



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

**WECHSELWIRKUNGEN VON OLIGO-LYSINEN UND  
AUSGEWÄHLTEN PEPTIDEN MIT DPPC-LIPOSOMEN ALS  
MODELLMEMBRANEN**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Magister/a Pharmaciae (Mag.pharm.)  
an der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Universität Wien

Verfasser/in: Barbara Ranftl  
Matrikelnummer: 0203479  
Studienrichtung: Pharmazie (A449)  
Begutachter: Ao. Univ.-Prof. Dr. Claudia Valenta

Wien, im Februar 2009

## DANKSAGUNGEN

Mein Dank geht an O. Univ. – Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für das Ermöglichen meiner Arbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie.

Sehr Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin Ao. Univ. – Prof. Dr. Claudia Valenta für die hervorragende Betreuung und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Ao. Prof. Dr. Martin Kratzel möchte ich für die Synthesen der Oligo-lysine meinen Dank aussprechen.

Ein großes Dankeschön gebührt Mag. pharm. Sonja Höller für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während des praktischen Teils meiner Diplomarbeit.

Weiters möchte ich mich bei Zita Cechovsky und meinen Laborkolleginnen für die konstruktive Unterstützung und die lustige gemeinsame Zeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Peter Rippl für seine kompetente Unterstützung bei EDV-Problemen, und meinen Freundinnen Margit Lugauer und Susanne Berndl die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>2 Allgemeines .....</b>	<b>7</b>
2.1    Biologische Membranen.....	7
2.1.1    Aufbau und Funktion .....	7
2.2    Haut allgemein .....	8
2.3    Liposomen als Modellmembran .....	8
2.3.1    Liposomen allgemein .....	8
2.4    Oligopeptide.....	11
2.4.1    Oligolysin .....	11
2.4.1    Kombination von Lysin und Alanin .....	13
2.5    Thermische Phasenübergänge von DPPC-Liposomen und Oligopeptiden.....	14
<b>3 Methoden und experimenteller Teil .....</b>	<b>17</b>
3.1    Geräte .....	17
3.1.1    Hochdruckhomogenisator .....	17
3.1.2    Zetasizer .....	18
3.1.2.1    Teilchengröße .....	19
3.1.2.1.1    Praktische Vorgehensweise .....	19
3.1.2.2    Zetapotential .....	19
3.1.2.2.1    Praktische Vorgehensweise .....	20
3.2    Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Parameter bei der Liposomenherstellung .....	20
3.3    Herstellung der Liposomen .....	20
3.4    Beladung der DPPC-Liposomen mit Peptiden .....	21
3.5    Membran Interaktionsstudien.....	22
3.5.1    Mikrokalorimeter.....	22
3.5.2    Praktische Vorgehensweise .....	23

---

<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
4.1    Voruntersuchungen.....	24
4.2    Teilchengröße .....	25
4.3    Zetapotential .....	28
4.4    Mikrokalorimetrie.....	30
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>38</b>
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>42</b>
<b>7 Anhang</b>	
7.1    Tabellen .....	44
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>49</b>
<b>9 Lebenslauf</b> .....	<b>52</b>

## 1 Einleitung

Es gibt eine Fülle von wissenschaftlichen Arbeiten die sich mit zellpenetrierenden Peptiden, sogenannten „Cell-Penetrating-Peptides“ (CPPs) beschäftigen [1]. Dabei handelt es sich um kationische oder amphiphile Peptide, die aus bis zu dreißig Aminosäuren bestehen. Diese haben die Fähigkeit, konjugierte Proteine oder Oligonukleotide durch zelluläre Membranen zu transportieren. Auffällig ist, dass alle bisher beschriebenen CPPs hohe Anteile der Aminosäure Arginin oder Lysin aufweisen [1].

Um aussagekräftige Interaktionsstudien mit Oligopeptiden zu erhalten, sollten diese mit geeigneten und stabilen Modellmembranen, nach dem Vorbild von biologischen Membranen, durchgeführt werden. Biologische Membranen besitzen als Grundstruktur eine Lipiddoppelschicht, die für die meisten polaren Moleküle impermeabel ist. Etabliert hat sich für solche Untersuchungen DPPC<sup>1</sup>, das gute Eigenschaften als Modellmembran aufweist.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde der Einfluss des Tripeptides Lysin-3, des Pentapeptides Lysin-5 und des Heptapeptides Lysin-7 auf die Hautpermeation des Modellstoffes Na-Fluorescein untersucht [1]. Dabei stellte sich heraus, dass das Heptapeptid Lysin-7 den größten Effekt auf die Na-Fluoresceinpermeation ausübte. Aufgrund dieser Ergebnisse war es nun interessant in einer weiteren Studie zu testen, inwieweit Membranwechselwirkungen bewiesen werden können. Die Haut ist ein komplexes Bilayersystem aus Lipiden und Proteinen, wobei für alle Diffusionsprozesse die Hornschicht die Hauptbarriere darstellt. In dieser befinden sich Korneozyten, die mit Keratin gefüllt sind und von einer kohärenten lamellaren Lipidphase umgeben sind. Obwohl die Lipide der Haut Ceramide sind, hat es sich dennoch bewährt als vereinfachtes Membranmodell DPPC-Liposomen zu verwenden, um Wechselwirkungen von Penetrationsförderern und Membranlipiden zu untersuchen. Als Technik eignet sich dazu ein thermoanalytisches Verfahren, wie z.B. Differential Scanning Kalorimetrie oder

---

<sup>1</sup> 1.2 – Dipalmitoyl-sn-Glycer-3-phosphocholin im weiteren bezeichnet als DPPC

Mikrokalorimetrie. Es ist bekannt, dass DPPC-Liposomen zwei wesentliche Phasenübergangstemperaturen, nämlich eine Prä-transition bei etwa 35°C - 38°C und eine Hauptübergangstemperatur von etwa 40° C – 44 °C aufweisen [2].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Derivate Lysin-3, Lysin-5, Lysin-7, Lysin-9 und zwei Polypeptide in DPPC-Liposomen einzuarbeiten und die Wechselwirkungen mittels Mikrokalorimetrie zu untersuchen. Die Peptide sollten dazu in verschiedenen Konzentrationen eingearbeitet werden. Als erster Punkt sollte von diesen DPPC-Liposomen die physikalische Stabilität mittels Messung der Teilchengröße, des Polydispersitätsindex und des Zetapotentials über einen Zeitraum von vier Wochen überprüft werden. Zunächst sollen biologische Membranen genauer erklärt werden.

## 2 Allgemeines

### 2.1 Biologische Membranen

#### 2.1.1 Aufbau und Funktion

Der komplexe Aufbau von Membranen in biologischen Systemen wurde durch das Fluid Mosaik Modell von Singer und Nicolson ansatzweise aufgeklärt. Danach bestehen biologische Membranen aus einer hydratisierten Doppelschicht aus amphiphilen Lipidmolekülen [3].

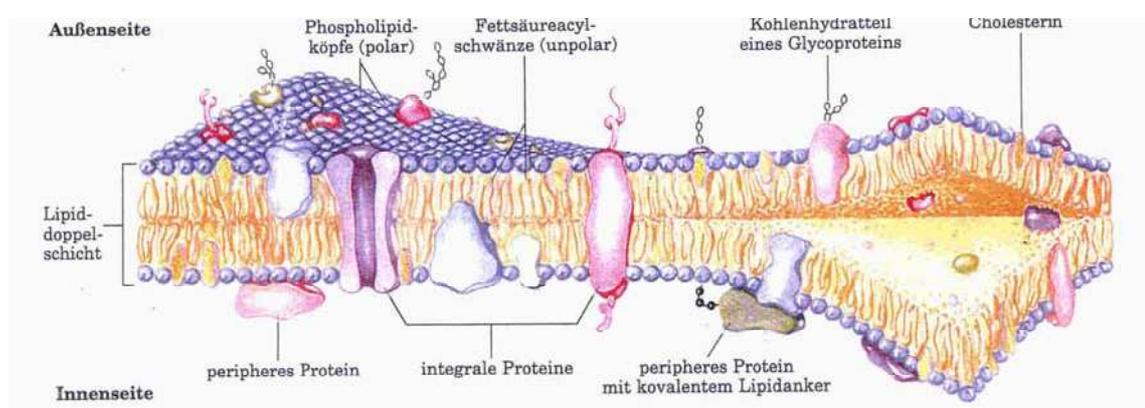


Abbildung 1: Das Fluid-Mosaik-Modell einer biologischen Membran von S.J. Singer und G.C. Nicolson [4]

Die polaren Gruppen lagern sich nach außen an. Die apolaren Bereiche stehen im Kontakt mit den hydrophoben Schwänzen der Lipidmoleküle. In die Lipidmatrix wie auch an der Oberfläche sind Membranproteine eingebaut. Diese sind nicht fest fixiert und können sich lateral an der gekrümmten Membranoberfläche bewegen. Die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Protein/Protein und Lipid/Protein und deren Stärke entscheiden über diese Beweglichkeit. Zur Erhöhung der Stabilität ist weiters Cholesterin eingebaut. Es liegt auf Grund dieser Anordnung ein hochkomplexes System vor [5]. Da die getesteten Peptide in weiterer Folge an der Haut eingesetzt werden sollen, stellte sich die Frage welche Besonderheiten die Haut als Membran aufweist.

## **2.2 Haut allgemein**

Die Haut ist ein schichtenförmiges Organ, das die Grenze zur Außenwelt darstellt. Das Problem der Hautpenetration – permeation von Arzneistoffen besteht darin, dass die oberste Schicht die Hornschicht durchdrungen werden muss. Diese Hornschicht stellt ein komplexes „Bilayersystem“ dar, das aus sechs verschiedenen Typen von Ceramiden, die teilweise an Proteine der Korneozyten angegelagert sind besteht [6, 7]. Obwohl also die Haut aus Ceramiden aufgebaut ist, hat es sich bewährt definierte Phospholipid – Liposomen als stark vereinfachtes Modellmembransystem heranzuziehen [8].

## **2.3 Liposomen als Modellmembran**

Bei Liposomen handelt es sich um mono oder unilamellare Vesikel. Aufgrund des Lipiddoppelschicht Aufbaus von Liposomen stellen diese ein gutes Grundmodell für einfache biologische Membranen dar. Das Verteilungs-, Assoziations-, Einlagerungs- und Permeationsverhalten von kleinen Molekülen wie z. B.: Arzneistoffen, Polymeren oder Proteinen kann mit Hilfe von Liposomen gut in vitro untersucht werden [9]. Zur Herstellung von künstlichen Membranen werden häufig natürliche oder synthetische Phospholipide verwendet und als Modellsysteme eingesetzt. An diesen Systemen kann man grundlegende Eigenschaften studieren, da hier keine, die Messung störenden Membranbestandteile vorhanden sind. Diese Systeme haben den Vorteil, dass sie reproduzierbar herzustellen und gut charakterisierbar sind. Je nach Herstellung kann auf Vesikelgröße und Lamellarität Einfluss genommen werden [10].

### **2.3.1 Liposomen allgemein**

Die Liposomenhülle besteht aus einer oder mehreren wasserunlöslichen quellbaren Phospholipid Doppelschichten, die einen mit wässriger Lösung gefüllten Kern umschließen [11]. Die Doppelschichten sind aus einer Bilayerschicht amphiphiler Lipide aufgebaut. Strukturell werden Phospholipide unterteilt in:

- hydrophile Kopfgruppe  
Phosphorsäureester, verknüpft mit einer Hydroxylgruppe des Glycerols und mit Cholin, Ethanolamin, Serin oder einem weiteren Glycerolmolekül und einen
- lipophilen Fettsäureschwanz  
bestehend aus mindestens zwei der restlichen Hydroxylgruppen der Glycerol veresterten Fettsäuren (12 – 24 C Atome).

Die polaren Kopfgruppen richten sich zu den wässrigen Kompartimenten und die lipophilen Molekülteile sind einander zugewandt, sie bilden somit den hydrophoben Innenbereich innerhalb der Doppelschicht. Schalenartig, vergleichbar mit einer Zwiebelschale, können mehrere solcher Doppelschichten angeordnet sein. Am häufigsten werden Phospholipide, Cholesterol und Glycolipide zur Herstellung von Liposomen verwendet [12]. Die Ladung der Liposomen folgt u.a. aus der Lipidzusammensetzung der Membranen. Demzufolge gibt es kationische, neutrale wie auch anionische Liposomen [13].

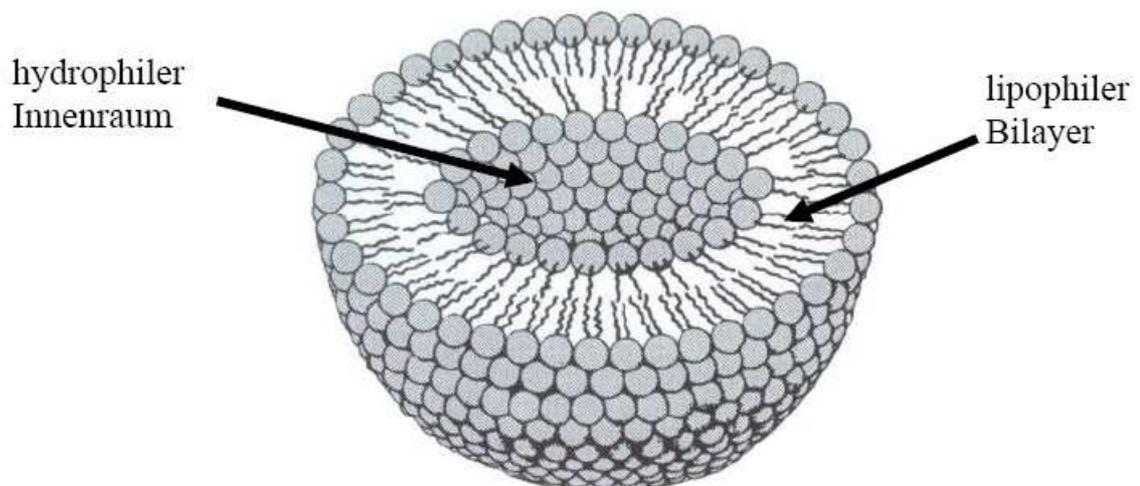


Abbildung 2: Ein Liposom im Querschnitt [14]

In der vorliegenden Arbeit wurden DPPC Liposomen verwendet, laut Firmeninformation<sup>2</sup> bestehen sie aus Phosphatidylcholin<sup>3</sup>. Das Lipid hat amphiphilen Charakter, der dreiwertige Alkohol Glycerol und ein Phosphorsäurediester bilden die polare Kopfgruppe. Der lipophile Teil besteht aus den mit den beiden Hydroxylgruppen veresterten zwei Fettsäuren [15].

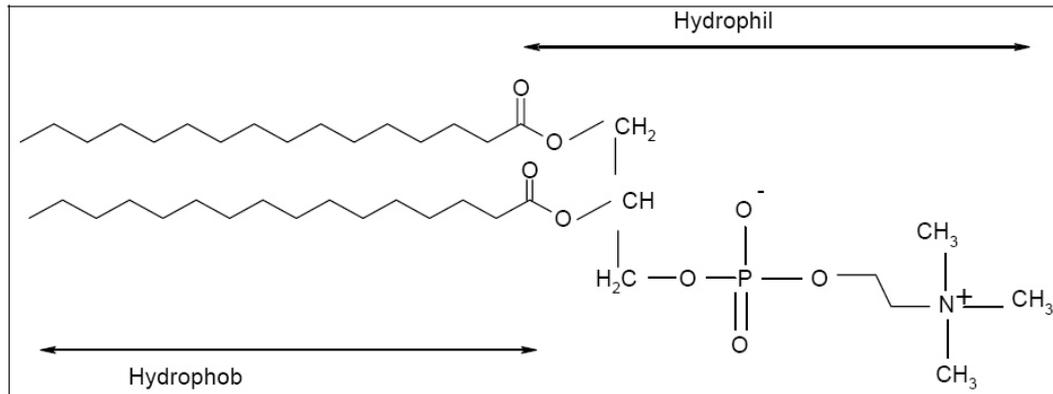


Abbildung 3: 1.2 – Dipalmitoyl-sn-Glycero-sn-Glycero-3-phosphocholin [10]

In die Liposomen wurden die verschiedenen Oligopeptide inkorporiert, um in näherer Folge die Wechselwirkungen von Lipid und Peptid zu untersuchen.

---

<sup>2</sup> Lipoid AG Schweiz

<sup>3</sup> Lipoid PC 16:0/16:0 DPPC

## 2.4 Oligopeptide

### 2.4.1 Oligolysin

In der vorliegenden Arbeit wurden das Tripeptid Lysin-3 (Lys-3), das Pentapeptid Lysin-5 (Lys-5), das Heptapeptid Lysin-7 (Lys-7) und das Nonapeptid Lysin-9 (Lys-9) verwendet.

Lys-3

relative Molekülmasse: 402 g/mol

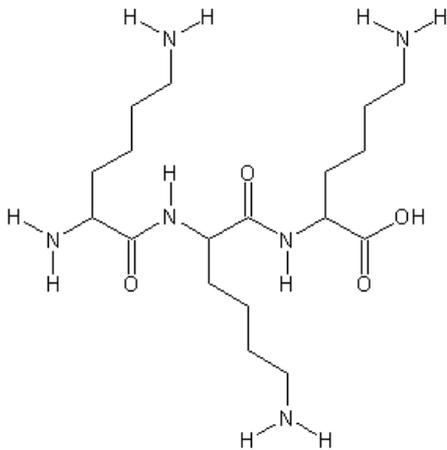


Abbildung 4: Oligopeptid Lys-3

Lys-5

relative Molekülmasse: 658 g/mol

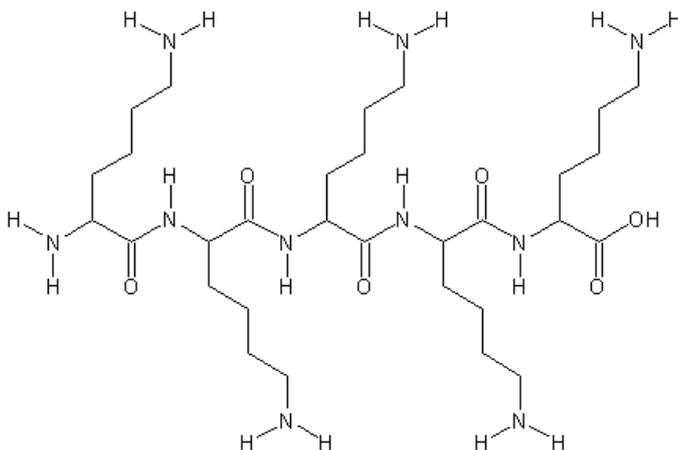


Abbildung 5: Oligopeptid Lys-5

Lys-7

relative Molekülmasse: 914 g/mol

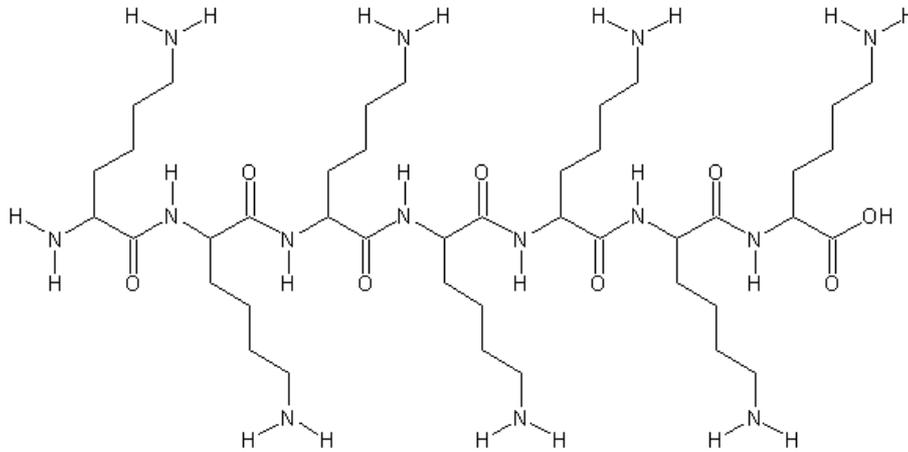


Abbildung 6: Oligopeptid Lys-7

Lys-9

relative Molekülmasse: 1171 g/mol

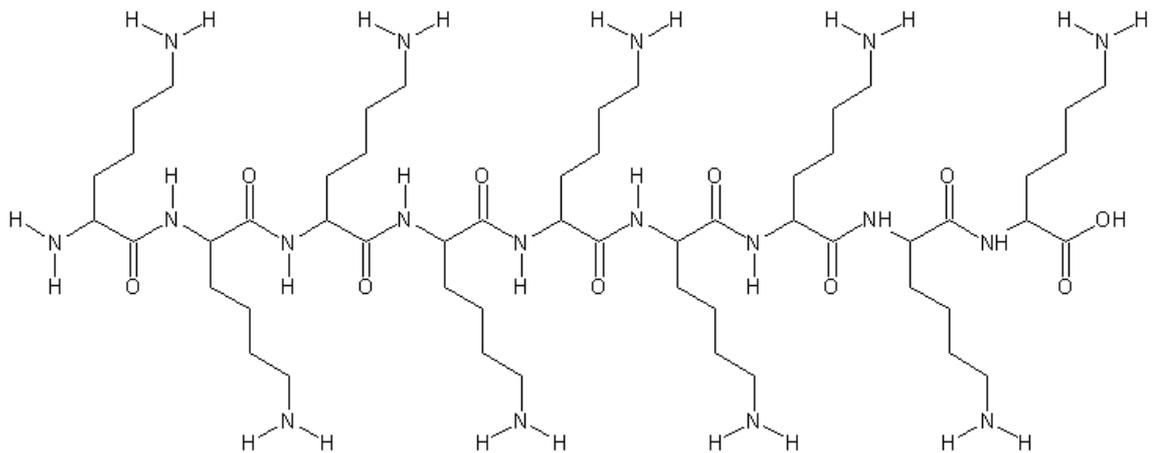


Abbildung 7: Oligopeptid Lys-9

### 2.4.1 Kombination von Lysinen und Alanin

Zusätzlich zu den Oligolysinen sollten noch folgende zwei Polypeptide untersucht werden: **KAKAKAK** (A1) und **KAAKAAK** A2. Diese Polypeptide bestehen aus Lysin und Alanin.

A1: KAKAKAK entspricht Lys-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys

relative Molekülmasse: 744 g/mol

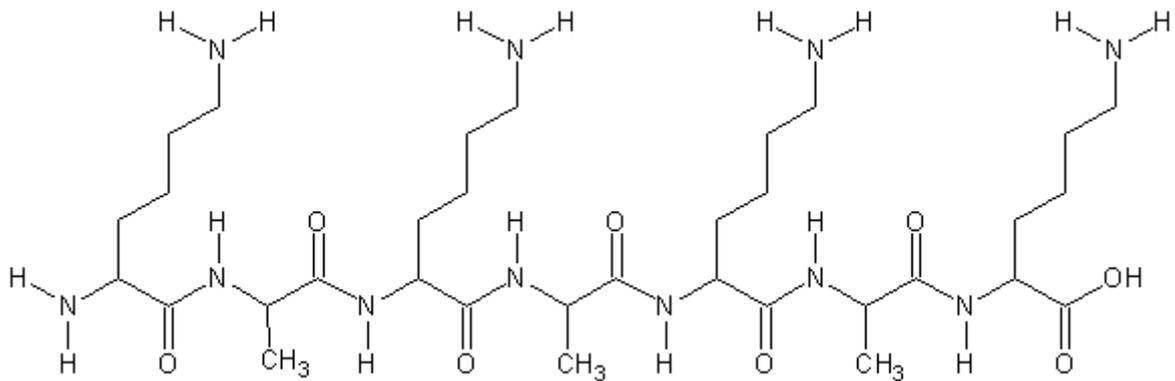


Abbildung 8: Oligopeptid A1

A2: KAAKAAK entspricht Lys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys

relative Molekülmasse: 687 g/mol

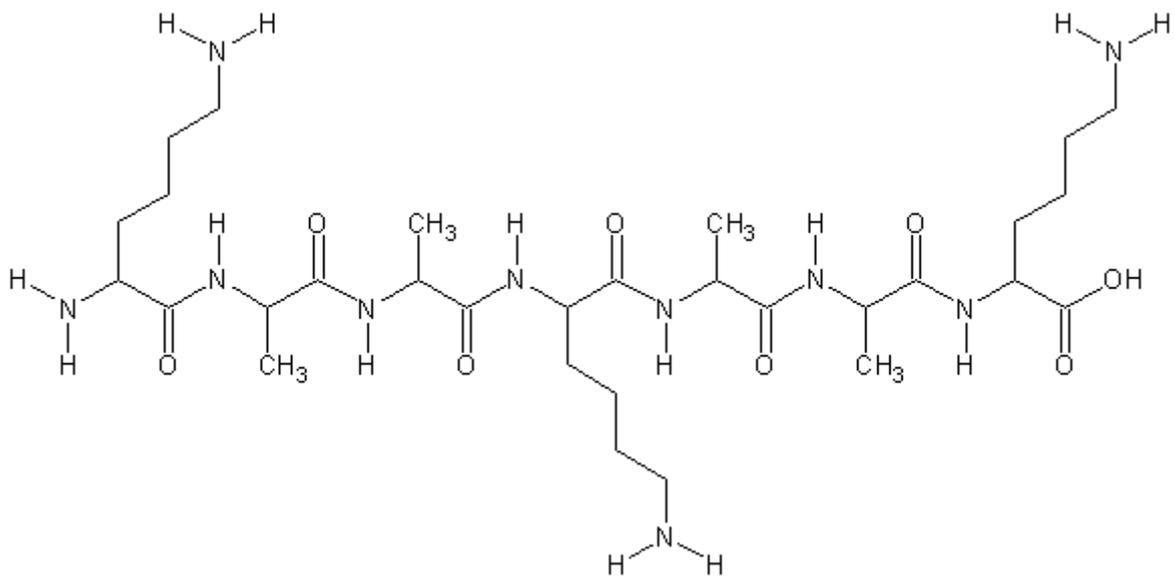


Abbildung 9: Oligopeptid A1

## 2.5 Thermische Phasenübergänge von DPPC-Liposomen und Oligopeptiden

In trockenem Zustand liegen Phospholipide als planare Doppelschichten vor. In wässrigem Medium kommt es aufgrund der Hydratation zur Quellung. Lösen sich dabei Bruchstücke der hydratisierten Doppelschichten ab, sind diese aus Gründen der Enthalpie gezwungen, sich kugelförmig anzulagern. Damit wird der energetisch ungünstige, direkte Kontakt zwischen dem wässrigen Medium und den hydrophoben Endgruppen an den freiliegenden Kanten dieser Bruchstücke vermieden. Natürliche amphipile Moleküle mit membranbildenden Eigenschaften weisen dabei besonders niedrige kritische Mizell(bildungs)konzentrationen (CMC) von  $\leq 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$  auf. Das hat zur Folge, dass eine geringe Konzentration frei in Lösung auftretender Moleküle vorliegt und daraus resultiert die reduzierte Aggressivität solcher Systeme im Vergleich zu anderen grenzflächenaktiven Substanzen. In Abhängigkeit von der Temperatur können liposomale Membranen in zwei unterschiedlichen Zuständen vorliegen und diese gehen bei der Phasenübergangstemperatur ineinander über.

Die Gelphase liegt unterhalb dieser Temperatur, hier sind die Lipidmoleküle in einem „kristallinen Gitter“ fixiert und ihre lipophilen Fettsäuren sind kaum beweglich. Der flüssigkristalline Zustand liegt oberhalb dieser Temperatur. Hier weisen die Lipidmoleküle ebenfalls kristallinen Charakter auf, die Alkylketten sind jedoch deutlich beweglicher. Der Grund liegt in der höheren inneren Energie dieses Zustands und erlaubt den Lipidmolekülen die laterale Diffusion innerhalb des Bilayers. Waag- und senkrecht zur Membran kommt es zur Eigenrotation der einzelnen Moleküle. Die Folge ist die gauche-trans-gauche-Isomerisation in den Alkylketten. Die physikalischen Eigenschaften liposomaler Bilayer sind je nach Gelphase oder flüssigkristalliner Phase unterschiedlich, zum Beispiel in der Fluidität und Permeabilität.

Die Phasenübergangstemperatur ist eine charakteristische Kenngröße eines Phospholipids. Sie ist von der Art der hydrophilen Kopfgruppen als auch von der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäureketten abhängig [9].

Die Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu höheren Temperaturen deutet auf eine Interaktion der untersuchten Substanzen mit der hydrophilen Oberfläche oder mit dem des hydrophilen Kern des Liposoms hin. Eine Verschiebung zu tieferen Temperaturen deutet auf eine Interaktion mit dem lipophilen Teil hin. Der Vorphasenübergang (Prä-Transition) gibt die Oberflächenstruktur an und es kommt zu einer Drehung der Phospholipid Kopfgruppe oder Umformung der lamellaren Struktur und Änderung der Kohlenwasserstoffkettenpackung. Die darauffolgende Phasenübergangstemperatur (Phase transition temperature) zeigt den Kettenschmelzübergang an [8]. In der Phasenübergangstemperatur durchleben Liposome eine deutliche strukturelle Änderung [16].

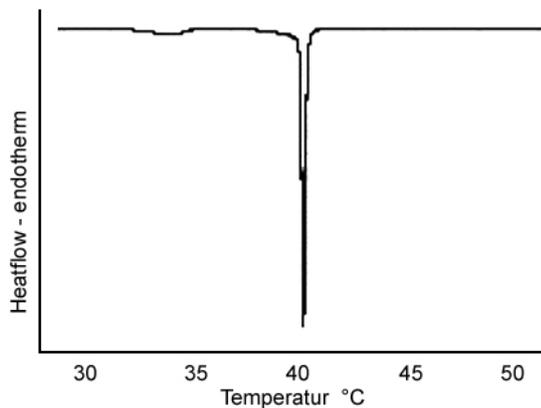


Abbildung 10: Standard Thermogramm eines DPPC Liposom mit endothermen Phasenübergängen [24]

Bei der Prä-transition Temperatur ändern sich die Lipide von der geneigten eindimensionalen in die zweidimensionale Anordnung mit regelmäßigen Wellenbewegungen. Über der Phasenübergangstemperatur werden die Lipide in Folge der trans-gauche-dreh Isomerisation flüssiger. Es resultiert entlang der Ketten eine laterale Entwicklung und Abnahme der Bilayerdicke und es erfolgt ein Zurückkehren in die eindimensionale Anordnung [8].

Wie aus der Abbildung 9 ersichtlich, liegt die Temperatur des Vorphasenübergangs (Prä-transition) bei etwa 34,5°C und die der Hauptübergangstemperatur bei etwa 41°C.

Zunächst sollten reproduzierbare Liposomen hergestellt werden. Die dazu benötigten Geräte werden im nächsten Kapitel beschrieben.

## 3 Methoden und experimenteller Teil

### 3.1 Geräte

Zur Herstellung und Charakterisierung der Liposomen wurden verschiedene Geräte verwendet. Da in der vorliegenden Arbeit nicht die Filmmethode zur Anwendung kam, wurden die Liposomen mittels Hochdruckhomogenisator hergestellt.

#### 3.1.1 Hochdruckhomogenisator



Abbildung 11: Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex – C3<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> Avestin Inc Kanada

Der Hochdruckhomogenisator ist eine Stömungsdispergiermaschine. Die Summe aus dynamischem und statischem Druck ist dabei immer konstant. Die Flüssigkeiten werden unter sehr hohem Druck durch einen sehr engen Zwischenraum gepresst, und der dynamische Druck steigt dabei stark an und der statische fällt in gleichem Maße ab. Sobald der statische Druck unter den Dampfdruck der Flüssigkeit fällt, fängt diese zu sieden an und es entstehen Dampfblasen. Diese Gasblasen kollabieren bei Austritt aus dem Spalt. Es entstehen durch die Implosion der Gasblasen starke Kräfte, die in Form von Stoßwellen auf das Homogenisationsgut treffen und so zu dessen Zerkleinerung führen [18]. Der verwendete Hochdruckhomogenisator konnte stufenlos zwischen 30 und 2000 bar eingestellt werden. Wir verwendeten einen Druck von 1100 bar.

### 3.1.2 Zetasizer

Zur Bestimmung der Teilchengröße, des PDI<sup>5</sup> und des Zetapotentials wurde der Zetasizer Nano ZS (Malvern UK) verwendet.

Das verwendete Gerät<sup>6</sup> erlaubt die Bestimmung verschiedenster Parameter durch dynamische Lichtstreuung oder auch Photokorrelationsspektroskopie. Die Photokorrelationsspektroskopie ist ein optisches Messverfahren, das die Größe von Molekülen und Partikel im Nanometer- Bereich misst. Das Messprinzip beruht auf der Brownschen Molekularbewegung der Teilchen. Wenn die Moleküle oder Partikel mit einem Laser beleuchtet werden, schwankt die Intensität des Streulichts abhängig von der Teilchengröße. Schneller bewegen sich kleinere Teilchen, die von Lösungsmittelmolekülen weiter gestoßen werden. Unter Verwendung der Stokes- Einstein- Beziehung liefert die Auswertung dieser Intensitätsschwankung die Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung und somit die Teilchengröße [18].

---

<sup>5</sup> Polydispersitätsindex

<sup>6</sup> Zetasizer Nano ZS Malvern UK

### **3.1.2.1 Teilchengröße**

Die Größe ist ein wichtiger Parameter bei Einsatz von Liposomen als Modellmembran. Liposomen mit ungleicher Größe weisen eine verschieden starke Krümmung ihrer Oberfläche auf. Der Polydispersitätsindex (PDI) entspricht der Breite der Größenverteilung [9]. Um reproduzierbare und physikalisch chemisch stabile Liposomen zu erhalten, wäre bei all diesen Messungen ein PDI von 0,1 bis 0,3 optimal.

#### **3.1.2.1.1 Praktische Vorgehensweise**

Arbeitsvorschrift:

In eine Polystyrolküvette werden 2 ml Probe der Liposomen pipettiert und mit destilliertem keimfiltrierten Wasser 1:10 verdünnt. Der Messmodus wird so gewählt, dass die Teilchengröße der Probe dreimal hintereinander gemessen wird. Während der Messung wird die Proben temperatur mit Hilfe eines Thermostats annähernd auf 25°C konstant gehalten.

#### **3.1.2.2 Zetapotential**

Das Zetapotential der Liposomen wurde ebenfalls mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) nach dem Prinzip der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Man erhält Auskunft über die Ladungsart und -dichte nahe der Membranoberfläche d.h. an der Scherfläche diffundierender Liposomen mit der Umgebung [9]. Das elektrische Potential an der Abscherschicht sich bewegender Partikel in einem Dispersionsmittel ist das Zetapotential.

Das Zetapotential wird im angelegten Wechselfeld durch die elektro-phoretische Mobilität der Partikel gemessen. In einer Messzelle werden zwei Laserstrahlen zur Kreuzung gebracht. Bewegte Partikel streuen dieses Licht und verändern die Frequenz in Abhängigkeit von ihrer Geschwindigkeit (Doppler Effekt). Daraus errechnet sich das Zetapotential [15].

### **3.1.2.2.1 Praktische Vorgehensweise**

Arbeitsvorschrift:

Die Probe wird mit frisch destilliertem keimfiltriertem Wasser verdünnt und luftblasenfrei in die Messzelle mit Hilfe einer Spritze eingebracht. Danach an beiden Enden mit den dazugehörigen Verschlüssen verschlossen.

### **3.2 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Parameter bei der Liposomenherstellung**

Um Liposomen mit reproduzierbaren physikalischen Eigenschaften, wie z. B. gleichmäßiger Teilchengröße herzustellen wurden zunächst einige Vorversuche durchgeführt. Dazu wurden die DPPC - Mengen und die Homogenisationszeit variiert. Zuerst wurden Liposomen mit jeweils 0,5 Mol%, 2 Mol%, 5 Mol% und 10 Mol% DPPC hergestellt und über zwei Wochen lang täglich die Teilchengröße (TG), der Polydispersity Index (PDI) und das Zetapotential (ZP) vermessen. Als am stabilsten zeigten sich die 5 Mol%-igen DPPC-Liposomen. Da die zu testenden Peptide in die fertigen Liposomen eingearbeitet werden sollten, wurden 5 Mol%-ige DPPC-Liposomen 1:1 mit Wasser verdünnt. Diese Liposomen dienten in weiterer Folge als Kontrollen und wurden als Placebo-Liposomen bezeichnet.

### **3.3 Herstellung der Liposomen**

Das DPPC wird in frisch destilliertem Wasser bei 60°C zu einer Endkonzentration von 5 Mol% gelöst. Sobald die Lösung auf 40°C abgekühlt ist, wird sie mit dem Ultraturrax fünf Minuten lang auf Stufe 2 gerührt und anschließend im Hochdruckhomogenisator bei 1100 bar homogenisiert. Je nach Menge wurden unterschiedliche Zeiten gewählt. Diese lagen von acht bis sechzehn Minuten. Bei einer Herstellung von 20 ml DPPC Lösung beträgt die Homogenisationszeit acht Minuten, bei 40 ml DPPC Lösung sechzehn Minuten.

### 3.4 Beladung der DPPC-Liposomen mit Peptiden

In die DPPC-Liposomen wurden verschiedene Polypeptide in unterschiedlichen Konzentrationen eingearbeitet. Eine genaue Angabe der Mengen ist in Tabelle 1 gegeben. Darüber hinaus wurde noch getestet, ob eine Zugabe der Peptide vor oder nach der Hochdruckhomogenisation diese physikalischen Eigenschaften wesentlich veränderte. Es stellte sich heraus, dass kein signifikanter Einfluss auftrat. Deshalb wurden die zu untersuchenden Peptide in die fertigen Liposomen eingearbeitet. Zur Beladung mit den Oligopeptiden wurden jeweils die 5 Mol%-igen DPPC-Liposomen 1:1 mit der entsprechenden Menge wässriger Peptidlösung oder mit destilliertem Wasser (Kontrollen) verdünnt. Danach wurden die Liposomen über Nacht bei 32°C geschüttelt.

Tabelle 1: Mengen der eingearbeiteten Polypeptide

Lys-3	5 Mol%	10 Mol%	20 Mol%	30 Mol%
Lys-5	5 Mol%	10 Mol%	20 Mol%	30 Mol%
Lys-7	5 Mol%	10 Mol%	20 Mol%	30 Mol%
Lys-9		10 Mol%	20 Mol%	
A1 <sup>7</sup>		10 Mol%	20 Mol%	
A2 <sup>8</sup>		10 Mol%	20 Mol%	

---

<sup>7</sup> KAKAKAK

<sup>8</sup> KAAKAAK

### 3.5 Membran Interaktionsstudien

Wie in 2.5 beschrieben kann bei DPPC-Liposomen eine Prä- und eine Hauptübergangstemperatur gemessen werden. Daneben ist es auch möglich die Enthalpie zu berechnen.

#### 3.5.1 Mikrokalorimeter

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Mikrokalorimeter der Firma Setaram (Setaram III) verwendet. Als Auswertesoftware stand Setsoft 2000 zur Verfügung. Chemische Reaktionen sind mit der Aufnahme oder Abgabe von Wärme verbunden. Die Enthalpie einer Reaktion gibt Aufschluss über die freiwerdende oder verbrauchte Energie. Daraus ergibt sich die Möglichkeit Informationen über kovalente Bindungen, nicht kovalente Bindungen und Hydratisierungsprozesse zu erhalten. Das Mikrokalorimeter besitzt eine Referenzzelle und eine Probenzelle, die thermostatiert und isoliert sind. Das Geschehen in der Zelle wird über den Stromfluss gemessen. Es herrschen isotherme Bedingungen d.h. die Temperatur des Mantels wird konstant feedback-kontrolliert aufgeheizt. Konstanter Strom (J) fließt durch die Referenzzelle und die Stromstärke wird als Funktion der Zeit (t) registriert. Läuft in der Probenzelle eine Reaktion ab und es wird dabei Wärme frei, so wird der Strom (J) durch den Feedback Mechanismus gedrosselt. Wird aber Wärme aufgenommen, muss der Heizstrom verstärkt werden. Eine Veränderung der Stromstärke wird als positiver oder negativer Peak registriert. Das Mikrokalorimeter misst die Stromstärke in der Probenzelle und berechnet daraus die Aufnahme bzw. Abgabe von Wärme pro Zeiteinheit (mikroCal/sec) [19].

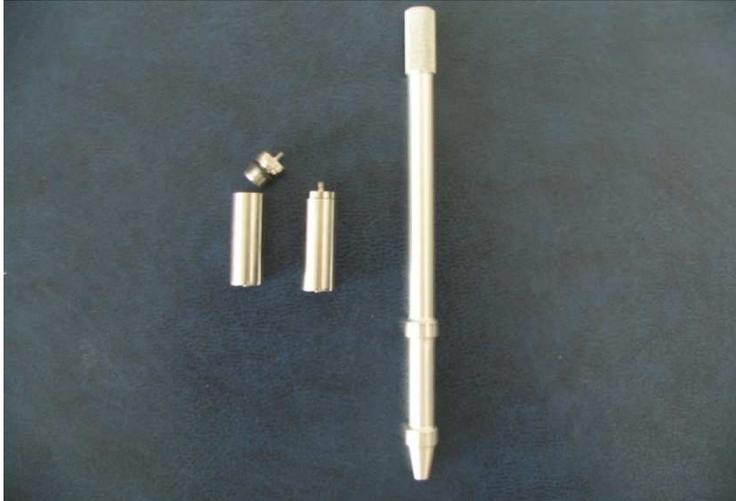


Abbildung 12: Messzellen der Micro DSC [20]

### 3.5.2 Praktische Vorgehensweise

Arbeitsvorschrift:

Es wird 0,45 ml der DPPC-Liposomen und dieselbe Menge an destilliertem keimfiltriertem Wasser in die Referenzzelle pipettiert. Der durchschnittliche DPPC Gehalt beträgt 11,25 mg. Die Analyse der Proben erfolgt bei einer Scanning rate von 1 °C/min in einem Temperaturbereich von 15 bis 65 °C. Die Resultate werden aus den Mittelwerten von drei parallelen Experimenten mit Setsoft 2000 ermittelt. Die Phasenübergangstemperatur und die Enthalpie für jede Oligopeptidkonzentration kann so errechnet werden.

## 4 Ergebnisse

DPPC-Liposomen ohne Zusätze dienen als Kontrollen und werden als Placebo bezeichnet.

### 4.1 Voruntersuchungen

Die Teilchengröße der hergestellten Placebo-Liposomen wurde ab dem Herstellungstag regelmäßig 60 Tage lang vermessen. Dabei wurde, wie Abb. 13 zeigt, festgestellt, dass sich die Teilchengröße während der gesamten Untersuchungszeit nicht verändert und im Bereich von 100 bis 118 nm liegt. Das heißt es ist gelungen, reproduzierbare DPPC-Placebo-Liposomen mit ausreichender physikalischer Stabilität zu produzieren.

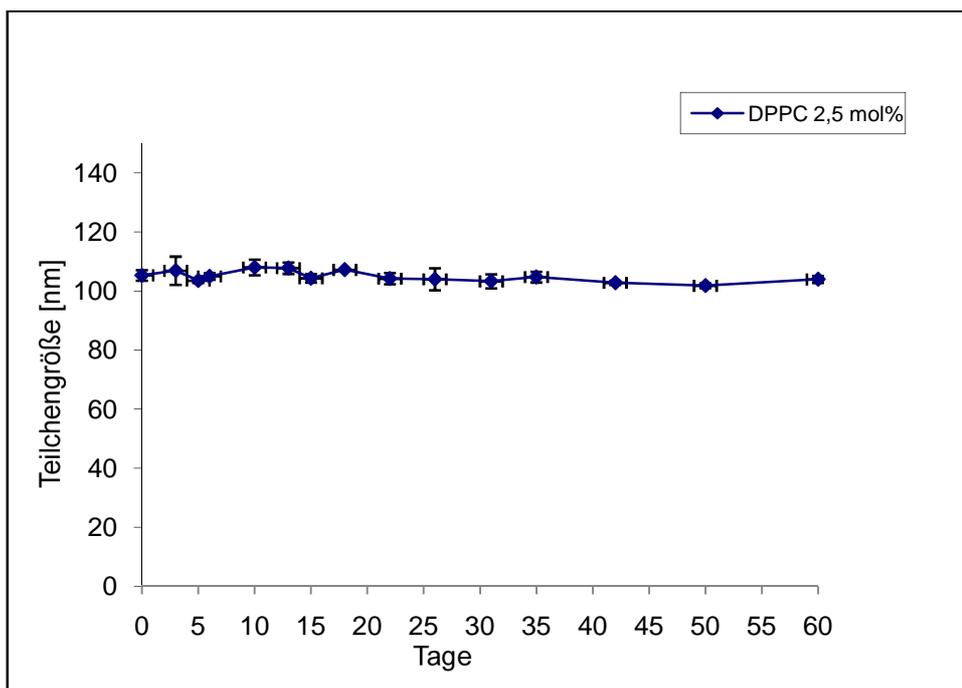


Abbildung 13: Vergleich der Teilchengröße von DPPC-Placebo-Liposomen über 60 Tage

Nachdem die physikalische Stabilität gesichert war, wurden unmittelbar nach Herstellung der DPPC-Placebo-Liposomen die zu untersuchenden Peptide in den Konzentrationen, die in Tab.1 angeführt sind eingearbeitet und in bestimmten Zeitabständen 4 Wochen lang jeweils die Teilchengröße, das Zetapotential und der Polydispersitätsindex ermittelt. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

#### 4.2 Teilchengröße

Die Teilchengröße veränderte sich nach Einarbeitung der Oligopeptide im Vergleich zu den Placebo Liposomen nicht signifikant. Der Größenbereich liegt zwischen 85 und 117 nm.

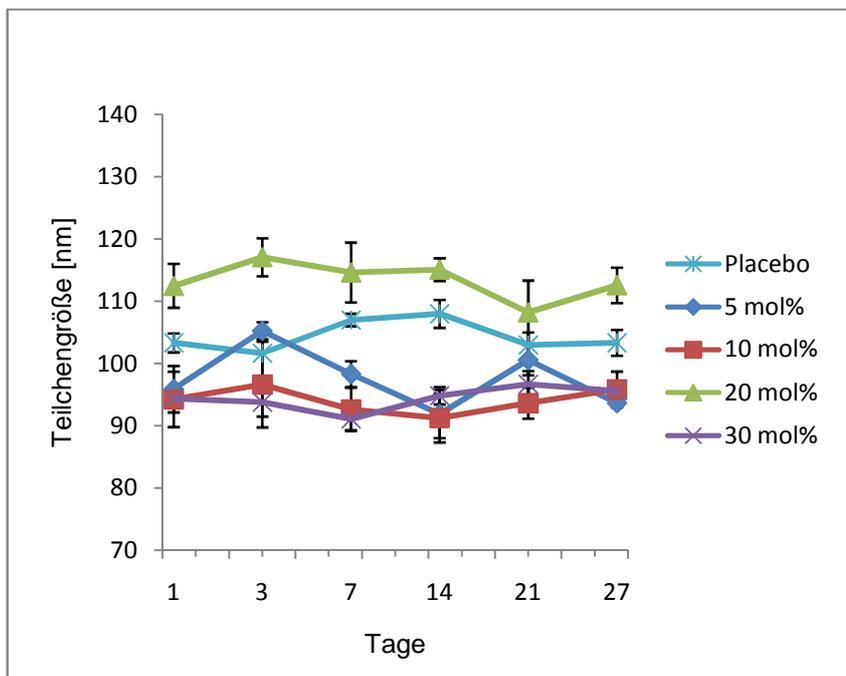


Abbildung 14: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Lys-3 auf die Teilchengröße in DPPC-Liposomen

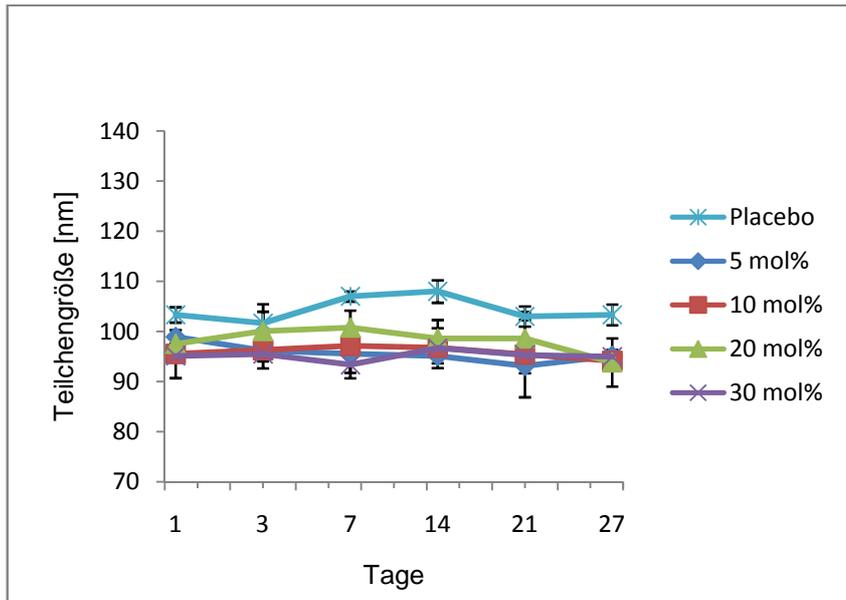


Abbildung 15: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Lys-5 auf die Teilchengröße in DPPC-Liposomen

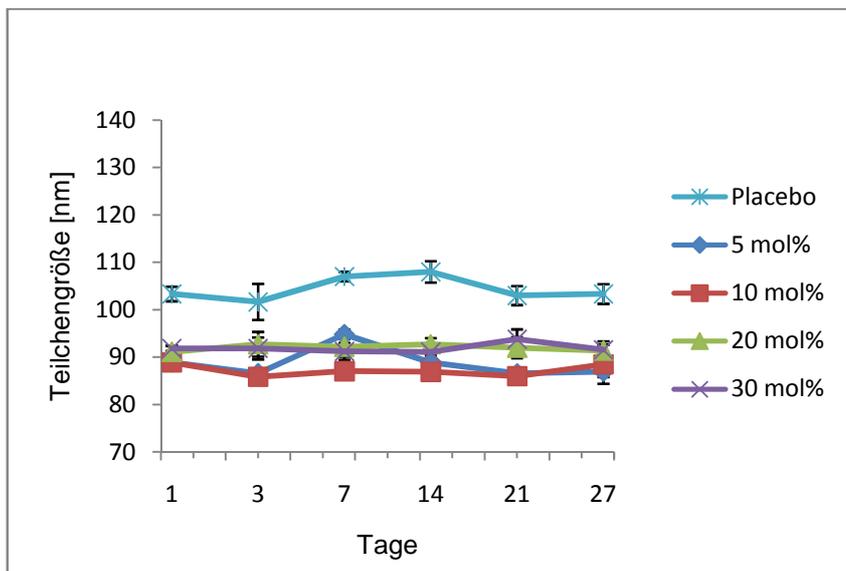


Abbildung 16: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Lys-7 auf die Teilchengröße in DPPC-Liposomen

Im Vergleich zu Placebo Liposomen weisen DPPC-Liposomen, die mit Lys-5 und Lys-7 beladen sind eine kleinere Teilchengröße auf. Wie Abb. 15 und Abb. 16 zeigen liegt bei allen Lysin-Konzentrationen die Teilchengröße in einer sehr engen Breite. Bei Lys-5 im Bereich von 93 bis 102 nm und bei Lys-7 zwischen 85 und 95 nm. Eine größere Teilchengröße als die Placebo-Liposomen zeigen nur Liposomen mit 20 Mol% Lys-3 mit Werten von 107 bis 117 nm (siehe Abb. 14). Andere Konzentrationen von Lys-3 bewirken eine kleinere Teilchengröße als Placebo-Liposomen. Die PDI Werte von 0,1 - 0,28 beweisen dass ein sehr enger Größenwert vorliegt. Das beweist, dass es gelungen ist physikalisch stabile Liposomen herzustellen. Es ist somit sichergestellt, dass die von uns hergestellten Liposomen über eine Zeitspanne von mindestens vier Wochen physikalisch stabil bleiben und sich die Teilchengröße nicht mehr wesentlich verändert.

### 4.3 Zetapotential

Um weitere Aussagen über die physikalische Stabilität treffen zu können wurde auch das Zetapotential regelmäßig vermessen.

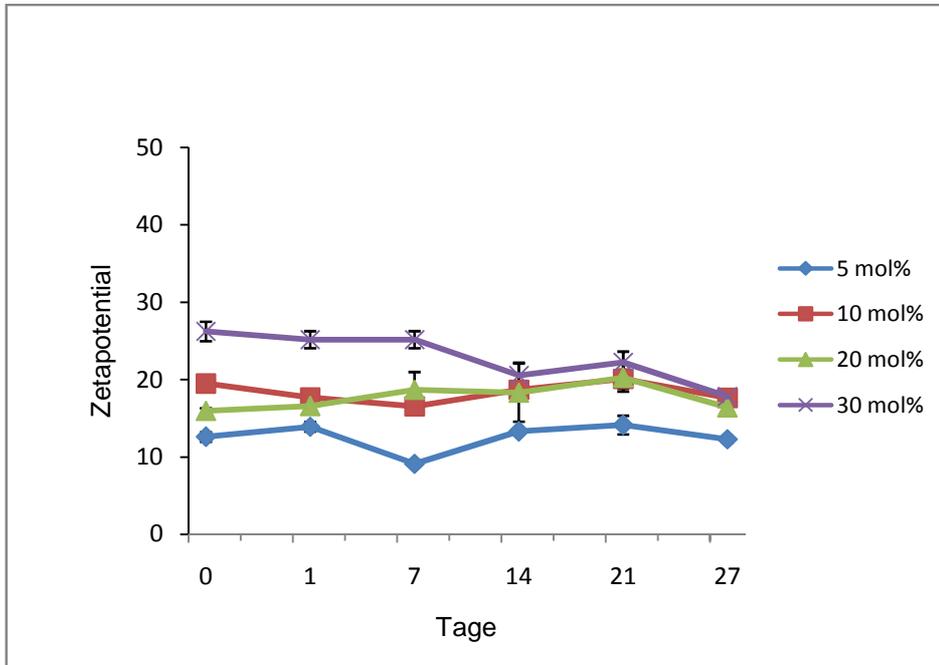


Abbildung 17: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Lys-3 auf das Zetapotential in DPPC-Liposomen

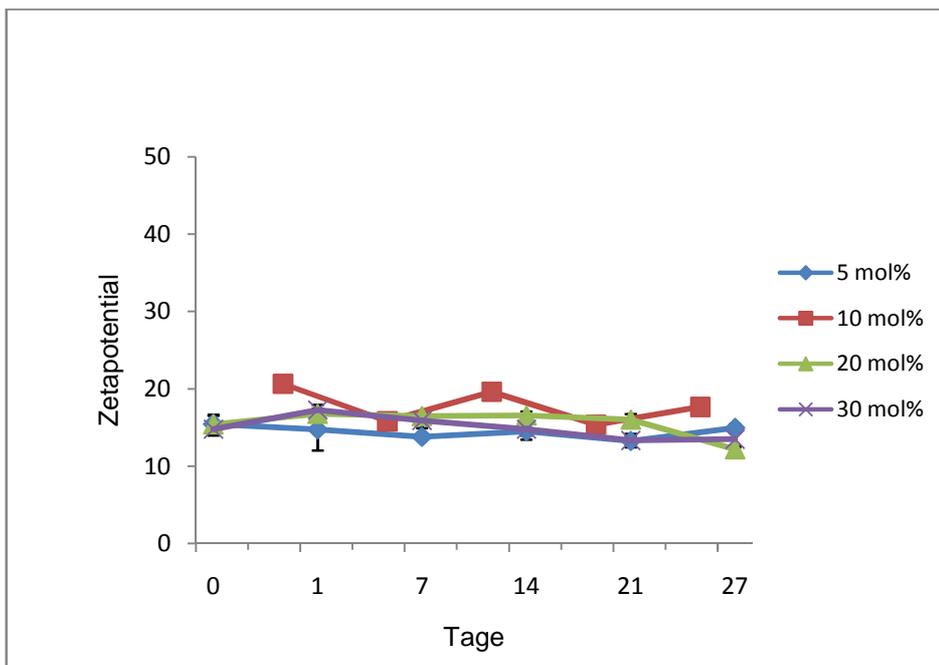


Abbildung 18: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Lys-5 auf das Zetapotential in DPPC-Liposomen

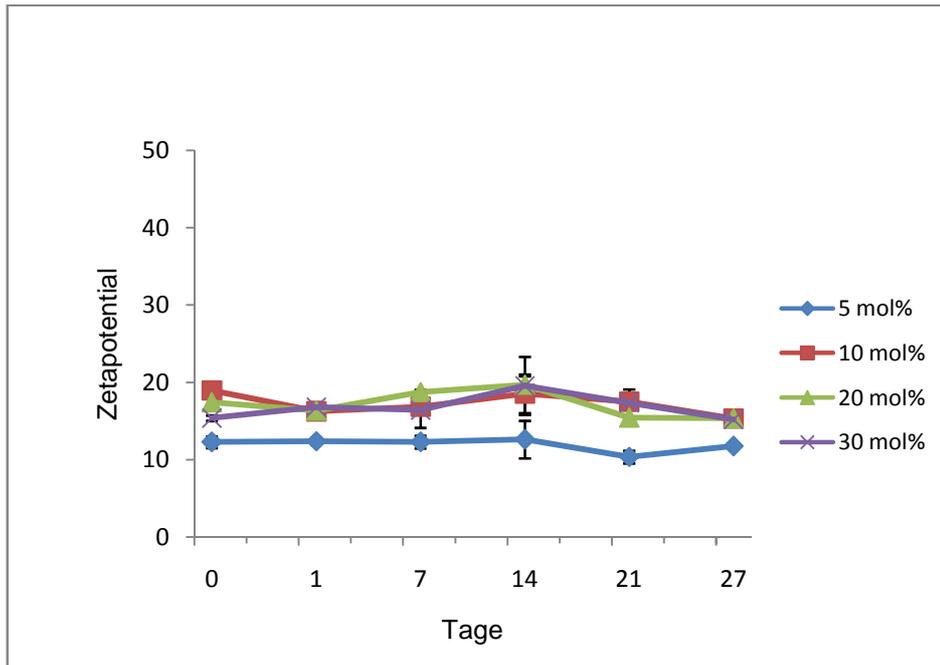


Abbildung 19: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Lys-7 auf das Zetapotential in DPPC-Liposomen

Während der gesamten Messzeit von vier Wochen lag das Zetapotential im positiven Bereich. Wie Abb. 18 und Abb. 19 zeigen sind bei Lys-5-hältigen und Lys-7-hältigen Liposomen sehr ähnliche Werte zu beobachten. Sie lagen zwischen +15 und +20. Bei Liposomen, die mit Lys-3 versetzt sind konnten wir im Vergleich dazu, größere Unterschiede messen. Die Werte liegen wie aus Abb. 17 ersichtlich zwischen +8 und +27.

#### 4.4 Mikrokalorimetrie

Wie bereits unter 2.5 beschrieben weisen die Placebo-DPPC-Liposomen eine Prä-Transition-Temperatur von 34,5°C und eine Hauptphasenübergangstemperatur von 41°C auf. Diese Prä-Transition ist in weiterer Folge bei der Vermessung der Liposome, in die Peptide inkorporiert sind, nicht mehr sichtbar. Die Hauptphasenübergangstemperatur verschiebt sich nach Beimengung aller untersuchten Oligolysine zu höheren Temperaturen - mit Ausnahme des Polypeptids A1 10 Mol%, das diese zu niedrigeren Werten verschiebt. Dies deutet auf eine Interaktion der Peptide mit der hydrophilen Oberfläche oder mit dem hydrophilen Kern der Liposome hin (siehe Abb. 20).

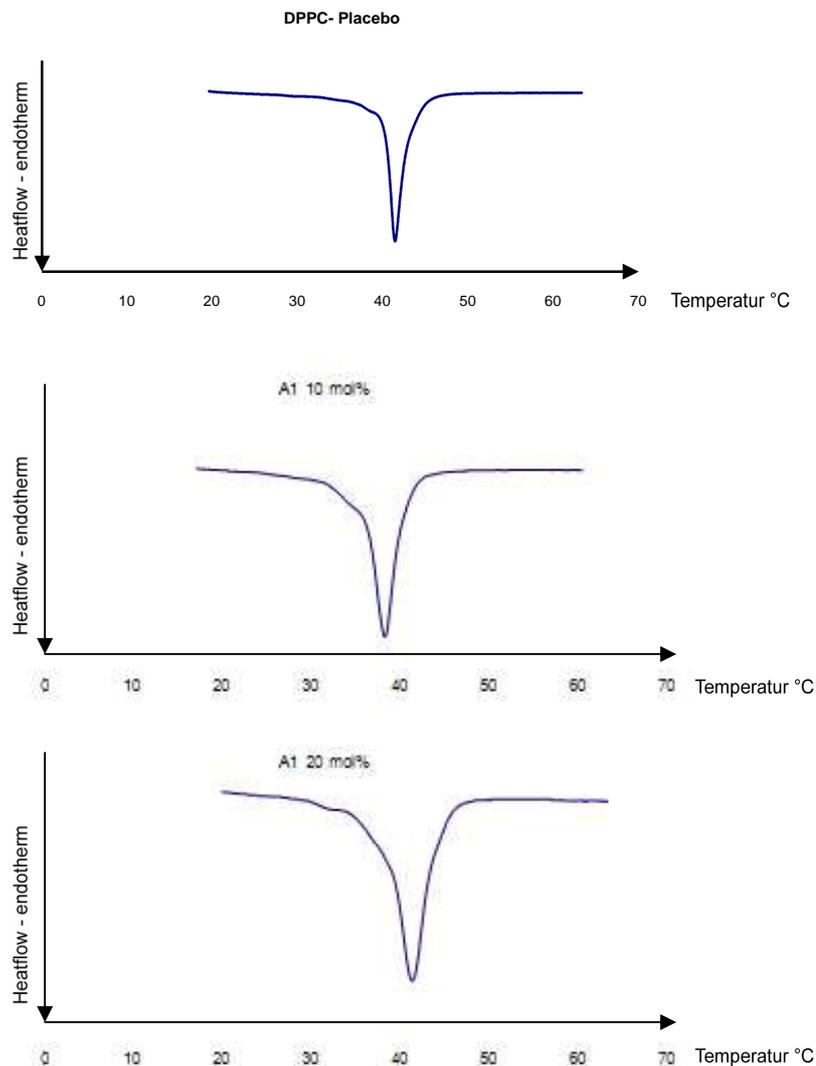


Abbildung 20: Einfluss von A1 in 10 und 20 Mol% auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu Placebo DPPC-Liposomen

Bei den Liposomen, die in vier verschiedenen Konzentrationen mit Lys-3 versetzt sind, kann, wie aus Abb. 21 ersichtlich, die Verschiebung zu höheren Temperaturen im Bereich von 41,85°C bis 42,50 °C beobachtet werden. Der Peak wird vor allem bei der 30 Mol%-igen Konzentration breiter und es zeigen sich kleine zusätzliche Schultern.

Die mit Lys-5 versetzten Liposomen sind denen mit Lys-3 bis zur 20 Mol%-igen Konzentration in ihrer Verschiebung sehr ähnlich. Die Werte liegen dabei zwischen 41,92°C und 43,13°C. Unterschiedlich verhält sich die 30 Mol%-ige Konzentration. Sie verschiebt sich wie in Abb. 22 zu sehen, zu deutlich höheren Temperaturen und weist mehrere zusätzliche Kuppeln und eine starke Verbreiterung des Peaks auf.

Mit Lys-7 getestete Liposomen haben ihre Phasenübergangstemperatur zwischen 42,41°C und 43,26°C. Diese steigt, wie bei allen getesteten Liposomen, mit Höhe der Molprozentigkeit der Oligopeptide. Eine starke Verbreiterung des Peaks war bei Zusatz von 20 und 30 Mol% zu erkennen. Die höchste Lysin-7 Konzentration zeigt zahlreiche zusätzliche Schultern und eine starke Verbreiterung des Peaks (siehe Abb. 23).

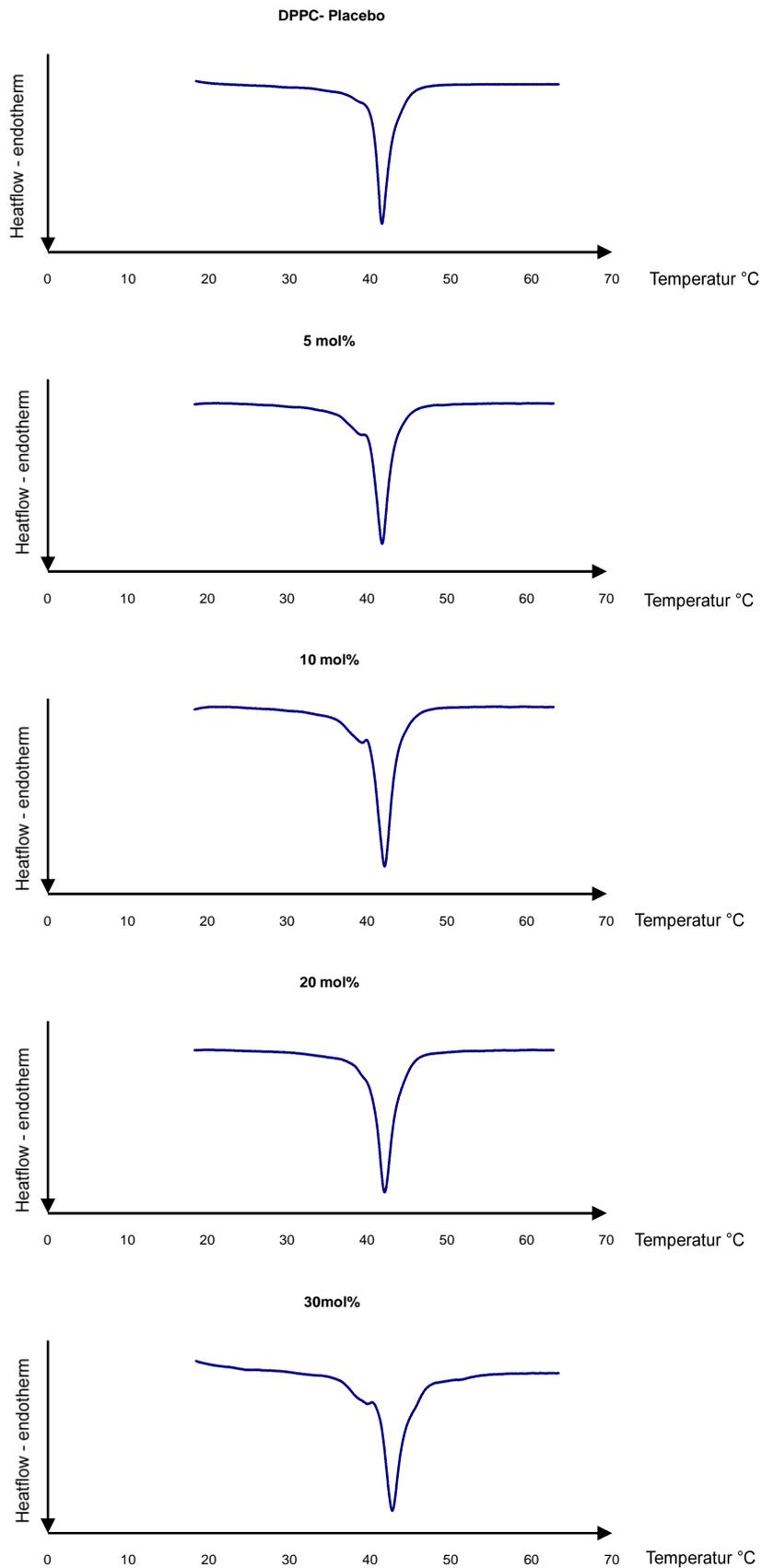


Abbildung 21: Einfluss von Lys-3 in 5, 10, 20, 30 Mol% auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu Placebo DPPC-Liposomen

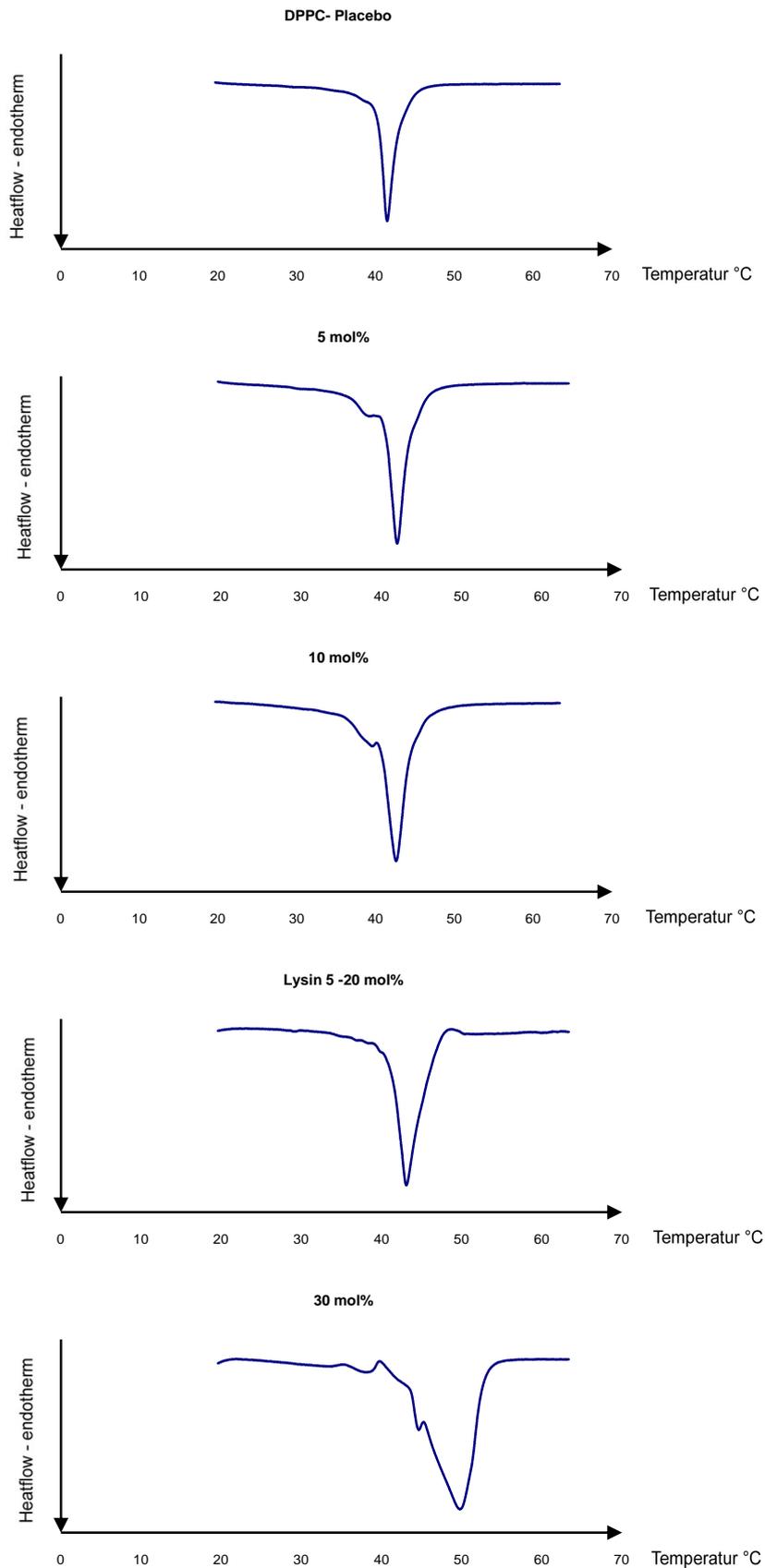


Abbildung 22: Einfluss von Lys-5 in 5, 10, 20, 30 Mol% auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu Placebo DPPC-Liposomen

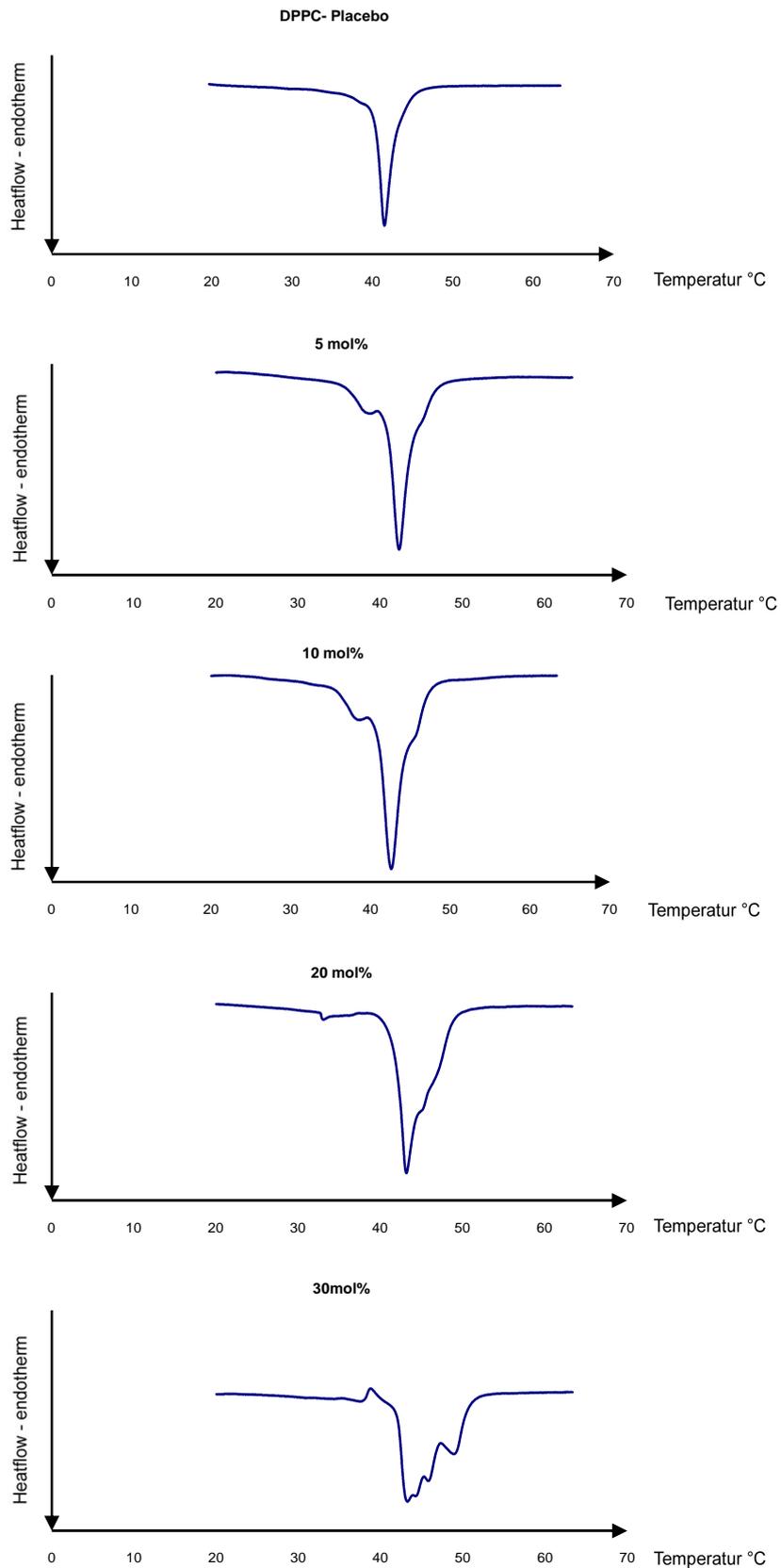


Abbildung 23: Einfluss von Lys-7 in 5, 10, 20, 30 Mol% auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu Placebo DPPC-Liposomen

Bei den Liposomen mit Lys-9 sind deutlich höhere Hauptphasenübergangstemperaturen (siehe Abb. 24) zu erkennen. Interessanterweise ist diese Phasenübergangstemperatur bei der niedrigeren Konzentration höher als bei den 20 Mol%-igen Liposomen. Die Peaks sind sehr breit und die zusätzlichen Schultern weisen auf starke Wechselwirkungen hin.

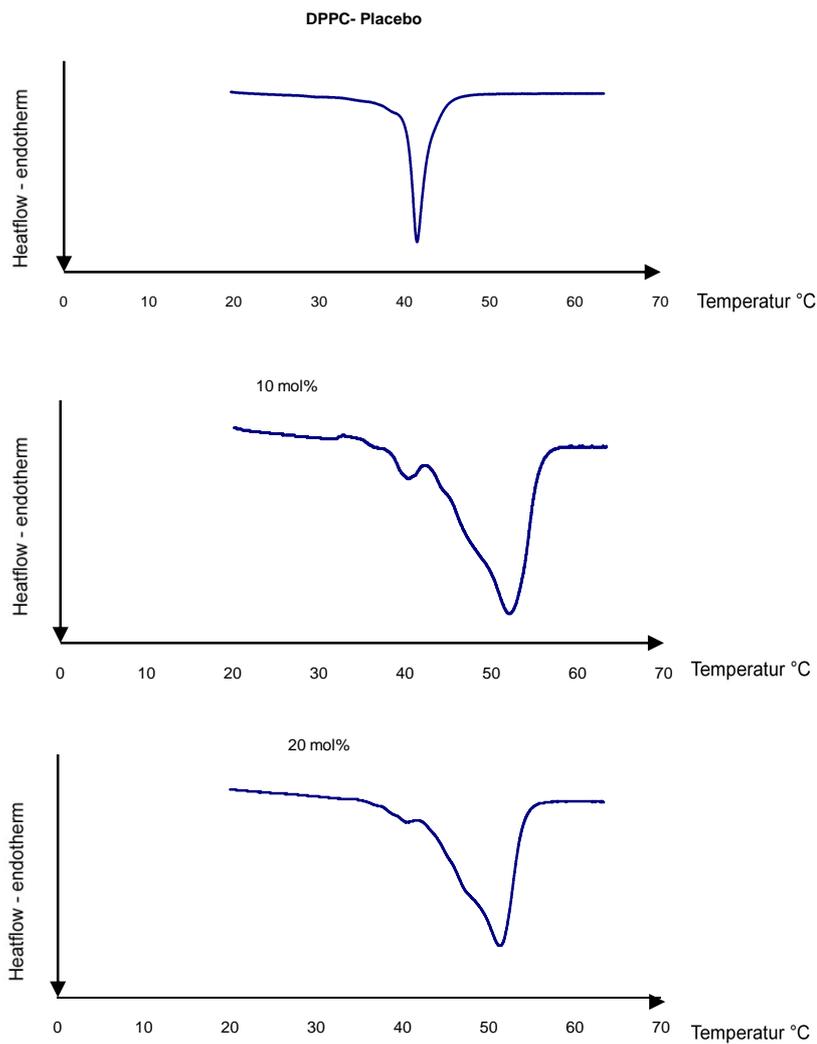


Abbildung 24: Einfluss von Lys-9 in 10 und 20 Mol% auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu Placebo DPPC-Liposomen

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, verändert sich die Hauptphasenübergangstemperatur bei den Liposomen in die das Peptid A1 in 10 Mol%-iger Konzentration eingearbeitet ist zu niedrigeren Temperaturen verglichen mit Placebo-Liposomen und bei Einarbeitung von 20 Mol% A1 zu höheren Temperaturen. In Abb. 25 ist deutlich zu sehen, dass eine Einarbeitung von 10 oder 20 Mol% die Hauptphasenübergangstemperatur zu hohen Werten aber nur geringfügig verschiebt. Interessant sind dabei die Kurvenformen.

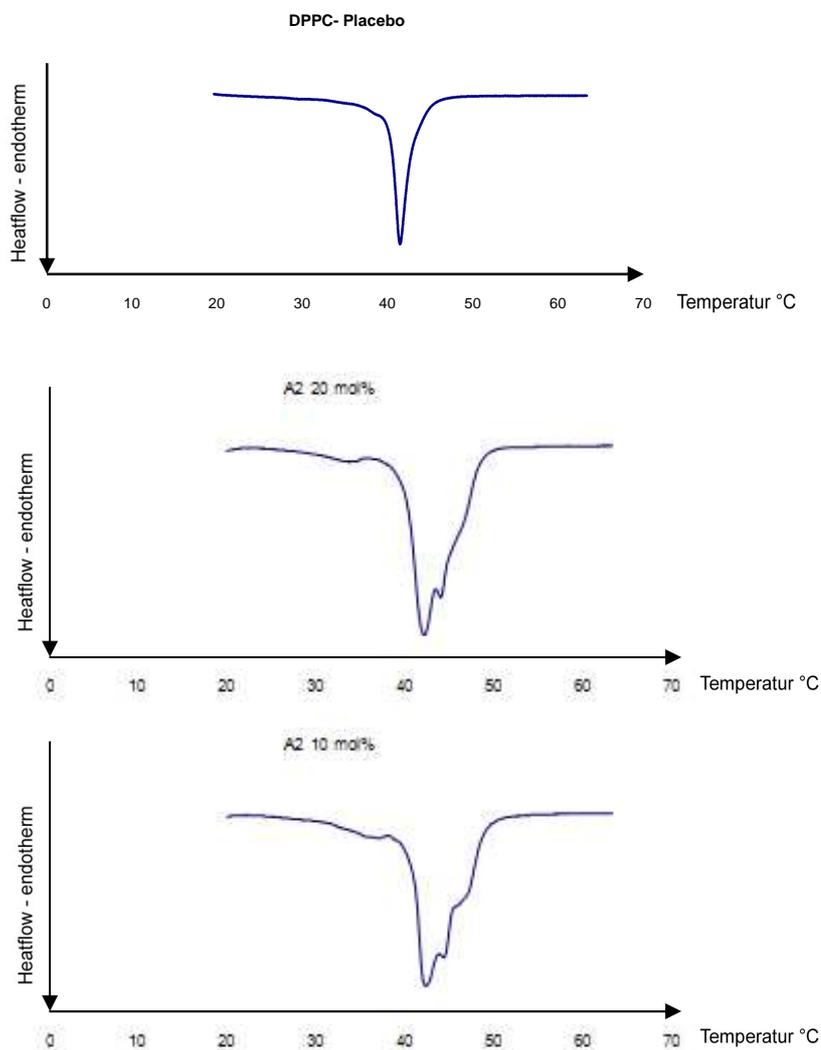


Abbildung 25: Einfluss von A2 in 10 und 20 Mol% auf die Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen im Vergleich zu Placebo DPPC-Liposomen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in den untersuchten Liposomen, in die Peptide inkorporiert waren die Haupttransformationstemperatur ( $T_{max}$ ) zu höheren Temperaturen verschoben wurde, mit Ausnahme von A1 10 Mol%, in diesem Fall wurde sie, zu niedrigeren Temperaturen verschoben.

Tabelle 2: Phasenübergangstemperaturen und Enthalpie, n=3

	$T_{max}$	Onset Peak °C	Enthalpie kJ/mol
Placebo/ Prä	34,37 ± 0,25	33,57 ± 0,62	30,31 ± 0,23
Placebo/Haupt	41,42 ± 0,05	40,11 ± 0,10	30,67 ± 0,43
Lys-3 5 Mol%	41,85 ± 0,02	40,12 ± 0,03	33,54 ± 4,21
10 Mol%	42,19 ± 0,04	40,14 ± 0,04	35,67 ± 2,95
20 Mol%	42,09 ± 0,10	40,45 ± 0,13	33,33 ± 0,95
30 Mol%	42,49 ± 0,20	37,72 ± 4,87	32,53 ± 6,25
Lys-5 5 Mol%	41,92 ± 0,04	40,26 ± 0,05	39,77 ± 6,04
10 Mol%	42,42 ± 0,12	40,22 ± 0,03	37,61 ± 0,73
20 Mol%	43,13 ± 0,03	41,26 ± 0,37	25,46 ± 3,29
30 Mol%	49,92 ± 0,15	43,31 ± 0,11	42,07 ± 1,45
Lys-7 5 Mol%	42,41 ± 0,15	40,67 ± 0,03	31,76 ± 3,00
10 Mol%	42,51 ± 0,21	40,61 ± 0,08	38,10 ± 0,70
20 Mol%	43,28 ± 0,11	41,94 ± 0,18	40,22 ± 1,04
30 Mol%	43,26 ± 0,02	42,00 ± 0,03	40,32 ± 1,21
Lys-9 10 Mol%	52,25 ± 0,57	46,17 ± 0,77	42,18 ± 1,15
20 Mol%	51,84 ± 0,48	44,29 ± 1,27	51,05 ± 8,82
A1 10 Mol%	38,51 ± 4,57	38,72 ± 0,09	38,66 ± 4,76
20 Mol%	41,56 ± 0,49	38,81 ± 0,50	41,44 ± 0,84
A2 10 Mol%	42,36 ± 0,04	40,74 ± 0,04	40,46 ± 0,71
20 Mol%	42,15 ± 0,05	39,93 ± 0,10	42,57 ± 2,35

## 5 Diskussion

Die gemessene Teilchengröße der entwickelten Liposomen veränderte sich durch die Inkorporation der Lysinderivate zu kleineren Werten und blieb während der gesamten Untersuchungszeit im gleichen Größenbereich.

Es konnten reproduzierbare Liposomen hergestellt werden. Als Beweis dient ein PDI von 0,2. Dabei handelt es sich um eine sehr kleine Breite der Größenverteilung. Zur Betrachtung der physikalischen Stabilität wurden auch die beladenen Liposomen herangezogen. Dabei sollte es weder zu einer Aggregation der Vesikel noch zu einer Freisetzung von verkapseltem Material kommen. Sind Liposomen an ihrer Oberfläche neutral und sehr groß, ist die Membrankrümmung nicht sehr ausgeprägt. Das kann dazu führen, dass bei Annäherung von Vesikeln die fast planaren Bereiche durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen stark angezogen werden und in weiterer Folge die Teilchen zusammenfließen und aggregieren. Dadurch sedimentieren die entstanden Gebilde leichter [10].

Die bei der mikrokolorimetrischen Vermessung ermittelten Phasenübergangstemperaturen für DPPC, nämlich der Prä-Transition bei 34,5°C und der Hauptphasenübergang bei 41,4°C stimmen mit den Werten aus der Literatur überein [17]. Die beobachteten Unterschiede zwischen den entwickelten DPPC-Placebo-Liposomen und den mit Lysinderivaten beladenen DPPC-Liposomen lassen darauf schließen, dass sich diese im hydrophilen Kern oder an der hydrophilen Oberfläche einlagern.

Auffallend unterschiedlich geformte Peaks sind bei Lys-5- und Lys-7-haltigen Liposomen in jeweils 30 Mol% zu sehen (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Die Peaks sind im Unterschied zu den Liposomen mit niedrigerem Gehalt an Peptid breiter und haben zusätzliche Schultern. Diese könnten daraufhin hinweisen, dass sich neue Strukturen gebildet haben oder spezielle Wechselwirkungen auftreten. Bei Liposomen mit Lys-9 ist die Verschiebung der Hauptübergangstemperatur zu höheren Temperaturen am höchsten (siehe Abb. 24). Die Inkorporation der Polypeptide A1 und A2 führt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während sich die Hauptphasenübergangstemperatur bei Zusatz von 10 Mol% A1 zu niedrigeren Temperaturen im Vergleich zum Placebo

verschoben hat (siehe Abb. 20), sind die Hauptübergangstemperaturen der Liposomen mit höherer Konzentration von A1 und A2 einander sehr ähnlich. Die Kurven zeigen aber ein sehr unterschiedliches Aussehen. Diese sind bei Zusatz von A2 wesentlich breiter und weisen zusätzliche Schultern auf (siehe Abb. 25). Dabei ist interessant, dass die räumlichen Strukturen der beiden ähnlichen Peptide aufgrund der hier enthaltenen Ergebnisse sehr unterschiedlich sein müssen. Neben den beiden Polypeptiden ist auch das Nonapeptid Lys-9 von Bedeutung und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Es wäre interessant, weitere Informationen z.B. aus NMR-Studien über die räumliche Anordnung dieser Peptide zu erlangen.

Bereits ab 5 Mol% Lys-3 zeigen sich 2 Peaks. Der Hauptpeak wird jedoch zu höheren Temperaturen verschoben. Das Auftreten eines 2. Peaks deutet auf die Bildung eines Aggregats so wie auf eine laterale Phasentrennung von Peptid-Phospholipid unter Bildung von lysinreichen Domänen hin. Diese Bildung lässt sich eventuell durch stärkere Wechselwirkungen der Lysin-derivate und Lipidmoleküle in den Membranen erklären. In diesem Zustand sind die untersuchten Peptide in DPPC unmischbar.

Aufgrund der beschriebenen Resultate ergaben sich zwei Gruppen, nämlich die Gruppe 1 mit Lys-3, Lys-5, Lys-7 und die Gruppe 2 mit Lys-9, Polypeptide A1 und A2. Daher war es von Interesse eine Korrelation von  $T_{max}$  und der Enthalpie jeweils zur Menge an inkorporierten Peptidderivat zu erstellen.

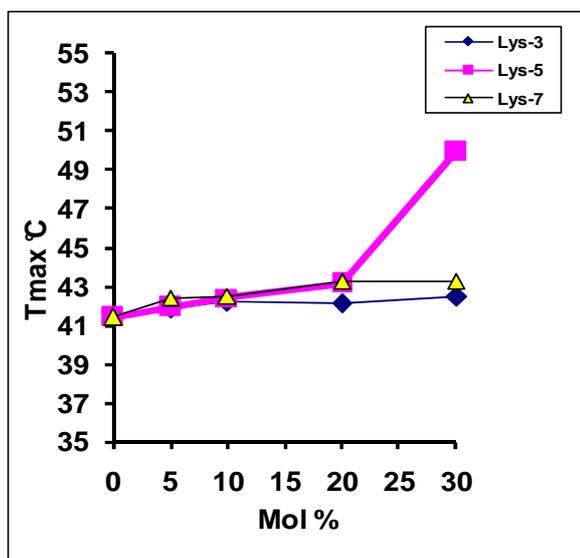


Abbildung 26: Einfluss der inkorporierten Lysin-derivate auf die Hauptübergangstemperatur

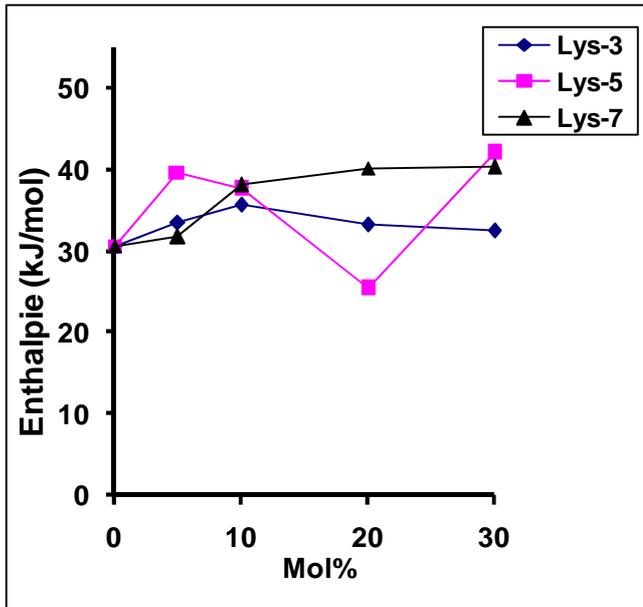


Abbildung 27: Einfluss der inkorporierten Lysinderivate auf die Enthalpie des Hauptphasenübergangs

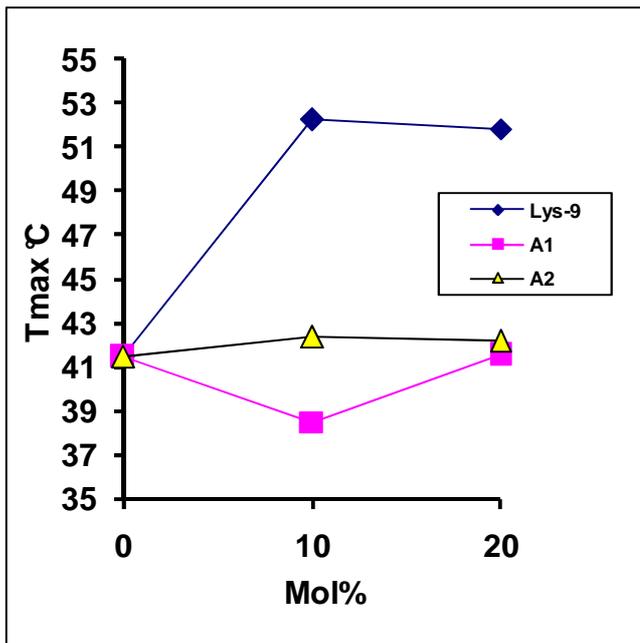


Abbildung 28: Einfluss der inkorporierten Lysinderivate auf die Hauptübergangstemperatur

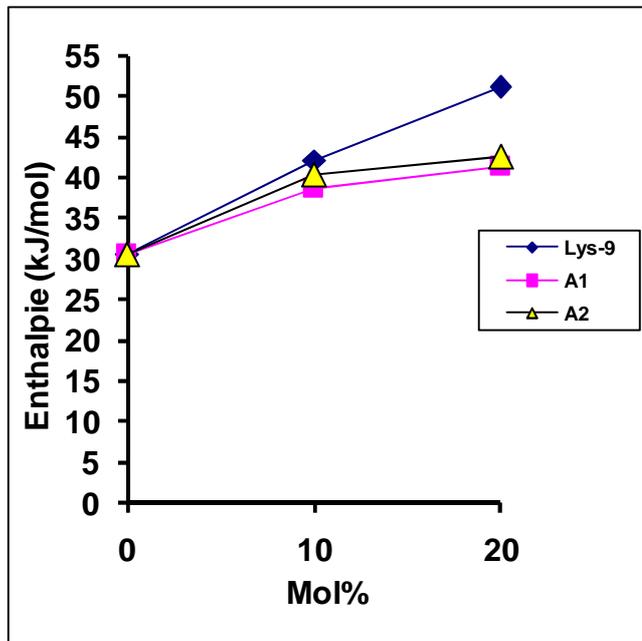


Abbildung 29: Einfluss der inkorporierten Lysinderivate auf die Enthalpie des Hauptphasenübergangs

#### Gruppe 1 Lys-3, Lys-5, Lys-7 (Abb. 26, Abb. 27)

Mit Ausnahme der Einarbeitung von 30 Mol% Lys-5 bleibt das Verhältnis von  $T_{\max}$  zur Peptidmenge annähernd konstant (siehe Abb. 26). Bei der Korrelation der Enthalpie gegen die eingearbeitete Menge Lysinderivat können keine Abhängigkeiten abgelesen werden.

#### Gruppe 2 Lys-9, Polypeptid A1 und A2 (Abb. 28, Abb. 29)

In Abb. 29 ist erkennbar, dass je mehr Lys-9 in den Liposomen eingearbeitet ist desto höher ist die Enthalpie der Phasenübergangstemperatur. Es ergibt sich in diesem Fall eine annähernd lineare Korrelation. Hingegen bei Einarbeitung der beiden Polypeptide A1 und A2 ergibt sich keine lineare Abhängigkeit. Bei einem Vergleich von  $T_{\max}$  gegen die Menge an eingearbeitetem Peptid zeigt sich im Falle von A2 ein Gleichbleiben von  $T_{\max}$ , unabhängig von der eingearbeiteten Menge. Demgegenüber führt eine Einarbeitung von Lys-9 oder A1 zu keiner Korrelation (siehe Abb. 28).

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten physikalisch stabile DPPC Liposomen hergestellt werden, die in weiterer Folge als Modellmembranen für Interaktionsstudien mit ausgewählten Lysinderivaten dienen sollten. Dazu wurden - nach Entwicklung und Optimierung der Herstellungsmethode - 2,5 Mol%-ige DPPC-Liposomen mittels Hochdruckhomogenisator hergestellt. Danach wurden die Teilchengröße, das Zetapotential und der PDI 3 Wochen lang vermessen.

Die Teilchengrößen bewegten sich von 100 bis 118 nm. Das Zetapotential lag zwischen +9 und +26 und der PDI bei 0,2. Die angestrebten physikalisch stabilen Liposomen konnten somit hergestellt werden. In die stabilen DPPC-Liposomen wurden die Lysinderivate in unterschiedlichen Mengen inkorporiert. Auch von diesen Produkten wurden jeweils die Teilchengröße, das Zetapotential und der PDI bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Teilchengröße nach Einarbeitung der Lysinderivate annähernd stabil blieb und im Bereich von 85 bis 117 nm lag.

Bei den thermoanalytischen Untersuchungen wurden die DPPC-Liposomen als Placebo-Liposomen verwendet. Folgende Lysinderivate wurden in unterschiedlichen Konzentration eingearbeitet: Lys-3, Lys-5, Lys-7, Lys-9 und 2 Polypeptide aus Alanin und Lysin. Von allen sind mikrokalorimetrische Untersuchungen zwischen 15°C- 65°C durchgeführt und Thermo-Kurven aufgezeichnet worden. Von der Hauptübergangstemperatur wurde auch die Enthalpie berechnet.

Placebo-DPPC-Liposomen haben einen charakteristischen Vorphasenübergang bei 34,5°C und einen Hauptphasenübergang bei 41°C. Die Einarbeitung aller Oligopeptide mit Ausnahme von A1 führte zu einer Erhöhung der Phasenübergangstemperatur. Dabei handelte es sich um endotherme Phasenübergänge. Die höchste Temperaturänderung zu höheren Temperaturen wurde mit Lys-9 erzielt. Die Form des Peaks der Phasenübergangstemperatur bei Lys-9 ist mit zahlreichen Schultern versehen. Alle eingearbeiteten und untersuchten Lysine haben eine Änderung der charakteristischen Phasenübergangstemperatur gezeigt. Das deutet auf

Wechselwirkungen mit den Modellmembranen hin. Da die größten Unterschiede in den Thermokurven zu den Placebo-DPPC-Liposomen in Lys-9 und Polypeptid A2-hältigen Liposomen beobachtet werden konnten, wäre es für zukünftige Studien interessant, zu untersuchen, ob diese beiden Komponenten einen positiven Einfluss auf die Hautpermeation ausgewählter Modellarzneistoffe ausüben könnten.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

Für die nachfolgende Tabelle wurden die Messungen aller drei Chargen herangezogen, daraus ergibt sich n=9.

Tabelle 3: Vergleich der Teilchengröße von DPPC Placebo Liposomen

<b>Tage</b>	<b>Ch. 1</b>	<b>Ch. 2</b>	<b>Ch. 3</b>
<b>0</b>	113,33 ± 1,53	103,33 ± 0,58	99,33 ± 4,04
<b>3</b>	111,67 ± 3,79	108,33 ± 3,37	100,67 ± 2,52
<b>5</b>	104,67 ± 3,21	105,00 ± 4,58	101,00 ± 4,58
<b>6</b>	107,00 ± 1,00	106,67 ± 2,89	101,33 ± 3,06
<b>10</b>	107,33 ± 5,51	113,33 ± 4,62	103,33 ± 0,58
<b>13</b>	108,00 ± 2,11	107,67 ± 3,21	107,67 ± 5,86
<b>15</b>	108,00 ± 4,36	107,33 ± 3,06	97,67 ± 1,53
<b>18</b>	109,33 ± 3,21	107,33 ± 3,51	118,27 ± 2,22
<b>22</b>	103,00 ± 2,00	106,13 ± 1,07	103,53 ± 4,69
<b>26</b>	103,33 ± 2,08	110,20 ± 8,48	98,52 ± 1,97
<b>31</b>	104,50 ± 4,20	108,23 ± 7,09	97,19 ± 2,34
<b>35</b>	107,00 ± 6,16	105,73 ± 3,96	101,49 ± 2,57
<b>42</b>	105,63 ± 2,70	107,80 ± 2,25	95,06 ± 1,33
<b>50</b>	103,57 ± 1,16	100,97 ± 2,67	100,90 ± 1,45
<b>60</b>	102,60 ± 1,82	107,00 ± 3,54	102,30 ± 4,14

Für die Teilchengröße- und Zetapotentialmessungen mit den unterschiedlichen Lysinen ergibt sich  $n=3$

Alle Teilchengrößen sind in Nanometer angegeben, alle Zetapotentiale in mV.

Tabelle 4: Einfluss von Lys-3 auf die Teilchengröße in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>20 mol%</b>	<b>30 mol%</b>
<b>1</b>	95,89 ± 3,74	94,25 ± 4,46	112,50 ± 3,52	94,39 ± 1,46
<b>3</b>	105,27 ± 1,37	96,65 ± 6,90	117,10 ± 3,05	93,79 ± 2,10
<b>7</b>	98,30 ± 2,10	92,65 ± 3,47	114,63 ± 4,82	91,11 ± 2,58
<b>14</b>	91,90 ± 3,88	91,24 ± 3,90	115,10 ± 1,84	94,84 ± 1,50
<b>21</b>	100,56 ± 8,44	93,64 ± 2,50	108,23 ± 5,11	96,70 ± 2,99
<b>27</b>	76,97 ± 0,23	92,18 ± 2,87	112,57 ± 2,86	95,62 ± 0,93

Tabelle 5: Einfluss von Lys-5 auf die Teilchengröße in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>20 mol%</b>	<b>30 mol%</b>
<b>1</b>	98,94 ± 0,38	95,43 ± 4,80	97,50 ± 0,10	95,12 ± 0,50
<b>3</b>	96,21 ± 1,45	96,28 ± 3,60	100,06 ± 3,90	95,49 ± 1,40
<b>7</b>	95,53 ± 4,83	97,11 ± 1,00	100,78 ± 3,40	93,36 ± 1,60
<b>14</b>	95,13 ± 1,44	96,77 ± 1,40	98,62 ± 3,70	96,71 ± 4,00
<b>21</b>	93,10 ± 1,41	95,40 ± 8,50	98,62 ± 3,70	95,29 ± 1,80
<b>27</b>	95,07 ± 1,25	94,17 ± 1,80	93,85 ± 4,80	94,98 ± 1,20

Tabelle 6: Einfluss von Lys-7 auf die Teilchengröße in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>20 mol%</b>	<b>30 mol%</b>
<b>1</b>	88,91 ± 1,50	88,90 ± 1,50	91,07 ± 1,40	91,82 ± 0,50
<b>3</b>	96,57 ± 0,90	85,84 ± 0,50	92,73 ± 2,60	91,85 ± 2,30
<b>7</b>	94,80 ± 1,00	87,03 ± 1,00	92,15 ± 2,00	91,12 ± 1,80
<b>14</b>	88,91 ± 1,50	86,91 ± 0,20	92,74 ± 1,30	91,07 ± 1,40
<b>21</b>	86,61 ± 0,50	86,01 ± 0,60	92,01 ± 2,20	93,78 ± 2,10
<b>27</b>	86,92 ± 1,10	88,49 ± 4,10	91,34 ± 2,00	91,56 ± 1,10

Tabelle 7: Einfluss von Lys-3 auf das Zetapotential in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 Mol%</b>	<b>10 Mol%</b>	<b>20 Mol%</b>	<b>30 Mol%</b>
<b>1</b>	12,60 ± 0,61	19,50 ± 0,89	15,97 ± 0,35	26,23 ± 1,25
<b>3</b>	13,90 ± 0,61	17,70 ± 0,10	16,57 ± 0,64	25,17 ± 1,10
<b>7</b>	9,10 ± 0,09	16,53 ± 0,15	18,70 ± 2,29	25,17 ± 1,10
<b>14</b>	13,30 ± 0,10	18,70 ± 0,53	18,33 ± 3,76	20,53 ± 1,66
<b>21</b>	14,13 ± 1,20	20,10 ± 1,21	20,23 ± 1,76	22,23 ± 1,40
<b>27</b>	12,30 ± 0,44	17,63 ± 0,67	16,43 ± 0,64	17,83 ± 0,93

Tabelle 8: Einfluss von Lys-5 auf das Zetapotential in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 Mol%</b>	<b>10 Mol%</b>	<b>20 Mol%</b>	<b>30 Mol%</b>
<b>1</b>	15,43 ± 1,11	21,83 ± 0,91	15,40 ± 1,25	14,80 ± 0,78
<b>3</b>	14,77 ± 2,70	20,67 ± 0,83	16,77 ± 0,35	17,27 ± 0,67
<b>7</b>	13,80 ± 0,36	15,80 ± 0,70	16,50 ± 0,26	15,90 ± 0,95
<b>14</b>	14,50 ± 1,05	19,63 ± 1,12	16,57 ± 0,51	14,80 ± 0,78
<b>21</b>	13,27 ± 0,67	15,37 ± 0,21	16,03 ± 0,72	13,33 ± 0,85
<b>27</b>	14,97 ± 0,45	17,67 ± 1,16	12,17 ± 0,32	13,50 ± 0,89

Tabelle 9: Einfluss von Lys-7 auf das Zetapotential in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 Mol%</b>	<b>10 Mol%</b>	<b>20 Mol%</b>	<b>30 Mol%</b>
<b>1</b>	12,30 ± 0,75	18,97 ± 0,85	17,43 ± 0,71	15,40 ± 0,62
<b>3</b>	12,40 ± 0,44	16,27 ± 1,00	16,37 ± 1,07	16,83 ± 0,86
<b>7</b>	12,30 ± 0,82	16,87 ± 0,78	18,77 ± 0,31	16,43 ± 0,65
<b>14</b>	12,63 ± 2,42	18,57 ± 2,50	19,70 ± 1,11	19,57 ± 1,26
<b>21</b>	10,38 ± 0,82	17,53 ± 0,12	15,47 ± 0,96	17,37 ± 0,61
<b>27</b>	11,77 ± 0,31	15,33 ± 0,90	15,37 ± 0,55	15,20 ± 0,46

Tabelle 10: PDI von Placebo DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>Ch. 1</b>	<b>Ch. 2</b>	<b>Ch. 3</b>
<b>0</b>	0,25 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,00
<b>3</b>	0,20 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,26 ± 0,02
<b>5</b>	0,23 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,23 ± 0,02
<b>6</b>	0,24 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,01
<b>10</b>	0,23 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,25 ± 0,01
<b>13</b>	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,20 ± 0,01
<b>15</b>	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,00	0,23 ± 0,01
<b>18</b>	0,30 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,04
<b>22</b>	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,19 ± 0,02
<b>26</b>	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,19 ± 0,02
<b>31</b>	0,25 ± 0,00	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,01
<b>35</b>	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,32 ± 0,01
<b>42</b>	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,21 ± 0,00
<b>50</b>	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02
<b>60</b>	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,03

Tabelle 11: PDI von Lys-3 in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>20 mol%</b>	<b>30 mol%</b>
<b>1</b>	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01
<b>3</b>	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02
<b>7</b>	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,15 ± 0,01
<b>14</b>	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,01
<b>21</b>	0,19 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<b>27</b>	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,00

Tabelle 12: PDI von Lys-5 in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>20 mol%</b>	<b>30 mol%</b>
<b>1</b>	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,13 ± 0,01
<b>3</b>	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01
<b>7</b>	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,13 ± 0,00
<b>14</b>	0,24 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01
<b>21</b>	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,00
<b>27</b>	0,17 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,12 ± 0,01

Tabelle 13: PDI von Lys-7 in DPPC-Liposomen

<b>Tage</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>20 mol%</b>	<b>30 mol%</b>
<b>1</b>	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,01
<b>3</b>	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
<b>7</b>	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01
<b>14</b>	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,00
<b>21</b>	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01
<b>27</b>	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] B. Herbsthofer, Einfluss verschiedener Lysine auf die Hautpermeation von Natrium Fluorescein. Diplomarbeit, Universität Wien 2008
  
- [2] R.H. Guy, J. Hadgraft, Transdermal Drug Delivery, Dekker Verlag, New York–Basel 1989
  
- [3] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731 (1972)
  
- [4] A. Lehninger, D.L. Nelson, M. Cox, Prinzipien der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 1994
  
- [5] H. Heller, M. Schäfer, K. Schulten, *J Phys. Chem.* 97, 8343 (1993)  
<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d22/22.htm>, 10.11.2008
  
- [6] D.C. Swartzendruber, K.W. Wertz, K.C. Madison, D.T. Downing, Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J. Invest. Dermatol.* 88, 709-713 (1987)
  
- [7] P.W. Wertz, M.C. Miethke, S.A. Long, J.S. Strauss, D.T. Downing, The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J. Invest. Dermatol.* 84, 410-412 (1985)

- 
- [8] B.G. Auner, M.A.A. O'Neil, C. Valenta, J. Hadgraft, Interaction of phloretin and 6-ketocholestanol with DPPC liposomes as phospholipid model membranes. *Int. J. Pharm.* 294, 149 – 155 (2005)
- [9] L. Kalie, Einfluss des Serum-Komplementsystems auf die Permeabilität von Liposomenmembranen. Dissertation, Universität Freiburg 2006
- [10] D. Gutmayer, Synthese eines Polymerskeletts in Liposomen über pH-abhängige Membranadsorption von Monomeren. Dissertation, Universität Freiburg 2004
- [11] Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Auflage Walter de Gruyter Berlin–New York 2004
- [12] R. Schubert, Liposomen in Arzneimitteln. in: Pharmazeutische Technologie Moderne Arzneiformen, 2. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart. 1998
- [13] K. Winkler, Durch Hochdruck-Homogenisation gewonnene Mistelpräparate, Charakterisierung der Membranvesikel und deren Wechselwirkung mit aktiven Inhaltsstoffen. Dissertation, Universität Freiburg 2004
- [14] LivOn Laboratories. Liposomes: what they are, what they do, how they are made? (2006) <http://www.livonlabs.com/liposomes.html>, 11.10.2008

- 
- [15] M. Gantert, Glucose-Oxidase-Liposomen zur Therapie der Septischen Granulomatose: aktives Drug Targeting mit liposomal gekoppelten IgG Antikörpern. Dissertation, Universität Freiburg 2007
- [16] A.M. Wolka, J.H. Rytting, B.L. Reed, B.C. Finnin, The interaction of the penetration enhancer DDAIP with a phospholipid model membrane. *Int. J. Pharm.* 271, 5-10 (2004)
- [17] B. Klajnert, J. Janiszewska, Z. Urbanczyk-Lipowska, M. Bryszewska, R.M. Epand, DSC studies on interactions between low molecular mass peptide dendrimers and model lipid membranes. *Int. J. Pharm.* 327, 145-152 (2006)
- [18] A.Sperger, Einfluss verschiedener Zuckertenside in Lecithin-Nanoemulsionen auf das physikalisch- chemische Verhalten und die Haut-Diffusion von Fludrocortisonacetat. Diplomarbeit, Universität Wien 2008
- [19] G. Ecker, Emerging Focus Pharmacoinformatics - Vorlesungsskriptum 2005. Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien (2003)
- [20] B. Biruss, Neue Vehikel zur optimalen Hautpenetration/Permeation für an der Haut angewendete Hormone. Dissertation, Universität Wien 2007

## 9 Lebenslauf

Name: Barbara Ranftl  
Geburtsdatum: 16.08.1980  
Geburtsort: Klosterneuburg

### Ausbildung

1986-1990 Volksschule Echtsenbach, NÖ  
1990-1994 Privathauptschule Zwettl, NÖ  
1994 -1997 Fachschule für wirtschaftliche Berufe mit  
Abschlussprüfung  
1997-2000 Lehre zur Pharmaz.kaufm.Assistentin in der Alten  
Hofmühl Apotheke, Lehrabschlussprüfung mit  
ausgezeichneten Erfolg  
2000 - 2002 Tätigkeit als PKA in der Alten Hofmühl Apotheke  
Juli 2002 Absolvierung der Berufsreifeprüfung  
Seit Okt. 2002 Studium der Pharmazie

### Studienbegleitende Tätigkeiten

Bis 2003 Alte Hofmühl Apotheke, 6.Wien  
Seit 2004 Apotheke zum heiligen Josef, 2.Wien  
Aug. 2007 Summerschool in Beijing/China – Chines.  
Arzneipflanzen und Drogen der TCM -3 Wochen  
(Department für Pharmakognosie)  
SS 08 und WS 08/09 Tutorium für die Übungen zur Magistralen  
Arzneimittelherstellung (Department für  
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie)

### Sonstige Kenntnisse:

Fremdsprachen: Englisch