



Neutron scattering on biological subjects – Neue Einblicke in die Struktur der Lipidmatrix des *Stratum corneum*, basierend auf Modellmembranen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Pharmazeutin Doreen Kessner geb. Otto

geb. am 01.06.1979 in Magdeburg

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Bodo Dobner, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Dr. habil. Gerald Brezesinski, MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung Golm

Halle(Saale), 02. Juli 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014080

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014080>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	
I. Einleitung und Zielstellung	10
II. Theoretischer Teil	13
II.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	13
II.2. Das Stratum corneum	15
II.2.1. Struktur und Funktion des <i>Stratum corneum</i>	15
II.2.2. Lipidzusammensetzung im <i>Stratum corneum</i>	16
II.3. Physikochemische Eigenschaften der Ceramide und deren Einfluss auf die Struktur des SC – Part I: Physikochemische Eigenschaften der Ceramide	20
II.4. Physikochemische Eigenschaften der Ceramide und deren Einfluss auf die Struktur des SC – Part II: Stratum corneum Lipid Modellsysteme	23
II.5. Neutronenstreuung in der Stratum corneum Forschung	29
II.5.1. Grundlagen der Methode	29
II.5.2. Neutronenstreustudien an Stratum corneum Lipid-Modellsystemen	34
II.5.3. Postulation des <i>armature reinforcement</i> Modells	39
II.6. Weitere Methoden zur Charakterisierung des physikochemischen Verhaltens der Ceramide als wichtige Stratum corneum Lipide	41
II.6.1. Lyotrope flüssigkristalline Zustände	41
II.6.2. Grundlagen der eingesetzten Methoden	43
II.6.2.1. Röntgenbeugung	43
II.6.2.2. IR-und Raman-Spektroskopie	44
III. Experimenteller Teil	49
III.1. Verwendete Substanzen und Chemikalien	49
III.1.1 Synthese und Analytik der Ceramide CER[NS], CER[NS]-D2, CER[NS]-D3 und CER[NS]-D47	53
III.2. Methoden	62
III.2.1. Neutronendiffraktion	62
III.2.1.1. Probenpräparation für Neutronenstreuexperimente	64
III.2.2. Röntgenpulverdiffraktion	65
III.2.2.1. Probenpräparation für Röntgendiffraktionsxperimente	67
III.2.3. FT-Raman-Spektroskopie	67
III.2.4. FT-IR-Spektroskopie	67
III.2.5. Weitere Methoden	68

IV. Ergebnisse und Diskussion	69
IV.1. Physikochemische Charakterisierung der ω -Acylceramide CER[EOS] und CER[EOP]	69
IV.1.1. Röntgendiffraktionsstudien an CER[EOS]	69
IV.1.2. Röntgendiffraktionsstudien an CER[EOP]	71
IV.1.3. Raman-spektroskopische Untersuchungen an CER[EOS] und CER[EOP]	76
IV.2. Darstellung des CER[NS] und der deuterierten Derivate CER[NS]-D2, CER[NS]-D3 und CER[NS]-D47	81
IV.2.1. Neutronenspektroskopische Untersuchungen an DPPC/CER[NS]-Modellmembranen	88
IV.3. Untersuchungen an SC Lipid-Modellsystemen mittels Neutronen-Streuung	93
IV.3.1. Weiterführende Studien am Referenzsystem CER[AP]/CHOL/PA/ ChS	93
IV.3.1.1. Lokalisation von partiell deuteriertem Cholesterin im quaternären SC Lipid-Modellsystem	93
IV.3.1.2. Einfluss der Diastereomere D-CER[AP] und L-CER[AP] auf die Membranstruktur	99
IV.3.2. Entwicklung von SC Lipid-Modellsystemen unter Verwendung des ω -Acylceramid CER[EOS]	106
IV.3.2.1. Entwicklung eines ternären SC Lipid Modellsystems CER[EOS]/CER[AP]/CHOL	106
IV.3.2.2. Einfluss der Kopfgruppenstruktur des ω -Acylceramid auf die Membranstruktur – Austausch des CER[EOS] durch CER[EOP]	113
IV.3.2.3. Entwicklung des quaternären SC Lipid-Modellsystems CER[EOS]/CER[AP]/CHOL/BA	118
IV.3.3. Aufbau eines quaternären SC Lipid-Modellsystems CER[NS]/CHOL/BA/ChS	126
IV.3.4. Einfluss von CER[AP] auf die Mikrostruktur des SC Lipid-Modellsystems: Ein Paradigmenwechsel	130
V. Zusammenfassung	136
VI. Ausblick	140
VII. Literaturverzeichnis	141
VIII. Anhang	149

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
CER	Ceramid
CHOL	Cholesterol
FFA	free fatty acid (freie Fettsäure)
SC	Stratum corneum
TEWL	Trans epidermal water loss (Transepidermaler Wasserverlust)
δ	chemische Verschiebung
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FT	Fourier Transformation
IR	Infrarot
LAM	Longitudinal akustische Moden (Ramanspektroskopie)
m	Multiplett
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear magnetic resonance – Kernspinresonanz
r.H.	<i>engl.</i> relative humidity – relativer Feuchtigkeitsgehalt
s	Singulett (NMR)
s	reziproker Netzebenenabstand (Röntgendiffraktion)
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
t	Triplet
T	Temperatur
ttt	<i>all-trans</i> Konformation (Ramanspektroskopie)
WAXS	Wide Angle X-ray Scattering
θ	Streuwinkel <i>theta</i>
λ	Wellenlänge
$v_{s;a}$	Streckschwingungen (symmetrisch; a(anti)symmetrisch)
m	SI-Einheit: Masse [g; mg]

abs.	absolut
CDCl ₃	deuteriertes Methanol
CHCl ₃	Chloroform
MG	Molekulargewicht [g/mol]
n	SI-Einheit: Stoffmenge [mol; mmol]
P ₂ O ₅	Phosphorpentoxid
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
THP-	(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-)oxy-
X	Molenbruch
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
HASYLAB	Hamburger Synchrotron Strahlungslabor
HMI	Hahn-Meitner-Institut Berlin

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1** Die menschliche Haut (schematische Darstellung)
- Abb.2** Schematischer Aufbau der Epidermis
- Abb. 3** Vorstellung des *Stratum corneums* als „brick and mortar“- Modell
- Abb.4.** Übersicht über die zur Zeit identifizierten Ceramid-Subspezies
- Abb.5** Chemische Strukturen von L-CER[AP] und dem natürlich vorkommenden D-CER[AP] nach Raudenkob et al. [2005]
- Abb.6** Mögliche molekulare Anordnungen des CER[AP] in der multilamellaren Membran nach Raudenkob et al. [2005] und Kiselev et al. [2005]
- Abb.7** Das Stacked Monolayer Model nach Swartzendruber et al. [1989]
- Abb.8** Das Domain Mosaic Model nach Forslind [2001]
- Abb.9** Das Sandwich Model nach Bouwstra et al. [1998]. Die Nomenklatur erfolgte noch nach dem alten, auf dem chromatographischen Laufverhalten basierenden System. Nach Motta et al. [1993] ergibt sich folgende: CER1 = CER[EOS], CER2 = CER[NS], CER3 = CER[NP], CER4 = CER[AS](C24), CER5 = CER[AS](C16), CER6 = [AP]
- Abb.10** Das Single Gel Phase Model nach Norlén [2001]
- Abb.11** Schematische Darstellung eines Streu-Experimentes. Der Streuvektor q entspricht der Differenz zwischen Austritts- und einfallenden Strahls [Grossmann 2002]
- Abb.12** Modellvorstellung eines multilamellar orientierten Lipidfilms
- Abb.13** Neutronenstreulängedichtheprofil $\rho_s(x)$ der CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS Membran bei 60% r.H., T=32°C und bei drei verschiedenen D₂O-Konz. Zur Illustration sind die charakteristischen Membranbereiche hervorgehoben und die Lokalisierung der Moleküle eingefügt.
- Abb. 14** Neutronenstreulängedichtheprofil einer DMPC-Membran (60% r.H., T=32°C, 8% D₂O), aus [Kiselev et al. 2005]
- Abb.15** Wasserverteilungsfunktion für die Membran CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS; Die Wassereindringtiefe entspricht $X_{HH}=15,6 \text{ \AA}$
- Abb.16** *Armature reinforcement* Modell nach Kiselev [2007] über die Struktur der SC Lipid-Modellmatrix
- Abb. 17** *Trans-* und *gauche*-Konformation der Alkylketten
- Abb.17a** Lamellarphasen
- Abb.18** Beugung von Röntgenstrahlen an einem Gitter
- Abb. 19** Wechselwirkungen von monochromatischer Strahlung mit Molekülen
- Abb.20** V1 Diffraktometer (Foto) [Qelle: www.hmi.de]
- Abb.21** HMI- *V1 Membrandiffraktometer* in schematischer Darstellung (*Be-Filter*= Beryllium-Filter zur Erhöhung der Neutronenintensität; *Collimator*= Erzeugung eines parallelen Strahlenverlaufs; *Monochromator*= Isolierung einer bestimmten Wellenlänge aus einer einfallenden Menge elektromagnetischer Strahlung)
- Abb.22** Abhängigkeit des Strukturfaktors vom D₂O-Gehalt für die SC Lipid Modellmembran CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5%), bei T=32°C; 60% r.H.
- Abb.23** Versuchsanordnung am Messplatz A2 (*HASYLAB, DESY*)
- Abb.24** Röntgendiffraktionsmuster von trockenem CER[EOS] bei verschiedenen Temperaturen
- Abb.25** Röntgendiffraktionsmuster von hydratisiertem CER[EOS] bei verschiedenen Temperaturen
- Abb.26** Röntgendiffraktionsmuster von trockenem CER[EOP] bei verschiedenen Temperaturen

- Abb.27** Röntgendiffraktionsmuster von hydratisiertem CER[EOP] bei verschiedenen Temperaturen
- Abb.28** Temperaturabhängigkeit der d-Werte des 0,45 (durchgezogene Linie) und des 0,38 nm (gestrichelte Linie) Reflexes.
- Abb.29** Raman-Spektren von CER[EOS] trocken bei ausgewählten Temperaturen in den Spektralbereich 100- 1650 cm⁻¹ (links) und 2800-3000 cm⁻¹ (rechts)
- Abb.30** Temperaturabhängige Änderung der Bandenposition der symmetrischen Valenzschwingung der Methylengruppen von CER[EOS] trocken
- Abb.31** Temperaturabhängige Abnahme der *trans*-Konformere durch Flächenvergleich der v_{as}(CH₂)- und v_s(CH₂)-Banden bei CER[EOS]
- Abb.32** Raman-Spektren von CER[EOP] trocken bei ausgewählten Temperaturen in den Spektralbereich 100-1650 cm⁻¹ (links) und 2800-3000 cm⁻¹ (rechts)
- Abb.33** Temperaturabhängige Änderung der Bandenposition der symmetrischen Valenzschwingung der Methylengruppen von CER[EOP] trocken
- Abb.34** Temperaturabhängige Abnahme der *trans*-Konformere durch Flächenvergleich der v_{as}(CH₂)- und v_s(CH₂)-Banden bei CER[EOP]
- Abb.35** Darstellung des CER[NS] über ein gemischtes Anhydrid
- Abb.36** Darstellung des CER[NS]-D47 unter Verwendung des Kopplungsreagens EEDQ. Wegen der besseren Übersichtlichkeit wurden die 47 Deuteriumatome der Acylseitenkette nicht eingezeichnet.
- Abb. 37** Schema zur Darstellung des CER[NS]-D2
- Abb.38** Zusammenfassung der Synthese zum CER[NS]-D3
- Abb.39** Das Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der multilamellaren DPPC Membran (**fett**) gegen das Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der DPPC/ CER[NS]-Membran, gemessen bei 60% Feuchtigkeit, 20°C und einem Kontrast von D₂O/ H₂O 8/ 92
- Abb.40** Vorschlag eines Strukturmodells der DPPC/ CER[NS]-Membran für ein Molverhältnis von $X_{CER/NS} = 0,32$.
- Abb.41** Das Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der DPPC/ CER[NS]-D3 Modellmembran bei 60 % Feuchtigkeit, 20°C und einem Kontrast von D₂O/ H₂O 8/ 92.
- Abb. 42** Neutronendiffraktionsbild des Systems CER[AP]/ CHOL-D7/ PA/ ChS vs. Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (kleines Bild) [Kiselev et al. 2005] (T=32°C, 60 % hum, H₂O/ D₂O 92/ 8). Die Unterschiede in den rel. Peakhöhen zeigen die Empfindlichkeit der Methode auf Deuterium-markierungen.
- Abb.43** (links) Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der CER[AP]/ CHOL-D7/ PA/ ChS Membran bei T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8; (rechts) zum Vergleich Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der Referenzmembran [aus Kiselev et al. 2005]
- Abb.44** Differenzplot zwischen den Neutronenstreulänge-dichteprofilen CER[AP]/CHOL-D6/PA/ChS und CER[AP]/CHOL/PA/ChS
- Abb.45** Schematische Darstellung des SC Lipid Modellsystems CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS
- Abb.46** Strukturformel von L-CER[AP] (links) und D-CER[AP] (rechts)
- Abb.47** Vergleichende Betrachtung der Neutronenstreulängedichteprofile $\rho_s(x)$ der Referenzmembran (rot) zum D-CER[AP]-System (schwarz). Der Unterschied zwischen beiden besteht in der Breite des Übergangsbereichs zwischen dem hydrophilen und dem hydrophoben Membranbereich. Dieser ist gekennzeichnet durch einen steilen Abfall für die Referenzmembran (links-rotes Rechteck) bzw. durch einen breiten Übergang für das D-CER[AP]-System (rechts-graues Rechteck)

- Abb.48** Neutronendiffraktionsbild CER[EOS]/ CER[AP]/CHOL bei T=32°C; 60%r.H., H₂O/ D₂O 50: 50
I,II,III: Diffractionsordnungen der Modellmembran
1,2: Reflexe CHOL-Kristalle
- Abb.49** Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der CER[EOS]/CER[AP]/ CHOL Membran (33/ 22/ 45 % (w/w)) bei 60% r.H.; H₂O/ D₂O 50: 50, T=32°C gegen die CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5 % w/w) Membran gemessen unter den gleichen Bedingungen.
- Abb.50** Schematische Darstellung der CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL Modellmembran
- Abb.51** Anordnung des CER[EOS] innerhalb der Membran CER[EOS]/CER[AP]/CHOL entsprechend der Aussagen des $\rho_s(x)$
- Abb.52** Neutronenstreulängedichteprofile des Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/PA/ChS (rot), des CER[EOS]/ CER[AP]/CHOL System (schwarz) und des CER[EOP]/CER[AP]/CHOL Systems (blau) für T=32°C; 60% r.H. und H₂O/ D₂O 50/50
- Abb.53** Die Neutronenstreulängedichteprofile $\rho_s(x)$ von CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL (rot) und CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL (blau) einschließlich der jeweiligen Fehlergrenzen (gestrichelt); Berechnet für T=32°C, 60% rel. Feuchtigkeit und H₂O/ D₂O Kontrast von 50/ %0 (m/m)
Die Berechnung der Fehlergrenzen erfolgte mittels des Computerprogramms IGOR PRO 6, (Skalierung (offset): F₀=-0,02).
- Abb.54a** Neutronenbeugungsmuster für die CER[EOS]/ CER[AP]/PA/ CHOL Membran der Zusammensetzung 23/ 10/ 33/ 33 % (m/m) bei 60% r.H., H₂O/ D₂O 50/ 50 und T=32°C.
Römische Ziffern zeigen die Reflexe 1., 2. und 3. Ordnung für das Modellsystem, kleine Buchstaben die [010] und [020] Diffractionspeaks der CHOL Kristalle und Großbuchstaben die phasen-separierte Palmitinsäure.
- Abb.54b** Neutronenbeugungsmuster für die CER[EOS]/ CER[AP]/ BA/ CHOL Membran der Zusammensetzung 23/ 10/ 33/ 33 % (m/m) bei 60% r.H., H₂O/ D₂O 50/ 50 und T=32°C.
Römische Ziffern zeigen die Reflexe 1., 2., 3. und 4. Ordnung für das Modellsystem, mit Kleinbuchstabe a ist der [010] Diffractionspeak der CHOL Kristalle angegeben.
- Abb.55** Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der CER[EOS]/CER[AP]/ CHOL/ BA Membran bei 60% r.H.; H₂O/ D₂O 50: 50, T=32°C gegen die CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5 % w/w) Membran gemessen unter den gleichen Bedingungen.
- Abb. 56** Strukturformeln der eingesetzten Deuterium-markierten Behensäure-Derivate
- Abb.57** Die Neutronenstreulängedichteprofile für die Systeme CER[EOS]/ CER[AP]/ **BA-D4**/CHOL (links) und CER[EOS]/CER[AP]/ **BA-D3**/CHOL (rechts) jeweils bei T=32°C, 60% r.H. und verschiedenen H₂O/D₂O Kontrasten. Zur Verdeutlichung der Anordnung der Behensäure-Moleküle sind diese in die Darstellungen mit eingezeichnet.
- Abb.58** Diffractionsbild der CER[EOS]/ CER[AP]/ CH/ BA Membran (Verhältnis CERs/ CH/ BA 1/ 0,5/ 1) bei **60% Feuchtigkeit (links)** bzw. **bei 98% Feuchtigkeit (rechts)**. Weitere experimentelle Bedingungen: D₂O/ H₂O Kontrast 8/ 92, T=32°C
- Abb.59** schematische Darstellung CER[NS]
- Abb.60** Neutronendiffraktionsbild von CER[NS]/ CHOL/ **PA**/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m) für T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8; Römische Ziffern: 1.und 2. Ordnung der multilamellaren Membran; Arabische Zahlen: 1.Ordnung der phasenseparierten PA; (Indizierung nach Ruettinger et al. [2008]
Buchstaben: [010] Reflex von kristallisiertem CHOL
- Abb.61** Neutronendiffraktionsbild von CER[NS]/ CHOL/ **BA**/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m) für T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8
Römische Ziffern: 1.bis 6. Ordnung der multilamellaren Membran
Buchstaben: [010] Reflex von kristallisiertem CHOL
- Abb.62** Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der CER[NS]/ CHOL/ **BA**/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m) für T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8, 80/20, 50/50
Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind zwei Moleküle CER[NS] in der postulierten Anordnung eingetragen

Tabellenverzeichnis

- Tab.1** Neutronen- (b_{coh}) und Röntgenstreulängen (f_{X-Ray}) verschiedener Elemente [Dianoux und Lander 2003]
- Tab.2** Einfluss des Cholesterolgehaltes auf den lamellaren Wiederholabstand d
- Tab.3** Zuordnung der wichtigsten Raman-Banden und deren Position bei Raumtemperatur gemäß Literaturangaben [Snyder et al. 1978; Kirchhoff und Levin 1987; Mendelsohn und Moore 1998]
- Tab.4** Strukturfaktoren für die SC Lipid Modellmembran CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5%), bei T=32°C; 60% r.H.
- Tab.5** Werte für den lamellaren Wiederholabstand d , ermittelt für alle Systeme bei T=20°C, 60% Feuchtigkeit und einem Kontrast von D₂O/ H₂O 8/ 92.
- Tab.6** Untersuchte SC Modellsysteme sowie Angaben über experimentelle Bedingungen und Art der Messungen
- Tab.7** Experimentelle Befunde der Systeme **L-CER[AP]/CHOL/PA/ChS** und **D-CER[AP]/CHOL/PA/ChS**
- Tab.8** Tendenz der d-Werte in Abhängigkeit von der rel. Feuchte
- Tab.9** Einfluss von Temperatur und rel. Feuchtigkeit auf die SC Lipid-Modellsysteme
- Tab.10** Übersicht über die untersuchten Systeme sowie über die experimentellen Bedingungen
- Tab.11** Die der durchgeföhrten Fehlerrechnung zugrunde liegenden Daten
- Tab.12** Exp.Daten zur Untersuchung der CER[EOS]/ CER[AP]/BA-deuteriert/CHOL Modellmembranen
- Tab.13** Parameter des CH₂-Gruppenbereiches aus dem Neutronenstreulängedichteprofil (^aFWHH= $2\sigma\sqrt{2\ln 2}$)
- Tab.14** Parameter des Neutronenstreulängedichteprofil (^aFWHH= $2\sigma\sqrt{2\ln 2}$; ^bx₀=d/2 ist festgelegt)
- Tab.15** Einfluss von CER[AP] auf die Mikrostruktur des SC Lipid-Modellsystems

I. Einleitung und Zielstellung

Die menschliche Haut stellt die lebenswichtige Barriere zwischen Organismus und Umwelt dar [Wertz und van den Bergh 1998]. Sie bietet als äußere Begrenzung besonderen Schutz vor physikalischen, chemischen und biologischen Belastungen und ist durch Aufnahme und Verarbeitung zahlreicher Reize in der Lage, mit dem sie umgebenden Milieu in Kontakt zu treten. Grundlage für die Realisierung dieser Funktionen ist die vielschichtig organisierte Struktur der Haut. Die geringe Permeabilität gegenüber fremden und exogenen Substanzen liegt in der Komplexität des *Stratum corneums* (SC), der äußeren Schicht der Haut, begründet. Abgestorbene, keratinreiche Zellen (*Korneozyten*) liegen eingebettet in lamellaren, flüssigkristallinen Lipid-Wasser-Schichten, wobei die Zusammensetzung und die Orientierung der interzellularen Lipide für die Barriereeigenschaften von besonderer Bedeutung zu sein scheinen [Elias 1983]. Detailliertes Wissen über die molekulare Anordnung der Lipide im *Stratum corneum* ist essentiell für das Verständnis der SC Barrierefunktion und für ein rationelles Design von *drug delivery* Systemen.

Als Hauptfraktionen der SC Lipide werden Ceramide (CER), freie Fettsäuren (FFA) und Cholesterolderivate (CHOL) unterschieden [Wertz und van den Bergh 1998], wobei die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden Ceramide eng mit der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Barriereeigenschaften des SC in Zusammenhang stehen [Holleran et al. 1991]. Ceramide bestehen aus einer Sphingoidbase, die über eine Amidbindung entweder mit einer in α -Position hydroxylierten Fettsäure, einer ω -Hydroxyfettsäure oder mit einer nicht-hydroxylierten Säure verknüpft ist. Im Moment sind neun verschiedene Ceramidklassen bekannt, deren einzelne Bedeutung für den strukturellen Aufbau des SC noch weitgehend unklar sind [Coderch et al. 2003; Ponec et al. 2003]. Zudem wird auch der Einfluss des extrem langkettigen ω -Acylceramids CER[EOS] auf die Barrierestruktur viel diskutiert [Bouwstra et al. 1998; Al-Amoudi et al. 2005].

Während der letzten Jahrzehnte konzentrierten sich viele Studien auf die Aufklärung der Lipidorganisation und führten zur Entwicklung verschiedener theoretischer Modelle über die strukturelle Anordnung im SC, deren Verifizierung oftmals noch aussteht. Im Übersichtsartikel *Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure - A review - Part II: Stratum corneum lipid model systems* [Kessner et al. 2007] wurden die z.T. kontroversen Diskussionen über einzelne Modelle reflektiert.

In früheren Studien wurde hauptsächlich isoliertes natives SC Material eingesetzt, wobei aufgrund der Variabilität der Kettenlänge und der Kopfgruppenstruktur der Lipide im nativen Gewebe nicht auf die Funktion individueller Ceramid-Subspezies geschlossen werden konnte

[Abraham et al. 1991; McIntosh 1993; Ongpipattanakul et al. 1994; Bouwstra et al. 1996]. Daher konzentriert man sich heute auf den Einsatz synthetischer Ceramide definierter chemischer Struktur mit dem Ziel einer verbesserten Struktur-Wirkungs-Analyse [de Jager et al. 2004].

Durch Anwendung von DSC, Röntgendiffraktion, FT-IR und FT-Ramanspektroskopie konnte das Phasenverhalten verschiedener Sphingosin- und Phytosphingosin-basierter Ceramide aufgeklärt werden [zusammengefasst in Wartewig und Neubert 2007]. Vergleichbare Daten über die ω -Acylceramide fehlen allerdings. Die einzigartige Struktur und eine hohe Oxidationsempfindlichkeit der ungesättigten Seitenkette erschweren sowohl die präparative Darstellung als auch die experimentelle Handhabung.

Die relevanten Studien haben das gemeinsame Ziel, eine Lipidmischung als Modell zu entwickeln, die die nativen Verhältnisse im SC widerspielt. Die Struktur der SC Lipidmatrix wird häufig mit der Co-Existenz zweier lamellarer Phasen mit den jeweiligen Wiederholabständen 6.0 nm (*short-periodicity phase - SPP*) und 13.0 nm (*long-periodicity phase - LPP*) in Verbindung gebracht [Bouwstra et al. 2000]. Eine Mischung verschiedener Ceramide (CER[EOS]/NP/AS, Molverhältnis 1:7:2), Fettsäuren und Cholesterol zeigte diese Struktur und begründete den Einsatz der Mischung als Barrieremembran in Penetrationsstudien [de Jager et al. 2005 und 2006]. Diese Ergebnisse wurden vor allem mittels Röntgenstreuung erbracht. Nachteil dieser Methode ist, dass man aufgrund des Phasenproblems die Vorzeichen der Strukturfaktoren als Grundlage für die Berechnung des Streulängedichteprofils nicht ermitteln kann [McIntosh 2003] und damit die interne Membranstruktur nicht charakterisiert werden kann.

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Neutronenstreuung, die das Phasenproblem durch Kontrastvariation von H₂O und D₂O lösen kann [Worcester 1976], auf dem Gebiet der SC Lipid Forschung an dem System CER/AP]/ Cholesterol (CHOL)/ Palmitinsäure (PA)/ Cholesterolsulfat (ChS) erstmalig erfolgreich eingesetzt [Kiselev et al. 2005]. Die Geometrie der Probe, die Untersuchung hochorientierter multilamellarer Lipidmembranen, präpariert nach etablierter Methode [Seul und Sammon 1990] auf einer Quarzplatte, entspricht der Lipidorganisation in nativem SC. Die aufgrund der generierten Neutronenstreudaten erhaltene Berechnung des Streulängedichteprofils erlaubt Aussagen über das innere Membranprofil. Diese können weiter gesteigert werden durch die Deuterium-Markierung bestimmter Molekùlbereiche, da die signifikant verschiedenen Streulängen von Wasserstoff und Deuterium die Identifizierung solcher Molekùlregionen im Membranprofil ermöglichen [Bacon 1972; Schoenborn 1976; Dante et al. 2003].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift sollten zunächst die Erkenntnisse über das Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS vertieft werden, wobei das verwendete CER[AP] als Gemisch der Diastereomeren D- und L-CER[AP] vorlag.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass sich D- und L-CER[AP] in ihren physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden [Raudenkob, Dissertation 2002]. Durch Auftrennung in die Einzelsubstanzen sollte deren Einfluss auf die innere Membranstruktur gezeigt werden. Des Weiteren sollte durch Einsatz selektiv deuterierter CHOL-Derivate deren Position in der Membran aufgeklärt und die Anwendungsmöglichkeiten von Deuterium-Markierungen gezeigt werden. Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung des ω -Acylceramids CER[EOS], das durch eine Kooperation mit Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, zur Verfügung gestellt wurde.

Die Substanz sollte zunächst physikochemisch charakterisiert und mit dem analogen CER[EOP], das eine zusätzliche OH-Gruppe aufweist, verglichen werden.

Für die Neutronenstreuexperimente wurde eine einfache ternäre Membran aus CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL präpariert, um grundlegende Aussagen über die Anordnung des Ceramids in der Lipidmatrix zu erhalten.

Um die Bedeutung für die SC Forschung zu erhöhen, sollte das ternäre System durch Hinzugabe physiologisch relevanter Fettsäuren erweitert und umfassend charakterisiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Synthese des CER[NS], das zu den mengenmäßig am häufigsten auftretenden Ceramid-Fraktionen gehört [Wertz und van den Bergh 1998; Farwanah et al. 2005] und dessen Funktion in der SC Lipid-Modellmembran untersucht werden sollte. Für Voruntersuchungen wurden drei partiell deuterierte CER[NS]-Derivate dargestellt [Wille, Diplomarbeit 2008]. In Mischungen mit dem Phospholipid DPPC sollte der Einfluss des Ceramids auf die Membran als auch die Lokalisation der deuterierten Gruppen untersucht werden. Damit war auch die Fragestellung für zukünftige Synthesearbeiten verbunden, welche Position und welcher Deuterierungsgrad im Molekül für die Anwendung in Neutronenstreuexperimenten an SC Modellmembranen am aussagekräftigsten sind.

II. Theoretischer Teil

II.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut (*Cutis*) ist mit einer Fläche von fast 2 m^2 beim erwachsenen Menschen das größte Organ, das den Organismus von der Umwelt abgrenzt, ihn so gegen chemische, physikalische und mechanische Noxen und vor dem Eindringen von Mikroorganismen schützt. Die Haut verhindert ein zu starkes Austrocknen des Körpers, lässt aber gleichzeitig eine physiologische Wasserverdunstung zu. Als Wärmeregulator des menschlichen Körpers kann sie über eine Verengung oder Erweiterung der Hautgefäße sowie durch Schweißsekretion wirken. Daneben vermittelt die Haut als wichtiges Sinnesorgan mittels spezifischer Rezeptoren Druck-, Temperatur- und Schmerzreize und spielt eine wesentliche Rolle im intermediären Stoffwechsel sowie bei vielen immunologischen Prozessen [Thews 1999].

Anatomisch gliedert sich die Haut in die *Epidermis* (Oberhaut), *Dermis* (Korium, Lederhaut) und die *Subcutis* (Unterhaut), ein lockeres Bindegewebe mit eingelagerten Fettläppchen, das als Kälteschutz, Energiereserve und Druckpolster dient (Abb.1). An die *Subcutis* schließt sich die *Dermis* als Stütz- und Bindegewebe von hoher mechanischer Festigkeit an, bedingt durch Fibroblasten, die in eine Matrix aus Strukturproteinen wie Kollagen und Elastin eingebettet sind. Des Weiteren finden sich hier Zellen der Immunabwehr sowie Nervenbahnen und Hautanhangsgebilde (Schweiß- und Talgdrüsen, Haarwurzeln und -kanäle). Die gefäßreiche *Dermis* gewährleistet außerdem durch Diffusion die Ernährung der *Epidermis*, die frei ist von Blutgefäßen.

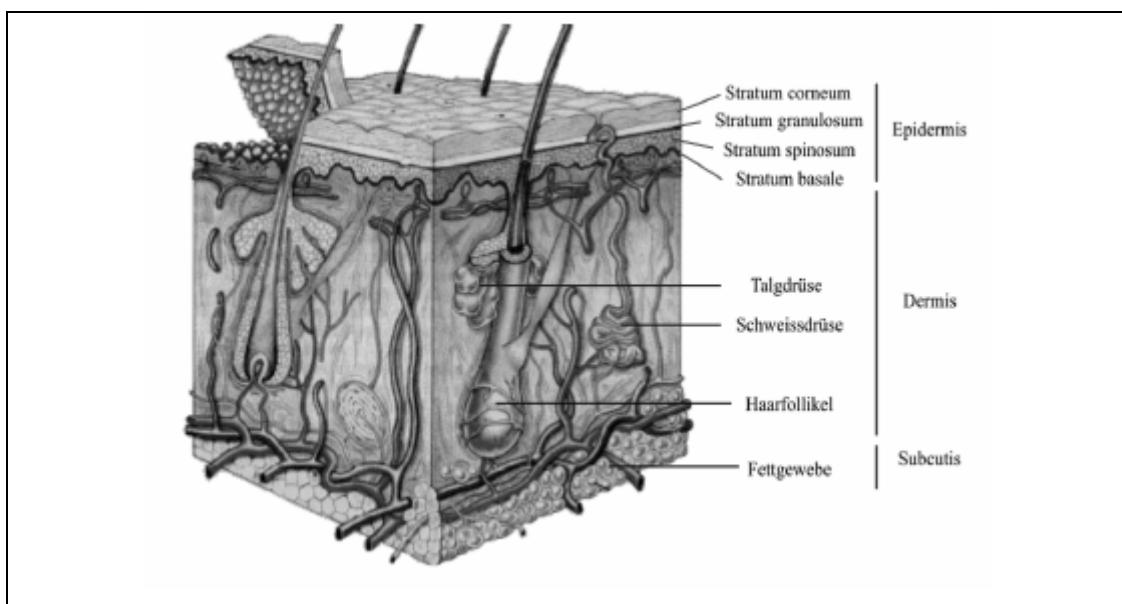


Abb.1 Die menschliche Haut (schematische Darstellung)

Die *Epidermis*, die äußerste Schicht der Haut, wird in mehrere funktionelle Zellschichten untergliedert. Der physiologische Ausgangspunkt ist das *Stratum basale* (Basalzellschicht), dem sich das *Stratum spinosum*, das *Stratum granulosum* und als abschließende Schicht das *Stratum corneum* (Hornschicht) angliedern (Abb.2).

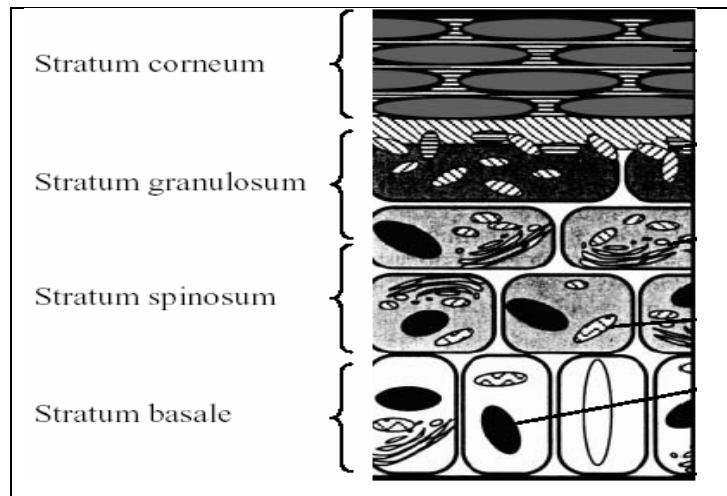


Abb.2 Schematischer Aufbau der Epidermis nach Schürer [1998]

In der *Epidermis* überwiegen die *Keratinozyten*, Zellen, die im Laufe der Zeit keratinisieren. Während des ca. 28 Tage dauernden epidermalen Differenzierungsprozesses erfahren die *Keratinozyten* eine starke morphologische und histochemische Veränderung, indem sich die mitotisch aktiven Zellen der Basalschicht zu toten, kernlosen, verhornten *Korneozyten* (Hornzellen) umwandeln, die an der Oberfläche abgeschuppt werden.

In den *Keratinozyten* des *Stratum basale* befinden sich u.a. intermediäre Filamente, auch *Tonofibrillen* genannt, die die Haut gegen Schereinwirkungen stabilisieren. Des Weiteren weisen die *Keratinozyten* zahlreiche *Desmosomen* zur Verknüpfung mit Nachbarzellen auf. In den oberen Schichten des aufliegenden *Stratum spinosum* befinden sich membrumschlossene Lamellengranula, die *Odland bodies* [Odland 1960], die u.a. hydrolytische Enzyme, Glycoproteine und spezielle Lipide enthalten [Elias 1981]. Letzteren wird eine wesentliche Rolle bei der späteren Bildung der Permeabilitätsbarriere des *Stratum corneums* zugesprochen [Landmann 1991].

Im *Stratum granulosum*, das von den *Keratinozyten* nach ca. 14 Tagen erreicht wird, enthalten die Zellen viele stark verdichtete, starre *Tonofibrillen*. Im Zuge des Differenzierungsprozesses verhornen die *Keratinozyten* zu stoffwechselaktiven *Korneozyten* und die Zellorganellen werden durch lysosomale Enzyme aufgelöst. Zusätzlich wird der Inhalt der *Odland bodies*

durch Exozytose in den Interzellularraum freigesetzt und bildet dort eine kontinuierliche Lipidmatrix aus [Landmann 1991].

II.2. Das Stratum corneum

II.2.1. Struktur und Funktion des Stratum corneum

Endprodukt der epidermalen Differenzierung ist das *Stratum corneum* (SC), das aus mehreren Lagen stark abgeflachter *Korneozyten* besteht, die in eine Lipidmatrix geordneter Struktur eingebettet sind. Nach außen hin abgegrenzt werden die *Korneozyten* anstelle der üblichen Plasmamembran durch eine Hornhülle, den *cornified envelope*.

Der Wassergehalt des *Stratum corneums* liegt zwischen 10 und 40% [Warner et al. 1988], wobei ein Gradient von innen nach außen besteht. Dabei bildet sich ein Gleichgewicht zum einen zwischen der innersten Zellschicht des SC und der hohen Feuchte (bis zu 70%) der Zellen des *Stratum granulosum* und zum anderen zwischen den äußersten Zellschichten und der trockeneren Umgebungsluft aus. Dieser Konzentrationsgradient führt zu einer kontinuierlichen Wasserabgabe an die Umgebung, die auch als transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss = TEWL) bezeichnet wird. Auch der pH-Wert des SC weist einen Gradienten von den äußeren Schichten ($\text{pH} = 4,5 - 5,5$) zu den untersten Schichten ($\text{pH} = 7$) hin auf, wobei letzterer dem pH-Wert der lebenden Epidermis entspricht [Turner et al. 1998].

Die Struktur des SC wird häufig mit dem Aufbau einer Ziegelmauer verglichen, dem „brick and mortar“- Modell [Elias 1983].

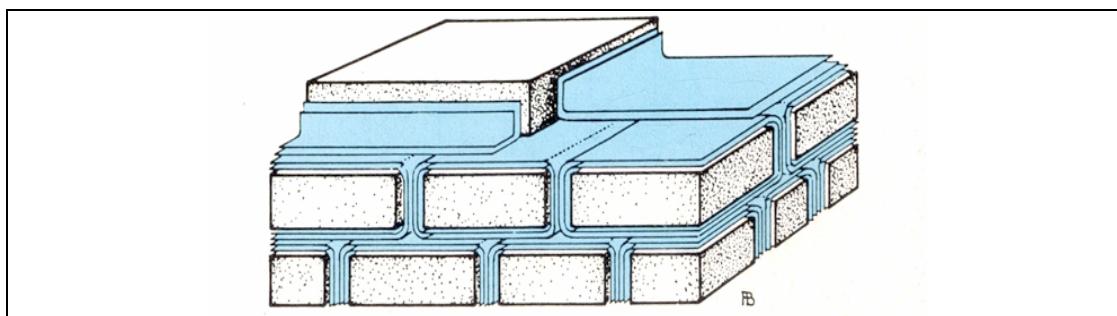


Abb. 3 Vorstellung des *Stratum corneums* als „brick and mortar“- Modell nach Landmann [1991]

Dabei ordnen sich die *Korneozyten* als Backsteine für die chemische und mechanische Stabilität in die interzelluläre Lipidmatrix, dem Mörtel, ein, die für die Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase und für das Verhindern des Eindringens fremder Substanzen verantwortlich ist. Die interzelluläre Lipidmatrix ist aufgrund ihres hydrophoben Charakters

nahezu wasserundurchlässig, wobei diese Eigenschaft abhängig ist von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Lipide und erheblich durch Nahrungsfaktoren beeinflusst wird. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an essentiellen Fettsäuren (z.B. Linolsäure), die auch Bestandteil der SC Lipidfraktion sind, zu einer starken Zunahme der Permeabilität des *Stratum corneum*, einer Erhöhung des TEWL und einer fehlerhaften Korneozytendifferenzierung führen [Lowe et al. 1977, Elias et al. 1980]. Des Weiteren konnten zahlreiche Untersuchungen bestimmter Hauterkrankungen die Bedeutung der interzellulären Lipide für die Barriereeigenschaft des SC belegen. So konnte ein Mangel an bestimmten Acylceramidfraktionen bei verschiedenen Formen der Ichthyose durch Paige et al. [1994] gezeigt werden, ebenso wurde bei Patienten mit Psoriasis eine veränderte Verteilung der Ceramide durch Motta et al. [1994] beobachtet. Ferner zeigten Smith et al. [1982], dass eine Entfernung der Hautlipide durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zu einer Permeabilitätsverhöhung des *Stratum corneum* mit Anstieg des TEWL führte.

In der Arbeit von Farwanah [Dissertation 2005] wurde zudem untersucht, ob bei Vorliegen von Hauterkrankungen wie Neurodermitis oder Psoriasis auch das Ceramidmuster der nicht involvierten, gesund erscheinenden Hautstellen beeinflusst wird. Durch Anwendung neuer analytischer Methoden zu Trennung und Nachweis der Ceramide wurde gezeigt, dass das Ceramidmuster in der nicht involvierten Haut von Neurodermitis- oder Psoriasis- Erkrankten keine signifikante Unterschiede zu demjenigen von gesunden Probanden aufwies. Demzufolge konnten die Ceramide in diesen Arealen nicht für diagnostische Zwecke herangezogen werden.

II.2.2. Lipidzusammensetzung im Stratum corneum

Die Lipide im Interzellularraum machen etwa 10-30% des Gesamtvolumens bzw. 10-15% der Gesamtmasse des *Stratum corneum* aus [Grayson et al. 1982]. Hauptbestandteile der Lipide des SC sind Ceramide (ca.40%), Cholesterin (ca. 25%), freie Fettsäuren (free fatty acids = FFA) (ca.25%), Cholesterolsulfat (ca.6%) und Triglyceride. Die schwankenden prozentualen Angaben für die einzelnen Lipide im *Stratum corneum*, die in der Literatur beschrieben werden [Lampe 1983, Elias 1990, Wertz 1996a; Ponec et al. 2003], ergeben sich zum einen aus der Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden und –mittel und zum anderen aus der inter- und intraindividuellen Variabilität der Lipidzusammensetzung, letzteres in Abhängigkeit von der untersuchten Körperregion.

Die fast vollständige Abwesenheit von Phospholipiden im SC unterscheidet die Lipidbarriere der Hornschicht von anderen Biomembranen, die vor allem aus Phospholipiden aufgebaut sind [Neubert und Wepf 2007].

Cholesterol (CHOL) als ubiquitärer Membranbestandteil beeinflusst die Membranfluidität in Abhängigkeit von seinem jeweiligen Gewichtsanteil und der Eigenschaften anderer Membranbestandteile. Für das *Stratum corneum* wird diskutiert, dass Cholesterol bis zu einem gewissen Grad die Fluidität einer sonst zu starren, eventuell auch brüchigen Membran bedingt [Wertz 1996a].

	Lipidklasse	Mengenanteile [% m/m]
Lipidzusammensetzung im <i>Stratum corneum</i> [Ponec et al. 2003]		
<i>Cholesterol</i>		25,0
<i>Freie Fettsäuren</i>		25,0
davon	Fettsäurezusammensetzung	
	Myristinsäure [14:0]	3,8
	Palmitinsäure [16:0]	10,0
	Stearinsäure [18:0]	7,0
	Ölsäure [18:1]	10,0
	Linolsäure [18:2]	6,0
	Behensäure [22:0]	10,0
	Lignocerinsäure [24:0]	30,0
	Cerotinsäure [26:0]	25,0
<i>Sterole und Wachsester</i>		5,0
<i>Ceramide</i>		40,0
davon	CER[EOS]	8,3
	CER[NS]	20,5
	CER[NP]	18,0
	CER[EOH]	5,0
	CER[AS]	10,1
	CER[AP]	8,6
	CER[AH]	12,9
	CER[NH]	10,32
	CER[EOP]	6,4

Dem meist zu den polaren Lipiden gezählten Cholesterolsulfat (ChS) wird, trotz seiner geringen Menge, eine wichtige Funktion bei der Modulation des Desquamationsprozesses (Abstoßen der obersten, verhornten Schichten der Haut (SC) unter Bildung von Hautschuppen) und der Cholesterolsynthese in der Epidermis über eine Feedback-mechanismus zugeschrieben [Williams 1992].

Die Fraktion der freien Fettsäuren (FFA) besteht hauptsächlich aus unverzweigten, gesättigten Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von 16-30 Kohlenstoffatomen, wobei die C22:0, C24:0, C26:0 und C28:0 Fettsäuren dominieren. Neben dem Cholesterolsulfat sind die FFA die

einzigsten ionisierbaren Lipide des SC und spielen eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der Lipid-Doppelschichten [Wertz 1996a].

Ceramide (CER) bilden mit ca. 40% den größten Anteil der *Stratum corneum* Lipide. Während sie, in fast allen Geweben des Organismus vorkommend, schon in geringen Konzentrationen als Signalsubstanz fungieren [Colina et al. 2005], liegt ihre Bedeutung im *Stratum corneum* in der Ausbildung der Lipidbarriere. Die im SC vorkommenden Ceramide stellen eine sehr heterogene Mischung dar, die sich zum einen durch die verschiedenen Sphingoidbasen und zum anderen durch die Art der mit der Kopfgruppe des Sphingosinderivates über eine Amidbindung verknüpften Fettsäure unterscheiden (Abb.4).

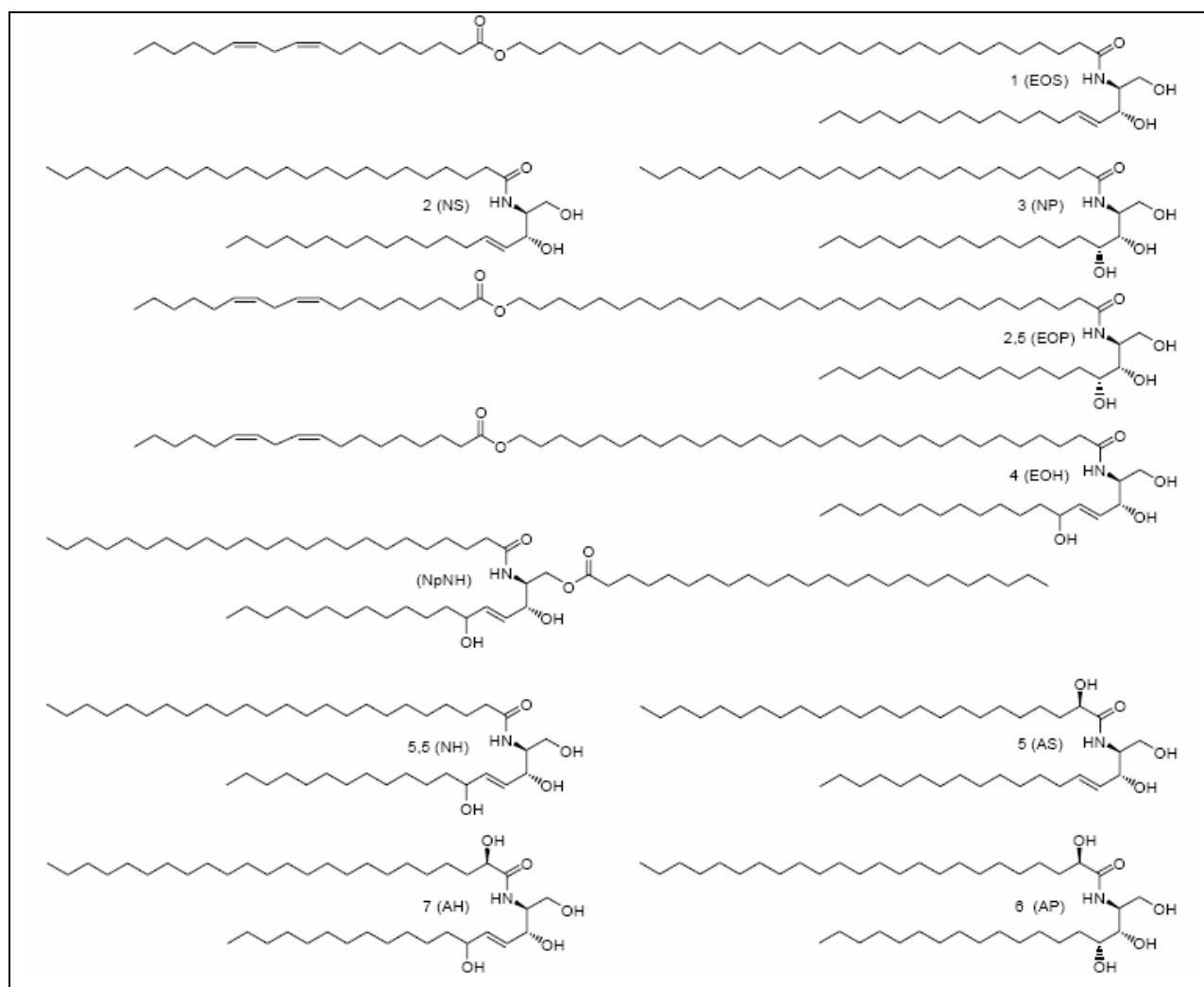


Abb.4. Übersicht über die zur Zeit identifizierten Ceramid-Spezies [nach Chopart et al. 2002]

Bei den Sphingoidbasen unterscheidet man *Phytosphingosine* (4-Hydroxysphinganine), *Sphingosine* (Sphingenine und Sphinganine) und die *6-Hydroxysphingosine*. Für die Bindung am Stickstoffatom kommen *Nonhydroxy-*, α -*Hydroxy-* und ω -*Hydroxyfettsäuren* in Betracht, wobei letztere mit einer weiteren Fettsäure verestert sein können. Unter den in der Natur

vorkommenden α -Hydroxyfettsäureceramiden existieren nur die D-Komponenten [Karlson et al. 1974]. Im Moment sind neun Ceramidklassen bekannt, über deren einzelne Funktionen allerdings keine genauen Aussagen getroffen werden können [Wertz et al. 1985, Robson et al. 1994, Ponec et al. 2003]

Die ursprüngliche Nomenklatur der Ceramide basierte auf den Zahlen 1-7, einschließlich einiger gebrochener Zahlen, abgeleitet vom chromatographischen Laufverhalten. Dabei beschrieben höhere Zahlen Ceramide höherer Polarität [Stewart and Downing 1999]. Heutzutage wird allerdings die Nomenklatur von Motta et al. [1993] bevorzugt, die, sich an der chemischen Struktur der Ceramide orientierend, ein kombinatorisches Buchstabensystem verwendet. Der letzte Buchstabe bezeichnet dabei die Sphingoidbase (**S**=Sphingosin, **P**=Phytosphingosin, **H**=6-Hydroxysphingosin). Die amidierten Fettsäuren können über die Hydroxylierungen unterschieden werden: Fettsäuren ohne Hydroxylgruppe werden mit **N** (nonhydroxy) bezeichnet, omega-Hydroxyfettsäuren erhalten den Buchstaben **O** und alpha-Hydroxyfettsäuren den Buchstaben **A**.

Innerhalb der Ceramidklassen werden den ω -Acylceramiden CER[EOS], CER[EOH] und CER[EOP] aufgrund der einzigartigen Lipidstruktur eine besondere Bedeutung zugewiesen. Durch die ω -Acylgruppe, bei der es sich fast ausschließlich um Linolsäure handelt, wird die Fettsäureseitenkette drastisch verlängert. Auf diesem Effekt berufen sich zahlreiche Literaturangaben [Bouwstra et al. 1996a, 1998 und 2002] bei der Zuweisung obiger Ceramide zu essentiellen strukturgebenden Komponenten.

Zusammenfassend kann man an dieser Stelle sagen, dass die Ceramide sowohl die mengenmäßig größte Fraktion der SC Lipide darstellen als auch eine essentielle Rolle bei Aufbau und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des SC spielen. Die detaillierte Funktion der einzelnen Ceramidklassen ist im Moment noch nicht bekannt, aber man geht davon aus, dass ein genaues Wissen über deren physikochemische Eigenschaften absolut notwendig ist, um den Einfluss der neun Subspezies auf die Barrierefunktion zu bestimmen. Aufgrund dieser hohen Bedeutung fasst der folgende Abschnitt die aktuellen Erkenntnisse über das thermotrope und das lyotrope Verhalten ausgewählter Ceramide, ermittelt anhand von DSC-, FT-IR-, FT-Raman- und Röntgendiffraktionsdaten, zusammen.

II.3. Physikochemische Eigenschaften der Ceramide und deren Einfluss auf die Struktur des SC - Part I: Physikochemische Eigenschaften der Ceramide

Generell konnte über das Phasenverhalten der SC Ceramide festgestellt werden, dass sie alle das Auftreten eines Polymorphismus teilen. Bei physiologischen Temperaturen zeigen alle Verbindungen kristalline Phasen mit lamellaren Strukturen und hochgeordneten Alkylketten. Zudem scheint die Kopfgruppenpolarität der einzelnen Ceramide eine wichtige Determinante für die Ausbildung der Hautbarrierefunktion zu sein.

Im Folgenden sollen aus dem Übersichtsartikel von Wartewig und Neubert [2007] nur die aktuellen Erkenntnisse über die Ceramide CER[NS] und CER[AP] wiedergegeben werden, da diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

CER[NS]

Laut verschiedenen Studien gilt das CER[NS] innerhalb der neun Ceramidklassen als die mengenmäßig am häufigsten vorkommende Subklasse [Wertz und van den Bergh 1998, Farwanah et al. 2005], woraus sich die Notwendigkeit zur genauen Charakterisierung ergibt.

So konnte in der Studie von Shah et al. [1995] mittels DSC und Röntgendiffraktion das komplexe polymorphe Phasenverhalten des hydratisierten CER[NS] belegt werden. Es wurden ein exothermer Übergang bei ca. 60°C und ein endothermer bei 90°C gegenüber einem einzigen breiten endothermer Übergang der wasserfreien Substanz bei 95°C beobachtet.

In DSC- und FT-IR-Studien wurden durch Chen et al. [2000] der Einfluss der Kettenlänge der Fettsäure (C14, C16, C18, C20) auf das Verhalten des synthetisch erhaltenen Gesamt molekül CER[NS] untersucht. Für alle bei 90°C hydratisierten Derivate konnte gezeigt werden, dass die Hauptphasen-Übergangstemperatur im Wesentlichen unabhängig ist von der Kettenlänge des Acylrestes. Zusätzlich wurden die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen mittels FT-IR-Studien durch Einbau perdeuterierter Fettsäureketten untersucht. Die Temperaturabhängigkeit zweier charakteristischer IR-Moden bewiesen einen *fest-fest*-Übergang bei ca. 20°C unterhalb der Hauptumwandlungstemperatur, begleitet von einer Änderung der orthorhombischen Kettenpackung zu einer hexagonalen. Letzteres trat gemeinsam mit einem verstärktem Eindringen von Wasser in die Region der Kopfgruppen auf, geschlussfolgert aus der Temperaturabhängigkeit zweier für die Kopfgruppe charakteristischer IR-Moden.

Des Weiteren wurde unter Anwendung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie von Li et al. [2002] die konformative Anordnung der hydrophilen Region des CER[NS] und die daraus,

unter Einbezug der Amino- und Hydroxylgruppen, resultierenden Wasserstoffbrückenbindungen untersucht.

CER[AP]

Die Untersuchungen dieses Ceramids sind aus zwei Gründen besonders interessant. Zum einen ist es aufgrund seiner Kopfgruppenstruktur mit vier benachbarten OH-Gruppen und der relativ kurzen Alkylketten (C16 bzw. C18) das Ceramid mit der höchsten Polarität. Zum anderen ist es das einzige der bisher bekannten SC Ceramide, das durch Synthese in Form von 2 Diasteromeren erhalten wird.

Dabei erfolgt die Darstellung durch eine selektive Acylierung am Stickstoff der optisch reinen Form der C18- (2S, 3S, 4R)-Phytosphingosinbase mit der α -Hydroxystearinsäure. Das Produkt ist die Mischung zweier Diasteromeren, die sich in der Stellung der OH-Gruppe in α -Position der Acylkette unterscheiden (Abb.5).

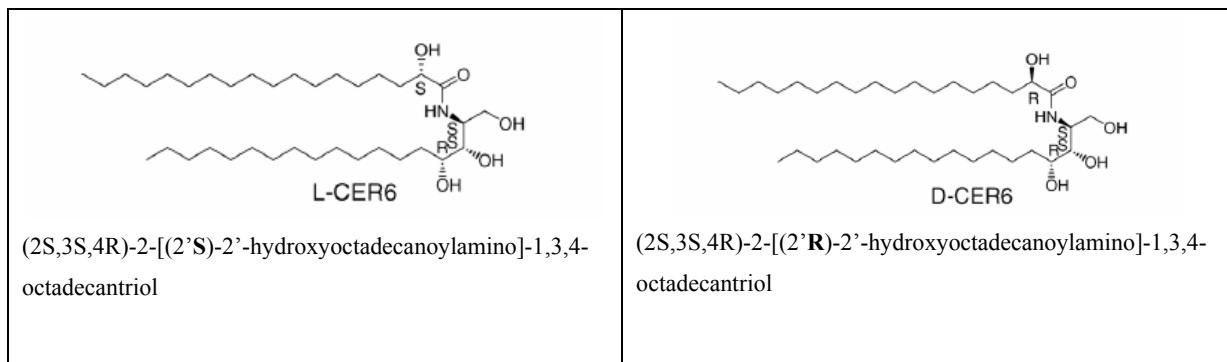


Abb.5 Chemische Strukturen von L-CER[AP] und dem natürlich vorkommenden D-CER[AP] nach Raudenkob et al. [2005]

Rerek et al. [2001] und Garidel [2002] untersuchten diese Mischung mithilfe der FT-IR-Spektroskopie. Raudenkob et al. [2005] trennten erst das Diastereomerenpaar säulenchromatographisch auf und charakterisierten die zwei Einzelsubstanzen dann mittels Röntgendiffraktion, FT-IR-, und FT-Ramanspektroskopie. Es ist hinlänglich bekannt, dass sich Diastereomere in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. Folglich zeigten sowohl D-CER[AP] als auch L-CER[AP] unterschiedliches thermotropes Phasenverhalten.

Für L-CER[AP] konnten drei lamellar kristalline Phasen und eine lamellar flüssigkristalline Phase detektiert werden. Das natürlich auftretende D-CER[AP] wies zwei lamellar kristalline sowie eine lamellar flüssigkristalline Phase auf. Obwohl beide Diastereomere die gleiche Kettenlänge aufwiesen, waren die lamellaren Wiederholabstände aller Phasen des D-CER[AP] größer als die der L-Form. Gemeinsam war den zwei Substanzen, dass das Hinzufügen von Wasser eine Absenkung der Temperatur des Hauptphasenübergangs

induzierte, aber nicht zu einer Wassereinlagerung zwischen den lamellaren Schichten, also zu keiner Quellung, führte.

Um diese Erkenntnisse veranschaulichen zu können, wurde für das L-CER[AP] eine V-förmige Struktur postuliert, während das D-CER[AP] eine *ful-extended* Konformation einnehmen sollte, in der beide Seitenketten ausgestreckt in entgegengesetzte Richtungen zeigen (Abb.6) [Raudenkolb et al 2005; Kiselev et al. 2005].

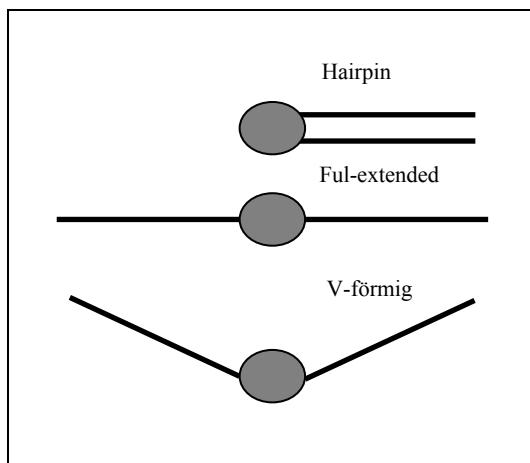


Abb.6 Mögliche molekulare Anordnungen des CER[AP] in der multilamellaren Membran nach Raudenkolb et al. [2005] und Kiselev et al. [2005]

Wie bereits einleitend gesagt ist ein Wissen über die physikochemischen Eigenschaften der Ceramide wichtig, um deren Einfluss auf die Mikrostruktur des *Stratum corneums* bestimmen zu können. Die Eigenschaft eines auftretenden Polymorphismus bei allen bisher bekannten und untersuchten Ceramiden ist dafür ein bedeutendes Ergebnis. Es hat sich gezeigt, dass innerhalb der verschiedenen Phasen eines Ceramids solche mit *ful-extended* Konformation eine besondere Rolle bei der Ausbildung der SC Struktur spielen. Entweder ordnen sie sich innerhalb der Lipid-Doppelschicht so an, dass beide Alkylketten in eine Richtung zeigen (*hairpin*-Konformation) oder in entgegengesetzter Richtung (*ful-extended*), wobei das Zusammenspiel mit dem Einfluss der polaren Kopfgruppe bei der Ausbildung der Membranstruktur noch diskutiert werden muss.

Im Moment sind leider noch keine Daten zur physikochemischen Charakterisierung der ω -Acylceramide CER[EOS] und CER[EOP] verfügbar. Dies ist aber in Anbetracht ihrer bedeutenden Rolle bei der Ausbildung der Integrität der SC Lipidmatrix notwendig. Als limitierender Faktor sind dabei zum einen die begrenzte Verfügbarkeit und zum anderen die schwierige Handhabung aufgrund der oxidativen Anfälligkeit des Linolsäurerestes anzuführen.

Zusammenfassend hat sich aber gezeigt, dass die Studien an synthetisch dargestellten Ceramiden mit definierter Struktur unter Anwendung geeigneter spektroskopischer Methoden gute Ergebnisse liefern. So abgeleitete strukturbasierte Eigenschaften sind hilfreich, um in der Strukturaufklärung des *Stratum corneums* zu Erkenntnissen zu gelangen. In den vergangenen Jahrzehnten ging man allerdings in der SC Lipid-Forschung meist von isoliertem nativen tierischen Material aus, da dieses leicht zugänglich war. Auf Basis der so gewonnenen Einblicke in die Struktur des SC wurden verschiedene Modellvorstellungen über die Mikrostruktur des SC entwickelt, deren Validierung heute aber zumeist immer noch aussteht und die daher auch häufig Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen sind. Im folgenden Abschnitt soll der aktuelle Kenntnisstand zu diesem Thema reflektiert werden.

(publiziert in: **Wartewig, S, Neubert, R.H.H.**
Properties of Ceramides and their impact on the stratum corneum structure – A Review – Part 1: Ceramides.
Skin Pharmacology and Physiology (2007))

II.4. Physikochemische Eigenschaften der Ceramide und deren Einfluss auf die Struktur des SC - Part II: Stratum Corneum Lipid Modellsysteme

In den 70iger Jahren konnte durch Gefrierbruchmikroskopie gezeigt werden, dass die SC Lipide ein hochgeordnetes multilamellares System bilden, das den Raum zwischen den *Korneozyten* vollständig als interzelluläre Lipidmatrix ausfüllt [Breathnach et al. 1973]. Diese Erkenntnisse stellten einen Fortschritt dar, da mit der vorher üblicherweise eingesetzten Transmissions-Elektronenmikroskopie solche Aufnahmen nicht möglich waren.

Einen weiteren Meilenstein markierte die Einführung von Rutheniumtetroxid (RuO_4) als Fixierungsagenz [Madison et al. 1987], um die gesättigten Lipide elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen. Die interzellularen Lipidlamellen treten in der Regel als trilamellare Wiederholeinheit auf und erscheinen im mikroskopischen Bild in Form von alternierenden dunklen und hellen Banden unterschiedlicher Dicke (sogenannte *broad-narrow-broad-sequence*), hervorgerufen durch elektronendurchlässige und weniger durchlässige Zonen. Die trilamellare Einheit wies einen Gesamt-Wiederholabstand von 13 nm auf und es wurde der Begriff einer *Long-Periodicity Phase (LPP)* dafür definiert. So wurden Mischungen aus CER/CHOL/ FFA vor allem durch Röntgen-Weitwinkel-, (*Wide Angle X-ray Scattering - WAXS*) und -Kleinwinkeldiffraktion (*Small Angle X-ray Scattering - SAXS*) untersucht. Diese ersten Studien wurden hauptsächlich an aus Tieren isolierten SC-Proben (vor allem isolierte Mäuse- und Schweineepidermen) durchgeführt, weil dieses Material leicht verfügbar war [Wertz und van den Bergh 1998, Bouwstra et al. 1999, Kuempel et al. 1998, McIntosh et al. 1996, McIntosh 2003]. Aufgrund der Abweichungen in der Lipidzusammensetzung im Vergleich zu

humanen Gewebe waren die so gewonnenen Daten schwer zu korrelieren. So konnten McIntosh et al. [1996] an hydratisierten Mischungen aus Schweine-CERs/ CHOL/ Palmitinsäure zeigen, dass die Existenz einer einzelnen Phase mit dem Wiederholabstand von 13 nm an die Anwesenheit des nur in Epidermis auftretenden ω -Acylceramides CER[EOS] geknüpft ist. Eine Substitution durch aus Rinderhirn isolierten Ceramiden führte nicht zur Ausbildung einer LPP, was darauf hindeutete, dass die lamellare Struktur des SC sowohl von spezifischen Ceramiden als auch von einem geeignetem Verhältnis CHOL/ FFA abhängig ist. Weiter konnte an vergleichbaren Mischungen in Quellungsexperimenten durch Berechnung des Elektronenstreulängedichtheitsprofils [McIntosh 2003] gezeigt werden, dass die 13 nm Phase aus zwei asymmetrischen Bilayern besteht, zwischen denen Cholesterol unsymmetrisch verteilt ist.

Ebenfalls einen wichtigen Beitrag auf diesem Gebiet der SC Lipid-Forschung lieferte die Gruppe um Bouwstra [1996b]. Die Untersuchungen an Mischungen aus Schweine-CERs/ CHOL/ langkettenigen FFA brachten die Existenz zweier lamellarer Bereiche mit Wiederholabständen von 6 nm (Short-Periodicity Phase- SPP) bzw. 13nm (LPP) hervor. Ferner konnte gezeigt werden, dass analoge Ergebnisse zu den Gefrierbruchuntersuchungen (Auftreten der *broad-narrow-broad*-Sequenz) nur dann erhalten wurden, wenn der Mischung CER/ CHOL auch FFA zugesetzt wurden. In einem weiteren Schritt wurde der Effekt wechselnder Mischungsverhältnisse auf die Lipidorganisation studiert [Bouwstra et al. 1999], da auch im natürlichen Gewebe unterschiedliche Zusammensetzungen in Abhängigkeit von der Körperregion und dem Gesundheitszustand der Haut bestehen. So konnte aber gezeigt werden, dass die Lipidorganisation weitgehend unempfindlich ist gegenüber einer Änderung der Zusammensetzung von CERs/ CHOL/ FFA Mischungen. Relativ schnell ging man allerdings dazu über, anstelle von tierischem humanes SC Material einzusetzen, da dieses eine bessere Korrelation zur *in-vivo* Situation zuließ. Im Vergleich zeigten zwei Mischungen mit entweder tierischem oder humanen isolierten Ceramiden das Auftreten einer LPP, vor allem in Abhängigkeit von CER[EOS]. Unterschiede traten auf bei Zugabe von FFA. So wurden nur für die Mischungen aus humanen CERs/ CHOL bei Zugabe von FFA die Ausbildung einer SPP beobachtet [Bouwstra et al. 2001].

Prinzipiell konnte durch Einsatz nativen SC Materials die Organisation der interzellulären Lipidmatrix gut untersucht werden. Aufgrund der Variabilität der isolierten Lipide in Bezug auf Kopfgruppenarchitektur und Kettenlängenverteilung war es allerdings nicht möglich, den Einfluss einzelner Lipidklassen, vor allem den der neun Ceramid-Subspezies zu bestimmen. Daher erfolgte in den letzten Jahren ein Strategiewechsel. Man arbeitet heute verstärkt mit

synthetisch dargestellten Ceramiden definierter Struktur, um so genauer den Effekt des Molekülbaus auf die Membranstruktur zu bestimmen.

So konnten de Jager et al. [2004a, 2004b] ein equimolares System aus CHOL/ CER/ FFA entwickeln, dessen Fraktion synthetischer Ceramide CER[EOS]/ CER[NP]/ CER[AS] im Verhältnis 1:7:2 enthielt und das der natürlichen SC Lipidorganisation am ehesten entsprechen sollte. In Röntgendiffraktionsstudien konnte durch Variation der Ceramidmischung gezeigt werden, dass der Ausschluss verschiedener Subspezies keinen Einfluss auf die Lipidorganisation hatte. Einen Effekt erzielte allerdings eine Substitution des ω -Acylceramids CER[EOS] gegen CER[EOP]. Die Ausbildung einer LPP wurde in Gegenwart von CER[EOS] immer detektiert, deren Intensität relativ unempfindlich gegenüber der Konzentration des Ceramids war. Aber bei einem teilweisen Austausch gegen CER[EOP] wurde die Intensität der LPP geringer und verschwand nahezu vollständig bei kompletter Substitution. Diese Unterschiede wurden von den Autoren vor allem auf den Kopfgruppeneffekt des polareren CER[EOP] bei vergleichbarer Kettenlänge zurückgeführt [de Jager et al. 2005]. Diese Studien zeigten erstens eine relevante Struktur-Wirkungsbeziehung bei Einsatz synthetisch dargestellter Ceramide, zweitens wurde ein Zusammenhang zwischen CER[EOS] und der Ausbildung der LPP hergestellt und drittens konnte erstmalig anhand von SC Lipidmatrices auch der Einfluss der Kopfgruppe der Ceramide auf den membranbildenden Prozess gezeigt werden.

Auf Grundlage der hier zusammengefassten Studien wurden verschiedene theoretische Vorstellungen über die Lipidorganisation im *Stratum corneum* entwickelt, die kurz vorgestellt werden.

- a). **Das Stacked Monolayer Model** [Swartzendruber et al. 1998] beschreibt die lamellare Anordnung der interzellulären Lipidmatrix, gekennzeichnet sowohl durch ein Überlappen der gestreckten Alkylketten der Ceramide als auch durch eine statistische Verteilung der Cholesterol-Moleküle zwischen den einzelnen Lipidschichten. Diese Anordnung entspricht der elektronenmikroskopisch sichtbaren Breit-Schmal-Breit-Abfolge der Lamellen.

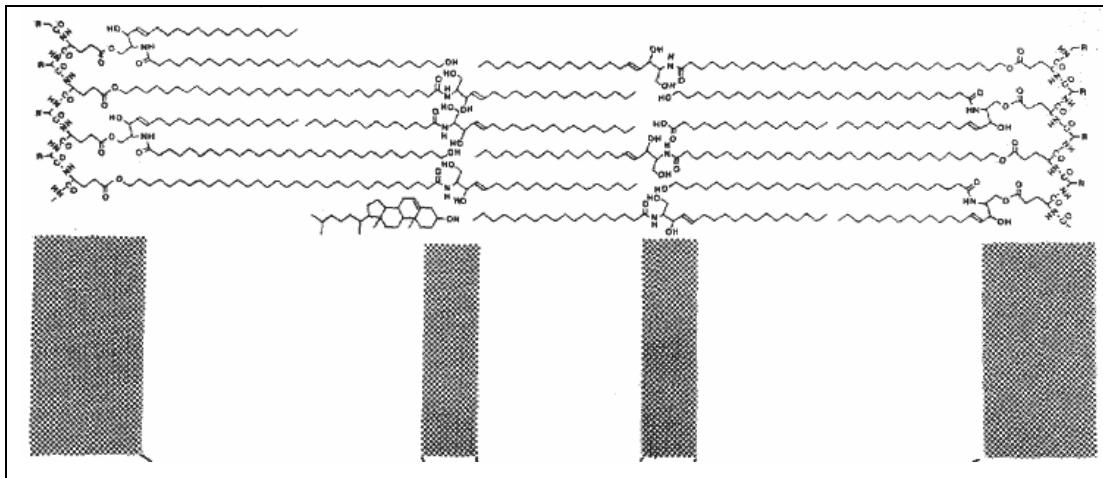


Abb.7 Das Stacked Monolayer Model nach Swartzendruber et al. [1989], zusammengefasst in Kessner et al. [2007]

b). Das von Forslind postulierte **Domain Mosaic Model** [Forslind 1994] geht davon aus, dass die Lipide für Diffusionsprozesse im flüssigkristallinen Zustand vorliegen müssen. Durch die Dominanz langer Kohlenwasserstoffketten sind allerdings kristalline und Gelphasen gegeben, die nicht die mechanischen Anforderungen an die Barriere erfüllen. Es wird deshalb die Ausbildung von Domänen innerhalb der Bilayer postuliert, in denen ein Großteil der Lipide entsprechend ihrer Eigenschaften als kristalline oder Gelphase vorliegen. *Grain borders* begrenzen diese Gebiete und beinhalten Lipide im flüssigkristallinen Zustand.

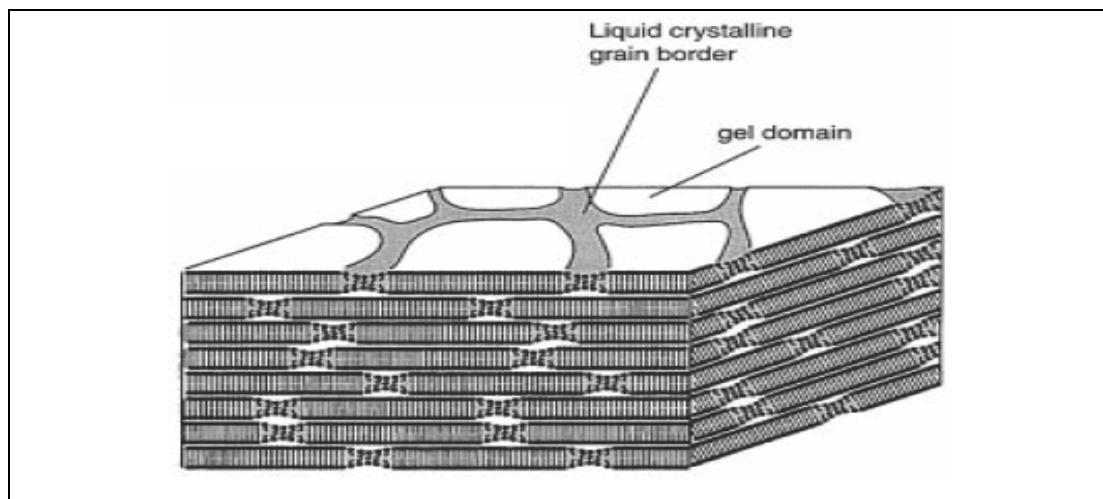


Abb.8 Das Domain Mosaic Model nach Forslind [2001], zusammengefasst in Kessner et al. [2007]

c). Während im Domain Mosaic Model die kristallinen und flüssigen Bereiche nebeneinander in einer Schicht vorliegen, beinhaltet das **Sandwich Model** [Bouwstra et al. 2000] eine Anordnung dieser Domänen in getrennten Bereichen innerhalb einer trilamellaren Grundstruktur. Nach diesem Modell, das ebenfalls die Breit-Schmal-Breit-

Abfolge miteinbezieht, befindet sich innerhalb des 13 nm Wiederholabstandes eine fluide Phase von 3 nm (schmal), bestehend aus den ungesättigten Seitenketten von CER[EOS] und CHOL. Diese Phase wird umgeben von geordneten Lipidstrukturen (breit), gebildet aus den gesättigten Molekülteilen der Lipide. Die Permeation von Substanzen durch das SC soll nach dieser Vorstellung hauptsächlich im Bereich der fluiden Phase erfolgen.

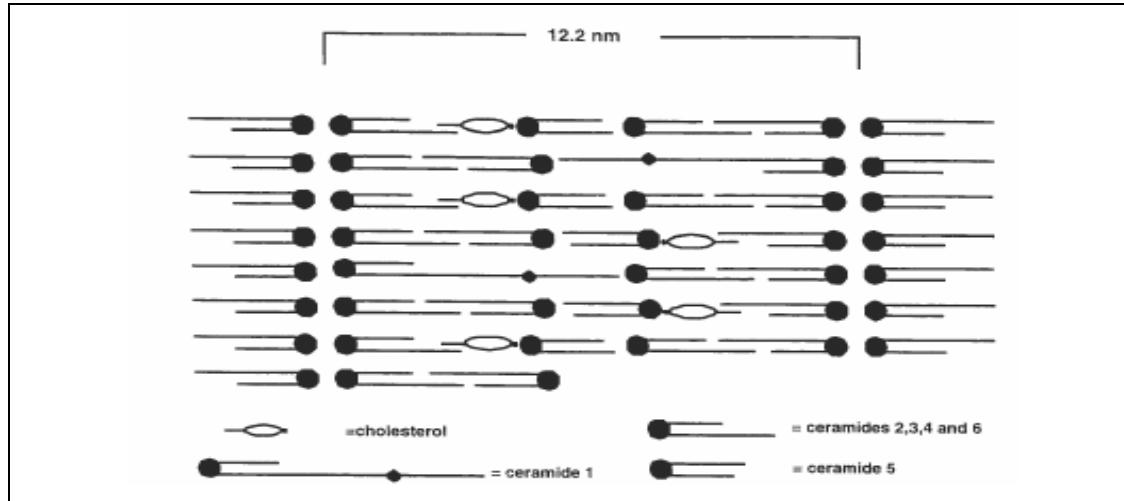


Abb.9 Das Sandwich Model nach Bouwstra et al. [1998], zusammengefasst in Kessner et al. [2007]. Die Nomenklatur erfolgte noch nach dem alten, auf dem chromatographischen Laufverhalten basierenden System. Nach Motta et al. [1993] ergibt sich folgende: CER1 = CER[EOS], CER2 = CER[NS], CER3 = CER[NP], CER4 = CER[AS](C24), CER5 = CER[AS](C16), CER6 = [AP].

d). Das **Single Gel Phase Model**, entwickelt von Norlén [2001], unterscheidet sich grundlegend von den vorangegangenen, da es der Vorstellung folgt, dass die Lipidmatrix aus einer einzigen zusammenhängenden, kohärenten lamellaren Gel-Struktur gebildet wird.

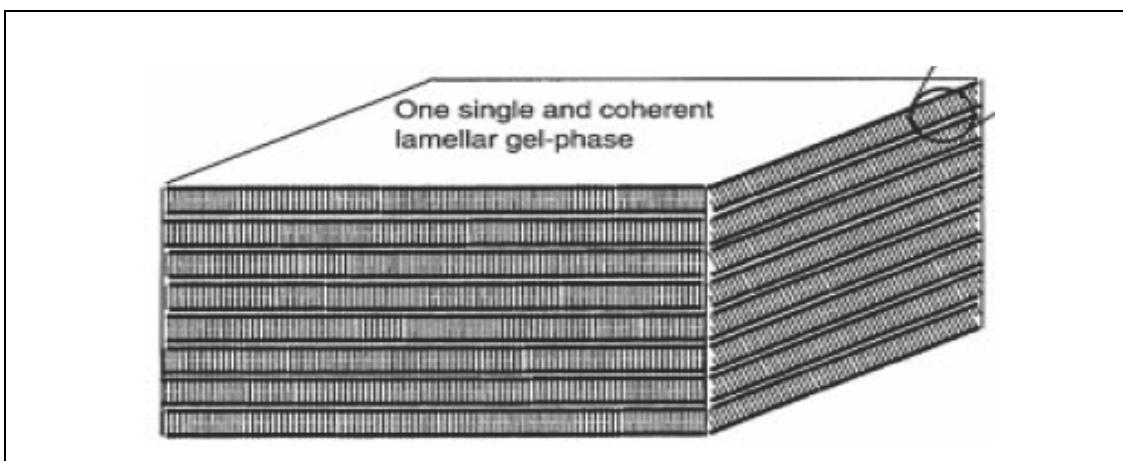


Abb.10 Das Single Gel Phase Model nach Norlén [2001], zusammengefasst in Kessner et al. [2007].

Keine Phasenseparation, weder in den flüssigkristallinen und Gelphasen noch in den kristallinen Phasen mit orthorhombischer bzw. hexagonaler Kettenpackung wird

beschrieben. Die Lipidstruktur ist gekennzeichnet durch einen geringen Wassergehalt, einer geringen Beweglichkeit der Lipidketten und einer geringen Wasserpermeabilität aufgrund der dichten Packung der konstituierenden Lipide. Während die obigen Modelle von einer vorherrschenden *hairpin*-Konformation der Ceramide (beide Alkylketten zeigen in eine Richtung) ausgehen, bezieht Norlén in seine Überlegungen auch die Existenz der *ful-extended* Konformation (Alkylketten zeigen in entgegengesetzte Richtung) mit ein.

Anzumerken ist, dass sich gegenwärtig alle Modelle über die Anordnung der Lipide in der SC Matrix in der Diskussion befinden. Schlüsselfragen sind dabei das Auftreten von Phasenseparationen und die Existenz von flüssigen Lipidstrukturen [Norlén 2003, Bouwstra und Ponec 2006].

Zusammenfassend gilt, dass die Validierung der einzelnen Modelle durch experimentelle Hindernisse erschwert wird, wie das Einstellen optimaler Versuchsbedingungen und die Entwicklung geeigneter Modelle, wobei letzteres durch den vermehrten Einsatz synthetisch dargestellter Lipide mittlerweile gut beherrschbar ist [Bouwstra et al. 2002, de Jager et al. 2004b]. Die Schwierigkeiten bezüglich des experimentellen Setups (Vergleich der mit unterschiedlichen Methoden gewonnener Daten, Nachahmung der *in-vivo* Situation) bestehen allerdings weiterhin.

Keines der beschriebenen Modelle konnte bisher aufgrund experimenteller Daten eindeutig bestätigt werden. Für keines der Modelle existieren Studien, die eine Übertragung der vorgeschlagenen molekularen Anordnung auf die reale Lipidorganisation zulassen. Generell gehen zwar einige renommierte Arbeitsgruppen von der Existenz einer LPP innerhalb der Lipidstruktur aus, aber auch darüber werden z.T. kontroverse Debatten geführt. Wie bereits erwähnt führten Swartzendruber et al. [1989], Wertz [1996b] und Bouwstra et al. [2000] unabhängig voneinander elektronenmikroskopische bzw. Röntgendiffraktionsstudien durch, die auf Grundlage der detektierten Breit-Schmal-Breit-Abfolge der Lamellen und des 13nm – Wiederholabstandes zur Entwicklung der entsprechenden Modelle führten. Bei der für die elektronenmikroskopischen Messungen notwendigen Probenpräparation wurde RuO₄ als Fixierungsagent eingesetzt. Analog gingen auch Hill und Wertz [2003] vor, die dann zwar auch eine trilamellare Organisation der Lamellen feststellten, allerdings hatten die Lamellen eine einheitliche Dicke und die *broad-narrow-broad-Sequenz* wurde nicht detektiert. Diese Ergebnisse unterstützen die Thesen von Pfeiffer et al. [2000] und von Al-Amoudi et al. [2005], dass die Präparation mit RuO₄ zu drastischen Störungen der Struktur der SC Probe

führt und die dann detektierte LPP auch ein Artefakt der experimentellen Methode darstellen könnte.

Generell besteht aber eine weitgehende Einigkeit darüber, dass ein Auftreten der LPP in Zusammenhang mit der Anwesenheit des ω -Acylceramids CER[EOS] steht. Aber es gibt auch Studien, die von der Ausbildung einer LPP in Abwesenheit von CER[EOS] berichten [Hatta et al. 2001].

Abschließend ist festzustellen, dass in den letzten Jahren viele neue Einblicke in die Mikrostruktur des SC gewonnen werden konnten, vor allem auch durch das Fokussieren auf die Gruppe der Ceramide. Aussagekräftige theoretische Modelle über die Anordnung der Lipidmatrix wurden entwickelt, deren Validierung erschwert ist. Es sollte also weiterhin intensiv auf diesem Gebiet gearbeitet werden, um das Wissen über die Lipidorganisation zu erweitern. Gerade durch Einsatz von synthetischen Lipiden definierter Struktur können diesbezüglich neue Ergebnisse erwartet werden. Letztendlich ist ein besseres Verständnis über den Aufbau der SC Lipidmatrix eine Grundvoraussetzung, um die Hautbarriere verstehen zu können. Ein größeres Wissen über die interne Struktur des *Stratum corneum* hilft, die Mechanismen der Arzneistoffpenetration durch das SC zu studieren und im Sinne der Entwicklung geeigneter dermaler oder transdermaler *drug delivery systems* zu beeinflussen.

(publiziert in:

Kessner, D., Ruettinger, A., Kiselev, M.A., Wartewig, S., Neubert, R.H.H.
Properties of Ceramides and their impact on the stratum corneum structure – A Review – Part 2: Stratum Corneum Lipid Model Systems
Skin Pharmacology and Physiology (2008)

II.5. Neutronenstreuung in der Stratum corneum Forschung

II.5.1. Grundlagen der Methode

Zur physikochemischen Charakterisierung von Stratum corneum Lipiden, als Einzelsubstanzen oder als binäre, ternäre oder Multikomponent-Mischungen wurden und werden vor allem Methoden wie die *Differential Scanning Calorimetry* (DSC), *IR-* und *Ramanspektroskopie* sowie die *Röntgendiffraktion* eingesetzt [zusammengefasst in Wartewig und Neubert 2007]. Auf den so erhaltenen Daten basiert das heutige Wissen über Struktur und Aufbau der SC Lipidmatrix. Allerdings ist als ein großer Nachteil aufzuführen, dass die eingesetzten Proben hauptsächlich in Pulverform bzw. als hydratisierte Pulver vorliegen und somit nicht die interzelluläre hochorientierte multilamellare Lipidmatrix nachahmen. Dieses Problem ist weithin bekannt und es konnte in Arbeiten gezeigt werden, dass sich zur Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von Lipidsystemen orientierte multilamellare Proben weitaus besser eignen als „Pulverproben“ [Münster 2000].

Die experimentelle Untersuchung multilamellarer Membranen erfordert Methoden, die sensitiv für den entsprechenden Längenskalen (*nm*-Bereich) sind. Da es sich um biologisch relevante Systeme handelt, untersucht man typischerweise unter Normaldruck, hoher Luftfeuchtigkeit und Temperaturen im physiologischen Bereich. Die Weichheit der Materie erschwert die Anwendung rasterkraftmikroskopischer Methoden. Bei elektronenmikroskopischen Methoden muss Kontrastierungsmaterial eingesetzt werden, dass das zu untersuchende Membransystem entscheidend verändert und die biologische Relevanz in Frage stellt. Die Streuung von Neutronen- oder Röntgenstrahlung ist berührungslos und *in situ* möglich. Strahlenschäden, die das System während der Messung verändern, wurden für die Neutronenstreuung nicht beobachtet. Die Röntgenbeugung ist die klassische Untersuchungsmethode zum Studium struktureller Eigenschaften kondensierter Materie, die auch die SC Lipide zugeordnet werden können [Hou et al. 1991]. In letzter Zeit hat sich auch die Neutronenstreuung, die bisher klassischerweise in der Phospholipid-Membran-Forschung [Katsaras et al. 1992, Kucerka et al. 2004, Nagle und Tristram-Nagle 2000] eingesetzt wurde, auf dem Gebiet der *Stratum corneum* Untersuchungen als geeignet erwiesen [Kiselev et al. 2005, Zbytovska et al. 2006, Rüttinger et al. 2008, Kessner et al. 2008]. Die Neutronenstreuung ergänzt das Methodenspektrum sinnvoll, da eine Analyse der inneren Struktur der aus SC Lipiden präparierten multilamellaren Membranen dadurch ermöglicht wird. Dieser Vorteil übertrifft auch die Nachteile dieser Messtechnik wie die geringe Intensität des Neutronenstrahls und die geringe Verfügbarkeit von Neutronenquellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Neutronendiffraktionsmuster wurden am *VI Diffraktometer für Kalte Neutronen* des Hahn-Meitner-Instituts, Berlin aufgenommen. Mittels Neutronen können im Atomverbund leichte Atome wie Wasserstoff nachgewiesen, einander ähnliche Metallatome unterschieden und der Magnetismus einzelner Atome bestimmt werden. Somit leistet die Neutronenstreuung Beiträge zur Chemie, zur Biologie, zur Metallkunde und zur Festkörperphysik, die auf andere Weise nicht gewonnen werden können. Durch den Einbau einer *Kalten Quelle*, die die Geschwindigkeit der Neutronen stark verringert, ist es möglich, die Bewegungen der Atome zu studieren, den Aufbau sehr komplexer Atomgebilde zu bestimmen und Baufehler in der Atomanordnung, die bei hohen Temperaturen oder bei Bestrahlung in festen Körpern entstehen, zu erklären. Mit einer *Kalten Quelle* wird eine etwa zehn Zentimeter dicke Schicht flüssigen Wasserstoffs an den Rand des Reaktorkerns gebracht, wodurch durch Streuung an Wasserstoff besonders langsame Neutronen erzeugt werden. Diese eröffnen spezielle wissenschaftliche Untersuchungsgebiete und können durch Neutronenleiterrohre zu weiter entfernten Experimentierplätzen geführt werden. Am HMI-

Forschungsreaktor gibt es eine eigene Versuchshalle, die von mehreren Neutronenleiterrohren versorgt wird [HMI 2002].

Die physikalische Natur von Röntgen- und Neutronenbeugung ist verschieden. Röntgenbeugung findet an Elektronen statt. Die Röntgenstreuulängen steigen daher mit der Zahl der Elektronen im Atom (entspricht der *Ordnungszahl Z*). Neutronenstrahlen werden von Atomkernen gebeugt und die Streulängen können stark variieren [Kádár und Rosta, 2003]. So weichen die Streulängen von Deuterium und

Wasserstoff stark voneinander ab, die des Wasserstoffs trägt sogar ein negatives Vorzeichen [Dianoux und Lander 2003]. Dieser Umstand kennzeichnet den großen Nutzen der Neutronenstreuung und wird durch Kontrastvariation bzw. durch Deuterium-Markierungen im Molekül in vielen Experimenten angewendet.

Atom	b_{coh} (10^{-12} cm)	f_{X-Ray} (10^{-12} cm)
^1H	-0,374	0,28
D (^2H)	0,667	0,28
^{12}C	0,665	1,69
^{14}N	0,930	1,97
^{16}O	0,580	2,25

Tab.1 Neutronen- (b_{coh}) und Röntgenstreuulängen (f_{X-Ray}) verschiedener Elemente [Dianoux und Lander 2003]

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen und die Energie E ist mit der Wellenlänge λ über folgende Gleichung verknüpft

$$E = hc / \lambda \quad \text{Gleichung 1,}$$

wobei c die Lichtgeschwindigkeit und h das Planck'sche Wirkungsquantum sind.

Neutronen hingegen besitzen eine endliche Masse m und ihre kinetische Energie korreliert folgendermaßen mit der Wellenlänge λ :

$$E = h^2 / 2m\lambda^2 = m\nu^2 / 2 \quad \text{Gleichung 2,}$$

wobei ν die Neutronengeschwindigkeit ist. Dieser Unterschied zwischen beiden Strahlungsarten führt dazu, dass Röntgenstrahlung um ein Mehrfaches energiereicher ist als Neutronenstrahlung [King 2005].

In einem typischen Streuexperiment geht ein parallel gerichteter Strahl der Wellenlänge λ durch die Probe hindurch und die Streuintensität wird entweder als Funktion des Streuwinkels θ oder als Funktion des Streuvektors q gemessen [Abb.11]. Der Streuvektor q ergibt sich aus dem Unterschied zwischen dem Ausbreitungsvektor des gestreuten und des einfallendes Strahls [Grossmann 2002] und ist folgendermaßen mit dem Streuwinkel korreliert:

$$q = |\vec{q}| = |k_s - k_i| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad \text{Gleichung 3.}$$

Für ein besseres Verständnis soll an dieser Stelle kurz der Unterschied zwischen den Begriffen Streuung (engl. *scattering*) und Brechung/ Beugung (*diffraction*) erläutert werden. Streuung resultiert aus der Einwirkung von Strahlung auf Materie. Falls diese keine höhere Ordnung aufweist (Bsp. in einem homogenen Medium dispergierte Partikel), legen die gestreuten Strahlen unterschiedliche Wege zurück und sie unterscheiden sich in der jeweiligen Phase.

Die Streudaten lassen so Rückschlüsse auf Form, Größe und Wechselwirkung zwischen einzelnen Partikeln zu. Entsprechend ist die Diffraktion als eine Spezialform der Streuung zu betrachten, bei der der einfallende Strahl auf eine geordnete Struktur (Bsp. Kristall) trifft und unter einem definierten Winkel 2θ , dem Bragg'schen Gesetz folgend, gebrochen wird. Daher tritt Diffraktion in Folge von Interferenzen zwischen gebeugten Wellen paralleler Netzebenen auf und ein Diffraktionspeak (Reflex) kann als definierte Funktion des Streuvektors q detektiert werden.

Einer der wichtigsten Parameter, der durch Diffraktionsstudien an Lipid-Biomembranen bestimmt werden kann, ist die Dicke des Bilayers, benannt als lamellarer Wiederholabstand d oder als Periodizität. Aus der Intensität der Diffraktionsreflexe kann durch Fourier Transformation das Elektronen- bzw. Neutronenstreulängedichteprofil ermittelt werden. Das Profil ist eine Funktion, die die Dichteverteilung der Elektronen bzw. Neutronen beschreibt und damit Informationen über die molekulare Struktur der Lipid-Biomembranen liefern kann. Multilamellare Filme auf einer nahezu absolut glatten Quarzoberfläche weisen einen hohen Ordnungszustand auf und viele Reflexe hoher Intensität können gemessen werden. In Abb.12 ist das Modell einer solchen Lipidschicht sowie die Definition des *lamellaren Wiederholabstand*

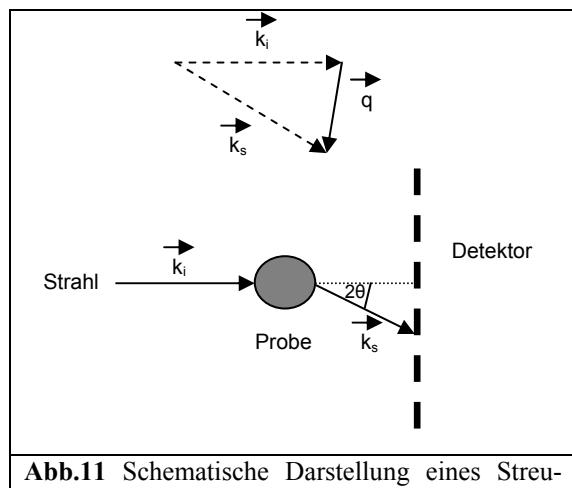


Abb.11 Schematische Darstellung eines Streu-Experimentes. Der Streuvektor q entspricht der Differenz zwischen Austritts- und einfallenden Strahls [Grossmann 2002]

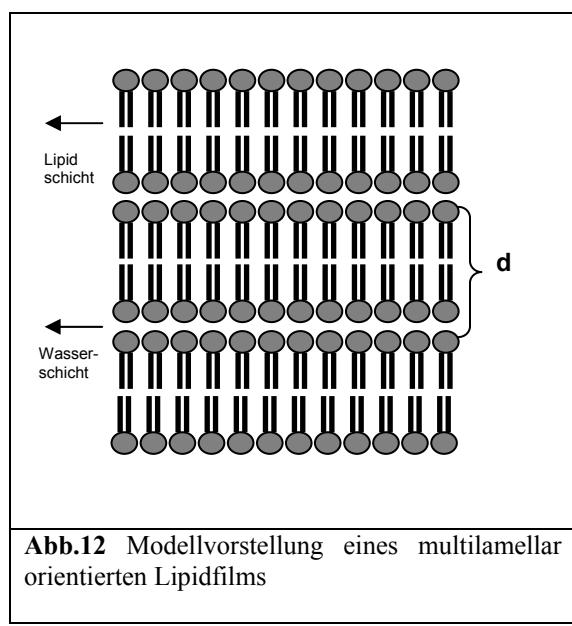


Abb.12 Modellvorstellung eines multilamellar orientierten Lipidfilms

d dargestellt. Der d -Wert entspricht der Summe der Dicke einer Lipid-Doppelschicht und der einer angrenzenden Wasserschicht.

Für die Ermittlung der Struktur aus den erhaltenen Beugungsbildern bildet das Bragg'sche Gesetz die mathematisch-physikalische Grundlage [Jenkins und Snyder 1996].

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Gleichung 4}$$

Dabei ist λ die Wellenlänge des monochromatischen Röntgen- oder Neutronenstrahls, mit dem die Probe bestrahlt wird, d der Abstand der Netzebenen, θ der Winkel, unter dem die Strahlung auf die Netzebene auftrifft und n eine ganze Zahl.

Nach dem Bragg'schen Gesetz kann der lamellare Wiederholabstand d einfach bestimmt werden. Aus einer gut orientierten Probe mit einer hohen Zahl an Diffraktionsordnungen kann man dann unter Durchführung einer Fourier Synthese das Streulängedichtheprofil berechnen:

$$\rho(x) - \rho_w = \frac{1}{D} F_0 + \frac{2}{D} \sum_{h=1}^{h_{\max}} \alpha_h F_h \cos\left(\frac{2\pi h x}{D}\right) \quad \text{Gleichung 5}$$

wobei ρ_w die Elektronen- oder Neutronenstreu länge des umgebenden Mediums, meist Wasser oder D₂O ist. Für verschiedene Diffraktionsordnungen $h > 0$ beschreibt α_h den Phasenfaktor, der für den Fall zentrosymmetrischer Bilayer nur die Werte +1 oder -1 annehmen kann. F_h ist der Form- bzw. Strukturfaktor. Dieser entspricht der statistischen Verteilung der Elektronen/ Neutronen innerhalb des Bilayers. Für eine homogene zentrosymmetrische Struktur wird der Formfaktor aus der Quadratwurzel der Intensität des Diffraktionspeaks berechnet:

$$F_h = \sqrt{C_h \cdot I_h} \quad \text{Gleichung 6}$$

(C_h = Lorentz' Faktor, I = Intensität, h = Diffraktionsordnung). Für eine orientierte Probe ist C_h der Diffraktionsordnung h nahezu proportional.

Der Formfaktor kann nur als absoluter Wert berechnet werden [Nagle und Tristram-Nagle 2000]. Dieses Problem ist darin begründet, dass die Intensitätsmessungen in Diffraktionsbildern nur die Amplitude, aber nicht die Phase (Vorzeichen) des Formfaktors angeben. Daher ist es nicht möglich, aus den berechneten Formfaktoren direkt durch Fourier Transformation ein Streulängedichtheprofil zu ermitteln. Dieses Phänomen ist generell bekannt als Phasenproblem der Röntgen- bzw. Neutronenstreuung [Michette 2002]. Es existieren nun Methoden, das Phasenproblem direkt oder indirekt zu lösen. Für die Neutronenstreuung gibt es eine günstige Methode zur Phasenbestimmung durch Ausnutzen der großen Differenz zwischen den Streulängen von Wasserstoff H und Deuterium D. Durch einfaches

Austauschen bzw. Mischen von H₂O und D₂O kann der Streukontrast zwischen verschiedenen Komponenten eingestellt werden. Ein stufenweiser H₂O/ D₂O Gradient erlaubt die direkte Beobachtung des Phasenwechsels bestimmter Reflexe [Schoenborn 1976, Zaccai et al. 1975]. Durch diese *Isotopen-Austausch-Methode*, bei der H₂O gegen D₂O ausgetauscht wird, werden die Strukturfaktoren geradzahliger Ordnung in linearer Abhängigkeit größer, aber die Strukturfaktoren ungeradzahliger Ordnung kleiner mit steigender D₂O-Konzentration [Frank und Lieb 1979]. Wenn also die gemessenen Strukturfaktoren dieser Regel folgend in Abhängigkeit vom D₂O-Gehalt aufgetragen werden, ergeben sich Geraden, deren Anstiege für die geradzahligen Ordnungen steigend, und für die ungeradzahligen fallend sind. Die Phasen (Vorzeichen der Strukturfaktoren) werden entsprechend dieser Regel bestimmt und die Neutronenstreulängedichteprofile können entsprechend Gleichung 5 berechnet werden.

Abschließend ist zu sagen, dass die Berechnung des Streulängedichteprofils einen neuen Ansatz in der Charakterisierung von *Stratum corneum* Lipid-Modellmembranen darstellt. In einer jüngeren Studie bestimmte McIntosh [2003] das Elektronenstreulängedichteprofil einer aus isolierten SC Lipiden bestehenden Membran auf Grundlage von Röntgendiffraktionsdaten. Das Problem der Phasenbestimmung wurde dabei durch Induzieren von Quellungsprozessen in Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenen Milieus gelöst.

Die Anwendung der Neutronenstreuung in Kombination mit der Isotopen-Austausch-Methode auf dem Gebiet der *Stratum corneum*-Forschung wurde erstmals in der Arbeit von Kiselev et al. [2005] beschrieben und war die grundlegende Auswertungsmethode für die entsprechenden Neutronendiffraktionsstudien in der vorliegenden Dissertationsschrift.

II.5.2. Neutronenstreustudien an *Stratum corneum* Lipid-Modellsystemen

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, stellt die Neutronenstreuung eine effektive Methode zur Charakterisierung von multilamellaren Membranen dar. Dieser hohe Nutzen begründet sich vor allem in der Möglichkeit, die innere Membranstruktur darstellen und analysieren zu können. Die Anwendung der dafür notwendigen Fourier Synthese ist nur möglich, da man das bereits erwähnte Phasenproblem durch den Austausch von H₂O gegen D₂O und der damit verbundenen Vorzeichenbestimmung der Strukturfaktoren lösen kann.

Neutronenstreuung an isoliertem tierischen oder humanen SC Material wurde bereits in den Arbeiten von Steriotis et al. [2002] und Bouwstra et al. [2004] angewendet. Letztere konnten anhand einer CER[EOS] enthaltenen Lipidmischung aus CER/ CHOL/ FFA die Existenz der SPP eindeutig nachweisen. Die Diffractionspeaks, die einer LPP zugeordnet werden sollten, waren allerdings kaum bis sehr schwach ausgeprägt. Während diese Untersuchungen bei einer

relativen Feuchte von 60% stattfanden, führten Steriotis et al. [2002] Quellungsexperimente an isolierten humanen oder porcinen SC Lipidgemischen durch. Das reversible Verschwinden der ersten Diffraktionsordnung bei Wasserüberschuss wurde dabei im Zusammenhang mit der Fähigkeit nativer Haut zur Regenerierung nach mechanisch/ physikalischem Stress (Bsp. Aufquellen der Haut im Wasser) diskutiert.

In der Arbeit von Kiselev et al. [2005] konnte dann erstmals ein aus definierten, synthetischen Lipiden bestehendes *Stratum corneum* Modellsystem, präpariert als multilamellare Membran auf einer Quarzoberfläche, charakterisiert werden.

Das quaternäre System CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% w/w) wurde bei 32°C, 60% relativer Feuchtigkeit und bei drei verschiedenen D₂O/ H₂O Verhältnissen vermessen (D₂O/ H₂O 8/ 92; 20/ 80; 50/ 50 (m/m)).

Aus den fünf abstandsgleichen Diffraktionsreflexen wurde ein lamellarer Wiederholabstand von 45,68 Å (= 4,568 nm) ermittelt. Die Auflösungsgrenze konnte als 5.5 Å berechnet werden und erlaubte die Anwendung des Modells für die interne Membranstruktur mit unterteilten hydrophilen und hydrophoben Bereichen, in denen sich verschiedene molekulare Gruppen im Abstand von ≈ 6 Å anordnen. Günstigerweise muss auch die geringe Absorption von Neutronen durch Lipide und Wasser nicht bei der Auswertung der Streuintensität berücksichtigt werden, wie anhand der Berechnung des linearen Absorptionskoeffizienten für das quaternäre System gezeigt wurde.

Aus der integrierten Peakintensität erfolgte dann die Berechnung des absoluten Wertes der Strukturfaktoren. Deren Vorzeichen ergab sich aus dem Anstieg der Strukturfaktorabhängigkeit vom D₂O-Gehalt, wie in Worcester [1976] und Frank und Lieb [1979] beschrieben. Das berechnete Neutronenstreulängedichtheprofil (*Fourier Profil*) beschreibt den Verlauf einer einzelnen lamellaren Wiederholeinheit, bestehend aus einer Lipid- und einer Wasserschicht (Abb.13). Dabei entsprechen die Maxima an den Seiten den polaren Kopfgruppen der Lipide, da Heteroatome in der Regel positive Streulängen haben. Das Minimum in der Membranmitte ergibt sich aus der negativen Streulänge der Wasserstoffatome in den Methylgruppen, die sich im hydrophoben, inneren Membranbereich befinden.

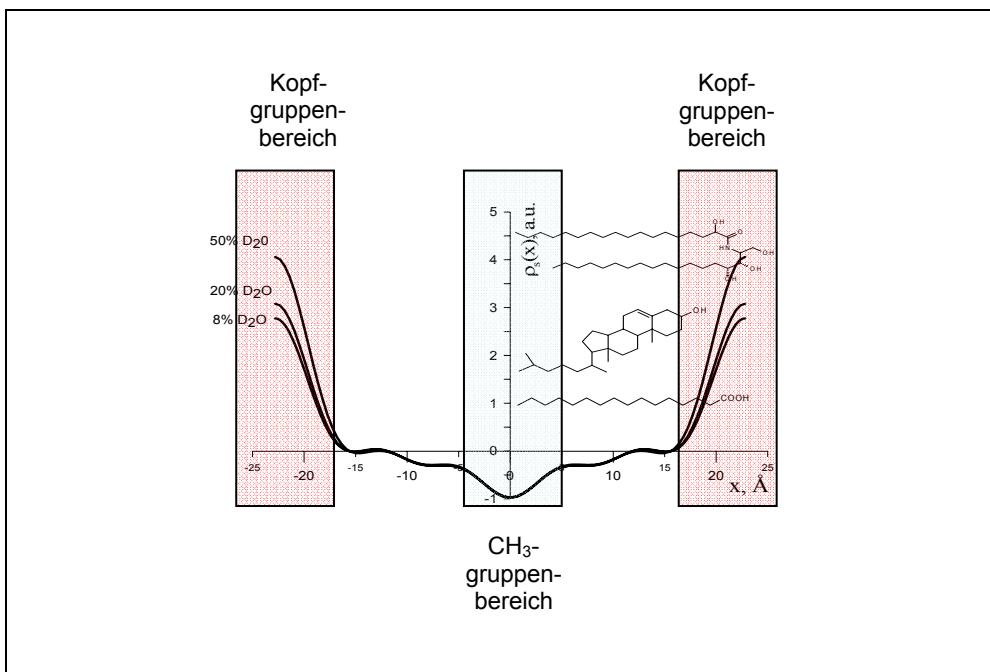


Abb.13 Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS Membran bei 60% r.H., T=32°C und bei drei verschiedenen D_2O -Konz. [veröffentlicht in Kiselev et al. 2005].

Zur Illustration sind die charakteristischen Membranbereiche hervorgehoben und die Lokalisierung der Moleküle eingefügt.

Für eine bessere Interpretation erfolgte der Vergleich mit dem Neutronenstreulängedichteprofil einer *Dipalmitoyl-phosphatidylcholin*-(DMPC)-Membran, gemessen unter den gleichen Bedingungen (Abb.14). Phospholipid-Membranen in Neutronenstreustudien sind in der Literatur sehr gut beschrieben und stellen ein gutes Hilfsmittel für die Analyse der SC Membran dar [Worcester 1976, Frank und Lieb 1979, Gordeliy und Kiselev 1995, Nagle und Tristram-Nagle, 2000].

Das Membranprofil von DMPC beginnt in der Mitte einer Wasserschicht, verläuft über den hydrophilen Membranbereich (Kopfgruppen-Maximum), durch die Membranmitte (Minimum) und über das zweite Maximum der polaren Kopfgruppenbereiche bis in die angrenzende Wasserschicht.

Das Membranprofil der SC Lipidmischung beginnt sofort mit dem den Kopfgruppen zugeordneten Maximum, was darauf hindeutet, dass dieses direkt benachbart ist zu den Kopfgruppen der angrenzenden Schicht.

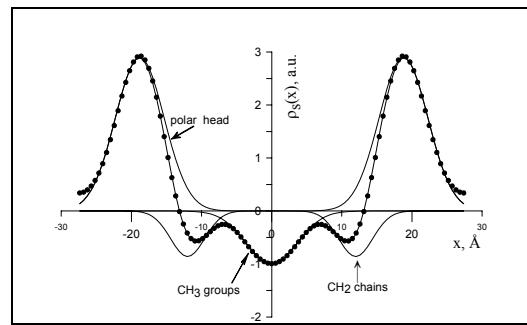


Abb. 14 Neutronenstreulängedichteprofil einer DMPC-Membran (60% r.H., T=32°C, 8% D_2O), aus [Kiselev et al. 2005]

Aufgrund dieses Unterschiedes konnte als ein wichtiges Ergebnis für das quaternäre System das Fehlen einer Wasserschicht zwischen zwei Lipidlayern bei 60% relativer Feuchte beschrieben werden. Dieses Ergebnis wurde durch die gleichen Werte für den lamellaren Wiederholabstand d und für den Abstand zwischen den zu den Kopfgruppen gehörenden Maxima d_{ph} untermauert.

Die innere Membranstruktur der quaternären Mischung wurde dadurch bestimmt, dass das Fourier-Profil mit vier Gauß-Funktionen gefittet wurde, entsprechend der Weite und Position der polaren Kopfgruppen, den Bereichen der Cholesterolmoleküle, der Kohlenwasserstoffketten und der Methylgruppen.

$$\rho_{fit}(x) = \rho_{CH_3}(x) + \rho_{CH_2}^{sym}(x) + \rho_{CHOL}^{sym}(x) + \rho_{PH}^{sym}(x) \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Funktion $\rho_{CHOL}^{sym}(x)$ wurde angewendet, um Aussagen über die Position des wichtigen Membranbestandteils Cholesterol machen zu können. Messungen am quaternären SC System unter Variation des Cholesterolgehalts hatten gezeigt, dass ein geringerer CHOL-Anteil zu einer Vergrößerung des Wiederholabstandes führt.

	SC Lipid Mischung CER/AP/ CHOL/ PA/ ChS (%w/w)	Lamellarer Wiederholabstand d (Å)	
↓	44/ 40/ 12/ 4	43,9	↑
55/ 25/ 15/ 5	45,63		
66/ 10/ 18/ 6	46,1		

Tab.2 Einfluss des Cholesterolgehaltes auf den lamellaren Wiederholabstand d

Ferner hatte ein variierender Cholesterol-Anteil Einfluss auf die Membrändicke (d_m), die Dicke des Kopfgruppenbereiches (d_{PH}) und die Dicke des Alkylkettenbereiches. So konnte eine Vergrößerung der Alkylkettenenschicht von 12,55 Å (25% CHOL) auf 13,83 Å (10% CHOL) festgestellt werden, die in Zusammenhang mit einer größeren Ausdehnung der Alkylketten bei herabgesetzter CHOL-Menge diskutiert wurde. Diese Erkenntnis unterstützt die Vermutung, dass Cholesterol die Rigidität der Alkylketten vor dem Haupt-Phasenübergang herabsetzt [Chapman und Penkett 1966].

Bezüglich der Lokalisation des Cholesterols in der Membran wurde das Maximum bei 12,8 Å dem Molekülbereich zwischen den Ringen A und B des Steroidgerüstes zugeordnet, da dort die geringste Dichte an Wasserstoffatomen mit einer negativen Streulänge herrscht. Diese geringe Dichte führt zur Ausprägung eines Maximums im Membranprofil. Weiterführende Untersuchungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt und diskutiert.

Als ein weiterer Membranparameter, der aus der inneren Membranstruktur abgeleitet werden konnte, wurde die Eindringtiefe von Wasser (*HH-Boundary*) berechnet. Dem Profil (Abb.13)

ist zu entnehmen, dass die Streulängendichte an der Membranoberfläche mit steigendem D₂O-Gehalt im umgebenden Milieu zunimmt. Dieser Anstieg wird deutlich in der hydrophilen Membranregion und korrespondiert zur berechneten Wasserverteilungsfunktion [Kiselev et al. 2004]. Letztere ergibt sich aus der Differenz der Streulängendichtheprofile bei 50% D₂O und 8% D₂O (Abb.15). In dem Zusammenhang ist anzumerken, dass eine 8% D₂O-Lösung die Streulänge Null hat. Das Wasser ist also „unsichtbar“ und nur die Membran wird detektiert. Trotz der geringen intermembranären Hydratation ist die Wasserpenetration in die SC Lipidmembran vergleichbar mit der in eine Phospholipid-Membran [Armen et al. 1998, Nagle und Tristram-Nagle 2000].

Des Weiteren wurde auch der Einfluss der

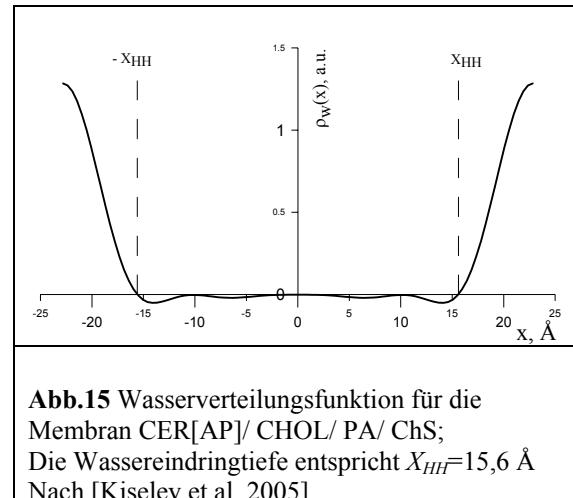


Abb.15 Wasserverteilungsfunktion für die Membran CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS; Die Wassereindringtiefe entspricht $X_{HH}=15,6 \text{ \AA}$
Nach [Kiselev et al. 2005]

Feuchtigkeit auf die Membranstruktur gemessen. Bei 99% Feuchtigkeit war ein Anstieg des lamellaren Wiederholabstandes von 45,68 Å auf 46,13 Å zu verzeichnen. Untersuchungen im Wasserüberschuss ergaben einen d -Wert= 46,45 Å und die Zahl der Diffraktionsordnungen verringerte sich von 5 auf 3.

Durch Auswertung des Streulängedichtheprofils und der assoziierten Parameter ergaben sich im Vergleich zu den Phospholipid-Membranen folgende Resultate:

- i). Für das quaternäre System konnte nur ein geringer Einfluss der relativen Feuchte auf den d -Wert festgestellt werden.
- ii). Die geringe Hydratation des intermembranären Raums ist ein wesentlicher Unterschied zu Phospholipid-Membranen.
- iii). Ein weiterer Unterschied ist die geringe Weite des Kopfgruppenbereiches, begründet in dem geringen Umfang der Kopfgruppe von Ceramiden, Cholesterin und FFA im Verhältnis zu dem von Phospholipiden.
- iv). Aus der Wasserverteilungsfunktion ließ sich ableiten, dass Wassermoleküle 3,8 Å tief bis in die Region der Alkylketten hinein penetrieren. Dieses Verhalten entspricht dem der Phospholipide.
- v). In kinetischen Experimenten konnte die im Vergleich zu Phospholipiden äußerst langsame Diffusion von Wasser durch die Membran beobachtet werden.

Auf molekularer Ebene wurden diese Erkenntnisse mittels der Arbeit von Raudenkob et al. [2005] über DL-CER[AP] folgendermaßen diskutiert. Von den dort beschriebenen (siehe II.3) drei Konformationen des CER[AP] erfüllen nur zwei (*hairpin-* und *ful extended* Konformation) die Anforderungen der beobachteten 45,63 Å Wiederholabstand des quaternären Systems. Es wird postuliert, dass bei 60% relativer Feuchtigkeit ein bestimmter

Anteil an CER[AP] in *ful extended* Konformation vorliegt und sich symmetrisch zwischen zwei Bilayern anordnet. Die polare Kopfgruppe befindet sich im hydrophilen Membranbereich und die zwei entgegengesetzt gerichteten Alkylketten ragen jeweils in eine Lipidschicht. Das Ceramid bildet somit eine Brücke zwischen zwei Schichten. Diese Anordnung ist möglich, da die geringe Wasserschicht keine energetische Barriere bei der Penetration der Alkylketten in die angrenzenden Layer darstellt. Anzumerken ist auch, dass die postulierte Anordnung beider Konformationen in der Membran nicht dem berechneten Membranprofil widersprechen.

Die Kopfgruppenbereiche benachbarter Lipidschichten liegen demnach sehr eng beieinander und es entsteht ein „Kopfgruppen-Adhäsionseffekt“. Dieser bedingt einen extrem dicht gepackten Lipidverband, der z.Bsp. die Diffusion von Wasser maßgeblich behindert. Zusammenfassend konnte in der Arbeit von Kiselev et al. [2005] gezeigt werden, dass synthetische SC Lipid-Modellmembranen auf einer Quarzoberfläche, untersucht mit Neutronenstreuung, eine neue Möglichkeit bieten, die innere Membranstruktur und deren Beeinflussung durch innere (Lipidzusammensetzung) und äußere (Temperatur, Feuchtigkeit etc.) Faktoren zu untersuchen. Die Berechnung des Neutronenstreuulängedichtheitsprofils und zahlreicher daraus abgeleiteter Membranparameter erlauben es, sowohl qualitative als auch quantitative Struktureinflüsse zu charakterisieren. Zukünftig einen weiteren Vorteil dürfte der Einsatz speziell deuterierter Lipide darstellen, da aufgrund der unterschiedlichen Streulängen von Wasserstoff und Deuterium durch den gezielten Einbau von schwerem Wasserstoff in das Lipid genauere Aussagen über dessen Anordnung in der Probe gewonnen werden können.

II.5.3. Postulation des armature reinforcement Modells

Die auf Grundlage der Neutronenstreudaten gewonnenen Einblicke in die Struktur der SC Lipid-Modellmatrix tragen auch zur Diskussion über die Organisation der Lipidmatrix selbst bzw. über darüber bestehende Modellvorstellungen bei. So hätte der beschriebene „Kopfgruppen-Adhäsionseffekt“ weitreichenden Einfluss auf die Interpretation des *Sandwich-Modells* [Bouwstra et al. 2000] mit dem charakteristischen trilamellaren (50 Å -30 Å -50 Å) Wiederholabstand (*LPP*). Demnach zeigen Kiselevs Ergebnisse, dass diese Anordnung auch in Abwesenheit von Wasser möglich ist, und dass so auch günstigere Bedingungen für die Penetration des CER[EOS] innerhalb der LPP bestehen würden.

Dennoch haben alle bekannten theoretischen Modelle über die SC Lipidorganisation den Nachteil, dass sie nicht die strukturellen Änderungen der Lipidmatrix bei Wasserüberschuss erklären können. So wurde von Kiselev [2005, 2007] aufgrund dieser Diskrepanz und

basierend auf den neuen Einblicken in die SC Lipid-Modellmatrix ein unabhängiges Modell postuliert, das *armature reinforcement* Modell.

Es begründet sich auf der *ful extended*-Konformation des CER[AP] und erklärt das Phänomen des Übergangs in die *hairpin*-Konformation (*chain-flip-transition*) bezogen auf folgende experimentelle Fakten: a). das Verschwinden der ersten Diffraktionsordnung bei gleichzeitiger Stabilität der zweiten Ordnung unter Arbeit in Wasserüberschuss an isolierten porcinen SC Lipiden und b). der Wechsel der LPP zu SPP in Wasserüberschuss bei aus menschlichen Gewebe isolierten SC Lipiden.

Die Hauptmerkmale des *armature reinforcement* Modells sind in Abb.16 dargestellt.

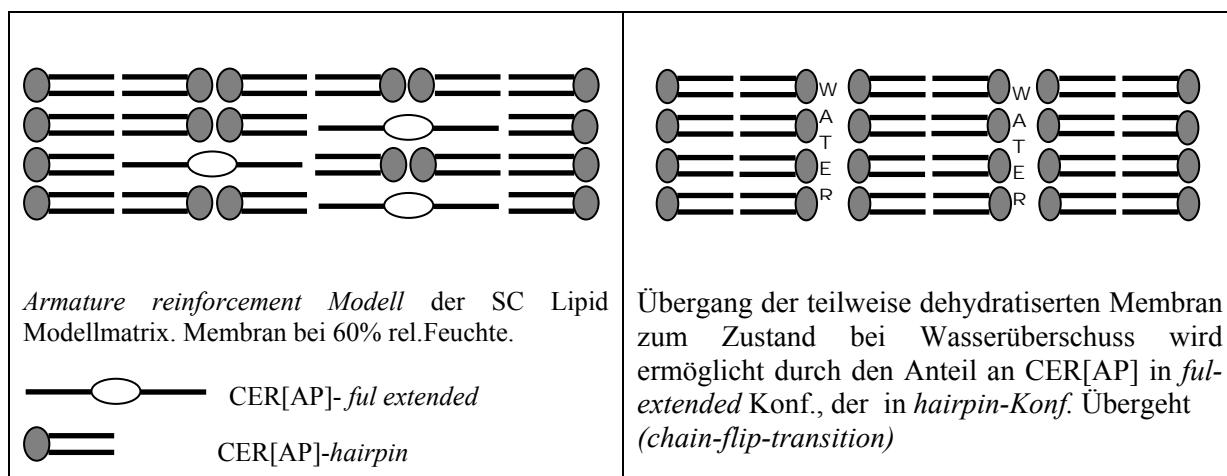


Abb.16 *Armature reinforcement* Modell nach Kiselev [2007] über die Struktur der SC Lipid-Modellmatrix

Der enge Kontakt zwischen zwei benachbarten Lipidschichten wird hergestellt durch CER[AP] in *ful extended* Konformation. Es fungiert als „Brücke“, deren Ausbildung aber nur aufgrund der geringen intermembranären Hydratation möglich ist. Im Wasserüberschuss wird der intermembranäre Raum größer, die vorher in *ful-extended* Konformation vorliegenden Ceramide gehen in die *hairpin*-Konformation über und der enge Kontakt zwischen den Layern verschwindet.

Dieses Modell basiert im Moment nur auf einer relativ geringen Datenmenge und muss durch weitere Untersuchungen an modifizierten SC Lipidsystemen verifiziert und weiterentwickelt werden.

II.6. Weitere Methoden zur Charakterisierung des physikochemischen Verhaltens der Ceramide als wichtige Stratum corneum Lipide

Für die Struktur der interzellulären Lipidsubstanz des *Stratum corneum*, im wesentlichen aufgebaut aus Ceramiden, Cholesterin und freien Fettsäuren, wird das Vorliegen flüssigkristalliner Strukturen diskutiert. Im folgenden Kapitel werden daher die Voraussetzungen zur Bildung flüssigkristalliner Strukturen, deren physikochemisches Verhalten und Methoden zur Charakterisierung erläutert.

II.6.1. Lyotrope flüssigkristalline Zustände

Bildung lyotroper Mesphasen

Bezüglich des festen kristallinen und des flüssigen isotropen Zustands nehmen Flüssigkristalle eine Mittelstellung ein, woraus auch die Bezeichnung Mesophase resultiert. Verglichen mit dem kristallinen Zustand weisen die Einzelmoleküle eine stärkere Beweglichkeit auf, die sich in einer bestimmten Fließfähigkeit des Systems bemerkbar macht. Im Vergleich zu einer Flüssigkeit besitzt der flüssigkristalline Zustand eine höhere Ordnung, die sich auch in der Anisotropie (Richtungsabhängigkeit) physikalischer Eigenschaften manifestiert. Betrachtet man die Position und Orientierung der einzelnen Moleküle in einem Flüssigkristall zueinander, so besitzen diese eine Ordnung im Fernbereich, aber keine, wie bei Kristallen zu findende, definierte Ordnung im Nahbereich. [Small 1986]

Im Gegensatz zu den thermotropen Mesphasen, die sich in Abhängigkeit von der Temperatur ausbilden können, wird die Bildung lyotroper Mesphasen durch ein Lösungsmittel induziert, wobei lyotrope Mesphasen zusätzlich auch temperaturabhängige Phasenübergänge zeigen können [Brown und Crooker 1983].

Für die Ausbildung lyotroper Mesphasen ist im Allgemeinen eine anisometrische Molekülstruktur mit polaren und unpolaren Molekülteilen, meist in Form einer hydrophilen Kopfgruppe und eines lipophilen Alkylrest, notwendig. Demnach sind Lipide zur Bildung lyotroper Mesphasen befähigt. Es können dabei unterschiedliche flüssigkristalline Zustände resultieren, die entsprechend der Periodizität in der Fernordnung in die lamellare, hexagonale oder kubische Phase unterteilt werden [Bauer, Frömming, Führer 2002]

i). Der **lamellare** Zustand ist durch eine Periodizität entlang einer Achse gegeben und repräsentiert somit ein eindimensionales flüssigkristallines Gitter. Die Lamellarstruktur ist gekennzeichnet durch einen geschichteten, palisadenartigen Aufbau aus Moleküldoppelschichten, wobei innerhalb einer Doppelschicht jeweils die polaren Kopfgruppen und die hydrophoben Bereiche zueinander ausgerichtet sind. Dadurch entsteht ein Schichtgitter mit

alternierenden polaren und unpolaren Ebenen, die unter Quellung hydrophile bzw. hydrophobe Stoffe einlagern können.

ii). Der **hexagonale** Zustand besitzt eine zweidimensionale Periodizität. Die hexagonale Phase ist durch das Auftreten von langgestreckten, röhrenförmigen Assoziaten, die in einer sechseckigen Anordnung gepackt sind, gekennzeichnet. Im wässrigen Milieu sind die hydrophilen Gruppen des Mesogens nach außen, im unpolaren Milieu hingegen nach innen gerichtet (inverse Hexagonalphase H_{II}). Lipophile und hydrophile Stoffe können nur in begrenztem Maße inkorporiert werden.

iii). Die **kubische** Phase ist durch eine dreidimensionale Periodizität gekennzeichnet und besteht aus dicht gepackten, runden bis ellipsoiden Mizellen bzw. inversen Mizellen (*invers kubische Phase*). Die kubisch flüssigkristallinen Zustände sind optisch isotrop. Aufgrund des dreidimensionalen regelmäßigen Aufbaus zeigen derartige Mischungen mechanisch-akustische Resonanzerscheinungen, die zur Bezeichnung „ringing gels“ bzw. Brummgele führten.

Langketige Lipide zeigen meist schon im nicht hydratisierten, kristallinen Zustand eine lamellare Überstruktur, die sich durch Charakterisierung des Zustandes der Kohlenwasserstoffketten weiter spezifizieren lassen. Alkylketten können im Allgemeinen in einer *trans*- oder *gauche*-Konformation vorliegen, wobei die letztere energetisch ungünstiger ist.

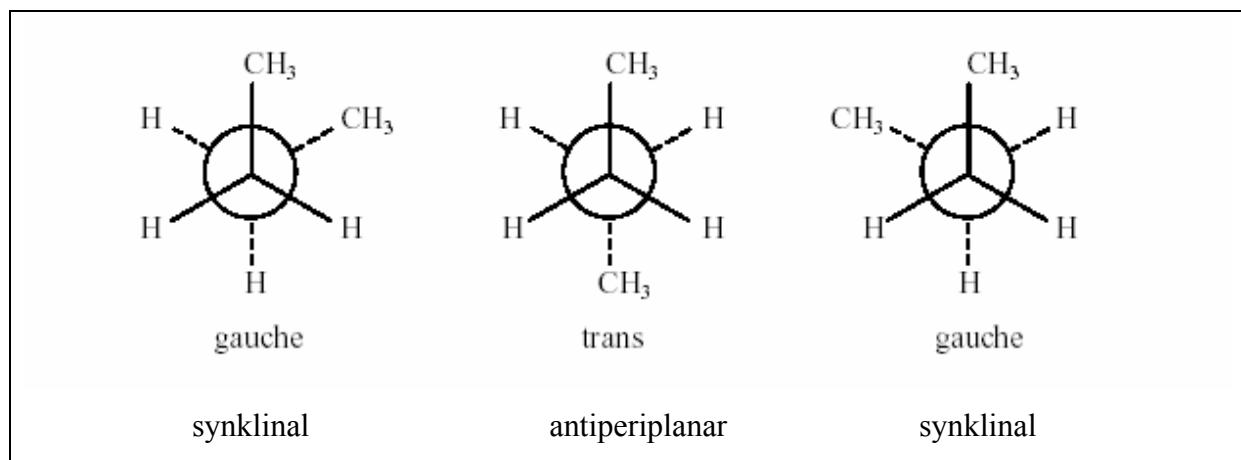


Abb. 17 *Trans-* und *gauche*-Konformation der Alkylketten

Während in der lamellaren flüssigkristallinen Phase (L_α) die Kohlenstoffketten nicht durchgängig in der *trans*-Konformation vorliegen, sind sie in der lamellaren Gel-Phase (L_β) all-*trans* ständig, wodurch eine dichtere Packung und eine höhere Ordnung ermöglicht wird. Wenn die Ketten nicht senkrecht zur Lamellarebene, sondern geneigt angeordnet sind, so wird diese Phase als L_β' bezeichnet. Dieser Zustand resultiert aus einem erhöhten Flächenbedarf

der polaren Kopfgruppe gegenüber meist gesättigten Kohlenwasserstoffketten und führt ebenfalls zu einer höheren Packungsdichte. Zusammengefasst sind die Alkylketten in der L_α -Phase sehr viel beweglicher als in der L_β -und der $L_{\beta'}$ -Phase, so dass im Gegensatz zu den Gel-Phasen nur eine Fernordnung vorliegt.

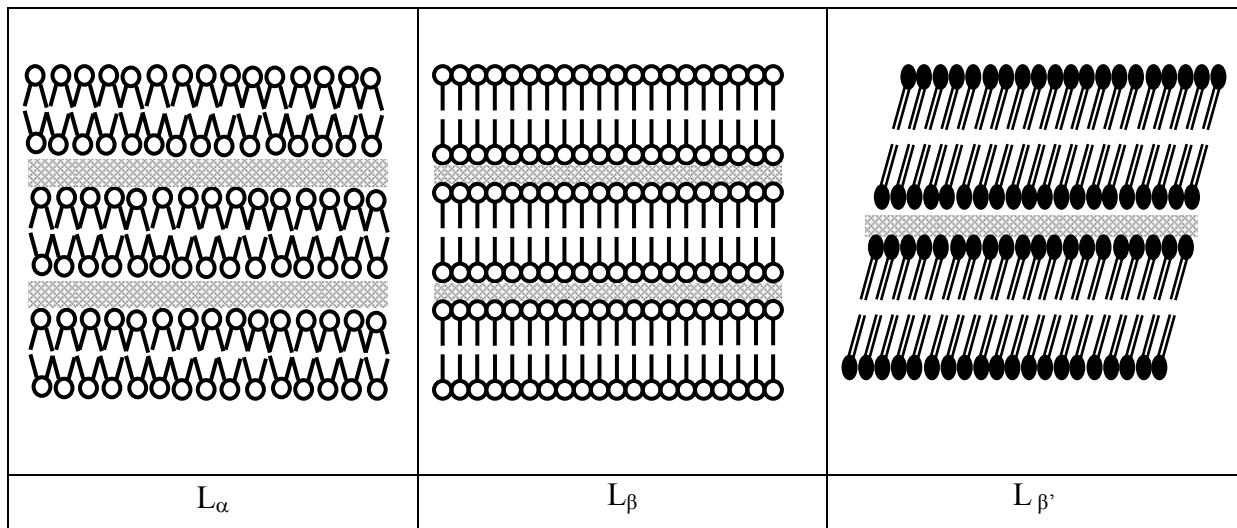


Abb.17a Lamellarphasen

II.6.2. Grundlagen der zur Charakterisierung eingesetzter Methoden

II.6.2.1. Röntgenbeugung

Grundlage dieser Messmethode ist die Beugung von Röntgenstrahlen beim Durchdringen eines Systems mit geordneten Strukturen (Abb.18). Dabei kommt es zu einer Intensitätsverstärkung zwischen zwei Strahlen mit gleichem Einfallswinkel θ , wenn diese, nach Reflexion an zwei parallelen Ebenen mit dem Abstand d , in Phase schwingen und ihr Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ beträgt.

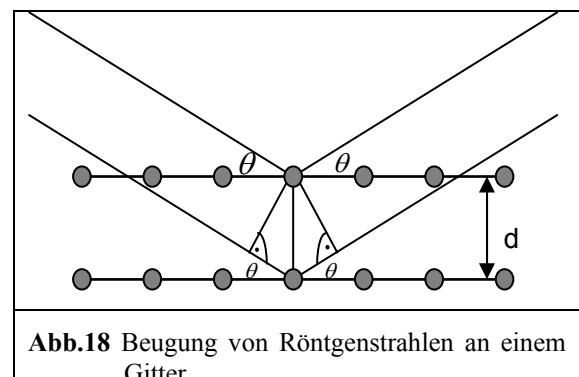


Abb.18 Beugung von Röntgenstrahlen an einem Gitter

Durch die Bragg'sche Reflexionsgleichung

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad \text{Gleichung 4}$$

(n = Ordnung der Reflexion)

lässt sich die Intensitätsverstärkung beschreiben.

Durch die auftretenden charakteristischen Interferenzfolgen sind zum einen die Zuordnung zu bestimmten Mesophasen und zum anderen die Berechnung der Abstände zwischen den Molekülen bzw. Molekülebenen möglich. Die Röntgenmessungen können entweder im Kleinwinkelbereich (Beugungswinkel $\theta < 2^\circ$) oder im Weitwinkelbereich (Beugungswinkel $\theta = 2\text{--}50^\circ$) durchgeführt werden. Die Zuordnung zu den entsprechenden flüssigkristallinen Systemen erfolgt durch die auftretenden Interferenzfolgen im Kleinwinkelbereich, die verschiedene periodische Abstände aufweisen können. Bei lamellaren Phasen verhalten sich die Beugungsmaxima verschiedener Ordnungen wie $1 : 1/2 : 1/3 : 1/4 : 1/5$, bei Hexagonalphasen $1 : 1/\sqrt{3} : 1/\sqrt{4} : 1/\sqrt{7} : 1/\sqrt{12}$ [Luzatti et al. 1960]. Für die kubische Phase existieren mehrere Möglichkeiten für die Interferenzfolgen aufgrund der unterschiedlichen Strukturvorstellungen. Aus dem ersten Maximum lässt sich nach Bragg zusätzlich der Netzebenenabstand d der jeweiligen flüssigkristallinen Phase im Bereich der Nahordnung und bei Hexagonalphasen zusätzlich der Röhrendurchmesser $a = (2/\sqrt{3}) \cdot d$ der entsprechenden Mesophase ermitteln.

Durch Messungen im Weitwinkelbereich (Beugungswinkel $\theta > 2^\circ$) werden d -Werte im Bereich der Nahordnung erfasst. Darüber hinaus kann ein Verlust der Nahordnung anhand des Fehlens von Interferenzen bzw. eine Veränderung des Interferenzmusters gegenüber dem kristallinen Zustand überprüft werden.

II.6.2.2. IR- und Raman-Spektroskopie

Die Infrarot (IR)-Spektroskopie und die Raman-Spektroskopie sind Methoden zur Aufnahme von Schwingungsspektren. Die Spektren beider Methoden ergänzen sich gegenseitig zu einem angemessenen Bild über die molekulare Struktur einer Substanz [Wartewig und Neubert 2002].

Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung des infraroten Spektralbereichs (Wellenlängenbereich $\lambda = 0,8\text{--}50\ \mu\text{m}$) werden in Molekülen mechanische Schwingungen der Atome angeregt, die symmetrisch oder antisymmetrisch sein können. Diese Molekülschwingungen können entweder in Richtung der Bindungsachse zweier Atome oder Molekülteile (*Valenz- oder Stretschwingungen*) oder unter Deformation des Bindungswinkels (*Deformations- oder Biegeschwingungen*) erfolgen. Dabei ist eine Schwingung nur dann IR-aktiv, wenn mit dem Schwingungsvorgang eine Änderung des Dipolmoments verbunden ist. Da die Molekülschwingungen bestimmter Atomgruppen, vor allem funktioneller Gruppen, besonders charakteristisch sind, eignet sich die Methode daher zur Identifizierung von Substanzen.

In der *Raman-Spektroskopie* werden ebenfalls Molekülschwingungen angeregt und charakteristische Raman-Banden, vor allem von unpolaren oder wenig polaren Gruppen, registriert. Es lassen sich die von C-C –Schwingungen herrührenden Gerüstschwingungen von Molekülteilen besser zuordnen und der Vorteil der Raman-Spektroskopie liegt darin, dass oftmals IR-inaktive Gruppen Raman-aktiv und umgekehrt sind. Das schwingende Molekül kann allerdings nur dann Raman-Strahlung emittieren, wenn es einen oszillierenden Dipol darstellt und Strahlung der eigenen Schwingungsfrequenz abgibt. Nur wenn sich die *Polarisierbarkeit des Moleküls* (Deformierbarkeit der Elektronenhülle des Moleküls) während der Molekülschwingung ändert, kann der Raman-Effekt beobachtet werden.

Unter *Raman-Effekt* versteht man dabei die nach dem indischen Physiker C. V. Raman benannte physikalische Erscheinung von Streuung des Lichtes unter Änderung der Wellenzahl,

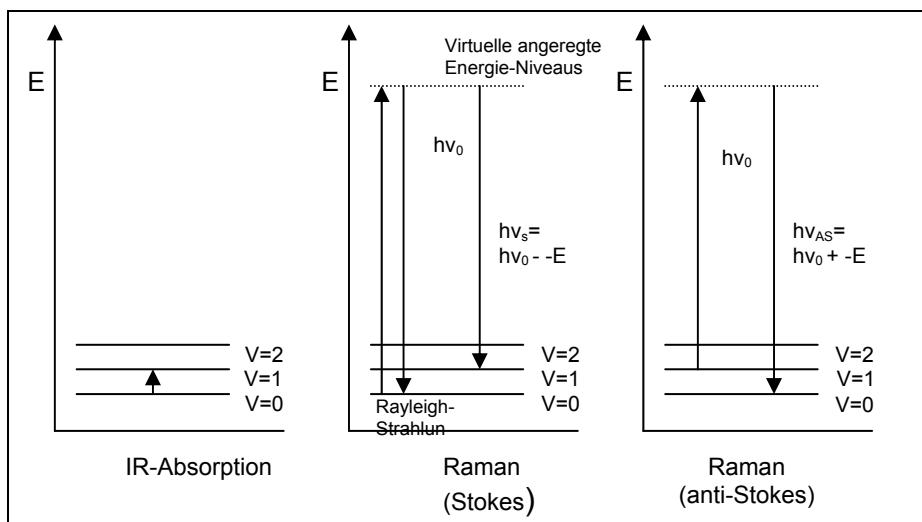


Abb. 19 Wechselwirkungen von monochromatischer Strahlung mit Molekülen

wenn monochromatisches Licht in eine Lösung strahlt. Analysiert man die Raman-Streustrahlung mittels eines Prismas, so stellt man fest, dass sie sich in Linien bestimmter Wellenlängen zerlegen lässt (*Stokessche Linien*) (Abb.19). Im Vergleich zur Wellenlänge des Anregungslichtes, haben diese Raman-Linien fast ausschließlich kleinere Wellenzahlen. Es werden also analog zur IR-Spektroskopie Molekülschwingungen angeregt, wobei der Verlauf der Anregung ein anderer ist. Einige Lichtquanten der monochromatischen Anregungsstrahlung geben einen Teil ihrer Energie an die Probenmoleküle zur Anregung von Molekülschwingungen ab. Diese nun energieärmeren Lichtquanten werden als Raman-Streustrahlung emittiert und ihre Wellenzahl gemessen. Die Wellenzahldifferenz zwischen den emittierten Raman-Linien und der eingestrahlten Anregungsstrahlung entspricht der zur

Schwingungsanregung notwendigen Energie, die im Raman-Spektrum registriert und den angeregten Molekülschwingungen zugeordnet wird.

Die Raman-Spektroskopie ist eine nützliche Methode, um apolare Atomgruppen in der Strukturaufklärung zu identifizieren. Im Gegensatz zur IR-Spektroskopie, bei der Wasser durch seine starke Absorption störend wirkt, lassen sich aufgrund der niedrigen Ramanstreuung des Wassers auch Proben mit hohem Wassergehalt gut charakterisieren. Zudem können die Proben in Glasgefäßen vermessen werden, da Glas für Anregungs- und Streustrahlung durchlässig ist, so dass sich auch eine einfache Probenvorbereitung ergibt.

Vorteilhaft in der IR-Spektroskopie ist der Informationsgewinn über die Kopfgruppen von Lipiden, die z.Bsp. die intensitätsstarken Streck-und Deformationsschwingungsbanden der Carbonylgruppen und die Stretschwingsungen der Hydroxylgruppen liefern. Anhand dieser Banden können Wasserbrückenbindungen und konformative Änderungen an polaren Atombindungen spektroskopisch verfolgt werden.

Das Schwingungsverhalten von Molekülen untersteht dem Einfluss verschiedener Faktoren. Vereinfacht kann eine Molekülschwingung von zwei Atomen als klassischer harmonischer Oszillatator betrachtet werden, der aus zwei Massen m_1 und m_2 besteht, die durch eine mechanische Feder mit der Kraftkonstante k verbunden ist. Die Schwingungsfrequenz ν dieses Oszillators ist

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad m = \frac{m_1 * m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{Gleichung 9}$$

Da, wie aus der Gleichung ersichtlich, die Schwingungsfrequenz ν von den Massen der Atome abhängt, kann sie durch den Austausch von Atomen gegen Isotope gezielt beeinflusst werden. So führt der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium zu starken Änderungen im Schwingungsverhalten und der deuterierte Strukturteil kann separat von dem nichtdeuterierten im Spektrum verfolgt werden.

Weiterhin wird das Schwingungsverhalten aber auch durch intermolekulare Wechselwirkungen beeinflusst, wie es sich zum Beispiel bei den intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zeigt. Dabei kommt es zu einer langwelligen Verschiebung der OH- und der CO-Valenzschwingungen und einer Verbreiterung der Deformationsschwingungen.

Wie bereits beschrieben stellt die Raman-Spektroskopie eine geeignete Methode dar, um lange Alkylketten enthaltende Verbindungen zu charakterisieren (Tab.3).

Es lassen sich dabei u.a. bei Wellenzahlen $< 400 \text{ cm}^{-1}$ lokalisierte Kristallgitterschwingungen bestimmen. Bei diesen longitudinalen akustischen Moden (LAM) schwingt das gesamte Molekül über die gestreckte, *all-trans*-konformierte Alkylkette.

Generell zeichnen sich die langen Kohlenwasserstoffketten im festen Zustand durch eine transplanare Struktur (*all-trans*) aus, wobei neben dieser hoch geordneten zick-zack-Anordnung auch geringe Anteile mit konformativen Störungen (*gauche* Konformere) existieren. Da die Atomgruppen der *gauche*-Sequenzen enthaltenden Kohlenwasserstoffketten ein anderes Schwingungsverhalten als Alkylketten in *all-trans*-Konformation aufweisen, zieht man zur Auswertung der Raman-Spektren verschiedene konformationsempfindliche Banden heran, um den Anteil an *gauche*-Konformeren (G) neben den *trans*-Konformeren (T) zu bestimmen.

Bandenposition in cm ⁻¹	Zuordnung	Sensitivität
<300	Longitudinal akustische Mode (LAM)	Auftreten zeigt die <i>all-trans</i> Konformation der Alkylketten an
890-895	CH₃ Rocking Mode	Scharfe Bande indiziert Kettenende in <i>all-trans</i> Konformation (ttt)
1060-1065	v_{as}CC (antisymmetrische C-C-Gerüstschwingung)	Scharfe Bande indiziert Ketten mit drei oder mehr <i>trans</i> Konformeren hintereinander
1090-1130	v_sCC (symmetrische C-C-Gerüstschwingung)	Scharfe Bande indiziert Ketten mit drei oder mehr <i>trans</i> Konformeren hintereinander
1420-1460	CH ₂ -Scherschwingung (CH₂ scissoring)	Aufspaltung in drei Banden indiziert orthorombisches Kettenpacken; Aufspaltung in zwei Banden indiziert hexagonales Kettenpacken
1628, 1654	v (C=O) Amid I	
2842-2854	v_sCH₂ (symmetrische CH ₂ -Valenzschwingung)	Position gibt qualitativ Aussagen über Ordnungsgrad der Alkylketten
2880-2885	v_{as}CH₂ (antisymmetrische CH ₂ -Valenzschwingung)	Position gibt qualitativ Aussagen über Ordnungsgrad der Alkylketten. Scharfe Bande indiziert Ketten mit drei oder mehr <i>trans</i> Konformeren in Reihe

Tab.3 Zuordnung der wichtigsten Raman-Banden und deren Position bei Raumtemperatur gemäß Literaturangaben [Snyder et al. 1978; Kirchhoff und Levin 1987; Mendelsohn und Moore 1998]

Im Bereich von 2800 bis 3000 cm⁻¹ treten die symmetrischen und die antisymmetrischen CH₂-Valenzschwingungen auf, deren Bandenposition und Intensitätsverhältnisse zur Auswertung des G/T-Verhältnisses genutzt werden. Phasenumwandlungen, die mit Änderungen im G/T-Verhältnis verbunden sind, können durch sprunghafte Änderungen der konformationsempfindlichen Parameter erkannt werden.

Zwischen 850 und 900 cm⁻¹ tritt die CH₃- *rocking* Schwingung auf, die von Kettenend-Bewegungen der Alkylkette herrührt. Weisen die zwei terminalen C-C-Bindungen *trans*-Konformation auf, bedingt die CH₃-*rocking* Schwingung unter Beteiligung der C-C-

Streckschwingung der terminalen C-C-Bindung eine scharfe Bande bei 890 cm^{-1} . *Gauche*-Konformere am Kettenende rufen hingegen im Spektrum eine breite Bande bei 870 cm^{-1} hervor.

Der Bereich der Deformationsschwingungen ist zwischen 1400 und 1500 cm^{-1} lokalisiert, in dem die CH_2 -Scherschwingungen auftreten. Über diesen Bereich des Spektrums können Aussagen über die Kettenpackungen der Lipide erhalten werden. Befinden sich zwei Ketten in der Einheitszelle (orthorhombische Kettenpackung), beobachtet man im Raman-Spektrum eine Aufspaltung des CH_2 -Scherschwingungsbereiches in drei Banden. Befindet sich stattdessen nur eine Kette in der Einheitszelle (trikline und hexagonale Kettenpackung), weist der Bereich der Scherschwingungen nur zwei Banden auf.

III. Experimenteller Teil

III.1. Verwendete Substanzen und Chemikalien

DL-CER[AP]

(Ceramid VI, LOT C899/04/6/4) wurde mit einem Gehalt >94% (berechnet als N- α -Hydroxystearylphytosphingosin [AP], MG: 600,0 g/mol) durch Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland zur Verfügung gestellt und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Für die Untersuchungen zum Einfluss der Diastereomere D- bzw. L-CER[AP] auf die SC Lipid Modellmembran wurde die Substanz durch eine präparative Dünnenschichtchromatographie unter Verwendung des Laufmittelgemisches Chloroform/ Methanol/ Essigsäure 9/ 1/ 0,1 aufgereinigt. 50 mg des DL-CER[AP] wurden in 3 ml Chloroform gelöst und mittels einer Pipette dünn über die gesamte Startfront aufgetragen. An den Seiten der DC-Platte wurden die zwei Diastereomere nach Entwickeln des Chromatogramms über eine Farbreaktion mit Bromthymolblau identifiziert. Die Auftrennung war möglich, da D- bzw. L-CER[AP] als Diastereomere unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen. Dabei weist L-CER[AP] einen höheren RF-Wert auf, der mit dessen geringerer Polarität aufgrund der internen Neutralisation der polaren Kopfgruppen korreliert [Pascher 1976; Raudenkob et al. 2004]. Aus den von der Platte abgetrennten Kieselgel-Substanzgemischen wurde durch Waschen mit Ether das jeweils reine Diastereomer isoliert, dessen Identität massenspektroskopisch bestimmt wurde. Beide Substanzen lagen nach der Trennung in einer Ausbeute von 20 mg mit einem Reinheitsgrad > 99% vor.

CER[EOS]

(Ceramid I, C30, LOT WBR06079.01) wurde mit einer Reinheit von 80-88% (berechnet als 30-Linoyloxy-triacontanoic acid-[$(2S, 3R)$ -1,3-dihydroxyocta-dec-4-enyl]-amide, MG: 1012 g/mol) durch Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland zur Verfügung gestellt. Um die Reinheit auf >96% zu erhöhen, wurde die Substanz mittels einer MPLC an einer mit Kieselgel gepackten Säule über einen Chloroform/ Methanol Lösungsmittelgradient diskontinuierlicher Polaritätserhöhung aufgereinigt. Nach Trocknung über Phosphorpentoxid wurde die Identität der Substanz massenspektroskopisch überprüft, um eventuelle strukturelle Veränderung der oxidationsempfindlichen Substanz im Zuge des Aufreinigungsprozesses ausschließen zu können.

CER[EOP]

(Ceramid IX, Ceramid 9, C30, LOT WBR06031.01) wurde mit einem Gehalt von 85-94% (berechnet als 30-Linoyloxy-triacontanoic acid-[$(2S, 3R)$ -1,3,4-trihydroxyocta-decyl]-amide MG: 1028 g/mol) durch Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland zur Verfügung gestellt. Um die Reinheit auf >96% zu erhöhen, wurde die Substanz mittels einer MPLC an einer mit Kieselgel gepackten Säule über einen Chloroform/ Methanol Lösungsmittelgradient diskontinuierlicher Polaritätserhöhung aufgereinigt. Um eventuelle strukturelle Veränderung der oxidationsempfindlichen Substanz im Zuge des Aufreinigungsprozesses ausschließen zu können, wurde nach Trocknung über Phosphorpentoxid die Identität der Substanz massenspektroskopisch überprüft.

Behensäure

(LOT 1181781) wurde mit einer Reinheit von >99,0% von der Firma SigmaUltra, Taufkirchen, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Behensäure-7,7,8,8,-D4

(Docosan-d 7,7,8,8-säure) (LOT R660P1) wurde mit einer Reinheit von 99,2% von der Firma Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Behensäure-22,22,22-D3

(Docosan-d 22,22,22-säure) (LOT R259AP10) wurde mit einer Reinheit von 98,2% von der Firma Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Palmitinsäure

(LOT 110K03015) wurde mit einer Reinheit von 99% von der Firma SigmaUltra, Taufkirchen, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Cholesterol

(LOT 54H8479) wurde mit einer Reinheit von 99% von der Firma SigmaUltra, Taufkirchen, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Cholesterol-2,2,3,4,4,6 -D₆

(LOT I1-7016) wurde mit einer Reinheit von 98% von der Firma Chemotrade GmbH, Leipzig, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Cholesterol-25,26,26,26,27,27-D₇

(LOT I1-7407) wurde mit einer Reinheit von 98% von der Firma Chemotrade GmbH, Leipzig Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Cholesterolsulat

(LOT 103K5206) wurde mit einer Reinheit von 99% von der Firma SigmaUltra, Taufkirchen, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)

(LOT 055K1464) wurde mit einer Reinheit von 99% von der Firma SigmaUltra, Taufkirchen, Deutschland bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die zur Synthese und chromatographischen Reinigung der Ceramide verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und getrocknet.

Vorbehandlung der eingesetzten Lösungsmittel

Im Rahmen der durchgeführten Synthesen wurden überwiegend absolute Lösungsmittel eingesetzt, die nach den in der Literatur angegebenen Methoden erhalten wurden [Organikum 1999].

Chloroform (CHCl_3)	Trocknen über P_2O_5 Destillation
Heptan	Trocknen über KOH Destillation
Tetrahydrofuran (THF)	Trocknen über Na* Destillation
	* Hinzugabe von Benzophenon als Indikator Erhitzen unter Rückfluss bis zur Blaufärbung des Lösungsmittels (über eine radikalische Reaktion des Benzophenons)

Für die Aufreinigung der kommerziell erworbenen Ceramide bzw. zur Reinigung der Zwischen- und Endprodukte der Synthesearbeiten kamen folgende chromatographische Methoden zum Einsatz.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes und zur Überprüfung der Reinheit isolierter Zwischenverbindungen herangezogen. Die dabei zum Einsatz gekommenen Chromatographieplatten (mit Kieselgel 60, F_{254} , beschichtete Aluminiumplatten 5x10 cm) stammten von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland.

Die Substanzen wurden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst, dünn aufgetragen und in Chromatographiekammern unter Kammersättigung entwickelt.

Folgende Lösungsmittelgemische wurden als mobile Phase verwendet:

Chloroform/ Diethylether; Chloroform/ Methanol; Chloroform/ Heptan

Zur Detektion wurden Bromthymolblau bzw. Brom verwendet.

Durch Einsatz des Triphenylmethanfarbstoffes Bromthymolblau ließen sich unter Bildung von Charge-Transfer-Komplexen lipophile Verbindungen nachweisen. Diese wurden als ockerfarbene Flecke auf hellgelben Grund sichtbar. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit konnte das Chromatogramm mit Ammoniak bedampft werden. Es zeigten sich dann blaue Flecke auf hellgelben Grund. Als weiße Flecke waren durch diese Methode anorganische Verbindungen erkennbar.

Zur Detektion von Substanzen mit ungesättigten Alkylketten diente eine Lösung von Brom in Methanol (ca.1%), welche durch eine Additionsreaktion an die Doppelbindung entfärbt wurde.

Die Detektionsreagenzien wurden wie folgt hergestellt:

- Bromthymolblaulösung

Zur Herstellung wurden 200mg Bromthymolblau ($3',3''$ -Dibromthymolsulfophthalein) in wenig Ethanol gelöst und zusammen mit 400mg KOH in 1 Liter Aqua dest. aufgenommen.

- Bromlösung

0,5g Bromlösung wurden mit Methanol ad 100ml verdünnt.

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie diente zur Reinigung der Zwischen- und Endprodukte. Als Trennmittel kam Kieselgel 60 der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, mit der Korngröße 0,063-0,200mm für drucklose Chromatographie zum Einsatz.

Das Packen der Säule folgte einem Kieselgel-Substanz-Verhältnis von 10:1.

Als Elutionsmittel dienten Heptan/ Diethylether, Heptan/ Chloroform, Chloroform/ Methanol/ THF und Chloroform/ Methanol, wobei die Polarität diskontinuierlich erhöht wurde.

Middle Pressure Liquid Chromatographie (MPLC)

Die MPLC diente vorwiegend zur Trennung und Reinigung der Endprodukte. Als Trennmittel kam Kieselgel 60 der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland, mit einer Korngröße von 0.040 – 0.063 mm zum Einsatz. Die Säulen wurden mittels eines Cartriger C-670 der Firma Büchi, Flawil 1, Schweiz, befüllt. Die Probensammlung erfolgte über einen Fraction Collector C-660 (Büchi); als Pumpe diente das Pump Module C-601 und der Pump Manager C-615 (Büchi). Als Elutionsmittel kamen Chloroform/Methanol-Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzung zum Einsatz, wobei die Polarität diskontinuierlich erhöht wurde. Die Bedingungen hinsichtlich der Flussrate und der Zusammensetzung der Elutionsmittel wurden dem jeweiligen Trennproblem angepasst. Das Injektionsvolumen betrug je nach Löslichkeit des Produktes 5 – 15 ml. Die Detektion der Endprodukte erfolgte durch chromatographische Untersuchung (DC) der einzelnen Fraktionen.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Die präparative Dünnschichtchromatographie diente zur Auf trennung des DL-CER[AP] in die reinen Diastereomere. Die dabei zum Einsatz gekommenen Chromatographieplatten (mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumplatten 20x20 cm, Dicke 2 mm) stammten von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland.

Als Elutionsmittel diente ein Chloroform/ Methanol/ Essigsäure-Gemisch [9/ 1 / 0,1]

III.1.1. Synthese und Analytik der Ceramide CER[NS], CER[NS]-D2, CER[NS]-D3 und CER[NS]-D47

Kommerziell erworbene Substanzen

	MG	Firma
Tetracosansäure	368 g/mol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetracosansäure-D47	415 g/mol	Chemotrade, Leipzig, Deutschland
Chlorameisensäureethylesters	108,5 g/mol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Sphingosin	299 g/mol	Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, D.
EEDQ	247,29 g/mol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tridecanidisäure	244,33 g/mol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

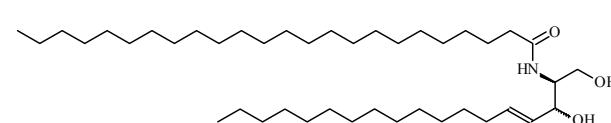
1. Synthese von CER[NS]

Die Darstellung von CER[NS] erfolgte über ein gemischtes Anhydrid nach der Vorschrift von Ramsany et al. [1982].

In einen mit Argon sekurierten Einhalskolben werden 2 g Tetracosansäure (MG: 368 g/mol; n= 5,43 mmol) in 20 ml absoluten THF (n=5,43 mmol) eingewogen. Es bildet sich eine Suspension, zu der 0,755 ml abs. Triethylamin (TEA) (MG: 101 g/mol; n= 5,43 mmol; Dichte: 0,726 g/ml) hinzugegeben werden. Der Ansatz wird mittels Trockeneis in Ethanol auf 0°C abgekühlt. Es erfolgt dann die Zugabe des Chlorameisen-säureethylesters (MG: 108,5 g/mol; n= 5,43 mmol; Dichte= 1,139 g/ml; V= 0,517 ml). Der Ansatz wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das gemischte Anhydrid über eine Fritte abgesaugt, wobei das Triethylammoniumchlorid zurückbleibt.

Zu dem isolierten Anhydrid im mit Argon sekurierten Zweihalskolben gibt man dann die gleiche Menge Sphingosin (MG= 299 g/mol; n= 5,43 mmol; m= 1,62 g) dazu und lässt für 24 h unter DC-Kontrolle bei RT röhren.

Im Anschluss erfolgt die säulenchromatographische Aufreinigung unter Verwendung eines Chloroform/ Methanol-Gemisches diskontinuierlicher Polaritätserhöhung. Die DC-Kontrolle der Fraktionen wird unter Verwendung des Laufmittels Chloroform/ Methanol 9/1 durchgeführt, die Detektion mittels Bromthymolblau und Ammoniak-Bedämpfung.

Aussehen:	weiße kristalline Substanz	
Ausbeute:	2,25 g = 64%	
Summenformel:	C ₄₂ H ₈₃ NO ₃	
Molekulargewicht:	650,12 g/mol	
Massenspektrum:	siehe Anhang	
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 77,59% H = 12,87% gefunden: C = 77,58% H = 12,62%	
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)	

δ [ppm]:	0,864	(t, 6H, 2x[CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -])
	1,231	(m, 64H, 30x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; 2x[CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -])
	2,016	(m, 2H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])
	2,16	(t, 2H, [-CH-HNOC-CH ₂ -CH ₂ -])
	3,706	(m, 2H, [HO-CH ₂ -CH-NH-])
	3,944	(m, 1H, [HO-CH ₂ -CH-NH-])
	4,308	(m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])
	5,536	(m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])
	5,752	(m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])

2. Synthese von CER[NS]-D2

Darstellung der Tetracosan-2,2-D2-säure über den Tetracosansäuremethylester

a). Darstellung des *Tetracosansäuremethylester*

0,75 g Tetracosansäure (MG: 368 g/mol; n= 2,04 mmol) werden in 12 ml CH₃OD unter Zusatz von 0,5 ml konz.H₂SO₄ bei 80°C unter Rückfluss (Molsieb) über 4 Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen unter Vakuum wird der Ansatz zusammen mit 30 ml Diethylether und 15 ml D₂O in den Scheidetrichter überführt. Nach Abtrennung wird die Etherphase über Natriumsulfat (Na₂SO₄) getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeengt. Der so erhaltene Feststoff wird unter Verwendung eines Heptan/Chloroform-Eluenten chromatographisch aufgereinigt, wobei der Ester bereits bei reinem Heptan eluiert. Ausbeute: 0,8g

b). Darstellung der *Tetracosan-2,2-D2-säure*

Nach der Vorschrift von Aasen et al. [1970] wird Tetracosansäuremethylester (MG: 382 g/mol; n= 2,1 mmol; m= 0,8 g;) zu einer Lösung von Na (MG: 23 g/mol; n= 0,51 mmol ; m= 11,7 mg;) in CH₃OD (0,8 ml) gegeben. Die Mischung wird 1 Stunde unter Rückfluss bei 85°C erhitzt. Das Methanol wird unter vermindertem Druck entfernt und die Behandlung insgesamt viermal mit je 0,8 ml der Na-CH₃OD-Mischung wiederholt. Die Mischung wird mit 0,4 ml 5N DCl acidifiziert und dann mit CHCl₃ extrahiert. Das Chloroform wird im Vakuum entfernt. Ausbeute: 0,15 g (20%).

Über eine hochauflösende Massenspektrometrie (TOF MS-ES) konnte ein D-H Austausch an den beiden α -Kohlenstoffatomen von ca. 70% -CD₂-CO- festgestellt werden.

Darstellung des CER[NS]-D2

Das in α -Position zweifach deuterierte CER[NS]-D2 wurde über eine modifizierte Methode nach Müller et al. [2000] aus der Tetracosan-2,2-D2-säure und dem Sphingosin unter Verwendung des Kupplungsreagenz EEDQ (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydro-chinolin) erhalten.

0,1757 mmol Tetracosan-2,2-D2-säure (MG: 371,66 g/mol m= 65 mg;), 0,2636 mmol Sphingosin (MG: 299,49 g/mol m= 79 mg;) und 0,2636 mmol EEDQ (MG: 247,29 g/mol, m= 65 mg) werden in 8 ml absolutem Ethanol unter Argonbegasung bei 50°C über 48 Stunden bei dünnenschichtchromatographischer Reaktionskontrolle gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser abgebrochen, das Rohprodukt anschließend zweimal mit Wasser

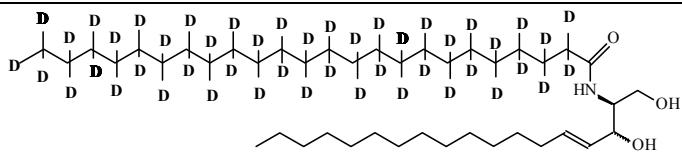
gewaschen und an Kieselgel unter Verwendung eines Chloroform/ Methanol/ THF Gradienten diskontinuierlicher Polaritätserhöhung chromatographiert.

Aussehen:	weiße kristalline Substanz	
Ausbeute:	75,6mg = 66%	
Summenformel:	C ₄₂ H ₈₁ D ₂ NO ₃	
Molekulargewicht:	652,13 g/mol	
Massenspektrum:	siehe Anhang	
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 77,36% H = 12,52% gefunden: C = 77,21% H = 12,63%	
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)	
δ [ppm]:	0,847-0,881 (t, 6H, 2x[CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -]) 1,239-1,513 (m, 62H, 29x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; 2x[CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -]) 1,612 (m, 2H, [-CH ₂ -CH ₂ -CD ₂ -]) 2,016-2,152 (m, 2H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 3,702-3,710 (m, 2H, [HO-CH ₂ -CH-NH-]) 3,925-3,963 (m, 1H, [HO-CH ₂ -CH-NH-]) 4,308 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 5,528-5,544 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 5,752 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])	

3.Synthese von CER[NS]-D47

Die Synthese erfolgte analog der Darstellung des CER[NS]-D2, indem Tetracosan-D47-säure und Sphingosin unter Einwirkung des Kupplungsreagenz EEDQ in abs. Ethanol umgesetzt wurden.

0,2409 mmol Tetracosan-D47-säure (MG: 415 g/mol; m= 100 mg), 0,3614 mmol Sphingosin (MG: 299,49 g/mol, m= 108 mg) und 0,3614 mmol EEDQ (MG: 247,29 g/mol; m=89 mg) werden in 8 ml absolutem Ethanol unter Argonbegasung bei 50°C über 48 Stunden bei dünnenschichtchromatographischer Reaktionskontrolle gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser abgebrochen, das Rohprodukt anschließend zweimal mit Wasser gewaschen und an Kieselgel unter Verwendung eines Chloroform/ Methanol/ THF Gradienten diskontinuierlicher Polaritätserhöhung chromatographiert.

Aussehen:	weiße kristalline Substanz	
Ausbeute:	106,2mg = 63%	
Summenformel:	C ₄₂ H ₃₆ D ₄₇ NO ₃	
Molekulargewicht:	697,41 g/mol	
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 72,33% H = 18,77% gefunden: C = 72,21% H = 18,52%	
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)	
δ [ppm]:	0,847-0,880 (t, 3H, [-CH ₂ -CH ₃]) 1,243 (m, 22H, 10x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂]; [-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃]) 2,033-2,050 (m, 2H, [-CH=CH-CH ₂ -CH ₂]) 3,702-3,710 (m, 2H, [HO-CH ₂ -CH-NH-]) 3,924-3,962 (m, 1H, [HO-CH ₂ -CH-NH-]) 4,305 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 5,505-5,543 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 5,749-5,790 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])	

4.Synthese von CER[NS]-D3

Darstellung der in ω -Position deuterierten Tetracosansäure

a). Darstellung des *Tridecandisäuredimethylesters*

Entsprechend der Vorschrift zur azeotropen Veresterung [Organikum 1999] werden 0,5 mol der Dicarbonsäure Tridecandisäure (MG: 244,33 g/mol; m= 122 g) mit 1,75 mol Methanol, 5 g konz.H₂SO₄ und 200 ml Methylenechlorid versetzt und am Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt bis sich kein Wasser mehr abscheidet.

Der anorganische Bodensatz wird abdekantiert und die Lösung mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen. Nach Testen des pH-Wertes erfolgt das Neutralwaschen mit Na₂CO₃-Lösung. Im Anschluss wird die organische Lösung eingeengt, über P₂O₅ getrocknet und weiter umgesetzt. Ausbeute: 54 g (40%)

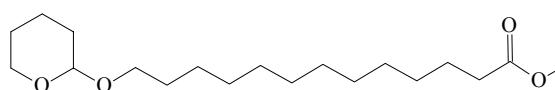
b). Darstellung des *Tridecandisäuremonomethylesters*

54 g Tridecandisäuredimethylesters (MG: 272,4 g/mol; n= 0,2 mol) werden in 120 ml Methanol gelöst und 174 ml einer 1,14 N methanolischen Ba(OH)₂-Lösung hinzugefügt. Die Mischung wird kurz umgerührt und über Nacht stehen gelassen. Die gelartige Substanz wird anschließend jeweils zweimal mit 100 ml Diethylether überschichtet, über einer Glasfritte scharf abgesaugt und abschließend getrocknet. Danach wird der Feststoff mit äquivalenten Mengen HCl (0,2 mol) und Ether versetzt. Es wird gerührt, bis beide Phasen klar sind. Im Anschluss wird die organische Phase mit Wasser gewaschen und mit Bicarbonatlösung neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die aus Petrolether umkristallisierte Substanz wird dann weiter umgesetzt. Ausbeute: 19,24 g (40%)

c). Darstellung von *13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-tridecansäuremethylester* via *13-Hydroxy-tridecansäuremethylesters*

Entsprechend der Vorschrift von Ramsay et al.[1982] werden 0,08 mol Monoester (MG: 242 g/mol; m= 19,2 g) in trockenem THF vorgelegt und gleiche Mengen TEA (m=7,6 g) zugegeben. Nach Herunterkühlen auf 0°C wird über eine Kanüle Chlorameisensäureethylester (8,1 g, gelöst in 75 ml THF) zugetropft und der Ansatz unter DC-Kontrolle 6 Stunden gerührt. Anschließend wird der Feststoff über eine Fritte abgesaugt und 5,55 g Natriumborhydrid (NaBH_4) in 37,5 ml H_2O zugegeben. Nach 5 Stunden Röhren wird die Lösung eingeengt und das Rohprodukt ausgewogen.

15 g des Monoester (MG: 244 g/mol; n= 0,06 mol) werden in 150 ml abs. Dichlormethan gelöst. Es erfolgt die Zugabe von 3,4—Dihydro-2H-pyran im Überschuss (1:1,8) und von einer Spatelspitze Pyridiniumtosylat. Nachdem mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird das Tosylat mit Wasser aus dem Ansatz gelöst und dieser über Calciumchlorid (CaCl_2) getrocknet, im Vakuum eingeengt und säulenchromatographisch unter Verwendung eines Heptan/ Diethylether–Eluenten diskontinuierlicher Polaritätserhöhung aufgereinigt. Wegen der vorhandenen Schutzgruppe werden 10 Tropfen Triethylamin (TEA) je 100 ml Eluent zur Phlegmatisierung des Kieselgels zugesetzt.

Aussehen:	farblose Flüssigkeit	klare	
Ausbeute:	13 g = 66%		
Summenformel:	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_4$		
Molekulargewicht:	328,5 g/mol		
Massenspektrum:	siehe Anhang		
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 69,47% H = 11,05%	gefunden: C = 69,57% H = 10,98%	
$^1\text{H-NMR}$:	(in CDCl_3 , 400 MHz)		
δ [ppm]:	1,245	(m, 18H, [-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -])	
	1,555-1,599	(m, 8H, 3x[-CH ₂ -CH ₂ -O-]; [CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-] _{ring})	
	2,264-2,301	(m, 2H, [-CH ₂ -CH ₂ -COO-CH ₃])	
	3,352-3,855	(t, 4H, 2x[-CH ₂ -CH ₂ -O-])	
	3,647	(s, 3H, [-COO-CH ₃])	
	4,547-4,564	(s, 1H, [-O-CH ₂ -O-])	

d). Reduktion zum *13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-tridecanol*

Entsprechend der Vorschrift von Dobner und Nuhn [1991] werden in einen ausgeheizten, mit Argon sekurierten 250 ml-Dreihalskolben 3,33 g LiAlD₄ (MG: 41,7 g/mol; n= 0,08 mol) eingewogen und in 75 ml absolutem Diethylether aufgenommen. Um die Reaktivität des LiAlD₄ zu erhöhen, wird es im Verhältnis 2:1 mit dem Ester umgesetzt, und nicht 1:1 wie in der Vorschrift angegeben. In einem Becherglas erfolgt die Einwaage des Esters (MG: 328,5 g/mol; n=0,04 mol; m= 12,8 g), der in 30 ml Ether gelöst wird und über einen Tropftrichter langsam dem LiAlD₄ zugegeben wird. Der Ansatz wird unter DC-Kontrolle für eine Stunde bei RT gerührt, dann weitere 7 Stunden unter Rückfluss bei 45°C Badtemperatur.

Der Ansatz wird im Eisbad auf 0°C gekühlt und 27,9 ml Ethylacetat und 9,3 ml H₂O werden hinzugeben und es wird gerührt bis der Feststoff weiß ist (LiOH). Der Ansatz wird über einer Fritte scharf abgesaugt und der weiße Bodensatz wird mehrmals mit Diethylether gewaschen, eingeengt und getrocknet. Ausbeute: 11,4 g (95%).

e). Darstellung von *13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)- 1,1,1-D3-Tridecan*
via *13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)- 1,1-D2-Tridecanol*

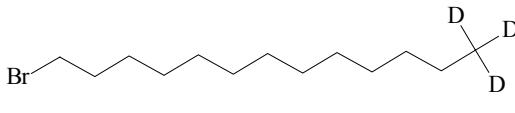
11,4 g Alkohol werden in 25 ml Chloroform gelöst und im Eisbad gerührt. Es erfolgt die Zugabe von 7,7 g Pyridin (7,8 ml). Anschließend werden 5,44 g Methansulfonylchlorid tropfweise zugeführt und der Ansatz röhrt für 5 Stunden bei 0°C, weitere 12 Stunden bei RT und wird eingeengt.

0,0347 mol LiAlD₄ ($m = 1,46 \text{ g}$) werden in einem ausgeheizten Dreihalskolben in 75 ml abs. Diethylether aufgenommen. 0,0289 mol mesylierter Alkohol ($m = 11,01 \text{ g}$) werden in 20 ml Ether gelöst und langsam dem LiAlD₄ zugetropft und der Ansatz für 7 Stunden bei 45°C unter Rückfluss gerührt. Die Reaktion wird dann abgebrochen durch tropfenweises Zugeben von insgesamt 3 ml D₂O, wobei ein Niederschlag ausfällt. Der Ansatz wird für weitere 12 Stunden bei RT gerührt und der Niederschlag anschließend abfiltriert. Die Etherphase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeengt und säulenchromatographisch unter Verwendung eines Heptan/ Diethylether–Eluenten diskontinuierlicher Polaritätserhöhung + TEA aufgereinigt.

Aussehen:	weiße Substanz	kristalline	
Ausbeute:	4,90 g = 59%		
Summenformel:	C ₁₈ H ₃₃ D ₃ O ₂		
Molekulargewicht:	287,5 g/mol		
Elementaranalyse:			theoretisch: C = 75,20% H = 13,67% gefunden: C = 75,02% H = 13,87%
¹ H-NMR:			
δ [ppm]: (in CDCl ₃ , 400 MHz) 1,240 (m, 20H, 9x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; [-CH ₂ -CH ₂ -CD ₃]) 1,555-1,599 (m, 8H, 3x[-CH ₂ -CH ₂ -O-]; [CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-] _{ring}) 3,352-3,855 (t, 4H, 2x[-CH ₂ -CH ₂ -O-]) 4,547-4,564 (s, 1H, [-O-CH ₂ -O-])			

f). Darstellung von *1-Brom-13,13,13-D3-tridecan*

0,038 mol Triphenylphosphin ($m = 9,96 \text{ g}$) werden in 120 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Unter Argonsekurierung erfolgt das Zutropfen von in wenig Dichlormethan gelöstem 0,038 mol Brom ($m = 6,08 \text{ g}$) bei 0°C. Nach 30 min werden 0,017 mol der zu bromierenden Alkylverbindung ($m = 4,90 \text{ g}$), gelöst in 10 ml CH₂Cl₂, mit einem Mal zugegeben. Es wird über 16 h bei Raumtemperatur unter DC-Kontrolle gerührt. Nach der quantitativen Umsetzung wird mit jeweils 100 ml Wasser zweimalig gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch unter Verwendung von reinem Heptan gereinigt.

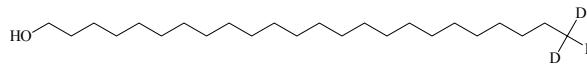
Aussehen:	weiße kristalline Substanz	
Ausbeute:	4,08 g = 90%	
Summenformel:	C ₁₃ H ₂₄ D ₃ Br	
Molekulargewicht:	266 g/mol	
Massenspektrum:	siehe Anhang	
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 58,64% H = 11,35% gefunden: C = 58,75% H = 11,51%	
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)	
δ [ppm]:	1,245-1,263 (m, 20H, 9x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; [-CH ₂ -CH ₂ -CD ₃]) 1,818-1,855 (m, 2H, [Br-CH ₂ -CH ₂ -]) 3,370-3,404 (t, 2H, [Br-CH ₂ -CH ₂ -])	

g). Darstellung von 24,24,24-D3-Tetracosanol

In einem Einhalskolben werden 0,012 mol (MG: 335 g/mol; m= 4,0g) 11-(Tetrahydropyran-oxo)-undecanyl-bromid in 40 ml THF gelöst und mit Magnesiumspänen versetzt. Unter Rückflusskühlung wird 2 h lang bei ca. 60°C gerührt und nach Reaktionsende wird das restliche Magnesium abdekantiert und zurückgewogen. Die abgegossene organische Phase wird erneut in einen Einhalskolben gefüllt und bei -10°C mit 0,8 ml Li₂CuCl₄ versetzt. Nach leichter Erwärmung auf bis zu -5°C erfolgt die Zugabe von 0,015 mol (m= 4,0 g) 1-Brom-13,13,13-D3-tridecan, gelöst in 10 ml THF, und der Reaktionsansatz wird über 3 h gerührt, wobei das Lösungsmittel sich schwarz verfärbt und ein weißer Niederschlag ausfällt.

Die organische Phase wird mit 150 ml ammoniakal. Wasser ausgeschüttelt, die wässrige bläuliche Phase abgetrennt und die darin enthaltenen organischen Bestandteile mit 25 ml Diethylether rückextrahiert. Die gleiche Prozedur zur Abtrennung anorganischer Bestandteile wird erneut mit jeweils 100 ml H₂O und 15 ml Ether wiederholt und alle Etherphasen werden zum Schluss vereinigt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeengt und an einer Normal-Kieselgelsäule unter Verwendung eines Heptan/Diethylether-Eluenten diskontinuierlicher Polaritätserhöhung und Zusatz von TEA zur Phlegmatisierung des Kieselgels aufgereinigt. Das erhaltene Reaktionsprodukt stellt den THP-geschützten trisdeuterierten C₂₄-Alkohol dar, der jedoch nicht charakterisiert wird.

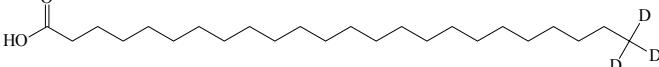
Zur weiteren Umsetzung wird der Alkohol in einem Einhalskolben mit überschüssigem Methanol und einer Spatel spitze Pyridiniumtosylat als Katalysator versetzt. Nach dreistündigem Erhitzen unter Rückfluss bildet sich ein bei Raumtemperatur in Methanol unlöslicher Niederschlag, der sich mit 50 ml Ether lösen lässt. Es wird mit 50 ml H₂O ausgeschüttelt und die Etherphase mit etwas Chloroform versetzt, um die Produktlöslichkeit darin zu erhöhen. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt.

Aussehen:	weiße lockere Substanz	
Ausbeute:	0,8 g	
Summenformel:	C ₂₄ H ₄₇ D ₃ O	
Molekulargewicht:	357,7 g/mol	

Massenspektrum:	siehe Anhang
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 80,59% H = 14,93% gefunden: C = 80,88% H = 14,97%
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)
δ [ppm]:	1,239 (m, 44H, 21x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; [-CH ₂ -CH ₂ -CD ₃]) 3,605-3,638 (t, 2H, [HO-CH ₂ -CH ₂ -])

8). Darstellung von 24,24,24-D3-Tetracosansäure

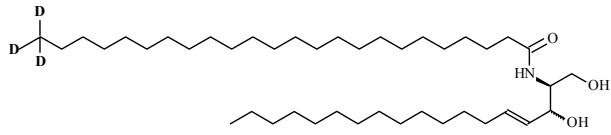
2,23 mmol 24,24,24-D3-Tetracosanol (m= 800 mg) werden in einem Lösungsmittelgemisch aus je 30 ml Chloroform und Dimethylformamid gelöst. Man fügt 17,8 mmol Pyridinium-dichromat (m= 6,73 g) hinzu und röhrt den Ansatz bei Raumtemperatur für 72 Stunden unter DC-Kontrolle. Nach Ende der Reaktion wird mit jeweils 20 ml dest. Wasser gewaschen und die organische Phase anschließend über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wird in wenig Chloroform aufgenommen und säulenchromatographisch unter Einsatz eines Heptan/Chloroform-Gemisch aufsteigender Polarität gereinigt.

Aussehen:	weiße kristalline Substanz		
Ausbeute:	0,24 g = 29%		
Summenformel:	C ₂₄ H ₄₅ D ₃ O ₂		
Molekulargewicht:	371,7 g/mol		
Massenspektrum:	siehe Anhang		
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 77,56% H = 13,83% gefunden: C = 77,33% H = 13,61%		
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)		
δ [ppm]:	1,238 (m, 42H, 20x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; [-CH ₂ -CH ₂ -CD ₃]) 2,312-2,349 (t, 2H, [HOOC-CH ₂ -CH ₂ -])		

Kopplung zum Ceramid[NS]-D3

Die Synthese erfolgte analog der Darstellung des CER[NS]-D2, indem 24,24,24-D3-Tetracosansäure und Sphingosin unter Einwirkung des Kupplungsreagenz EEDQ in abs. Ethanol umgesetzt wurden.

0,645 mmol 24,24,24-D3-Tetracosansäure (m= 240 mg), 0,968 mmol Sphingosin (MG: 299,49 g/mol; m= 290 mg;) und 0,968 mmol EEDQ (MG: 247,29 g/mol; m= 239 mg) werden in 10 ml absolutem Ethanol unter Argonbegasung bei 50°C über 48 Stunden bei dünnenschichtchromatographischer Reaktionskontrolle geröhrt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser abgebrochen, das Rohprodukt anschließend zweimal mit Wasser gewaschen und die Substanz mittels einer MPLC an einer mit Kieselgel gepackten Säule über einen Chloroform/ Methanol Lösungsmittelgradient diskontinuierlicher Polaritätserhöhung aufgereinigt.

Aussehen:	weiße kristalline Substanz	
Ausbeute:	120 mg = 29%	
Summenformel:	C ₄₂ H ₈₀ D ₃ NO ₃	
Molekulargewicht:	653,14 g/mol	

Massenspektrum:	siehe Anhang
Elementaranalyse:	theoretisch: C = 77,24% H = 12,35% gefunden: C = 77,34% H = 12,41%
¹ H-NMR:	(in CDCl ₃ , 400 MHz)
δ [ppm]:	0,847-0,881 (t, 3H, [CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -]) 1,239-1,513 (m, 64H, 30x[-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -]; [CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -], [CD ₃ -CH ₂ -CH ₂ -]) 2,016 (m, 2H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 2,16 (t, 2H, [-CH-HNOC-CH ₂ -CH ₂ -]) 3,702-3,710 (m, 2H, [HO-CH ₂ -CH-NH-]) 3,925-3,963 (m, 1H, [HO-CH ₂ -CH-NH-]) 4,308 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -OH]) 5,528-5,544 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH]) 5,752 (m, 1H, [-CH ₂ -CH=CH-CH-OH])

III.2. Methoden

III.2.1. Neutronendiffraktion

Die Neutronendiffraktionsmuster der beschriebenen multilamellaren *Stratum corneum*-Lipid-Modellmembranen wurden am *V1 Diffraktometer für Kalte Neutronen und mit einem Flächendetektor* des Hahn-Meitner-Instituts, Berlin, aufgenommen. Das *Membrandiffraktometer V1* mit variabel einfallender Wellenlänge ist an den kurvenförmigen Neutronenleiter NL1A angeschlossen und ausgestattet mit einem hoch-auflösenden Flächendetektor. Der Aufbau des Instruments ist abgestimmt auf die Anforderungen für Untersuchungen an biologischen Proben bzw. anderen Proben mit einer Einheitszelle der Größenordnung von 5-10 nm.



Abb.20 V1 Diffraktometer (Foto)
[Quelle: www.hmi.de]

Die Beugungsmuster wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 4,517 \text{ \AA}$ und einem Probe-zu-Detektor-Abstand von 101,8 cm entweder als *rocking curve* bei verschiedenen fixierten Streuwinkel 2θ oder als *theta-2theta-scan* ($\theta - 2\theta$) von 0-30° aufgenommen. Der zum Einsatz kommende Detektor ist ein zwei-dimensionaler positionssensitiver ^3He -Detektor mit den Parametern 20 cm x 20 cm (Fläche) und 1,5 mm x 1,5 mm (räumliche Auflösung).

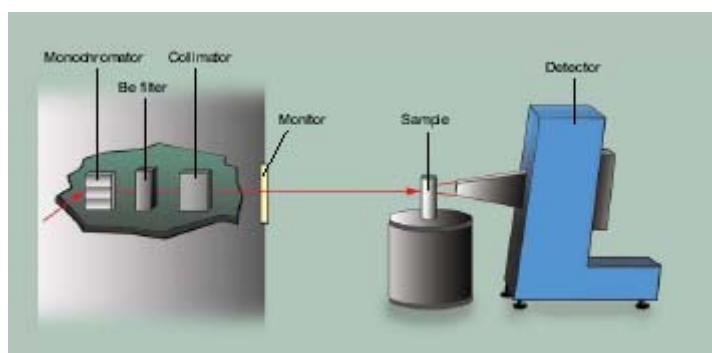


Abb.21 HMI- *V1 Membrandiffraktometer* in schematischer Darstellung (Be-Filter= Beryllium-Filter zur Erhöhung der Neutronenintensität; Collimator= Erzeugung eines parallelen Strahlenverlaufs; Monochromator= Isolierung einer bestimmten Wellenlänge aus einer einfallenden Menge elektromagnetischer Strahlung)

Die Membranproben wurden für 12 Stunden in einer transportablen, verschließbaren Kammer bei eingestellter Temperatur, D_2O -Konzentration und Feuchtigkeit equilibriert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei folgenden definierten relativen Feuchtigkeitsgehalten (r.H.) gearbeitet:

- 60% r.H., eingestellt durch gesättigte Natriumbromid (NaBr)-Lösung,
- 98% r.H., eingestellt durch gesättigte Kaliumsulfat (K_2SO_4)-Lösung.

Folgende D_2O -Kontraste wurden in den Messungen eingesetzt: $\text{H}_2\text{O}/ \text{D}_2\text{O}$ 92/ 8, 80/ 20, 50/ 50 und 0/ 100, (w/w). Die Kontrastvariation ist notwendig für die Bestimmung der Strukturfaktoren und die Anwendung hoher D_2O -Konzentration erlaubt zudem die Detektion von Reflexen höherer Ordnung mit geringer Intensität.

Nach Einbringen der Kammer in den Neutronenstrahl wurden die Messungen für ca. 12 Stunden durchgeführt, kontrolliert und unterstützt durch das HMI-eigene Software-Programm CARESS.

In den Neutronendiffraktionsbildern wird die Streuintensität I (in frei wählbarer Maßeinheit-*engl. arbitrary units, a.u.*) als Funktion des Streuvektors Q (in \AA^{-1}) gemessen. Dieser ist als

$$Q = (4\pi \sin \theta) / \lambda \quad \text{Gleichung 10}$$

definiert, wobei θ den Streuwinkel und λ die Wellenlänge bezeichnen. Mithilfe der Software Peak Fit® 4.0 wurden die Positionen einer Serie abstandsgleicher Reflexe (Q_n) ermittelt, aus denen dann der lamellare Wiederholabstand d (Periodizität) der Membran nach der Gleichung

$$d = \frac{2n\pi}{Q_n} \quad \text{Gleichung 11}$$

(n = Ordnungsnummer des jeweiligen Diffraktionspeaks) berechnet wurde. Wenn das Neutronendiffraktionsbild mindestens drei, besser aber vier bzw. fünf Diffraktionsordnungen zeigt, kann das Neutronenstreuulängendichteprofil $\rho_s(x)$ über den Bilayer durch eine Fourier-Synthese ermittelt werden. Wiederum unter Verwendung der Software Peak Fit® 4.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) erfolgte die Berechnung des absoluten Wertes des Strukturfaktors $|F_H|$ aus dem Integral der Peakintensität I und dem Lorentzfaktor h der Ordnung nach

$$|F_H| = \sqrt{h \cdot I_h} \quad \text{Gleichung 12.}$$

Für den Fall eines zentrosymmetrischen Bilayers können die Vorzeichen der Strukturfaktoren nur die Werte +1 oder -1 annehmen. Durch Kontrastvariation, d.h. Vermessen derselben Probe bei verschiedenen D_2O -Konzentrationen, kann das Vorzeichen entsprechend der von Worcester [1976] und Franks und Lieb [1979] beschriebenen Vorgehensweise ermittelt werden. Danach hat die Gerade, die die Abhängigkeit der Strukturfaktoren geradzahliger Ordnungen von steigendem D_2O -Gehalt beschreibt, einen positiven Anstieg, die der ungeradzahligen Ordnungen einen negativen. Durch Anordnung der einzelnen

Strukturfaktoren entsprechend dieser Regel konnten die jeweiligen Vorzeichen bestimmt werden (Abb.22; Tab.4).

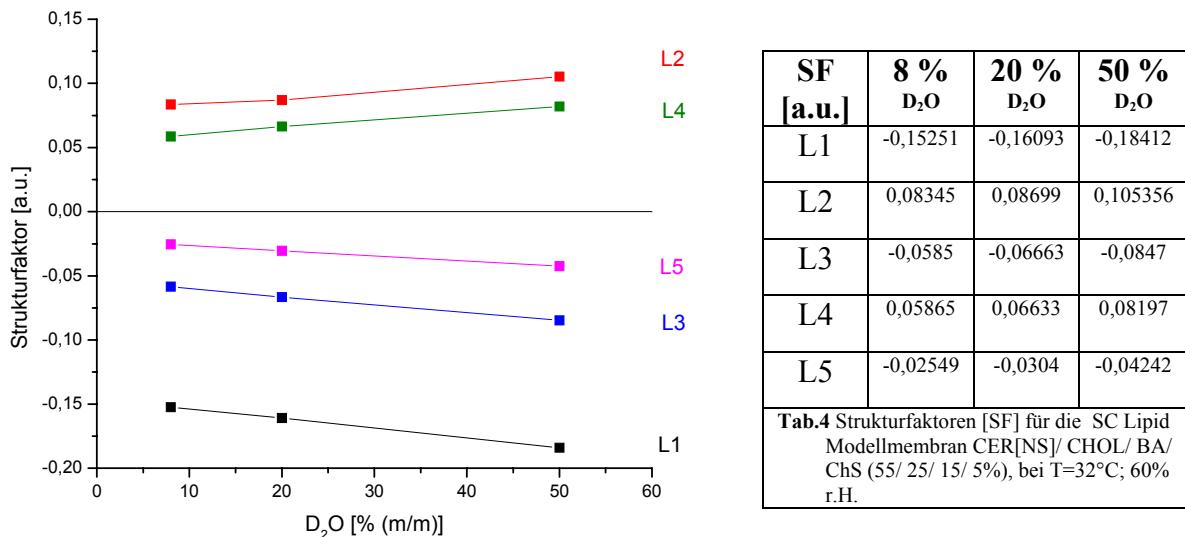


Abb.22 Abhängigkeit des Strukturfaktors vom D₂O-Gehalt für die SC Lipid Modellmembran CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5%), bei T=32°C; 60% r.H.

Im Anschluss konnte dann mittels des Software-Programms Grapher® 2.0 (Golden Software Inc., Golden, USA) das Neutronenstreuulängedichteprofil $\rho_s(x)$ durch eine Fourier-Synthese erhalten werden

$$\rho_s(x) = \frac{2}{d} \cdot \sum_{h=1}^{h_{\max}} F_h \cdot \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot h \cdot x}{d}\right) \quad \text{Gleichung 5}$$

Dabei ist F_h der Strukturfaktor des Diffraktionsreflexes der jeweiligen Ordnung h und d der lamellare Wiederholabstand.

Die innere Membranstruktur wurde aus dem Fourier-Profil durch Hineinlegen von vier Gauß-Funktionen entsprechend der Weite und Position der polaren Kopfgruppen, den Bereichen der Cholesterolmoleküle, der Kohlenwasserstoffketten und der Methylgruppen bestimmt.

Die im Kapitel IV.3.2.2. beschriebene Fehlerrechnung zum Neutronenstreuexperiment an der CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL Modellmembran wurde mit Hilfe der Software IGOR PRO 6® (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) durchgeführt.

III.2.1.1. Probenpräparation für Neutronenstreuexperimente

Die Präparationsmethode der multilamellaren SC Lipid-Modellmembranen orientierte sich an der von Seul und Sammon [1990] beschriebenen Vorgehensweise, wobei sich eine Modifikation einzelner Präparationsschritte als vorteilhaft erwies.

Zunächst wurde die Lipidmischung eingewogen, die dann in Chloroform/ Methanol (1/1 V/V) gelöst wurde, wobei ein gelindes Erwärmen und das gleichmäßige Verteilen auf einem Vortexer (Reax 2000 der Firma Heidolph, Schwalbach, Deutschland) günstig sind. Eine Herstellung von Stammlösungen bestimmter Konzentration einzelner Lipide mit anschließender Verdünnung auf die gewünschte Konzentration ist möglich und erleichtert die Herstellung genauer Mischungsverhältnisse. Eine Aufbewahrung der Stammlösung wird allerdings aus Stabilitätsgründen nicht empfohlen.

Die Präparation der Membran erfolgte auf einer im Trockenschrank (Typ E28, Firma Binder, Tuttlingen, Deutschland) auf 65°C temperierten Quartzplatte (Spectrosil 2000 der Firma Saint-Gobain, Wiesbaden, Deutschland), welche zur Vermeidung von Defektstellen in der Membran absolut planar auf einer erschütterungsfreien Fläche aufliegen sollte. Dafür hat sich eine Petrischale, die zur Justierung auf einer mit Quartsand befüllten Kristallisationsschale aufliegt, bewährt.

Mittels einer Hamillton-Pipette geeigneter Kalibrierung wurden 1200 µl Lipidlösung aufgetragen. Nach Verdunsten des organischen Lösungsmittels wurden die Proben im Vakuumschrank für 12 Stunden zur vollständigen Entfernung des Solvents aufbewahrt. Anschließend erfolgte das Annealen der Membran im Trockenschrank bei 65°C. Dazu wurde eine kleine Petrischale (Durchmesser: 1 cm) mit ca. 1 ml Aqua dest. befüllt, neben die Quartzplatte gestellt und beides mit einer weiteren Petrischale abgedeckt. Nach 30 Minuten wurde die Membran bei Raumtemperatur für 5 Minuten abgekühlt, bevor der gesamte Vorgang noch zweimal wiederholt wurde.

Nach Abschluss der Membranpräparation wurden verschiedene Qualitätsbewertungen durchgeführt. Wies die Probe optisch eine transparente Beschaffenheit auf, deutete dies bereits auf eine gute lamellare Orientierung hin. Weiterhin konnten am STOE Powderdiffraktometer (STOE & CIE, Darmstadt, Deutschland) des Instituts für Chemie; MLU Halle-Wittenberg, Transmissionsspektren aufgenommen werden. Eine lamellar orientierte Membran brachte dabei ein Spektrum abstandsgleicher Reflexe hervor.

Generell sollte die Probenvorbereitung stets so zeitnah wie möglich (maximaler Abstand 1 Woche) vor der Messzeit am V1 Diffraktometer durchgeführt werden. Die Probenlagerung erfolgte unter Luftabschluss bei Raumtemperatur.

III.2.2. Röntgenpulverdiffraktion

Die Röntgenaufnahmen wurden am Messplatz A2 des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB) am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) durchgeführt.

Bei dem Messplatz A2 handelte es sich um eine doppelfokussierende Röntgenkamera. Die Monochromatisierung des weißen Synchrotronstahls erfolgte mit einem Germanium-Einkristallmonochromator, dessen (111)-Netzebene bei einem Streuwinkel von $2\theta = 26,5^\circ$ eine Wellenlänge von 0,150 nm reflektiert. Der Monochromator fokussierte den Strahl durch eine leichte Krümmung in horizontaler Richtung, die Fokussierung in vertikaler Richtung erfolgte über die Krümmung eines vor dem Monochromator horizontal angeordnetem Nickelspiegel. Hierdurch ließ sich die Größe des Röntgenstrahls am Ort des Fokus auf etwa 0,5 mm vertikal und 2 mm horizontal einstellen. Die Wellenlänge des auf die Probe treffenden Strahls beträgt fest eingestellte 0,150 nm. Der Abstand zwischen Probe und Detektor konnte zwischen 5 cm und 300 cm variiert werden.

Zur simultanen Detektion der Reflexe im Klein- und Weitwinkelbereich wurden zwei separate Primärstrahldetektoren mit unterschiedlichem Abstand zur Probe genutzt. Diese Versuchsanordnung gestattete die Aufnahme von Reflexen im Kleinwinkelbereich (Small Angle X-Ray Scattering – SAXS) von $0 < s < 0,5 \text{ nm}^{-1}$ und im Weitwinkelbereich (Wide Angle X-Ray Scattering – WAXS) von $1,8 < s < 3 \text{ nm}^{-1}$. Die Detektorauflösung betrug im SAXS-Bereich 0,0014 und im WAXS-Bereich 0,005 nm⁻¹.

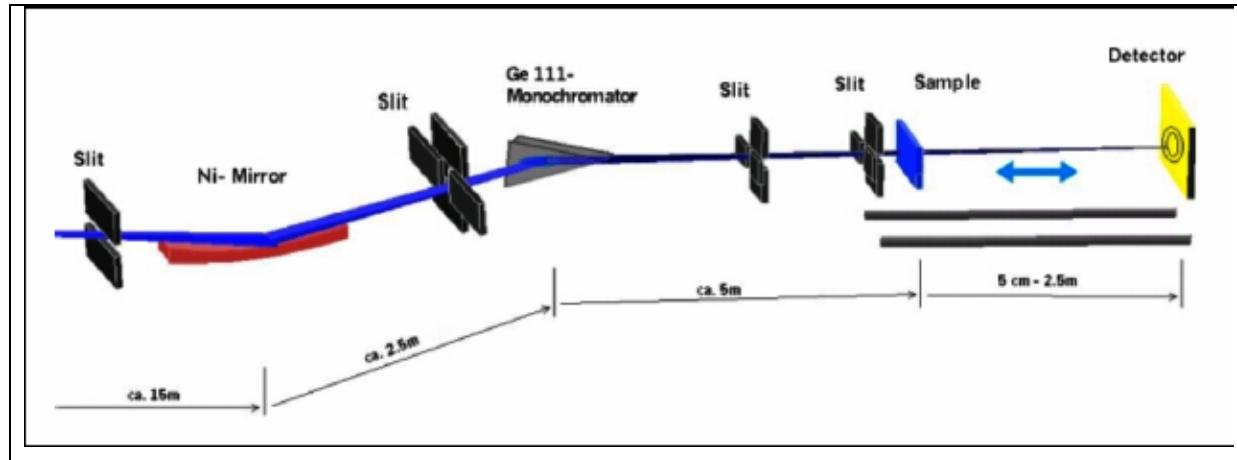


Abb.23 Versuchsanordnung am Messplatz A2 (HASYLAB, DESY)

Die Kalibrierung des Primärstrahldetektor im SAXS-Bereich erfolgte mit einer Rattail-Probe ($d= 65 \text{ nm}$), die des Primärstrahldetektor im WAXS-Bereich über die Weitwinkelreflexe des Tripalmitins. Die Versuchsanordnung gestattete auch temperaturabhängige Messungen. Die Proben wurden in Markröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm und einer Wandstärke von 0,01 mm eingeschmolzen.

Die Auswertung und Bearbeitung der Beugungskurven erfolgte mithilfe der Software Microcal Origin® (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

III.2.2.1. Probenpräparation für Röntgendiffraktionsexperimente

Zur Untersuchung ihres physikochemischen Verhaltens wurden die ω -Acylceramide CER[EOS] und CER[NS] im trockenen sowie im hydratisierten Zustand vermessen. Für ersteres wurde die gereinigte, pulverisierte Substanz über ein Fallrohr in die Röntgen-Glaskapillare (Durchmesser: 1,0 mm) (Firma Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) eingefüllt und das Kapillarenende über einer Flamme zugeschmolzen. Um den Einfluss von Wasser auf das Phasenverhalten beschreiben zu können, wurde eine Ceramid/ Wasser-Mischung im Verhältnis 80/ 20 (m/m) in Eppendorf-Tubes hergestellt. Da die Ceramide nicht wasserlöslich sind, erfolgte lediglich eine Hydratisierung. Um diese zu verbessern, wurde die Mischung im auf 60°C temperierten Wasserbad erwärmt und auf einem Vortexer homogenisiert. Anschließend wurde die Probe in eine Röntgen-Glaskapillare (Durchmesser: 1,0 mm) überführt, die an der Öffnung ebenfalls zugeschmolzen wurde. Die so luftdicht verschlossene Probe wurde bei Raumtemperatur über 48 Stunden equilibriert und dann vermessen.

III.3. FT-Raman-Spektroskopie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem RFS-100 (Bruker, Ettlingen, Deutschland). Das Gerät arbeitet mit einem Nd:YAG Laser als Lichtquelle zur Anregung der Moleküle mit einer Wellenlänge von 1064 nm.

Mit einer Laserleistung von 500 mW wurden die Spektren erfasst, wobei die Auflösung 4 cm^{-1} betrug. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde die Probe mit 200 Scans abgetastet. Für einen Scan von 1,5 s ergibt sich daraus eine Messzeit von etwa 5 min pro Spektrum.

Die Messtemperatur wurde in einem Dewargefäß über einen Bereich von 25°C bis $115^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ geregelt. Die Probe wurde dabei mit einem gleichmäßigen Luftstrom umspült. Die Einstellung der Temperatur des Gasstroms erfolgte über eine Temperaturrezepteinheit (Eurotherm, Limburg an der Lahn, Deutschland). Vor jeder Messung wurde die Probe zur Stabilisierung der Messtemperatur für 5 Minuten temperiert.

Die Auswertung der aufgenommenen Ramanspektren erfolgte über das Softwareprogramm OPUS[®] 4.0 (Bruker, Ettlingen, Deutschland). Dieses Programm ermöglicht es, genaue Peakpositionen der Ramanbanden, die Fläche unter der Bande als Maß für die Intensität der Schwingungen sowie eine Kurvenanpassung zur Zerlegung überlagerter Banden zu ermitteln.

III.4. FT-IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren von CER[AP] und CER[NS] wurden an einem FT-IR Spektrometer IFS 28 der Firma Bruker, Ettlingen, Deutschland, aufgenommen.

III.5. Weitere Methoden

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden mit einem CHNS-932 der Fa. *LECO-Corporation, ST.Joseph, Michigan, USA*, durchgeführt. Die Proben wurden vor der Einwaage über P₂O₅ unter Vakuum getrocknet.

NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden an einem *Bruker AC 500* der Firma Bruker, Ettlingen, Deutschland, mit Tetramethylsilan als innerem Standard bei einer Frequenz von 400 MHz aufgenommen.

Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte an einem *Finnigan MAT 710C* (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland). Zur Injektion der Substanzen diente eine Spritzenpumpe *Havard Apparatus 22* (Instech Laboratories, Inc., Winsum, Niederlande). Die Ionisation wurde im Elektronenspray bei 4,5 KV positiv und negativ durchgeführt.

Das Gerät verfügt über eine auf 200°C beheizbare Kapillare und weist eine Flow-rate von 20µl / min auf. Zum Lösen der Proben wurde ein Lösungsmittelgemisch von Methanol, Wasser und Chloroform unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet.

IV. Ergebnisse und Diskussion

IV.1. Physikochemische Charakterisierung der ω -Acylceramide CER[EOS] und CER[EOP]

Innerhalb der Ceramidfraktion der SC Lipide ist das physikochemische Verhalten einiger Subspezies während der letzten Jahren intensiv mit DSC, Röntgendiffraktion und schwingungsspektroskopischen Methoden wie IR- und Ramanspektroskopie untersucht wurden [zusammengefasst in Wartewig und Neubert 2007]. CER[AS], CER[NP], CER[NS] und CER[AP] ist dabei ein Polymorphismus gemein, der für die Ausbildung der lamellaren SC Lipidstruktur von hoher Bedeutung zu sein scheint. Bei physiologischen Temperaturen zeigen alle Verbindungen kristalline Phasen mit lamellaren Strukturen und hochgeordneten Alkylketten. Zudem scheint die Kopfgruppenpolarität der einzelnen Ceramide einen wichtigen Einfluss auf die Ausbildung der Hautbarrierefunktion zu haben. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit der ω -Acylceramide CER[EOS] und CER[EOP] konnten analoge Untersuchungen zu deren Eigenschaften bisher nicht durchgeführt werden.

Die für die vorliegende Arbeit von Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, zur Verfügung gestellten CER[EOS] und CER[EOP] wurden zunächst über eine MPLC aufgereinigt und massenspektroskopisch aufgeklärt.

Beide Ceramide weisen eine 30-Hydroxy-triacontanseitenkette (C30) auf, deren terminale OH-Gruppe mit einer Linolsäure verestert ist. Im Unterschied zur Sphingosinbase des CER[EOS] weist das CER[EOP] als Phytosphingosin eine zusätzliche OH-Gruppe auf.

An beiden Substanzen wurden Röntgendiffraktionsstudien (DESY, HASYLAB, Hamburg) bzw. Raman-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

IV.1.1. Röntgendiffraktionsstudien an CER[EOS]

Röntgenbeugungsaufnahmen am CER[EOS] im trockenen Zustand zeigten bei 20°C im

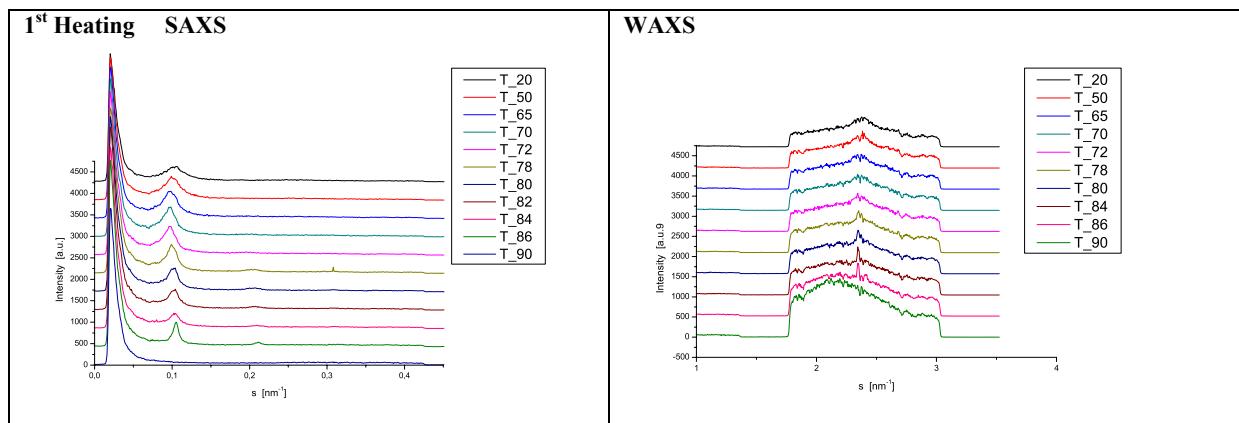


Abb.24 Röntgendiffraktionsmuster von trockenem CER[EOS] bei verschiedenen Temperaturen ($s=1/d$)

Kleinwinkelbereich (SAXS) zwei Reflexe, deren s -Werte sich wie 1:2 verhalten und auf eine lamellare Gelphase hindeuten (Abb.24). Mit steigender Temperatur wurden diese Reflexe zunächst schärfer, d.h. die Korrelation zwischen den Schichten wurde besser, ehe sie am Schmelzpunkt $T=86^\circ\text{C}$ verschwanden. Im WAXS-Bereich konnte unterhalb der Schmelze ein Reflex identifiziert werden, der eine hexagonale Packung der geordneten Kohlenwasserstoffketten anzeigen. Die Kettenquerschnittsfläche, die sich aus diesem Reflex berechnen ließ, betrug $20,4 \text{ \AA}^2$ bei 20°C und erhöhte sich bis kurz unterhalb des Schmelzpunktes auf $21,0 \text{ \AA}^2$. Mit dem Schmelzen ging dieser in einen breiten Halo über, der charakteristisch für geschmolzene Ketten ist und eine im Mittel hexagonale Anordnung flüider Ketten mit geringer Korrelation anzeigen. Beim Abkühlen der Substanz wurde die lamellare Gelphase wieder ausgebildet. Zudem zeigte die WAXS-Region durch zwei auftretende scharfe Reflexe ein orthorhombisches Packen der Ketten. Durch einen zweiten Aufheizvorgang ließen sich folgende Ergebnisse bestätigen:

- i). Das thermotrope Phasenverhalten von CER[EOS] im trockenen Zustand ist reversibel. Die für das Schmelzen notwendigen Temperaturen führten nicht zu einer massiven Strukturveränderung, wie es die aufgrund der ungesättigten Linolsäure-Seitenkette bedingte Empfindlichkeit vermuten lassen würde.
- ii). Im geschmolzenen Zustand wurde keine Überstruktur gefunden. Die Probe befindet sich nicht in einem flüssig-kristallinen Zustand, sondern bildet eine echte Schmelze, die durch größere Aggregate oder Mizellen charakterisiert ist. Durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie könnten diese Aussagen vertieft werden.
- iii). Das gewählte Temperaturprogramm beeinflusst die Kettenpackung. Wurde bei Raumtemperatur zunächst ein hexagonales Gitter indiziert, erhielt man nach der ersten Rekristallisation eine orthorhombische Kettenpackung. Eine der beiden Phasen sollte gegenüber der anderen metastabil sein. Entweder ist die metastabile Modifikation durch die Auskristallisation aus dem Lösungsmittel entstanden (hexagonale Packung) oder durch den Abkühlprozess aus der Schmelze (orthorhombische Packung). Eine Klärung dieser Frage könnte nur durch zeitaufwendige Lagerung der Probe in der Nähe der Schmelztemperatur oder durch Variation der Lösungsmittel erreicht werden.
- iv). Der lamellare Wiederholabstand von $\approx 8 \text{ nm}$ weicht deutlich von den im Zusammenhang mit CER[EOS] diskutierten 12 nm (*Long-periodicity phase LPP*) [Bouwstra et al. 2002] ab. Diese kürzere Periodizität könnte das Resultat einer partiellen Verzahnung zweier sich gegenüberstehender CER[EOS] Moleküle sein.

Analoge Untersuchungen wurden am hydratisierten CER[EOS] durchgeführt (Abb.25).

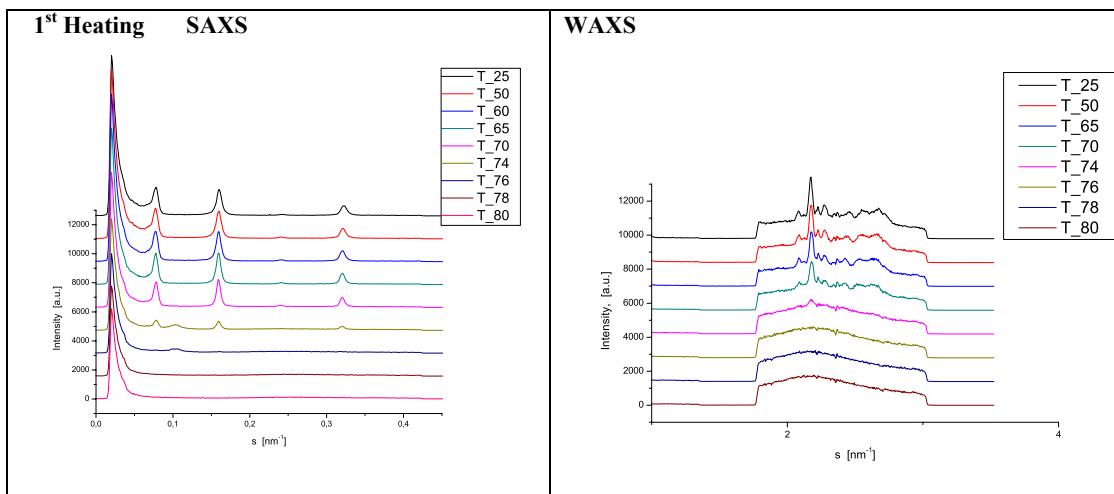


Abb.25 Röntgendiffraktionsmuster von hydratisiertem CER[EOS] bei verschiedenen Temperaturen ($s=1/d$)

Bei 20°C wurden in der SAXS-Region vier Bragg-Reflexe detektiert, deren s -Werte im Verhältnis 1:2:3:4 stehen und somit eine hochgeordnete lamellare Gelphase charakterisieren. Der berechnete d -Wert von 12 nm zeigte die Ausbildung einer LPP. Mit steigenden Temperaturen wurde die Intensität der Reflexe geringer, ehe sie am Schmelzpunkt ($T=74^\circ\text{C}$) verschwanden. In der WAXS-Region waren zwei Bragg-Reflexe zu erkennen, die eine orthorhomatische Kettenpackung charakterisieren. Oberhalb des Schmelzpunktes gingen sie in einen breiten Halo über und zeigten so das Schmelzen der Ketten an. Beim Abkühlen bildete sich wieder die lamellare Gelphase aus, wobei die Ketten wieder eine orthorhomatische Packung aufwiesen, abgeleitet aus den zwei WAXS-Reflexen. Wurde der Reflex mit dem kleineren s -Wert mit (02) und der mit dem größeren s -Wert als degenerierter Reflex (11)+(1 $\bar{1}$) indiziert, so ergab sich eine Kettenquerschnittsfläche von 19,3 Å² bei 25°C und von 20,1 Å² bei 70°C. Auch in diesem Fall stieg die Querschnittsfläche aufgrund erhöhter thermischer Beweglichkeit kontinuierlich an.

Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass in der Schmelze keine geordnete Überstruktur vorlag. Analoge Erkenntnisse existieren bereits auch über andere Ceramid-Subspezies [Raudenkob, Dissertation 2002]. Die größere Periodizität geht auf den Einfluss der Hydratation zurück, ebenso die Absenkung des Schmelzpunktes um $\approx 10^\circ\text{C}$.

IV.1.2. Röntgendiffraktionsstudien an CER[EOP]

In Diskussionen über die Bedeutsamkeit der ω -Acylceramide für die Barrierefunktion des SC wird häufig die einzigartige Kettenlänge angeführt [Bouwstra et al. 2002]. Durch den Vergleich des physikochemischen Verhaltens von EOS und dem eine zusätzlich OH-Gruppe tragenden EOP sollte vor allem der Einfluss der Kopfgruppenpolarität beleuchtet

werden. Zumal Röntgendiffraktionsstudien an EOS und/oder EOP enthaltenen synthetischen SC Lipidmischungen deutliche Unterschiede in der Ausbildung der lamellaren Lipidorganisation hervorbrachten [de Jager et al. 2004].

CER[EOP] wies in Röntgenkleinwinkeluntersuchungen im trockenen Zustand bei Raumtemperatur bereits eine signifikant höhere Orientierung auf als CER[EOS] (Abb.26).

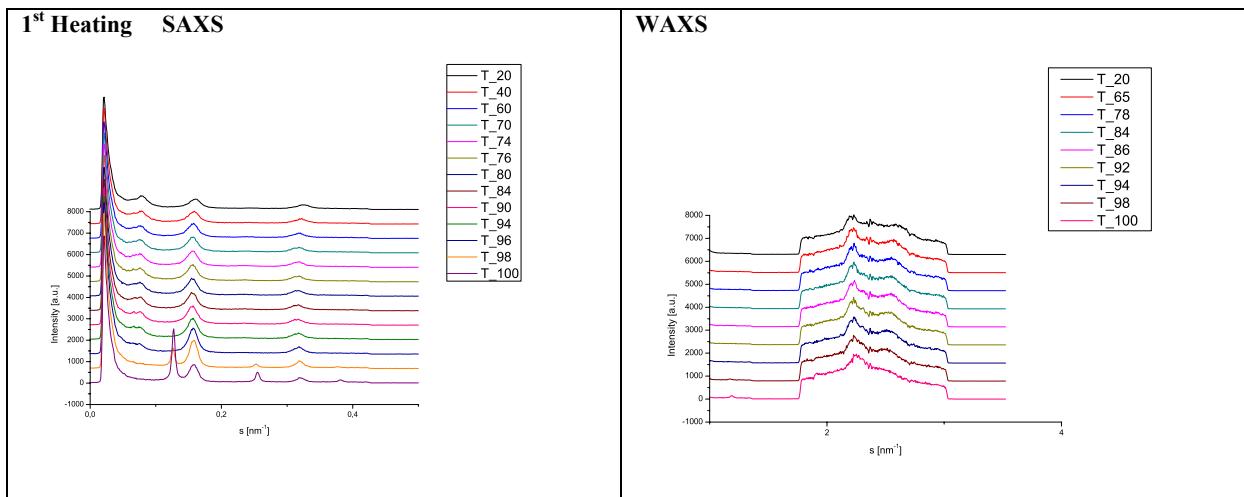


Abb.26 Röntgendiffraktionsmuster von trockenem CER[EOP] bei verschiedenen Temperaturen

Der lamellare Wiederholabstand von 12,5 nm (LPP) entsprach der Größe einer Schicht zweier gegenüberstehender CER[EOP]-Moleküle. Es wird vermuten, dass das CER[EOP] aufgrund der höheren Polarität ein größeres Wasserstoffbrückenbindungssystem als Rückgrat des lamellaren Systems aufbaut und sich ein partielles Verzahnen der Kettenenden resultierend in einem verkürzten *d*-Wert, wie für CER[EOS] diskutiert, nicht ergibt.

Mit zunehmender Temperatur nahm die Intensität der Reflexe zu, wobei aufgrund des limitierten Temperaturprogramms an der Beamline A2 ein Schmelzen nicht beobachtet werden konnte. Im Unterschied zu CER[EOS], das bei T=86°C schmilzt, befand sich der Schmelzpunkt des CER[EOP] oberhalb von 100°C, was bereits aus DSC- und Ramanuntersuchungen bekannt war. Dieser Unterschied basiert auf der größeren Kopfgruppenpolarität des CER[EOP], denn eine höhere Anzahl von OH-Gruppen bedingt ein größeres Ausmaß an H-Brücken, die eine höhere Energie im Schmelzprozess erfordern.

Interessanterweise tritt ab 98°C eine zweite lamellare Phase mit einem kürzeren *d*-Wert (\approx 8 nm) auf, der der für trockenes CER[EOS] beobachteten Phase entspricht. Es wird vermutet, dass bei 100°C bereits ein großer Anteil des Wasserstoff-Bindungssystems aufgehoben war und sich eine Phase ausbildete, die aus zwei sich gegenüberstehenden

CER[EOP]-Molekülen mit partiellem Verzahnen der Ketten in der Membranmitte gebildet wurde.

In der WAXS-Region wurde im Unterschied zu CER[EOS] aus dem Auftreten zweier Reflexe auf eine orthorhomatische Kettenpackung geschlossen. Der zweite Reflex näherte sich mit steigender Temperatur langsam dem ersten Reflex an, so dass die Verzerrung des Gitters allmählich aufgehoben wurde und der Übergang zu hexagonaler Kettenpackung angedeutet war.

Das Abkühlen der Probe zeigte bei 91°C das Verschwinden der zweiten Phase und deutete damit an, dass ein Großteil der H-Bindungen wieder ausgeprägt wurde.

Zusätzlich wurde CER[EOP] auch in Mischung mit Wasser vermessen, um den Einfluss der Hydratation auf die strukturelle Anordnung zu untersuchen (Abb.27).

Die SAXS-Bilder bei 25°C zeigen mehrere Bragg-Peaks, deren s -Werte im Verhältnis 1:2:3:4 die Existenz einer hochgeordneten lamellaren Gelphase mit dem Wiederholabstand $d = 12,5$ nm bewiesen. Da diese Phase der im trockenen Zustand beobachteten entspricht, wurde geschlussfolgert, dass keine merkliche Hydratation der Kopfgruppen auftritt. Wasser hat keinen Einfluss auf die Ausbildung der LPP. Diese Erkenntnis markiert einen wesentlichen Unterschied zum CER[EOS], das erst nach Zusatz von Wasser eine Phase im Größenordnungsbereich einer LPP ausbildete.

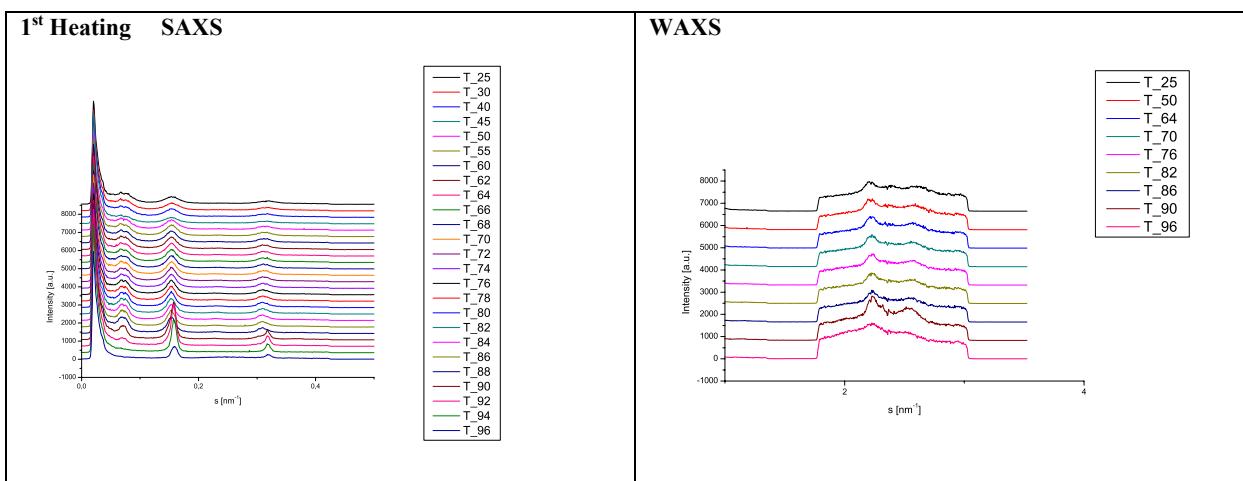


Abb.27 Röntgendiffraktionsmuster von hydratisiertem CER[EOP] bei verschiedenen Temperaturen

Mit steigender Temperatur nahm die Intensität der Reflexe ab und ähnlich zum trockenen Zustand konnte der Schmelzpunkt nicht unterhalb von 100°C beobachtet werden. Außerdem wurde die Existenz einer zweiten lamellaren Phase für das hydratisierte CER[EOP] nicht beobachtet.

Anhand der WAXS-Bilder konnte aus den zwei detektierten Reflexen erneut auf ein orthorhomatisches Kettengitter geschlussfolgert werden.

Beim Abkühlen bildeten sich die scharfen Reflexe wieder aus. Ein zweiter Temperaturscan bestätigte die Erkenntnisse, die noch einmal zusammengefasst werden:

- i). Die Kopfgruppenstruktur der Acylceramide beeinflusst maßgeblich das thermotrope Phasenverhalten. Im Unterschied zu CER[EOS] vermag das polarere CER[EOP] schon im trockenen Zustand eine LPP auszubilden.
- ii). Im trockenen Zustand bildet das CER[EOP] ab 98°C eine zweite lamellare Phase aus, die mit der des CER[EOS] vergleichbar ist.
- iii). Aufgrund des ausgedehnten intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungssystems besitzt CER[EOP] einen Schmelzpunkt oberhalb von 100°C.
- iv). Sowohl im trockenen Zustand als auch nach Zusatz von Wasser weisen die Ketten eine hochgeordnete orthorhombische Packung auf.

Um das Wissen über die Eigenschaften des CER[EOP] zu vertiefen, wurde anhand der WAXS-Bilder die laterale Kettenpackung studiert.

Ein starker Reflex bei 0,41 nm zeigt eine hexagonale Packung mit einer Kettenquerschnittsfläche von $19,4 \text{ \AA}^2$ an, wohingegen zwei Reflexe bei 0,41 und 0,37 nm (entsprechen $q = 15,40$ und $17,22 \text{ nm}^{-1}$) auf eine orthorhombische Kettenpackung mit einer extrem kleinen Kettenquerschnittsfläche von $18,0 \text{ \AA}^2$ hinweisen [Bouwstra 2006]. Diese sehr dichte Anordnung der Alkylketten bedingt eine geringe Permeabilität für verschiedene Substanzen [Bouwstra 2006]. Wie bereits beschrieben, zeigen die WAXS-Bilder von CER[EOP] im trockenen Zustand ein orthorhombisches Kettengitter (Reflexe bei 0,45 und 0,38 nm). Zwischen 20 und 98°C verschiebt sich der 0,38 Reflex systematisch zu größeren d -Werten, wobei der Reflex bei 0,45 nm nur geringfügig zu kleineren d -Werten trifft. Da beide Reflexe sich allmählich annähern, kann von einem angedeuteten Übergang zur hexagonalen Packung ausgegangen werden. In dieser Packung sind die Ketten rotationssymmetrisch, woraus eine weniger dichte Packung resultiert, die eine höhere Durchlässigkeit für viele Substanzen zur Folge hat. In Abb.28 ist die Temperaturabhängigkeit der 0,45 und 0,38 nm Reflexe jeweils dargestellt.

Um detaillierte Aussagen über die laterale Kettenpackung machen zu können, wurde die Fläche pro Alkylkette aus den korrespondierenden q -Werten berechnet. Bei 20°C entsprechen die zwei Reflexe bei 0,45 und 0,375 nm q -Werten von 13,94 und $16,757 \text{ nm}^{-1}$. Die Fläche pro Alkylkette wurde daraus zu $18,6 \text{ \AA}^2$ berechnet und beschreibt sinnvoll die hohe Packungsdichte einer orthorhombischen Phase.

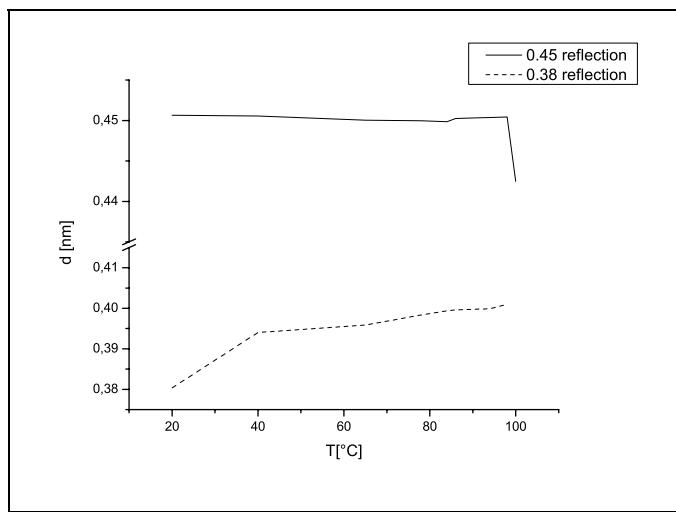


Abb.28 Temperaturabhängigkeit der d-Werte des 0,45 (durchgezogene Linie) und des 0,38 nm (gestrichelte Linie) Reflexes.

Mit steigender Temperatur nimmt die Packungsdichte ab. Der Kettenquerschnitt steigt auf $19,0 \text{ \AA}^2$ bei 98°C an. Die Einheitszelle ist rechtwinklig, so dass die Entfernung zwischen benachbarten Molekülen in unterschiedlichen Richtungen unterschiedlich ist. Die dichte Packung kann nur durch eine drastische Einschränkung der Rotation um die Längsachse erreicht werden, was in eine Art von *herringbone* Packung mündet.

Ein weiterer Parameter zur Beschreibung von lateralen Kettenpackungen ist die Verzerrung des Gitters der Alkylketten, welche aus den Halbachsen der Ellipse, die die sechs nächsten Nachbarn in einem Kettengitter verbindet, berechnet werden kann [Bringezu et al. 2002].

Für 20 und 98°C beträgt die Gitterverzerrung 0,2286262 bzw. 0,183044. Die Reduzierung der Verzerrung mit steigender Temperatur zeigt den langsamen Übergang vom orthorhombischen zum hexagonalen Kettengitter an, da die hexagonale Phase *per se* unverzerrt ist.

Zusammenfassend zeigten die WAXS-Bilder von wasserfreiem CER[EOP] eine orthorhombische Kettenpackung bei $T < 100^\circ\text{C}$. Bei 100°C deutet sich der Übergang zum hexagonalen Gitter an. Durch die Berechnung spezieller Parameter wie der Fläche pro Alkylkette und der Verzerrung des Kettengitters konnten diese Aussagen bestätigt und vertieft werden. Das Schmelzen der Ketten, angezeigt durch einen breiten Halo konnte aufgrund des begrenzten Temperaturprogramms nicht beobachtet werden.

Das Kettengitter ändert sich durch Wasserzugabe stärker als der d-Wert im Kleinwinkelbereich. Die Kopfgruppen scheinen leicht zu hydratisieren, aber es bildet sich keine merkliche Wasserschicht zwischen den CER[EOP]-Schichten aus. Das Kettengitter bleibt zwar orthorhombisch aber die Ketten benötigen etwas mehr Platz. Die berechnete

Kettenquerschnittsfläche betrug nach Wasserzugabe $19,2 \text{ \AA}^2$ bei 25°C und erhöhte sich auf $19,8 \text{ \AA}^2$ bei 90°C .

Abschließend kann über die röntgenspektroskopischen Untersuchungen an den beiden ω -Acylceramiden CER[EOS] und CER[EOP] festgestellt werden, dass beide Ceramide die Ausbildung einer lamellaren Phase mit einem Wiederholabstand von $\approx 12 \text{ nm}$ (LPP) induzieren. Für CER[EOS] wurde diese Phase erst nach Hydratation beobachtet, wohingegen CER[EOP] bereits im trockenen Zustand die entsprechenden Reflexe zeigte. Es bleibt festzuhalten, dass die Eigenschaft zur Ausbildung einer LPP, die in der Literatur häufig ω -Acylceramiden enthaltenen SC Lipidmischungen zugewiesen wird [Bouwstra et al. 1998; de Jager et al. 2005], nach unserem Kenntnisstand nur auf die reinen Ceramide bezogen werden kann. In einer homogenen Mischung essentieller SC Lipide kann nicht davon ausgegangen werden, dass allein die Anwesenheit eines ω -Acylceramids die Ausbildung einer LPP induzieren kann.

IV.1.3. Raman-spektroskopische Untersuchungen an CER[EOS] und CER[EOP]

Die Untersuchungen am CER[EOS] wurden mittels FT-Raman-Spektroskopie in einer den Röntgenbeugungsexperimenten analogen Weise durchgeführt.

Die Ramanspektren von trockenem CER[EOS] sind in Abb. 29 für einige ausgewählte Temperaturen dargestellt. Interessanterweise lassen sich sowohl keine LAM-Moden ($<300\text{cm}^{-1}$) als auch keine CH_3 Rocking Mode (890cm^{-1}) detektieren. Das Kettenende des ω -Acylceramids weist folglich keine *all-trans* Konformation (ttt) am Kettenende auf. Dieser Effekt basiert möglicherweise auf den zwei konjugierten Doppelbindungen im Linolsäurerest, der eine erhöhte Kettenbeweglichkeit und folglich keine hochgeordnete Kettenanordnung bedingt. Vergleichsmessungen an reiner Linolsäure zeigten ebenfalls nicht obige Banden. Die Aufsplittung der CH_2 -scissoring Bande in ein Duplett deutet auf ein hexagonales laterales Kettenpacken hin. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen aus den Röntgenstreuuntersuchungen überein.

Aus dem Auftreten verschiedener Raman-Banden kann man auf den Ordnungszustand der Kohlenwasserstoffketten schließen.

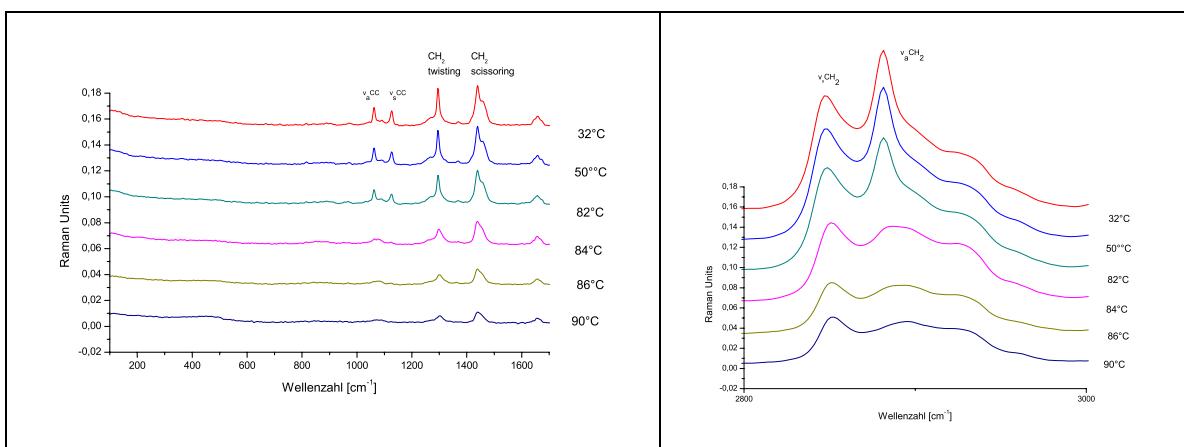


Abb.29 Raman-Spektren von CER[EOS] trocken bei ausgewählten Temperaturen in den Spektralbereich 100-1650 cm⁻¹ (links) und 2800-3000 cm⁻¹ (rechts)

Die Bandenposition der symmetrischen Valenzschwingung der CH₂-Gruppen ist ein Maß für den Ordnungszustand von Alkylketten. Der ist umso größer, je niedriger die Bandenposition ist [Mendelsohn und Moore 1998; Raudenkolb et al. 2003]. Anhand der Positionsänderung dieser Bande in Abhängigkeit von der Temperatur kann die Änderung der Kettenordnung verfolgt werden (Abb.30).

Bei Raumtemperatur beträgt die Position der symmetrischen Valenzschwingung 2846,2 cm⁻¹. Dieser Wert zeigt ebenfalls keine hochgeordnete Struktur an, da in diesem Falle die Bandenposition Werte >2845 cm⁻¹ annimmt [McPhail et al. 1984; Raudenkolb, Dissertation 2002]. Beim Aufheizen verschiebt sich die Bande kontinuierlich zu höheren Wellenzahlen. Zwischen 80 und 90°C erfolgt eine sprunghafte Verschiebung

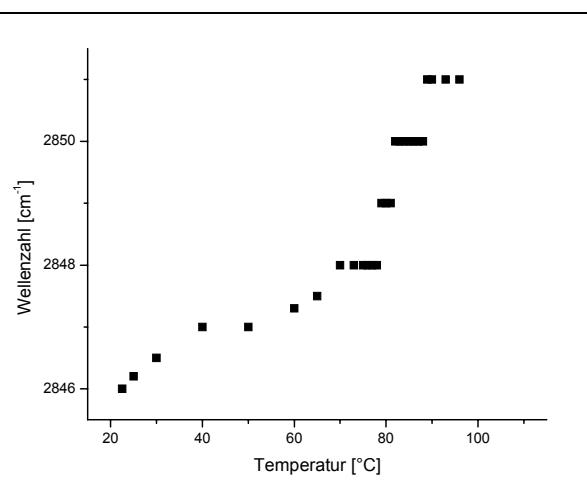


Abb.30 Temperaturabhängige Änderung der Bandenposition der symmetrischen Valenzschwingung der Methylengruppen von CER[EOS] trocken

um 2,2 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen. Daraus wird ersichtlich, dass die Kettenordnung während des Phasenübergangs deutlich abnimmt und der erreichte Endwert von 2851,9 cm⁻¹ zeigt den geschmolzenen Zustand an, der mit dem Verlust jeglicher Ordnung der Alkylkette einhergeht [Snyder et al. 1982]. Dieses Ergebnis stimmt mit den Röntgenuntersuchungen am trockenen CER[EOS] überein, dessen Schmelzpunkt bei 86°C detektiert wurde. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den

Umwandlungstemperaturen ergeben sich aus den unterschiedlichen Temperaturregimen beider Methoden.

Des Weiteren ist das Verhältnis der Bandenpositionen zwischen symmetrischer und antisymmetrischer CH₂-Valenzschwingung von den Konformationen der Alkylketten abhängig [Wang et al. 2000]. Zur Berechnung dient der Quotient aus den beiden nach Kurvenanpassung erhaltenen Flächen der Banden (Gleichung), normiert auf 1:

$$I = \frac{\int v_{as}(CH_2)}{\int v_s(CH_2)} \quad \text{Gleichung 12}$$

Dieser Wert erlaubt Aussagen über das Verhältnis von *trans*- und *gauche*-Konformeren, da eine Abnahme von *trans*-Konformeren mit einer Flächenabnahme der antisymmetrischen CH₂-Valenzbande verbunden ist. Abb.31 zeigt das temperaturabhängige Verhältnis zwischen symmetrischer und antisymmetrischer CH₂-Valenzschwingung.

Während des Aufheizens ist eine ständige

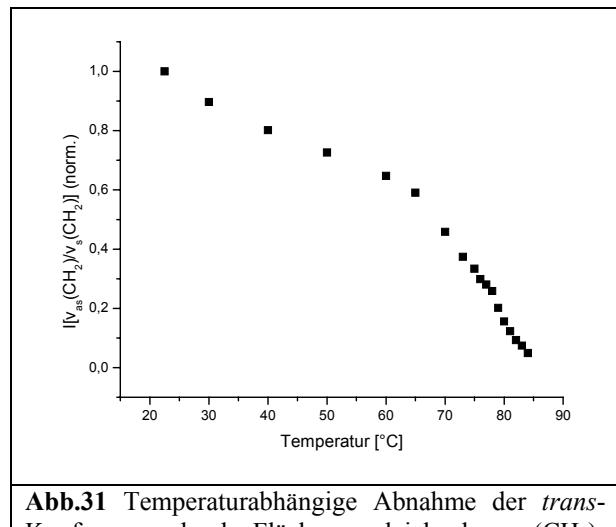


Abb.31 Temperaturabhängige Abnahme der *trans*-Konformere durch Flächenvergleich der $v_{as}(CH_2)$ - und $v_s(CH_2)$ -Banden bei CER[EOS]

Zunahme an *gauche*-Konformeren zu beobachten, indiziert durch eine Abnahme des Quotienten. Im Bereich des Phasenübergangs erfolgt eine sprunghafte Abnahme der Anzahl von jeweils drei oder mehr zusammenhängenden *trans*-konfigurierten Methylengruppen und am Schmelzpunkt tendiert dieser gegen 0%.

Zusammenfassend zeigten die Raman-spektroskopischen Untersuchungen an CER[EOS] im trockenen Zustand lediglich einen Phasenübergang vom kristallinen in den flüssigen Zustand. Aufgrund der extrem langen ω -Acylseitenkette, deren Kettenende eine hohe Beweglichkeit aufweist, weisen die Alkylketten keine hohe Ordnung auf, wie sie von anderen Ceramiden bekannt ist [Raudenkolb, Dissertation 2002].

Analog zu den Untersuchungen am CER[EOS] wurde auch das wasserfreie CER[EOP] charakterisiert. In Abb.32 sind die Ramanspektren bei ausgewählten Temperaturen dargestellt. In Übereinstimmung zum CER[EOS] weisen auch diese Spektren weder eine LAM noch eine CH₃ Rocking Mode auf. Auch CER[EOP] verfügt über keine endständige *all-trans* Konfiguration. Auch hierfür wird die Kettenbeweglichkeit auf den terminalen ungesättigten Linolsäurerest zurückgeführt.

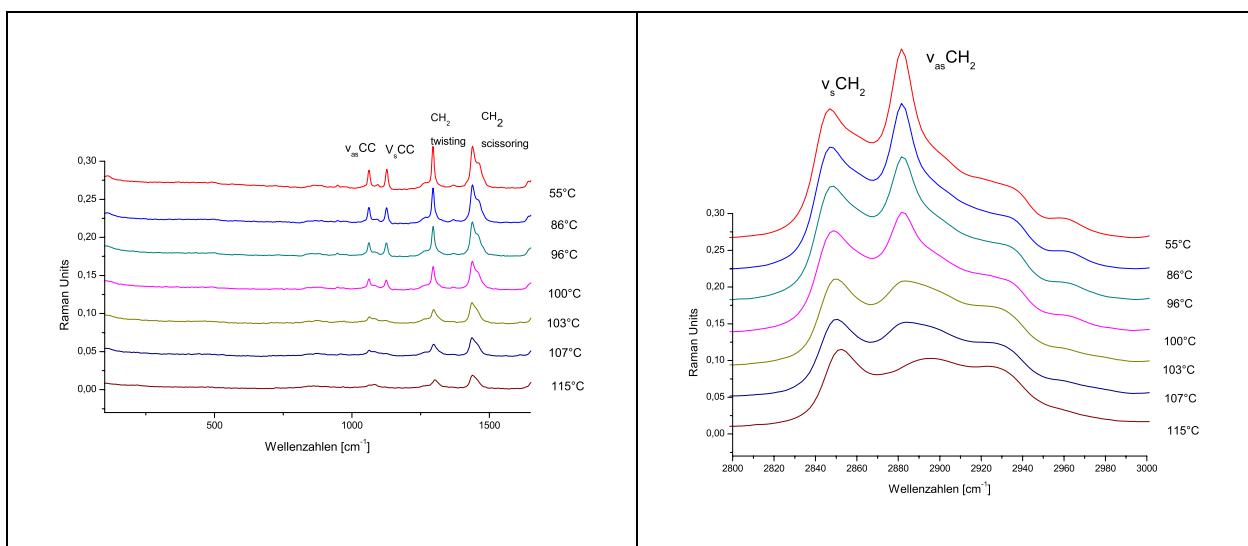


Abb.32 Raman-Spektren von CER[EOP] trocken bei ausgewählten Temperaturen in den Spektralbereich 100-1650 cm⁻¹ (links) und 2800-3000 cm⁻¹ (rechts)

Aus der Bandenposition der symmetrischen CH₂-Valenzschwingung sollte auf den Ordnungszustand der Alkylketten geschlossen werden. Wie aus Abb.33 ersichtlich lag diese Bande bei Raumtemperatur bei 2846,9 cm⁻¹.

Dieser Wert ist vergleichbar mit dem des CER[EOS] und zeigt an, dass die vorliegende Ordnung weniger hoch ist, als sie von anderen, kürzerkettigen Ceramiden bekannt ist [Raudenkob, Dissertation 2002].

Im Unterschied zu CER[EOS] zeigt die Temperaturabhängigkeit der Bandenposition (Abb.33) deutlich zwei Sprünge bei 98°C und 105°C. Dieses partielle Schmelzen der Ketten ist mit dem beobachteten Übergang von der orthorhombischen zur hexagonalen Kettenpackung verknüpft, der in den Röntgenstreuuntersuchungen an trockenem CER[EOP] bei T=98°C beobachtet wurde. Der zweite Übergang zeigt dann das vollständige Kettenschmelzen an, da auch die finale Bandenposition von 2853 cm⁻¹ den geschmolzenen Zustand mit dem Verlust jeglicher Ordnung der Alkylketten indiziert. Um vergleichende Aussagen auch über das

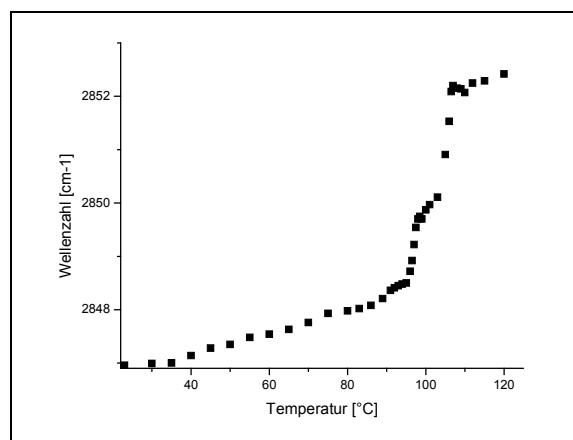


Abb.33 Temperaturabhängige Änderung der Bandenposition der symmetrischen Valenzschwingung der Methylengruppen von CER[EOP] trocken

Verhältnis von *trans*- zu *gauche*-Konformeren machen zu können, wurde wiederum der Quotient aus den beiden nach Kurvenanpassung erhaltenen Flächen der Banden der symmetrischen und der antisymmetrischen CH₂-Valenzschwingungen ermittelt.

In dieser Darstellung (Abb.34) ist die stetige Zunahme an *gauche*-Konformeren zu beobachten, resultierend in einer Aufhebung des Ordnungszustandes der Alkylketten. In den Temperaturbereichen der zwei Phasenumwandlung erfolgt eine sprunghafte Abnahme des Quotienten und im Bereich der Kettenschmelze ($T>105^{\circ}\text{C}$) tendiert der Anteil von jeweils drei zusammenhängenden *trans*-konfigurierten Methylengruppen gegen 0%.

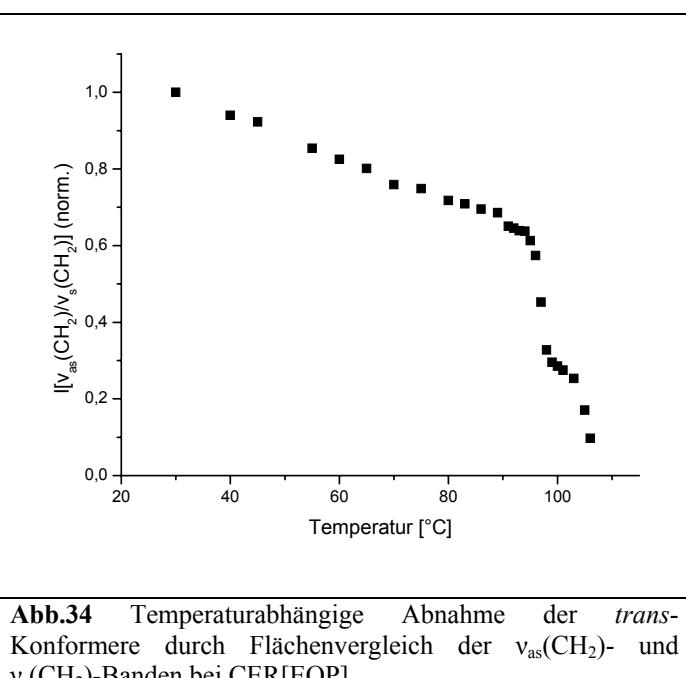


Abb.34 Temperaturabhängige Abnahme der *trans*-Konforme durch Flächenvergleich der $v_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ - und $v_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ -Banden bei CER[EOP]

Zusammenfassend zeigten die physikochemischen Untersuchungen an CER[EOS] und [EOP] keinen Polymorphismus, wie er von kürzerkettigen Ceramiden bekannt ist (Raudenkob, Dissertation 2002). Der extrem lange Acylseitenrest hat einen großen Einfluss auf das Verhalten der beiden Ceramide und übertrifft offensichtlich den der Kopfgruppe, denn ein auftretender Polymorphismus wird häufig in Zusammenhang mit dem polaren Molekülteil diskutiert [Wartewig und Neubert 2007].

Dennoch hat die zusätzlichen OH-Gruppe des CER[EOP] verglichen mit dem CER[EOS] einen Einfluss auf den *d*-Wert der lamellaren Phase und auf die Kettenpackung. Das unpolarere CER[EOS] untersteht offensichtlich dem Einfluss der langen Seitenkette und erst im hydratisierten Zustand bildet sich ein auf H-Brücken gestütztes Rückgratsystem aus Kopfgruppen aus, resultierend in der Ausbildung einer LPP. Im polareren CER[EOP] wird dieses Rückgrat bereits im wasserfreien Zustand ausgebildet, resultierend in einer LPP und einer hochgeordneten Packung der Alkylketten.

Vertiefende und weiterführende Untersuchungen an beiden Ceramiden sollen diese Ergebnisse fortführen.

IV.2. Darstellung des CER[NS] und der deuterierten Derivate CER[NS]-D2; CER[NS]-D3 und CER[NS]-D47

Die im Folgenden beschriebenen Synthesen des CER[NS] und der partiell deuterierten Derivate CER[NS]-D2, CER[NS]-D3 und CER[NS]-D47 erfolgte in Zusammenarbeit mit der Erstellung der Diplomarbeit von Adam Wille [Wille, Diplomarbeit 2008].

Die Auswahl der Zielsubstanzen ergab sich aus folgenden Gründen:

1. CER[NS] tritt innerhalb der Ceramidfraktion des SC am häufigsten auf [Wertz und van den Bergh 1991; Farwanah et al. 2005] und seine Charakterisierung u.a. in Neutronenstreuuntersuchungen an multilamellaren Modellmembranen ist gerechtfertigt.
2. Durch etablierte Synthesewege und analytisches Aufklären der Substanz erhält man eine genau definierte Struktur für eine gute Korrelation zu den physikalischen Messergebnissen.
3. Zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Beobachtungen zum CER[AP], dessen sehr polare Kopfgruppenstruktur großen strukturbestimmenden Einfluss auf multilamellare SC Lipid-Modellmembranen hat, stellt das CER[NS] mit einer wesentlich geringeren Kopfgruppenpolarität einen geeigneten Vergleich dar.

Zunächst wurde das undeuterierte **CER[NS]** nach der von Ramsany et al. [1982] beschriebenen Methode über ein gemischtes Anhydrid dargestellt (Syntheseweg siehe Abb.35).

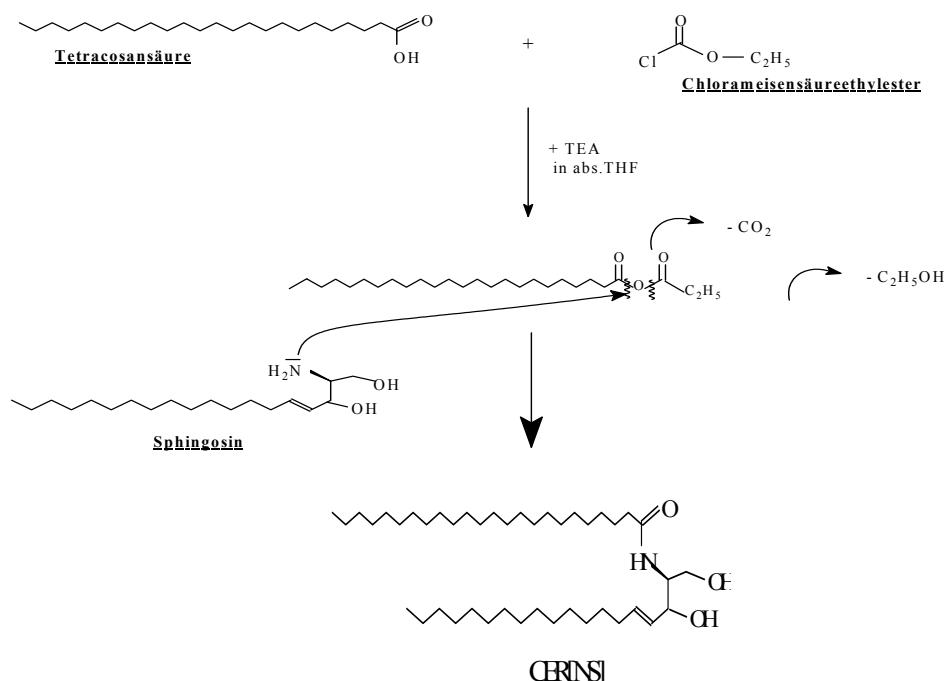


Abb.35 Darstellung des CER[NS] über ein gemischtes Anhydrid

Dazu wurde zunächst die Tetracosansäure in abs. THF gelöst. Die Hinzugabe von Triethylamin (TEA) bedingte die Einstellung eines basischen pH-Wertes, wodurch das Proton der Säure leichter abgespalten wurde. Das erhaltene Carboxylat wies am Sauerstoff eine ausgeprägte Nukleophilie auf und reagierte mit dem zugegebenen Chlorameisensäureethylester. Wie aus der Literatur [Ehlers 1999] bekannt, weisen Säurehalogenide bzw. deren Derivate aufgrund der starken elektronenziehenden Wirkung des Chlorids einen Elektronenmangel am Carbonyl-Kohlenstoff auf. Dort erfolgte der Angriff des nukleophilen Carboxylats mit Bildung des gemischten Anhydrids unter Abspaltung von HCl.

Das gemischte Anhydrid wies als Carbonsäurederivat ebenfalls eine hohe Reaktivität auf [Ehlers 1999]. Aufgrund elektronenziehender Effekte wurde der elektrophile Carbonyl-Kohlenstoff der Fettsäure von der primären Amingruppe des Sphingosins als Nukleophil angegriffen. Dabei kam es zur Abspaltung eines Halbesters der Kohlensäure, der nach der Erlenmeyer-Regel [Ehlers 1999] instabil ist und zu Ethanol und CO₂ zerfiel.

Diese Umsetzung verlief glatt und konnte bei milden Bedingungen (Rühren bei RT) durchgeführt werden. Das erhaltene CER[NS] wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und in einer Ausbeute von 64% erhalten. Es wies eine definierte Struktur mit einer C24-Acylseitenkette und einer C15-Sphingosinkette auf. Es wurde vornehmlich zur Präparation multilamellarer Modellmembranen für Neutronenstreuexperimente eingesetzt. Um Aussagen über die genaue Lokalisation des Ceramids in der Modellmembran machen zu können, sollten spezifische Deuterierungen am CER[NS] durchgeführt werden, die eine Erhöhung des lokalen Kontrasts in Neutronenstreuexperimenten bedingen.

Für die Auswahl der Zielstrukturen bestand dabei die Frage, an welcher Stelle und in welchem Umfang Deuterierungen einen sinnvollen Beitrag zur Strukturaufklärung liefern können.

So wurde festgelegt, den Einbau von Deuteriumatomen in der Acylseitenkette durchzuführen, zum einen in *alpha*-Position zur polaren Kopfgruppe ([CER[NS]-D2), weiter in *omega*-Position (CER[NS]-D3), als auch alle Wasserstoffatome gegen Deuteriumatome auszutauschen (CER[NS]-D47).

Die Synthese letzterer Verbindung gestaltete sich am einfachsten, da die Tetracosansäure-D47 käuflich erworben werden konnte und für die Verknüpfung mit dem Sphingosin die oben beschriebene Methode nach Ramsany et al. [1982] sich als geeignet erwiesen hatte.

Bei der Durchführung eines Probeansatzes wurde allerdings ein Produktgemisch aus freier, nicht umgesetzter perdeuterierter Fettsäure, Anhydrid und gekoppelten **CER[NS]-D47** erhalten, das sich nicht aufreinigen ließ. Aufgrund des hohen Preises des Ausgangsstoffs Tetracosansäure-D47 wurde nach einem alternativen Syntheseweg unter Verwendung des in der Peptidchemie häufig eingesetzten Kupplungsreagenz EEDQ (*N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin) gesucht. EEDQ kann mit Carbonsäuren *in situ* aktivierte Zwischenprodukte bilden, die an der Carbonylposition eine hohe Folgereaktivität aufweisen. Für die vorgesehene Reaktion empfahl sich der Einsatz dieser Substanz aufgrund bekannt guter Ausbeuten, der einfachen synthetischen Handhabung und der später leicht durchzuführenden Abtrennung des Nebenproduktes Chinolin (Syntheseschema Abb.36).

In einer Eintopfreaktion bedingte zunächst die Deprotonierung der Säure eine Protonierung des Ethoxysubstituenten am EEDQ unter Abspaltung von Ethanol. Das sich so kurzzeitig bildende Kation induzierte unter Anlagerung des Carboxylats eine Umacetalisierung mit Ausbildung des Aromaten Chinolin und des gemischten Anhydrids. Die Entstehung eines instabilen Intermediats mit einer hohen Triebkraft zur Rückbildung des aromatischen Systems war zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

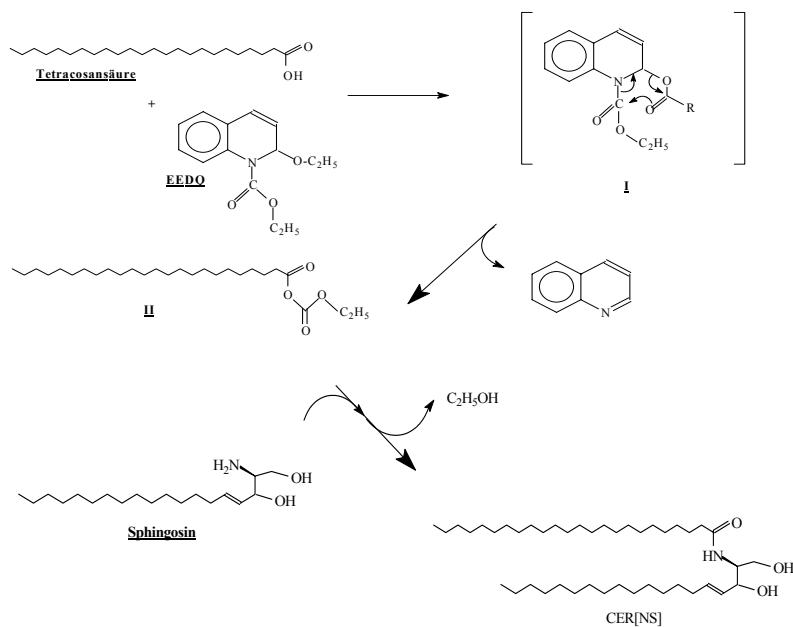


Abb.36 Darstellung des CER[NS]-D47 unter Verwendung des Kopplungsreagens EEDQ. Wegen der besseren Übersichtlichkeit wurden die 47 Deuteriumatome der Acylseitenkette nicht eingezeichnet.

Das Anhydrid wies als Carbonsäurederivat aufgrund der elektronenziehenden Effekte des Sauerstoffs eine hohe Elektrophilie am Carbonyl-Kohlenstoff auf, der sich gut mit der primären Amingruppe des Sphingosins unter Ausbildung des CER[NS]-D47 umsetzte.

Auch hierbei wies der intermediär gebildete Kohlensäure-Halbester eine Instabilität auf und zerfiel zu CO₂ und Ethanol.

Bei der Darstellung des **CER[NS]-D2** bestand das Problem darin, dass die Tetracosan-2,2-D2-säure kommerziell nicht verfügbar war und dieser Ausgangsstoff zunächst synthetisiert werden musste (Abb.37).

Da die beiden auszutauschenden Protonen keiner funktionellen Gruppe angehörten, konnten sie nicht über eine Modifikation dieser ins Molekül eingeführt werden. Da sich die relevanten Wasserstoffatome in *alpha*-Position zur Carboxylfunktion befinden, bedingt deren –I-Effekt eine Azidität der Protonen, die eine Substitution erleichtert.

Um diesen Effekt zu verstärken, wurde zunächst die Tetracosansäure in den Methylester überführt, da die Estergruppe stärkere elektronenziehende Eigenschaften besitzt.

Im zweiten Schritt wurden dann zunächst in einer aus Natrium und deuteriertem Methanol CH₃OD erzeugten basischen Na-methanolat-lösung die zwei Wasserstoffatome gegen Deuterium-Atome ausgetauscht. Im Anschluss erfolgte die Esterspaltung in D₂O/ DCl unter Bildung der freien Säure.

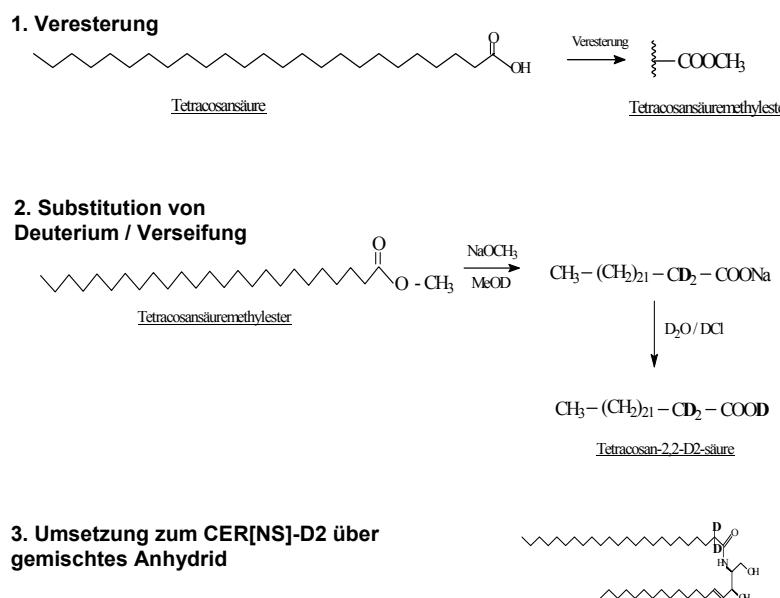


Abb. 37 Schema zur Darstellung des CER[NS]-D2

Die Reaktion fand unter milden Reaktionsbedingungen (Röhren bei RT in Ethanol) statt und hatte den Vorteil, dass aufgrund der geringeren Nukleophilie des Alkohols verglichen mit der eines Amines der Alkohol und die Carbonsäure nicht zum Ester reagierten.

Im Anschluss erfolgte die Umsetzung der Tetracosansäure-D2 mit Sphingosin unter Verwendung des Kupplungsreagens EEDQ zum CER[NS]-D2, das nach säulen-

chromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 66% erhalten wurde.

Die aufwendigsten Synthesearbeiten waren zur Darstellung des **CER[NS]-D3** bzw. der Vorstufe 24,24,24-D3-Tetracosansäure notwendig (Abb.38). Im Unterschied zu CER[NS]-D2 befand sich hierbei allerdings in unmittelbarer Nachbarschaft zur *omega*-Position keine elektronenziehende Gruppe, so dass die Fettsäurekette partiell aus geeigneten Molekülsequenzen aufgebaut werden musste.

Ausgangssubstanz war die Tridecandisäure, die zunächst zum Dimethylester umgesetzt wurde [Organikum 1999]. Im nächsten Schritt erfolgte die selektive Monoverseifung zum Tridecandisäuremonomethylester durch Hinzugabe von Ba(OH)₂. Das schnell gebildete Bariumsalz, das im Anschluss mit HCl gespalten wurde, war schwerlöslich, fiel aus und befand sich nicht mehr im Reaktionsgleichgewicht.

Darstellung der in ω -Position deuterierierten Tetracosansäure

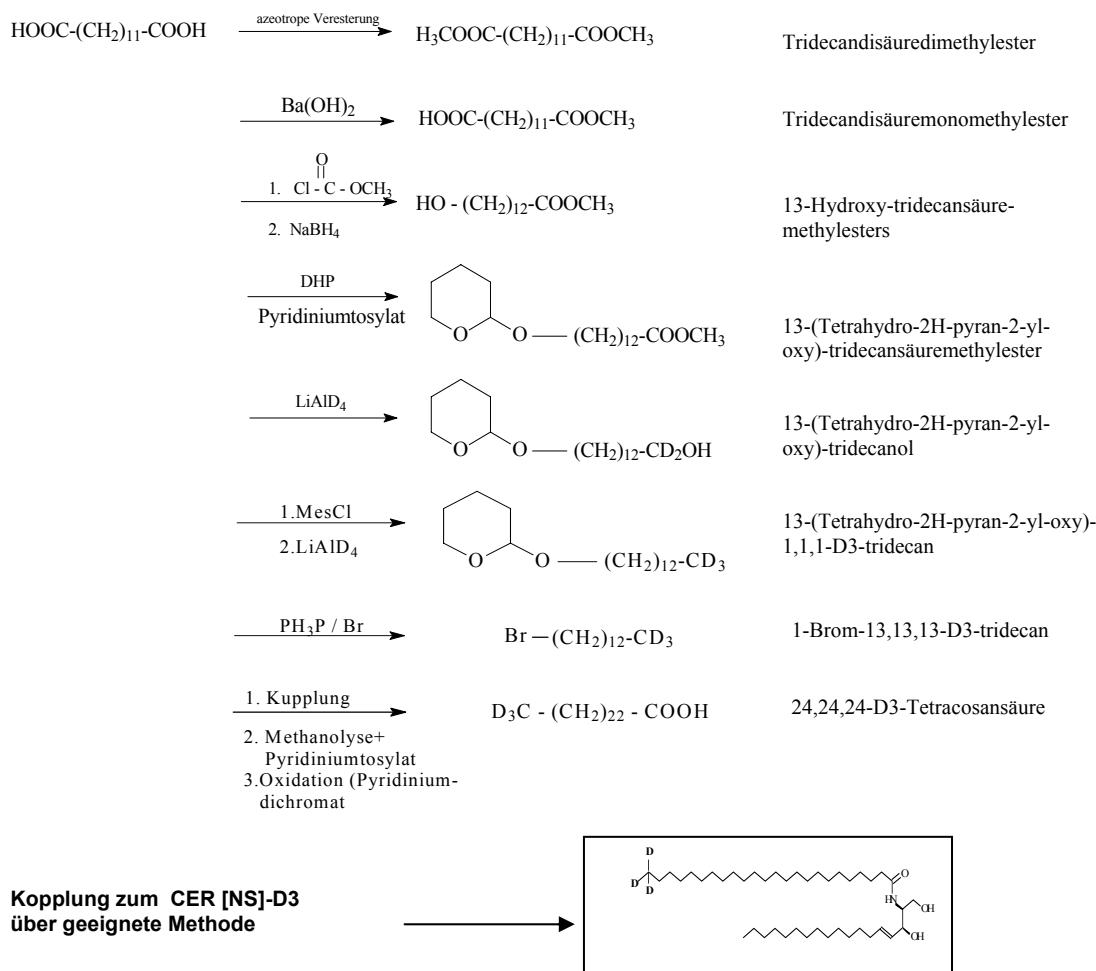


Abb.38 Zusammenfassung der Synthese zum CER[NS]-D3

Im Folgenden wurde entsprechend der Vorschriften von Ramsany et al. [1982] aus der Säurefunktion und dem hinzugegebenen Chlorameisensäurethylester das gemischte

Anhydrid gebildet, der durch das selektive Reduktionsmittel NaBH_4 zum Alkohol reduziert wurde. Die Esterfunktion blieb dieser Reaktion verschlossen.

Im nächsten Schritt sollte die terminale OH-Gruppe geschützt werden. Dazu wurde unter Pyridiniumtosylat-Katalyse 3,4-Dihydro-2H-pyran zugegeben. Dessen Enoletherstruktur wird an die OH-Gruppe unter Aufspaltung der Doppelbindung addiert. Die so erhaltene Tetrahydropyranyl-(THP)-schutzgruppe ist stabil im Basischen und hydrolysiert bei saurem pH.

Danach sollten sowohl die endständige Estergruppe durch LiAlD_4 zum Alkohol reduziert als auch zwei Deuteriumatome eingeführt werden. Bei der Umsetzung mit komplexen Hydriden wie LiAlH_4 , LiAlD_4 und NaBH_4 kommt es zur irreversiblen Übertragung von Hydrid- bzw. Deuteridionen auf Carbonyle, wobei diese über die Stufe des Aldehyds bis zum Alkohol reduziert werden [Ehlers 1999]. Hierbei war bei Verwendung von LiAlD_4 im Reaktionsverlauf auf strikte Abwesenheit von Wasser zu achten, da dieses als Protonenquelle ebenfalls LiAlD_4 umsetzt und somit das Reduktionsmittel verbrauchen würde.

Das erste Deuterid-Ion (D^-) lagerte sich als starkes Nukleophil an den Carbonyl-Kohlenstoff unter Bildung eines Halbacetals an, das unter Abspaltung von Methanolat rasch zerfiel. An den Carbonyl-Kohlenstoff des so intermediär gebildeten Aldehyds lagerte sich ein zweites Deuterid-Ion an. Das entstandene Alkoholat wurde bei der anschließenden wässrigen Aufarbeitung protoniert. Da die erhaltene Alkoholfunktion im weiteren Reaktionsverlauf nicht erhalten blieb, musste die Hydrolyse nicht unter Verwendung von schwerem Wasser D_2O erfolgen.

Für die geplante Reduktion des Alkohols und die damit verbundene Einführung des dritten Deuterium-Atoms musste die Hydroxylfunktion zunächst in eine geeignete Abgangsgruppe überführt werden, denn ein OH^- als nukleofug Gruppe hätte eine so hohe Nukleophilie, dass sofort die Rückreaktion einsetzen würde. Durch Umsetzen des Alkohols mit Methansulfonsäurechlorid entstand durch das resonanzstabilisierte Mesylat-Ion eine für Substitutionsreaktionen geeignete Abgangsgruppe [Ehlers 1999].

Im Anschluss wurde das Mesylat mit 20% Überschus von LiAlD_4 (m/m) umgesetzt. Bei der Reduktion des Methylsulfonsäureesters substituierte ein D^- den vorher alkoholisch gebundenen Sauerstoff und dieser trat als Mesylat-Abgangsgruppe aus dem Molekül aus. Nachdem die Bildung der *omega*-ständigen CD_3 -Gruppe der Tridecansäure abgeschlossen war, erfolgte die Kupplung zur Tetracosansäure.

Dazu wurde zunächst das 13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-1,1,1-D₃-tridecan mit Schwarz' Reagenz (Brom-triphenylphosphoniumbromid PPh₃Br₂) umgesetzt, das den THP-Rest unter Substitution durch ein Bromatom ersetzen kann. Schwarz' Reagenz wird erhalten aus Triphenylphosphin und elementaren Brom [Schwarz et al. 1975]. Das bromierte Phosphoniumsalz eliminierte bei elektrophilem Angriff auf den ringexternen Acetal-Sauerstoff die kovalent gebundene THP-Sequenz und bildete ein Phosphoniumsalz des entsprechenden Alkoholats. Bei der anschließenden Abspaltung von Triphenylphosphinoxid entstand die bromierte Alkylverbindung 1-Brom-13,13,13-D₃-tridecan.

Im nächsten Schritt erfolgte nun die Verlängerung des C₁₃-Körpers zur gewünschten C₂₄-Einheit über eine Kupfer-katalysierte Grignard-Kupplung mit einer C₁₁-Sequenz [Ehlers 1999]. Diese wurde entsprechend der Angaben von Miyashita et al. [1977] und Heiser [Dissertation 1998] durchgeführt, wobei 11-Brom-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-undecan durch Zugabe von Magnesiumspänen zu einem Grignard-Reagenz umgesetzt wurde. Bei regelgerechtem Verlauf der Synthese wird je Alkylhalogenid-Molekül ein Magnesiumatom eingeführt. Dabei bildete sich die gewünschte organometallische Verbindung, welche aufgrund einer äußerst polarisierten Kohlenstoff-Magnesium-Bindung eine starke Nucleophilie aufwies.

Für einen reibungslosen Ablauf einer Grignard-Reaktion ist ein geeignetes Lösungsmittel maßgebend. Es wird in der Regel abs. Ether eingesetzt, da die Insertion von metallischen Atomen in halogenierte Alkane zur Stabilisierung koordinative Bindungen mit elektronenreichen Bestandteilen des Solvens benötigt [Ehlers 1999]. Alkylhalogenide mit enthaltenen Tetrahydropyranyl-oxy-Gruppen lassen sich aber nur schwerlich in Diethylether zum entsprechenden Grignard-Reagenz umsetzen. Hierfür greift man auf die Verwendung von THF als Lösungsmittel zurück, welches ebenfalls eine Etherstruktur aufweist.

Die sich anschließende Kupplung erfolgte unter Verwendung eines kupferhaltigen Katalysators, da dieser sich für die Kupplung zweier ungleich langer Alkylhalogenidketten empfiehlt [Tamura und Kochi 1971]. Es bildete sich der THP-geschützte Tetracosanalkohol mit *omega*-ständiger CD₃-Gruppe, welcher im weiteren Reaktionsverlauf über eine Umacetalisierung mit Methanol zum freien Alkohol umgesetzt werden sollte.

Dazu wurde 24-(Tetrahydropyranyl-oxy)-1,1,1-D₃-tetracosan in Methanol unter Zugabe katalytischer Mengen Pyridiniumtosylat gelöst. Da das Lösungsmittel im Überschuss

zugegeben wurde, erfolgte eine Methanolysen, wobei methoxysubstituiertes Tetrahydropyran als Nebenprodukt anfiel und das 24,24,24-D3-Tetracosanol als Produkt entstand.

Der primäre Alkohol wurde dann durch Pyridiniumdichromat zur Carbonsäure oxidiert, wobei die sechswertige Chromverbindung als Oxidationsmittel im Laufe der Reaktion in ein dreiwertiges Chromsalz überführt wurde. Da es sich um ein nicht-wässriges Solvens und keine hochprozentige Säure handelte, bestand hierbei nicht die Gefahr einer Esterbildung zwischen Edukt und Produkt.

Nach Darstellung der 24,24,24-D3-Tetracosansäure wurde diese entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise unter Einsatz von EEDQ mit Sphingosin zum CER[NS]-D3 umgesetzt. Da massenspektroskopische Untersuchungen noch die Existenz von Nebenprodukten zeigten, schloss sich eine MPLC an und das Produkt wurde mit hohem Reinheitsgrad erhalten.

IV.2.1. Neutronenspektroskopische Untersuchungen an DPPC/ CER[NS]-Modellmembranen

Zunächst wurde CER[NS] mit dem Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) zur Präparation einer orientierten multilamellaren Modellmembran eingesetzt, deren innere Membranstruktur in Neutronenstreuexperimenten bestimmt werden sollte.

Im Gegensatz zu Ceramiden sind Phospholipid-basierte Modellmembranen mit Neutronenstreuung hinreichend untersucht [Katsaras et al. 1992; Kucerka et al. 2004]. Eine Ceramid/ Phospholipid-Membran stellt daher ein relativ einfaches Modellsystem dar, welches gut für die Untersuchungen des Ceramideinflusses in Neutronenstreuexperimenten eingesetzt werden kann.

Um Aussagen über die Beeinflussung der DPPC-Membran durch das Ceramid als auch über dessen Lokalisation in der Membran treffen zu können, bestand die Hauptaufgabe in der Synthese von drei unterschiedlich deuterierten Ceramid[NS]-Derivaten. Damit war die Fragestellung verbunden, welche Position und welcher Deuterierungsgrad im Molekül für eine aussagekräftige Anwendung von Neutronenstreuexperimenten an den verwendeten Modellmembranen geeignet sind.

Die Präparation folgender Proben (Tab.5), die Vermessung am VI Diffraktometer des HMI, Berlins als auch die Datenevaluierung erfolgten analog der für die SC Lipid-Modellmembranen beschriebenen Vorgehensweise.

Anhand der erhaltenen Diffraktionsmuster, die jeweils mindestens vier Ordnungen aufwiesen, konnten die lamellaren Wiederholabstände der einzelnen Membranen berechnet werden (Tab.5). Um den Einfluss des Ceramids auf die DPPC-Membran zu studieren, wurde die reine Phospholipid-Membran als Referenz vermessen.

System	DPPC	DPPC/ CER[NS] $X_{CER/NS} = 0,32$	DPPC/ CER[NS]-D2 $X_{CER/NS} = 0,32$	DPPC/ CER[NS]-D3 $X_{CER/NS} = 0,32$	DPPC/ CER[NS]-D47 $X_{CER/NS} = 0,32$
d-Wert	60.0 Å ± 0.03 Å	60.0 Å ± 0.01 Å	60.8 Å ± 0.01 Å	60.7 Å ± 0.1 Å	60.8 Å ± 0.02 Å

Tab.5 Werte für den lamellaren Wiederholabstand d , ermittelt für alle Systeme bei $T=20^\circ\text{C}$, 60% Feuchtigkeit und einem Kontrast von $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} 8/92$.

Der Zusatz von CER[NS] hatte demnach keinen Einfluss auf den Wiederholabstand der DPPC-Membran. Damit wurde ein Unterschied zu den Untersuchungen von Kiselev et al. [Kiselev et al. 2005b] festgestellt, in der die Zugabe des wesentlich polareren Phytosphingosins CER[AP] den lamellaren Wiederholabstand verringert.

In der Auswertung der berechneten Neutronenstreu längendichtheprofile $\rho_s(x)$ bot sich zunächst aufgrund der ähnlichen d -Werte eine vergleichende Darstellung der DPPC-Membran und der DPPC/ CER[NS]-Membran an (Abb.39). Dabei wurde ein merklicher Einfluss des CER[NS] auf die innere Membranstruktur ersichtlich, da sich die Streulängendichten sowohl im Bereich der polaren Kopfgruppen als auch in der Membranmitte unterscheiden.

Die aus der Literatur [Kiselev et al. 2005] bekannte Fähigkeit von Ceramiden, in unterschiedlichen Konformationen auftreten zu können, wurde für die Interpretation dieser zwei Beobachtungen herangezogen. In der *fully extended*-Konformation (FE) zeigen die beiden Seitenketten in entgegengesetzte

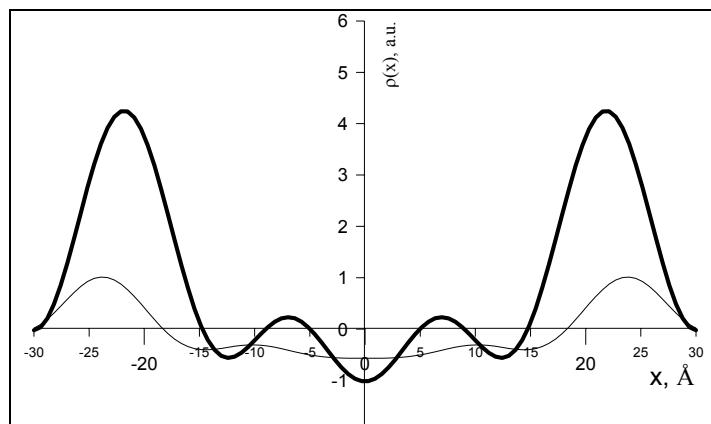


Abb.39 Das Neutronenstreu längendichtheprofil $\rho_s(x)$ der multilamellaren DPPC Membran (**fett**) gegen das Neutronenstreu längendichtheprofil $\rho_s(x)$ der DPPC/ CER[NS]-Membran, gemessen bei 60% Feuchtigkeit, 20°C und einem Kontrast von $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} 8/92$

Richtungen und in der *hairpin*-Konformation in die gleiche Richtung. Ein mögliches Strukturmodell der DPPC/ CER[NS]-Membran ist in Abb.40 abgebildet.

Danach wird das Ceramid in FE- Konformation in die Membran hineingeschoben, so dass sich die Kopfgruppe in Nähe der Membranmitte befindet und die beiden Kettenenden bis

in den Bereich der Kopfgruppen des DPPC ragen. Dieses paradox erscheinende Verhalten lässt sich u.a. darauf zurückführen, dass eine Wasserschicht von $\approx 9 \text{ \AA}$ zwischen zwei Bilayern einer Phospholipidmembran [Kiselev et al. 2005b] eine große energetische Barriere bezüglich der Penetration einer Kohlenwasserstoffkette (KW) in den Nachbarlayer darstellt. Daher erscheint es energetisch günstiger, wenn sich das aufgespannte Ceramid in die Membran hineinschiebt. Des Weiteren weist die Ceramid-Kopfgruppe eine wesentlich geringere Polarität als die des DPPC auf, was die postulierte Anordnung unterstützt. Die eigentümliche Anordnung wird durch die berechneten Streulängendichtheprofile hervorgebracht.

Die KW-Ketten des CER[NS] in *FE*-Konformation ragen in den Bereich der polaren Kopfgruppen hinein und bedingen aufgrund der negativen Streulänge von CH₂-Gruppen ($\rho_s = -0,030 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) und von CH₃-Gruppen ($\rho_s = -0,087 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) die herabgesetzte Streuintensität im Vergleich zur reinen DPPC-Membran.

In der vorgeschlagenen Anordnung des CER[NS] in *FE*-Konformation befindet sich die polare Kopfgruppe mit einer positiven Streulänge im Bereich der Membranmitte.

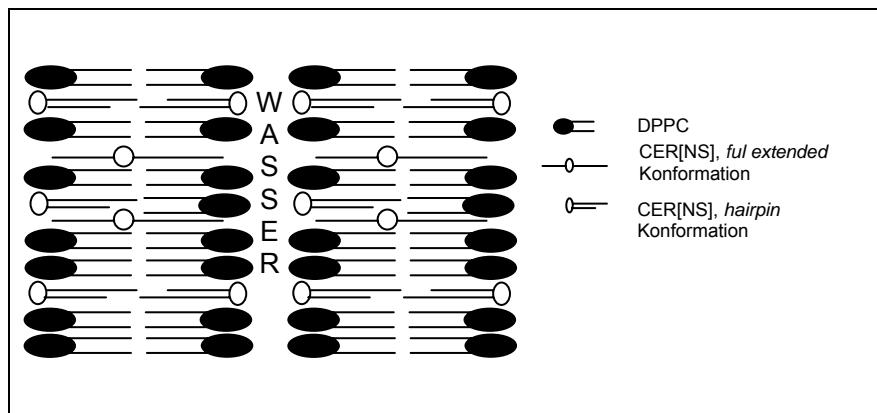


Abb.40 Vorschlag eines Strukturmodells der DPPC/ CER[NS]-Membran für ein Molverhältnis von $X_{CER[NS]} = 0,32$.

Die Summe der Streulängen von Kopfgruppe und Methylgruppen ist weniger negativ resultierend in einem geringerem Minimum als in der reinen DPPC-Membran, in der dieser Bereich nur durch Methylgruppen ($\rho_s = -0,087 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) gebildet wird.

Aus den Messungen an einer DPPC/ CER[NS]-Membran kann auf die Existenz des CER[NS] in der ausgestreckten *FE*-Konformation geschlossen werden. Nach Kiselev et al. [2005] tritt bei 60% Feuchtigkeit nur ein bestimmter Teil der Ceramidkomponente in dieser Konformation auf. Diese Aussage sollte im Folgenden durch die Auswertung der Fourier Profile von partiell deuterierten Ceramiden enthaltenen Membranen überprüft werden.

Das $\rho_s(x)$ von DPPC/ CER[NS]-D3 [Abb.41] zeigte, dass sowohl die Intensitäten im Bereich der Kopfgruppen als auch in der Membranmitte deutlich größer waren als die der DPPC-Matrix, welches im Zusammenhang mit den drei Deuterium-Atome in *omega*-Position gesehen werden muss.

Das Intensitätsmaximum in der Membranmitte ergibt sich aus der

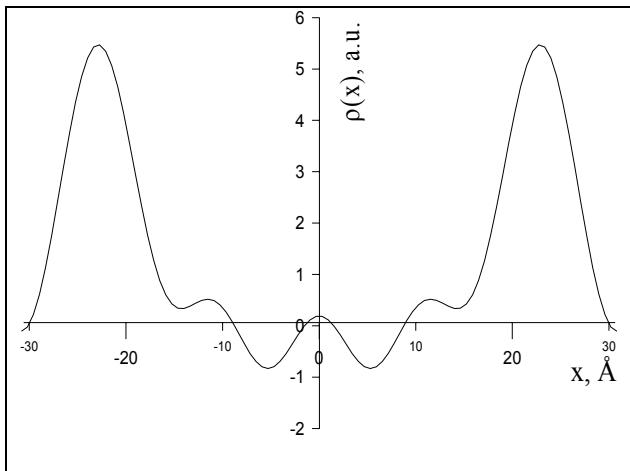


Abb.41 Das Neutronenstreu längedichteprofil $\rho_s(x)$ der DPPC/ CER[NS]-D3 Modellmembran bei 60 % Feuchtigkeit, 20°C und einem Kontrast von D_2O / H_2O 8/ 92.

positiven Streulänge der Deuteriumatome. Die CD_3 -Gruppe befindet sich nur dann an dieser Position, wenn das CER[NS] in *hairpin*-Konformation vorliegt.

Gleichzeitig existiert ein bestimmter Anteil Ceramid in *FE*-Konformation, denn die gesteigerte Streuintensität im Bereich der Kopfgruppe, die sich in der Größenordnung der reinen DPPC-Matrix befindet, ist zurückzuführen auf die positive Streulänge der CD_3 -Gruppe des Ceramids in *FE*-Konformation bei oben beschriebener Anordnung in der Membran.

Zusammenfassend ergaben sich zwei Hauptergebnisse aus den durchgeföhrten Untersuchungen.

1). CER[NS] existiert bei 60% Feuchtigkeit in zwei nebeneinander vorliegenden Konformationen. Dieses Wissen ist hilfreich in zukünftigen Untersuchungen an SC Lipidmodellmembranen, die CER[NS] enthalten werden. Die innerhalb der DPPC-Membran vorgeschlagene Anordnung des CER[NS] erscheint paradox, basiert aber auf reproduzierbaren experimentellen Befunden.

2). Aus präparativer Sicht ist die spezielle Markierung mit Deuterium-Atomen ein wichtiges Instrument in der Anwendung von Neutronenstreuexperimenten. Dabei ist aber zu beachten, dass diese Markierung nur an solchen Stellen und in solchem Grad sinnvoll ist, wenn sie nicht mit anderen charakteristisch streuenden Molekülteilen interagieren bzw. durch diese überdeckt werden. Im vorliegenden Experiment erfüllt die Deuterierung in *omega*-Position der Fettsäurekette des Ceramids (CER[NS]-D3) diese Bedingungen. Eine vollständig deuterierte Fettsäurekette (im CER[NS]-D47) beeinflusste die Streuintensität in allen Membranbereichen, so dass eine differenzierte Betrachtung nicht

möglich war. Die Deuterierung in unmittelbarer Nähe zur stark streuenden Kopfgruppe (CER[NS]-D2) brachte ebenfalls keine aussagekräftigen Ergebnisse hervor, da der Abstand zwischen CD₂- und Kopfgruppe unterhalb der Auflösungsgrenze des Experimentes lag.

IV.3. Untersuchungen an SC Lipid-Modellsystemen mittels Neutronenstreuung

IV.3.1. Weiterführende Studien am Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS

Wie bereits beschrieben wurde in der Arbeit von Kiselev et al. [2005] erstmals die Neutronenstreuung erfolgreich zur Charakterisierung der internen Membranstruktur einer quaternären *Stratum corneum* Lipid-Modellmatrix eingesetzt. In der Auswertung der experimentellen Daten wurde vielfach der Vergleich zu Phospholipidmembranen gezogen, da auf diesem Gebiet die Neutronenstreuung eine etablierte Methode ist. Eine sehr geringe intermembranäre Hydratation und ein daraus resultierender starker Zusammenhalt der Lipide innerhalb der Matrix wurden als wichtigstes Ergebnis festgehalten, auf dessen Grundlage das *armature reinforcement*-Modell zur Beschreibung der Lipidorganisation in der Modellmatrix entwickelt wurde. Das CER[AP] spielt dabei als molekularer Nagel zwischen den einzelnen Lipidschichten eine zentrale Rolle. Des Weiteren konnte aus dem Neutronenstreuulängedichteprofil eine mögliche Position des Cholesterols innerhalb der Membran abgeleitet werden. In direkter Fortführung dieser Studie ergab sich zunächst die Fragestellung, ob durch Einsatz partiell deuterierter Cholesterol-Derivate die Lokalisation dieses wichtigen Membranbestandteils präzisiert werden könne. Ferner wurde in dieser Studie das CER[AP] als Mischung seiner beiden Diastereomeren D- bzw. L-CER[AP] eingesetzt. Basierend auf der Tatsache, dass sich Diastereomere in ihrem physikochemischen Verhalten unterscheiden, ergab sich die Frage, ob ein Einfluss der D- bzw. L-Form des CER[AP] auf die Membranstruktur besteht.

IV.3.1.1. Lokalisation von partiell deuterierten Cholesterols im quaternären SC Lipid-Modellsystem

Cholesterol ist innerhalb der SC Lipidmatrix die mengenmäßig größte Komponente und entsprechend verschiedener *in vitro* Studien wird ihm eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung der Barrierefunktion zugesprochen [de Kruijff et al. 1974; Takahashi et al. 1996; Sparr et al. 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass für die optimale Barrierefunktion der Gehalt an CHOL so groß wie möglich, aber nicht über der Löslichkeit des CHOL innerhalb der Lipidmatrix liegen sollte. Die sich sonst ausbildenden Domänen kristallinen Cholesterols würden eine Diskontinuität der Lipidmatrix bedingen [Subramaniam et al. 1987; Engblom et al. 1998; Norlén 2000]. Dennoch treten in künstlichen SC Membranen immer einzelne CHOL-Kristalle auf, die allerdings die multilamellare Organisation nicht

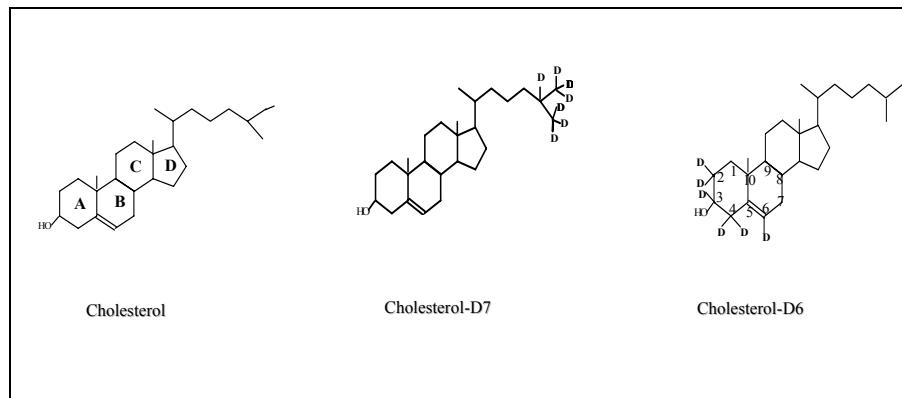
beeinflussen [de Jager et al. 2004a]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass bei einem hohen CHOL/ CERs-Verhältnis die lamellare Organisation unempfindlich ist gegenüber einer Änderung der Zusammensetzung der Ceramide [Bouwstra et al. 1999].

Zusammenfassend liegen viele Untersuchungen über die Spezifität der Interaktionen zwischen Cholesterin und anderen Membranbestandteilen vor, allerdings ist wenig bekannt über die genaue Anordnung des CHOL innerhalb der Membran. Bouwstra et al. [2002] postulieren im *sandwich model*, dass die innere Phase der trilamellaren LPP gekennzeichnet ist von einer hohen Fluidität bedingt durch die dortige Anwesenheit des CHOL und der ungesättigten Seitenketten der ω -Acylceramide. Diese Ergebnisse basieren auf Röntgendiffraktionsstudien, die aber keine Aussage über die innere Membranstruktur zulassen. McIntosh [2003] zeigte in Röntgenuntersuchungen an porcinen SC Lipiden die Bildung einer LPP, die in zwei asymmetrische Bilayer mit ungleichmäßiger CHOL-Verteilung geteilt ist.

Die Neutronenstreuexperimente von Kiselev et al. [2005] am quaternären SC Modell unter Variation des CHOL-Anteils zeigten, dass mit zunehmendem CHOL-Anteil die Intensität des Maximums bei 12,8 Å im Neutronenstreuulängedichteprofil zunahm. Daraus wurde geschlossen, dass dieses Maximum dem CHOL zugeordnet werden kann, genauer der Grenze zwischen den Ringen A/B des Steroidgerüstes mit einer geringen Dichte an negativ streuenden Wasserstoffatomen. Durch Verwendung zweier unterschiedlich deuterierter CHOL

Derivate sollte die Lokalisation genauer untersucht werden.

Dabei wurde der Vorteil spezifischer Deuteriummarkierung



ngen in der Neutronenstreuung, der zu einer Verstärkung des lokalen Kontrasts führt, ausgenutzt.

Im Rahmen dieser Studie wurden folgende SC Lipid-Modellsysteme am V1 Diffraktometer untersucht (Tab.6).

SC Lipid-Modellsysteme	Experimentelle Bedingungen	Art der Messung
CER[AP]/ CHOL-D7/ PA/ ChS, 55/ 25/ 15/ 5 % (w/w)	T=32°C, 60% rel.Feuchtigkeit, H ₂ O/ D ₂ O= 92/ 8, 80/ 20, 50/ 50 (w/w)	<i>Rocking curve</i> bei verschiedenen def. Streuwinkeln
CER[AP]/ CHOL-D6/ PA/ ChS, 55/ 25/ 15/ 5 % (w/w)	T=32°C, 60% rel.Feuchtigkeit, H ₂ O/ D ₂ O= 92/ 8, 80/ 20, 50/ 50 (w/w)	<i>theta- 2*theta scan</i> von 0-30°

Tab.6 Untersuchte SC Modellsysteme sowie Angaben über experimentelle Bedingungen und Art der Messungen

Die nicht deuterierte Modellmembran [Kiselev et al. 2005] diente als Referenzmembran, und wird im Folgenden auch so bezeichnet. Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse war es notwendig, die gleichen experimentellen Bedingungen zu wählen.

Als erstes wurde das System unter Verwendung des CHOL-D7, in dessen Alkylkette sieben Wasserstoffatome gegen Deuteriumatome ausgetauscht waren, untersucht. Das Neutronenstreuemuster ist in Abb.42 dargestellt.

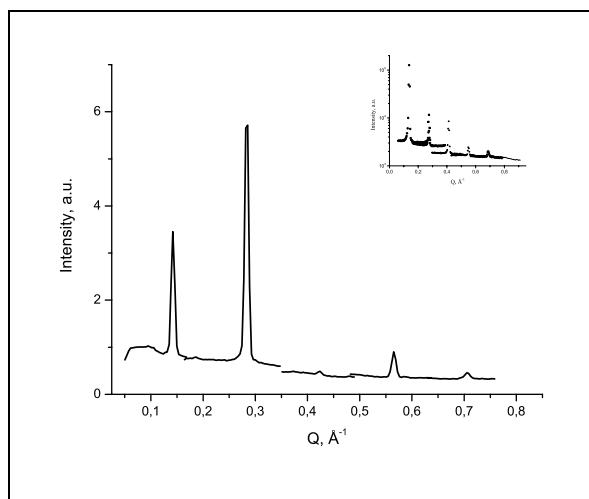


Abb. 42 Neutronendiffraktionsbild des Systems CER[AP]/ CHOL-D7/ PA/ ChS vs. Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (kleines Bild) [Kiselev et al. 2005] (T=32°C, 60 % hum, H₂O/ D₂O 92/ 8).

Die Unterschiede in den rel. Peakhöhen zeigen die Empfindlichkeit der Methode auf Deuteriummarkierungen.

Fünf Diffraktionsordnungen konnten gemessen werden. Aus der Position der einzelnen Reflexe wurde durch lineare Regression ein lamellarer Wiederholabstand von 45,05 Å ermittelt, der die Vergleichbarkeit zum Referenzsystem (d= 45,6 Å) zulässt.

Aus der integrierten Peakintensität wurden die absoluten Werte für die Strukturfaktoren berechnet, deren Vorzeichen entsprechend der von Worcester [1976] und Franks und Lieb [1979] beschriebenen Methode durch Kontrastvariation bestimmt wurden. Mittels einer Fourier-Synthese erfolgte dann die Berechnung des Neutronenstreulängedichteprofils $\rho_s(x)$ im relativen Maßstab.

In Abb.43 ist das Membranprofil für einen Kontrast von $\text{H}_2\text{O}/ \text{D}_2\text{O}$ 92/ 8 abgebildet. Da unter diesen Bedingungen Wasser die Streulänge Null hat, wird somit nur die Membran detektiert. Die zwei begrenzenden Maxima entsprechen den polaren Kopfgruppen aufgrund der positiven Neutronenstreulänge von Heteroatomen. Auch dieses Profil weist keinen intermembranären Raum auf. Der Abstand zwischen den den Kopfgruppen zugeordneten Maxima d_{ph} entspricht dem lamellaren Wiederholabstand d , was auf einen intermembranären Raum kleiner als die Auflösungsgrenze hinweist. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Referenzsystem und erlaubt die vergleichende Betrachtung.

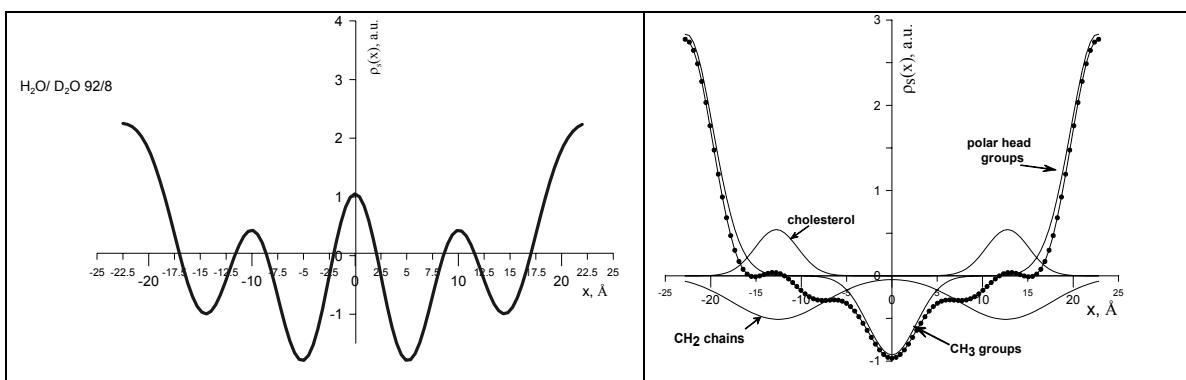


Abb.43 (links) Neutronenstreuängedichtheiprofil $\rho_s(x)$ der CER[AP]/ CHOL-D7/ PA/ ChS Membran bei $T=32^\circ\text{C}$, 60%r.H. und $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 92/8; (rechts) zum Vergleich Neutronenstreuängedichtheiprofil $\rho_s(x)$ der Referenzmembran [aus Kiselev et al. 2005]

Der Unterschied zwischen beiden System besteht darin, dass das Fourier Profile der Deuteriummarkierten Probe ein deutliches Maximum in der Membranmitte aufweist, welches offensichtlich dem Isotopenaustausch zuzuordnen ist. Die kohärenten Streulängen von Wasserstoff (-3,741 fm) und Deuterium (6,671 fm) unterscheiden sich deutlich. Das nicht markierte Referenzsystem weist in der Membranmitte (CH_3 -Gruppenregion) ein deutliches relatives Minimum auf, das mit der dortigen hohen Dichte an H-Atome korreliert. Das Maximum der CHOL-D7 enthaltenen Probe liefert nun den Beweis, dass in der Membranmitte eine hohe Dichte an positiv streuenden Deuteriumatomen herrscht und folglich die deuterierten CD_3 -Gruppen in diesem Bereich lokalisiert sind.

In einem weiteren Versuch wurde das analoge Experiment an dem System CER/AP/ CHOL-D6/ PA/ ChS durchgeführt, wobei das CHOL-D6 eine selektive Deuterierung an den Ringen A und B des Steroidgerüsts aufwies.

Die Auswertung der Diffraktionsbilder und die Berechnung des Neutronenstreuängedichtheoprofs $\rho_s(x)$ erfolgte nach der beschriebenen Vorgehensweise. Da die direkte Analyse des Fourier-Profs keine weiteren Rückschlüsse zuließ, wurde die

Differenz zwischen der Neutronenstreuulängendichte der deuterierten Probe sowie der nicht deuterierten Probe berechnet (Abb.44).

Daraus konnte der Einfluss des H-D-Austausches auf die Membranstruktur abgeleitet werden. Das Maximum bei ursprünglich 12,8 Å ist verschoben zu 17,5 Å. Die Differenz von 4,5 Å entspricht dem Abstand zwischen der Molekülregion mit der niedrigsten H-Atom-Dichte (Maximum im Profil der nicht-deuterierten Probe) und der Region mit der höchsten Dichte an D-Atomen (Maximum der deuterierten Probe). Die Berechnung basiert auf dem Abstand von 1,5 Å zwischen zwei sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen, woraus sich ein Abstand von $\approx 4,5$ Å zwischen drei C-Atomen ergibt [Fox 1994]. Allerdings ist anzumerken, dass es nicht möglich ist, die exakte Position einzelner Atome im Molekül durch die gewählte Methode zu bestimmen. Aber gerade der Differenzplot (Abb.44) erlaubt eine Abschätzung der Lokalisation der markierten molekularen Gruppen.

Zusammenfassend lieferte die Studie über die Lokalisation des CHOL in der SC Lipid-Modellmatrix drei Ergebnisse:

- i). Die Untersuchung am CER[AP]/ **CHOL/ PA/ ChS** Referenzsystem zeigte eine grobe Zuordnung der Position des CHOL zu dem Maximum bei 12,8 Å im Membranprofil, welches der hypothetischen Achse durch das Molekül mit der geringsten Dichte an Wasserstoff-Atomen entspricht [Kiselev et al. 2005].
- ii). Das Membranprofil des CER[AP]/ **CHOL-D7/ PA/ ChS** Systems brachte im Zentrum eine hohe Dichte an Deuterium hervor, woraus die zentrale Anordnung der Deuterium-markierten Alkylseitengruppen des CHOL-D7 gefolgert wurde (Abb.43 links).
- iii). Die Berechnung des Differenzplots zwischen den Neutronenstreuulängendichten der deuterierten Probe CER[AP]/ **CHOL-D6/ PA/ ChS** und dem Referenzsystem brachte die Verschiebung des Maximums von 12,8 auf 17,5 Å. Dieser Unterschied entspricht dem Abstand zwischen der niedrigsten Dichte an negativ streuenden H-

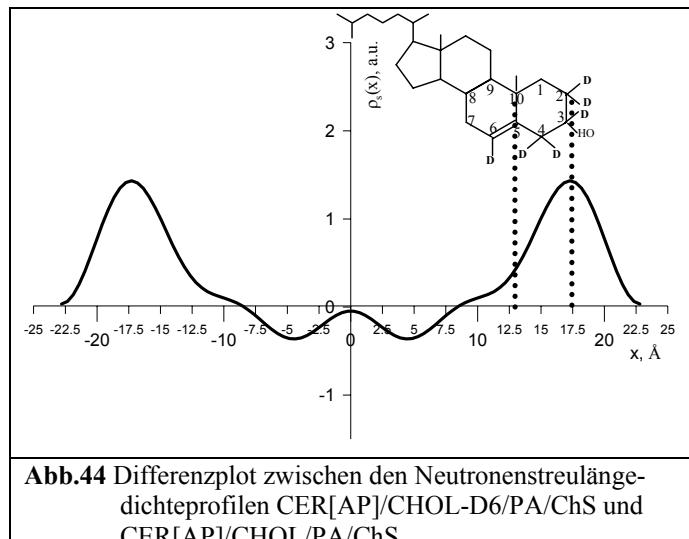


Abb.44 Differenzplot zwischen den Neutronenstreuulängendichtenprofilen CER[AP]/CHOL-D6/PA/ChS und CER[AP]/CHOL/PA/ChS

Atome in der nicht-deuterierten Probe und der höchsten Dichte an positiv streuende D-Atomen in der deuterierten Membran (Abb. 44).

Auf Grundlage dieser experimentellen Befunde lagen drei Fixpunkte zur Beschreibung der Position des Cholesterols innerhalb der Membran vor. Zur Veranschaulichung dieses Ergebnis wurde eine schematische Darstellung entwickelt [Abb.45]. Demnach ist das Cholesterol in die Kohlenwasserstoffregion des Bilayers eingebettet. Diese Anordnung vergrößert die hydrophoben Wechselwirkungen zu den Alkylketten der Ceramide und der Fettsäuren. Unser Modell über die Anordnung des CHOL ist nachvollziehbar und entspricht anderen Studien zur Position des CHOL. Es bleibt anzumerken, dass es sich bei der vorgeschlagenen Anordnung natürlich nicht um eine starre Fixierung handelt. Vielmehr sollte in diese Diskussion auch der Einfluss des Phasenverhaltens der einzelnen Lipide einfließen, da die Vermutung nahe liegt, dass die Position des Cholesterols dadurch beeinflusst werden könnte. Es fehlen allerdings genauere Ergebnisse aus DSC-, ramanspektroskopischen, sowie WAXS-Untersuchungen an diesen Systemen, um diese Fragestellung zu erörtern.

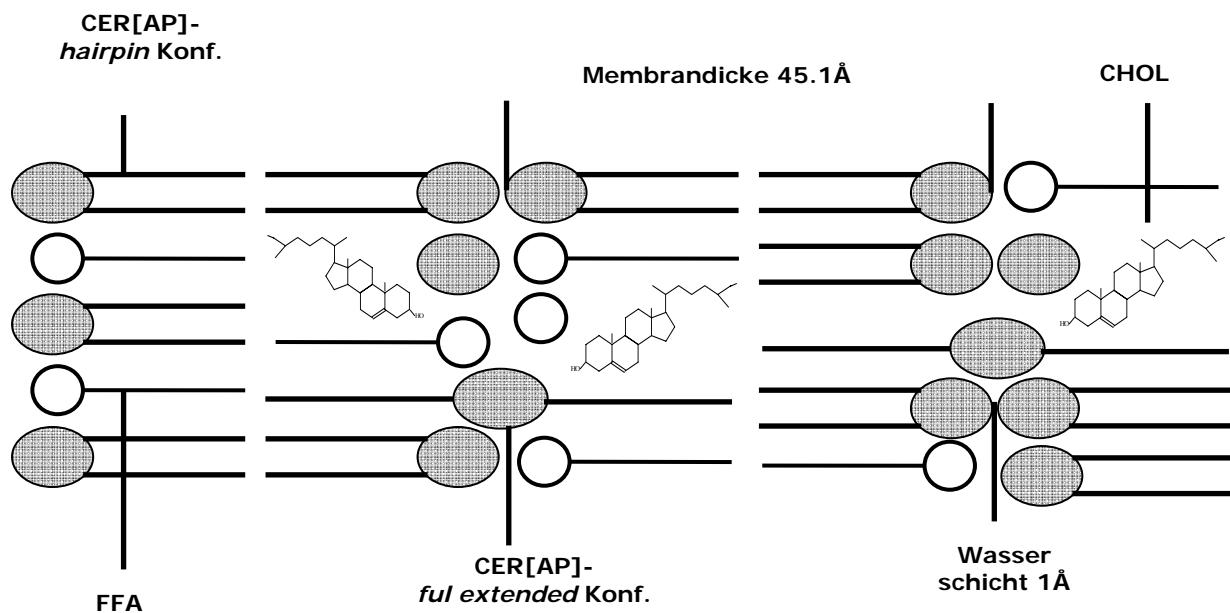


Abb.45 Schematische Darstellung des SC Lipid Modellsystems CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS

Abschließend zu dieser Studie bleibt festzuhalten, dass es sich um eine Fortführung der ersten Messungen am Referenzsystem handelte und dass die dabei postulierte Position des CHOL durch Einsatz spezifisch deuterierter CHOL-Derivate bestätigt und präzisiert werden konnte. Es wurde ein weiterer Beweis für die nutzvolle Anwendung der Neutronenstreuung an SC Lipid-Modellsystemen geliefert, erweitert um den Aspekt, dass

neben Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch die Positionsbestimmung einzelner Membranbestandteile durch Isotopenaustausch möglich ist.

(publiziert in: **Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauß, T., Dante, S., Wartewig, S., Neubert, R.H.H.**
Localisation of partially deuterated cholesterol in quaternary SC lipid model membranes. A neutron diffraction study
European Biophysical Journal with Biophysics Letter (2008), Online veröffentlicht

IV.3.1.2. Einfluss der Diastereomere D-CER[AP] und L-CER[AP] auf die Membranstruktur

Wie einleitend zu diesem Kapitel gesagt, stand im Folgenden die Frage, ob die Diastereomeren des CER[AP] eine andere innere Membranstruktur als das System DL-CER[AP]/CHOL/ PA/ ChS bewirken. Dabei richtete sich das Interesse vornehmlich auf das natürlich vorkommende D-CER[AP].

Nach Auf trennung des Gemisches mittels einer präparativen DC wurden folgende Modellmembranen hergestellt:

- **D-CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m)**
- **L-CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m)**

Um neben dem Einfluss auf die Membranstruktur auch das Phasenverhalten der Lipidmembranen charakterisieren zu können, wurden unterschiedliche Temperaturen und rel. Feuchtigkeitsgehalte gewählt. In Tab.7 sind die experimentellen Befunde gegenübergestellt.

Experimentelle Bedingungen	L-CER[AP]/CHOL/PA/ChS	D-CER[AP]/CHOL/PA/ChS
Trocken (Raumfeuchte) ; T=20°C	-eine Phase d= 43,4 Å	-eine Phase d= 42 Å
60% r.H, T=32°C	-keine Phasenseparation d= 44,5 Å ♦ reversible	-Phasenseparation Phase 1 : d= 46,63 Å Phase 2 : d= 42,17 Å ♦ reversibel
98% r.H, T=32°C	-Phasenseparation Phase 1 : d= 50,0 Å Phase 2 : d= 46,6 Å	-keine Phasenseparation d= 46,6 Å

Tab.7 Experimentelle Befunde der Systeme **L-CER[AP]/CHOL/PA/ChS** und **D-CER[AP]/CHOL/PA/ChS**

Auffällig ist sofort, dass im trockenen Zustand die Membranen jeweils eine einheitliche Phase bilden, die allerdings einen kleineren d-Wert aufweisen als das Referenzsystem ($d= 45,6 \text{ \AA}$). Nach Equilibrierung des Systems bei $T=32^\circ\text{C}$ und 60% r.H. wurde eine Vergrößerung des lamellaren Wiederholabstandes d für das L-CER[AP]-System festgestellt. Im D-CER[AP]-System kam es hingegen zu einer Phasenseparation, wobei die zwei Phasen d -Werte von $d_1= 46,63 \text{ \AA}$ bzw. $d_2= 42,17 \text{ \AA}$ aufwiesen. Die

Durchführung der Messungen bei 98% r.H. brachte eine Phasenseparation für das L-CER[AP]-System hervor ($d_1 = 50,0 \text{ \AA}$ bzw. $d_2 = 46,6 \text{ \AA}$), im D-CER[AP]-System trat unter diesen Bedingungen nur ein Phase mit einer Periodizität d von $46,6 \text{ \AA}$ auf

Zur Interpretation dieser kontrovers erscheinenden experimentellen Befunde werden noch einmal die Strukturformeln der beiden Diastereomeren gezeigt (Abb. 46). Literaturangaben zufolge bedingt die stereochemische Anordnung der OH-Gruppen im L-CER[AP] die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die zu einer internen Neutralisation der Polarität der Kopfgruppe führen. Somit weist die L-Form nach außen hin eine geringere Hydrophilie auf als die D-Form [Pascher 1976].

Die Auswertung der Daten basierte hauptsächlich auf der von Raudenkolb et al. [2005] durchgeföhrten Studie über den Polymorphismus des CER[AP] mittels schwingungsspektroskopischen und Röntgendiffraktionsstudien seiner Diastereomere. Sowohl für die L-, als auch die D-Form wurden mehrere lamellar kristalline Phasen detektiert, die sich allerdings in den Periodizitäten deutlich unterschieden. Trotz gleicher Kettenlängen waren die lamellaren Phasen des D-Cer[AP] größer als die des L-CER[AP]. Der größere d -Wert für das D-CER[AP] wurde auf die gestreckten Anordnung (*full extended*) der Ketten zurückgeführt. Die Verkürzung der Periodizität des L-CER[AP] wurde durch das Modell der V-förmigen Anordnung der Fettsäurekette nach Dahlén und Pascher [1979] erklärt. In den vorliegenden Neutronenstreuuntersuchungen an den CER[AP] enthaltenen SC Lipid-Modellmembranen wurde bei Raumfeuchtigkeit eine analoge Verkürzung des d -Wertes für das L-CER[AP]-System nicht detektiert (Tab.8).

Die jeweils die reinen Diastereomere enthaltenen Modellsysteme wiesen vergleichbare Periodizitäten auf, die mit steigendem Feuchtigkeitsgehalt zunahmen und dann der Periodizität des DL-CER[AP] enthaltenem Systems entsprachen.

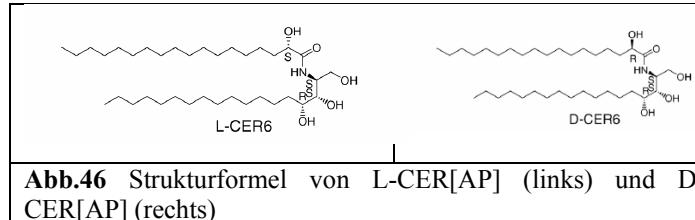


Abb.46 Strukturformel von L-CER[AP] (links) und D-CER[AP] (rechts)

rel. Feuchtigkeit	System mit L-CER[AP]	System mit D-CER[AP]	
Raumfeuchtigkeit	43,4 Å	42 Å	
60% r.H.	44,5 Å	46,6 Å	
98% r.H.	46,6 Å	46,6 Å	

Tab.8 Tendenz der d -Werte in Abhängigkeit von der rel. Feuchte

Der bei Raumfeuchte gemessene kleinere d -Wert von $\approx 43 \text{ \AA}$ lässt vermuten, dass die reinen Diastereomere innerhalb der Lipidmatrix dichter gepackt sind, also eine idealere

Packung ergeben als die Mischung aus DL-CER[AP] in der Referenzmembran. Damit korreliert auch eine kleinere Fläche/ Kopfgruppe und auch ein kleinerer *d*-Wert.

Die Beobachtung größer werdender Periodizitäten in Abhängigkeit von der rel. Feuchte weicht von den Ergebnissen von Raudenkolb et al. [2005] ab. Für die dort postulierte gestreckte bzw. gewinkelte Kettenanordnung des CER[AP] ergibt sich keine Möglichkeit zur Wechselwirkung mit Wasser. In diesen Anordnungen schirmen die in entgegengesetzte Richtungen zeigenden Fettsäure- und Phytosphingosin-Seitenketten die Kopfgruppe des Ceramids vor dem Wasser ab. Im vorliegenden Fall kann also angenommen werden, dass die reinen Diastereomeren jeweils im Verbund mit den anderen SC Lipiden in der *ful extended*-Konformation und in der *hairpin*-Konformation (beide Seitenketten zeigen in dieselbe Richtung) vorliegen und durch letztere eine Interaktion mit Wasser möglich ist. Inwieweit dieser Effekt mit der dichten Packung der reinen Diastereomere zusammenspielt bzw. wie groß der Anteil an Ceramid ist, der in *ful-extended* Konformation vorliegt (für den engen Kontakt zwischen benachbarten Bilayern), kann aufgrund der noch geringen Datenmenge an dieser Stelle nicht diskutiert werden. Zur Klärung dieser Fragestellung bietet sich eine synthetische Darstellung spezifisch deuterierter CER[AP]-Derivate an. Untersuchungen an entsprechenden Modellmembranen lassen möglicherweise dem CER[NS] analoge Aussagen zu [Kapitel IV.2.1.].

Die Auswertung des Einflusses des zweiten äußeren Parameters, der Temperatur, auf das Phasenverhalten der zwei Modellmembranen ergab allerdings keine direkte Abhängigkeit (Tab.9). So

	System mit L-CER[AP]	System mit D-CER[AP]
rH 60%; 20°C	1 Phase	1 Phase
rH 60%; 32°C	1 Phase	2 Phasen
rH 98%; 32°C	2 Phasen	1 Phase

Tab.9 Einfluss von Temperatur und rel. Feuchtigkeit auf die SC Lipid-Modellsysteme

weist das L-CER[AP]-System bei 60% r.H. bei beiden Temperaturen eine Phase auf, bei Erhöhung der Feuchtigkeit wurde ein Zwei-Phasen-System beobachtet. Im Falle des D-CER[AP]-Systems detektierte man bei 60% r.H. bei niedriger Temperatur ein einphasiges und bei höherer Temperatur ein Zweiphasen-System. Interessanterweise bewirkte hier die Erhöhung der Feuchtigkeit bei T=32°C die Rückbildung zum Einphasen-System.

Durch Wiederholungsmessungen wurde überprüft, dass dieses Verhalten reversibel ist. Beide Membranen stellen damit Gleichgewichtssysteme dar und es handelt sich bei den Ergebnissen nicht um Artefakte einer zu langsamen Kinetik.

Es wird vermutet, dass bei höherer Temperatur die Wasserpenetration in die Membran ansteigt, die in Abhängigkeit von der jeweils betrachteten Membran zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.

Im Falle des D-CER[AP]-Systems liegt wie beschrieben das natürlich vorkommende, polarere Diastereomer vor. Bei 60% r.H. und T=20°C bildet das System eine einphasige multilamellare Membran aus. Die durch eine höhere Temperatur (T=32°C) bedingte größere Wasserpenetration führt zu einer kurzzeitigen Wasserübersättigung der Membran, die in der Ausbildung eines Zweiphasen-Systems resultiert. In einem zeitgesteuerten Prozess stellt sich dann ein Gleichgewicht im System ein, realisiert durch eine hinreichende Hydratation der Kopfgruppen der Ceramide in Haarnadel-Konformation. Im Zuge dieser Gleichgewichtseinstellung liegt das System in einer einheitlichen Phase vor. Die Erhöhung der Feuchtigkeit auf 98% führt nicht zu einem erneuten Aufbrechen der Membran. Dieser Effekt basiert auf der hohen Kopfgruppenpolarität des D-CER[AP], welches in hohem Umfang hydratisiert werden kann. Es liegt die Vermutung nahe, dass eine weitere Temperaturerhöhung mit gesteigerter Wasserpenetration allerdings zum Auseinanderbrechen des Systems führen würde. Aufgrund der Absättigung der Kopfgruppen könnte kein Wasser mehr vom System aufgenommen werden. Dieses Verhalten ließe sich auch mit Beobachtungen an nativen *Stratum corneum* korrelieren. Für die Ausbildung optimaler Barriereeigenschaften ist eine hinreichend große Hydratation erforderlich. Sowie das Wasserangebot aber einen kritischen Wert überschreitet, bricht das System unter Verlust der Barrierefunktion auf [Neubert und Wepf 2007].

Zum D-CER[AP]-System analoge Betrachtungen können auch für das L-CER[AP]-System angestellt werden. Sowohl bei 20°C als auch bei 32°C tritt hierfür bei 60% r.H. ein einphasiges System auf. Es wird allerdings vermutet, dass der zur Zweiphasigkeit des D-CER[AP]-Systems bei T=32°C analoge Zustand unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht erfasst wurde. Möglicherweise wird eine Temperaturen <32°C zu einer gesteigerten Wasserpenetration in den Bilayer führen, was zunächst eine Übersättigung des Systems mit daraus resultierender Zweiphasigkeit bedingen würde. Ebenfalls in einem zeitgesteuerten Prozess erfolgt die vollständige Hydratation der Kopfgruppen und Einstellung eines Gleichgewichtszustandes unter Ausbildung eines Einphasen-Systems. Bei 98% r.H. besteht dann für dieses System schon eine Wasserübersättigung, die zum Auseinanderbrechen der Membran der Membran führt.

Dieses Phänomen ließe sich auf die geringere Polarität des L-CER[AP] zurückführen, welches weniger hydratisiert werden kann als die D-Form.

Die vorliegenden ersten Untersuchungen zum Phasenverhalten der SC Lipide in hochorientierten Modellmembranen deuten ein Potential an, dass auf molekularer Ebene der Einfluss von äußeren Parametern wie Temperatur und Feuchtigkeit mithilfe der Neutronenstreuung gut studiert werden kann. Die Interpretation dieser zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch geringen Datenmenge kann aber noch nicht hinreichend abgesichert werden. Zunächst sollten den Monosubstanzen D-CER[AP] und L-CER[AP] analoge schwingungsspektroskopische und Röntgendiffraktionsstudien an den Lipidmischungen durchgeführt werden. Des Weiteren würden Festkörper-NMR-untersuchungen zur Aufklärung der lokalen Kopfgruppenstruktur beitragen. Unter Anwendung der Neutronenstreuung sollte zum einen ein detaillierter Temperaturscan für zwei verschiedene rel. Feuchtigkeitsgehalte bzw. eine Messung in Wasserüberschuss die Einblicke in das Verhalten der diastereomerenreinen Membranen vertiefen. Zudem war die Zuordnung der Phasen wegen der auftretenden Mehrphasigkeit schwierig. Hierbei würde eine Wiederholung der Messungen unter Verwendung speziell deuterierter Lipide (z.Bsp. deuterierte Ceramide oder Fettsäuren) hilfreich sein, um feststellen zu können, welche Komponenten welche Phasen bilden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren diese Untersuchungen sowohl aus messtechnischen als auch aus zeitlichen Gründen nicht durchführbar.

Ursprünglich sollten die Vermessungen der diastereomerenreinen Membranen und der Vergleich zum Referenzsystem über die berechneten Neutronenstreulängedichtprofile Aussagen zulassen, inwieweit die Diastereomeren die innere Membranstruktur beeinflussen. Dieser Vergleich ist uneingeschränkt nicht möglich gewesen, da der Berechnung des Membranprofils des Referenzsystems fünf Diffraktionsordnungen zugrunde lagen, dem der diastereomerenreinen Membranen jeweils nur drei. Des Weiteren gilt das Neutronenstreulängedichteprofil des Referenzsystems für T=32°C und 60% r.H. Das bei analogen Bedingungen aufgenommene Spektrum des D-CER[AP]-Systems war aufgrund der beobachteten zwei Phasen nicht zur Berechnung geeignet. Somit ergab sich eine gegenüberstehende Betrachtung des Referenzsystems bei 60% r.H. und des D-CER[AP]-Systems bei 98% r.H. Der sich daraus ergebene Vergleich kann daher lediglich als Näherung gesehen werden. (Auf eine entsprechende Diskussion zum Neutronenstreulängedichteprofil des L-CER[AP]-Systems wird an dieser Stelle

verzichtet, da es sich bei L-CER[AP] nicht um die natürlich vorkommende Form des CER[AP] handelt.)

In der Auswertung beider Membranprofile (Abb.47) fällt auf, dass sie die charakteristischen Membranbereiche (Bereiche der polaren Kopfgruppen an den zwei Seiten des Profils; Bereich der Methylgruppen in der Profilmitte) teilen. Daraus lässt sich schließen, dass in beiden Membranen eine vergleichbare Organisation der Lipide in der Matrix vorliegt. Diese Feststellung erlaubt wiederum den Vergleich beider Profile durch Darstellung im gleichen relativen Maßstab (Abb.47), wobei die Normierung auf die in beiden Fällen gleich ausgeprägten Bereiche der Methylgruppen erfolgte. Die zwei Profile unterscheiden sich im Feuchtigkeitsgehalt, bei dem die Probe vermessen wurde. Dieser Unterschied hat Auswirkungen auf die Membranstruktur.

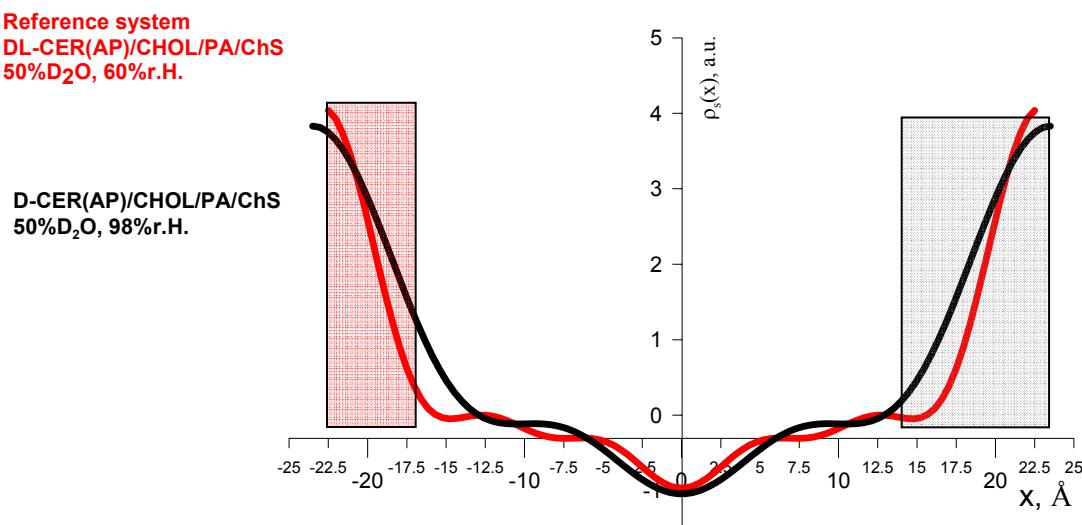


Abb.47 Vergleichende Betrachtung der Neutronenstreu längedichteprofile $\rho_s(x)$ der Referenzmembran (rot) zum D-CER[AP]-System (schwarz). Der Unterschied zwischen beiden besteht in der Breite des Übergangsbereichs zwischen dem hydrophilen und dem hydrophoben Membranbereich. Dieser ist gekennzeichnet durch einen steilen Abfall für die Referenzmembran (links-rotes Rechteck) bzw. durch einen breiten Übergang für das D-CER[AP]-System (rechts-graues Rechteck)

Das Profil des Referenzsystems weist einen scharfen Übergang zwischen dem Bereich der polaren Kopfgruppe und dem hydrophoben Membranbereich auf. Bei 60% r.H. erfolgt nur eine geringe Hydratation der Kopfgruppe, da nur wenig Wasser vorliegt. Zudem liegt nach den Vorstellung des *armature reinforcement* Modells [Kiselev 2007; Kessner et al. 2007a] ein bestimmter Anteil an CER[AP] in *full extended*-Konformation vor, der aufgrund der Abschirmung der Kopfgruppen durch die Seitenketten nicht mit Wasser in Wechselwirkung treten kann. Außerdem erfolgt eine starke Absättigung der polaren Kopfgruppen durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. Diese drei Effekte bedingen in Analogie zu anderen Studien [Nagle und Tristram-Nagle 2000] die geringe

Hydratation der polaren Kopfgruppen, eine geringe Fläche/ Kopfgruppe und eine geringe Eindringtiefe des Wassers in den Bilayer. Dieses Verhalten wird durch die scharfe Grenze zwischen hydrophilem und hydrophobem Membranbereich deutlich.

Für den Fall des D-CER[AP]-Systems ist der Übergang zwischen hydrophilem und hydrophobem Membranbereich wesentlich breiter. Dieses könnte auf folgende Effekte zurückzuführen sein: die Kopfgruppe des D-CER[AP] weist eine hohe Polarität auf und zusammen mit der Vermutung, dass in diesem System der Einfluss des Ceramidanteils in Haarnadel-Konformation groß ist, ergibt sich eine bessere Hydratation des hydrophilen Bereichs. Demzufolge ist die Fläche/ Kopfgruppe größer, woraus eine höhere Beweglichkeit und ein größerer Platzbedarf der Alkylketten resultiert [Nagle und Tristram-Nagle 2000]. Somit kann das Wasser tiefer in den Bilayer penetrieren und der Übergang zum hydrophoben Bereich ist diffuser und weniger scharf als beim Referenzsystems. Dieses Verhalten wird ebenfalls noch durch das Vorliegen eines hohen atmosphärischen Wassergehaltes von 98% r.H. in der Messzelle begünstigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aufgrund der experimentellen Bedingungen näherungsweise ein Vergleich zwischen dem Membranprofil des Referenzsystems (Mischung DL-CER[AP]) und dem D-CER[AP]-System möglich war. Im Rahmen des experimentellen Fehlers vergleichbare *d*-Werte erlaubten die Darstellung beider Membranprofile im gleichen relativen Maßstab und es ergab sich für beide die gleiche Lipidorganisation innerhalb der Membran. Allerdings bedingen sowohl ein höherer rel. Feuchtigkeitsgehalt (98%) als auch die Verwendung des reinen Diastereomers D-CER[AP] eine Aufweitung des Übergangs zwischen hydrophilen und hydrophobem Membranbereich. Zusammen mit den vorangestellten Beobachtungen über den Einfluss der zwei Diastereomere auf das Phasenverhalten der Membran lässt sich folgendes schlussfolgern: der Aufbau der Membran ist relativ unabhängig von dem verwendeten Diastereomer. Die Eigenschaften der Membran hingegen werden deutlich beeinflusst, je nachdem ob die Mischung aus DL-CER[AP] oder das jeweilige Diastereomer vorliegt.

Im Rahmen dieser ersten Neutronendiffraktionsstudie über das Phasenverhalten von SC Lipid-Modellmembranen konnte ebenfalls die Bedeutung der gewählten Methode verdeutlicht werden. Nicht nur die Lipidorganisation bzw. eine Lokalisation einzelner Lipide durch Deuteriummarkierungen lassen sich im Membranprofil verfolgen, sondern auch die Einflüsse äußerer Parameter wie rel. Feuchte und Temperatur werden im Neutronenstreulängedichteprofil erkennbar.

IV.3.2. Entwicklung von SC Lipid-Modellsystemen unter Verwendung des ω -Acylceramids CER[EOS]

Innerhalb der SC Lipidmatrix stellen die Ceramide die mengenmäßig größte Fraktion dar, deren Bedeutung für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion unumstritten ist. Der genaue Mechanismus der Barrierefunktion bzw. die Rolle der neun Ceramid-Spezies sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Aus der Literatur ist bekannt, dass das ω -Acylceramid CER[EOS] eine Schlüsselrolle bei dem Aufbau der Hautbarriere einnimmt [Bouwstra et al. 1998; McIntosh 2003]. Bedingt durch seine einzigartige Struktur aus einer ω -Hydroxy-Triacontansäure verestert mit der doppelt ungesättigten Linolsäure soll es die Ausbildung einer Long-Periodicity-Phase (LPP) von 130 Å bedingen. Allerdings ist sowohl die Existenz der LPP als auch der Aufbau innerhalb dieser Phase immer wieder Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen [Pfeiffer et al. 2000; Al-Amoudi et al. 2005].

Ziel der vorgestellten Studie war zunächst die Entwicklung einer einfachen Lipidmembran, die kommerziell erworbenes CER[EOS] enthielt. Das aus den Neutronenstreudaten berechnete Membranprofil sollte den Einfluss des CER[EOS] auf den Membranbildungsprozess zeigen, vor allem unter Beachtung der besonderen Ceramidstruktur.

In Fortführung dieser Studie sollte dann zum einen der Einfluss der Kopfgruppenarchitektur auf die Membranstruktur untersucht werden. Dazu wurde CER[EOS] durch CER[EOP], das als Phytosphingosin eine höhere Polarität der Kopfgruppe aufweist, ausgetauscht.

Des Weiteren wurde das primär entwickelte CER[EOS]-basierte System in seiner Zusammensetzung so variiert, dass die Lipidmischung auf Modellebene der SC Lipidmatrix entsprach. Dieses „*SC Lipid Model substitute*“ wurde dann mithilfe der Neutronenstreuung umfangreich charakterisiert.

IV.3.2.1. Entwicklung eines ternären SC Lipid Modellsystem CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL

Die im Rahmen dieser Studie untersuchten Systeme wurden entsprechend der beschriebenen Methode präpariert und am V1 Diffraktometer des HMI Berlin vermessen (Tab.10).

SC Modellsystem	Experimentellen Bedingungen	Scan
CER[AP]/ CHOL 50/50 % (m/m)	T=32°C; 60% r.H. H ₂ O/ D ₂ O 92/ 8 (m/m)	theta-2*theta scan
CER[EOS]/ CHOL/ PA 55/ 25/ 20 % (m/m)	T=32°C; 60% r.H. H ₂ O/ D ₂ O 92/ 8 (m/m)	theta-2*theta scan
CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL 33/ 22/ 45 % (m/m)	T=32°C; 60% r.H. H ₂ O/ D ₂ O 50/ 50; 0/100 (m/m)	theta-2*theta scan
CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ PA 33/ 22/ 25/ 20 % (m/m)	T=32°C; 60% r.H. H ₂ O/ D ₂ O 92/ 8 (m/m)	theta-2*theta scan

Tab.10 Übersicht über die untersuchten Systeme sowie über die experimentellen Bedingungen

In der Auswertung der Daten wurde zunächst überprüft, inwiefern die einzelnen Systeme multilamellar orientierte Membranen ausbilden.

Für die Mischung CER[AP]/ CHOL konnte keine lamellare Orientierung nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von de Jager et al. [2003], die eine geeignete Kettenlängenverteilung von Ceramiden bzw. FFA als Notwendigkeit für den Erhalt einer geeigneten Lipidmischung beschreiben.

Das System CER[EOS]/ CHOL/ PA bildete ebenfalls keine multilamellare Membran. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass nicht nur die Anwesenheit von CER[EOS], sondern auch eine geeignete Anzahl anderer Ceramide für die Ausbildung der Lipidorganisation bedeutsam ist [de Jager et al. 2003].

Aus den Neutronendiffraktionsmustern des Systems CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL konnte die Ausbildung einer multilamellaren Ordnung abgeleitet werden (Abb.48).

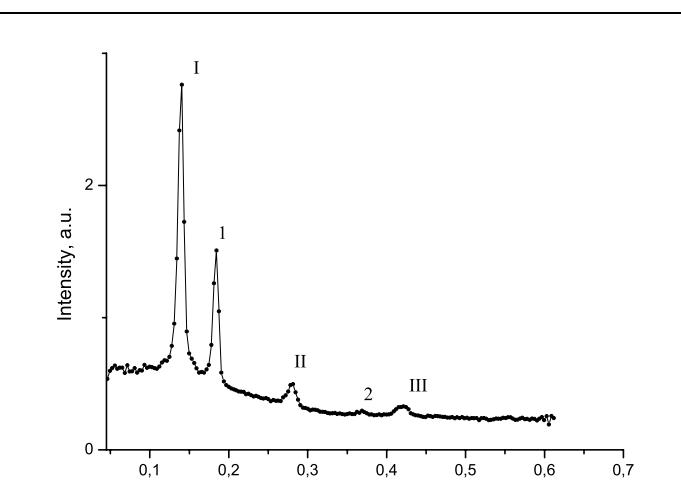
Der lamellare Wiederholabstand d wurde mit 45,2 Å berechnet. Das Auftreten einer Long-periodicity Phase (LPP) von 130 Å wurde hingegen nicht beobachtet.

Zusätzlich wurde phasensepariertes Cholesterin anhand der Reflexe bei $Q_1=0,18 \text{ \AA}^{-1}$ und $Q_2=0,37 \text{ \AA}^{-1}$ festgestellt.

Zur Absicherung der Zugehörigkeit

Abb.48 Neutronendiffraktionsbild CER[EOS]/ CER[AP]/CHOL bei T=32°C; 60%r.H., H₂O/ D₂O 50: 50
I,II,III: Diffraktionsordnungen der Modellmembran
1,2: Reflexe CHOL-Kristalle

dieser Reflexe zu CHOL-Kristallen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Balagurov



(Frank Laboratory of Neutron Physics, JIND, Dubna, Russland) Berechnungen zur Bestimmung der Gitterkonstanten des Cholesterol-Kristalls miteinbezogen. Die Auswertung dieses Systems war möglich, da in vielen Arbeiten [Huang et al. 1999; Brzustowicz et al. 2002; Jager et al. 2005; Ali et al. 2006], beschrieben ist, dass das Auftreten von kristallinen Cholesterol nicht die Ausbildung der multilamellaren Lipidorganisation beeinträchtigt.

Für die Mischung CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ PA konnte zwar ein lamellarer Wiederholabstand von $d = 42.2 \text{ \AA}$ ermittelt werden, allerdings traten hier neben CHOL-Kristallen zusätzlich Reflexe von phasenseparierter Palmitinsäure auf, die eine Berechnung des Neutronenstreulängedichtprofils nicht möglich machten.

Zusammenfassend erwies sich lediglich das ternäre System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL als geeignet, als CER[EOS]-basiertes multilamellares Modellsystem weiter betrachtet zu werden. Es hat sich bestätigt, dass eine geeignete Kettenlängenverteilung (CER[EOS]: $\Sigma C48$ und C16; CER[AP]: $\Sigma C18$ und C16) notwendig ist, um Cholesterol hinreichend in der Lipidmatrix zu solubilisieren und die Ausbildung einer Membran zu ermöglichen. Die LPP wurde trotz der Anwesenheit von CER[EOS] nicht detektiert.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Vervollständigung der Lipidmischung durch eine Fettsäure (FFA) für die Ausbildung der langen Periodizität erforderlich ist [de Jager et al. 2003]. Unsere Untersuchungen am System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ PA haben ebenfalls nicht die Existenz einer LPP hervorgebracht. Die Phasenseparierung der PA wurde auf die Unterschiede in den Kettenlängen von CER[EOS] und PA zurückgeführt, welches die Ausbildung einer homogenen Mischung verhinderte.

Aus dem Neutronendiffraktionsbild des Systems CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL konnte das Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ berechnet werden (Abb.49). Bei der Bestimmung der Vorzeichen der Strukturfaktoren musste hierbei beachtet werden, dass die Probe nur bei zwei H₂O/ D₂O Kontrasten vermessen werden konnte. Üblicherweise benötigt man drei Kontraste, um die Abhängigkeit der Strukturfaktoren vom D₂O-Gehalt entsprechend der Regel von Worcester [1976] und Franks und Lieb [1979] zuzuordnen. Da allerdings die Diffraktionsordnungen bei einem Kontrast von H₂O/ D₂O 92/8 (w/w) eine zu geringe Intensität zeigten, konnte diese Messung nicht mit in die Auswertung eingehen. Die Vorzeichen der Strukturfaktoren wurde daher aus den sechs sich ergebenen Möglichkeiten als -, +, - für die Diffraktionsordnungen 1, 2 und 3 bestimmt. Diese Zuordnung ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen an SC Lipid-Modellsystemen.

Anschließend wurde durch eine Fourier-Synthese das Neutronenstreuulängedichteprofil über die Membran im relativen Maßstab erhalten. Üblicherweise erlaubt erst die Anwesenheit von vier Diffraktionsordnungen die Durchführung einer Fourier-Synthese. Aufgrund des angestrebten Vergleichs zum Referenzsystem wurde die Berechnung des $\rho_s(x)$ mit drei Ordnungen durchgeführt [Kiselev 2006].

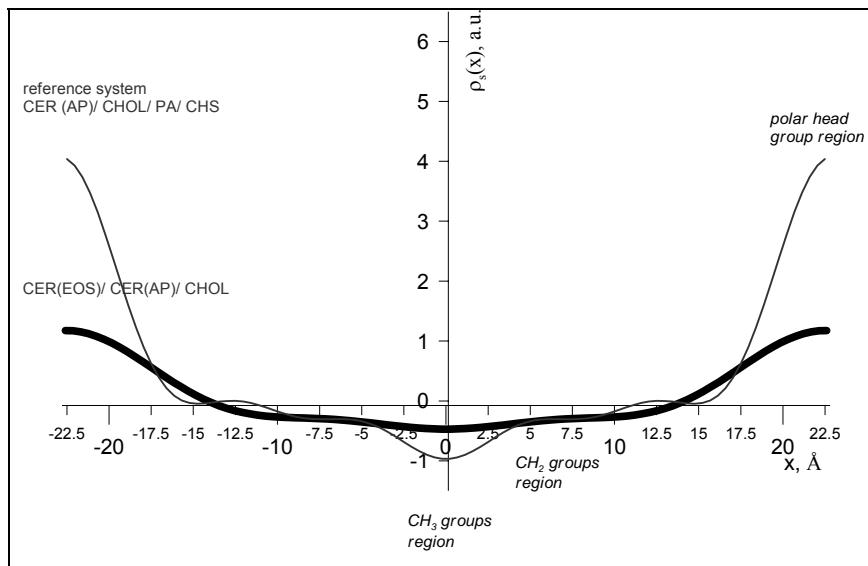


Abb.49 Neutronenstreuulängedichteprofil $\rho_s(x)$ der CER[EOS]/CER(AP)/ CHOL Membran (33/22/45 % (w/w)) bei 60% r.H.; H_2O/D_2O 50: 50, $T=32^\circ\text{C}$ gegen die CER(AP)/ CHOL/ PA/ ChS (55/25/15/5 % w/w) Membran gemessen unter den gleichen Bedingungen.

In der Auswertung der Daten fiel auf, dass der lamellare Wiederholabstand $d= 45,2 \text{ \AA}$ vergleichbar ist mit dem des Referenzsystems CER(AP)/ CHOL/ PA/ ChS ($d= 45,6 \text{ \AA}$). Daher konnten beide Profile in einer graphischen Darstellung gezeigt werden (Abb.49). Da beide Profile jeweils in einem relativen Maßstab (*engl. arbitrary units, a.u.*) berechnet wurden, mussten sie für den angestrebten Vergleich normiert werden.

Für diesen Vorgang wurden die kohärenten Streulängen für Methyl- ($-0,087 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) bzw. Methylengruppen ($-0,030 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) herangezogen.

Im Fall der Referenzmembran wird die Membranmitte ausschließlich von Methylgruppen gebildet [Kiselev et al.2005]. Deren Streulänge von $-0,087 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ wird der Einfachheit halber auf -1 a.u. gesetzt. Da im Verhältnis zur Referenzmembran der Methylgruppenbereich der CER[EOS]/ CER(AP)/ CHOL Membran Unterschiede aufweist, konnte dieser nicht für die Normierung genutzt werden. Daher wurde auf den Bereich der Methylengruppen normalisiert, der von keiner anderen molekularen Gruppe verfälscht wurde und als konstant angesehen werden konnte. Daher wurde dieser Bereich auf -0,3 a.u. normiert, entsprechend der kohärenten Neutronenstreuulänge von $-0,030 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ für die CH₂-Gruppe.

Aus der so gewählten Darstellung beider Membranprofile konnten folgende Ergebnisse abgeleitet werden.

- i). Analog zum Referenzsystem wies auch das Membranprofil des ternären Systems keinen messbaren Intermembranraum auf. Der lamellare Wiederholabstand d und die Membrandicke d_m entsprechen sich, was auch rechnerisch nachgewiesen wurde.
- ii). Beide Profile teilen den Bereich der polaren Kopfgruppen, allerdings unterscheiden sie sich in den Intensitäten der Maxima. Das ternäre System weist in diesem Bereich eine geringere Intensität auf.
- iii). Das Minimum von $\rho_s(x)$ in der Membranmitte für das Referenzsystem korreliert mit der Position der Methylgruppen. Laut Abb.49 ist die Intensität dieses Bereichs für das ternäre System geringer ausgeprägt. Dieser Fakt deutet darauf hin, dass dieser charakteristische Membranbereich nicht nur von Methylgruppen gebildet wird.

Das Fehlen der LPP im ternären System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL, die nahezu identischen Periodizitäten für das ternäre und das Referenzsystem sowie die aus dem Membranprofil abgeleiteten Ergebnisse führten zu der Annahme, dass das langkettige CER[EOS] in die Phase kurzer Periodizität von 45,2 Å integriert wurde. Die lange ω -Acylseitenkette ragt in den Nachbarlayer hinein und fungiert damit als *molekularer Anker*. Zur Visualisierung dieser Erkenntnisse wurde eine schematische Darstellung der ternären Membran entwickelt (Abb.50).

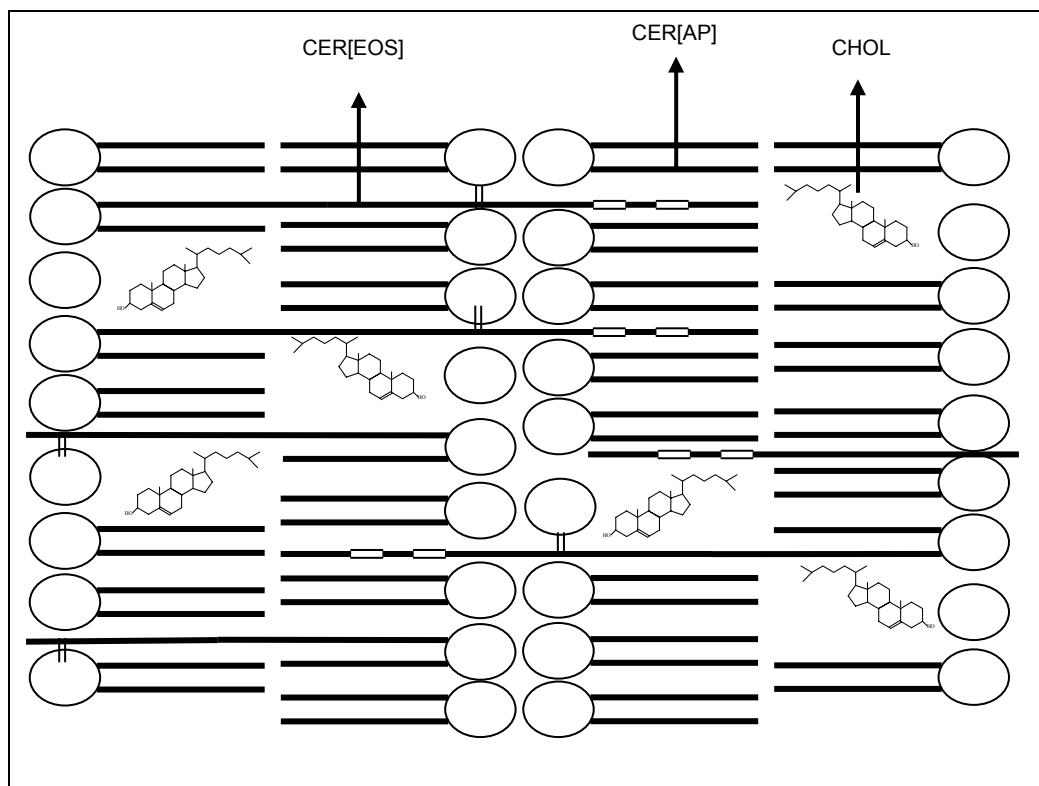


Abb.50 Schematische Darstellung der CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL Modellmembran

Die geringere Intensität im Bereich der polaren Kopfgruppen geht auf die im Vergleich zum Referenzsystem zusätzlich vorhandenen Methylengruppen der durchspannenden ω -Acylseitenkette zurück. Der negative Wert der kohärenten Streulänge von CH₂-Gruppen führt zur Absenkung der Streulängenintensität in diesem Bereich.

Das Minimum in der die CH₃-Gruppen darstellenden Membranmitte ist für das ternäre System weniger stark ausgeprägt. Die weniger negativ streuenden CH₂-Gruppen der durchspannenden Ketten ersetzen eine bestimmte Anzahl von stärker negativ streuenden CH₃-Gruppen im Vergleich zur Referenzmembran. Die herabgesetzte Zahl an CH₃-Gruppen bedingt das geringer ausgeprägte Minimum an dieser Stelle im Membranprofil des ternären Systems.

Zur Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurden CER[EOS] und CER[AP] auf das Neutronenstreu längendichteprofil projektiert (Abb.51)

Diese vorgeschlagene zwei Bilayer durchspannende Anordnung des CER[EOS] lässt sich auf den amphiphilen Charakter der Ceramide stützen. Die lipophilen Alkylketten verankern die Moleküle im hydrophoben Membranbereich. Die hydrophilen Kopfgruppen mit freien OH- und NH-Gruppen ermöglichen, dass Ceramide als Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren fungieren können. Wenn

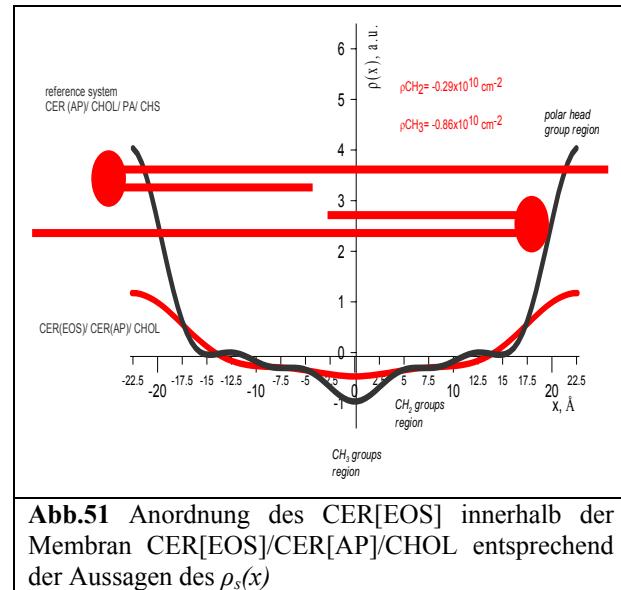


Abb.51 Anordnung des CER[EOS] innerhalb der Membran CER[EOS]/CER[AP]/CHOL entsprechend der Aussagen des $p_s(x)$

diese Bindungen in lateraler Richtung ausgeprägt werden, führen sie zusätzlich zur Erhöhung der Stabilität der Membran [Pascher 1976].

Im vorliegenden Fall muss auch die geringe intermembranäre Wasserschicht in Betracht gezogen werden, denn sie schließt intermembranäres Wasser nahezu als Partner für die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen aus. Daher ist anzunehmen, dass sich Wasserstoffbrückenbindungen zu den Kopfgruppen benachbarter Membranschichten ausbilden. Dieses bedingt eine interne Neutralisation und führt zu einem Absinken der Polarität der hydrophilen Membranregion. Dieses wiederum erlaubt die postulierte Anordnung des CER[EOS], dessen hydrophobe Alkylkette den in seiner Hydrophilie abgeschwächten Bereich der polaren Kopfgruppen durchdringt.

Zusätzlich befindet sich auch die Esterfunktion in *omega*-Position der Triacontan-Fettsäurekette in Bereich der polaren Kopfgruppen. Die von ihr ausgehenden Wasserstoffbrückenbindungen forcieren ebenfalls die Verankerung des CER[EOS] in der Lipidmatrix mit einem kurzen Wiederholabstand.

Zusammenfassend konnte als Hauptergebnis das Fehlen der LPP unter den gewählten experimentellen Bedingungen festgestellt werden. Damit tragen unsere Untersuchungen zu den weitreichenden Diskussionen über die Existenz dieser Phase bei. Wir vermuten, dass andere Bedingungen als nur die Anwesenheit von CER[EOS] für die Ausbildung nötig sein müssen. Fehler bezüglich der gewählten Präparationsmethode der Membranen bzw. bezüglich der Evaluierung der Neutronenstreudaten sollten die Verifizierung der vorliegenden Daten nicht berühren, da es sich jeweils um etablierte und wissenschaftlich akzeptierte Abläufe handelte.

Als ein weiteres wichtiges Resultat dieser Studie kann die offensichtlich besondere Rolle des kurzkettigen CER[AP] auf den Membranbildungsprozess angesehen werden.

Der lamellare Wiederholabstand d von 45,2 Å entspricht der Breite einer Schicht, die von zwei sich gegenüberstehenden CER[AP] Molekülen gebildet wird.

Die Kopfgruppenstruktur des Ceramids mit vier benachbarten OH-Gruppen ist für die Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen in lateraler Richtung bekannt [Rerek et al. 2001]. Diese Eigenschaft scheint eine superstabile Membran-Nanostruktur mit einer kurzen Periodizität zu erzeugen, die das längerkettige, aber weniger polare CER[EOS] zur Anordnung in diese Phase zwingt. Detaillierte Studien zur Rolle des CER[AP] in SC Lipid-Modellmembranen werden in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit beschrieben.

Abschließend zu dieser Studie ist zu sagen, dass es sich hierbei um den ersten Versuch zur Charakterisierung einer multilamellaren, CER[EOS]-basierten Modellmembran in Neutronenstreuxperimenten handelte. Es wurde das Fehlen der oft mit der Anwesenheit von CER[EOS] assoziierten LPP und eine superstabile Membranstruktur auf der Basis von CER[AP] festgehalten. Es bleibt anzumerken, dass diese einfache SC Lipidmischung nicht die Eigenschaften der komplexen SC Lipidmatrix widerspiegeln kann. Aber es konnte gezeigt werden, dass die Neutronenstreuung durch Ermittlung des internen Membranprofils gut geeignet ist, den Einfluss einzelner Lipide, insbesondere einzelner Ceramide, auf den Membranbildungsprozess zu untersuchen.

(eingereicht als: **Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauß, T., Dante, S., Lersch, P., Wartewig, S., Neubert, RHH**

Arrangement of ceramide [EOS] in a stratum corneum lipid model matrix – new aspects revealed by neutron diffraction studies

bei European Biophysical Journal (2008), Online veröffentlicht)

IV.3.2.2. Einfluss der Kopfgruppenstruktur des ω -Acylceramids auf die Membranstruktur – Austausch des CER[EOS] durch CER[EOP]

Nachdem für das ternäre System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL auf Grundlage des Neutronenstreuulängedichthe profils $\rho_s(x)$ eine mögliche Lipidorganisation postuliert werden konnte, sollte in einem weiteren Versuch der Einfluss der Kopfgruppenstruktur des ω -Acylceramids auf die Membranstruktur durch Austausch des CER[EOS] gegen CER[EOP] bestimmt werden.

Der Unterschied zwischen beiden Ceramiden besteht darin, dass CER[EOP] in der Kopfgruppe eine zusätzliche OH-Gruppe aufweist. Demnach ist CER[EOS] den Sphingosinen zuzuordnen, CER[EOP] den Phytosphingosinen. Im nativen Stratum corneum entspricht der CER[EOS]-Anteil an der Gesamtmenge aller Ceramide 8,3%, der CER[EOP]-Anteil liegt bei 6,4% [Ponec et al. 2003].

In der Studie von de Jager et al. [2004c] wurden an synthetischen SC Lipidmischungen SAXS Untersuchungen durchgeführt. Diese Mischungen enthielten als ω -Acylceramid entweder nur CER[EOS], nur CER[EOP] oder definierte Mischungen beider Subspezies. Als Hauptergebnis wurde festgehalten, dass CER[EOS] innerhalb der Mischung die Ausbildung einer LPP induziert. Ein teilweiser Austausch von CER[EOS] gegen CER[EOP] beeinflusste diese konventionelle Lipidorganisation kaum, wobei der komplette Austausch unter Phasenseparation von CER[EOP] nicht zu einer Bildung der LPP führte. Diese Beobachtungen wurden auf die höhere Polarität des CER[EOP] zurückgeführt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Röntgen-Kleinwinkel-, bzw. Weitwinkelmessungen an CER[EOS] und CER[EOP] zeigten ebenfalls einen nachweislichen Einfluss der Kopfgruppenpolarität auf das Phasenverhalten (siehe Kapitel IV.1.).

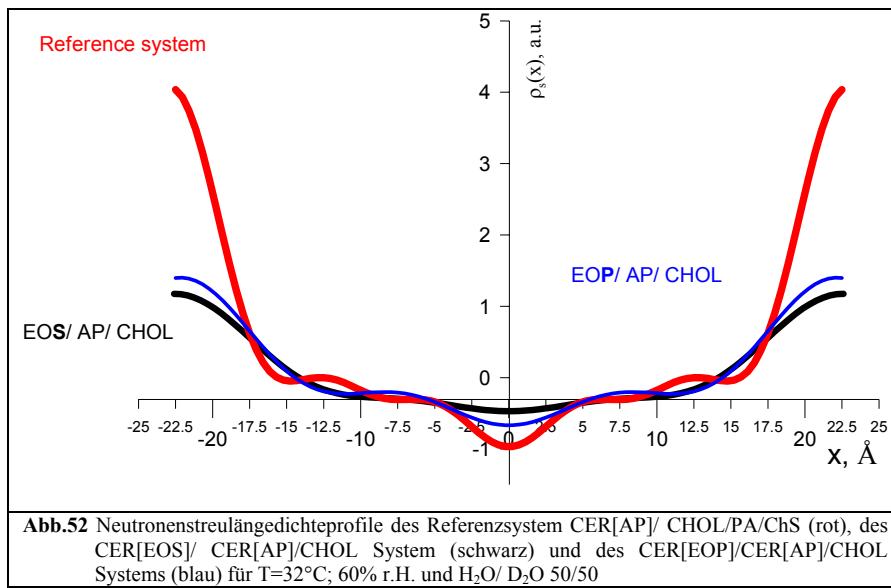
Im folgend vorgestellten Experiment stellte sich die Frage, welcher Effekt des CER[EOP] in Neutronenstreuexperimenten an orientierten SC Lipid-Modellmembranen festzustellen ist. Für die CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL (33/ 22/ 45% (m/m)) Modellmembran wurde gezeigt, dass das kurzkettige, sehr polare Phytosphingosin CER[AP] eine sehr stabile, aber kurze Periodizität ausbildet, in die sich das längerkettige, aber weniger polare Spingosin CER[EOS] einpassen muss. Wie verhalten sich nun die zwei Phytosphingosine CER[EOP] und CER[AP] zueinander?

Die multilamellare CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL (33/ 22/ 45% (m/m)) Membran wies im Diffraktionsbild lediglich drei Ordnungen vergleichsweise geringer Intensität auf, was die Ortsauflösung des Membranprofils beschränkt.

Der aus der Peakposition berechnete lamellare Wiederholabstand d ergab 44,4 Å. Im Verhältnis zum ternären System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL ($d= 45,2$ Å) weicht dieser Wert zwar mehr von dem des Referenzsystems CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% (m/m)) ab ($d= 45,6$ Å), aber ein näherungsweiser Vergleich war dennoch möglich. Eine LPP von 130 Å wurde für dieses System nicht detektiert.

Erste Aussagen bezüglich der Lipidorganisation in der CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL-Modellmembran können nach Auswertung des Diffraktionsmusters bereits getroffen werden. Aufgrund des Fehlens der LPP und der stattdessen beobachteten Phase von ≈ 45 Å kann eine zum CER[EOS] analoge Anordnung des CER[EOP] postuliert werden. Nähere Aussagen über die Art der Anordnung sollen dem Neutronenstreulängedichtheprofil entnommen werden.

Wie bereits beschrieben, wies das Diffraktionsbild nur drei Reflexe geringer Intensität auf, so dass dem berechneten Fourier-Profil keine gesicherten Aussagen entnommen werden



können. Aufgrund der Vergleichbarkeit der d -Werte der drei Systeme CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL, CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL und CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS erfolgte die gemeinsame graphische Darstellung im relativen Maßstab (Abb.52). Zur Absicherung der daraus abgeleiteten Ergebnisse wurde unter Verwendung des Software-Programms IGOR PRO 6 eine Fehlerrechnung in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Thomas Hauß (Instrumentenverantwortlicher V1 Diffraktometer, HMI, Berlin) durchgeführt.

Wie in der Arbeit von Dante et al. [2002] beschrieben, dient die Bestimmung der Fehlergrenzen der Absicherung der aus dem Neutronenstreulängedichtheprofil $\rho_s(x)$

abgeleiteten Membraneigenschaften. Der Fehler im $\rho_s(x)$ entsprechend der Konfidenzschätzung ist gegeben durch

$$\Delta\rho(x) = t\{\text{var}(\rho(x))\}^{\frac{1}{2}} \quad \text{Gleichung 13}$$

wobei t der Studentische' t-Faktor und $\text{var}(\rho(x))$ die Varianz von $\rho(x)$ darstellen. Da die Strukturfaktoren unabhängig voneinander sind, ergibt sich folgende Form der obigen Gleichung

$$\Delta\rho(z) = \frac{2t}{d} \left[\sum_{h=0}^n (\Delta F(h))^2 \cos^2\left(\frac{2\pi h z}{d}\right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Gleichung 14}$$

Die Fehlerrechnung wurde mithilfe des Software-Programms IGOR PRO 6 auf Basis der in Tabelle angegeben Werte durchgeführt. Die Fehlergrenzen wurden dabei mit einem t-Faktor von 1,96 als 95% Konfidenzschätzung berechnet [Bronstein und Semendjajew 1986], d.h. dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% der nächste gemessene Datenpunkt (Streulängedichte) innerhalb der Fehlergrenze liegt.

Strukturfaktoren Fehler	CER[EOS]/CER[AP]/CHOL	CER[EOP]/CER[AP]/CHOL
Gitterkonstante	45,23 Å	44,43 Å
F_0	-0,02	-0,02
F_1	0,077	0,085
1%	0,0007	0,0008
F_2	0,0325	0,03
5%	0,001	0,001
F_3	0,015	0,0285
10%	0,0015	0,003

Tab.11 Die der durchgeföhrten Fehlerrechnung zugrunde liegenden Daten

In Abb.53 ist das Neutronenstreulängedichteprofil $\rho_s(x)$ von CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL (rote durchgezogene Linie) einschließlich der Fehlergrenzen (rot gestrichelt) und das $\rho_s(x)$ von CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL (blau) einschließlich der Fehlergrenzen (blau gestrichelt) dargestellt.

Aus der Darstellung kann sofort abgeleitet werden, dass die signifikantesten Unterschiede im Bereich der polaren Kopfgruppen auftreten, da hier die untere Fehlergrenze des $\rho_s(x)$ von CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL noch bei einer höheren Streulängendichte als die obere Fehlergrenze des $\rho_s(x)$ von CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL liegt.

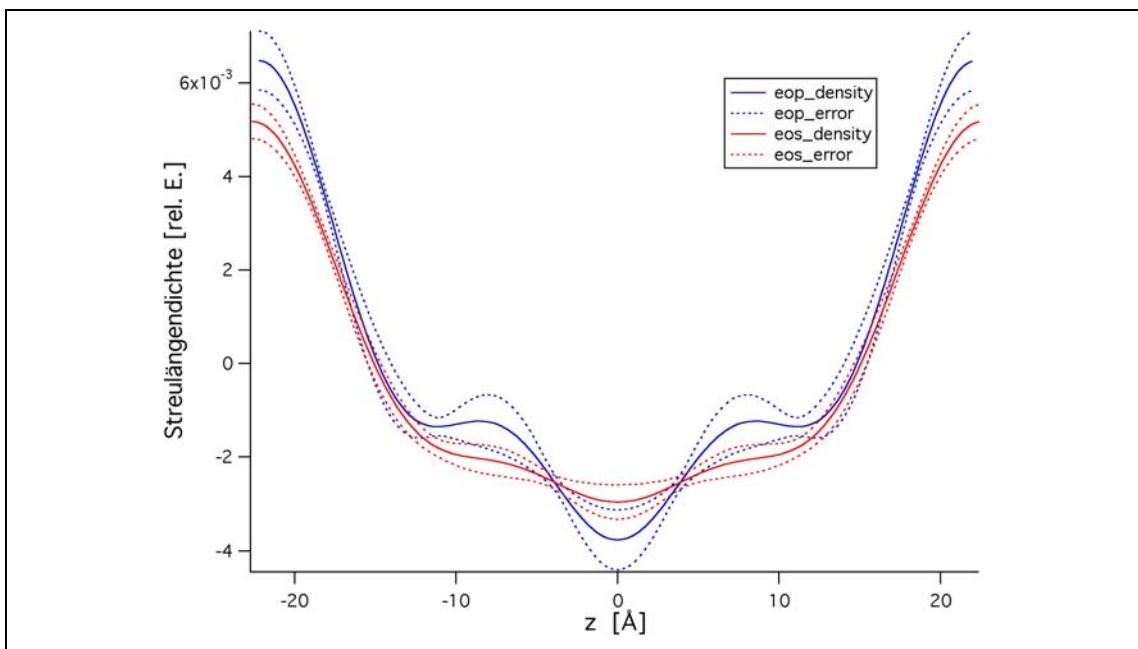


Abb.53 Die Neutronenstreu längendichthe profile $\rho_s(x)$ von CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL (rot) und CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL (blau) einschließlich der jeweiligen Fehlergrenzen (gestrichelt); Berechnet für T=32°C, 60% rel. Feuchtigkeit und H₂O/ D₂O Kontrast von 50/ %0 (m/m)
Die Berechnung der Fehlergrenzen erfolgte mittels des Computerprogramms IGOR PRO 6, (Skalierung (offset): F₀=-0,02).

Der Bereich der Membranmitte wird durch Methylen- bzw. Methylgruppen gebildet. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass sich die Fehlergrenzen für beide Systeme überlappen und somit angenommen werden kann, dass in beiden Membranen in diesem Bereich eine ähnliche Dichteverteilung trotz eines großen Fehlerbalkens besteht.

Zusammenfassend kann daher folgendes über die Anordnung des CER[EOP] in der Lipidmatrix festgehalten werden:

I). Analog zum ternären System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL führten die drei Beobachtungen:

1. vergleichbarer d -Wert zum Referenzsystem und zum ternären System
2. Fehlen der LPP
3. keine intermembranäre Hydratation

zu der Annahme, dass das CER[EOP] sich innerhalb der kurzen Periodizität von \approx 45 Å anordnet und die lange ω -Acylseitenkette in den Nachbarlayer hineinragt.

Durch den Vergleich der Membranprofile der drei relevanten Systeme kann die Anordnung des CER[EOP] in der Lipidmatrix präzisiert werden. Die durchgeföhrte Fehlerrechnung dient der Absicherung der folgenden Aussagen.

II). Im Bereich der polaren Kopfgruppen weist das CER[EOP]-basierte System eine Streulängendichteintensität größer als die des CER[EOS]-basierte Systems, aber

kleiner als die des Referenzsystems auf. Letzteres geht auf die im Vergleich zum Referenzsystem zusätzlich vorhandenen Methylengruppen der durchspannenden ω -Acylseitenkette zurück. Der negative Wert der kohärenten Streulänge von CH₂-Gruppen führt so zur Absenkung der Streulängenintensität.

Im Vergleich zum CER[EOS]-basierten System ist diese Absenkung der Intensität aber geringer ausgeprägt. Dieser Effekt geht auf die polarere Kopfgruppenstruktur des CER[EOP] mit einer zusätzlichen OH-Gruppe zurück. Heteroatome besitzen eine positive Streulänge und in der Summe ergibt sich für diesen Bereich für das CER[EOP]-basierte System eine höhere Streulängendichte als für das CER[EOS].

III). In der Membranmitte bilden sich für beide ω -Acylceramid-basierte Systeme ein geringeres Minimum innerhalb der Fehlergrenzen aus als für das Referenzsystem. Die an dieser Stelle zu den Methylgruppen zusätzlich vorhandenen Methylengruppen bedingen, dass in der Summe ein weniger negativer Wert für die Streulängendichte in diesem Bereich resultiert.

Als Ergebnis dieser Studie bleibt festzuhalten, dass die Substitution des CER[EOS] durch das CER[EOP] keine gravierenden Änderungen der Membranstruktur bedingte. Für beide ω -Acylceramid-basierten Systeme konnte keine LPP detektiert werden. Anhand der berechneten Neutronenstreuängedichteprofile kann für beide ω -Acylceramide die gleiche Anordnung in der Lipidmatrix postuliert werden. Durch die zwei Bilayer durchspannende Anordnung fungiert das CER[EOP], analog dem CER[EOS], als *molekularer Anker*. Die unterschiedlichen Kopfgruppenpolaritäten von CER[EOS] und CER[EOP] konnten im Vergleich der Membranprofile identifiziert werden.

In der Diskussion der Ergebnisse muss festgehalten werden, dass auch für das CER[EOP]/CER[AP]/CHOL System eine dominante Rolle des kurzkettigen, sehr polaren CER[AP] innerhalb des Membranbildungsprozess festgestellt wurde. Auch in der Mischung zweier Phytosphingosine übertrifft die höhere Polarität des CER[AP] (vier OH-Gruppen vs. drei OH-Gruppen im CER[EOP]) den Effekt der langen hydrophoben Seitenkette.

Abschließend ist zu beachten, dass die im vorliegenden Kapitel präsentierte Studie lediglich einen Anfang in der Charakterisierung des CER[EOP] in den SC Lipid-Modellmembranen darstellt. Weitere Untersuchungen müssen sich anschließen, um den Einfluss weitreichender bestimmen zu können und um einen umfassenden Vergleich zu analogen CER[EOS]-basierten Systemen zuzulassen.

IV.3.2.3. Entwicklung des quaternären SC Lipid-Modellsystems CER[EOS]/CER[AP]/ CHOL/ Behensäure (BA)

In den zwei vorhergehenden Abschnitten wurde der Einfluss des ω -Acylceramids auf eine einfach zusammengesetzte SC Lipid-Modellmatrix diskutiert. Weder für CER[EOS] noch für CER[EOP] wurde dabei eine ihrer molekularen Struktur entsprechende Phase langer Periodizität (LPP – 130 Å) detektiert.

Im Folgenden bestand die Aufgabe, dass ternäre System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL um eine Fettsäure zu ergänzen. Die freien Fettsäuren (FFA) des SC sind in der Regel gesättigte, unverzweigte und aus mindestens 18 Kohlenstoffatome zählenden Alkylketten aufgebaut. Innerhalb der FFA-Fraktion sind die C₂₂-C₂₄ langen Säuren am meisten vertreten [Wertz und van den Bergh 1997]. Zum einen stellen die Fettsäuren neben den Ceramiden und Cholesterol die dritte große Lipidfraktion innerhalb der SC Matrix dar und ein SC Lipid-Modellsystem besitzt eine höhere Aussagekraft, wenn es in seiner Zusammensetzung den nativen Bedingungen entspricht. Zum anderen wurde in der Literatur beschrieben, dass die Anwesenheit von FFA im SC Modellsystem sowohl für die Ausbildung der LPP [de Jager et al. 2003] als auch für die der epidermalen Barrierefunktion [Mao-Qiang et al. 1993] notwendig ist.

In einem ersten Schritt galt es nun, eine geeignete, physiologisch relevante FFA für die Mischung CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL zu finden. Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Anordnung des CER[EOS] in der Modellmatrix wurde auch das System CER[EOS]/CER[AP]/CHOL/ Palmitinsäure (PA) untersucht. Im Diffraktionsbild (Abb.54a) wurden neben Cholesterol-Kristallen auch phasenseparierte Palmitinsäure detektiert, so dass eine Berechnung des Membranprofils nicht möglich war. Die inhomogene Mischung wurde zurückgeführt auf die stark voneinander abweichenden Kettenlängen der Komponenten.

In weiteren Versuchen wurden längerkettige Fettsäuren wie Stearinsäure (C18), Behensäure (C22), Lignocerinsäure (C24) und Cerotinsäure (C26) eingebaut. Für die Mischung CER[EOS]/CER[AP]/CHOL/ Behensäure (BA) wurden reproduzierbar Diffraktionsbilder hochorientierter Modellmembranen erhalten (Abb.54b).

Die Mischung aus einem lankettigen (CER[EOS]) und einem kurzkettigen Ceramid (CER[AP]) zusammen mit einer längerkettigen FFA Behensäure führt zu einer guten Mischbarkeit der Lipide und einer guten Solubilisierung des CHOL in der Matrix.

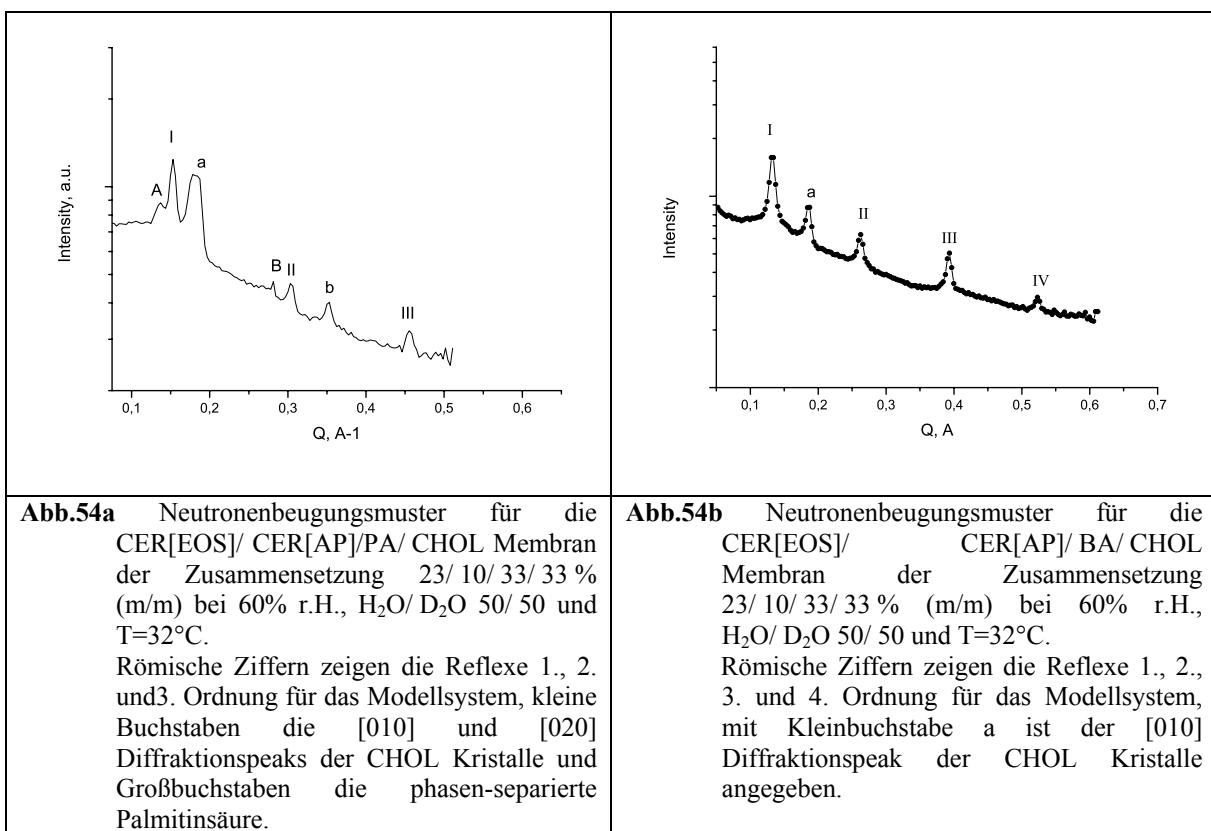


Abb.54a Neutronenbeugungsmuster für die CER[EOS]/ CER[AP]/PA/ CHOL Membran der Zusammensetzung 23/ 10/ 33/ 33 % (m/m) bei 60% r.H., H₂O/ D₂O 50/ 50 und T=32°C.
Römische Ziffern zeigen die Reflexe 1., 2. und 3. Ordnung für das Modellsystem, kleine Buchstaben die [010] und [020] Diffraktionspeaks der CHOL Kristalle und Großbuchstaben die phasen-separierte Palmitinsäure.

Abb.54b Neutronenbeugungsmuster für die CER[EOS]/ CER[AP]/ BA/ CHOL Membran der Zusammensetzung 23/ 10/ 33/ 33 % (m/m) bei 60% r.H., H₂O/ D₂O 50/ 50 und T=32°C.
Römische Ziffern zeigen die Reflexe 1., 2., 3. und 4. Ordnung für das Modellsystem, mit Kleinbuchstabe a ist der [010] Diffraktionspeak der CHOL Kristalle angegeben.

Da das so erhaltene Modellsystem in seiner Zusammensetzung der nativen Lipidmatrix des SC hinreichend entsprach und sich gut zu einer Membran präparieren ließ, wurde es in verschiedenen Experimenten charakterisiert.

a). Berechnung des Membranprofils

Die einzelnen Reflexe im Diffraktionsbild wurden jeweils über eine Gauß-Funktion gefittet, deren Maximum der Bestimmung der Peakposition diente. Für das System errechnete sich ein lamellarer Wiederholabstand d von 47.5 Å. Über die integrierte Peakintensität wurden die absoluten Werte der Strukturfaktoren erhalten, deren Vorzeichen mittels der Isotopenaustauschmethode ermittelt wurden. Im Anschluss erfolgte durch das Software-Programm Grapher 2.0 die Berechnung des Neutronenstreulängedichteprofils $\rho_s(x)$ über eine Fourier-Synthese (Abb.55).

Trotz der Anwesenheit des CER[EOS] und der langketigen Behensäure wurde erneut keine LPP detektiert. Vielmehr lag die Periodizität von ≈47 Å im Größenordnungsbereich zweier einen Bilayer bildenden CER[AP] Moleküle ($d= 45$ Å).

Aufgrund der Vergleichbarkeit der d -Werte von CER[EOS]/ CER[AP]/ BA/ CHOL und dem Referenzsystem erfolgte die gemeinsame graphische Darstellung beider Membranprofile im relativen Maßstab (Abb.55).

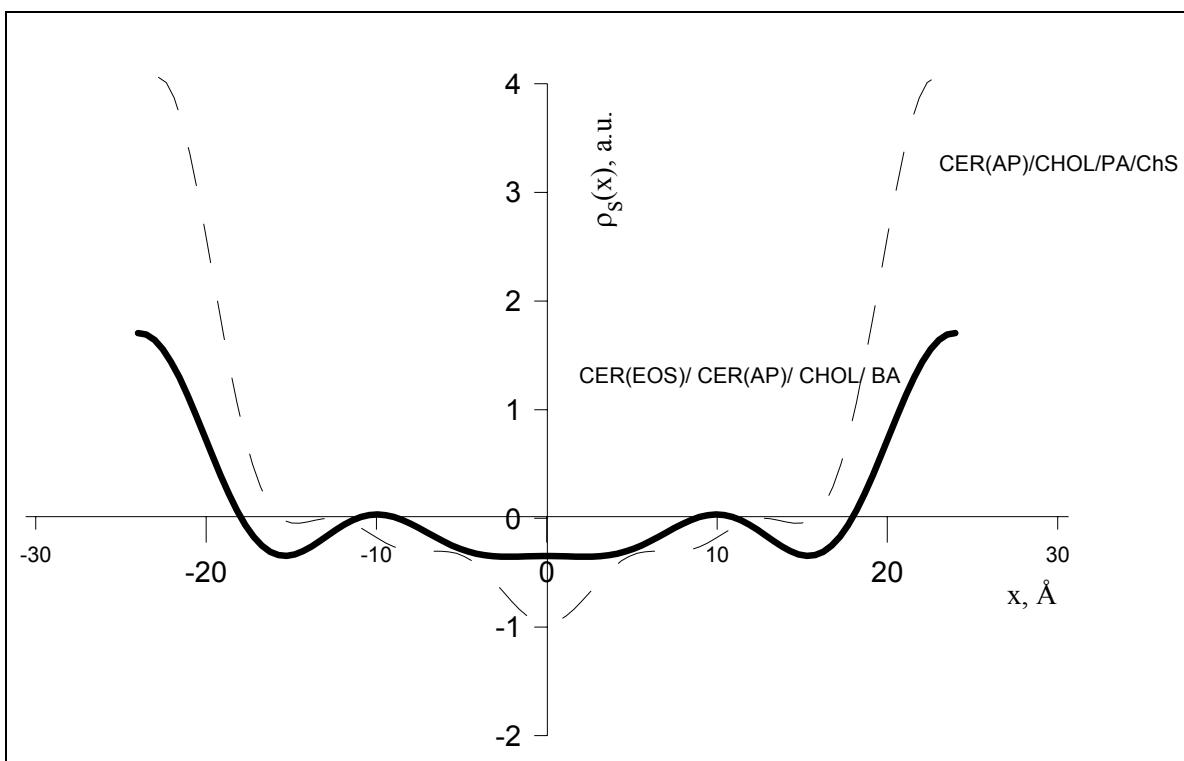


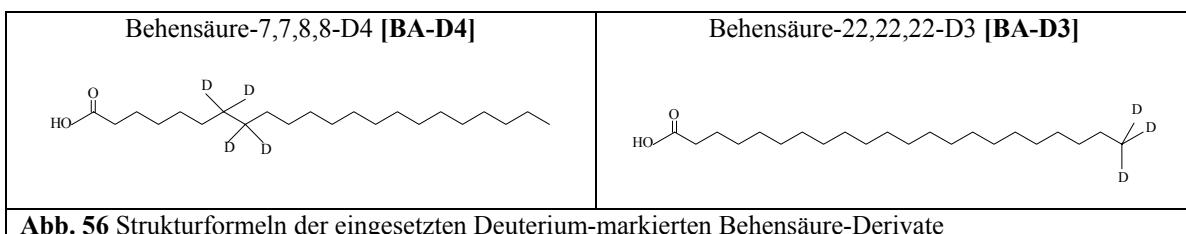
Abb.55 Neutronenstreu längendichtheprofil $\rho_s(x)$ der CER[EOS]/CER[AP]/ CHOL/ BA Membran bei 60% r.H.; H₂O/ D₂O 50: 50, T=32°C gegen die CER(AP)/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5 % w/w) Membran gemessen unter den gleichen Bedingungen.

Die herabgesetzte Streulängendichte im Bereich der polaren Kopfgruppen sowie das geringer ausgeprägte Minimum im Zentrum des Profils der CER[EOS]/ CER[AP]/ BA/ CHOL Membran führen zu der Annahme einer dem ternären System analogen Anordnung des CER[EOS] innerhalb der Lipidmatrix. Für die Behensäure stellt sich die Frage, wie sich die lange Kette in der kurzen Phase anordnet.

b). Untersuchungen zur Anordnung der Behensäure in der Lipidmatrix

In der von Ruettinger et al. [2008] veröffentlichten Arbeit am System CER[AP]/CHOL/varierte Fettsäure/ ChS wird ebenfalls auf eine besondere Rolle des CER[AP] im Membranbildungsprozess geschlossen. Für die längerketigen Fettsäuren (C18-C26) wird postuliert, dass sie sich in der kurzen Phase so anordnen, dass die Kettenenden in der Membranmitte überlappen.

Zur Überprüfung dieser Theorie wurde im System CER[EOS]/CER[AP]/CHOL/BA die Behensäure gegen zwei unterschiedlich Deuterium-markierte ausgetauscht (Abb.56), wobei auf den Ergebnissen zur Lokalisation des CHOL in der Lipidmatrix durch selektive deuterierete CHOL-Derivate aufgebaut wurde [Kessner et al. 2008b].

**Abb. 56** Strukturformeln der eingesetzten Deuterium-markierten Behensäure-Derivate

Die präparierten Modellmembranen wurden am V1 Diffraktometer vermessen (Zusammenfassung der experimentellen Daten siehe Tab.12).

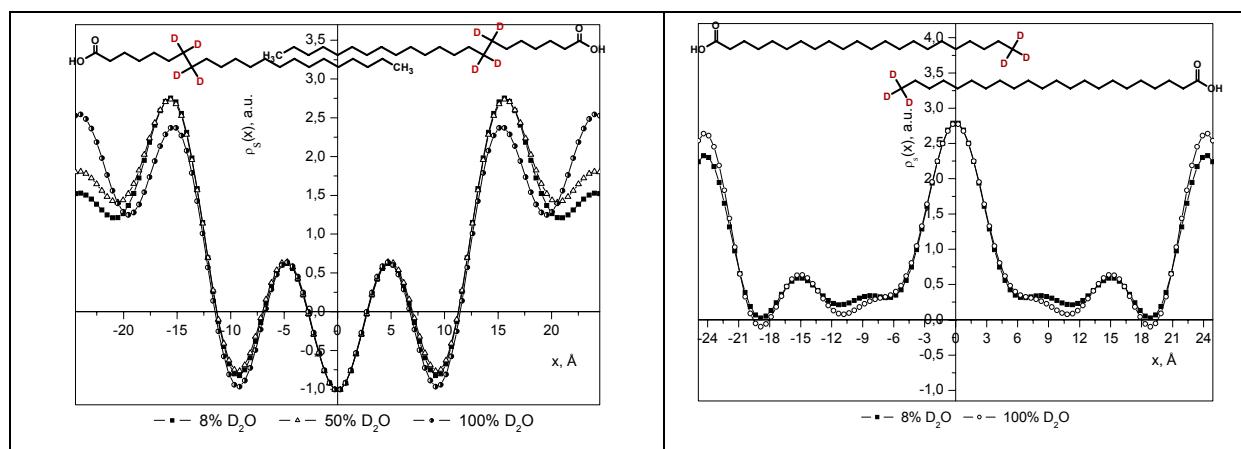
	CER[EOS]/CER[AP]/ BA-D4/CHOL	CER[EOS]/CER[AP]/ BA-D3/CHOL
Exp. Bedingungen	T=32°C, 60% r.H., 3 Kontraste H ₂ O/D ₂ O 92/8, 80/20, 50/50	T=32°C, 60% r.H., 3 Kontraste H ₂ O/D ₂ O 92/8, 0/100
Scan	Rocking curve	theta-2theta
Anzahl der Diffraktionspeaks	5	6
lamellarer Wiederholabstand <i>d</i>	49,16 Å	48,52 Å

Tab.12 Exp. Daten zur Untersuchung der CER[EOS]/ CER[AP]/BA-deuteriert/CHOL Modellmembranen

Die Auswertung der erhaltenen Diffraktionsmuster erfolgte nach bereits beschriebenen Abläufen und ergab die Berechnung der Membranprofile (Abb.57)

Die Neutronenstreuulängedichteprofile der Deuterium-markierten Proben weisen deutliche Unterschiede zur nicht-markierten Membran auf (Abb.55).

Das Membranprofil des CER[EOS]/CER[AP]/ **BA-D4/CHOL** zeigt neben den der Position der polaren Kopfgruppen zugeordneten Maxima noch zwei weitere, die den markierten CD₂-Gruppen mit der hohen Dichte positiv streuender Deuteriumatome entsprechen.

**Abb.57** Die Neutronenstreuulängedichteprofile für die Systeme CER[EOS]/CER[AP]/ **BA-D4/CHOL** (links) und CER[EOS]/CER[AP]/ **BA-D3/CHOL** (rechts) jeweils bei T=32°C, 60% r.H. und verschiedenen H₂O/D₂O Kontrasten. Zur Verdeutlichung der Anordnung der Behensäure-Moleküle sind diese in die Darstellungen mit eingezeichnet.

Durch Anfitten der Maxima mit Gaußfunktionen können die Positionen als $X_{C7D2-C8D2}=15,46 \text{ \AA}$ bzw. $-15,46 \text{ \AA}$ bestimmt werden.

Zur Veranschaulichung dieses Ergebnisses dient folgendes Modell. Ein Bilayer, der aus zwei gegenüberstehenden Behensäuremolekülen gebildet wird, hat einen theoretischen d -Wert von 55 \AA , unter der Annahme, dass eine Methylgruppe gleich $1,5$ und eine Methylengruppe gleich $1,25 \text{ \AA}$ [Fox 1994] sind. Im Vergleich zur SC Modellmembran mit einem d -Wert von 49 \AA ergibt sich eine Differenz von 6 \AA . Es wird vermutet, dass dieser geringere Raum durch die Behensäure so kompensiert wird, dass sich endständige Butyl-($5,5 \text{ \AA}$)- bzw. Pentylreste ($6,5 \text{ \AA}$) in der Membranmitte überlappen.

Im hypothetischen Behensäure-Bilayer kann die Position von C_7 und C_8 im Mittel für $X_{C7H2-C8H2} \approx 18 \text{ \AA}$ bzw. -18 \AA angenommen werden. Bezogen auf die Position von $X_{C7D2-C8D2}=15,46 \text{ \AA}$ bzw. $-15,46 \text{ \AA}$ in der SC Modellmatrix ergibt sich eine Differenz von $\approx 2,5 \text{ \AA}$. Dieses würde bedeuten, dass sich lediglich die endständigen drei C-Atome in der Membranmitte überlagern würden.

In diese Diskussion muss allerdings einbezogen werden, dass es sich hierbei um keine molekular-dynamischen Berechnungen handelt. Im Rahmen der gewählten experimentellen Bedingungen und der Auflösungsgrenze von $5,9 \text{ \AA}$ kann die Interpretation der Ergebnisse nur unter Beachtung bestimmter Bereichsgrenzen erfolgen. Nach der von Kiselev et al. [2005] vorgestellten Arbeit wurden verschiedene Parameter des CH_2 -Gruppenbereiches aus dem Neutronenstreulängedichteprofil berechnet (Tab.13).

SC System	Molekulare Gruppe	Area (a.u.)	$X_0 (\text{\AA})$	$\sigma (\text{\AA})$	FWHH (\AA) ^a
CER[AP]/CHOL/PA/ChS [Kiselev et al. 2005]	CH_2	-6,437	12,55	5,02	11,82
CER[EOS]/CER[AP]/BA-d4/CHOL	CH_2	8,1353	15,46	3,7105	8,738

Tab.13 Parameter des CH_2 -Gruppenbereiches aus dem Neutronenstreulängedichteprofil (^aFWHH= $2\sigma\sqrt{2\ln 2}$)

Aus dem Wert FWHH (Peakbreite bei halber Höhe) ist abzuleiten, dass der Methylengruppenbereich innerhalb der Membran der größte ist [Kiselev et al. 2005]. Unter der Annahme, dass das Maximum im $\rho_s(x)$ den Bereich der $\text{C}_7\text{H}_2-\text{C}_8\text{H}_2$ mit dem Zentrum $X_{C7D2-C8D2}=15,46 \text{ \AA}$ bzw. $-15,46 \text{ \AA}$ entspricht, erfasst FWHH ($8,737 \text{ \AA}$ bzw. -

19,83 bis -11,09 Å bzw. 11,09 bis 19,83 Å) den mittleren Bereich, in dem eine hohe Dichte an Deuterium herrscht. Somit würde eine Verschiebung der Position von C₇D₂-C₈D₂ von 18 Å zu 12,5 Å, für den Fall, dass sich endständige Butylgruppen in der Membranmitte überlagern, innerhalb dieser Bereichsgrenzen liegen.

In der Membranmitte ist nicht die Abschwächung des Minimums zu erkennen. Vielmehr ist dieser Bereich durch starke Oszillationen gekennzeichnet, die durch den Fouriersynthese-Abbruchfehler bedingt sind. Daher eignet sich dieser Bereich des Profils nicht zur Auswertung.

Das Membranprofil des Systems CER[EOS]/CER[AP]/ **BA-D3**/CHOL erlaubt hingegen die Auswertung des CH₃-Gruppenbereichs. Das Profil weist deutliche Maxima bedingt durch die hohe Dichte an Deuteriumatomen aufweist. Dieses Maximum mit dem festgelegten Zentrum x₀=0 ist sehr breit und FWHH ergab 6 Å bzw.-3 bis 3 Å. Dieser Wert bzw. Bereich erfasst genau die Membranregion (siehe Abb.57), in der die Überlappung der endständigen Alkylgruppen erfolgt und somit eine hohe Dichte an Deuteriumatomen herrscht.

Die Maxima an den Seiten des Profils werden den Bereichen der polaren Kopfgruppen zugeordnet und die hohe Streulängendichte bei -15 bzw. 15 Å dem Cholesterol.

Zusammenfassend konnten diese Messungen am Modellsystem CER[EOS]/CER[AP]/BA/ CHOL die Anordnung der Behensäure innerhalb der Lipidmatrix zeigen. Die Verwendung unterschiedlich deuterierter Behensäure-Derivate führte dabei zu unterschiedlichen lokalen Kontrasten und die markierten Molekülbereiche konnten im Membranprofil lokalisiert werden. Somit konnte für alle Lipidbestandteile eine Anordnung in der Modellmatrix postuliert werden.

c). Einfluss der Feuchtigkeit auf die Membranstruktur

In einem vorerst letzten Experiment an dieser Modellmatrix sollte der Einfluss der relativen Feuchtigkeit auf den Membranbildungsprozess untersucht werden. Es wird in der Literatur diskutiert, dass die SC Lipide sich nur in geringem Maße hydratisieren lassen [Raudenkob, Dissertation 2002].

Mithilfe der Neutronenstreuung konnte an dem einfachen Modellsystem DL-CER[AP]/CHOL/PA/ChS eine Beeinflussung der Membranstruktur in Abhängigkeit vom jeweils reinen Diastereomere und der Wahl von Temperatur und Feuchtigkeit gezeigt werden. Es stellte sich nun die Frage, welchen Effekt die umgebende Feuchtigkeit auf das komplexe System CER[EOS]/CER[AP]/BA/CHOL hat.

Die Modellmembran CER[EOS]/CER[AP]/BA/CHOL (23/ 10/ 33/ 33% m/m) wurde nacheinander bei 60% r.H. und 98% r.H. am V1 Diffraktometer (HMI, Berlin) vermessen ($T=32^\circ\text{C}$, 3 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Kontraste, Messungen als Rocking curves). In den Abb.58 sind die Neutronendiffraktionsbilder beider Messungen angegeben.

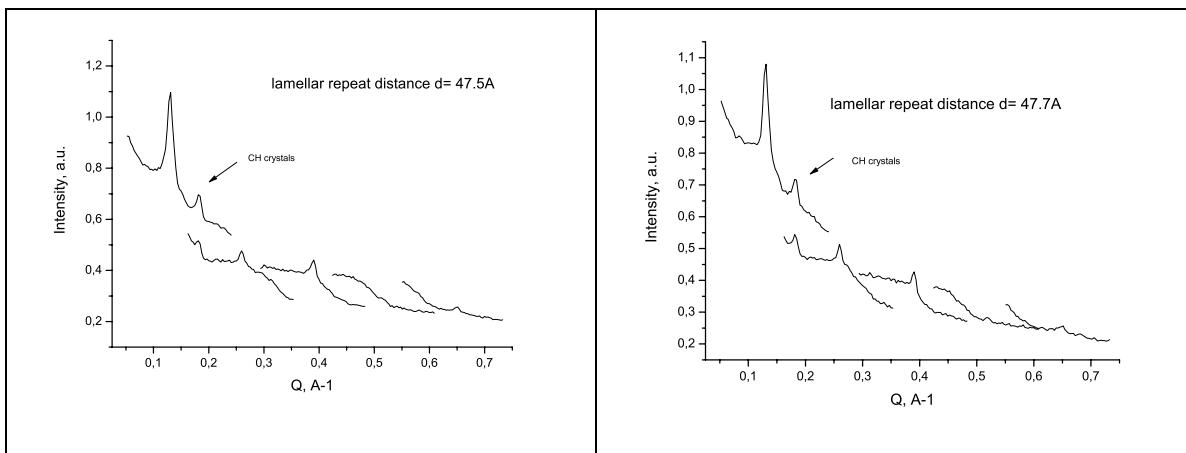


Abb.58 Diffraktionsbild der CER[EOS]/ CER[AP]/ CH/ BA Membran (23/ 10/ 33/ 33% m/m) bei **60% Feuchtigkeit (links)** bzw. **bei 98% Feuchtigkeit (rechts)**. Weitere experimentelle Bedingungen: $\text{D}_2\text{O}/ \text{H}_2\text{O}$ Kontrast 8/ 92, $T=32^\circ\text{C}$

Aus den jeweiligen Peakpositionen wurde für die Membran bei 60% r.H. ein lamellarer Wiederholabstand von 47,5 Å und bei 98% r.H. von 47,7 Å ermittelt. Aufgrund dieser nahezu identischen d -Werte konnte zunächst auf keine Beeinflussung der Membranstruktur bzw. des Hydratationsverhalten der Lipide durch den umgebenden Feuchtigkeitsgehalt geschlossen werden.

Aus den berechneten Neutronenstreulängedichteprofilen wurden nach der von Kiselev et al. [2005] beschriebenen Fit-Prozedur mehrere Parameter berechnet (Tab.14).

SC System	Molekulare Gruppe	$X_0 (\text{\AA})^b$	$\sigma (\text{\AA})$	FWHH (\AA^a)
CER[EOS]/CER[AP]/ BA/CHOL 60% r.H.	Polare Kopfgruppe	23,20	2,578	6,070
CER[EOS]/CER[AP]/ BA/CHOL 98% r.H.	Polare Kopfgruppe	23,456	2,733	6,4357

Tab.14 Parameter des Neutronenstreulängedichteprofil ($^a\text{FWHH}= 2\sigma\sqrt{2\ln 2}$; $^b x_0=d/2$ ist festgelegt)

Der die Position der polaren Kopfgruppen beschreibende Wert x_0 nimmt mit größerer Feuchtigkeit zu, was auf eine geringe Zunahme der Hydratation der Kopfgruppe hindeuten könnte. Diese Hypothese wird gestützt durch den ebenfalls zunehmenden Wert für die Peakbreite bei halber Höhe (FWHH-full width at half height), welcher auf einen

etwas größeren Raumbedarf der Kopfgruppe bei 98% r.H. hindeutet.

Aufgrund der Auflösungsgrenze von 5,5 Å, berechnet nach

$$0,6 * d/h_m, \quad \text{Gleichung 15}$$

(h_m = Anzahl der Ordnungen), ist es nicht möglich, die Dicke der Wasserschicht d_w nach der Gleichung $d_w=d-d_m$ (d =lamellarer Wiederholabstand, d_m =Dicke der Lipidschicht) zu berechnen. Aus dem Fourierprofil (Abb.55) ist aber ersichtlich, dass in Analogie zum Referenzsystem eine Schichtdicke <1Å wahrscheinlich ist. In der Arbeit von Kiselev et al. [2005] war dieser Wert als Differenz der d -Werte bei 60% r.H. und bei Wasserüberschuss berechnet worden.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich für die Modellmembran eine Differenz von 0,2 Å zwischen den d -Werten, gemessen bei 60% und 98% r.H. Der geringe Unterschied könnte zum einen innerhalb des experimentellen Fehlers liegen und somit eine Beeinflussung der Membranstruktur durch die Feuchtigkeit ausschließen. Aufgrund der berechneten Membranparameter kann allerdings auch eine, wenn auch geringe, zunehmende Hydratation der Kopfgruppe postuliert werden, die in einer Vergrößerung des d -Wertes bei 98% r.H. resultiert.

Abschließend zu dem vorliegendem Kapitel kann gesagt werden, dass unter der Aufgabenstellung 'Untersuchung des Einflusses des ω -Acylceramids CER[EOS] auf die innere Struktur von SC Lipidbilayern' mit der CER[EOS]/CER[AP]/BA/CHOL Modellmembran eine gute Repräsentative der SC Lipidmatrix gefunden wurde.

Sie enthält die drei wichtigen Lipidfraktionen, darunter das für die Hautfunktion so wichtige CER[EOS], ein weiteres Phytosphingosin, dessen besondere Rolle noch diskutiert wird, ferner die am häufigsten vorkommende FFA Behensäure und Cholesterol. Das quaternäre System lieferte reproduzierbare Diffraktionsbilder, wobei die lamellaren Wiederholabstände verschiedener Membranen gleicher Zusammensetzung im Rahmen des experimentellen Fehlers schwankten ($d= 48,0 \pm 1,0$ Å). Für alle Membranbestandteile konnten durch Auswertung der Neutronenstreulängedichteprofile eine Anordnung innerhalb der Matrix postuliert werden.

Nach der hinreichenden Charakterisierung soll diese Modellmembran in einem nächsten Schritt in der AG Prof. Neubert als Diffusionsbarriere in Arzneistoff-Diffusionsexperimenten in einer FTIR-ATR-Messzelle zum Einsatz kommen. Aus solchen Untersuchungen könnten Aussagen über die Barriereeigenschaften eines solchen SC Lipid Substituten gewonnen werden.

IV.3.3. Aufbau eines quaternären SC Lipid-Modellsystems CER[NS]/ CHOL/ BA/ChS

In der im Folgenden vorgestellten Studie sollte in Analogie zum Referenzsystem eine Modellmembran entwickelt werden, die auf CER[NS] (Abb.59) basierte. CER[NS] kommt mengenmäßig am häufigsten innerhalb der SC Ceramidfraktion vor [Wertz und van den Bergh 1998; Farwanah et al. 2005]. Im Unterschied zu den anderen untersuchten Ceramiden wurde es nicht von Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, bezogen, sondern im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

Folgende Modellmembranen wurden präpariert und am V1 Diffraktometer, HMI, Berlin vermessen:

CER[NS]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m)

CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m)

Im ersten Fall wurde ein sehr uneinheitliches Diffraktionsbild erhalten, dass zusätzliche Reflexe phasenseparerter Palmitinsäure und CHOL Kristalle aufwies (Abb.60).

Der SC Lipid-Modellmembran wurde ein lamellarer Wiederholabstand d von 60 Å zugeordnet.

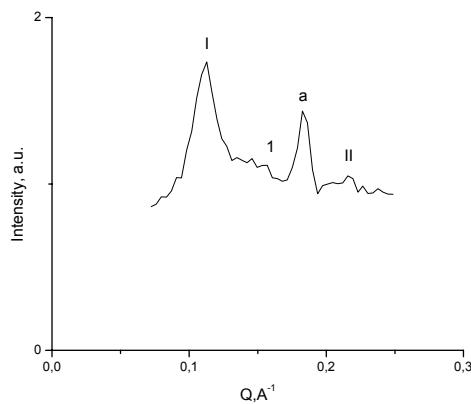


Abb.60 Neutronendiffraktionsbild von CER[NS]/ CHOL/ PA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m) für T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8; Römische Ziffern: I und II. Ordnung der multilamellaren Membran; Arabische Zahlen: 1. Ordnung der phasenseparierten PA; (Indizierung nach Ruettinger et al. [2008]) Buchstaben: [010] Reflex von kristallisiertem CHOL

Dieser Wert entspricht der Lipidschicht eines hypothetischen Bilayers aus zwei gegenüberstehenden CER[NS] Molekülen. Dieser Berechnung lagen die Werte von 1,5 Å für eine CH₃- und 1,25 Å für eine CH₂-Gruppe zugrunde. Diese Übereinstimmung deutet darauf hin, dass hauptsächlich das Ceramid die Membranstruktur bestimmt. Die

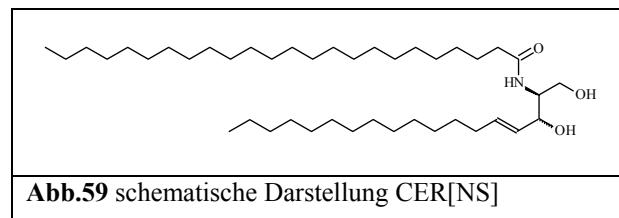


Abb.59 schematische Darstellung CER[NS]

beobachtete Phasentrennung wurde auf die voneinander abweichenden Kettenlängen zwischen CER[NS] (C24) und PA (C16) zurückgeführt. Dadurch ergibt sich eine schlechte Mischbarkeit der Lipide und eine unzureichende Solubilisierung des CHOL. Das System CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS bildete eine einheitliche Phase mit fünf Diffraktionsordnungen (Abb.61).

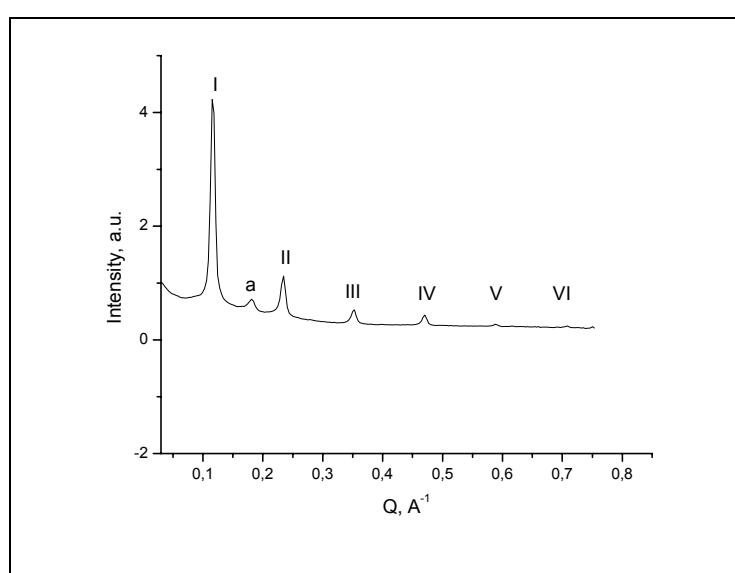


Abb.61 Neutronendiffraktionsbild von CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m) für T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8
Römische Ziffern: 1.bis 6. Ordnung der multilamellaren Membran
Buchstaben: [010] Reflex von kristallisiertem CHOL

Der durch Auswertung der einzelnen Peakpositionen erhaltene *d*-Wert entsprach 53,4 Å. Die übereinstimmenden Kettenlängen von CER[NS] (C24) und der Behensäure (C22) wurden als Grund für die gute Mischbarkeit der Lipide angesehen. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen zum Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/ PA/ChS mit CER[AP] (C18) und PA (C16) kann postuliert werden, dass einander entsprechende Kettenlängen der CER- und der FFA-Komponente eine Voraussetzung für eine homogene Lipidmischung sind, die in einer guten lamellaren Orientierung resultiert.

In Analogie zum Referenzsystem (*d*= 45,6 Å) und zum System CER[NS]/ CHOL/ PA/ ChS (*d*= 60 Å) wurde allerdings ein *d*-Wert erwartet, der der Größenordnung eines Bilayers zweier gegen-überstehender CER[NS] Moleküle (*d*= 60 Å) entsprach. Der tatsächlich berechnete von *d*= 53,4 Å wichen von dem hypothetischen Wert um ≈7 Å ab, wobei diese Abweichung außerhalb des experimentellen Fehlers lag.

Anhand des berechneten Neutronenstreulängedichteprofils $\rho_s(x)$ über die Membran konnte eine Erklärung für die Verkürzung des *d*-Wertes gewonnen werden. In Abb.62 sind die $\rho_s(x)$ für die drei Kontraste H₂O/D₂O 92/8, 80/20 und 50/50 dargestellt.

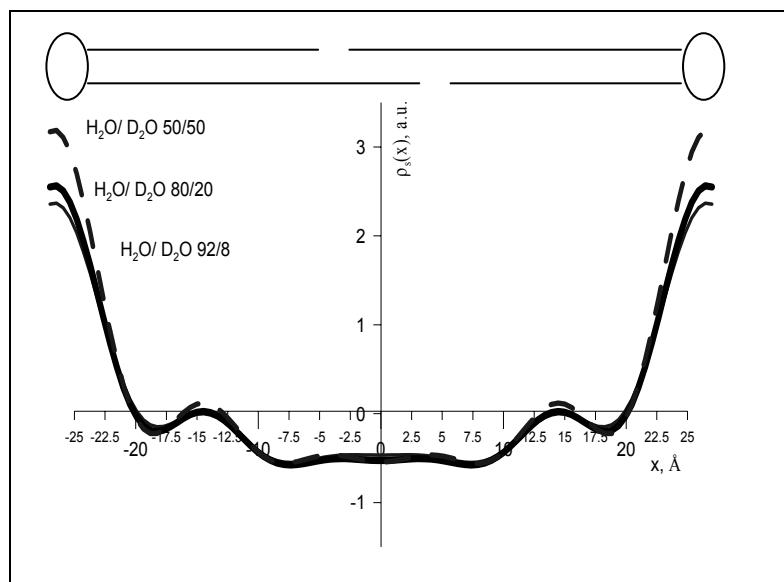


Abb.6.2 Neutronenstreu längedichtheitprofil $\rho_s(x)$ der CER[NS]/ CHOL/ **BA**/ ChS (55/ 25/ 15/ 5% m/m) für T=32°C, 60%r.H. und H₂O/D₂O 92/8, 80/20, 50/50

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind zwei Moleküle CER[NS] in der postulierten Anordnung eingetragen

Wie im $\rho_s(x)$ des Referenzsystems weist das Profil keine intermembranäre Wasserschicht auf. Die das Profil an beiden Seiten begrenzenden Maxima werden den Bereichen der polaren Kopfgruppen zugeordnet. Die Maxima bei $\approx x = -13,5$ bzw. $13,5 \text{ \AA}$ entsprechen der Position des CHOL.

Im Unterschied zum Referenzsystem ist allerdings das die CH₃-Gruppen repräsentierende Minimum in der Membranmitte ersetzt durch ein 12 \AA umfassendes (≈ -6 bzw. 6 \AA) Plateau, welches begrenzt wird durch jeweils zwei Minima bei $\approx x = -7,5$ bzw. $7,5 \text{ \AA}$.

Diese Beobachtungen können mithilfe des folgenden Modells interpretiert werden. Das CER[NS] besteht aus einer Tetracosanyl-Seitenkette (C24) und einer Sphingosin-Seitenkette (C15). Damit besteht eine Differenz von 9 C-Atomen zwischen beiden Ketten. Der berechnete hypothetische Bilayer mit $d=60 \text{ \AA}$ basiert darauf, dass sich jeweils Ketten gleicher Länge gegenüber stehen. Eine solche Anordnung wäre aber energetisch ungünstig.

Aufgrund des Molekülbaus von CER[NS] ist eine Verzahnung der Ketten denkbar, d.h. die Tetracosanyl-Seitenkette des einen CER steht der Sphingosin-Seitenkette des anderen gegenüber. Eine solche Verzahnung der Ketten entspräche einer energetisch günstigen Anordnung und sie ist in Übereinstimmung mit der Aussage des $\rho_s(x)$. Zur Veranschaulichung sind zwei verzahnte CER[NS]-Moleküle in die Abb.6.2 eingefügt.

Demnach ragen beim Verzahnung die endständigen 5 C-Atome (Länge=6,5 Å) der Tetracosanyl-Kette eines CER[NS] Moleküls in die korrespondierende Lücke des Partner-

CER[NS]. Dessen C24-Seitenkette verhält sich analog und schiebt sich in die Lücke der Sphingosin-Seitenkette. Somit ergibt sich in der Membranmitte ein Bereich über $\approx 2 \times 6,5 \text{ \AA}$, gekennzeichnet durch eine hohe Dichte an Methylengruppen mit der kohärenten Neutronenstreuung von $-0,030 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$. Der Bereich, der dabei ausschließlich von den Methylengruppen gebildet wird, wird durch das Plateau im $\rho_s(x)$ beschrieben. Die begrenzenden Minima bei $\approx x = -7,5$ bzw. $7,5 \text{ \AA}$ repräsentieren den Membranabschnitt, in dem sich die Kettenenden gegenüberstehen. Dort addieren sich die kohärenten Streulängen von CH₂- und CH₃-Gruppen ($-0,087 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) zu einem Wert, der geringer ist als der des Plateaubereichs. Die geringere Ausprägung dieser Minima im Vergleich zum Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/PA/ChS beruht auf der Tatsache, dass im Referenzsystem die Membranmitte ausschließlich aus CH₃-Gruppen mit dem Betrag nach größeren kohärenten Streulänge gebildet werden.

Anhand dieser Aussagen des $\rho_s(x)$ lässt sich das beschriebene Modell der Anordnung des CER[NS] in der Lipidmatrix begründen. Obwohl diese Berechnungen nicht gleichgesetzt werden können mit molekular-dynamischen Betrachtungen, lassen sich die Ergebnisse aus dem $\rho_s(x)$ gut mit den entsprechenden Strukturmerkmalen des Ceramids korrelieren, zumal dieses durch Eigensynthese erhalten wurde und somit eine analytisch abgesicherte Struktur aufweist.

Bezüglich der Anordnung der Behensäure in der Membran wird, entsprechend der bisherigen Ergebnisse, vermutet, dass die Alkylketten sich in der Membranmitte überlappen. In einem weiteren Schritt sollte in dem System CER[NS]/ CHOL/ BA/ChS die Behensäure gegen spezifisch deuterierte Derivate ersetzt werden, um aus den so erhaltenen Daten die Anordnung der Behensäure in der Lipidmatrix zu präzisieren.

Abschließend ist zu sagen, dass die Entwicklung des Modellsystems CER[NS]/ CHOL/ BA/ChS einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Referenzsystem aufweist. Es enthält mit dem CER[NS] das am häufigsten vorkommende Ceramid und mit der Behensäure die am häufigsten auftretende FFA. Das Zusammenspiel beider Lipide ist demnach sehr relevant für die SC Lipid-Forschung.

IV.3.4. Einfluss von CER[AP] auf die Mikrostruktur des SC Lipid-Modellsystems: Ein Paradigmenwechsel

In zu den Neutronenstreuuntersuchungen an orientierten SC Modellmembranen abschließenden Kapitel soll der Focus nicht auf bestimmten Lipidzusammensetzungen liegen. Vielmehr erfolgt eine vergleichende Betrachtung der bisher untersuchten Systeme. Innerhalb der Lipidmatrix der äußeren Hautschicht, dem *Stratum corneum*, stellen die Ceramide die größte Fraktion dar, die wesentlich zu Aufbau und Aufrechterhaltung der SC Barrierefunktion beitragen. Von den bisher identifizierten neun Ceramid-Subklassen ist der Effekt jeder einzelnen auf diese biophysikalische Funktion nicht bekannt.

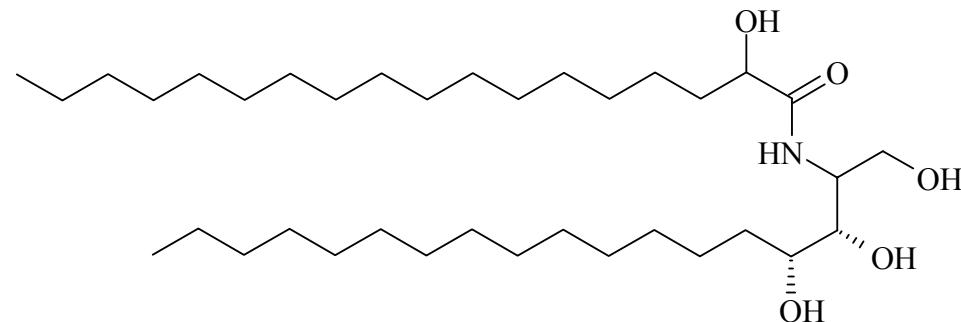
Es sind viele Studien bekannt, die das chemisch-physikalische Verhalten der Ceramide, entweder als Bulksubstanz oder in Mischungen mit anderen SC Lipiden, bestimmt haben. Allerdings entspricht die Geometrie der Probe in der Regel nicht den nativen Verhältnissen der hochorientierten multilamellaren SC Lipidmatrix. Neutronenstreuuntersuchungen an multilamellar orientierten SC Lipidmodellen auf Quarzplatten erlauben durch Bestimmung des Neutronenstreulängedichteprofils Aussagen über die molekulare Architektur der Lipide.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Systeme am V1 Diffraktometer des HMI, Berlin, untersucht (Tab.15). Die Auswertung der erhaltenen Diffraktionsbilder führte zur Bestimmung der jeweiligen lamellaren Wiederholabstände d , die ebenfalls in Tab.15 zusammengefasst sind. Offensichtlich bedingt die Anwesenheit von CER[AP] in der Lipidmischung das Auftreten einer Periodizität von 45 Å, die der Breite eines Bilayers zweier sich gegenüberstehender Moleküle CER[AP] entspricht. Es erscheint, dass die molekulare Struktur der gebildeten Membran stark abhängig ist von CER[AP] und dass längerkettige Ceramide wie CER[EOS] bzw. mittelkettige wie CER[NS] sich in diese kurze Periodizität einpassen müssen.

Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass bei Abwesenheit von CER[AP] die gebildeten Bilayer d -Werte im Bereich der jeweils vorhandenen Ceramide aufweisen.

Die auf Grundlage der erhaltenen Diffraktionsbilder berechneten $\rho_s(x)$ von CER[AP]/CHOL/ PA/ChS, CER[NS]/ CHOL/ BA/ChS, CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL und CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ BA wurden bereits in vorherigen Kapiteln ausgewertet.

EINFLUSS VON CER[AP] auf die Mikrostruktur des SC Lipid-Modellsystems



CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS	CER[NS]/ CHOL/ PA/ ChS	CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS	CER[EOP]/ CER[AP]/ CHOL	CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL	CER[EOS]/ CER[NS]/ CER[AP]/ CHOL	CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ PA	CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ BA
d=	d=	d=	d=	d=	d=	d=	d=
45,6 Å	58,5 Å	53,0 Å	44,6 Å	45,2 Å	44,0 Å	47,5 Å	47,7 Å

Tab.15 Einfluss von CER[AP] auf die Mikrostruktur des SC Lipid-Modellsystems

An dieser Stelle sei nur noch einmal zusammengefasst, dass die Hypothese zur Anordnung des langkettigen CER[EOS] in einer kurzen Phase von $\approx 45 \text{ \AA}$ auf dem berechneten $\rho_s(x)$ und dem Fehlen einer LPP von 130 \AA beruhte. Die Hauptergebnisse aus den $\rho_s(x)$ CER[EOS] enthaltener Membranen waren

- Vorherrschender Einfluss des kurzkettigen CER[AP] auf die Membranstruktur zwingt langkettige Ceramide zur Anordnung innerhalb einer kurzen Periodizität
- Die berechneten $\rho_s(x)$ untermauern die vorgeschlagene Anordnung der Ceramide
- Die verwendete FFA hat keinen maßgeblichen Einfluss auf den lamellaren Wiederholabstand der Membran, aber bei übereinstimmender Kettenlänge mit der Ceramid-Komponente verbessert sie die Homogenität, die Mischbarkeit der Lipidmischung resultierend in einer guten lamellaren Orientierung (Tab.15)

Der Vergleich aller bisherigen Untersuchungen an SC Lipid-Modellsystemen brachte dabei folgende Resultate hervor:

1. Das Phytosphingosin CER[AP] bestimmt entscheidend die Membranstruktur, indem es das Rückgrat, das *armature reinforcement*, der multilamellaren Bilayer aus zwei gegenüberstehenden CER[AP] Molekülen in *hairpin*-Konformation bildet.

Dieser Effekt basiert auf den vier benachbarten OH-Gruppen der CER[AP]-Kopfgruppe, die in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen in lateraler Richtung auszubilden. Wie in der Literatur zu lesen, sind solche Interaktionen die treibende Kraft für die Aggregation von Phytosphingosin-Ceramiden [Rerek et al. 2001]. Zusätzlich existiert bei einer relativen Feuchte von 60% ein bestimmter Anteil an CER[AP] in *ful extended*-Konformation, der als *molekularer Anker* zwischen benachbarten Membranschichten fungiert.

Zur Absicherung der Aussagen über den starken Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kopfgruppen der CER[AP]-Moleküle, die das Rückgrat der Membran bilden, wurde das IR-Spektrum von CER[AP] mit dem des CER[NS] verglichen (Spektren Anhang). Letzteres weist mit nur zwei OH-Gruppen eine geringere Kopfgruppenpolarität auf. Die Eigenschaften der polaren Molekülstrukturen lassen sich gut im IR-Spektrum (Anhang) verfolgen.

Es ist bekannt, dass eine Beeinflussung der H-Brückenbindungen sich u.a. in einer langwelligen Verschiebung der OH-Valenzschwingungen widerspiegeln [Rücker et al. 1992].

Die Bereiche der OH-Valenzschwingungen beider Ceramide wurden durch eine Gaußfunktion angefittet und lieferten die folgenden Wellenzahlen: 3305 cm^{-1} für CER[NS] und 3245 cm^{-1} für CER[AP]. Da die Wellenzahlen den reziproken Wellenlängen entsprechen, weist die OH-Schwingung von CER[NS] zu CER[AP] eine längerwellige Verschiebung auf, was auf ein größeres Ausmaß des Wasserstoffbrückenbindungssystem im CER[AP] schließen lässt.

2. Die Sphingosin-Ceramide NS und EOS besitzen eine geringere Kopfgruppenpolarität und zeigen keinen Einfluss auf die lamellare Periodizität bei gleichzeitiger Anwesenheit von CER[AP]. Nach Aussage der $\rho_s(x)$ ordnen sie sich in die von CER[AP] bestimmte kurze Phase ein. CER[EOS] durchspannt zwei Lipidschichten und agiert als molekularer Nagel. Nach den Untersuchungen an CER[NS]/ DPPC-Modellmembranen [Kapitel IV.2.1.] ist bekannt, dass CER[NS] gleichzeitig in *hairpin*- und *ful extended* Konformation vorliegt. Im ersten Fall überlappen sich die Alkyl-Seitenketten dabei in der Membranmitte. Im letzteren schiebt eine Seitenkette als molekularer Linker in den Nachbarlayer. In beiden Fällen kann so der für das mittelkettige Ceramid zu kleine Raum der 45 \AA Phase kompensiert werden.

Diese postulierte Anordnung der Sphingosin-Ceramide erscheint kontrovers, da diese impliziert, dass hydrophobe Alkylketten eine hydrophile Wasserschicht durchdringen. Die OH- und NH-Gruppen von Ceramiden können als Wasserstoff-Brückendonoren und -akzeptoren fungieren. Wenn diese in lateraler Richtung ausgebildet werden, tragen sie zur Bilayerstabilität und zur geringen Wasserpenetration durch die Membran bei [Pascher 1976]. Für alle betrachteten SC Modelle wurde zudem eine intermembranäre Wasserschicht $< 1\text{ \AA}$ detektiert, die Wasser als Partner für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ausschließt. Diese werden folglich nur zwischen den polaren Kopfgruppen ausgebildet. Dieses Verhalten führt zu einer Neutralisation der Kopfgruppen und verringert die Polarität der hydrophilen Membranregion. Dieser Umstand ermöglicht die beschriebene Anordnung der Ceramide, da sie die Penetration der hydrophoben Alkylketten durch den intermembranären Raum erlaubt.

Zudem bedingt die im Bereich der polaren Kopfgruppen befindliche Estergruppe der ω -Acylseitenkette des CER[EOS] durch Ausbildung von Wasserstoff-Brücken ebenfalls eine Verankerung des Moleküls in der Lipidmatrix.

3. Bezuglich der FFA wurde festgestellt, dass übereinstimmende Kettenlängen zwischen FFA und Ceramid-Komponente die Mischbarkeit der Lipide verbessert und die Ausbildung einer gut orientierten Membran bedingt. Der Wiederholabstand bleibt

unbeeinflusst. Die FFA haben demnach eine den Ceramiden untergeordnete Wirkung auf die Membranstruktur.

4. In der Arbeit von Kiselev et al. [2005] wurde erstmals das *armature reinforcement*, der Zusammenhang zwischen dem starken zwischenmembranären Zusammenhalt der CER[AP]-basierten Bilayer und der geringen Wasserschicht beschrieben. In Fortführung dessen zeigten alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Systeme ebenfalls eine schmale Wasserschicht als Voraussetzung für die Penetration der langen Alkylketten unpolärer Ceramide. Diese agieren somit als *molekulare Anker*, vergrößern den Zusammenhalt zwischen den Bilayern und verstärken die Stabilität der Membran.

Welche neuen Einblicke in die Stabilität von SC Lipid Modellsystemen konnte so durch die vorliegenden Ergebnisse gewonnen werden?

Als Hauptergebnis gilt die Beobachtung einer stabilen multilamellaren Membran der Periodizität von 45 Å, deren Bildung von der Anwesenheit des polaren, kurzkettigen Phytosphingosins CER[AP] abhängig ist.

Die zwischen Kopfgruppen des CER[AP] ausgeprägten Wasserstoffbrückenbindungen sind die Voraussetzung für die geringe intermembranäre Hydratation, die somit einen engen Kontakt zwischen benachbarten Schichten ermöglicht.

Als Phytosphingosin bildet CER[AP] in *hairpin*-Konformation starke Wasserstoffbrücken aus, die die Bilayer-Stabilität in lateraler Richtung bedingen.

Diese Stabilität wird erhöht durch den Anteil CER[AP] in *ful extended*-Konformation. Eine Kette ragt dabei in den Nachbarlayer und verursacht einen engen Kontakt. Somit bildet CER[AP] das Rückgrat der SC Modellmembran.

Diese zwei Eigenschaften der geringen intermembranären Hydratation und das *armature reinforcement* durch CER[AP] zwingen die weniger polaren, längerkettigen Ceramide, sich in die stabile kurze Phase einzurichten. Mit dem Durchspannen derer Alkylketten tragen sie zudem zur Membranstabilität bei.

In allen CER[EOS] basierten Systemen wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen das Fehlen einer LPP beobachtet. Wir schlussfolgern daher, dass in einer Lipidmischung nicht nur die Anwesenheit von CER[EOS] die Bildung dieser charakteristischen SC Phase bedingt.

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Neutronenstreustudien haben gezeigt, dass die Ceramide die wichtigste strukturbestimmende Komponente innerhalb der

SC Lipid-Modellmatrix darstellen. Zwar können die gewählten Modellsysteme nicht die native SC Lipidmatrix nachahmen, aber es hat sich gezeigt, dass der Einfluss einzelner Lipide auf die innere Membranstruktur durch Auswertung der Neutronenstreuulängedichteprofile gut untersucht werden kann. Dabei war es möglich, zwischen den einzelnen eingesetzten Ceramidsubklassen zu differenzieren. Offensichtlich hat die Kopfgruppenpolarität einen größereren Einfluss auf den Membranbildungsprozess als die Ceramid-Kettenlänge. Dieses Ergebnis stellt somit einen Paradigmenwechsel in der Denkweise über die Rolle der Ceramide dar. Bis jetzt lag der Fokus meist auf dem Effekt der Kettenlänge, wobei vor allem die Diskussionen um das die Bildung der LPP induzierende CER[EOS] mit einer extrem langen Seitenkette im Vordergrund stand. Die vorliegenden Ergebnisse hingegen bringen die besondere Rolle der ausgeprägten Kopfgruppenpolarität des kurzkettigen CER[AP] hervor.

In der Interpretation der Ergebnisse wurde auch auf das bereits beschriebene *armature reinforcement model* nach Kiselev [2007] zurückgegriffen, wobei die neuen Erkenntnisse auch der Weiterentwicklung dieses Modells über die Lipidorganisation in der Matrix diente.

Unter der Voraussetzung der geringen intermembranären Hydratation bei 60% r.H. bedingen die Wasserstoffbrücken zwischen den CER[AP]-Molekülen in *hairpin*-Konformation das Rückgrat des Bilayersystems, welches gestärkt wird durch den als molekularer Linker zwischen benachbarten Schichten wirkenden Anteil in *ful-extended*-Konformation. Dieser Zusammenhalt wird vergrößert durch CER[EOS], welches mehrere Lipidschichten durchdringt. Abschließend zu den beschriebenen Untersuchungen wird festgehalten, dass CER[AP] das Rückgrat der multilamellaren Membranstruktur kurzer Periodizität bildet, welches hochstabil ist gegenüber langkettigen FFA und Ceramiden.

eingereicht als: **Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauß, T., Dante, S., Wartewig, S., Dobner, B., Neubert, R.**
Influence of CER[AP] on the nanostructure of a SC lipid model system: a shift of paradigm
Journal of Investigative Dermatology (2008)

V. Zusammenfassung

Die äußerste Hautschicht, das *Stratum corneum*, stellt die Hauptpenetrationsbarriere des menschlichen Organismus dar. Eine wesentliche Eigenschaft dieser multilamellar organisierten Schicht ist die besondere Lipidzusammensetzung, in der den Ceramiden als Hauptbestandteil die größte Bedeutung beigemessen wird. Die physikochemische Charakterisierung der neun Ceramidspezies ist notwendig, um über ihre physikalischen Eigenschaften und Interaktionen Rückschlüsse auf die Ausbildung der Barriereeigenschaften zu erlauben.

Um die experimentellen Befunde verlässlich auf die Struktur beziehen zu können, ist die Verwendung synthetischer Lipide dem Einsatz nativen Materials vorzuziehen.

Ein erklärtes Ziel der SC Forschung ist die Entwicklung eines Modellsystems, das der nativen SC Lipidorganisation entspricht und das als Barriere in Arzneistoff-Penetrationsstudien eingesetzt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift wurden die für die Ausbildung der Barrierefunktion als essentiell angesehenen ω -Acylceramide CER[EOS] und CER[EOP] erstmals physikochemisch charakterisiert.

Durch Röntgendiffraktionsstudien konnte gezeigt werden, dass CER[EOS] erst im hydratisiertem Zustand die für das *Stratum corneum* typische *Long-Periodicity Phase* (LPP) von 130 Å ausbildet, wohingegen das polarere CER[EOP] diese Phase schon im wasserfreien Zustand zeigt. Im Vergleich zu bekannten Untersuchungen an kürzerkettigen Ceramiden wurde kein Polymorphismus beobachtet. Das Verhalten dieser extrem langkettigen Ceramide vom *omega*-Acylrest geprägt ist. Dennoch bedingt die polarere Kopfgruppenstruktur des CER[EOP] eine höhere Orientierung und eine dichtere Packung der Alkylketten. Diese Erkenntnisse wurden auch durch analog durchgeführte Ramanstudien bestätigt.

Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Entwicklung von SC Lipid-Modellmembranen, die mithilfe der Neutronendiffraktion charakterisiert werden sollten.

Diese experimentelle Methode wird erst seit wenigen Jahren auf dem Gebiet der *Stratum corneum* Lipid-Forschung eingesetzt und hat sich durch ihre Vorteile gegenüber der Röntgendiffraktion behauptet. Durch Kontrastvariation kann das Phasenproblem der Vorzeichenbestimmung von Strukturfaktoren gelöst werden und das berechnete Streulängendichtheprofil $\rho_s(x)$ erlaubt Aussagen über die innere Membranstruktur.

Die durch eine etablierte Präparationsmethode erhaltenen multilamellaren Modellmembranen entsprechen in ihrer Geometrie der multilamellar organisierten SC Lipidmatrix. Die auf dem

Gebiet der Phospholipid-Membranen mittels Neutronendiffraktion gewonnenen Erfahrungen bildeten die Grundlage in der Auswertung der erhaltenen Diffraktionsbilder.

Durch die Entwicklung definiert zusammengesetzter Membranen konnte aus dem Neutronenstreulängedichtheprofil $\rho_s(x)$ der Einfluss bestimmter Lipide, speziell der von Ceramiden, auf die Mikrostruktur bestimmt werden.

Da die signifikant verschiedenen Streulängen von Wasserstoff und Deuterium die Identifizierung deuteriummarkierter Molekülregionen im Membranprofil ermöglichen, konnte durch Einsatz entsprechend modifizierter Lipide die Aussagekraft des $\rho_s(x)$ gesteigert werden. Neben Struktur-Wirkungsbeziehungen, der Lokalisierung bestimmter Molekülsequenzen und der Berechnung charakteristischer Membranparameter konnte auch der Einfluss äußerer Parameter wie Temperatur und rel. Feuchtigkeit auf das $\rho_s(x)$ und somit auf die Mikrostruktur der Membran verfolgt werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Neutronenstreuung das Methodenspektrum zur Charakterisierung des *Stratum corneum* auf Modellebene sinnvoll ergänzt.

In Fortführung der Untersuchungen am Referenzsystem CER[AP]/ CHOL/ PA/ ChS konnte zunächst durch Einsatz speziell deuterierter CHOL-Derivate die postulierte Anordnung dieses wichtigen Membranbestandteil bestätigt und aufgrund der Kontrastverstärkung durch den Deuterium-Einbau präzisiert werden.

Des Weiteren wurde das ursprünglich eingesetzte Gemisch aus DL-CER[AP] aufgetrennt und die Verwendung der reinen Diastereomere zeigte, dass die Membranstruktur nur geringfügig beeinflusst wird. Das Phasenverhalten der jeweiligen Membranen hingegen unterschied sich deutlich in Abhängigkeit von den gewählten äußeren Bedingungen wie Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt.

Der Einfluss des CER[EOS] als essentielles SC Lipid auf einfache Modellmembranen wurde untersucht. Das Neutronenstreulängedichtheprofil des ternären Systems CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL zeigte, dass die Anwesenheit von CER[EOS] keine LPP induzierte, sondern dass das lange Ceramid sich in die durch CER[AP] gebildete kurze Phase von 45 Å einpasst, indem es mehrere (1,5) Layer durchspannte und somit als *molekularer Anker* zur Membranstabilität beitrug.

Der Austausch des CER[EOS] durch das eine OH-Gruppe mehr aufweisenden CER[EOP] zeigte keine Effekte auf den lamellaren Wiederholabstand und auf die Membranstruktur, die höhere Polarität des CER[EOP] war aber im $\rho_s(x)$ erkennbar.

Für eine bessere Korrelation zur nativen SC Lipidmatrix wurde das System um die FFA Behensäure ergänzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine näherungsweise Übereinstimmung

der Kettenlängen von Ceramiden und FFA in einer sehr guten lamellaren Orientierung resultiert. Durch Einsatz speziell deuterierter Behensäure-Derivate konnte deren Anordnung in der kurzen Phase von 45 Å ebenfalls gezeigt werden. Vergleichende Untersuchungen bei 60 und 98% r.H. zeigten keine wesentlichen Effekte auf den lamellaren Wiederholabstand. Berechnungen von charakteristischen Parametern aus dem $\rho_s(x)$ brachten allerdings eine Beeinflussung der Mikrostruktur der Membran durch den gewählten Feuchtigkeitsgehalt hervor.

CER[NS] als mengenmäßig am häufigsten auftretend innerhalb der Ceramid-Fraktion wurde ebenfalls in Neutronenstreuuntersuchungen charakterisiert. Es wurde zusammen mit den drei deuterierten Derivaten CER[NS]-D2, CER[NS]-D3 und CER[NS]-D47 durch synthetische Arbeiten dargestellt, um zum einen eine genau definierte Struktur zu erhalten und zum anderen um bestimmte Molekühlbereiche durch Verstärkung des lokalen Kontrasts im $\rho_s(x)$ identifizieren zu können. Bezuglich der Auswahl geeigneter deuterierter Zielstrukturen erwiesen sich solche mit wenigen Deuteriumatome an repräsentativen Stellen ohne unmittelbare Nähe zu anderen stark streuenden Sequenzen (CER[NS]-D3 mit CD₃-Gruppe in *omega*-Position) als am besten geeignet.

Die quaternäre SC Lipid-Modellmembran CER[NS]/ CHOL/ BA/ ChS zeigte eine hoch geordnete lamellare Struktur und aus dem berechneten $\rho_s(x)$ konnte der strukturgebende Einfluss der Ceramidkomponente auf die Membran-Mikrostruktur abgeleitet werden. Aufgrund der unsymmetrischen Kettenlängen des CER[NS] verzahnen sich gegenüberstehende Moleküle und bedingen somit eine ausgeprägte Stabilität der Membran.

Durch eine vergleichende Betrachtung aller untersuchten Systeme ergab sich ein vorherrschender Einfluss der Ceramidkomponente auf die Mikrostruktur der Modellmembran. Die FFA bedingt bei geeigneter Kettenlänge eine gute Mischbarkeit der Lipide und Solubilisierung des Cholesterols in der Lipidmatrix, beeinflusst aber nicht den lamellaren Wiederholabstand.

Innerhalb der Ceramidfraktion zeigte sich ein dominanter Einfluss des kurzkettigen CER[AP] auf die Membranstruktur, welches langkettige Ceramide zur Anordnung innerhalb einer kurzen Periodizität zwingt.

Diese Ergebnisse trugen zur Weiterentwicklung des *armature reinforcement Modells* über die Lipidorganisation bei. Dabei induziert CER[AP] in *hairpin*-Konformation ein stabiles, auf Wasserstoffbrückenbindungen basierendes Rückgrat. Der in der *ful extended* Konformation

vorliegende Teil verbindet zwei angrenzende Membranschichten und erhöht somit die Stabilität der Matrix.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die im Zusammenhang mit der Barriereeigenschaft des *Stratum corneum* diskutierte dominante Rolle des CER[EOS] auf Grundlage der erhaltenen experimentellen Fakten differenziert gesehen werden muss.

Eine LPP wurde nur in Röntgendiffraktionsstudien an hydratisiertem CER[EOS] in der Bulkphase beobachtet. Im Verband mit anderen repräsentativen SC Lipiden zeigte eine multilamellare Membran diese Periodizität nicht. Vielmehr wurde durch Analyse der inneren Membranstruktur eine hervorragende Rolle der *short-periodicity Phase* (SPP) von $\approx 45 \text{ \AA}$ beobachtet. Deren Bildung wird durch das kurzkettige, polare CER[AP] induziert, womit ein in früheren Arbeiten postulierter großer Einfluss der Kopfgruppenpolarität auf die Mikrostruktur bestätigt wird.

VI. Ausblick

Die der vorliegenden Dissertationschrift zugrunde liegenden experimentellen Untersuchungen an multilamellaren SC Lipid-Modellmembranen mittels Neutronendiffraktion haben die wichtigen Vorteile und das Potential der Methode für die *Stratum corneum* Lipid-Forschung gezeigt. Vor allem die Analyse der inneren Membranstruktur der in ihrer Geometrie mit der nativen Lipidorganisation vergleichbaren Modellmembran ist dabei herauszustellen.

In zukünftigen Arbeiten können durch gezieltes Design von Modellmatrices, die sich entweder an bereits beschriebenen Systemen orientieren oder *de novo*- Zusammensetzung darstellen, interessante weitere Einblicke erwartet werden.

Bezüglich der vorgestellten Systeme verspricht der Einsatz synthetisch dargestellter, modifizierter CER[EOS]-Derivate wichtige Erkenntnisse.

Zum einen wird gegenwärtig in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dobner an einer Modellsubstanz gearbeitet, deren konjugierte Doppelbindung durch eine Methylverzweigung substituiert ist. Somit würde die durch die endständige Linolsäure induzierte Kettenfluidität erhalten bleiben bei gleichzeitig geringerer Oxidationsempfindlichkeit. Diese Modellsubstanz verspricht eine leichtere Handhabung in z.Bsp. temperaturabhängigen Langzeitmessungen CER[EOS]-basierter Modellmembranen.

Des Weiteren wird im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Björn Arbter eine Synthesevorschrift für ein deuteriertes CER[EOS]-Derivates erstellt. Die markierte C₃₀D₂-C₂₉D₂-C₂₈D₂-Sequenz verspricht interessante Ergebnisse für die Diskussion der postulierten CER[EOS]-Anordnung.

Außerdem sei auch darauf verwiesen, dass die vollständige Synthese dieser komplexen Substanz eine große Herausforderung darstellt, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben ist.

Ferner konnte mit dem System CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ BA eine Modellmatrix erzeugt werden, die in ihrer Komposition gut der nativen Lipidzusammensetzung entspricht. Diese soll nun als Diffusionsbarriere in Arzneistoff-Diffusionsexperimenten in einer FTIR-ATR-Messzelle zum Einsatz kommen. Aus solchen Untersuchungen könnten Aussagen über die Barriereeigenschaften eines solchen SC Lipid Substituten gewonnen werden.

VII. Literaturverzeichnis

- Aasen, J.J., Lauer, W.M., Holman, R.T.** Lipids 5; 869-877 (1970)
- Abraham, W., Downing, D.T.** Deuterium NMR investigation of polymorphism in stratum corneum lipids. Biochim Biophys Acta 1068:189-194 (1991)
- Al-Amoudi, A., Dubochet, J., Norlen, L.** Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. J Investig Dermatol 124, 764-777, (2005)
- Ali, M.R., Cheng, K.H., Huang, J.** Ceramide drives cholesterol out of the ordered lipid bilayer phase into the crystal phase in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine/cholesterol/ceramide ternary mixtures. Biochemistry; 45, 12629-12638 (2006)
- Armen, P.S., Uitto, O.D., Feller, S.E.** Phospholipid component volumes: determination and application to bilayer structure calculations. Biophys. J. 75, 734-744 (1998)
- Bacon, G.E.** Neutron diffraction.; Clarendon Press, Oxford (1972)
- Bauer, K., Frömming, K., Führer. C.** Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2002)
- Bouwstra,J.A., Cheng,K., Gooris,G.S., Weerheim,A., Ponec,M.** The role of ceramide 1 and 2 in the stratum corneum lipid organisation. Biochim. Biophys. Acta 1300, 177-186 (1996a)
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Cheng, K., Weerheim, A., Bras, W., Ponec, M.** Phase behavior of isolated skin lipids. J Lipid Res 37, 999-1011 (1996b)
- Bouwstra,J.A., Gooris,F.E., Weerheim,A.M., Ijzerman,E.P., Ponec,M.** Role of ceramide 1 in themolecular organisation of the stratum corneum lipids. J. Lipid Res. 39, 186-196 (1998)
- Bouwstra, J.A., Dubbelaar, F.E., Gooris, G.S., Weerheim, A.M., Ponec, M.** The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. Biochim Biophys Acta 1419, 127-136 (1999)
- Bouwstra, J.A., Dubbelaar, F.E., Gooris, G.S., Ponec, M.** The lipid organisation in the skin barrier. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 208, 23-30 (2000)
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Dubbelaar, F.E., Ponec, M.** Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. J Lipid Res 42, 1759-1770 (2001)
- Bouwstra J.A., Gooris G.S., Dubbelaar F.E., Ponec M.** Phase behavior of stratum corneum lipidmixtures based on human ceramides: The role of natural and synthetic ceramide 1. J. Invest.Dermatol.118 (4), 606-617 (2002)
- Bouwstra, J., Gooris, G., Charalambopoulou, G., Steriotis, T., Hauss, T.** Skin lipid organisation. HMI Experimental Report (2004)
- Bouwstra, J.A., Ponec, M.** The skin barrier in healthy and diseased state- A review. Biochim Biophys Acta 1758, 2080-2095 (2006)
- Breathnach, A.S., Goodman, T., Stolinski, C., Gross, M.** Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. J Anat 114:65-81 (1973)
- Brinzezu, F., Dobner, B., Brezesinski, G.** Generic Phase Behavior of Branched-Chain Phospholipid Monolayers“Chem. Eur. J. 8, 3203-3210 (2002)
- Bronstein, Semendjajew.** Taschenbuch der Mathematik. Verlag Harri.Deutsch, 19.Auflage (1986)

- Brzustowicz, M.R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W., Wassall, S.R.** Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation. *Biophys.J.* 82, 285-298 (2002)
- Chapman, D., Penkett, S.A.** Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of the Interaction of Phospholipids with Cholesterol. *Nature* 211, 1304 - 1305 (1966)
- Chen, H., Mendelsohn, R., Rerek, M.E., Moore, D.J.** Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry studies of fatty acid homogeneous ceramide 2. *Biochim Biophys Acta* 1468, 293-303 (2000)
- Chopart,M., Castiel-Higounenc,I., Arbez,E., Guey,C., Gaetani,Q., Schmidt,R.** The normal human stratum corneum: A new ceramide profile. *Perspectives in Percutaneous Penetration* 8a, 35 (2002)
- Coderch, L., Lopez, O., de la Maza, A., Parra, J.L.** Ceramides and skin function. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4, 107-129 (2003)
- Colina, C., Flores, A., Castillo, C., Garrido, M.R., Israel, A., DiPolo, R., Benaim, G.** Ceramide-1-P induces Ca²⁺ mobilization in Jurkat T-cells by elevation of Ins (1,4,5)-P₃ and activation of a store-operated calcium channel. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 336, 54–60 (2005)
- Dahlen, B., Pascher, I.** Molecular Arrangements in Sphingolipids - Thermotropic Phase-Behavior of Tetracosanoylphytosphingosine. *Chem Phys Lipids* 24:119-133 (1979)
- Dante, S., Hauss, T., Dencher, N.** β-Amyloid 25 to 35 is Intercalated in Anionic and Zwitterionic Lipid Membranes to different extents. *Biophysical Journal* 83, 2610-2616 (2002)
- Dante, S., Hauss, T., Dencher, N.** Insertion of externally administered β-Amyloid 25 to 35 and perturbation of lipid bilayers. *Biochemistry* 42(46), 13667-13672 (2003)
- de Jager, M.W., Gooris, G.S., Dolbnya, I.P., Bras, W., Ponec, M., Bouwstra, J.A.** The phase behaviour of skin lipid mixtures based on synthetic ceramides. *Chem Phys Lipids* 124, 123-134 (2003)
- de Jager, M.W., Gooris, G.S., Dolbnya, I.P., Ponec, M., Bouwstra, J.A.** Modelling the stratum corneum lipid organisation with synthetic lipid mixtures: the importance of synthetic ceramide composition. *Biochim Biophys Acta* 1664, 132-140 (2004a)
- de Jager, M.W., Gooris, G.S., Dolbnya, I.P., Bras, W., Ponec, M., Bouwstra, J.A.** Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J Lipid Res* 45, 923-932 (2004b)
- de Jager, M.W., Gooris, G.S., Ponec, M., Bouwstra, J.A.** Acylceramide head group architecture affects lipid organisation in synthetic ceramide mixtures. *J.Invest. Dermatol.* 123; 911-916 (2004c)
- de Jager, M.W., Gooris, G.S., Ponec, M., Bouwstra, J.A.** Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J Lipid Res* 46, 2649-2656 (2005)
- de Kruijff, B., van Dijck, P.W.M., Demel, R.A., Schuijff, A., Brants, F., van Deenen, L.L.M.** Non-random distribution of cholesterol in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta* 356, 1-7 (1974)
- Dianoux, A.J., Lander, G.** Neutron Data Booklet, Second Edition, Institut Laue Langevin, France, pp.1.1-8-1.1-17 (2003)
- Dobner, B., Nuhn, P.** Syntheses of deuterium-labelled methylbranched fatty acids, Chemistry and Physics of Lipids, 60; 21-28 (1991)
- Ehlers, Eberhard.** Chemie II Kurzlehrbuch Organische Chemie. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 6.Auflage (S.427; 469; 429; 219;416;384;386) (1999)

- Elias, P. M., Brown B. E., Ziboh, V. A.** The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for direct role for linoleic acid in barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 74, 230-233 (1976)
- Elias, P. M.** Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int. J. Dermatol.* 20, 1-19 (1981)
- Elias, P. M.** Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80, 44s-49s (1983)
- Elias, P. M.** The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier. In: Osborne, D.W., Amann, A.H. (Hrsg.), *Topical drug delivery formulations*, Marcel Dekker, Inc., New York und Basel, 13-28 (1990)
- Engblom, J., Engström, S., Jönsson, B.** Phase co-existence in cholesterol-fatty acid mixtures and the effect of the penetration enhancer azone. *J Control Rel* 52, 271-280 (1998)
- Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R.H.H.** Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res.* 296, 514-521 (2005)
- Farwanah, H.** Untersuchung der Ceramide des Stratum corneum in der nicht involvierten Haut bei Neurodermitis- und Psoriasis-Patienten mit Hilfe der AMD-HPTLC und der HPLC/APCI-MS. Dissertation an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der MLU Halle/Wittenberg (2005)
- Forslind, B.** A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* 74, 1-6 (1994)
- Fox, M.A., Whitesell, J.K.** *Organische Chemie*. Spektrum Verlag (1994)
- Franks N. P., Lieb, W. R.** The structure of lipid bilayers and the effects of general anesthetics. *J. Mol. Biol.* 133, 469-500 (1979)
- Garidel, P.** Calorimetric and spectroscopic investigations of phytosphingosine ceramide membrane organisation. *Phys Chem Chem Phys* 4, 1934-1942 (2002)
- Gordeliy, V.I., Kiselev, M.A.** Definition of lipid membrane structural parameters from neutronographic experiments with the help of the strip function model. *Biophys J* 69, 1424-1428 (1995)
- Grayson, S., Elias P. M.** Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum membrane complexes: Implications for the cutaneous permeability barrier. *J. Invest. Dermatol.* 128-135 (1982)
- Grossmann, J.G.** Shape determination of biomolecules in solution from synchrotron X-ray scattering. In: *Scattering and inverse scattering in pure and applied science*. Edited by Pike, R. and Sabatier, P. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokio, pp.1123-1139, (2002)
- Hahn-Meitner-Institut Berlin GmbH.** Der Forschungsreaktor im Hahn-Meitner-Institut, Info-Broschüre (2002)
- Hatta, I., Ohta, N., Ban, S., Tanaka, H., Nakata, S.** X-Ray diffraction study on ordered, disordered and reconstituted intercellular lipid lamellar structure in stratum corneum. *Biophys Chem* 89, 239-242 (2001)
- Heiser, Ul.** Synthese langketiger bolaamphiphiler Phospholipide. Dissertation an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der MLU Halle/Wittenberg (1998)
- Hill, J.R., Wertz, P.W.** Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 1616, 121-126 (2003)
- Holleran, W.M., Man, M.Q., Gao, W.N., Menon, G.K., Elias, P.M., Feingold, K.R.** Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of

- sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest* 88, 1338-1345 (1991)
- Hou, S.Y.E., Rehfeld, S.J., Plachy, W.Z.** X-ray diffraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy of mammalian stratum corneum lipid domains. *Adv. Lipid Res.* 24, 141-171 (1991)
- Huang, J., Buboltz, J.T., Feigenson, G.W.** Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *BBA*; 1417, 89-100 (1999)
- Jenkins, R.; Snyder, R.L.** Introduction to X-ray powder diffractometry, Wiley, New York, pp. 1-94 (1996)
- Kádar, G., Rosta, L.** Lecture Notes on Neutron Scattering – Introductory Course to ECNS 1999, pp.1-12 Budapest (2003)
- Karlsson,K.-A., Pascher,I.** Resolution and chromatographic configuration analysis of 2-hydroxy fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* 12, 56-74(1974)
- Katsaras, J., Yang, D., Epand, R.M.** Fatty-acid chain tilt angles and directions in dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 63, 1170-1175 (1992)
- Kessner, D., Ruettinger, A., Kiselev, M.A., Wartewig, S., Neubert, R.H.H.** Properties of Ceramides and their impact on the stratum corneum structure – A Review – Part 2: Stratum Corneum Lipid Model Systems. *Skin Pharmacolgy and Physiology* 21, 58-74 (2008a)
- Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauß, T., Dante, S., Wartewig, S., Neubert, R.H.H.** Localisation of partially deuterated cholesterol in quaternary SC lipid model membranes. A neutron diffraction study - European Biophysical Journal with Biophysics Letter (2008b) published online
- King, S.M.** Small angle neutron scattering. Download am 23.05.2005 von www.isis.rl.ac.uk/largescale/log/documents/sans.htm.
- Kirchoff, W.H., Levin, I.W.** Description of the thermotropic behavior of membrane bilayers in terms of Raman spectral parameters: A two state model. *J Res Natl Bur Stds* 92; 113-128 (1987)
- Kiselev, M.A., Zemlyanaya, E.V., Aswal, V.K.** SANS study of unilamellar DMPC vesicles: Fluctuation model of a lipid bilayer. *Crystallography Reports* 49, s131-s136 (2004)
- Kiselev, M.A., Ryabova, N.Yu., Balagurov, A.M., Dante, S., Hauss, T., Zbytovska, J., Wartewig, S., Neubert, R.H.H.** New insights into structure and hydration of SC lipid model membranes by neutron diffraction. *European Biophysical Journal*. 34: 1030-1040 (2005)
- Kiselev, M.A., Ryabova, N.Yu., Balagurov, A.M., Dante, S., Hauss, T., Otto, D., Wartewig, S., Neubert, R.H.H.** Ceramid 6 influence on the structure and hydration of multilamellar DPPC membrane. HMI Users Meeting-Poster (2005b)
- Kiselev, M.A.** Persönliche Mitteilung Berechnung des Neutronenstreulängedichthe profils einer CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL-Modellmembran (2006)
- Kiselev, M.A.** Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in lipid matrix of the outermost layer of skin - stratum corneum. *Crystallography* 52, 572-576 (2007)
- Kucerka, N., Kiselev, M., Balgavy, P.** Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods. *Eur Biophys J* 33, 328-334 (2004)
- Kuempel, D., Swartzendruber, D.C., Squier, C.A., Wertz, P.W.** In vitro reconstitution of stratum corneum lipid lamellae. *Biochim Biophys Acta* 1372, 135-140 (1998)
- Lampe, M. A., Williams, M. L., Elias, P. M.**

- Human stratum corneum lipids characterization and regional variations. *J. Lip. Res.* 24, 120-130 (1983)
- Landmann, L.** Die Permeabilitätsbarriere der Haut, *Pharmazie in unserer Zeit* 4, 155-163 (1991)
- Li, L., Tang, X., Taylor, K.G., DuPre, D.B., Yappert, M.C.** Conformational characterization of ceramides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys J.* 82, 2067-2080 (2002)
- Lowe, N. J., Stoughton, R. B.** Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. *Br. J. Dermatol.* 96, 155-162, (1977)
- Luzatti, V., Mustacchi, H., Skoulios, A., Husson, F.** La structure des colloides d'association. I. Les phases liquide-cristallines des systèmes amphiphile-eau. *Acta Cryst.* 13, 660-667 (1960)
- Madison, K.C., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Downing, D.T.** Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 88, 714-718 (1987)
- Mao-Qiang, M., Elias, P.M., Feingold, K.R.** Fatty acids are required for Epidermal Permeability Barrier function. *Journ.Clin.Invest.* 92, 791-798 (1993)
- McIntosh, T.J., Stewart, M.E., Downing, D.T.** X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* 35, 3649-3653 (1996)
- McIntosh, T.J.** Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophys J* 85, 1675-1681 (2003)
- McPhail, R.A., Strauss, H.L., Snyder, R.G., Elliger, C.A.** C-H- stretching modes and the structure of n-alkyl-chains. 2. Long, all-trans chains. *J.Chem.Phys.* 84, 334-341 (1984)
- Michette, A.G.** Fundamentals of X-ray scattering. In: Scattering – Scattering and inverse scattering in pure and applied science. Edited by Pike, R. and Sabatier, P. Academic Press, London , San Diego, pp.: 1099-1107 (2002)
- Miyashita, M., Yoshikoshi, A., Greco, P.A.** *J.Org.Chem.* 42, 3772 (1977)
- Mendelsohn, R., Moore, D.J.** Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids* 96, 141-157 (1998)
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Melessi, L., Ghidoni, R., Caputo, R.** Abnormality of water barrier function in psoriasis. *Arch. Dermatol.* 130, 452-456 (1994)
- Müller, S., Schmidt, R.R.** Synthesis of the two unique compounds, a ceramide and a cerebroside, occurring in human stratum corneum. *J.Prakt.Chem.* 342 (8), 779-784 (2000)
- Münster, C.** Antibiotische Peptide in Phospholipiden: Strukturuntersuchungen mit Beugungs-methoden. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, (2000)
- Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S.** Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1469, 159-195 (2000)
- Neubert, R.H.H., Wepf, R.** Stratum corneum-Struktur und Morphologie einer Barriere. *Pharmazeutische Zeitung* 17 (2007)
- Norlén, L., Engblom, J.** Structure-related aspects on water diffusivity in fatty acid-soap and skin lipid model systems. *J Control Release* 63 (1-2), 213-226 (2000)
- Norlen, L.** Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J Investig Dermatol* 117, 830-836 (2001)
- Norlen, L.** Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16, 203-211 (2003)
- Olland, G. F.** A submicroscopic granular component in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 34, 11-15 (1960)

- Ongpipattanakul, B., Francoeur, M.L., Potts, R.O.** Polymorphism in Stratum-Corneum Lipids. *BBA-Biomembranes* 1190:115-122 (1994)
- Organikum** Autorenkollektiv, Wiley-VCH Verlag, 561-564 (1999)
- Paige, D. G., Morse-Fisher, N., Harper, J. I.** Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyosis. *Br. J. Dermatol.* 131, 23-27 (1994)
- Pascher, I.** Molecular arrangement in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *BBA* 455, 433-451 (1976)
- Pfeiffer, S., Vielhaber, G., Vietzke, J.P., Wittern, K.P., Hintze, U., Wepf, R.** High-pressure freezing provides new information on human epidermis: Simultaneous protein antigen and lamellar lipid structure preservation. Study on human epidermis by cryoimmobilization. *J Investig Dermatol* 14, 1030-1038 (2000)
- Ponec, M., Weerheim, A., Lankhorst, P., Wertz, P.** New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Investig Dermatol* 120: 581-588 (2003)
- Ramsany, K., Olsen, E., Emery, W.** Synthesis of N-t-Boc-L- ∇ -amino adipic Acid 1-t-Butyl-6-Ethyl-Ester from L-Aspartic Acid: A new route to L- ∇ -Amino adipic Acid. *Synthesis* 42-43, (1982)
- Raudenkob, S.** Untersuchungen zur strukturellen und physikochemischen Charakterisierung von Stratum corneum Lipiden und deren Mischsystemen. Dissertation an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der MLU Halle/Wittenberg (2002)
- Raudenkob, S.; Wartewig, S., Neubert, R.H.** Polymorphism of ceramide 6: A vibrational spectroscopic and X-ray powder diffraction investigation of the diastereomers of N-(alpha-hydroxyoctadecanoyl)-phytosphingosine. *Chem Phys Lipids*, 133, 89-102 (2005)
- Raudenkob, S., Wartewig, S., Brezesinski, G., Funari, S.S., Neubert, R.H.** Hydration properties of N-(alpha-hydroxyacyl)-sphingosine: X-ray powder diffraction and FT-Raman spectroscopic studies. *Chem Phys Lipids* 136:13-22 (2005)
- Rerek, M.E., Chen, H.C., Markovic, B., Van Wyck, D., Garidel, P., Mendelsohn, R., Moore, D.J.** Phytosphingosine and sphingosine ceramide headgroup hydrogen bonding: Structural insights through thermotropic hydrogen/deuterium exchange. *J Phys Chem B*, 05, 9355-9362 (2001)
- Robson,K.J., Stewart,M.E., Michelsen,S., Lazo,N.D., Downing,D.T.** 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* 35 : 2060-2068 (1994)
- Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G.** Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 2.Auflage, Kapitel 11 (1992)
- Schwarz, M., Oliver, J.E., Sonnet, P.E.** *J.Org.Chem.* 40 (16); 2411 (1975)
- Schoenborn, B.P.** Neutron scattering for the analysis of membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457, 41-55 (1976)
- Seul, M., Sammon, J.** Preparation of surfactant multilayer films on solid substrates by deposition from organic solution. *Thin Solid Films* 185, 287-305 (1990)
- Shah, J., Atienza, J.M., Duclos, R.I., Rawlings, A.V., Dong, Z.X., Shipley, G.G.** Structural and Thermotropic Properties of Synthetic C16-0 (Palmitoyl) Ceramide - Effect of Hydration. *J Lipid Res* 36, 1936-1944 (1995)
- Small, D. M.** In: *The physical chemistry of lipids*. Plenum Press, New York und London, 238-343 (1986)
- Smith W. P., Christensen, M.S., Nacht, S., Gans, E.H.** Effects of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 78, 7-11 (1982)

- Snyder, R.G., Hsu, S.L., Krimm, S.** Vibrational spectra in the C-H streching region and the stucture of the polymethylene chain. Spectrochim Acta 34A, 395-406 (1978)
- Sparr, E., Ekelund, K., Engblom, J., Engström, S., Wennerström, H.** An AFM study of lipid monolayers. II. The effect of cholesterol on fatty acids. Langmuir 15(20), 6950-6955 (1999)
- Steriotis, T., Charalambopoulou, G., Hauss, T.** Structural Analysis of Hydrated Stratum Corneum HMI Experimental Report (2002)
- Stewart, M.E., Downing, D.T.** A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. J. Lipid Res. 40, 1434-1439 (1999)
- Subramaniam, S., McConnel, M.** Critical mixing in monolayer mixtures of phospholipids and cholesterol. J Phys Chem 9, 1715-1718 (1987)
- Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Kitko, D.J., Madison, K.C., Downing, D.T.**:Molecular-Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum-Corneum. J Investig Dermatol 92, 251-257 (1989)
- Takahashi, H., Sinoda, K., Hatta, I.** Effects of cholesterol on the lamellar and the inverted hexagonal phases of dielaidoylphosphatidylethanolamine. Biochim Biophys Acta 1289, 209-216 (1996)
- Tamura, M., Kochi, J.** Coupling of Grignard Reagents with Organic Halides. Synthesis 303-305 (1971)
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P.** Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 5. Auflage (1999)
- Turner, N. G., Cullander, C., Guy, R. H.** Determination of pH gradient across the stratum corneum. J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 3 (2), 110-113 (1998)
- Wang, R., Guo, J., Baran, G., Wunder, S.L.** Characterization of the state of order of octadecysilane chains on fumed silica. Langmuir 16, 568-576 (2000)
- Warner, R. R., Myers, M. C., Taylor, D. A.** Electrone probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. J. Invest. Dermatol. 90, 218-229 (1988)
- Wartewig, S., Neubert, R.** Nicht-invasiveAnalysenmethoden der Schwingungsspektroskopie in der pharmazeutischen Forschung. Pharm. Ind. 64 (8a), 863-869 (2002)
- Wartewig, S., Neubert, R.H.H.** Properties of Ceramides and their impact on the stratum corneum structure – A Review – Part 1: Ceramides. Skin Pharmacology and Physiology 20, 220-229 (2007)
- Wertz, P.W., Miethke, M.C., Long, S.A., Strauss, J.S., Downing, D.T.** The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. J Invest Dermatol 84: 410-412 (1985)
- Wertz, P. W.** The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. Adv. Drug Delivery Rev. 18, 283-294 (1996a)
- Wertz, P.W.** Integral lipids in hair and stratum corneum; in Jolles P, Zahn H, Hocker H (eds): Hair: Biology and structure. Basel, Birkhauser Verlag, pp 227- 238, (1996b)
- Wertz, P.W., van den Bergh, B.** The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. Chem Phys Lipids 91: 85-96 (1998)
- Wille, A.** Darstellung deuterierter Ceramid[NS]-Derivate als Modellsubstanzen in Neutronenstreuexperimenten. Diplomarbeit,Institut für Pharmazie der MLU Halle/Wittenberg (2008)
- Williams, M. L.** Epidermal lipids and scaling diseases of the skin. Semin. Dermatol. 11 (2), 169-175 (1992)

Worcester, D.L. Neutron diffraction studies of biological membranes and membrane components. Brookhaven Symp. Biol. 27, III37-II57 (1976)

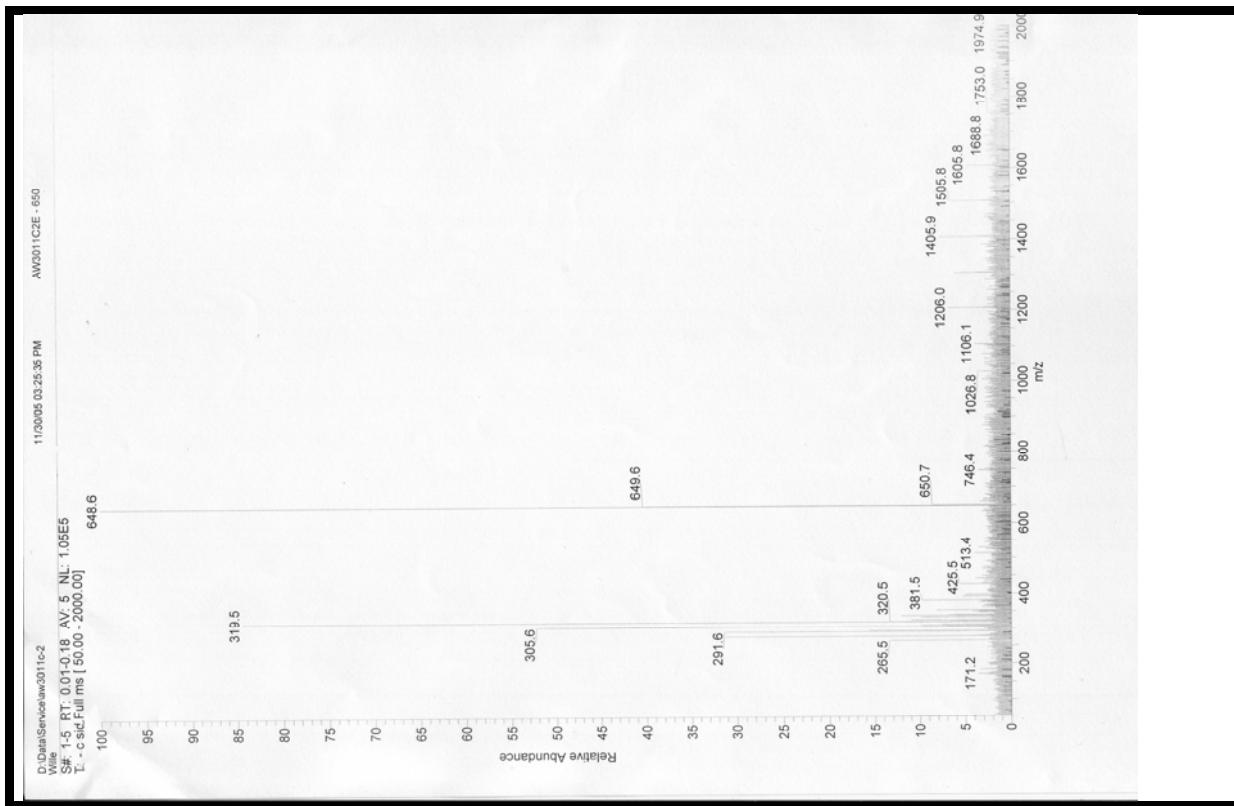
Zaccai, G., Blasie, J.K., and Schoenborn, B.P. Neutron diffraction studies on the location of water in lecithin bilayer model membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 376-380 (1975)

Zbytovska, J. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle/Saale, (2006)

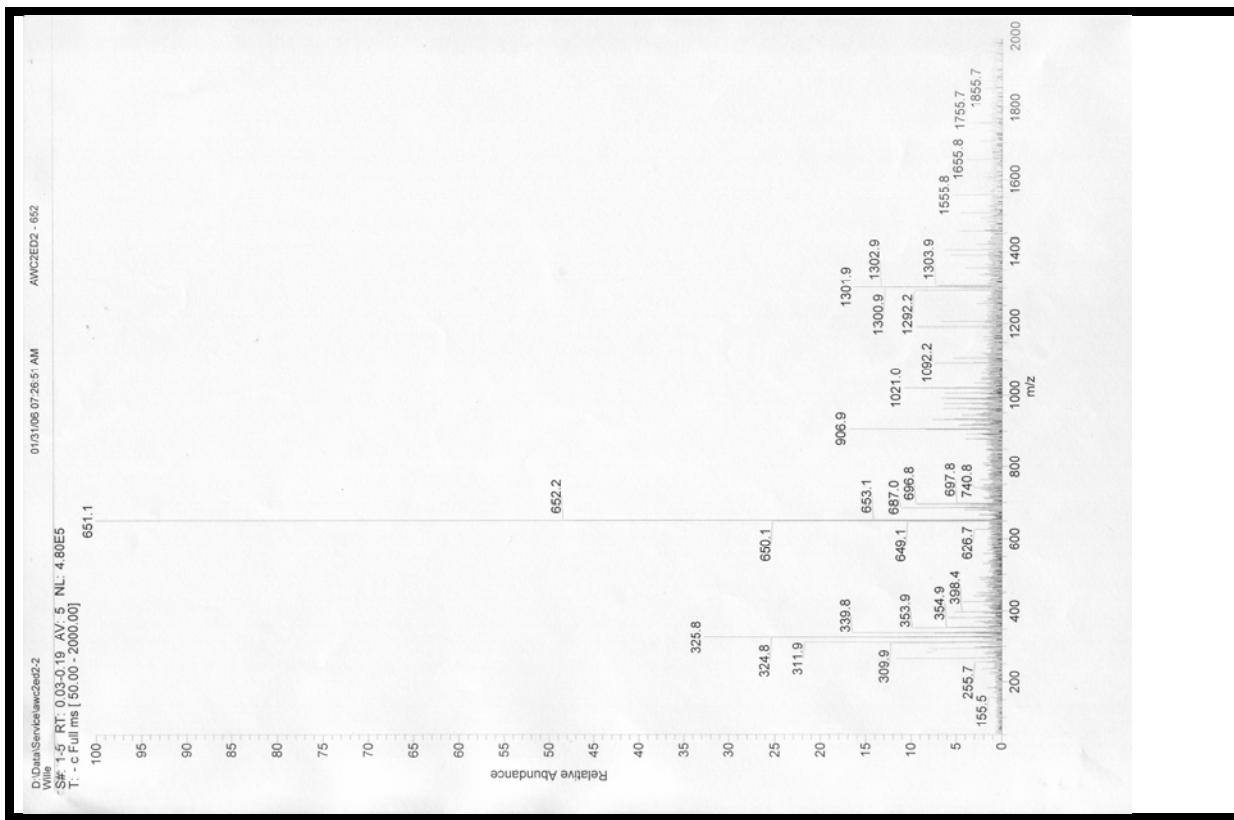
Internet-Links

- Instrumentenbeschreibung V1- Diffraktometer: www.hmi.de → Nutzerdienste → BENSC-Instrumente

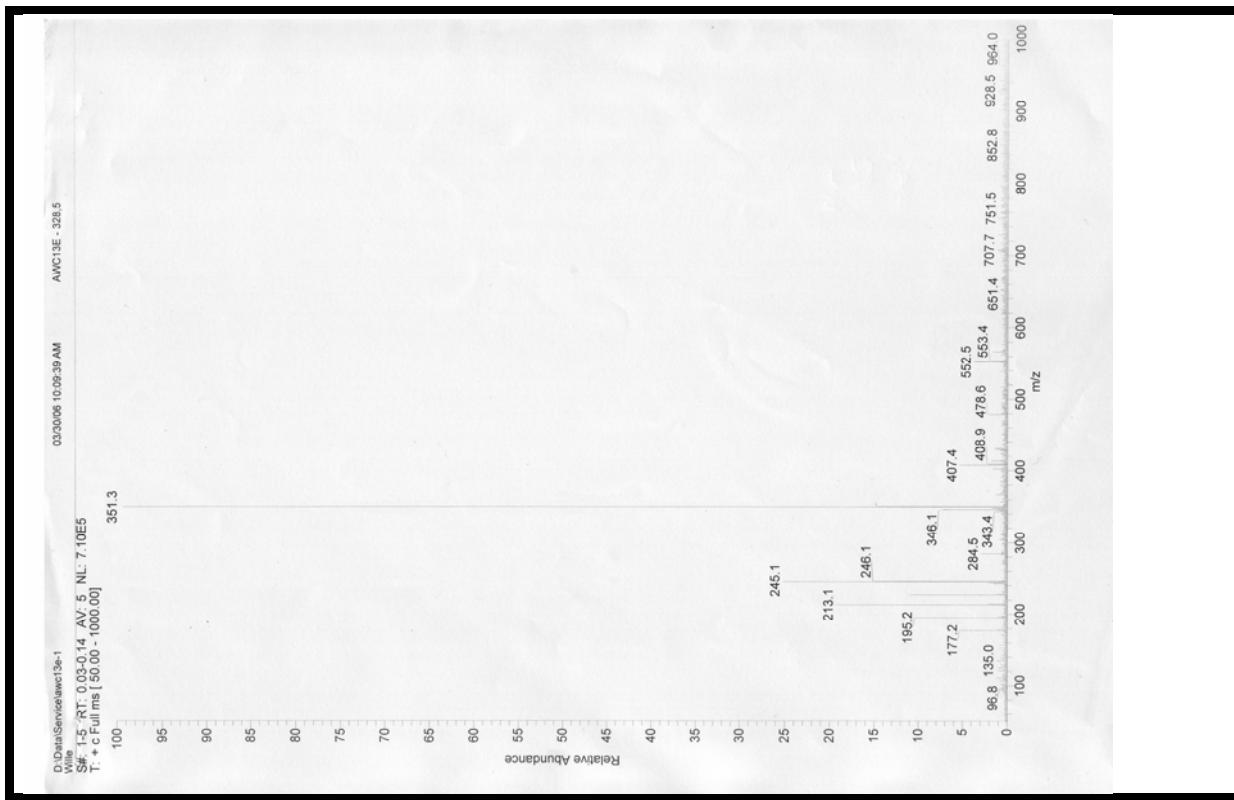
Massespektrum CER[NS]



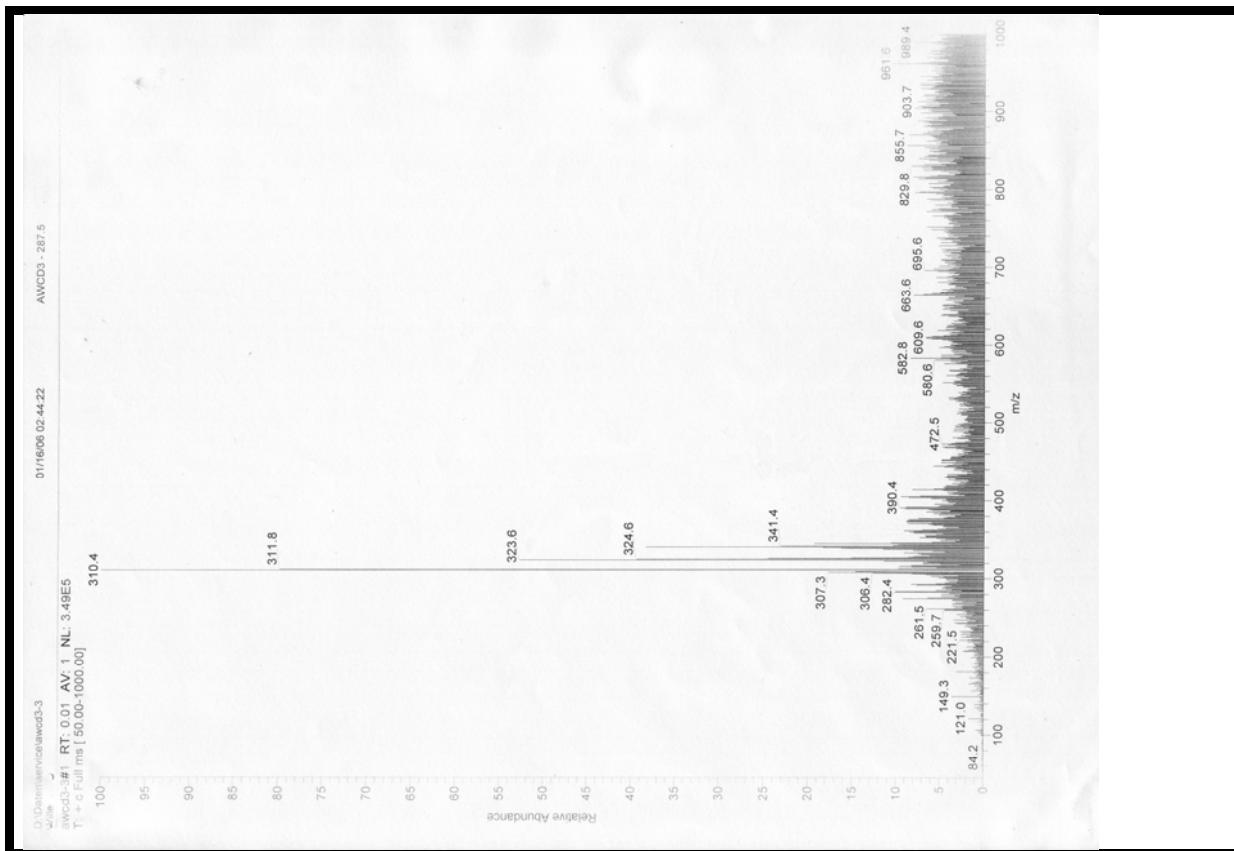
Massespektrum CER[NS]-D2



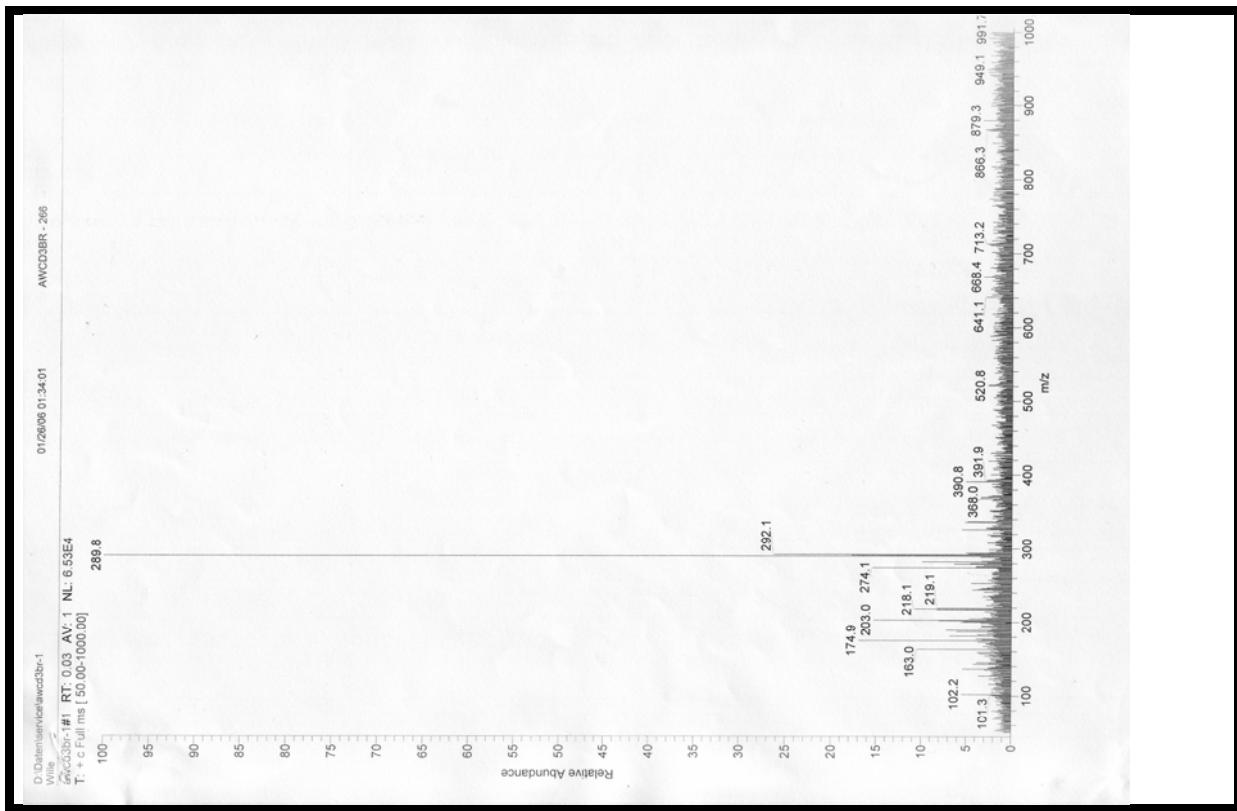
Massespektrum 13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-tridecansäuremethylester



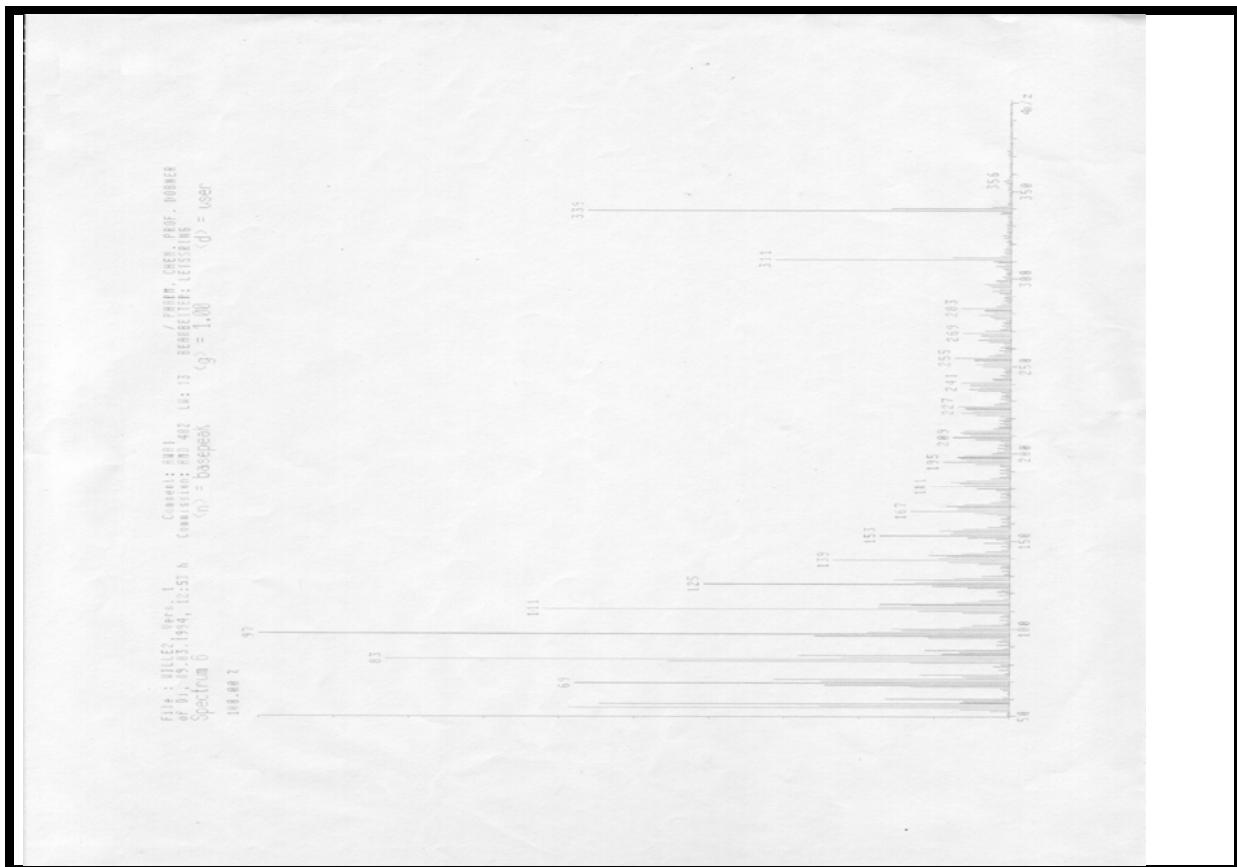
Massespektrum 13-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-1,1,1-D3-tridecan



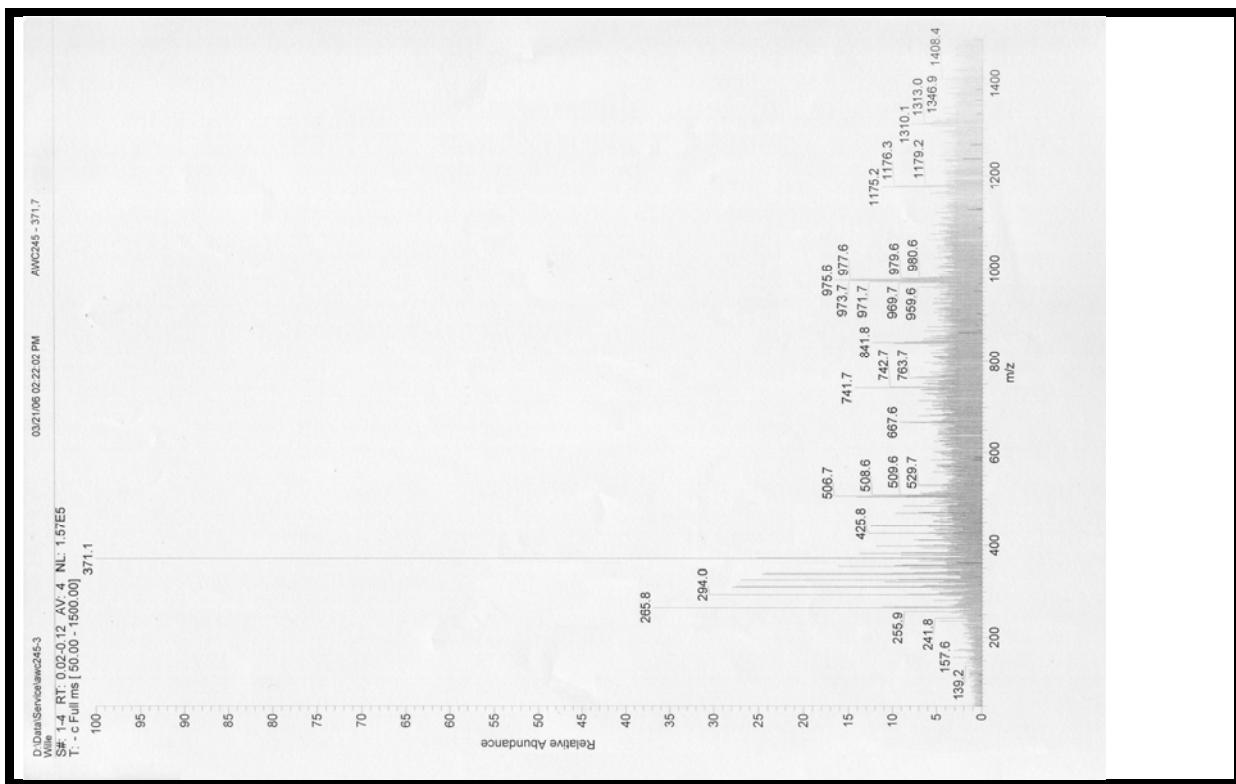
Massespektrum 1-Brom-13,13,13-D3-tridecan



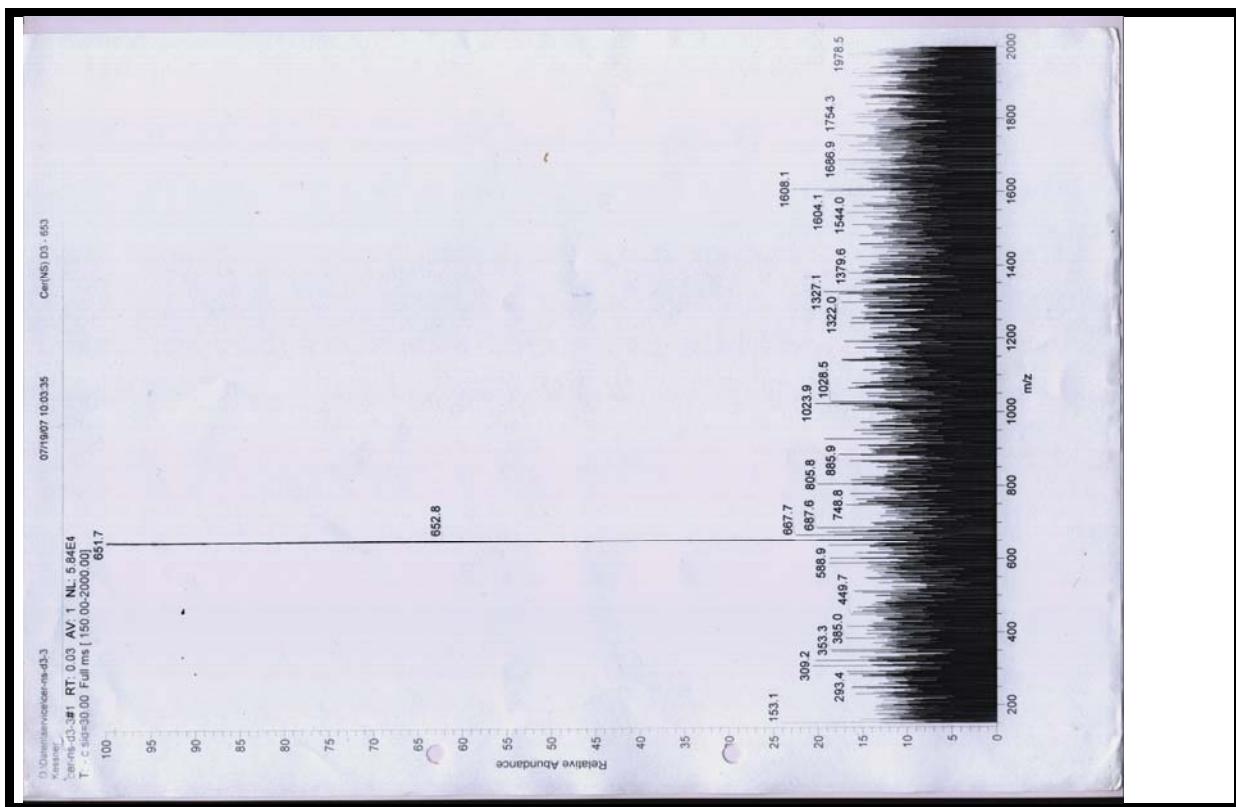
Massespektrum 24,24,24-D3-Tetracosanol



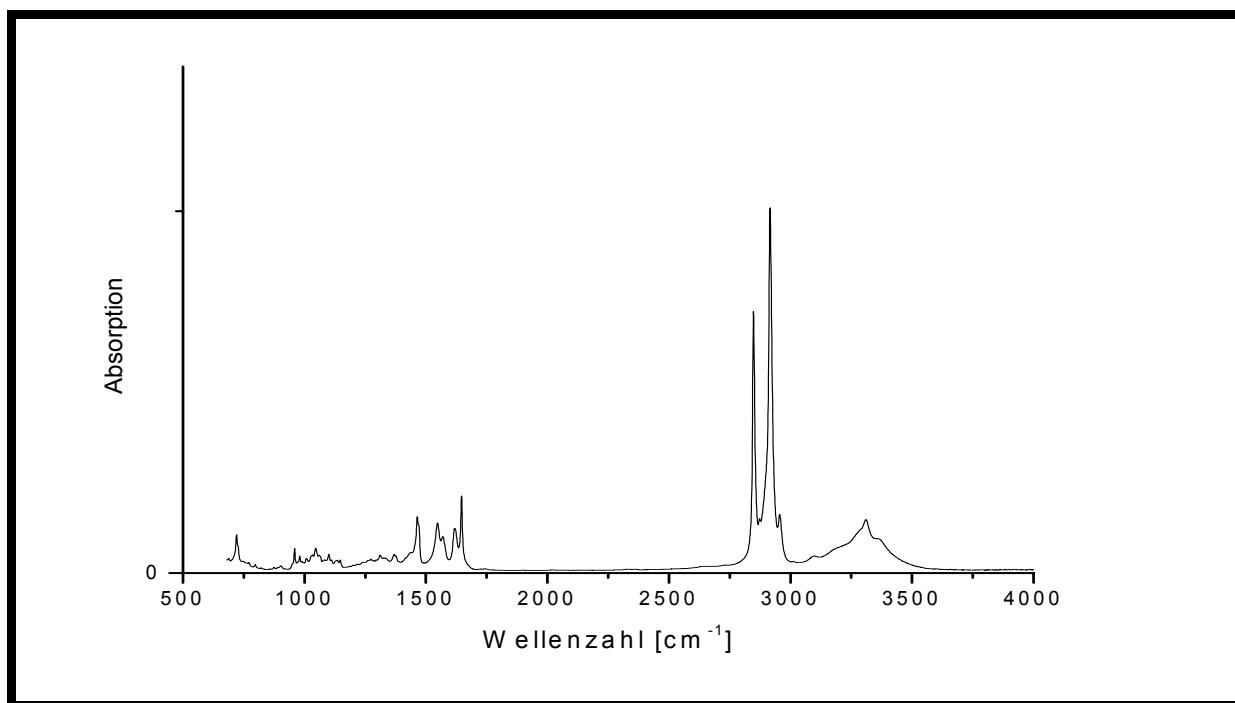
Massespektrum 24,24,24-D3-Tetracosansäure



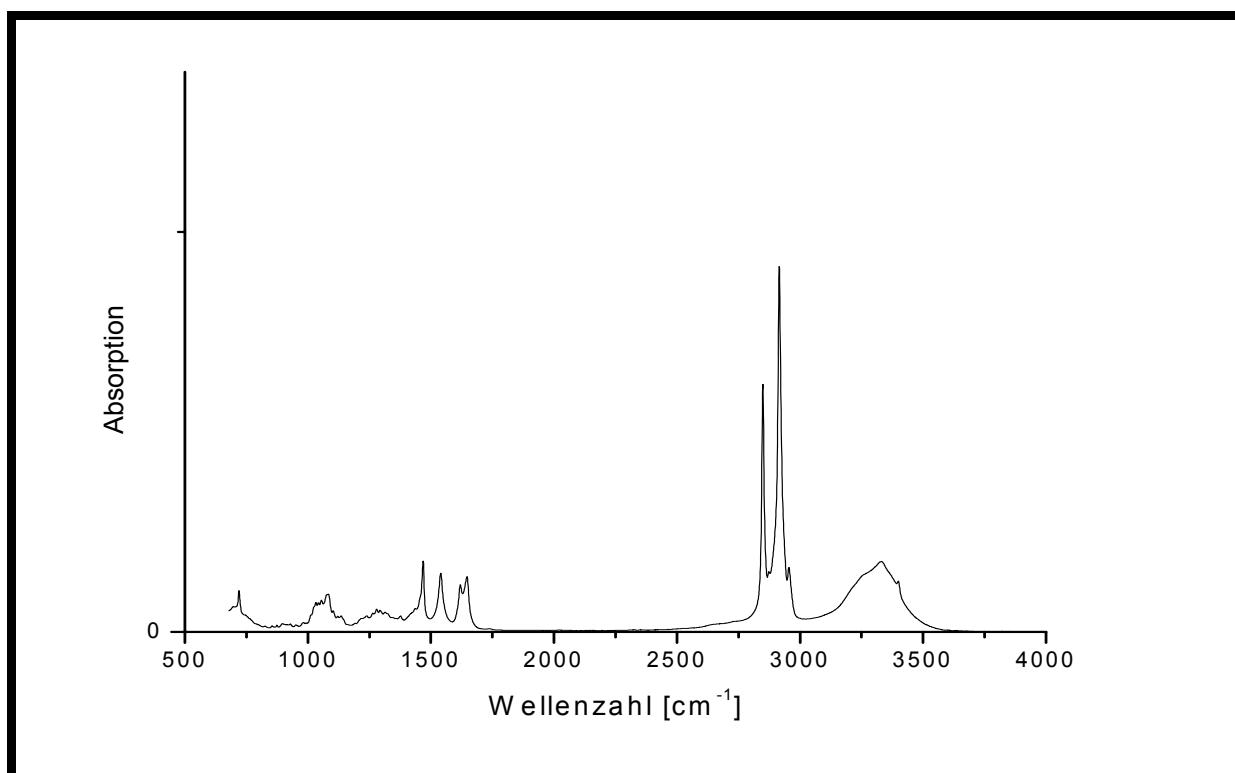
Massespektrum CER[NS]-D3



IR-Spektrum CER[NS]



IR-Spektrum CER[AP]



EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle/Saale, März 2008

Doreen Kessner

<u>Lebenslauf</u>		
<u>1. Angaben zur Person</u>		
Name	Doreen Kessner, geb. Otto	
Geburtsdatum/-ort	01.Juni 1979 in Magdeburg	
Ehegatte	Dr. Stephan Kessner, <i>Apotheker</i>	
Kinder	Lola Camille Kessner	
Eltern	Günter Otto, <i>Maschinenbau-Ingenieur</i> Bärbel Otto, geb. Hebner, <i>Apothekerin</i>	
Geschwister	Dennis Otto, Kunststudent Teresa Otto, Pharmaziestudentin	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
<u>2. Ausbildungsdaten</u>		
Schule	09.1986-07.1990	Grundschule Friedrich Engels Magdeburg
	09.1990-07.1998	POS Friedrich Engels, seit 1992 Immanuel-Kant Gymnasium Magdeburg Abschluss Abitur 12.Klasse
	08.1998-12.1998	Aufenthalt in Manchester, UK Besuch des Tameside College, Stockport
	01.1999-09.1999	Praktikum Altstadt Apotheke Magdeburg Praktikum Klinik St. Marienstift Magdeburg, Station für Gynäkologie und Geburtshilfe
Studium	10.1999-09.2003	Pharmazie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
	03.2000/08.2000	Famulatur Altstadt Apotheke Magdeburg
	08.2001	Bestehen des 1.Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
	09.2003	Bestehen des 2.Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
	10.2003-03.2004	Diplomandin am Institut für Pharmazeutische Chemie, <i>Beiträge zur Synthese und Charakterisierung von Bolaamphiphilen'</i>
	04.2004-09.2004	Pharmaziepraktikum Altstadt Apotheke Magdeburg
	11.2004	Bestehen des 3.Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung mit Erlangen der Approbation zur Apothekerin
<u>3. Beruf</u>	11.2004-01.2008	Stipendium der Landesgraduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt für ein Promotionsstudium am Institut für Pharmazie der MLU Halle/Wittenberg
	Seit 02.2008	Angestellte Apothekerin in der Altstadt Apotheke Magdeburg

Verzeichnis der Publikationen und Vorträge**Originalarbeiten:**

1.	Kessner, D., Ruettinger, A., Kiselev, M.A., Wartewig, S., Neubert, R.H.H. Properties of Ceramides and their impact on the stratum corneum structure – A Review – Part 2: Stratum Corneum Lipid Model Systems Skin Pharmacology and Physiology 2008; 21: 58-74
2.	Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauss, T., Dante, S., Wartewig, S., Neubert, R.H. Localisation of partially deuterated cholesterol in quaternary SC lipid model membranes: a neutron diffraction study. Eur Biophys J 2008, Online veröffentlicht
3.	Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauß, T., Dante, S., Lersch, P., Wartewig, S., Neubert, R.H.H. Arrangement of ceramide [EOS] in a stratum corneum lipid model matrix – new aspects revealed by neutron diffraction studies – European Biophysical Journal (2008), Online veröffentlicht
4.	Kessner, D., Kiselev, M.A., Hauß, T., Dante, S., Wartewig, S., Dobner, B., Neubert, R.H.H. Influence of CER[AP] on the nanostructure of a SC lipid model system: a shift of paradigm – Journal of Investigative Dermatology (2008), eingereicht

Kurzpublikationen:

1.	Kiselev, M., Otto, D., Dobner, B., Neubert, R., Ryabova, N., Dante, S., Hauss, T. Investigation of deuterium labeled model stratum corneum lipid membranes. HMI Experimental Report 2005
2.	Kessner, D., Kiselev, M., Ruettinger, A., Dobner, B., Dante, S., Hauss, T., Neubert, R. Investigation of deuterium labeled stratum corneum lipid model membranes. HMI Experimental Report 2006
3.	Kessner, D., Dante, S., Hauss, T., Neubert, R. Investigation of Ceramid1 based stratum corneum lipid model membranes HMI Experimental Report 2007 I
4.	Kessner, D., Kiselev, M., Dante, S., Hauss, T., Neubert, R. Confirmation of proposed SC lipid model, the armature reinforcement model. HMI Experimental Report 2007 II

Vorträge und Posterpräsentationen:

<u>Vorträge</u>	
1.	Otto, D., Kiselev, M. A., Zbytovská, J., Dante, S., Hauss, T., Dobner, B., Wartewig, S., Neubert, R. New Insights into the Structure of the Stratum Corneum Lipid Model Matrix by Neutron Diffraction. HMI Users' Meeting (22/23.09.2005) Berlin, Vortrag
2.	Kessner, D.: Anordnung des CER[EOS] in der Stratum corneum Lipidmatrix – ein neues Modell basierend auf Neutronendiffraktionsstudien. Kolloquium „SC Lipidmodell-membranen“, Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, 25.04.2007, Vortrag
3.	Kessner, D., Kiselev, M., Dante, S., Hauß, T., Wartewig, S., Neubert, R.H.H. New insights into the structure of the Stratum corneum lipid model: Neutron diffraction studies and their contributions to dermal drug delivery research. Europäischen Neutronenstreukonferenz, Lund, Schweden 25.-29.06.2007, Vortrag
4.	Kessner, D., Kiselev, M.A., Wartewig, S., Dobner, B., Dante, S., Hauß, T., Neubert, R.H.H. Einfluss von CER[AP] auf die Struktur von Stratum corneum Lipidmodell-membranen in Neutronenstreuexperimenten. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Erlangen, 10.-12.10.2007, Vortrag
<u>Posterpräsentationen</u>	
1.	Kiselev, M., Zbytovská, J., Otto, D., Rüttinger, A., Wartewig, S., Neubert, R. New Insights into the Structure of the Stratum Corneum Lipid Model Matrix. Gordon research conferences on skin, 08.2005, Newport, USA, Poster
2.	Kiselev, M.A., Ryabova, N., Balagurov, A.M., Otto, D., Dante, S., Hauß, T., Neubert, R.H.H., Wartewig, S. Ceramide 6 influence on the structure and hydration of multilamellar DPPC membrane. HMI Users' Meeting (22/23.09.2005) Berlin, Poster
3.	Kiselev, M., Zbytovska, J., Otto, D., Rüttinger,A., Dobner,B., Wartewig,S., Neubert, R. New Insights into the Structure of the Stratum Corneum Lipid Model Matrix 5 th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Genf, 27.-30.03. 2006, Poster
4.	Kessner, D., Kiselev, M., Wartewig, S., Neubert, R. New aspects about arrangement of ceramide[EOS] in a stratum corneum lipid model matrix. Gordon Research Conferences Barrier function of mammalian skin, August 5-10, 2007, Newport, USA, Poster
5.	Kessner, D., Kiselev, M.A., Dante, S., Hauss, T., Wartewig, S., Neubert, R.H.H. Analysis of the Cholesterol position in SC lipid model membranes by deuterium labelling in neutron diffraction studies. HMI Users' Meeting (24/25.05.2007) Berlin, Poster
6.	Kessner, D., Kiselev, M., Ruettlinger, A., Wartewig, S., Neubert, R.H.H. Influence of CER[AP] on the structure of a stratum corneum lipid model system as revealed by neutron diffraction studies. 4 th Polish-German Symposium, Halle/ Saale 06.06.2007, Poster

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Reinhard Neubert für die Überlassung des interessanten Themas, die gewährten Freiräume bei der Durchführung der Arbeit sowie dem stetigen Interesse am Fortgang des Promotionsvorhabens.

Herrn Professor Dr. Bodo Dobner danke ich herzlich für die optimale Betreuung bei der Durchführung der synthetischen Arbeiten und für seine immerwährende großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Wartewig danke ich für die gewährte Hilfsbereitschaft und ständige Diskussionsbereitschaft bei allen spektroskopischen Fragestellungen. Leider war es ihm aufgrund seines Todes nicht vergönnt, die Fertigstellung meiner Arbeit zu erleben. Seine menschlichen Ratschläge zu wissenschaftlichen Aufgabenstellungen waren mir immer sehr wertvoll.

Ich danke Herrn Dr. Mikhael Kiselev (Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research in Dubna, Russland) für die gewährte Unterstützung beim Erlernen der Neutronenspektroskopie und für die gemeinsame Durchführung verschiedener Messzeiten am Hahn-Meitner-Institut Berlin.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Silvia Dante und Herrn Dr. Thomas Hauß. Als Instrumentenverantwortliche am V1 Diffraktometer und Ansprechpartner am Hahn-Meitner-Institut zeigten sie ständige Diskussionsbereitschaft bei spektroskopischen und bio-physikalischen Fragestellungen und trugen somit zum Gelingen der vorliegenden Arbeit bei.

Ich danke meinem Kollegen Herrn Dipl.-Pharm. Simon Drescher für die wertvollen Ratschläge bei den synthetischen Arbeiten und für die angenehme Atmosphäre im Labor. Meiner Kollegin Frau Dipl.-Pharm. Annett Rüttinger danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Apotheker Adam Wille, dessen synthetische Arbeiten Eingang in diese Dissertation gefunden haben. Besonders sei seiner Unterstützung im Labor während meiner Schwangerschaft und während der Messzeit am DESY in Hamburg im Januar 2007 gedankt.

Ich danke Frau Rudolf für die Durchführung der Raman-Messungen, Frau Woigk für die Anfertigung der Massenspektren, ebenso Frau Brandt für die Durchführung der Elementaranalysen und der NMR-Abteilung am Institut für Chemie für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Des Weiteren bedanke ich mich bei all denjenigen, die mich im Verlaufe meiner Promotion unterstützten und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dieser Dank gilt im Besonderen meiner Familie. Ich danke meinem Mann Stephan für seine Geduld, für das Interesse an der mitunter schwierigen Aufgabenstellung und vor allem für die Unterstützung bei der Betreuung unserer Tochter Lola Camille während meiner zahlreichen Forschungsreisen. Von ganzem Herzen danke ich auch meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich immer bei der Durchführung meiner ehrgeizigen Vorhaben unterstützten.