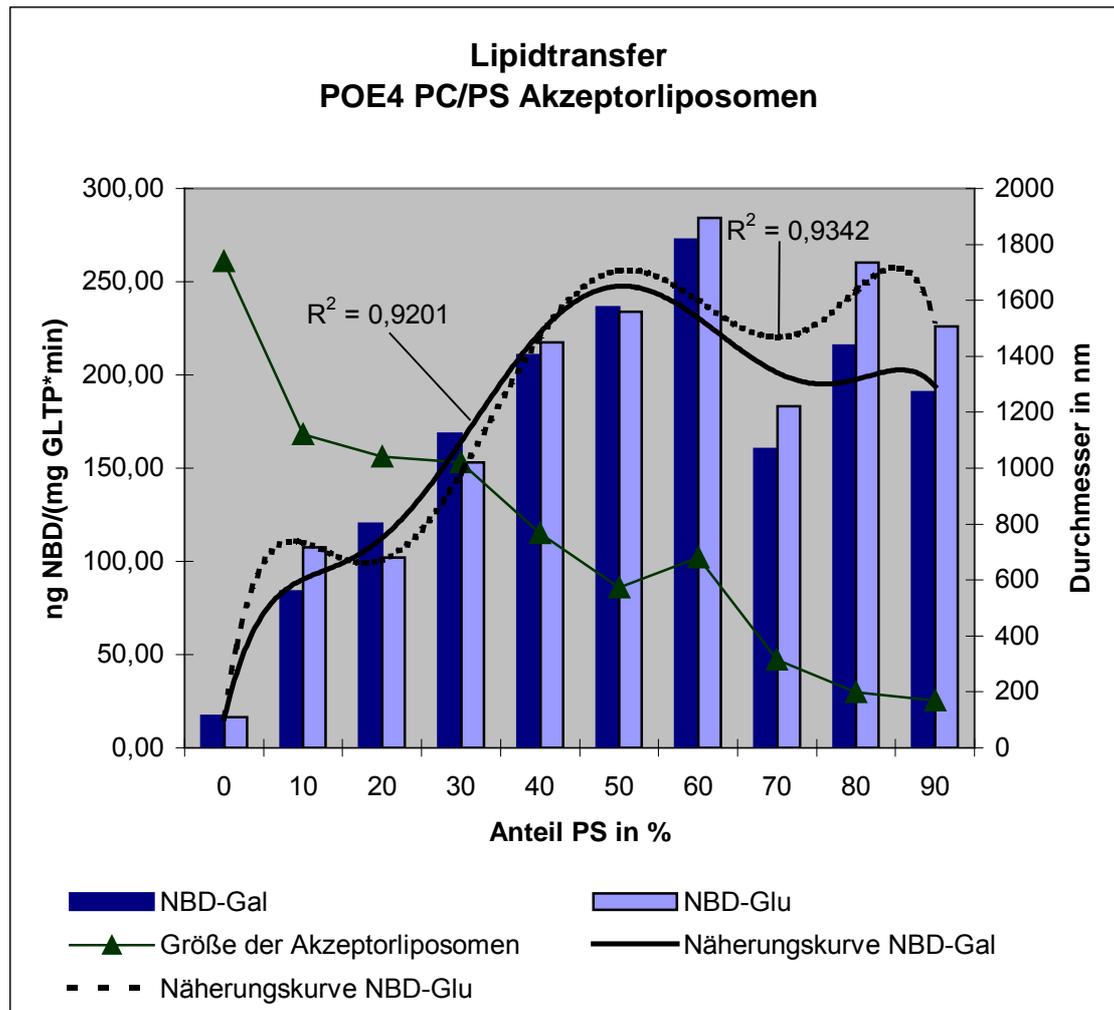
Die Lipidtransferraten reichen von 50,8 bis 111,8 ng NBD-Galactocerebroside pro mg GLTP\*min um den Mittelwert von 81,9 ng NBD ohne ersichtliche Korrelation zu dem PE-Anteil der Akzeptorliposomen.

### 3.4.5. Lipidtransferraten bei mit POE4 hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS, 100/0 bis 10/90

**Tabelle 14: Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PS**

Lipidzusammensetzung und Größe der Akzeptorliposomen			Lipidtransfer in ng NBD/(mg GLTP*min) bei Donorliposomen mit	
PC in %	PS in %	Größe in nm	NBD-Gal	NBD-Glu
100	0	1740	17,1	16,3
90	10	1120	84,0	107,5
80	20	1040	120,4	102,0
70	30	1020	168,5	153,2
60	40	767	210,7	217,3
50	50	572	236,2	233,9
40	60	680	272,7	284,3
30	70	314	160,3	183,1
20	80	199	215,6	260,2
10	90	168	190,8	226,2

Übersicht über die proteinkatalysierten Lipidtransferraten, bei dem Einsatz von mit POE4 hergestellten Akzeptorliposomen, bezogen auf deren PS-Anteil und den Einsatz von NBD-Glu oder NBD-Gal Donorliposomen. Für die Bestimmung des proteinkatalysierten Lipidtransfers, wurden Mittelwerte aus je n = 3 Messungen herangezogen. Die Transferraten für NBD-Glu liegen durchschnittlich 6 % über den Transferraten für NBD-Gal Donorliposomen.



**Abbildung 23: Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PS**

Darstellung des Lipidtransfers in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der mit POE4 hergestellten Akzeptorliposomen. Lipidtransferraten: Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen. Für den Lipidtransfer bei NBD-Glu Donorliposomen konnte mit Microsoft Excel<sup>®</sup> eine Näherungskurve

$y = -100790x^6 + 281671x^5 - 295542x^4 + 142734x^3 - 31254x^2 + 2912,3x + 15,6$  mit dem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,93$  basierend auf der RKP (polynomi-sche Regression) Statistikfunktion errechnet werden. Es finden sich zwei rechnerische Maxima des Lipidtransfers:  $Max_1$  ergibt sich für einen PS-Anteil von 51 % mit 256,3 ng NBD/(mg GLTP\*min).  $Max_2$  liegt bei einem PS-Anteil von 85 % mit 257,6 ng NBD/(mg GLTP\*min).

Für NBD-Gal Donorliposomen gilt die Näherungskurve

$y = -55117x^6 + 155718x^5 - 163552x^4 + 77834x^3 - 16695x^2 + 1787x + 15,676$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,92$  mit den Maxima  $Max_1 = 247,7$  ng NBD/(mg GLTP\*min) bei Akzeptorliposomen mit einem PS-Anteil von 50,5 % und  $Max_2 = 202,7$  ng NBD/(mg GLTP\*min) bei einem PS-Anteil von 85,5 %. Die Größe der Akzeptorliposomen ist zur Veranschaulichung ihres Einflusses auf den Lipidtransfer aufgeführt. Die mit POE4 hergestellten Akzeptorliposomen haben einen deutlichen antiproportionalen Zusammenhang Größe zu PS-Anteil.

### 3.4.5.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebrosid Donorliposomen

Die Lipidtransferraten für NBD-Glucocerebrosid markierte Donorliposomen sind durchschnittlich 6 % höher als bei NBD-Galactocerebrosid markierten.

Die Lipidtransferraten steigen von PC/PS 100/0 (16,3 ng NBD pro mg GLTP pro min) bis PC/PS 60/40 (284,3 ng NBD pro mg GLTP\*min) kontinuierlich an.

Es findet sich folgende Korrelation der Lipidtransferraten zum Anteil PS:

$$y = -100790x^6 + 281671x^5 - 295542x^4 + 142734x^3 - 31254x^2 + 2912,3x + 15,613$$

mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9342$ . Rechnerisch zeigen sich 2 Maxima des Lipidtransfers:

- $Max_1$ :  $y = 256,3$  ng NBD/(mg GLTP\*min);  $x = 51$  % PS.
- $Max_2$ :  $y = 257,6$  ng NBD/(mg GLTP\*min);  $x = 85$  % PS.

Die Maxima liegen beide unterhalb des gemessenen Höchstwertes für den Lipidtransfer mit 284,3 ng pro mg GLTP\*min. Unter der Annahme, dass die Lipidtransferraten für PC/PS 30/70 Messfehler darstellen, könnte eine Näherungskurve mit einem Maximum bei etwa 65 bis 75 % PS-Anteil dargestellt werden.

Man erkennt ein gegenläufiges Verhalten von Größe zu Lipidtransfer, d.h. für PS-Anteile von 0 bis 60 % und von 70 bis 80 % gilt je kleiner die Akzeptorliposomen desto höher die Lipidtransferraten.

### 3.4.5.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebrosid Donorliposomen

Die Lipidtransferraten steigen von PC/PS 100/0 (17,1 ng NBD pro mg GLTP pro min) bis PC/PS 60/40 (272,7 ng NBD pro mg GLTP\*min) kontinuierlich an.

Es findet sich folgende Korrelation Lipidtransferraten zu Anteil PS:

$$y = -55117x^6 + 155718x^5 - 163552x^4 + 77834x^3 - 16695x^2 + 1787x + 15,676$$

mit dem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9201$

Rechnerisch zeigen sich 2 Maxima des Lipidtransfers:

- $Max_1$ :  $y = 247,7$  ng NBD/(mg GLTP\*min);  $x = 50,5$  % PS.
- $Max_2$ :  $y = 202,7$  ng NBD/(mg GLTP\*min);  $x = 85,5$  % PS.

Die Maxima liegen beide unterhalb des gemessenen Höchstwertes für den Lipidtransfer mit 272,7 ng pro mg GLTP\*min. Unter der Annahme, dass die

Lipidtransferraten für PC/PS 30/70 Messfehler darstellen, könnte eine Näherungskurve mit einem Maximum bei etwa 60 bis 65 % PS-Anteil dargestellt werden.

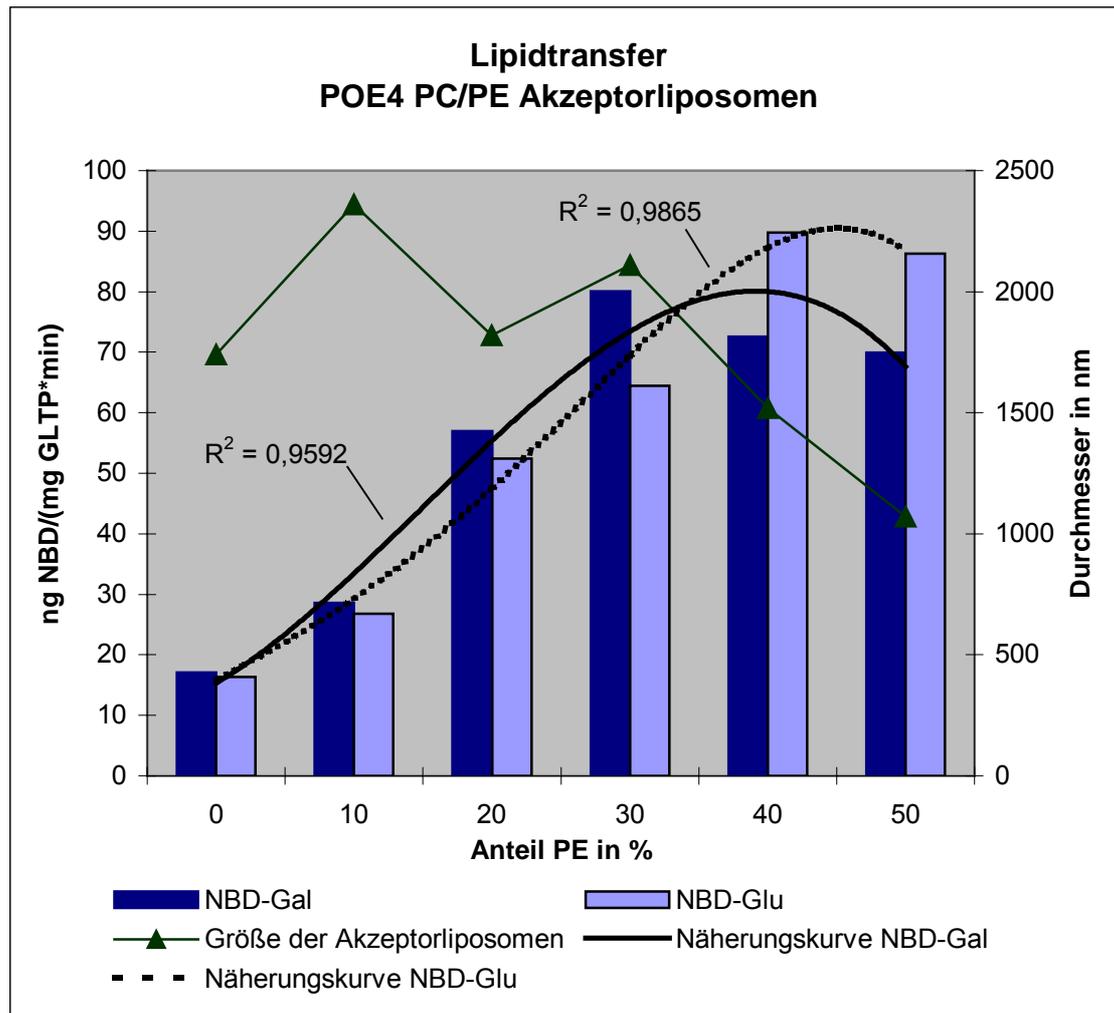
Man erkennt ein gegenläufiges Verhalten von Größe zu Lipidtransfer, d.h. für PS-Anteile von 0 bis 60 % und von 70 bis 80 % gilt je kleiner die Akzeptorliposomen desto höher die Lipidtransferraten.

### 3.4.6. Lipidtransferraten bei mit POE4 hergestellte Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PE, 90/10 bis 50/50

**Tabelle 15: Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PE**

Lipidzusammensetzung und Größe der Akzeptorliposomen			Lipidtransfer in ng NBD/(mg GLTP*min) bei Donorliposomen mit	
PC in %	PE in %	Größe in nm	NBD-Gal	NBD-Glu
100	0	1740	17,11	16,33
90	10	2360	28,57	26,75
80	20	1820	56,93	52,42
70	30	2110	80,06	64,45
60	40	1520	72,59	89,75
50	50	1070	69,92	86,3

Übersicht über die proteinkatalysierten Lipidtransferraten, bei dem Einsatz von mit POE4 hergestellten Akzeptorliposomen, bezogen auf deren PS-Anteil und den Einsatz von NBD-Glu oder NBD-Gal Donorliposomen. Für die Bestimmung des proteinkatalysierten Lipidtransfers, wurden Mittelwerte aus je n = 3 Messungen herangezogen. Die Transferraten für NBD-Glu liegen durchschnittlich 2 % über den Transferraten für NBD-Gal Donorliposomen.



**Abbildung 24: Lipidtransfer POE4 Akzeptorliposomen PC/PE**

Darstellung des Lipidtransfers in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der mit POE4 hergestellten Akzeptorliposomen. Lipidtransferraten: Mittelwerte aus je  $n = 3$  Messungen. Für den Lipidtransfer bei NBD-Glu Donorliposomen konnte mit Microsoft Excel<sup>®</sup> eine Näherungskurve  $y = -2735,4x^4 + 1445,9x^3 + 0,5068x^2 + 122,12x + 15,835$  mit dem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$  basierend auf der RKP (polynomische Regression) Statistikfunktion errechnet werden. Das rechnerische Maximum des Lipidtransfers ergibt sich für einen PE-Anteil von 45 % mit 90,5 ng NBD/(mg GLTP\*min). Für NBD-Gal Donorliposomen gilt die Näherungskurve  $y = -1265,2x^3 + 566,81x^2 + 137,51x + 15,307$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,96$  mit dem Maximum 80,1 ng NBD/(mg GLTP\*min) bei Akzeptorliposomen mit einem PE-Anteil von 39 %. Die Größe der Akzeptorliposomen ist zur Veranschaulichung ihres Einflusses auf den Lipidtransfer aufgeführt.

### 3.4.6.1. Lipidtransferraten bei NBD-Glucocerebroside Donorliposomen

Wie aus Tabelle 15 und Abbildung 24 ersichtlich sind die Lipidtransferraten für NBD-Glucocerebroside markierte Donorliposomen durchschnittlich 2 % höher als bei Verwendung von NBD-Galactocerebroside markierten Donorliposomen.

Die Lipidtransferraten reichen von 16,3 bis 89,8 ng NBD-Glucocerebroside pro mg GLTP\*min. Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9865$  lässt sich anhand der Regressionsanalyse die Näherungskurve

$y = -2735,4x^4 + 1445,9x^3 + 0,5068x^2 + 122,12x + 15,835$  mit einem rechnerischen Maximum des Lipidtransfer von 90,5 ng NBD/(mg GLTP\*min) bei einem PE-Anteil von 45 % bestimmen.

Eine antiproportionale Korrelation des Lipidtransfer zur Größe der Akzeptorliposomen lässt sich aus den Werten erahnen.

### 3.4.6.2. Lipidtransferraten bei NBD-Galactocerebroside Donorliposomen

Die Lipidtransferraten reichen von 17,1 bis 80,0 ng NBD-Glucocerebroside pro mg GLTP\*min. Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9592$  lässt sich anhand der Regressionsanalyse die Näherungskurve

$y = -1265,2x^3 + 566,81x^2 + 137,51x + 15,307$  mit einem rechnerischen Maximum des Lipidtransfer von 80,1 ng NBD/(mg GLTP\*min) bei einem PE-Anteil von 39 % bestimmen.

Eine Korrelation Lipidtransfer zu Größe ist aus den Werten nicht ersichtlich.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Ergebnisdiskussion**

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Membrankrümmung und der Lipidzusammensetzung, insbesondere des PS- und PE-Gehaltes auf die Eigenschaften von Akzeptormembranen und ihren daraus folgenden Einfluss auf den Glycolipidtransfer von Donor- auf Akzeptormembrane bestimmt. Als Membranmodell dienen Liposomen. Die Membrankrümmung ergibt sich aus der Größe, dem Durchmesser der Liposomen.

Mehrere Studien [als Review: 123] zeigten bereits, dass eine negative Ladung von Donorliposomen – insbesondere durch den Einschluss von negativ geladenem PS – den proteingestützten Lipidtransfer begünstigen. Als LTP wurden hierbei nicht spezifische LTP verwendet, welche PS und PE selbst transferieren.

Bei der vorliegenden Studie werden einerseits die Eigenschaften der Donor-membran konstant gehalten und andererseits GLTP eingesetzt, die PS oder PE nicht transferieren [123]. So wird gewährleistet, dass ausschließlich die Membraneigenschaften (Größe und Ladung) der Akzeptormembrane untersucht werden.

Der Untersuchungsansatz stellt also ein Modell zur Untersuchung von Membraneigenschaften auf die Lipidtransferaktivität von GLTP dar, das weitere Einflussgrößen möglichst ausschließt.

#### **4.1.1. Einfluss der verwendeten Detergentien auf die Größe der Akzeptorliposomen**

Bei dem verwendeten Mischzedialyseverfahren zur Herstellung der Liposomen hat die Größe der verwendeten Detergentien einen entscheidenden Einfluss auf den Durchmesser der Liposomen. Je größer das Detergenz, desto größer die entstehenden Liposomen.

Die Lipidzusammensetzung, v. a. der PS-Anteil, haben ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Liposomengröße (siehe Abbildung 13, Seite 50 und

Abbildung 14, Seite 51). Bei der Verwendung der Detergentien OG und POE4 findet sich eine eindeutige indirekt proportionale Korrelation von PS-Gehalt zu Größe der Liposomen. Dies zeigt, dass PS neben seinen Ladungseigenschaften, auch aufgrund seiner antikonischen Form, auf die Krümmung der entstehenden Liposomenmembran Einfluss hat. Bei sehr kleinen Liposomen, hier bei Na-Cholat als Detergenz, findet sich keine klare Korrelation mehr zwischen PS-Gehalt und Durchmesser (Abbildung 11, Seite 47). Wahrscheinlich stoßen diese kleinen Liposomen aufgrund der hohen Membrankrümmung schon an die Grenze der möglich Membranspannung PS-haltiger Liposomen.

#### **4.1.1.1. Mit Na-Cholat als Detergenz hergestellte Liposomen**

Unter Verwendung des kleinsten hier eingesetzten Detergenz, Na-Cholat, entstehen SUV Liposomen deren Durchmesser von 40 bis 90 nm reichen. Es zeigt sich keine klare Relation zwischen PS- oder PE-Gehalt zur Liposomengröße (Abbildung 11, Seite 47 und Abbildung 12, Seite 48). Mit 195 nm Durchmesser weichen die Akzeptorliposomen mit einem PE-Gehalt von 50 mol% deutlich von den anderen mit Na-Cholat hergestellten Liposomen ab. Hierfür konnte keine Erklärung, abseits eines Versuchsfehlers, gefunden werden.

#### **4.1.1.2. Mit OG als Detergenz hergestellte Liposomen**

Bei dem Einsatz von OG als Detergenz entstehen kleine LUV mit Durchmessern von 62 nm bis 234 nm. Es zeigt sich eine indirekt proportionale Korrelation zwischen PS-Gehalt und Größe, dass heißt je höher der PS-Anteil desto kleiner die Liposomen (Abbildung 13, Seite 50). Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,996$  lässt sich folgende Gleichung für den Durchmesser in nm zu dem PS-Anteil in % darstellen:

$$y = 191,67x^2 - 324,2x + 200,36$$

Es findet sich keine klare Korrelation zwischen PE-Gehalt und Größe der Liposomen (Abbildung 14, Seite 51).

#### 4.1.1.3. Mit POE4 als Detergenz hergestellte Liposomen

POE4 ist ein deutlich größeres Detergenz und führt zur Entstehung von LUV, die in ihrer Größe von 168 nm (PS-Gehalt: 10 mol%) bis zu 2360 nm (PE-Gehalt 10 mol%) sehr stark variieren.

Wie auch bei den mit OG hergestellten Liposomen zeigt sich eine deutliche indirekt proportionale Korrelation bezüglich des PS-Gehaltes und keine klare Korrelation zu dem PE-Gehalt, wohl aber eine Tendenz, je höher der PE-Gehalt desto kleiner die Liposomen. Bei den PC/PE Liposomen reichen die Durchmesser von 2360 nm (PE: 10 mol%) bis zu 1070 nm (PE: 50 mol%) es kann keine Näherungskurve mit akzeptablen Bestimmtheitsmaß angelegt werden (Abbildung 16, Seite 54).

Bei den PS Liposomen finden sich Durchmesser von 168 nm (PS: 90 mol%) bis zu 1120 nm (PS: 10 mol%) (Tabelle 6, Seite 52 und Abbildung 15, Seite 53). Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,934$  kann sich folgende Gleichung für den Durchmesser in nm zu dem PS-Anteil in % darstellen werden:

$$y = 862,34x^2 - 2318x + 1559,4$$

#### 4.1.2. Einfluss von Ladung und Größe der Akzeptorliposomen auf den Glycolipidtransfer

In der vorliegenden Arbeit wird mittels zwei verschiedener Donorliposomen-spezies sowohl der Transfer von NBD-Galactocerebrosiden, als auch von NBD-Glucocerebrosiden untersucht. Grundsätzlich weisen die Versuche sich gleichende Transferraten der Glycolipide in Bezug auf die unterschiedlichen Akzeptorliposomen auf. Insgesamt liegen die Transferraten der NBD-Glucocerebroside ungefähr 17 % über denen der Galactocerebroside. Dabei zeigen sich, je nach verwendetem Detergenz und damit Größe der Akzeptorliposomen-charge, unterschiedliche Verhältnisse des durchschnittlichen Transfers von NBD-Glu zu NBD-Gal.

**Tabelle 16: Verhältnis Transferaktivität NBD-Glu/NBD-Gal**

<b>Verhältnis durchschnittliche Transferraten NBD-Glu zu NBD-Gal in Bezug auf Akzeptorliposomencharge</b>		
<b>Detergenz</b>	<b>Lipidzusammensetzung</b>	
	<b>PC/PS</b>	<b>PC/PE</b>
<b>Na-Cholat</b>	<b>1,22 (+ 22 %)</b>	<b>1,51 (+ 51 %)</b>
<b>OG</b>	<b>1,19 (+ 19 %)</b>	<b>1,15 (+ 15 %)</b>
<b>POE4</b>	<b>1,06 (+ 6%)</b>	<b>1,02 (+ 2%)</b>

Je kleiner die verwendeten Akzeptorliposomen sind, desto höher liegen die Transferraten der NBD-Glucocebroside über denen der NBD-Galactocerbrosiden. Dieser Zusammenhang zeigt sich deutlicher bei dem Einsatz der PC/PE-Akzeptorliposomen als beim Einsatz der PC/PS-Akzeptorliposomen. Bei den kleinen PC/PE-Akzeptorliposomen liegt die NBD-Glu Transferrate mit + 51 % deutlich über der NBD-Gal Transferrate. Bei den großen POE4 Akzeptorliposomen hingegen liegt der NBD-Glu Transfer mit + 2 % nur knapp über dem NBD-Gal Transfer.

Einen großen Einfluss auf die Transferraten, sowohl von NBD-Glu als auch von NBD-Gal, hat der Anteil an PS, wohingegen der PE-Anteil keine klaren Aussagen zu einem Einfluss auf den Transfer zulassen. Als Erklärungsansatz hierfür werden die Hauptunterschiede der verwendeten Lipide PS und PE, die unterschiedlichen Ladungseigenschaften und die unterschiedliche räumliche Struktur der Lipide diskutiert. Als weitere Erklärung hierfür dienen Untersuchungen die darauf hinweisen, dass sich in Liposomen PS vornehmlich im Außenlayer integriert während sich PE bevorzugt im Innenlayer findet [123].

#### **4.1.3. Einfluss der Ladung der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer**

Der Einfluss der negativen Ladung der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer lässt sich am besten darstellen, wenn alle anderen Einflussfaktoren konstant sind. Dies ist bei Na-Cholat als Detergenz gegeben, da die entstandenen Akzeptorliposomen keine relevanten Größenunterschiede aufwiesen. Es handelt sich um SUV's von 40 bis 92 nm ohne ersichtliche Korrelation zwischen Größe und PS- oder PE-Gehalt (siehe Tabelle 2, Seite 47 und Tabelle 3, Seite 48 sowie Abbildung 11, Seite 47 und Abbildung 12, Seite 48).

Die Korrelationen des Lipidtransfers (in ng NBD-Glycolipid pro mg GLTP\*min) zum PS-Anteil (in %) lassen sich mit folgenden Gleichungen darstellen (siehe auch Tabelle 10, Seite 61 und Abbildung 19, Seite 62):

Für NBD-Glucocebroside:

$$y = 25197x^6 - 57500x^5 + 38177x^4 + 1713,5x^3 - 10190x^2 + 2836,4x + 2,4867;$$
$$R^2 = 0,96$$

Das errechnete Maximum findet sich bei einem PS-Anteil von 17,5 % mit 223 ng/(mg GLTP\*min).

Für NBD-Galactocerebroside:

$$y = 45448x^6 - 120257x^5 + 113555x^4 - 42203x^3 + 2338x^2 + 1394,7x - 0,4706;$$
$$R^2 = 0,93$$

Maximum bei PS-Anteil von 20 % mit 180,5 ng/min.

Setzt man den Durchschnitt der Transferraten, bei Verwendung der in etwa gleich großen PE-Akzeptorliposomen, als „Baserate“, so lässt sich folgendes postulieren:

PS-Anteile von 10 bis 40 % erhöhen die Transferaktivität, PS-Anteile von 40 bis 50 % haben keinen relevanten Einfluss darauf und PS-Anteile von 60 % und mehr hemmen sogar den Lipidtransfer.

Insgesamt sind jedoch die Transferraten bei den kleinen Na-Cholat Liposomen geringer, als bei den größeren OG und POE4 Liposomen bei entsprechender Lipidzusammensetzung.

Rückert et al. zeigen maximale Transferraten für unspezifische LTP (im System NBD-PC und RhodaminB-PE, bei Veränderung der Akzeptormembranen und bei konstanten Donormembranen) bei einem PS-Anteil von 30 %. Es zeigt sich also, dass sowohl bei GLTP als auch bei ns-LTP die Veränderung der PS-Anteile einen erheblichen Einfluss auf die Transferraten hat.

Dies deckt sich mit Studien [2, 118, 116, 117, 56, 125, 124] die zeigten, dass negativ geladene Liposomen mehr mit anderen Liposomen oder Zellen interagieren, als ungeladene Liposomen.

#### 4.1.4. Einfluss der Größe der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer

Um den Einfluss der Größe der Akzeptorliposomen und damit der Krümmungsradien zu bestimmen, sind erhebliche Größendifferenzen innerhalb einer Akzeptorliposomencharge notwendig. Dies ist bei der Verwendung von POE4 als Detergenz gegeben.

Die sehr großen PE-Liposomen (1070 bis 2360 nm) zeigen deutlich niedrigere Transferraten, als die erheblich kleineren PE-Liposomen, welche bei der Verwendung von OG oder Na-Cholat entstehen. Die Membrankrümmungen bei Liposomen mit einem Durchmesser von mehr als 1000 nm haben einen negativen Effekt auf den Glycolipidtransfer.

Bei den PS-Liposomen zeigt sich, dass die Größe der Liposomen den Ladungseffekt auf die Transfereigenschaften sogar übersteigt.

PS-Anteile von 10 bis 30 % führen zwar trotz Durchmesser von rund 1000 nm zu höheren Transferraten als bei nicht geladenen kleineren PC- oder PE-Liposomen. Allerdings liegen die Transferraten deutlich unter den Transferraten bei Einsatz der kleineren PS-Liposomen, die bei entsprechenden Lipidzusammensetzungen mit OG oder Na-Cholat als Detergenz hergestellt werden.

In der POE4-Charge findet sich ein Anstieg des Lipidtransfers mit zunehmenden PS-Anteil und daraus resultierende geringere Durchmesser. Ein Plateau der Transferraten wird bei PS-Anteilen von 60 bis 90 % erreicht. Zieht man hiervon den Ladungseffekt (siehe 4.1.3. Einfluss der Ladung der Akzeptorliposomen auf den Lipidtransfer) ab, so gilt für Durchmesser von 168 bis 2360 nm: je kleiner die Liposomen desto größer der Lipidtransfer. Auffallend ist, dass PS-Anteile größer als 50 % bei den mit POE4 hergestellten Akzeptorliposomen, die alle im Durchmesser größer als 150 nm sind, zu 5 bis 20fach höhere Transferraten führen, als bei den OG und Na-Cholat Liposomen die kleiner als 100 nm sind.

Dafür sind die Transferraten der über 1000 nm großen POE4 Liposomen mit PS-Anteilen bis 30 % deutlich geringer, als bei den zwischen 120 und 201 nm großen OG-Liposomen der selben Lipidzusammensetzung.

Folgende Tabelle zeigt dies beispielhaft bei dem Einsatz von NBD-Glu Donorliposomen und den Akzeptorliposomen PC/PS 80/20, PC/PS 40/60 und PC/PE 70/30 mit der Unterscheidung nach dem jeweils verwendeten Detergenz.

**Tabelle 17: Ausgewählte Transferraten zur Darstellung des Größeneffektes**

Einfluss der Größe in nm auf den NBD-Glu Transfer in (ng NBD-Glu pro mg GLTP*min)						
	PC/PS 80/20		PC/PS 40/60		PC/PE 70/30	
Detergenz	Transfer	Größe in nm	Transfer	Größe in nm	Transfer	Größe in nm
Na-Cholat	<b>204</b>	<b>61</b>	56	40	145	66
OG	<b>453</b>	<b>146</b>	52	73	150	239
POE4	102	1040	<b>285</b>	<b>680</b>	65	2110

Die jeweils höchsten Transferraten je Akzeptorliposomencharge sind fett markiert. Sowohl für die PC/PS 80/20 als auch für die PC/PE 70/30 finden sich die niedrigsten Transferraten bei den sehr großen (größer 1000 nm) POE4 Liposomen. Die Durchmesser der PC/PS 40/60 Liposomen liegt mit 680 nm deutlich unter 1000 nm, dort finden sich weit höhere Transferraten als bei den sehr kleinen Na-Cholat und OG Liposomen der gleichen Lipidzusammensetzung. Bei sich entsprechender Größe, hier bei den Na-Cholat Liposomen (40 bis 66 nm), finden sich die höchsten Transferraten bei der Lipidzusammensetzung PC/PS 80/20. Die Tatsache, dass bei den POE4 Liposomen die Lipidzusammensetzung PC/PS 40/60 zu den höchsten Transferraten führt, weist auf den Einfluss der Größe der Liposomen auf den Transfer hin.

#### 4.1.5. Optimale Zusammensetzung

Die mit OG hergestellten Akzeptorliposomen der Lipidzusammensetzung PC/PS 80/20 führten zu den höchsten Lipidtransferraten, sowohl in der NBD-Galactocerebrosid- als auch der NBD-Glucocerebrosid-Versuchsreihe.

Maximale Transferraten für NBD-Glucocerebroside finden sich bei mit OG hergestellten 146 nm großen Akzeptorliposomen mit der Lipidzusammensetzung PC/PS 80/20, gefolgt von PC/PS 70/30 mit einem Durchmesser von 124 nm.

Sehr hohe Transferraten finden sich bei den mit POE4 hergestellten 680 nm großen PC/PS 40/60, den 314 nm großen PC/PS 30/70 sowie den mit OG hergestellten PC/PS 90/10 und 40/60 Akzeptorliposomen mit einem Durchmesser von 166 bzw. 102 nm. Für NBD-Galactocerebroside finden sich maximale

Transferraten bei mit OG hergestellten PC/PS 80/20 Liposomen mit einem Durchmesser von 146 nm, dicht gefolgt von mit POE4 hergestellten 680 nm großen Akzeptorliposomen mit der Lipidzusammensetzung PC/PS 40/60 und den mit OG hergestellten PC/PS 70/30 Liposomen mit einem Durchmesser von 124 nm.

## 4.2. Gesamtbetrachtung

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PS bei einer Konzentrationen von 10 bis 40 % einen begünstigenden Einfluss für auf den Lipidtransfer hat.

Ab einer Konzentration von 60 % hat PS einen negativen Einfluss auf den Lipidtransfer. PE hat keinen relevanten Einfluss auf die Transferaktivität von Glycolipidtransferproteinen.

Die Größe der Durchmesser der Liposomen hat folgenden Einfluss auf den Lipidtransfer:

- Zwischen 120 und 760 nm einen positiven Einfluss
- Kleiner 100 nm einen negativen, d.h. transferhemmenden Einfluss
- Größer 1000 nm ebenfalls einen negativen Einfluss

### Lipidtransfer:

Die intrazelluläre Verteilung von Lipiden spiegelt nicht den ursprünglichen Ort ihrer Biosynthese wider. Die Hauptanzahl der intrazellulären Lipide befindet sich in der Plasmamembran, wohingegen die Membranen, die aktiv die Lipidsynthese betreiben (Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien), den niedrigsten Gehalt an Lipiden aufweisen [58]. Ein intensiver Fluss von Lipidmolekülen muss folglich existieren [132].

Die Hypothese einer direkten Mitwirkung spezifischer, zytosolischer Proteine beim Lipidaustausch zwischen Membranen wird von ihrer Fähigkeit, spezifische Reaktionen im Lipidmetabolismus zu stimulieren, abgeleitet [107]. Untersuchungen zeigen, dass die Rate an Lipidaustausch zwischen künstlichen Membransystemen bei Anwesenheit von unspezifischem LTP um das 40fache gesteigert werden kann [15, 21].

Für den proteinvermittelten Austausch von Lipiden zwischen einer Donor- und einer Akzeptormembran werden vier Mechanismen diskutiert [als Review 126]:

- a) Proteinunterstützte Membranfusion,
- b) durch das Protein vermehrte Abdiffusionsrate der in Membranen eingebundenen Lipide,
- c) Transport der an das Protein gebundenen Lipide durch eine wässrige Phase,
- d) Proteinvermittelte, enge Assoziation von Lipiden zweier Membranen ohne Fusion.

### **Einfluss saurer Phospholipide auf den Lipidtransfer:**

Der Einschluss von Phosphatidylethanolamine ein Phospholipid mit neutralem Potential bei pH 7,4 in Donor- und Akzeptor SUV's verändert weder die spontane Lipidaustauschkinetik noch die Charakteristika der Lipiddomänen innerhalb der Membranen [58, 36].

Dagegen verwandelt der Einschluss von nur 10 % eines anionischen Phospholipids (PS, PI, CL) die Größe der Lipidfraktionen innerhalb der Membranen und teilweise auch die Halbwertszeiten des spontanen Lipidaustausches [58, 36]. Eine Konformationsänderung der Lipiddomänen kann die Exposition einer größeren Anzahl von Lipidmolekülen an eine das Lösen aus der Membran begünstigende Umgebung bedeuten [58]. Die Strukturänderungen beruhen sowohl auf Penetration von Wasser in den Lipidbilayer als auch auf Lösung der spezifischen Interaktionen zwischen den Lipidmolekülen [101]. Möglicherweise stören bestimmte, saure Phospholipide die Bilayerstruktur durch elektrostatische Repulsion, wodurch ein größerer Abstand zwischen den Kopfgruppen der Phospholipide entsteht [37].

Auch bei Anwesenheit von unspezifischem LTP beobachten die Autoren eine deutliche Zunahme des Lipidtransfers bei Membranen mit negativ geladenem Phospholipidanteil, sodass sie schlussfolgern, dass ionische Interaktion zwischen positiv geladenem, unspezifischem LTP und negativ geladenen Membranen die stimulierende Wirkung, die das Protein auf den Lipidtransfer ausübt, beschleunigt [58, 52]. Zusätzlich beschreiben sie eine quantitativ vergleichbare

Rate des Lipidaustausches in Versuchsreihen, die mit Vesikeln mit geringem PS-Anteil, aber hoher Konzentration an unspezifischem LTP und vice versa, durchgeführt werden. Sie vermuten, dass die resümierende Kinetik von der Anzahl der aktiven Protein-SUV-Komplexe abhängt. Die Kinetik kann entweder durch die Verfügbarkeit des Proteins oder die Anzahl respektive Affinität von Bindungsstellen auf der Membran durch Veränderung des Gehaltes an sauren Phospholipiden, beeinflusst werden [58]. Wirtz et al. vermuten, dass die Assoziation vom Protein mit der Membran umso schneller abläuft, je negativer diese geladen ist [52].

Huang et al. [65] haben eine signifikante Änderung der Sekundärstruktur von unspezifischem LTP bei der Interaktion mit SUV-Membranen, die saure Phospholipide tragen, aber nicht bei der Anwesenheit von Vesikeln mit neutral geladenen Membranen beobachtet [65]. Die strukturelle Veränderung besteht in der Zunahme der  $\alpha$  - Helix innerhalb des Proteins. Die strukturelle Modifikation des N-terminalen Peptides, welche die amphipathische Helix verändert, verhindert die membranbindenden Eigenschaften des Proteins [65].

Andere Autoren observieren eine Inhibition der mit unspezifisches LTP katalysierten Phosphatidylcholintransferrate durch Einbau negativ geladener Phospholipide in die Akzeptormembran [152]. In einer Studie von van den Besselaar et al. hängt das Ausmaß der Transferhemmung durch die negative Oberflächenladung vom Verhältnis der eingesetzten Membranmengen ab. Bei 7,5 mol% Phosphatidylinositol in der Akzeptorvesikelmembran variieren die Ergebnisse von keiner bis zu einer Transferinhibition von 70 % bei Veränderung des Donor zu Akzeptor Verhältnisses von 0,2 bis 1,2 [148]. Berkhout dagegen beschreibt eine Zunahme der Transferraten durch unspezifisches LTP mit steigender PI-Konzentration seiner Versuchsliposomen bei niedrigen Akzeptorkonzentrationen und eine Hemmung des Lipidaustausches bei hohen Akzeptorliposomen. Die gegensätzlichen Ergebnisse begründet er mit einer Kompetition von Donor- und Akzeptormembran um das LTP. Bei nur niedriger Akzeptorkonzentration hat das Protein eine höhere Affinität zu den negativ geladenen Donormembranen [13]. Eine hohe Anzahl von Akzeptormembranen, die negativer geladen sind als die verwendeten Donormembranen, können unspezi-

fisches LTP effektiver binden [52]. Folglich ist das Protein für die Interaktion mit der Donormembran und für den Lipidaustausch nicht verfügbar [52].

In vitro Studien zeigen, dass negativ geladene Liposomen, die Phosphatidylserin enthalten, von Zellen besser endozytiert werden und eingeschlossene Pharmaka oder DNA effektiver an den Wirkort ausliefern [59]. Auch ist die Eliminationsrate von negativen geladenen Liposomen aus der Blutzirkulation schneller als von neutralen Liposomen [134]. Lee et al. beobachten, dass durch die Inkorporation von PS, PG und PI in die Liposomenmembran die Endozytose durch die Zellen gesteigert werden kann [79]. Sie schlussfolgern, dass die Zellmembrankomponente, die an das Liposom bindet, die negativ geladene Phosphatgruppe an der Berührungsstelle von Lipid mit Wasser als Rezeptor benutzt. Sie räumen ein, dass neben Phosphat auch andere negativ geladene Membrankomponenten als Bindungsstelle der Liposomen für die Zellwand dienen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich in soweit mit obigen Literaturangaben, dass der PS-Anteil die transferbegünstigende Eigenschaft von Membranen erhöht. Die Ergebnisse erweitern die Aussage dahingehend, dass ein Einfluss von PS auch auf den Glycolipidtransfer besteht und ein Maximum des Transfers bei PS-Anteilen von 20 % vorliegt. Zudem spielt der Krümmungsradius der Membrane eine erhebliche Rolle:

### **Membrankrümmung**

Die Membrankrümmung hat Einfluss auf die Größe und Eigenschaften von Lipiddomänen innerhalb der Membranen [48]. Der Unterschied der Lipidaustauschkinetik zwischen PC SUV im Gegensatz zu PC/PS SUV begründet sich möglicherweise mit der unterschiedlichen Membrankrümmung der Lipidvesikel durch andersartige Lipidanordnungscharakteristika [58]. Austausch von Donor und Akzeptor SUV's (bis 100 nm) gegen LUV's (bis 1000 nm) führen bei Fugler et al. zu einer Verlängerung der Austauschhalbwertszeit für Cholesterin um die Hälfte [48]. Huang et al. [65] beschreiben, dass das komplette unspezifische LTP bedeutende Änderungen in der Sekundärstruktur bei der Interaktion mit stark gekrümmten, anionische Phospholipide enthaltende SUV's, aber viel we-

niger mit wenig gekrümmten LUV's erfährt. Kleine Vesikel kennzeichnen sich durch beweglichere Kopfgruppen der Phospholipide in der äußeren Lipidschicht aus [65]. Die Anordnungsparameter in kleinen Vesikeln bewirken eine prominentere Exposition des hydrophoben Kernes der Doppelschicht. Dadurch kann eine Interaktion der Vesikel mit hydrophoben Regionen des LTP begünstigt werden [144]. Aufgrund des starken Krümmungsradius in kleinen Vesikeln, wiesen diese häufig Defekte in der molekularen Anordnung der Bausteine auf, was die Insertion von Proteinen begünstigen kann [65].

Besitzen die Liposomen einen sauren Phospholipidanteil innerhalb ihrer Membranen, führt die Reduktion des Durchmessers von 40 auf 22 nm bei Berkhout et al. [13] zu einer deutlichen Zunahme der Assoziationskonstante von PC-Transferprotein zur Vesikelmembran und folglich zur Transferinhibition. Sie testeten Liposomen mit einem Verhältnis PC/PA von 8:2 mol%. Bei Liposomen mit einem Durchmesser von mehr als 30 nm kann durch die Membranzusammensetzung keine Einschränkung des Transfers beobachtet werden [13].

Diese zum Teil kontroversen Aussagen zum Einfluss der Membrankrümmung bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie insofern, dass es einen für den Transfer optimalen Krümmungsradius, respektive einen optimalen Liposomendurchmesser geben muss. Der Einsatz von Akzeptorliposomen deren Durchmesser deutlich über oder unter diesem Optimum liegen, hindert den GLTP katalysierten Lipidtransfer. Nach den vorliegenden Ergebnissen liegt dieses Optimum in einen Bereich zwischen 120 und 760 nm.

### 4.3. Methodendiskussion

#### 4.3.1. Resonanz-Energie-Transfer (RET)

Zur Bestimmung der Transferraten von Glycolipiden wird eine Messmethode verwendet, die auf dem Resonanz-Energie-Transfer beruht. Vorteile dieser Methode sind, dass:

- die Messungen während des Transfers – also über einen Zeitraum hinweg – durchgeführt werden können, und nicht wie bei anderen Methoden (z.B. Gelschichtchromatografie) die Liposomen von einander getrennt werden müssen und damit nur Zeitpunktmessungen möglich sind,
- es sich um eine ungiftige und kostengünstige Methode handelt,
- keine Schutzmaßnahmen, wie z.B. bei der Verwendung von radioaktiv-markierten Lipiden, notwendig sind.

Durch diese Vorteile eignet sich die Methode auch für in vivo Versuchsreihen oder in vitro Messungen an Zellkulturen.

Kirjavainen et al. [76] verwenden fluoreszenzmarkierte Liposomen, um mittels Resonanz-Energie-Transfer zu zeigen, dass DOPE (diolelylphosphatidyl ethanolamine) haltige Liposomen mit dem stratum corneum der Haut fusionieren.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Donorliposomen weisen für NBD-Gal und NBD-Glu ähnliche Verteilungsmuster der Fluorophorlipide auf. Zu ca. zwei Dritteln finden sich die NBD-markierten Glycolipide im Außenlayer der Donorliposomen und stehen damit dem Transfer zur Verfügung (siehe Tabelle 8, Seite 55 und Tabelle 9, Seite 55). Die Sensitivität des Messsystems entspricht dem Verhältnis der sich im Außenlayer befindlichen NBD-Glycolipide, die im RET stehen (d.h. nah genug den RhodaminB-PE-Lipiden), zu den freien NBD-Glycolipiden im Außenlayer. Mit 93,4 % für NBD-Glucocerebroside und 95 % für NBD-Galactocerebroside Donorliposomen zeigen sich hohe Sensitivitäten.

### 4.3.2. Liposomenherstellung

Die nach Milsman et al. modifizierte Detergenzdialyse zur Herstellung der Liposomen ist eine vielfach [118, 116, 117, 43, 125, 124] verwendete und von vielen empfohlene Methode.

Alle in dieser Studie hergestellten Liposomenchargen weisen eine Polydispersität von null auf. Dies bestätigt, dass die Detergenzdialyse zur Entstehung von einheitlichen Liposomen führt.

Durch Verwendung verschieden großer Detergentien (Na-Cholat, OG und POE4) konnten Liposomenreihen mit deutlich unterschiedlicher Größe bei vergleichbarer Lipidkomposition gewonnen werden. Dabei konnte auch der Einfluss, insbesondere von PS auf die Größe und damit die Membrankrümmung nachgewiesen werden.

### 4.3.3. Glycolipidtransferprotein (GLTP)

Aus dem schlachtfrisch verarbeiteten Rinderhirn konnte mittels 40 %iger Ammoniumsulfatfällung ein Protein gewonnen werden, welches, wie die Ergebnisse zeigen, einen erheblichen katalytischen Einfluss auf den Transfer von Gluco- und Galactocerebrosiden hat. Somit handelt es sich um ein Glycolipidtransferprotein. Dies deckt sich mit Ergebnissen der GLTP-Charakterisierung von Rückert [123,126].

Insgesamt konnten 487 mg GLTP gewonnen werden. Unter der Aufbewahrung bei -18°C konnte über zwei Monate kein Aktivitätsverlust des Proteins festgestellt werden.

## 4.4. Eigene Betrachtungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass PS einen erheblichen Einfluss auf den GLTP katalysierten Transfer von Glycolipiden (Gluco- und Galactocerebrosiden) von einer Donormembran auf eine Akzeptormembran hat.

Mehrere Studien haben belegt, dass sowohl PS als auch Glycolipide begünstigende Effekte auf die Signalübertragung im Nervensystem (Azetylcholin-, das

Noradrenalin-, das Serotonin- und das Dopaminsystem [31, 30, 25, 5, 23]) haben, Gedächtnisleistungen verbessern und unter anderem bei Alzheimer- und Prionerkrankungen sowie Neuro-HIV die Nervenschädigungen mindern [68, 43, 89]. Hierbei sind insbesondere die Ursachen des Einflusses von PS auf molekularer Ebene noch nicht geklärt.

Der Einfluss von PS auf den Glycolipidtransfer in der vorliegenden Studie beruht einerseits auf den Ladungseigenschaften und andererseits darauf, dass PS die Entstehung kleinerer Liposomen und somit von kleineren Krümmungsradien der Membrane begünstigt.

In tierischen Zellen findet sich PS vornehmlich im Innenlayer der Zellmembranen. Die vermehrte Exposition von PS im Außenlayer tritt z.B. bei alternden Erythrozyten auf, welche dann vom RES schneller eliminiert werden. Im Normalfall scheint PS vornehmlich für intrazelluläre Prozesse von Bedeutung zu sein.

Es stellt sich die Frage, ob die positiven Effekte von PS auf die Nervenzellen (Signalübertragung, Alzheimererkrankung, Gedächtnisleistungen etc.) durch PS selbst oder über den durch PS vermehrten Transfer von Glycolipiden vom Ort ihrer Entstehung (ER, Mitochondrien) zur Zellmembran mit der verbundenen Anreicherung derselben im Außenlayer verursacht werden, oder ob es sich um eine Kombination von direktem Einfluss und indirektem Einfluss handelt.

Glycolipide wiederum sind vornehmlich im Außenlayer der Zellmembran vorhanden und können somit mit dem extrazellulären Raum, synaptischen Spalt oder anderen Zellen wechselwirken.

Neuere Studien zeigen, dass die Lipidverteilung in Zellmembranen nicht homogen ist. Es finden sich Regionen mit erhöhten Konzentrationen an bestimmtem Lipiden (insbesondere Glycolipiden), sogenannte „lipid enriched domains“, darunter „rafts“ und „caveolae“. Caveolae z.B. sind Einbuchtungen der Zellmembran mit Durchmessern von 50 bis 70 nm und damit geringeren Krümmungsradien als der Rest der Zellmembran. In diesen finden sich gehäuft Glycolipide und Phospholipide. Die Bestimmung der einzelnen Lipide weist noch Unsicherheiten auf, da die Zellen erst mit dem aggressiven Detergenz Triton X-100 zerstört werden müssen.

Neben der Lipidkomposition spielt auch der Krümmungsradius von biologischen Membranen eine entscheidende Rolle für die zellphysiologischen Prozesse.

Weiterer Forschungsbedarf besteht u.a. darin,

- auch für andere negativ geladene Phospholipide (z.B. PI) detailliert den Einfluss des Lipidanteils (von 10 bis 90 %) auf den Glycolipidtransfer und die Größe der entstehenden Liposomen zu bestimmen. Damit könnte eruiert werden, ob der Einfluss von PS auf Transfer und Größe der Liposomen durch die negativen Ladung von PS oder durch andere Eigenschaften von PS begründet werden kann.
- die sogenannten „lipid enriched domains“ gezielt nach dem PS-Anteil zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Tierische Zellen sind von einer Plasmamembran umschlossen, die aus einer Lipiddoppelschicht (Bilayer) besteht. Die Matrix dieses Bilayers wird vornehmlich von Phospholipiden (z.B. PS, PC, PE etc.) gebildet, darin eingebettet sind Glycolipide, Cholesterol und Proteine.

Die Verteilung der Lipide ist nicht homogen. Es findet sich eine Ungleichverteilung zwischen Innen- und Außenlayer. Zudem gibt es innerhalb der einzelnen Layer Regionen mit erhöhter Konzentration bestimmter Lipide, insbesondere von Glycolipiden, so genannte „lipid enriched domains“. Diesen Regionen wird eine besondere Bedeutung auf die Signalübertragung oder den Austausch mit der Umgebung respektive mit anderen Zellen beigemessen.

Innerhalb des menschlichen Körpers finden sich die höchsten Konzentrationen an Phosphatidylserin (PS) im Gehirn, mit 15 % am Gesamtlipidanteil.

PS wird als das wichtigste saure Phospholipid des Gehirns angesehen.

Die Lipide werden im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien gebildet und von dort zu der Zellmembran transportiert. Dieser Transport wird durch Lipidtransferproteine (z.B. Glycolipidtransferprotein, GLTP) katalysiert.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von PS und PE auf den GLTP katalysierten Transfer von Glycolipiden (Gluco- und Galactocerebrosiden) von Donor- auf Akzeptormembranen untersucht.

Hierzu werden Liposomen verwendet. Liposomen stellen künstliche Membransysteme dar. Die Liposomen werden mittels Detergenzdialyseverfahren hergestellt. Durch Verwendung verschieden großer Detergentien (Na-Cholat, OG und POE4) können Liposomenreihen unterschiedlicher Größe gewonnen werden.

Als Messsystem für den Lipidtransfer werden fluoreszenzmarkierte Lipide – RhodaminB-PE und NBD-Glycolipide (NBD-Glu respektive NBD-Gal) – in die Donorliposomen eingefügt. RhodaminB-PE und NBD-Glycolipide stehen in Resonanz-Energie-Transfer. Werden RhodaminB-PE und NBD-Glycolipide räumlich von einander getrennt – z.B. durch den Transfer von NBD-Glycolipiden auf die Akzeptorliposomen – so können Änderungen in der Fluoreszenz

gemessen werden. Die Sensitivität des Messsystems liegt für NBD-Glu bei 93,4 % und für NBD-Gal Donorliposomen bei 95 %.

Insgesamt 45 Akzeptorliposomenchargen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurden hergestellt: reine PC-Liposomen; PC/PS 90/10 bis PC/PS 10/90 und PC/PE 90/10 bis PC/PE 50/50 Liposomen.

Aus schlachtfrischen Rinderhirn konnte 487 mg GLTP gewonnen werden.

Die Ergebnisse zeigen einen erheblichen Einfluss von PS sowohl auf die Transferraten als auch auf die Größe der Akzeptorliposomen und damit auf die Krümmungsradien der Membrane. Für PE findet sich weder ein signifikanter Einfluss auf die Transferraten noch auf die Größe der Akzeptorliposomen.

Es gilt:

- je höher die PS-Konzentration desto kleinere Akzeptorliposomen entstehen,
- PS-Konzentrationen von 10 bis 40 % begünstigen den Glycolipidtransfer,
- PS-Konzentrationen größer 60 % hemmen den Transfer,
- Akzeptorliposomendurchmesser zwischen 120 bis 760 nm begünstigen und
- Akzeptorliposomendurchmesser kleiner 100 oder größer 1.000 nm hemmen den GLTP katalysierten Transfer von NBD-Glu und NBD-Gal.

Rechnerisch liegt das Maximum des Transfers für NBD-Glu bei einem PS-Anteil von 20 % und für NBD-Gal bei 22 % PS.

Mehrere Studien haben einen positiven Effekt von PS auf Gedächtnisleistung, Neurotransmittersysteme und auf die Reduktion der negativen Auswirkungen von Alzheimer Erkrankung auf die Nervenzellen nachgewiesen. Bisher konnte noch kein genaues Erklärungsmuster auf molekularer Ebene gefunden werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können hierzu einen Baustein beitragen, durch den Nachweis des positiven Einflusses von PS-Konzentrationen zwischen 10 und 40 % sowohl auf den Glycolipidtransfer als auch auf die Entstehung kleinerer Krümmungsradien vom Membranen. Sowohl Glycolipide als auch Membranregionen mit kleineren Krümmungsradien (z.B. Caveolae) haben einen nachgewiesenen Einfluss auf Neurotransmittersysteme, auf zellulären Austausch und Erkrankungen des Nervengewebes.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Abe, A., Yamada, K., Sasaki, T. (1982)  
A protein purified from pig brain accelerates the inter-membranous translocation of mono- and dihexosylceramides, but not the translocation of phospholipids.  
Biochem Biophys Res Commun. 104(4):1386-93.
- 2 Allen, T.M., Austin G.A., Chonn A., Lin L., Lee K.C. (1991)  
Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size.  
Biochim Biophys Acta. 1061(1): 56-64. PMID: 1995057
- 3 Allergo, L., Faaretto, V., Ziliotto, G. (1987)  
Oral Phosphatidylserine in elderly patients with cognitive deterioration. An open study. Clin. Trials J. 24:104-108.
- 4 Altamura, N., Landriscina, C. (1986)  
Effect of N-ethylmaleimide on rat liver phosphatidylcholine-specific and non-specific transfer protein activities: its dependence on donor liposome composition  
Int. J. Biochem. 18: 513-517 (154 von 7)
- 5 Amaducci, L., Crook, T.H., Lippi, A. et al. (1991)  
Use of phosphatidylserine in Alzheimer's Disease  
Ann NY Acad Sci 640:245-249.
- 6 Amaducci, L., The SMID Group. (1988)  
Phosphatidylserine in the treatment of Alzheimer's Disease: results of a multicenter study  
Psychopharm Bull 24:130-134.
- 7 Bagdanor, A.A., Gorleeva, L.V., Torchiken, V.P., Margolis, L.B. (1989)  
Lectin-tearing liposomes: differential finding to normal and to transformed mouse fibroblasts  
Exp. Cell Res. 181: 362-374
- 8 Bangham, A.D. (1983)  
Liposome letters  
Academic press. London, 269 – 276
- 9 Bangham, A.D., Hill, M.W., Miller, N.G. (1974)  
Methods Membr. Biol. 1: 1-68
- 10 Bangham, A.D., Horne, R.W. (1964)  
Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope  
J. Mol. Biol. 8: 660-668
- 11 Benton, D., Donohoe, R.T., Sillance, B., Nabb, S. (2001)  
The Influence of Phosphatidylserine Supplementation on Mood and Heart Rate when Faced with an Acute Stressor  
Nutritional Neuroscience 169-178.

- 12 Berden, J.A., Barker, R.W., Radda, G.K. (1975)  
NMR Studies on Phospholipid Bilayers, some Factors affecting Lipid Distribution  
*Biochim. Biophys. Acta.* 375: 186-208 [5]
- 13 Berkhout, T.A., Visser, A.J.W.G., Wirtz, K.W.A. (1984)  
Static and time-resolved fluorescence studies of fluorescent phosphatidylcholine bound to the phosphatidylcholine transfer protein of bovine liver.  
*Biochemistry* 23: 1501-1513
- 14 Bermudez, L.E. (1994)  
Use of Liposome Preparation to Treat Mycobacterial Infections  
*Immunobiol.* 191: 578-583
- 15 Billheimer, J.T., Gaylor, J.L. (1990)  
Effect of lipid composition on the transfer of sterols mediated by non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein2)  
*Biochim. Biophys. Acta* 1046: 136-143
- 16 Bloj, B., Zilversmit, D.B. (1983)  
Nonspecific lipid transfer protein from rat and beef liver. Purification and properties.  
*Methods Enzym* 98: 574-581
- 17 Blume, G., Ceve, G. (1993)  
Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo  
*Biochim. Biophys. Acta* 1146: 157 -168
- 18 Brambilla, F., Maggioni, M. (1998)  
Blood levels of cytokines in elderly patients with major depressive disorder  
*Acta Psychiatr Scand* 97:309-313.
- 19 Brown, D.A., London, E. (2000)  
Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.  
*J Biol Chem* 275,17221-17224, PubMed:20298779
- 20 Brown, R.E. (1998)  
Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal.  
*J Cell Sci* 111,1-9, PubMed:98055824
- 21 Butko, P., Hapala, I., Scallen, T.J., Schroeder, F. (1990)  
Acidic phospholipids strikingly potentiate sterol carrier protein-2 mediated intermembrane sterol transfer  
*Biochemistry* 29: 4070-4077
- 22 Caffarra, P., Santamaria, V. (1987)  
The Effects of Phosphatidylserine in patients with mild cognitive decline  
*Clin. Trials J.* 24,109-114.

- 23 Calderoni, G., Aporti, F., Bellini, F., Sonetti, A.C., Rubini, R., Telato, S. Xu, C. (1985)  
Phospholipids as pharmacological tools in the aging brain  
In: L.A. Horrocks, J.N. Kanfer, G. Porcellati (eds). Phospholipids in the nervous system, Vol II, Physiological roles. Raven Press New York 11-19.
- 24 Cenacchi, T., Baggio, C., Palin, E. (1987)  
Human tolerability of oral phosphatidylserine assessed through laboratory examinations  
Clin Trials J 24:125-130.
- 25 Cenacchi, T., Bertoldin, T., Farina, C. et al. (1993)  
Cognitive decline in the elderly: A double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration  
Aging Clin Exp Res 5:123-133.
- 26 Chanderbhan, R., Noland, B.J., Scallen, T.J., Vahouny, G.V. (1982)  
J. Biol. Chem. 257: 8928-8934
- 27 Chanderbhan, R.F., Kharroubi, A., Pastuszyn, A., Gallo, L.L. Scallen, T. (1998)  
In: Intracellular Cholesterol Trafficking  
Ed.: Chang, T.Y., Freeman, D.A.  
Kluwer Academic Publishers, Boston, MA
- 28 Chattopadhyay, A., (1990)  
Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes.  
Chem Phys Lipids. 53(1):1-15.
- 29 Crain, R.C., Zilversmit, D.B. (1980)  
Two nonspecific phospholipid exchange proteins from beef liver. I. Purification and characterization.  
Biochemistry 19 (7): 1433-1439
- 30 Crook, T.H., Petrie, W., Wells, C., Massari, D.C. (1992)  
Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's Disease  
Psychopharmacol Bull 28:61-66.
- 31 Crook, T.H., Tinklenberg, J., Yesavage, J. et al. (1991)  
Effects of phosphatidylserine in age-associated memory impairment  
Neurology 41:644-649.
- 32 Cummis, H.Z., Pusey, P.N. (1977)  
Photon correlation spectroscopy and velocimetry.  
Dynamics of macromolecular motions.  
Plenum Press, New York, pp. 164-199
- 33 Deamer, D., Bangham, A.D. (1976)  
Large volume liposomes by an ether vaporization method  
Biochim. Biophys. Acta 443: 629-634

- 34 Demel, R.A., Lowers, H., Jackson, R.L., Wirtz, K.W.A. (1984)  
Colloids and Surfaces 10: 301-311
- 35 Depauw, H., de Wolf, M., van Dessel, G., Hilderson, H.J., Lagrou, A., Dierick, W. (1988)  
Modification of TSH – stimulated adenylate cyclase activity of bovine thyroid by manipulation of membrane phospholipid composition with a nonspecific lipid transfer protein  
Biochim. Biophys. Acta 937: 359-368
- 36 Dicorleto, P.E., Fakharzadeh, F.F., Searles, L.L., Zilversmit, D.B. (1977)  
Stimulation by acidic phospholipid of protein – catalyzed phosphatidylcholine transfer  
Biochim. Biophys. Acta 468: 296-304
- 37 DiCorleto, P.E., Zilversmit, D.B. (1977)  
Protein – Catalyzed Exchange of Phosphatidylcholine between Sonicated Liposomes and Multilamellar Vesicles  
Biochemistry 16: 2145-2150
- 38 Dudel, J. (1987)  
Kapitel 1: Grundlagen der Zellphysiologie  
In: Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.):  
Physiologie des Menschen, 23. Aufl.: 2-15  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 39 Dyatlovitskaya, E.V., Lemenovskaya, A.F., Valdnetse, A.T., Sinitsyna, E.V., Bergelson, L.D. (1980)  
Biochemistry (Engl. Transl.) 45: 1546
- 40 Eastman, S.J., Hope, M.J., Wong, K.F., Cullis, P.R. (1992)  
Influence of Phospholipid Asymmetry on Fusion between Large Unilamellar Vesicles  
Biochemistry 31:4262-4268
- 41 Ehnholm, C., Zilversmit, D.B. (1973)  
Exchange of various phospholipids and of cholesterol between liposomes in the presence of highly purified phospholipid exchange protein  
J. Biol. Chem. 248:1719-1724
- 42 Fahey, , T.D., Pearl, M.S. (1998)  
The Hormonal and Perceptive Effects of Phosphatidylserine Administration During Two Weeks of Weight Training-Induced Over-Training  
Biol.Sport. 15,135-144.
- 43 Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., Yahi, N. (2002)  
Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases  
Exp. Rev. Mol. Med. 20 December,  
<http://www.expertreviews.org/02005392h.htm>

- 44 Fernholz, K.M., Seifert, J.G., Bacharach, D.W., Burke, E.R., Gazal, O. (2000)  
The Effects of Phosphatidylserine on Markers of Muscular Stress in  
Endurance Runners  
Annual Meeting of the American College of Sports  
Medicine, Indianapolis, June 3rd 2000
- 45 Ferrell, J.E., Lee, K.-J., Huestis, W.H. (1985)  
Lipid Transfer between Phosphatidylcholine Vesicles and Human  
Erythrocytes: Exponential Decrease in Rate with Increasing Acyl Chain  
Length  
Biochemistry 24: 2857-2864
- 46 Fielding, C.J., Fielding, P.E. (1997)  
Intracellular cholesterol transport.  
J. Lipid Res. 38: 1503-1521
- 47 Franck, P.F.H., Tsun-Yee Chiu, D., Op den Kamp, J.A.F., Lubin, B., van  
Deenen, L.L.M., Roelofsen, B. (1983)  
Accelerated transbilayer movement of phosphatidylcholine in sickled  
erythrocytes  
J. Biol. Chem. 258: 8435-8442
- 48 Fugler, L., Cleján, S., Bittman, R. (1985)  
Movement of cholesterol between vesicles prepared with different  
phospholipids or sizes  
J. Biol. Chem. 260: 4098-4102
- 49 Gabizon A, Peretz T, Sulkes A, Amselem S, Ben-Yosef R, Ben-Baruch N,  
Catane R, Biran S, Barenholz Y. (1989)  
Systemic administration of doxorubicin-containing liposomes in cancer  
patients: a phase I study.  
Eur. Cancer Clin. Oncol. 25(12): 1795-803
- 50 Gabizon, A., Papahadjopoulos, D. (1988)  
Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced  
uptake by tumors  
Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y., 85: 6949-6953
- 51 Gadella, T.W.J., Wirtz, K.W.A. (1991)  
The low-affinity site of the non-specific lipid transfer protein.  
Implications for its mode of action  
Biochim. Biophys. Acta 1070: 237-245
- 52 Gadella, T.W.J., Wirtz, K.W.A. (1994)  
Phospholipid binding and transfer by the nonspecific lipid-transfer protein  
(sterol carrier protein 2). A kinetic model.  
Eur. J. Biochem. 220: 1019-1028
- 53 Galler, H.J. (1988)  
Fluoreszenz – Spektroskopie  
In: Spektroskopische Methoden in der Biochemie  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

- 54 Gammon, C.M., Vaswani, K.K., Ledeen, R.W. (1987)  
Isolation of two glycolipid transfer proteins from bovine brain: reactivity toward gangliosides and neutral glycosphingolipids.  
*Biochemistry*. 26(19):6239-43.
- 55 Gortner, E., Grendel, F. (1925)  
*J. Exp. Med.* 41: 439-444
- 56 Grammer, J.B., Chung, Y.B., Pleyer, U., Thiel, H.-J., Schmidt, K.H., Lee, V.H.L. (1994)  
Topical peptide delivery to the eye using liposomes.  
*German J. Ophthalmol.* 3, 335
- 57 Granata, Q., Di Michele, J. (1987)  
Phosphatidylserine in elderly patients  
*Clin. Trials J.* 24,99-103.
- 58 Hapala, I., Kavecansky, J., Butko, , P., Scallen, T.J., Joiner, C.H., Schroeder, F. (1994)  
Regulation of Membrane Cholesterol Domains by Sterol Carrier Protein-2  
*Biochemistry* 33: 7682-7690
- 59 Heath, T.D., Lopez, N:G., Papahadjopoulos, D. (1985)  
The effects of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-gamma-aspartate to cells in vitro  
*Biochim. Biophys. Acta* 820: 74-84
- 60 Heiss, W.D., Kessler, J., Slansky, I. et al. (1993)  
Activation PET as an instrument to determine therapeutic efficacy in Alzheimer's Disease  
*Ann NY Acad Sci* 695:327-331.
- 61 Heiss, W.D., Kessler, J., Szelies, B., Herholz, K. (1991)  
Abnormalities of energy metabolism in Alzheimer's Disease studied with PET  
*Ann NY Acad Sci* 640:65-71.
- 62 Heywood, R., Cozens, D.D., Richold, M. (1987)  
Toxicology of a phosphatidylserine preparation from bovine brain (BC-PS)  
*Clin Trials J* 24:25-32.
- 63 Huang, A., Huang, L., Kennell, S.J. (1980)  
Monoclonal antibody covalently coupled with fatty acid  
*J. Biol. Chem.* 255: 8015-8018
- 64 Huang, C. (1969)  
Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics.  
*Biochemistry* 8: 344-352
- 65 Huang, H., Ball, J.M., Billheimer, J.T., Schroeder, F. (1999)  
Interaction of the N-terminus of sterol carrier protein 2 with membranes: role of membrane curvature  
*Biochem. J.* 344: 593-603

- 66 Huang, L. (1983)  
Liposome-cell interactions in vitro.  
In: Liposomes.  
Ostro, M. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel,  
pp.87-124
- 67 Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. (1977)  
Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles.  
Biochim. Biophys. Acta 470: 185
- 68 Jäger, R. (2002)  
Cognitive Performance Leci-PS  
Degussa Bioactives, [http://www.degussa-bioactives.com/bioactives/img/brochures/cognitive\\_ps.pdf](http://www.degussa-bioactives.com/bioactives/img/brochures/cognitive_ps.pdf)
- 69 Johnson, L.W., Zilversmit, D.B. (1975)  
Catalytic properties of phospholipid exchange protein from bovine heart.  
Biochim. Biophys. Acta 375: 165
- 70 Juliano, R.L., Grant, C.W.M., Barber, K.R., Kalp, M.A. (1987)  
Mechanism of selective toxicity of Amphotericin B incorporated into liposomes  
Mol. Pharmacol. 31: 1-11
- 71 Kaibuchi, K., Takay, Y., Nishizuka, Y. (1981)  
Cooperative roles of various membrane phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase.  
J.Biol.Chem. 256, 7146-7149.
- 72 Kamp, H.H., Wirtz, K.W.A., Van Deenen, L.L.M. (1975)  
Delipidation of the phosphatidylcholine exchange protein from beef liver by detergents  
Biochim. Biophys. Acta 398: 401-414
- 73 Kasper, A.M., Helmkamp, G.M. (1981)  
Intermembrane phospholipid fluxes catalyzed by bovine brain phospholipid exchange protein  
Biochim. Biophys. Acta. 664(1): 22-32
- 74 Kennedy, E. P. (1986)  
In: Lipids and Membranes: Past, Present and Future  
Ed. Op den Kamp, J.A.F., Roelofsen, B., Wirtz, K.W.A., Amsterdam, Elsevier,  
pp. 79-131
- 75 Kidd, P.M. (1996)  
Phosphatidylserine; membrane nutrient for memory. A clinical and mechanistic assessment.  
Altern Med Rev 1: 70-84.

- 76 Kirjavainen, M., Urtti, A., Jaaskelainen, I., Suhonen, T.M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Monkkonen, J. (1996)  
Interaction of liposomes with human skin in vitro--the influence of lipid composition and structure.  
*Biochim Biophys Acta*, 1304(3):179-89
- 77 Klinkhammer, P., Szelies, B., Heiss, W.D. (1990)  
Effect of phosphatidylserine on cerebral glucose metabolism in Alzheimer's Disease  
*Dementia* 1:197-201.
- 78 Latorraca, S., Piersanti, P., Tesco, G., et al. (1993)  
Effect of phosphatidylserine on free radical susceptibility in human diploid fibroblasts.  
*Neural Transm Park Dis Dement Sect* 6:73-77.
- 79 Lee, K.-D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1992)  
Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density  
*Biochim. Biophys. Acta* 1103: 185-197
- 80 Lichtenberg et al (1988)  
Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation.  
*Methods of Biochemical Analysis*, Volume 33: 337-452
- 81 Lichtenberg, D., Peterson, N.O., Giradet, J.L., Kainosho, M., Kroon, P.A., Seiter, C.H.A., Feigenson, G.W., Chan, S.I. (1975)  
The interpretation of proton magnetic resonance linewidths for lecithin dispersions. Effect of particle size and chain packing.  
*Biochim. Biophys. Acta* 382: 10
- 82 Lipka, G., Schulthess, G., Thurnhofer, H., Wacker, H., Wehrl, E., Zeman, K., Weber, F.E., Hauser, H. (1995)  
Characterization of lipid exchange proteins isolated from small intestinal brush border membrane.  
*J. Biol. Chem.* 270: 5917-5925
- 83 Litman, B.J. (1973)  
Lipid model membranes. Characterization of mixed phospholipid vesicles.  
*Biochemistry* 12: 2545-2554
- 84 Lombardi, G.F. (1989)  
Terapia farmacologica con fosfatidil serina in 40 pazienti ambulatoriali con sindrome demenziale senile  
*Minerva Med.* 80,599-602.
- 85 Lopez-Berestein, G., Mehta, R., Hopfer, R., Mills, K., Kasi, L., Mehta, K., Fainstein, V., Hersh, E., Juliano, R. (1985)  
Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study.  
*J. Infect. Dis.* 151: 704-710

- 86 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951)  
Protein Measurements with Folin Phenol Reagent  
*J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- 87 Machida, K., Ohnishi, S. (1980)  
Effect of bilayer membrane curvature on activity of phosphatidylcholine exchange protein.  
*Biochim. Biophys. Acta* 596: 201-209
- 88 Margolis, L.B. (1988)  
Cell interactions with solid and fluid liposomes in vitro: lessons for liposomologists and cell biologists; In: *Liposomes as drug carriers*  
Gregoriadis, G. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, pp. 75-92
- 89 Masserini, M., Palestini, P., Pitto, M. (1999)  
Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system  
*J Neurochem.* 73(1):1-11. Review.; PMID: 10386949
- 90 Massey, J.B., Gotto, A.M., Pownall, H.J. (1982)  
Kinetics and mechanism of the spontaneous transfer of fluorescent phosphatidylcholines between apolipoprotein-phospholipid recombinants.  
*Biochemistry* 21: 3630-3636
- 91 Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R. (1986)  
Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure  
*Biochim. Biophys. Acta* 858: 161-168
- 92 Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R., Janoff, A.S. (1985)  
Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles  
*Biochim. Biophys. Acta* 817: 193-196
- 93 McEvoy, L., Williamson, P., Schlegel, R.A. (1986)  
Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 3311-331
- 94 McLaughlin, S., Harary, H. (1975)  
Phospholipid flip-flop and the distribution of surface charges in excitable membranes.  
*Biophys. J.* 14: 200
- 95 McLean, L.R., Phillips, M.C. (1981)  
Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles.  
*Biochemistry* 20: 2893-2900
- 96 Megli, F.M., De Lisi, A., Van Amerongen, A., Wirtz, K.W.A., Quagliariello, E. (1986)  
Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) is bound to rat liver mitochondria: its role in spontaneous intermembrane phospholipid transfer  
*Biochim. Biophys. Acta* 861: 463-470

- 97 Metz, R.J., Radin, N.S. (1980)  
Glucosylceramide uptake protein from spleen cytosol  
J Biol Chem. 255(10):4463-4467
- 98 Metz, R.J., Radin, N.S. (1983)  
Cerebroside transfer protein  
Methods Enzymol. 98:613-22
- 99 Miller, E.K., Dawson, R.M. (1972)  
Exchange of phospholipids between brain membranes in vitro  
Biochem J.;126(4):823-35
- 100 Milsman, M.H.W., Schwendener, R.A., Weder, H.-G. (1978)  
The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis; Biochim. Biophys. Acta 512: 147-155
- 101 Nemezc, G., Schroeder, F. (1988)  
Biochemistry 27: 7740-7749
- 102 New, R.R.C., Black, C.D.V., Parker, R.J., Scherphof, G.L.(1990)  
Liposomes in biological systems.  
In: Liposomes. A practical approach.  
New, R.R.C.(Ed.), Oxford University Press, New York, pp. 224-252
- 103 Nichols, J.W. (1987)  
Binding of fluorescent – labeled phosphatidylcholine to rat liver nonspecific lipid transfer protein  
J. Biol. Chem. 262: 14172-14177
- 104 Nichols, J.W. (1988)  
Kinetics of fluorescent-labeled phosphatidylcholine transfer between nonspecific lipid transfer protein and phospholipid vesicles  
Biochemistry 27: 1889-1896
- 105 Nichols, J.W., Pagano, R.E. (1982)  
Biochemistry, 21: 1720-1726
- 106 Nichols, J.W., Pagano, R.E. (1983)  
Resonance energy transfer assay of protein-mediated lipid transfer between vesicles  
J. Biol. Chem. 258: 5368-5371
- 107 Noland, B.J., Arebalo, R.E., Hansbury, E., Scallen, T.J. (1980)  
Purification and properties of sterol carrier protein 2.  
J. Biol. Chem. 255: 4282-4289
- 108 Nordlund, J.R., Schmidt, C.F., Dicken, S.N., Thompson, T.E. (1981)  
Transbilayer Distribution of Phosphatidylethanolamine in Large and Small Unilamellar Vesicles  
Biochemistry 20: 3237-3241

- 109 Nunzi, M.G., Milan, F., Guidolin, D. et al. (1989)  
Effects of phosphatidylserine administration on age-related structural changes in the rat hippocampus and septal complex  
*Pharmacopsychiat* 22: 125-128.
- 110 Ossendorp, B.C., Snoek, G.T., Wirtz, K.W.A. (1994)  
*Curr. Topics Membr.* 40: 217-259
- 111 Ossendorp, B.C., Wirtz, K.W.A. (1993)  
The non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) and its relationship to peroxisomes; *Biochimie* 75: 191-200
- 112 Pasteur, F. et al.  
Efficacy of a nutritional supplement with phospholipids (phosphatidylserine) on athletic-training-induced psychological and physical stress.  
Publication in preparation.
- 113 Pastuszyn, A., Noland, B.J., Bazon, F., Fletterick, R.J., Scallen, T.J. (1987)  
Primary sequence and structural analysis of sterol carrier protein2 from rat liver: homology with immunoglobulins.  
*J. Biol. Chem.* 262: 13219-13227
- 114 Petersen, R.A., Lee, K.J., Donn, A. (1965)  
Acetylcholinesterase in the rabbit cornea  
*Arch. Ophthalmol.* 73: 370-377
- 115 Petkova, D.H., Momchilova-Pankova, A.B., Koumanov, K.S. (1987)  
Effect of liver plasma membrane fluidity on endogenous phospholipase A2 activity  
*Biochim.* 69: 1251-1255
- 116 Pleyer, U., Elkins, B., Rückert, D., Lutz, S., Grammer, J., Chou, J., Schmidt, K.H., Mondino, B. J. (1994)  
Ocular absorption of cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields.  
*Curr. Eye Res.* 13, 177-181
- 117 Pleyer, U., Grammer, J., Kosmidis, P., Rückert, D.G. (1995)  
Analysis of interactions between the corneal epithelium and liposomes: qualitative and quantitative fluorescens studies of a corneal epithelial cell line.  
*Surv. Ophthalmol.* 39, 53-516
- 118 Pleyer, U., Schmidt, K.H., Thiel, H.J. (1993)  
Liposomes in Ophthalmology and Dermatology.  
Hippokrates Verlag, Stuttgart
- 119 Puca, F.M., Baarese, M.A., Minervini, M.G. (1987)  
Exploratory trial of Phosphatidylserine efficacy in mildly demented patients  
*Clin.Trials J.* 24, 94-98
- 120 Rabboni, M., Maggioni, F.S., Giannelli, A., Beinat, L. (1990)  
Neuroendocrine and behavioural effects of phosphatidylserine in elderly patients with abiotrophic or ascular dementia or mild depression.  
*Clin.Trials J.* 27, 230-240.

- 121 Rimon, G., Hansky, E., Levitski, A. (1980)  
Temperature dependence of beta receptor, adenosine receptor, and sodium fluoride stimulated adenylate cyclase from turkey erythrocytes  
*Biochemistry* 19: 4451-4460
- 122 Rubas, W., Schreier, H. (1991)  
Liposomen: Fortschritte in Herstellungs-Technologie und Therapie  
*Pharmazie in unserer Zeit* 6: 255-270
- 123 Rückert, D.G. (1998)  
Enzymatische Darstellung von Liposomen mit asymmetrischer Transbilayerverteilung von Phospholipiden  
Dissertation, Tübingen
- 124 Rückert, D.G., Nagel, B. and Schmidt, K.H. (1993)  
Asymmetric Distribution of Phospholipids in Liposomes produced by detergent dialysis Method  
in: *Liposomes in Ophthalmology* Ed. U. Pleyer, Hippokrates Verlag Stuttgart, 27-43
- 125 Rückert, D.G., Pleyer, U., Karten, B., Schem, C., Lutz, S., Schmidt, K.H. and Thiel, H.J. (1993)  
Liposome-Encapsulated anti-CD<sub>4</sub> Monoclonal Antibodies (OKT3)  
in: *Liposomes in Ophthalmology* Ed. U. Pleyer, Hippokrates Verlag Stuttgart, 71-76
- 126 Rückert, D.G., Schmidt, K. (1990)  
Lipid transfer proteins  
*Chem. Phys. Lip.* 56: 1-20
- 127 Sanyal, S.N. (1987)  
Evidence for the presence of a glycosphingolipid-transfer protein in rat brain cytosol  
*Biochem Cell Biol.* 65(5):493-500; PMID: 3620164
- 128 Sasaki, T. (1985)  
Glycolipid-binding proteins.  
*Chem Phys Lipids.* 38(1-2):63-77; PMID: 4064224
- 129 Scallen, T.J., Pastuszyn, A., Noland, B.J., Chanderbhan, R., Kharroubi, A., Vahouny, V. (1985)  
Sterol Carrier and Lipid Transfer Proteins  
*Chem. Phys. Lip.* 38: 239-261
- 130 Schreiber, S., Kampf-Sherf, O., Gorfine, M., Kelly, D., Oppenheim, Y., Lerer, B. (2000)  
An open trial of plant-source derived Phosphatidylserine for the treatment of age-related cognitive decline  
*Isr.J.Psychiatry Relat. Sci.* 37:302-307.
- 131 Schreier, H. (1982)  
Liposomen – ein neuartiger Arzneistoffträger  
*Pharmazie in unserer Zeit* 11. J., Nr. 4.: 99-103

- 132 Schroeder, F., Jefferson, J.R., Kier, A.B., Knittel, J., Scallen, T.J., Wood, W.G., Hapala, I. (1991)  
Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 196: 235-252
- 133 Schwarz, B. (2003)  
12-wöchige Verlaufsbeobachtung on IQ-Plus KonsumentInnen,  
Publication in preparation.
- 134 Senior, J., Crawley, J.C.W., Gregoriadis, G. (1985)  
Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation  
after intravenous injection.  
Biochim. Biophys. Acta 839: 1-8
- 135 Sessa, G., Weissman, G. (1968)  
Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes.  
J. Lipid Res. 9: 310-318
- 136 Simons, K., Ikonen, E. (1997)  
Functional rafts in cell membranes.  
Nature 387, 569-572, PubMed: 97320491
- 137 Sinforiani, E., Agostinis, C., Merlo, P., Gualtieri, G., Mauri, M., Mancuso, A.  
(1987)  
Cognitive Decline in ageing brain. Therapeutic Approach with  
Phosphatidylserine  
Clin. Trials J. 24, 115-124.
- 138 Singer, S.J., Nichols, G.L. (1972)  
Fluid mosaic model of structure of cell membrane  
Science 181: 181-185
- 139 Smart, E.J. et al. (1999)  
Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction.  
Mol Cell Biol 19, 7289-7304, PubMed: 99454986
- 140 Somerharju, P.J., van Loon, D., Wirtz, K.W.A. (1987)  
Determination of acyl chain specificity of the bovine liver phosphatidylcholine  
transfer protein. Application of pyrene – labeled phosphatidylcholine species.  
Biochemistry, 26: 7193-7199
- 141 Teerlink, T., Poorthuis, B.J.H.M., Wirtz, K.W.A. (1983)  
Phosphatidylcholine transfer protein from rat liver: purification and  
radioimmunoassay  
Methods Enzymol. 96: 586-592
- 142 The SMID Group. (1987)  
Phosphatidylserine in the treatment of clinically diagnosed Alzheimer's  
disease  
J Neural Transm 24: 287-292.
- 143 Treat, J., Greenspan, A., Rahman, A. (1988)  
Breast Cancer Res. Treat 12: 148

- 144 Vaccaro, A.M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Barca, A., Roncaioli, P. (1993)  
Studies on glucosylceramidase binding to phosphatidylserine liposomes: the role of bilayer curvature.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1149: 55-62
- 145 Vale, M.G.P. (1977)  
Localization of the amino phospholipids in sarcoplasmic reticulum membranes revealed by trinitrobenzene-sulfonate and fluorodinitrobenzene  
*Biochim. Biophys. Acta.* 471: 39-48
- 146 Van Amerongen, A., Demel, R.A., Westerman, J., Wirtz, K.W.A. (1989)  
Transfer of cholesterol and oxysterol derivatives by the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2): a study on its mode of action.  
*Biophys. Acta* 1004: 36-46
- 147 Van Amerongen, A., Teerlink, T., Van Heusden, G.P.H., Wirtz, K.W.A. (1985)  
The non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) from rat and bovine liver  
*Chem. Phys. Lipids* 38 (1-2): 195-204
- 148 van den Besselaar, A.M.H.P., Helmkamp, G.C., Wirtz, K.W.A. (1975) Kinetic model of the protein-mediated phosphatidylcholine exchange between single bilayer liposomes.  
*Biochemistry* 14: 1852-1858
- 149 Van Meer, G. (1989)  
Lipid traffic in animal cells  
*Annu. Rev. Cell. Biol.* 5: 247-275
- 150 Voelker, D.R. (1984)  
Phosphatidylserine functions as major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK – 21 cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2669-2673
- 151 Waters, S.I., Sen, R., Brunauer, L.S., Huestis, W.H. (1996)  
Physical Determinants of Intermembrane Protein Transfer  
*Biochemistry* 35: 4002-4008
- 152 Wirtz, K.W., Geurts van Kessel, W.S.M., Kamp, H.H., Demel, R.A. (1976)  
The protein-mediated transfer of phosphatidylcholine between membranes. The effect of membrane lipid composition and ionic composition of the medium.  
*Eur. J. Biochem.* 61: 515-523
- 153 Wirtz, K.W.A. (1997)  
Phospholipid transfer proteins revisited  
*Biochem. J.* 324: 353-360

- 154 Wirtz, K.W.A., Zilversmit, D.B. (1968)  
Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes  
in vitro  
J. Biol. Chem. 243 (13): 3596-3602
- 155 Yamada, K., Abe, A., Sasaki, T. (1985)  
Specificity of the glycolipid transfer protein from pig brain  
J Biol Chem. 260(8):4615-21; PMID: 3988728
- 156 Zilversmit, D.B. (1983)  
Lipid Transfer Proteins: Overview and Applications  
Method. Enzym. 98: 565-573

## **Anhang**

### **Danksagungen**

Folgenden Personen möchte ich danken :

Herrn Prof. Dr. Dr. Schmidt, für die Möglichkeit diese Arbeit im Labor für experimentelle Chirurgie durchführen zu können.

Herrn Dr. Dieter Rückert für seine geduldige Betreuung, seine Bereitschaft technische und fachliche Fragen zu beantworten und seine konstruktiven Hinweise zur Verfassung.

Den Mitarbeitern und Doktoranden des Labors Pulvermühlstr. 3, für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre.

Fr. Dr. Susan Feyerabend und Herrn Dr. Krisna Gendo für ihre konstruktive Kritik von Struktur und Inhalt der Arbeit.

Meiner Liebsten Gabriele Dannert für die Durchsicht und die Hilfe bei der Formatierung, sowie für die Aufmunterung einen ganz speziellen Dank.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, gilt mein ganz besonders herzlicher Dank für das Vertrauen in mich und die endlose Unterstützung in jeder Hinsicht.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Hans Dannert  
Geburtsdatum: 15. Dezember 1966  
Geburtsort: Tübingen  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1974 - 1977 Köstlin-Grundschule, Tübingen  
1977 - 1986 Gesamtschule, Tübingen  
1986 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1987 - 1995 Studium der Medizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
3.11.1995 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Aufbaustudium

1999 - 2001 Studiengang Internationales Marketing, FH-Reutlingen  
2001 Abschluss: Master of Business Administration  
Master Thesis Der Gesundheitsmarkt Deutschland

### Beruf

1995 - 1997 Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie in Tübingen, AiP  
1997 Approbation  
1997 - 1999 Kliniken Schmieder für neurologische Rehabilitation in Allensbach, Mannheim und Gerlingen, Assistenzarzt  
2001 - 2004 BPT Beratungs- und Planungsgesellschaft mbH, Fachberater im Gesundheitswesen, Begutachtung und Sanierung von Sozialimmobilien, u.a. Geschäftsführer Schwarzwald-Tierklinik in Neubulach  
seit Sept. 2004 Klinikum Kirchheim Nürtingen, Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie, Assistenzarzt