

Hydrophobe und hydrophile Beladung polymerer Vesikel

Dissertation

zur Erlangung des Grades
'Doktor der Naturwissenschaften'
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Waltraut Müller

geboren in Frankfurt am Main



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 16. Oktober 2006 bis zum 1. Oktober 2009 am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag der 13. November 2009

Chem Is Try

Kurzfassungen

Hydrophobe und hydrophile Beladung polymerer Vesikel

Polymere Vesikel, gebildet durch Selbstorganisation des amphiphilen Blockcopolymers Polybutadien-b-Polyethylenoxid in Wasser, wurden in der vorliegenden Arbeit erfolgreich mit hydrophoben und hydrophilen Substraten beladen und detailliert charakterisiert. Über verschiedene Präparationsmethoden sind unilamellare PB₁₃₀-PEO₆₆-Vesikel unterschiedlicher Größen und Verteilungsbreiten zugänglich, die aber alle eine konstante hydrophobe Schalendicke von etwa 15nm aufweisen, wie aus TEM-Messungen hervorgeht. Die hydrophoben Farbstoffe Oil Red EGN, Oil Blue N, Nilrot sowie ein Perylen-Derivat wurden in diese hydrophobe Schale eingelagert. Durch Absorptions-, Emissions-, (cryo)TEM- und Fluoreszenzmikroskopie-Messungen konnte gezeigt werden, dass die selbstorganisierte Struktur durch die Einlagerung der hydrophoben Farbstoffe in die Schale nicht beeinflusst wird. Als zusätzliche hydrophobe Modell-Substrate wurden Halbleiter-Nanokristalle, sogenannte Quantum Dots (QDs, $\langle d \rangle = 5.7\text{nm}$), erfolgreich in die polymere Vesikelschale eingelagert und durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) in Kombination mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) nachgewiesen. Die Position der QDs in der Mitte der polymeren Doppelmembran konnte durch cryogene TEM-Abbildungen aufgezeigt werden. Darüber hinaus wurde die hydrophile Beladung des Vesikelkerns mit dem wasserlöslichen Farbstoff Phloxin B erfolgreich realisiert.

Hydrophobic and hydrophilic loading of polymeric vesicles

The successful encapsulation of hydrophobic and hydrophilic substrates into poly(butadiene)-poly(ethylene oxide) vesicles in water is reported. Furthermore, the detailed characterization of these systems is presented. Different preparation methods were used to obtain unilamellar vesicles of PB₁₃₀-PEO₆₆ with different vesicle sizes and distributions. However, for all vesicles a common hydrophobic shell thickness of about 15nm was assembled as determined by TEM. The hydrophobic dyes Oil Red EGN, Oil Blue N, Nile Red and a Perylen derivative were embedded into this hydrophobic shell. Absorption-, emission-, (cryo)TEM- and fluorescence microscopy-measurements showed the self-assembled structure to remain unchanged when the hydrophobic substrates are incorporated within the vesicle shell. Highly fluorescent semiconductor nanocrystals, so called quantum dots (QDs, $\langle d \rangle = 5.7\text{nm}$), were selected as additional hydrophobic model substrates and successfully enclosed into the vesicle shell, as evidenced by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements in combination with dynamic light scattering (DLS). Cryogenic TEM imaging revealed the position of the QDs, centered inside the double layer of the vesicle shell. Furthermore, we successfully studied the hydrophilic loading into the vesicle core using the hydrophilic dye Phloxine B.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Beladung polymerer Vesikel. Diese Vesikel werden durch Selbstorganisation des amphiphilen Blockcopolymers Polybutadien-block-Polyethylenoxid (PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH) im für PEO selektiven Lösemittel Wasser gebildet und bestehen aus einer polymeren Doppelmembran als Vesikelschale, die den wassergefüllten Vesikelkern von der Umgebungslösung abtrennt.

Abhängig von der Präparationsmethode sind Vesikel in unterschiedlichen Größen und Größenverteilungen zugänglich. Die Verwendung von THF als Co-Lösemittel, in dem das Polymer zunächst gelöst wird, ermöglicht bei der anschließenden Wasserzugabe über die Tropfgeschwindigkeit die Vesikelgröße zu kontrollieren. Wasserzugabe mit einer Geschwindigkeit von 1ml/h führt zu Vesikeln mit mittlerer Größe um $d \approx 90\text{nm}$, während eine deutlich schnellere Zugabe mit 70ml/h kleine Vesikel mit $d \approx 50\text{nm}$ liefert. Die Vesikelgrößen sind bei Verwendung dieser Methode eng verteilt um die jeweiligen Mittelwerte. Werden die Vesikel stattdessen durch Rehydrierung eines trockenen Polymerfilms präpariert, erhält man eine Lösung mit einer breiten Größenverteilung von Vesikeln mit Durchmessern von 50nm bis hin zu etwa 5 μm . Diese Methode ermöglicht keine Größenkontrolle.

Anhand von Modell-Substraten wurde die Möglichkeit der hydrophoben Beladung der etwa 15nm dicken Polybutadien-Domäne der Vesikelschale untersucht. Hauptinteresse bestand an Systemen, die eine eindeutige Charakterisierung der Beladung ermöglichen.

Als hydrophobe Modell-Substrate aus dem molekularen Größenbereich wurden hydrophobe, wasserunlösliche Farbstoffe in die Vesikelschale eingelagert. Die Präparation beladener Lösungen erfolgte ausgehend von Substrat/Polymer-Mischungen analog der Vesikelpräparation. Sowohl über die Co-Lösemittelmethode als auch durch Filmrehydrierung konnten so beladene Vesikel für die Farbstoffe Oil Red EGN (ORE), Nilrot (NR) sowie für ein Perylen-Derivat (P) erhalten werden. Der Nachweis erfolgte spektroskopisch über Messung der Absorption sowie im Falle der fluoreszierenden Farbstoffe NR und P über Emissionsspektren. Analoge Blindproben in denen kein Copolymer vorhanden war bzw. dieses durch reines PEO ersetzt wurde zeigten, dass beladene Lösungen nur in Anwesenheit des Copolymers möglich waren. Ohne Polymer bzw. nur mit dem hydrophilen PEO-Block konnten die wasserunlöslichen Farbstoffe nicht in Lösung stabilisiert werden und fielen aus. Durch die Kalibrierung der Absorption NR-beladener Vesikellösungen mit verschiedenen konzentrierten Lösungen von NR in linearem Polybutadien, konnte die Beladung zudem quantifiziert werden. Pro Vesikel wurden demnach 500-550 Nilrot-Moleküle eingelagert (0.3Gew.-%). Die Sensibilität der NR-Fluoreszenz auf die direkte Umgebung ermöglichte durch den Vergleich der Spektren der beladenen Vesikel mit der Farbstoff-Lösung in reinem Polybutadien zusätzlich den Nachweis, dass der Farbstoff in der hydrophoben PB-Domäne der Vesikel verkapselt wird. Für NR-beladene Riesen-Vesikel, die durch Filmrehydrierung präpariert wurden, konnte die Einlagerung des Farbstoffs in die Schale außerdem durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Der strukturelle Nachweis der Vesikel-Morphologie erfolgte für alle Farbstoff-beladenen Lösungen durch TEM-Messungen. Sowohl

cryoTEM- als auch TEM-Aufnahmen (nach strahlungsinduzierter Vernetzung) zeigten, dass die Anwesenheit der hydrophoben Modell-Substrate die Selbstorganisation zu Vesikeln nicht behindert.

Auch die Beladung durch fest/flüssig Phasentransfer, bei der die Farbstoffe feinpulvrig auf fertige Vesikellösungen aufgestreut wurden, führte zu beladenen Lösungen. Die Kinetik dieser Methode ist aber sehr langsam und erreichte auch nach >100 Tagen nicht annähernd die Einlagerungsdichten wie sie durch die direkte Beladung während der Vesikelbildung möglich sind.

Als hydrophobe Substrate aus dem Nanopartikelbereich wurden Halbleiter Nanokristalle, sogenannte Quantum Dots (QD) unterschiedlicher Größe eingelagert. Diese tragen hydrophobe Oberflächenliganden, sind somit wasserunlöslich und eignen sich als Modell-Substrate. Es wurden zum einen CdSe-Kerne mit einer Größe von $\langle d \rangle = 2.5 \text{ nm}$ (QD1) und zum anderen fluoreszierende Kern-Schale-Nanokristalle CdSe/CdS/ZnS mit einer Größe von $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$ (QD2) erfolgreich über Filmrehydrierung in der Vesikelschale verkapselt. Der Beladungsnachweis erfolgte auch hier spektroskopisch durch Messung der Absorption bzw. Emission (QD2). Neben dem strukturellen Nachweis der Vesikel konnten in cryoTEM- und TEM-Aufnahmen (nach Vernetzung) auch die in den Vesikeln eingelagerten Nanopartikel abgebildet werden. Für die QDs mit $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$ konnte durch Kippserien im cryoTEM die exakte Position der Partikel in der Mitte der Vesikelschale bestimmt werden. Durch die Verkapselung an der Grenzfläche der zwei PB-Lagen verursachen die QDs das Ausbeulen der Vesikelmembran nach außen und innen. In dieser notwendigen zusätzlichen Krümmung der Schale wird die Ursache vermutet, dass die QDs vorwiegend in direkter Nachbarschaft in der PB-Domäne eingelagert sind und nur selten einzeln verteilt über die gesamte Vesikelschale. Quantum Dots mit einer Größe von $\langle d \rangle = 7.6 \text{ nm}$ konnten nicht stabil in den Vesikeln verkapselt werden.

Zusätzlich zu den bisher genannten Charakterisierungsmethoden lieferte die Kombination aus dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Möglichkeit die Beladung auch über Ensemble-Methoden nachzuweisen. Für die NR- und QD2-beladenen Vesikellösungen lieferten DLS-Messungen, die über alle Partikel in Lösung mitteln, und FCS-Messungen, die nur über die fluoreszierenden Anteile, also die beladenen Vesikel mitteln, vergleichbare Ergebnisse. Die Kombination von DLS und FCS sowie (cryo)TEM-Messungen ermöglichte somit eine eindeutige Charakterisierung der Beladung.

Ferner wurde die Möglichkeit der Verkapselung hydrophiler Substrate im wassergefüllten Kern der Vesikel untersucht. Hierzu wurde der hydrophile Fluoreszenz-pH-Indikator Phloxin B (PhB) als geeignetes Modell-Substrat gewählt. Die Beladung erfolgte analog der Vesikelpräparation via Co-Lösemittel, wobei das Wasser durch eine wässrige PhB-Lösung ersetzt wurde. Das hydrophile Substrat befand sich somit nach Vesikelbildung sowohl verkapselt in den Vesikelkernen als auch frei gelöst in der Umgebungslösung. Da Phloxin B nur in einem pH-Bereich von 2.5-7 fluoresziert, bot dieses System die Möglichkeit, die Fluoreszenz aller frei gelösten PhB-Moleküle durch das Absenken des pH auf einen Wert < 2 zu quenchen. Nur die in den Vesikelkernen eingelagerten Farbstoffmoleküle waren durch die Vesikelmembran vor der sauren Umgebung geschützt und ihre Fluoreszenz konnte dadurch

separat detektiert werden. Der Beladungsnachweis erfolgte daher durch Messung der Emission nach Säurezugabe. Analoge Blindproben in denen kein Copolymer vorhanden war, bzw. durch reines PEO ersetzt wurde, zeigten, dass nur in Anwesenheit des Copolymers nach Säurezugabe eine signifikante Emission erhalten blieb. Auch in einer Vesikellösung, der nachträglich PhB zugesetzt wurde, waren die Farbstoffmoleküle nicht vor der Säure geschützt. Zusätzlich konnte die Verkapselung im Vesikelkern für eine durch Filmrehydrierung präparierte Lösung durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Der Nachweis der Vesikelstruktur erfolgte auch für die hydrophil-beladenen Proben durch TEM-Messungen nach Vernetzung. Diese zeigten, dass die Anwesenheit des hydrophilen Modell-Substrats die Selbstorganisation zu Vesikeln nicht behindert.

Ausblick

Die vorgestellten Modell-Systeme bieten die Möglichkeit Vesikelbeladungen unter definierten Bedingungen zu untersuchen. Insbesondere sind sie eindeutig charakterisierbar und ermöglichen es dadurch die Parameter zu untersuchen, von denen eine erfolgreiche Einlagerung abhängt. Neben der Abhängigkeit von der angebotenen Substrat-Menge oder der Partikelgröße (wie sie bereits ansatzweise in dieser Arbeit untersucht wurden) ist die Abhängigkeit der Beladung von z.B. der Substrat-Oberfläche oder der Ladung von Interesse. Die Quantum Dots bieten synthetischen Zugang zu oberflächen-modifizierten Vertretern in unterschiedlichen Größen und sind somit ein ideales Modell-System für weitere Forschung. Da dieses System auch die Bestimmung der exakten Position der Nanopartikel in der Vesikelmembran zulässt, wirft es die Frage auf, wie weit die Aufweitung der Vesikelmembran durch die Nanopartikel möglich ist, bevor der Übergang zu anderen Morphologien favorisiert wird. Sind all diese Parameter hinreichend untersucht, können die Ergebnisse auf andere Substrate übertragen und somit Auswahlregeln für erfolgreiche Systeme im Hinblick auf mögliche Anwendungen aufgestellt werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung der Arbeit	2
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Polymere Vesikel	3
2.2. Hydrophobe Beladung der Vesikelschale	10
2.3. Hydrophile Beladung des Vesikelkerns	13
2.4. Mögliche Anwendungen	15
3. Charakterisierungsmethoden	17
3.1. Lichtstreuung	17
3.2. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	22
3.3. Transmissionselektronenmikroskopie	24
3.4. Weitere Methoden	26
4. Ergebnisse und Diskussion	29
4.1. Polymere Vesikel	29
4.2. Hydrophobe Beladung mit Farbstoffen	36
4.3. Hydrophobe Beladung mit Quantum Dots	52
4.4. Nachweis durch Ensemble-Messungen	60
4.5. Hydrophile Beladung mit Farbstoffen	66
5. Experimenteller Teil	73
5.1. Vesikelpräparation	73
5.2. Hydrophobe Beladung der Vesikelschale	74
5.3. Hydrophile Beladung des Vesikelkerns	75
5.4. Charakterisierung	76
6. Kooperationsprojekte	79
6.1. Intermembran-Protein-Komplex LHCII	79
6.2. Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer	99
7. Anhang	109
Ausführliches Inhaltsverzeichnis	124
Literaturverzeichnis	132

1. Einleitung

Der in der heutigen Welt der Wissenschaft häufig genutzte Begriff 'nano' leitet sich von dem griechischen Wort 'nanos' ab, das 'Zwerg' bedeutet. In diesem Sinne bezeichnet es den milliardsten Teil einer Maßeinheit (10^{-9}). Mit der Weiterentwicklung mikroskopischer Methoden bis hin zur Elektronenmikroskopie wurde es möglich, Strukturen im Bereich weniger Nanometer aufzulösen und in Bildern darzustellen. Mit dieser neuen Möglichkeit unsere nanostrukturierte Umwelt in realen Bildern greifbar zu machen, wuchs gleichzeitig das Interesse, solche Nanostrukturen mit synthetischen Systemen zu kopieren. Dies betrifft die Forschung der Biologie, der Chemie und der Physik gleichermaßen.

Das Phänomen der Selbstorganisation (d.h. Phasenseparation) von Lipiden in Lösung ist für die Nano-Strukturierung vieler biologischer Systeme verantwortlich, so zum Beispiel der Aufbau einer Zellmembran als Doppelschicht amphiphiler Phospholipide, wie schematisch in Abbildung 1.1a gezeigt. Seit der Entdeckung der Selbstorganisation von Lipidsystemen zu den verschiedensten Morphologien wie beispielsweise Mizellen, Zylinder-Mizellen oder eben auch zu Hohlstrukturen wie Liposomen besteht ein großes Interesse an synthetischen Aggregaten, die mehr Spielraum für Funktionalisierung und synthetische Anpassung bieten.

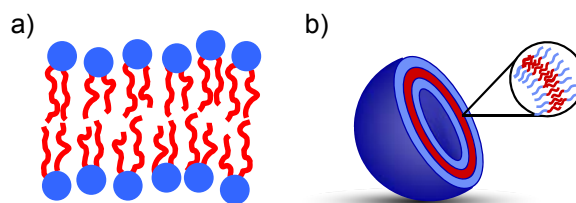


Abb. 1.1: Schematische Darstellung a) einer Zellmembran, b) eines polymeren Vesikels

Blockcopolymerer bestehen aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Polymerblock und bieten somit die Funktionalität eines geeigneten amphiphilen Systems. Ihr Verhalten der Phasenseparation und das wachsende Verständnis der physikalischen Hintergründe sind Ausgangspunkt aktuellen Forschungsinteresses.

Die Selbstorganisation amphiphiler Blockcopolymerer in selektiven Lösemitteln führt in Abhängigkeit von Parametern wie der Lösemittelselektivität, der Molmasse, dem Blocklängenverhältnis etc. zur Bildung von Aggregaten verschiedenster Morphologien analog den Lipidstrukturen. Gleichzeitig bieten synthetische Blockcopolymerer jedoch gegenüber biologischen Systemen den Vorteil der Modifizierbarkeit und damit der möglichen Einflussnahme auf Struktur, Stabilität und Funktionalität der Aggregate [1].

Besonderes Interesse liegt in polymeren Vesikeln in Wasser, sogenannten 'Polymersomen' (die polymere Entsprechung eines Liposoms, s. Abb. 1.1b). Analog zur Zellmembran trennt die Doppelschichtmembran des Vesikels den Lösemittel gefüllten, hydrophilen Kern von der

[1] Meier W. et al., 'Block Copolymer Vesicles' in *Block Copolymers in Nanoscience*

Umgebung ab. Innerhalb der Vesikelschale bildet sich eine hydrophobe Domäne aus, die ihrerseits durch die hydrophilen Schichten zu beiden Seiten von der Umgebung abgeschirmt ist. Für solche Vesikelstrukturen mit zwei abgegrenzten, gegensätzlich polarisierten Zonen sind eine Vielzahl von Anwendungen denkbar: Zur Verkapselung verschiedenster Substanzen, wie z.B. Farbstoffpigmenten, als Transportsysteme für verschiedenste Substrate (hier insbesondere auch der gezielte Medikamententransport im menschlichen Körper), als künstliche Zellsysteme oder auch als maßgeschneiderte Nanoreaktoren [1].

Ein synthetisches System sollte hierbei neben der Selbstorganisation zur Vesikelstruktur die Möglichkeit bieten auf Parameter, wie zum Beispiel die Größe, Einfluss nehmen zu können. In Bezug auf spätere Anwendungen als 'Containersystem' sollte eine effiziente Beladung möglich sein und zusätzlich muss das System gerade in Bezug auf diese Beladung eindeutig charakterisierbar sein.

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Das amphiphile Blockcopolymer Polybutadien-b-Polyethylenoxid (PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH) bildet in Wasser Vesikel durch Selbstorganisation. Anknüpfend an frühere Arbeiten [2] sollte die Möglichkeit der gezielten Einflussnahme auf die Vesikelgröße und Größenverteilung während der Präparation bzw. im Anschluss untersucht werden.

Im Mittelpunkt des Forschungsprojekts stand die Beladung der Vesikel: Durch passende Modell-Substrate sollte zum einen die hydrophobe Beladung der Vesikelschale und zum anderen die hydrophile Beladung des Vesikelkerns realisiert werden. Die Zielsetzung lag darüber hinaus in der eindeutigen Charakterisierung der beladenen Systeme sowohl durch abbildende Methoden als auch durch Ensemble-Messmethoden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Polymere Vesikel

2.1.1. Prinzip der Selbstorganisation

Das Phänomen der Selbstorganisation tritt in vielen biologischen Systemen auf und ist im Aufbau der Zellmembranen aus Phospholipiden von zentraler Bedeutung. Phospholipide sind fettähnliche Triglyceride, die zwei langkettige Fettsäuren und einen Phosphorsäurerest enthalten, an den eine Base gebunden ist. Diese Amphiphile ordnen sich zu einer Doppelschicht an, welche die Zelle nach außen abgrenzt. Als einfachste synthetische Vertreter solcher amphiphiler Systeme seien die Tenside erwähnt. Ein Tensidmolekül setzt sich aus einer unpolaren, hydrophoben Alkyl-Kette und einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe (z.B. einer Carboxylgruppe) zusammen. Dieser Aufbau führt in Wasser oberhalb einer kritischen Mizellbildungskonzentration zu organisierten, supramolekularen Strukturen wie sie in Abbildung 2.1 gezeigt sind.

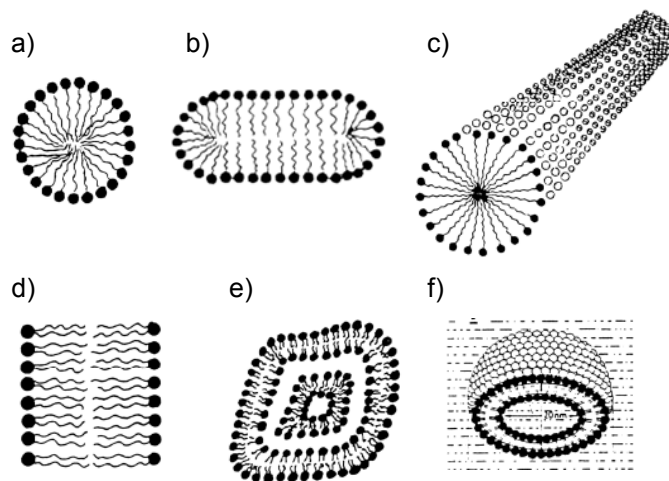


Abb. 2.1 [Vögtle]: Organisierte Tensidstrukturen: a) sphärische, b) ellipsoide, c) Zylinderförmige Mizellen; d) Doppelschicht; e) Multischalen-, f) Mikro-Vesikel

Die Ursache für die Assoziation von Amphiphilen zu supramolekularen Strukturen in wässriger Lösung liegt hauptsächlich in den abstoßenden Kräften zwischen den hydrophoben Gruppen des Amphiphils und den Wassermolekülen. Die Separation der verschieden-löslichen Bereiche verringert die Anzahl energetisch ungünstiger Wechselwirkungen und senkt somit die freie Energie ab. Die anziehenden Wechselwirkungen der hydrophoben Gruppen untereinander und der hydrophilen Gruppen mit den Wassermolekülen stabilisieren die gebildeten Strukturen zusätzlich. Neben dem einfachsten Fall der sphärischen Mizelle treten weitere geometrische Strukturen wie Ellipsoide, Zylinder oder Doppelschichtvesikel auf [3]. Über Parameter wie die Kopfgruppenfläche a_0 (resultierend aus ihrer repulsiven Wechselwirkung), der maximalen hydrophoben Kettenlänge l_c und dem Segmentvolumen v eines Tensids (s. Abb. 2.2a) lassen sich Aussagen über die favorisierte Struktur in Lösung treffen.

[3] Ringsdorf 1988; Gruen 1985; Vögtle; Rheingans 1999

Der dimensionslose Packungsparameter v/a_0l_c bestimmt die Form der Aggregate, wie in der Übersicht in Abbildung 2.2b zu sehen. Jede dieser Strukturen entspricht dabei dem kleinstmöglichen Aggregat, in dem die Lipide die minimale freie Energie aufweisen [Israelachvili].

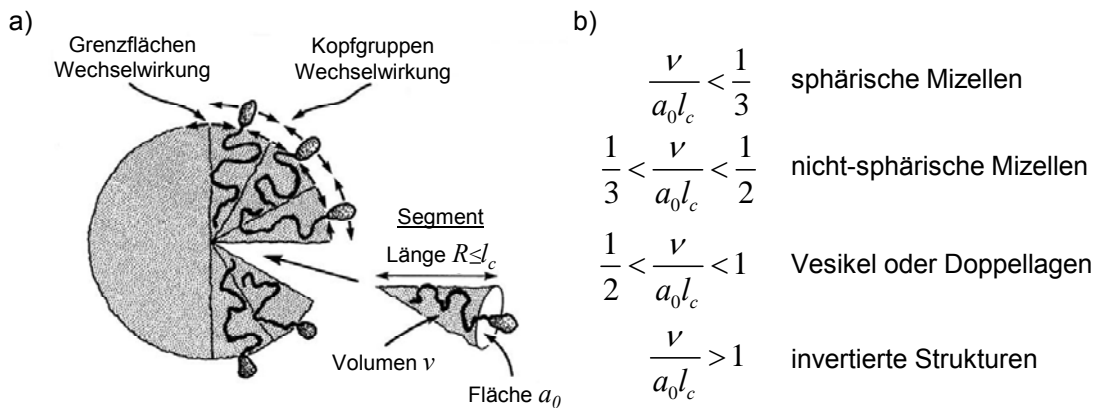


Abb. 2.2 [Israelachvili]: a) Schematische Darstellung einer Mizelle und ihrer Segmente; b) Strukturbestimmung durch den Packungsparameter v/a_0l_c

Sphärische Mizellen bilden sich, wenn die optimale Oberfläche a_0 im Vergleich zum hydrophoben Volumen v groß ist (z.B. bei geladenen Kopfgruppen), so dass der Radius R der Mizelle die kritische Kettenlänge l_c nicht übersteigt. Ist die Kopfgruppenfläche klein (z.B. im Falle ungeladener Gruppen) ist die sphärische Strukturierung nicht mehr begünstigt und es werden stattdessen zylinderförmige Mizellen favorisiert (auch trotz der energetisch ungünstigen Halbkugeln an beiden Zylinderenden). Lipide, deren hydrophobes Volumen v im Vergleich zur Kopfgruppe a_0 sehr groß ist (etwa doppelt so groß wie für Mizell-formende Lipide), können sich nur durch Aggregation zu Doppellagen stabilisieren ($v/a_0l_c=1$). Statt 'unendlich' ausgedehnter Doppellagen können sich auch geschlossene sphärische Vesikel bilden ($v/a_0l_c < 1$), die auf Grund ihrer endlichen Anzahl Moleküle entropisch günstiger sind und zusätzlich keine energetisch ungünstigen Ränder einer planaren Doppellage aufweisen. Um eine derart gekrümmte Doppellage zu bilden ist es notwendig, dass die Moleküle der beiden Lagen sich im Mittel analog abgeschnittener Kegel anordnen können (s. Abb. 2.3).

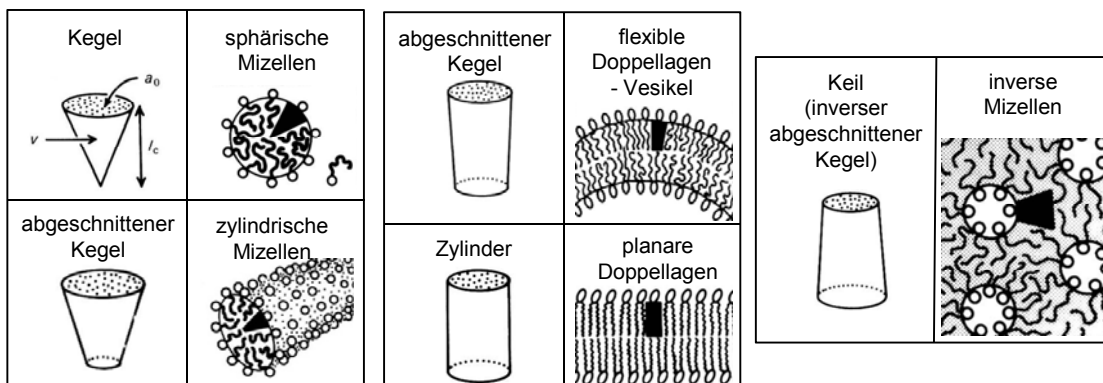


Abb. 2.3 [Israelachvili]: Packungsform der Moleküle und daraus geformte Aggregatstrukturen in Lösung

2.1.2. Polymere Selbstorganisation

Neben Tensiden und Lipiden zeigen auch synthetische Systeme wie amphiphile Blockcopolymeren das Phänomen der Selbstorganisation. Allgemein sind Diblockcopolymeren aus zwei Teilpolymeren unterschiedlicher Monomere aufgebaut. Die Kombination aus einem hydrophoben Block (z.B. Polybutadien, s. Abb. 2.4) und einem hydrophilen Block (z.B. Polyethylenoxid) führt zu amphiphilen Copolymeren mit charakteristischem Lösungsverhalten. In einem selektiven Lösemittel, welches nur für einen Block ein gutes Lösemittel ist, bilden sich Aggregate der Blockcopolymerketten, auf Grund der Assoziation der unlöslichen Blöcke. Die treibende Kraft für die Aggregation ist dabei die Minimierung der energetisch ungünstigen hydrophob-hydrophilen Kontakte, also sowohl die Minimierung der Kontakte des unlöslichen Blocks zum selektiven Lösemittel, als auch die Minimierung der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche zwischen den Teilblöcken des Copolymers. Dies führt zur Zusammenlagerung gleicher Blöcke zwischen Nachbarmolekülen und zur Streckung der einzelnen Polymerketten. Dieser Streckung wirkt die Entropie entgegen, die wiederum die geknäulte Polymerkette begünstigt. Die Wirkung dieser gegenläufigen Kräfte zeigt sich auch in der Ausbildung unterschiedlicher Aggregat-Morphologien in Abhängigkeit von Parametern, wie der Molmasse, der Zusammensetzung der Blockcopolymeren, dem relativen Blocklängenverhältnis und den relativen Löslichkeiten der Blöcke im Lösemittel [Antonietti 2003, Förster 2003].

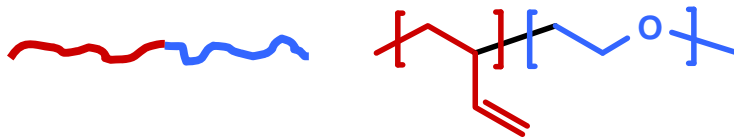


Abb. 2.4: Amphiphile Blockcopolymeren bestehend aus einem hydrophoben Block (rot, z.B. Polybutadien) und einem hydrophilen Block (blau, z.B. Polyethylenoxid)

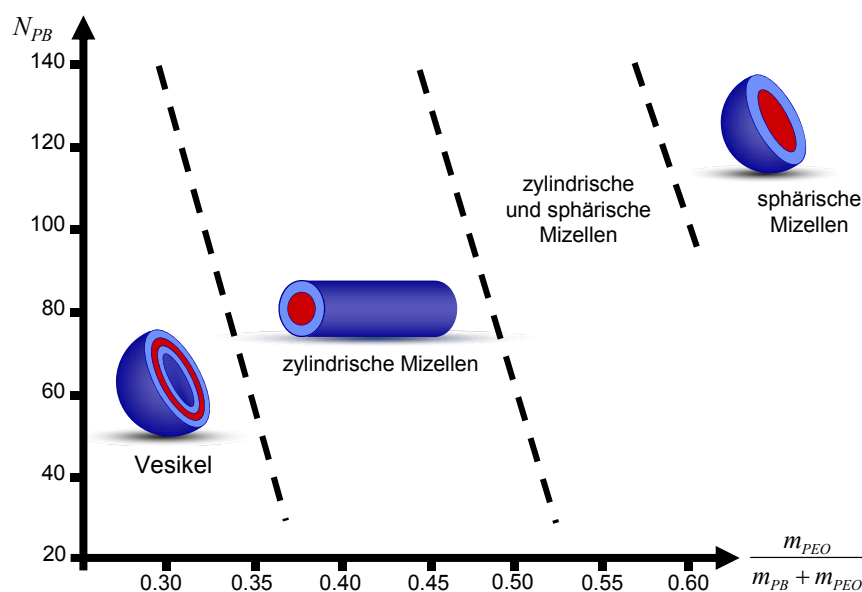


Abb. 2.5: Schematisches Phasendiagramm für PB-PEO in Wasser in Abhängigkeit von der Anzahl PB-Wiederholungseinheiten N_{PB} und dem PEO-Gewichtsanteil $m_{PEO}/(m_{PB}+m_{PEO})$

Im einfachsten Fall bilden sich in einem polaren Lösemittel sphärische Mizellen mit hydrophobem Kern und hydrophiler Korona. In unpolaren Lösemitteln bilden sich inverse Mizellen. Analog zu den Tensidstrukturen kommt es auch bei amphiphilen Blockcopolymeren unter den richtigen Bedingungen zur Bildung nicht-sphärischer Mizellen und anderer supramolekularer Strukturen in Lösung. In Abbildung 2.5 ist beispielhaft ein schematisches Phasendiagramm für die Selbstorganisation von Polybutadien-Polyethylenoxid in Wasser gezeigt [Bates 2004, Maskos 2006]. Die Verlängerung des hydrophilen Blocks (PEO-Gewichtsanteil $m_{PEO}/(m_{PB}+m_{PEO})$ steigt) verursacht bei gleicher hydrophober Blocklänge (Anzahl hydrophober PB-Wiederholungseinheiten N_{PB} konstant) den Strukturübergang von Vesikeln über zylindrische Mizellen bis hin zu sphärischen Mizellen. Das heißt analog zu den Tensidstrukturen steigt auch hier mit zunehmender hydrophiler Oberfläche die Krümmung der Aggregatoberfläche.

Verglichen mit Tensiden oder Lipiden haben amphiphile Blockcopolymere meist um ein Vielfaches höhere Molekulargewichte, was zur Ausbildung größerer Domänen und damit erhöhter Stabilität der geformten Strukturen führen kann, sowie zu veränderter Permeabilität [Discher 1999]. Gleichzeitig jedoch liegt in den hohen Molekulargewichten der Blöcke und den gegenseitigen Verwicklungen der langen Polymerketten die Ursache für eine deutlich verlangsamte Dynamik der Reorganisation. Dadurch können 'kinetisch gefangene' Morphologien entstehen, die nicht unbedingt der energetisch favorisierten Aggregatstruktur des Systems entsprechen [Bates 2003]. Darüber hinaus ist der Polymerisationsgrad, und somit das Molekulargewicht synthetischer Polymere, stets eine Verteilung, wobei die Verteilungsbreite bzw. Polydispersität abhängig ist von der gewählten Syntheseroute und eventueller Aufreinigungsschritte. Dadurch kann es zur Koexistenz verschiedener Morphologien in Lösung kommen, die durch unterschiedliche Kettenlängen-Fractionen der Polymere stabilisiert werden. Im Falle polymerer Vesikel kann eine Sortierung der Polymere (Kurzketten vermehrt in der inneren Lage, Langketten in der äußeren) zur zusätzlichen Stabilisierung der Struktur beitragen [Eisenberg 2001].

2.1.3. Das Blockcopolymer Polybutadien-b-Polyethylenoxid (PB-b-PEO)

Das für diese Arbeit verwendete Blockcopolymer setzt sich aus einem hydrophoben Poly-(1,2)Butadien-Block (PB) und einem hydrophilen Poly-Ethylenoxid-Block (PEO) zusammen (s. Abb. 2.4 und 2.6).

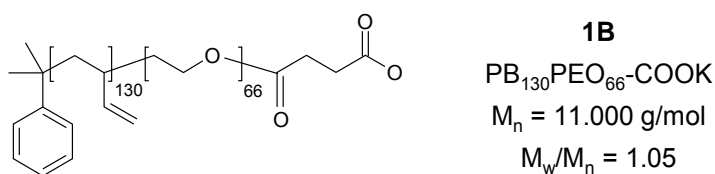


Abb. 2.6: Polybutadien(130)-b-Polyethylenoxid(66)-Copolymer (Abkürzung 1B)

Die Glasstemperatur T_g des hydrophoben Polybutadiens liegt mit ca. -40°C unterhalb der Raumtemperatur [Polymer Handbook]. Dadurch ist eine ausreichende Flexibilität dieses Blocks gegeben, so dass Gleichgewichtszustände der Struktur in Lösung leichter erreicht werden können als bei Verwendung von beispielsweise Polystyrol als hydrophobem Block mit einer Glasstemperatur von ca. 100°C [Polymer Handbook]. Zusätzlich bietet die Verwendung eines Polybutadien-Blocks den Vorteil weiterer ungesättigter Bindungen. Nach der Selbstorganisation im selektiven Lösemittel ist es somit möglich, die zunächst labil geformten Strukturen durch eine Vernetzung dieser Doppelbindungen zu fixieren (s. Abs. 2.1.5).

Der hydrophile Block aus Polyethylenoxid bildet in Wasser stets die Außenhülle der Struktur und bietet unter anderem den großen Vorteil biokompatibel zu sein. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass eine Kopplung von Proteinen oder Medikamenten an Makromoleküle eine Verlängerung ihrer Verweildauer im Körper bewirken kann. In vielen Fällen wurden hierfür als Makromoleküle Polyethylenglykole genutzt; einige solcher 'PEGylierten' Medikamente sind medizinisch zugelassen [4].

Abhängig von den Blocklängen und dem gegenseitigen Verhältnis bilden PB-b-PEO-Copolymere verschiedene Aggregatstrukturen im selektiven Lösemittel Wasser (vgl. Abb. 2.5). Im Falle relativ kurzer hydrophiler PEO-Blöcke bilden sich Vesikel als energetisch favorisierte Struktur. Verglichen mit klassischen Liposomen mit Membrandicken von 4-5nm zeichnen sich diese Polymersomen durch deutlich dickere Vesikelmembranen aus. Abhängig von der hydrophoben Blocklänge liegen sie im Bereich von 9-20nm [Discher 2002]. Diese dickere Vesikelschale, kombiniert mit der möglichen Verwicklung der einzelnen Polymerketten innerhalb der hydrophoben Domäne (s. Abb. 2.7), begründet die deutlich erhöhte Stabilität dieser Polymersomen gegenüber ihrer Lipid-Analoga [Ryan 2005]. Zusätzlich wird die Permeabilität durch die dickere Schale herabgesetzt [Mayer 2004].

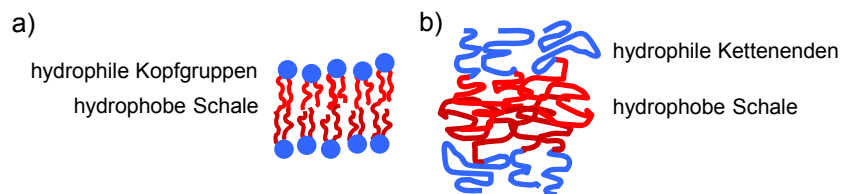


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Doppelschichten für
a) Lipide und b) Copolymere

Das für diese Arbeit verwendete Copolymer PB₁₃₀-b-PEO₆₆ (abgekürzt 1B, s. Abb. 2.6) wurde durch anionische Polymerisation synthetisiert ([Rheingans 1999], s. Abb. 2.8) und charakterisiert zur Verfügung gestellt. Es setzt sich im Mittel aus 130 Wiederholungseinheiten Butadien und 66 Einheiten Ethylenoxid zusammen (charakterisiert durch MALDI-TOF MS). Das PEO-Ende ist mit einer Carbonsäuregruppe terminiert (Struktur 9 in Abb. 2.8). Diese funktionelle Endgruppe ermöglicht eine spätere synthetische Modifikation. Die Molmasse beträgt im Zahlenmittel $M_n=11\text{kg/mol}$ und die Polydispersität $PD=M_w/M_n$ ist auf Grund der anionischen Polymerisation gering mit einem Wert von 1.05 [Maskos 2006].

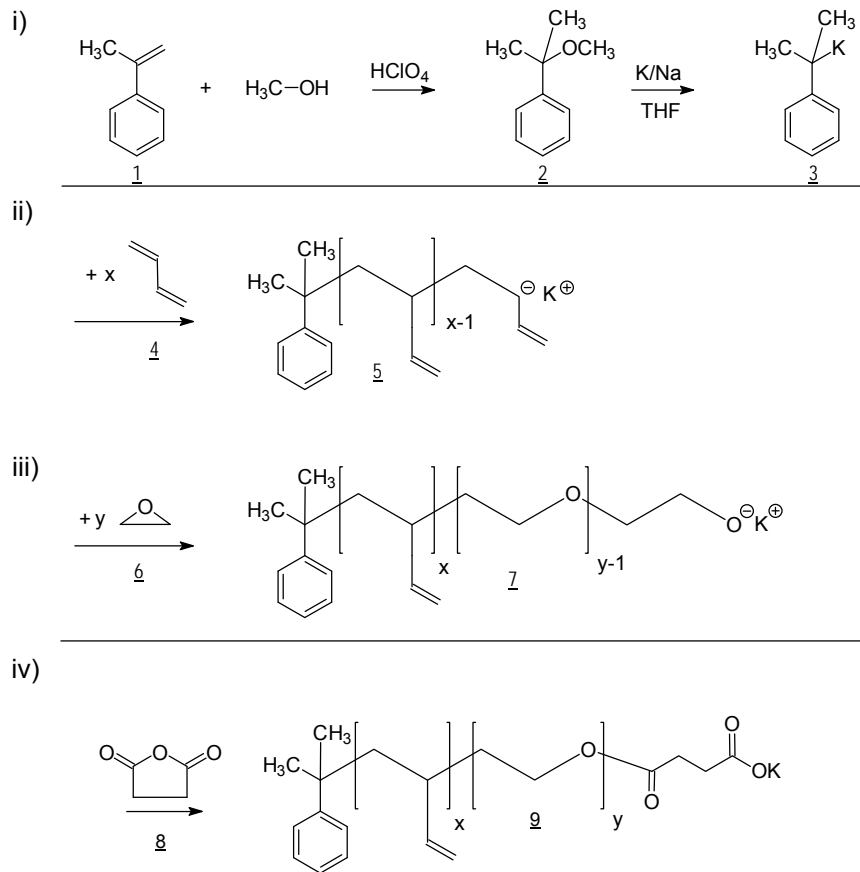


Abb. 2.8 [Maskos 2006]: PB-b-PEO-Copolymer Syntheschema

Dieses Copolymer PB_{130} -b- PEO_{66} bildet in Wasser, als selektivem Lösemittel für den PEO-Block, Vesikel aus Copolymer-Doppelschichten, wie in Abbildung 2.9 gezeigt [Maskos 2001/2006, vgl. Abb. 2.5]. Dabei wird der unlösliche PB-Anteil (Abb. 2.9, dargestellt in rot) vom hydrophilen PEO-Anteil (in blau) umgeben und ist somit durch die gequollenen PEO-Kettenenden vom Wasser abgeschirmt. Der Vesikelkern ist mit Wasser gefüllt.

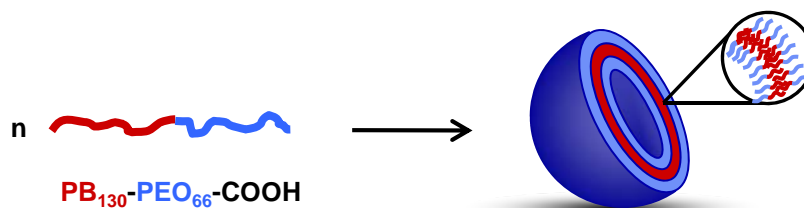


Abb. 2.9: $PB_{130}PEO_{66}$ -COOH in Wasser: Selbstorganisation zu Vesikeln mit polymerer Doppelschicht. Hydrophober PB-Block in rot, hydrophiler PEO-Block in blau.

2.1.4. Vesikelpräparation

Die Präparation der Vesikel in Lösung kann nach unterschiedlichen Vorgehensweisen erfolgen. Die einfachste Variante ist die direkte Lösung des Copolymers im selektiven Lösemittel Wasser. Die hohen Molekulargewichte der Polymere begründen aber eine deutlich

verlangsamte Dynamik im Vergleich zu klassischen Lipiden, daher nimmt diese direkte Präparation häufig viel Geduld in Anspruch. Im Folgenden werden einige weitere Präparationswege vorgestellt. Dabei bestimmen Randbedingungen wie die Löslichkeit des Polymers, seine Stabilität gegenüber Temperatureinflüssen etc. und auch die späteren Erwartungen an die Vesikellösung, in Bezug auf Partikelgröße und Größenverteilung, welche Methode die geeignete Wahl ist.

Co-Lösemittel

Existiert ein Lösemittel, in dem beide Polymerblöcke gut löslich sind und das uneingeschränkt mit dem selektiven Lösemittel Wasser mischbar ist, so kann es als Co-Lösemittel fungieren. Für das PB-PEO-Polymer ist Tetrahydrofuran (THF) ein geeignetes Co-Lösemittel. Das Copolymer wird in THF gelöst und das selektive Lösemittel Wasser unter Rühren gleichmäßig zugegeben. Dabei wird das umgebende Lösemittel für die PB-Kettenenden schrittweise schlechter und die Selbstorganisation des Copolymers zur energetisch begünstigten Vesikelstruktur eingeleitet. Unterhalb eines THF-Anteils von 39Gew.-% ist die Dynamik der Polymerketten soweit eingeschränkt, dass die Vesikelstruktur sozusagen eingefroren ist [Müller 2006]. Da THF zusätzlich den Vorteil bietet, dass es auf Grund seines hohen Dampfdrucks (21.6kPa bei 25°C; vgl. Wasser 3.17kPa [5]) nach der Vesikelpräparation leicht wieder aus der Lösung zu entfernen ist, können durch einfaches Abdampfen des Co-Lösemittels wässrige Vesikellösungen erhalten werden.

Es sei angemerkt, dass in der Literatur die Bezeichnung 'Co-Lösemittelmethode' auch für die inverse Variante gilt, wenn die Copolymer/THF-Lösung in einen Überschuss Wasser getropft wird, wodurch den gebildeten Strukturen eine andere Kinetik zugrunde liegt [Förster 2005].

Filmrehydrierung

Angelehnt an die Standardprozedur der Liposompräparation wird, ausgehend von einer Copolymerlösung im guten Lösemittel THF, ein dünner Film hergestellt (vorzugsweise in einem Teflongefäß). Nachdem der Film vollständig getrocknet ist (z.B. im Vakuumschrank) wird das selektive Lösemittel Wasser zugegeben und der Polymerfilm durch ausreichende Energiezufuhr (Ultraschallbad, erhöhte Temperatur) nach und nach wieder aufgelöst. Dabei unterstützt die Vorordnung der Polymerblöcke im trockenen Film (idealer Weise abwechselnde Lamellen) die Ausbildung der Vesikel. Einzelne, in sich lamellar geordnete Stücke lösen sich vom restlichen Polymerfilm ab und formen umgeben von Wasser die energetisch begünstigte Vesikelstruktur. Diese Methode führt zu Vesikeln, deren Durchmesser über das gesamte Größenspektrum variiert sowie vereinzelt auch zu ineinander gelagerten Vesikeln oder Multischalen-Vesikeln.

Um ausgehend von solchen Lösungen kleinere, enger verteilte Vesikellösungen zu erhalten bietet sich die Extrusion durch Membranen mit bekannter Porengröße an. Beim Durchgang durch die Membran werden Strukturen deutlich größer als der Porendurchmesser 'zerschert' und formen anschließend neue, kleinere Vesikel. Wiederholt man diesen Prozess, erhält man Vesikellösungen mit einem 'cut off' in Abhängigkeit der gewählten Membranporen. Hierzu wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit Untersuchungen durchgeführt [Müller 2006].

2.1.5. Vesikelvernetzung

Wie bereits erwähnt, bietet Polybutadien als hydrophober Copolymerblock den Vorteil ungesättigter Bindungen (eine C-C-Doppelbindung pro Monomersegment). Diese können, initiiert durch beispielsweise Radikale, miteinander reagieren und somit zu einer Vernetzung der Polymerketten führen. Erfolgt diese Vernetzung nach der Selbstorganisation, kann die zunächst nur labil geformte Vesikelstruktur dauerhaft fixiert werden.

Im Falle des PB-PEO-Polymers eignen sich zur Vernetzung γ -Strahlen, wie sie etwa von einer ^{60}Co -Quelle ausgesandt werden. Nach Bestrahlung der Vesikellösungen mit einer Dosis von etwa 60kGy sind die Strukturen dauerhaft vernetzt. Die Vesikel sind dann auch im trockenen Zustand im TEM abbildbar und sogar in einem für beide Blöcke guten Lösemittel stabil [Maskos 2001].

Eine weitere Möglichkeit zur Initiierung der radikalischen Polymerisation in Lösung ist die Zugabe eines Redoxsystems, wie z.B. Kaliumperoxodisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Natriumdisulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) und Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [Bates 1999]. Da diese Variante allerdings durch die Salzzugabe mit einer 'Verunreinigung' gleichzusetzen ist, stellt die Vernetzung durch γ -Strahlung die elegantere Methode in Bezug auf weitere Verwendungen der Lösungen dar.

2.2. Hydrophobe Beladung der Vesikelschale

Die von der Umgebung abgegrenzte hydrophobe Vesikelschale (vgl. Abb. 2.9) bietet die Möglichkeit, in einem nach außen hydrophilen System, hydrophobe Substrate zu verkapseln. Für solche Containersysteme ist eine Vielzahl Anwendungen denkbar (vgl. Abs. 2.4).

Der hydrophobe Membrankern setzt sich aus einer Doppellage der PB-Kettenenden zusammen. Wie aus cryoTEM-Abbildungen hervorgeht, hat diese Schicht im Falle der PB₁₃₀-PEO₆₆-Vesikel eine Dicke von etwa 15nm [Mueller 2006]. Die Modell-Substrate zur hydrophoben Beladung müssen sowohl diesen Dimensionen wie auch der chemischen Struktur der Polybutadien-Umgebung entsprechen. Zusätzlich müssen sie die detaillierte Charakterisierung der Vesikelbeladung im Nano-Größenbereich ermöglichen. Hierzu bieten sich vor allem fluoreszierende Substrate an, da Fluoreszenzsignale sowohl in abbildenden als auch in Ensemble-Messmethoden bis in einen hohen Verdünnungsbereich hinein nachweisbar sind.

Die Wahl geeigneter Substrate fiel im molekularen Größenbereich auf die hydrophoben Farbstoffe Oil Red EGN und Oil Blue N sowie Nilrot und ein Perylen-Derivat als fluoreszierende Vertreter. Als Modell-Substrate aus dem Nanopartikelbereich dienten fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle, sogenannte Quantum Dots, in verschiedenen Größen.

2.2.1. Hydrophobe Farbstoffe

Geeignete Farbstoffe für die hydrophobe Beladung der Vesikelschale müssen grundlegend zwei Bedingungen erfüllen. Zum einen dürfen sie keine Reaktion mit einer Komponente des

Vesikelsystems eingehen, d.h. im Falle des PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH sollten reaktive oder geladene Gruppen im Farbstoffmolekül vermieden werden, um ungewollte Reaktionen mit der Carbonsäuregruppe ausschließen zu können. Zum anderen dürfen sie sich nicht in Wasser lösen, da einerseits die Hydrophobizität die Triebkraft der Beladung darstellt und andererseits in der wässrigen Umgebung gelöste Farbstoffmoleküle die spätere Charakterisierung und Quantifizierung erschweren.

Die hydrophoben Farbstoffe mit Handelsnamen 'Oil Red EGN' (Solvent Red 26, ORE) und 'Oil Blue N' (Solvent Blue 14, OBN) erfüllen diese Bedingungen. Ihre chemische Struktur ist in Abbildung 2.11 gezeigt [6]. Zusätzlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot ('Nile Red', NR) sowie ein Perylen-Derivat (N,N'-bis(1-hexylheptyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylbisimid, abgekürzt als Perylen) als Modell-Substrat verwendet (s. Abb. 2.11). Auch diese besitzen keine für dieses System reaktive oder geladenen Gruppen und sind unlöslich in Wasser. Die intensive Fluoreszenz bietet Vorteile in der späteren Charakterisierung der Vesikelbeladung.

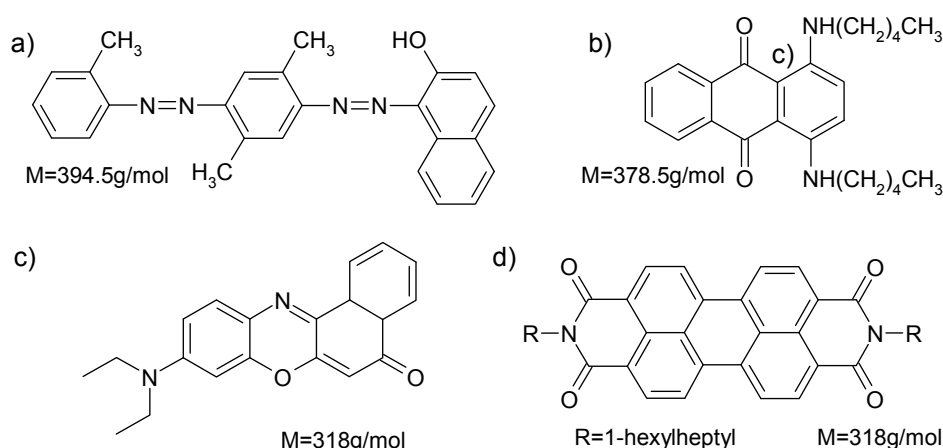


Abb. 2.11: Chemische Struktur von a) Oil Red EGN, b) Oil Blue N, c) Nilrot und d) N,N'-bis(1-hexylheptyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylbisimid, abgekürzt als Perylen

2.2.2. Quantum Dots

Halbleiter-Nanokristalle sind stark fluoreszierende Nanopartikel, sogenannte Quantum Dots (QD). Der Hauptbestandteil dieser Partikel ist häufig Cadmiumselenid (CdSe), das im Bulk in Wurtzit- oder Zinkblende-Struktur kristallisiert [5]. Nanokristalle mit Größen von 1-10nm unterscheiden sich jedoch in ihren physikalischen Eigenschaften deutlich von chemisch analogen Bulkmaterialien [7].

Ein Halbleiter zeichnet sich durch kontinuierliche Energiebänder aus, wobei das leere Leitungsband LB vom elektronengefüllten Valenzband VB durch eine konstante Energielücke $E_g(\text{bulk})$ separiert ist (s. Abb. 2.12a). Nanokristalle liegen im Übergangsbereich zwischen Molekül und Festkörper. Wegen der dreidimensionalen, räumlichen Begrenzung im Nanometerbereich besitzen sie keine kontinuierlichen Energiebänder sondern diskrete

[6] Green F.J., *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*

[7] Lakowicz; Rogach; Alivisatos 1996; Klimov 2003

Energieniveaus ähnlich einem einzelnen großen Molekül (s. Abb. 2.12b und c). Die Energielücke $E_g(QD)$ zwischen diesen besetzten und unbesetzten Niveaus ist dabei abhängig von der Größe der Nanokristalle und nimmt mit sinkender Kristallgröße zu ('Größenquantisierungseffekt').

Nach Absorption führt die Rekombination eines Elektron-Loch-Paares zur Energiefreisetzung in Form von Fluoreszenzstrahlung, deren Wellenlänge von der Bandlücke $E_g(QD)$ und somit von der Größe des Nanokristalls abhängt. So fluoreszieren 10nm große CdSe-Nanokristalle im roten und <2nm große Kristalle im blauen Wellenlängenbereich [Rogach]. Um höhere Fluoreszenzquantenausbeuten und höhere Stabilität gegen Photooxidation zu erreichen, kann die Oberfläche der Nanokristalle durch den Aufbau einer inorganischen Schale (z.B. CdS oder ZnS) passiviert werden. Zusätzliche Oberflächenliganden wie Trioctylphosphinoxid (TOPO) oder *cis*-9-Octadecensäure (Ölsäure) erhöhen die Kolloidstabilität und verhindern die Aggregation der Nanokristalle.

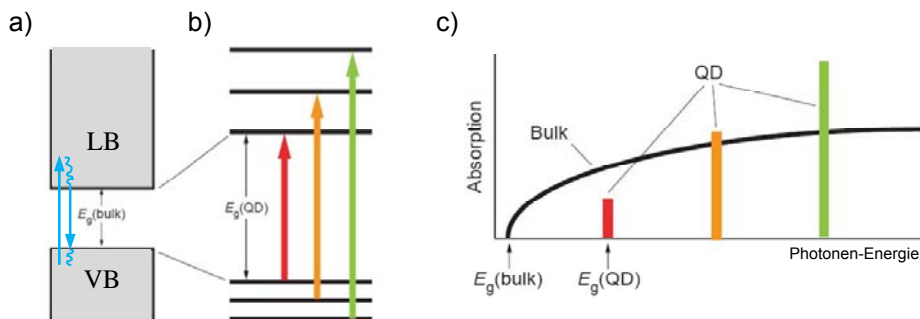


Abb. 2.12 [Klimov 2003]: Energielevel für Halbleiter a) im Bulk und b) im Nanokristall; c) schematische Darstellung der kontinuierlichen Absorption des Bulk-Halbleiters (schwarz) im Vergleich zur diskreten Absorption des Quantum Dots (farbig)

Gegenüber klassischen Farbstoffmolekülen bieten QD-Nanokristalle als hydrophobe Modell-Substrate zur Vesikelbeladung den Vorteil, dass sie eine höhere Fluoreszenzintensität liefern und dabei nicht ausbleichen. Zusätzlich geben sie einen guten Kontrast im Transmissions-elektronenmikroskop. Durch eine geeignete Anpassung der Parameter sind sie außerdem in unterschiedlichen Größen (bei enger Verteilung) synthetisierbar.

Für diese Arbeit wurden CdSe-Kerne mit mittlerem Durchmesser von 2.5nm und CdSe/CdS/ZnS Kern-Schale-Nanokristalle mit 5.7nm bzw. 7.6nm verwendet (s. Abb. 2.13). Die Quantum Dots wurden von Michaela Wagner (AK Basché, Universität Mainz) wie in [8] beschrieben synthetisiert und tragen hydrophobe Oberflächenliganden zur Stabilisierung.

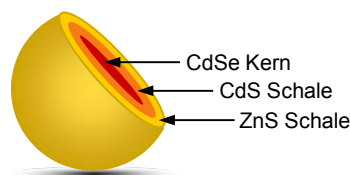


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der Kern-Schale Struktur der Quantum Dots

2.2.3. Präparation hydrophob beladener Vesikel

Die präparative Realisierung der hydrophoben Vesikelbeladung erfolgt analog der in Abschnitt 2.1.4 vorgestellten Präparationsmethoden der Vesikel, wobei an die Stelle des reinen Copolymers eine Mischung aus Copolymer und hydrophobem Substrat tritt.

In der *Co-Lösemittelmethode* wird neben dem Copolymer auch das hydrophobe Substrat im Co-Lösemittel THF gelöst. Zur Ausgangslösung Copolymer/Substrat/THF wird dann unter Rühren das selektive Lösemittel Wasser gleichmäßig zugetropft. Da die hydrophoben Modell-Substrate nicht in Wasser löslich sind, meiden sie wie die PB-Kettenenden mit steigendem Wasseranteil den Kontakt zur Umgebung. Bei der voranschreitenden Selbstorganisation des Copolymers zur energetisch begünstigten Vesikelstruktur können sie entweder innerhalb der hydrophoben PB-Domäne der Vesikelschale eingelagert werden, oder aus der Lösung ausfallen.

Bei der Beladung durch *Filmrehydrierung* wird ausgehend von einer Copolymer/Substrat-Lösung im guten Lösemittel (z.B. THF oder Chloroform) ein dünner Film hergestellt. Dieser wird getrocknet und anschließend wieder nach und nach in Wasser aufgelöst. Durch die Vorordnung der Polymerblöcke im trockenen Film positionieren sich auch die hydrophoben Substrate vorwiegend innerhalb der PB-Domäne und meiden die hydrophilen PEO-Kettenenden. Beim Lösungsprozess lagern sie sich dann innerhalb der Vesikelschale an oder gehen nicht in Lösung über bzw. fallen wieder aus.

Eine zusätzliche Methode der hydrophoben Beladung ist die *Beladung durch Phasentransfer*. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei Varianten: fest/flüssig und flüssig/flüssig Phasentransfer. Für letztere Variante wird das hydrophobe Substrat in einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel (z.B. Toluol) gelöst. Eine rein wässrige Vesikellösung wird mit dieser Substrat-Lösung überschichtet (flüssig/flüssig) und für einen längeren Zeitraum möglichst erschütterungsfrei stehen gelassen. Durch einen Austauschprozess an der flüssig-flüssig Grenzfläche wird das hydrophobe Substrat nach und nach in die wässrige Phase überführt und lagert sich dort in die hydrophobe Domäne der Vesikelschale ein. Im Falle feinpulvriger Substrate kann das Substrat auch in fester Form auf die Oberfläche einer rein wässrigen Vesikellösung gestreut werden (fest/flüssig Phasentransfer).

2.3. Hydrophile Beladung des Vesikelkerns

Der mit Lösemittel gefüllte, hydrophile Kern der Vesikel bietet ideale Voraussetzungen für die Verkapselung hydrophiler Substrate. Durch die hydrophobe Vesikelschale sind verkapselte Substrate von der Umgebung separiert und somit geschützt bzw. für die Umgebung 'unsichtbar', was diese 'Containersysteme' für Anwendungen interessant macht (s. Abs. 2.4).

Präparativ wird die hydrophile Beladung realisiert, indem in den vorgestellten Methoden (s. Abs. 2.1.4) das reine Wasser als selektives Lösemittel durch eine wässrige Lösung des

hydrophilen Substrats ersetzt wird. Nach der Strukturbildung befindet sich das hydrophile Substrat dann sowohl im Vesikelkern, als auch gelöst in der Umgebungslösung. Durch geeignete Trennmethode, wie z.B. Dialyse oder Ultrafiltration, können die beladenen Vesikel vom überschüssigen Substrat in Lösung separiert werden. Die hydrophilen Modell-Substrate müssen sich idealerweise gut in Wasser lösen und auch in hoher Verdünnung noch nachweisbar sein. Die Gegenwart reaktiver oder geladener Gruppen sollte vermieden werden, da diese mit dem PEO-Block oder der terminierenden Carbonsäuregruppe reagieren könnten.

Der Farbstoff mit dem Handelsnamen 'Phloxin B' (Acid Red 92, PhB) erfüllt diese Bedingungen. Die chemische Struktur ist in Abbildung 2.14a gezeigt. Die Wahl fiel aber gerade deshalb auf Phloxin B als hydrophiles Modell-Substrat, da den Farbstoff ein wichtiger Vorteil gegenüber anderen fluoreszierenden Farbstoffen auszeichnet: seine Eigenschaft als pH-Indikator. So emittiert er nur in einem pH-Bereich von 2.5-7 wohingegen die Fluoreszenz im stark sauren oder basischen Bereich gequenchet wird. Findet die Vesikelbeladung im neutralen pH-Bereich statt, so fluoresziert der Farbstoff innerhalb und außerhalb der Vesikel. Wird die äußere Phase anschließend durch Säurezugabe bei $\text{pH} < 2$ eingestellt, emittieren die überschüssigen, freien Farbstoffe in Lösung nicht mehr. Die Phloxin B Moleküle, die sich im Vesikelkern befinden, sollten jedoch durch die hydrophobe Vesikelschale zumindest zeitweise von der sauren Umgebung geschützt sein. Ihre Emission soll dann detektiert und somit die erfolgreiche Beladung nachgewiesen werden (s. Abb. 2.14b).

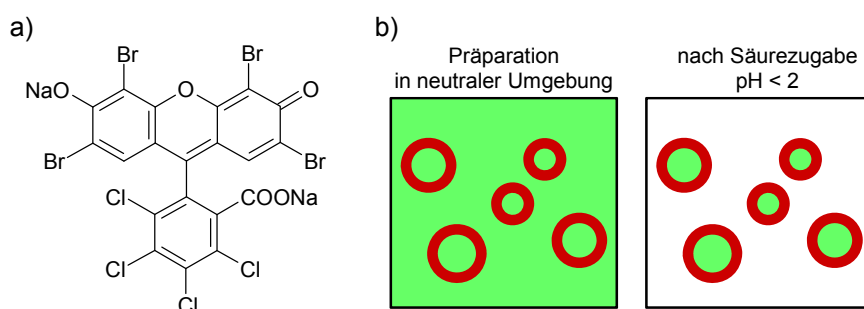


Abb. 2.14: a) Chemische Struktur von Phloxin B; b) Präparationsprinzip: nach der Fluoreszenzlöschung durch pH-Änderung emittieren nur noch die beladenen Vesikel (hydrophobe Schale in rot, fluoreszierendes Phloxin B in grün)

Eine bereits bekannte Methode nutzt einen solchen pH-Gradienten über die Vesikelmembran als Triebkraft für eine aktive, hydrophile Beladung des Vesikelkerns. Das verwendete Substrat Doxorubicin ist dabei in neutraler Vesikelumgebung ungeladen und kann durch die Vesikelmembran diffundieren. Durch einen sauren pH-Wert im Vesikelkern wird das Substrat protoniert, kann als geladene Spezies die Vesikelmembran nicht mehr passieren und reichert sich somit im Vesikelkern an [Eisenberg 2005].

2.4. Mögliche Anwendungen

Die Hohlraum-Morphologie mit hydrophober Vesikelschale und hydrophilem Vesikelkern eröffnet die Möglichkeit Substrate mit unterschiedlicher Polarität und Löslichkeit in ein- und demselben Partikel zu verkapseln und somit in der wässrigen Umgebung der Vesikel zu dispergieren. Für diese Nano-Container sind viele Anwendungen denkbar, die sich diese Löslichkeit im wässrigen Medium bei gleichzeitiger Abschirmung der Substrate durch die hydrophobe Schale zu Nutze machen. So lassen sich z.B. Farbpigmente gleichmäßiger verteilen bzw. überhaupt in Wasser dispergieren.

Das große Interesse an Polymersomen im Bereich der Biomedizin basiert hauptsächlich auf der großen Ähnlichkeit mit sogenannten 'stealth' (engl., Heimlichkeit) Liposomen. Diese Liposomen besitzen Polyethylenglykole (PEG) auf ihrer Oberfläche. Das Immunsystem des Körpers reagiert nicht auf diese 'Beschichtung', wodurch eine längere Verweildauer im Körper ermöglicht wird. Zusätzlich führt die Größe dieser Nanopartikel (50-100nm) zu einer erhöhten Anreicherung in krankhaften Zellen wie z.B. Tumoren ('enhanced permeability and retention' (EPR) Effekt) [Hosokawa]. Durch die bereits erwähnten Vorteile der polymeren Vesikel, wie höhere Stabilität und geringere Permeabilität der Membran sowie eine dichtere Polymeroberfläche, eröffnen sich neue Möglichkeiten in der Anwendung als 'drug delivery' Systeme (engl., Medikamententransport) [Torchilin 2006]. Die Möglichkeit, hydrophob beladene, fluoreszierende Polymersomen zur Tumorerkennung einzusetzen, wurde für das PB-PEO-System bereits erfolgreich *in vivo* an Ratten gezeigt [Therien 2005]. Eine Beladung mit magnetischen Substraten führt zu magnetischen Vesikeln und damit zur Erweiterung der Möglichkeiten der Detektion als auch der gezielten Anreicherung [Lecommandoux 2005]. Durch die Einlagerung von Intermembran-Proteinen in die Vesikelmembran kann die Permeabilität der Schale auf die Bedürfnisse angepasst werden. Bei gleichzeitiger Verkapselung eines Enzyms im Vesikelkern können Nanoreaktoren geschaffen werden, in denen das Enzym von einer eventuell schädlichen Umgebung abgeschirmt und somit in seiner Aktivität nicht beeinflusst wird [Meier 2000].

3. Charakterisierungsmethoden

3.1. Lichtstreuung

Die Analyse des Streulichts eines Lasers an einer gelösten Probe ist eine wichtige Methode zur Charakterisierung von Polymeren [9]. Sie ermöglicht, Informationen über die statischen und dynamischen Eigenschaften der gelösten Makromoleküle zu erhalten.

Bei einem Lichtstreuexperiment wird Laserlicht durch eine Probenlösung gestrahlt. Das oszillierende elektrische Feld dieses Primärstrahls induziert in den Elektronenhüllen der Moleküle oszillierende Dipole. Diese emittieren das Licht dann als ungerichtetes Streulicht, dessen Intensität mit einem Detektor winkelabhängig gemessen wird. Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau einer Lichtstreuapparatur.

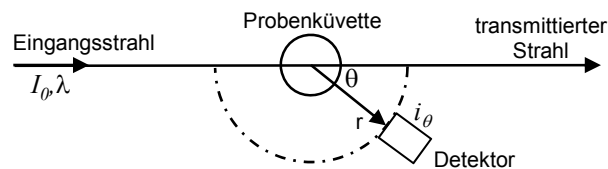


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer Lichtstreuapparatur

In der statischen Lichtstreuung (SLS) beobachtet man die über einen längeren Zeitraum gemittelte Streuintensität bei verschiedenen Winkeln θ . Aus dieser erhält man Informationen zur Struktur der Moleküle: Das Gewichtsmittel der Molmasse M_w , den zweiten Virialkoeffizient des osmotischen Drucks A_2 und das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats $\langle R_g^2 \rangle_z$.

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) beobachtet man dagegen die zeitliche Fluktuation der Streuintensität, und erhält Informationen über die dynamischen Eigenschaften der Probe wie das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z , aus dem dann der kugeläquivalente hydrodynamische Radius R_h als $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ ermittelt werden kann.

Statische Lichtstreuung (SLS)

Die Theorie der statischen Lichtstreuung in Flüssigkeiten geht zurück auf Smoluchowski, Einstein und Debye, und wird meist als Fluktuationstheorie bezeichnet. Nach dieser Theorie beruht die Streuung des Lichts auf Schwankungen der Polarisierbarkeit α , hervorgerufen durch Dichte- und Konzentrationsschwankungen in Folge der thermischen Bewegung im Streumedium. Da die Streuintensität der Lösung in Relation zu der des reinen Lösemittels gemessen wird, sind jedoch nur Konzentrationsschwankungen zu berücksichtigen.

Ersetzt man die Schwankungen der Polarisierbarkeit durch Schwankungen des Brechungsindex n , erhält man für Lösungen kleiner Teilchen (Durchmesser $< \lambda/20$)

$$\frac{i_\theta}{I_0} \sim C \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \left(\frac{\delta\mu}{\delta C} \right)_{T,P}^{-1} \quad (3.1)$$

mit der Differenz der Streuintensität $i_\theta = i(\text{Lösung}) - i(\text{Lösemittel})$, der Intensität des Primärstrahls I_0 , der Konzentration C , dem Brechungsindexinkrement (dn/dC) und der lokalen Fluktuation des chemischen Potentials mit der Konzentration $(\delta\mu/\delta C)_{T,P}$. Aus der Thermodynamik ergibt sich ein Zusammenhang mit dem osmotischen Druck π , da $(\delta\mu/\delta C)_{T,P} = (\delta\pi/\delta C)_{T,P}$. Beschreibt man den osmotischen Druck mit Hilfe einer Virialreihe der Konzentration

$$\frac{\pi}{C} = RT \left(\frac{1}{M_n} + A_2 C + A_3 C^2 + \dots \right) \quad (3.2)$$

und bricht nach dem zweiten Glied ab, so erhält man aus Gleichung 3.1

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2 C \quad (3.3)$$

mit der Molmasse des Polymers M , dem zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks A_2 (welcher Wechselwirkungen zwischen dem gelösten Polymer und dem Lösemittel beschreibt), und der optischen Konstante K , die sich aus obigen Parametern und dem Brechungsindex des Mediums n_0 , sowie der Wellenlänge des Primärstrahls im Vakuum λ_{vac} wie folgt zusammensetzt:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_{vac}^4 N_A} n_0^2 \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \quad (3.4)$$

Das Rayleigh-Verhältnis R_θ hängt von der Distanz r des Detektors zum Streuvolumen ab:

$$R_\theta = r^2 \frac{i_\theta}{I_0} \quad (3.5)$$

Ohne Kenntnis der Gerätegeometrie kann es nach der Messgerät-Kalibrierung mittels eines Standards wie Toluol, dessen absolute Streuintensität I_{abs} bekannt ist, wie folgt erhalten werden:

$$R_\theta = \frac{i(\text{Lösung}) - i(\text{Lösemittel})}{i(\text{Toluol})} I_{abs}(\text{Toluol}) \quad (3.6)$$

Für polydisperse Polymerlösungen mit einer Molmassenverteilung erhält man aus der statischen Lichtstreuung das Gewichtsmittel der Molmasse M_w :

$$M_w = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i} \quad (3.7)$$

Die Auswertung statischer Lichtstreuexperimente an verdünnten Polymerlösungen erfolgt in der Regel mit Hilfe der Zimm-Gleichung

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z + \dots \right) + 2A_2 C + \dots \quad (3.8)$$

mit dem z-Mittel des Trägheitsradienquadrats $\langle R_g^2 \rangle_z$ und dem Betrag des Streuvektors q , der über den Streuwinkel θ definiert ist als:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_{vac}} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.9)$$

Durch Auftragung des Zimm-Plots (s. Abb. 3.2) mit KC/R_θ gegen q^2+kC (wobei k eine Skalierungskonstante ist) und Extrapolation auf $C \rightarrow 0$ und $q \rightarrow 0$, erhält man das Gewichtsmittel der Molmasse M_w , den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks A_2 und das z-Mittel des Trägheitsradius $\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$.

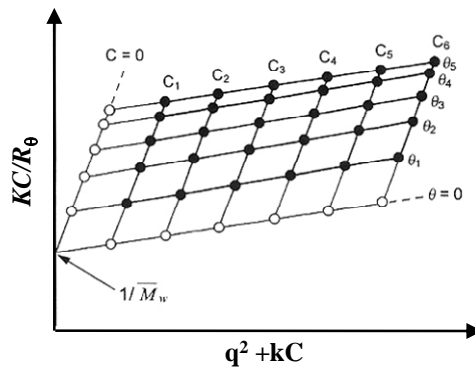


Abb. 3.2 [Tiege]: Zimm-Plot KC/R_0 gegen q^2+kC mit Extrapolation $C \rightarrow 0$ und $q \rightarrow 0$

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die zeitliche Fluktuation der Streuintensität beobachtet. Diese Intensitätsfluktuation entsteht durch Diffusion der gelösten Partikel in und aus dem Streuvolumen. Da die Geschwindigkeit der Diffusion bei gleicher Temperatur von der Größe der gelösten Partikel abhängt, lässt sich diese durch dynamische Lichtstreuung messen. Dabei werden die detektierten, gestreuten Photonen nicht über einen Zeitraum gemittelt wie im statischen Lichtstreuexperiment, sondern mit sich selbst korreliert.

In der Autokorrelationsfunktion

$$g_2(t) = \langle i(0)i(n \cdot \tau) \rangle_{abs} \quad (3.10)$$

wird die Streuintensität $i(0)$ zu einem zeitlichen Startpunkt $t_{abs}=0$ mit der Streuintensität $i(t)$ zu einem Zeitpunkt um $t=n\tau$ später multipliziert, wobei n die durch die minimale Korrelationszeit τ separierten Kanäle nummeriert. Dieser Vorgang wird sehr häufig für unterschiedliche Startzeiten $t_{abs}=0$ durchgeführt und anschließend über alle Werte gemittelt $\langle \rangle_{abs}$. Als Maximalwert der Autokorrelationsfunktion $g_2(t)$ erhält man für $t \rightarrow 0$ das Quadrat der Streuintensität $\langle i^2 \rangle$ zum Startpunkt $t_{abs}=0$.

Für zunehmende Korrelationszeiten t fällt die Funktion bis auf den Wert $\langle i \rangle^2$ (das Quadrat der Basislinie) ab. Dieser Abfall der Funktion erfolgt um so schneller, je schneller die Streuintensität fluktuiert, das heißt je schneller und somit kleiner die gelösten Partikel in der Probe sind (s. Abb. 3.3).

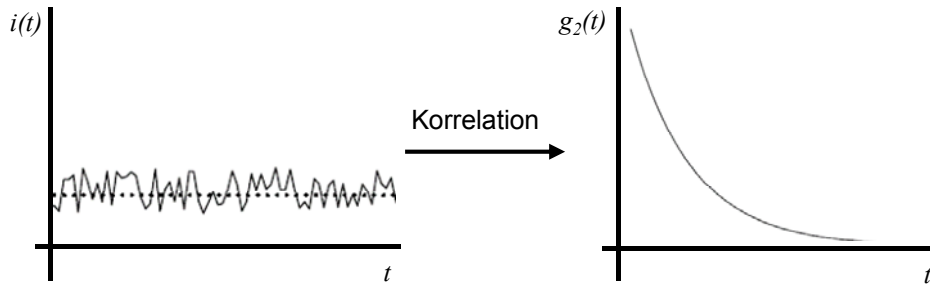


Abb. 3.3 [Schärftl]: Fluktuierende Streuintensität $i(t)$ und Autokorrelationsfunktion $g_2(t)$

Mit Hilfe der Siegert-Relation

$$g_1(t) = \sqrt{\frac{g_2(t) - A}{A}} \quad (3.11)$$

erhält man aus der Autokorrelationsfunktion der Streuintensität $g_2(t)$ und der experimentell ermittelten Basislinie A (wobei $A = \langle i \rangle^2$ gilt) die Korrelationsfunktion der Streuamplitude $g_1(t)$. Für eine rein diffuse Bewegung der Teilchen im Streuvolumen gilt für kleine, monodisperse Partikel, dass die Korrelationsfunktion $g_1(t)$ einem einfach-exponentiellen Abfall folgt:

$$g_1(t) = B \cdot \exp(-q^2 D t) \quad (3.12)$$

Die Abfallkonstante setzt sich dabei aus dem Betrag des Streuvektors q (s. Gl. 3.9) und dem translatorischen Diffusionskoeffizienten D zusammen. Die Konstante B steht für das Signal-Rausch-Verhältnis und hängt vom optischen Aufbau des Experiments ab. Für kleine, polydisperse Teilchen ergibt sich die Korrelationsfunktion aus der Summe der Exponentialfunktionen der einzelnen Komponenten (mit Index i):

$$g_1(t) = B \frac{\sum m_i M_i \exp(-q^2 D_i t)}{\sum m_i M_i} \quad (3.13)$$

Aus der Anfangssteigung der logarithmierten Auftragung erhält man in diesem Fall einen scheinbaren, apparenten Diffusionskoeffizienten D_{app} :

$$\left[\frac{d(\ln g_1(t))}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = -q^2 \frac{\sum m_i M_i D_i}{\sum m_i M_i} \equiv -q^2 D_{app} \quad (3.14)$$

Eine gängige Methode für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten bei polydispersen Systemen ist die Näherung der logarithmierten Korrelationsfunktion durch eine Kumulantenreihe:

$$\ln g_1(t) = -\Gamma t + \frac{\mu_2}{2!} \Gamma^2 t^2 - \frac{\mu_3}{3!} \Gamma^3 t^3 + \dots \quad (3.15)$$

Hierbei steht μ_i für den i -ten Kumulanten, und die Anfangssteigung Γ dieser Fit-Funktion hängt mit dem apparenten Diffusionskoeffizienten D_{app} zusammen:

$$\Gamma = \overline{D_{app}} q^2 \quad (3.16)$$

Für den Fall, dass $g_1(t)$ nur von der Translationsdiffusion der Teilchen abhängt, stellen die höheren Kumulanten in Gleichung 3.15 ein qualitatives Maß für die Polydispersität der Probe

dar. So ist im Falle des Modells harter Kugeln der zweite Kumulant mit der Standardabweichung σ_D der Diffusionskoeffizienten-Verteilung verknüpft [Schärtl]:

$$\mu_2 = \frac{\left(\overline{D_z^2} - \overline{D_z}^2\right)}{\overline{D_z}^2} = \sigma_D^2 \quad (3.17)$$

Für engverteilte Proben ergeben sich Werte für μ_2 im Bereich 0.05 - 0.1, während Werte größer 0.1 auf polydisperse Systeme hinweisen.

Von dem so erhaltenen scheinbaren Diffusionskoeffizienten D_{app} (s. Gl. 3.14 bzw. 3.16) führt eine Extrapolation $q \rightarrow 0$ zum z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z :

$$\lim_{q \rightarrow 0} [D_{app}(q)] = D_z \quad (3.18)$$

Aus diesem Diffusionskoeffizienten lässt sich über die Stokes-Einstein-Beziehung für die gelösten Partikel in der Probe das inverse z-Mittel eines kugeläquivalenten, hydrodynamischen Radius R_h berechnen:

$$\langle R_h \rangle \equiv \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} \quad (3.19)$$

η_0 steht hier für die Viskosität des Lösemittels bei Temperatur T , k ist die Boltzmann-Konstante.

Das ρ -Verhältnis

Das ρ -Verhältnis ist wie folgt durch den Trägheitsradius R_g und den kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius R_h definiert [Schmidt 1981]:

$$\rho = \frac{\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}}{\left(\left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z\right)^{-1}} \quad (3.20)$$

Durch den Vergleich des experimentell aus statischer und dynamischer Lichtstreuung bestimmten ρ -Wertes mit dem theoretisch berechneten Wert ist es möglich, Aussagen über die Geometrie der untersuchten Makromoleküle zu treffen (s. Tab. 3.1).

Tab. 3.1 [9]: ρ -Verhältnis verschiedener Teilchengemetrien

Teilchengemetrie	theoretisch berechnetes ρ -Verhältnis
harte Kugel	0.775
Hohlkugel	1

3.2. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) ist eine Methode zur Beobachtung der freien Diffusion fluoreszierender Moleküle in Lösung. Während der Messung verursacht die Diffusion einzelner Fluorophore in und aus dem Beobachtungsvolumen eine Intensitätsfluktuation der erfassten Emission. Durch Korrelation dieses zeitabhängigen Intensitätssignals kann der Diffusionskoeffizient des Fluorophors ermittelt werden [Lakowicz].

Abbildung 3.4 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer FCS-Apparatur. Das Beobachtungsvolumen wird durch einen fokussierten Laserstrahl und einen konfokalen Aufbau geformt. Es hat eine ellipsoide Form mit einer Ausdehnung von etwa 300nm lateral und etwa 1.5µm in z-Richtung. Während der Messung sind idealer Weise nur wenige Fluorophore zeitgleich in diesem Volumen (Partikelkonzentration im nM-Bereich) und werden durch den Laser angeregt. Das Emissionslicht passiert einen dichroitischen Spiegel und wird von einer Avalanche Photodiode detektiert. Eventuelles Licht, dass von Bereichen außerhalb des Beobachtungsvolumens stammt, wird durch eine Lochblende vor dem Detektor abgeblockt.

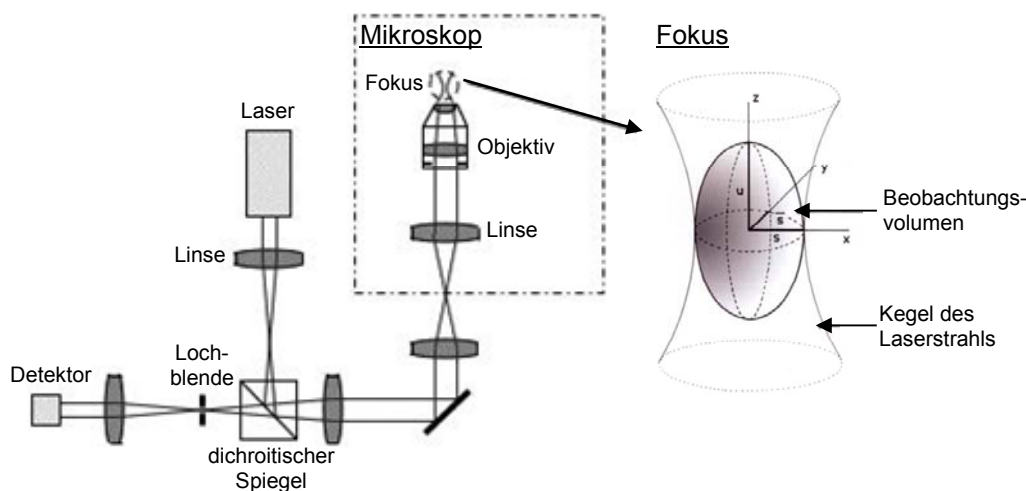


Abb. 3.4 [Lakowicz]: Prinzipieller Aufbau einer FCS-Apparatur mit Vergrößerung des Fokusbereichs; der gezeichnete Rand des Beobachtungsvolumens entspricht dem Abstand (s bzw. u) in dem die Maximal-Intensität I_0 auf den Wert $I=I_0 \cdot \exp^{-2}$ abgefallen ist.

Das Prinzip der FCS kann anhand folgender Abschätzung veranschaulicht werden: Geht man vereinfacht von einem zylindrischen Beobachtungsvolumen mit den oben genannten Ausdehnungen aus, würde das Volumen nach $V=\pi r^2 h$ etwa $0.1 \cdot 10^{-15} \text{ l}$ betragen. Bei einer Fluorophorkonzentration von 10nM würden sich im Mittel 0.6 Moleküle dort aufhalten (im Falle eines stationären Experiments). Auf Grund der zufälligen Diffusion der Fluorophore kommt es zur zeitabhängigen Fluktuation der Molekülanzahl im Volumen, und daraus resultierend zur zeitabhängigen Fluktuation der Fluoreszenzintensität, die zur Auswertung korreliert wird (s. Abb. 3.5). Basierend auf einer Poisson-Verteilung

$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \quad (3.21)$$

kann die Wahrscheinlichkeit $P(n,N)$ berechnet werden, mit der sich zeitgleich n Fluorophore im Volumen aufhalten, wenn die Fluorophoranzahl im Mittel N beträgt. In Abbildung 3.5 sind beispielhaft für $N=0.6$ (s.o.) die Wahrscheinlichkeiten für kein, ein und zwei Fluorophore im Beobachtungsvolumen angegeben.

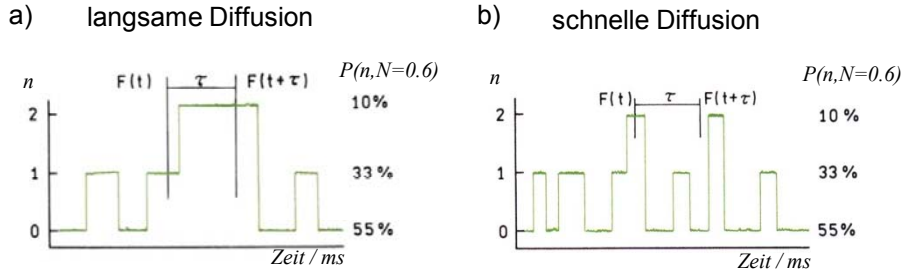


Abb. 3.5 [Lakowicz]: Zeitabhängige Fluktuation der Anzahl Fluorophore n im Beobachtungsvolumen einer FCS-Apparatur; a) langsame Diffusion, b) schnelle Diffusion.

In der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität (normiert auf die mittlere Intensität im Quadrat)

$$G'(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.22)$$

wird die Fluoreszenzintensität $F(t)$ zu einem zeitlichen Startpunkt t (wobei $t_{abs}=0$) mit der Fluoreszenzintensität $F(t+\tau)$ zum späteren Zeitpunkt $(t+\tau)$ multipliziert. Dieser Vorgang wird sehr häufig für unterschiedliche Startzeiten $t_{abs}=0$ durchgeführt und anschließend über alle Werte gemittelt $\langle \rangle$. Die entscheidende Größe ist dabei die Fluktuation $\delta F(t)$ der Intensität $F(t)$ um den Mittelwert $\langle F \rangle$, gegeben durch $\delta F(t) = \langle F \rangle - F(t)$, so dass wir Gleichung 3.22 umformen können

$$G'(\tau) = \frac{\langle F(0)F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.23)$$

und die Autokorrelationsfunktion der Intensitätsfluktuation erhalten:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.24)$$

Geht man davon aus, dass die Fluktuation der Fluoreszenzintensität nur durch Fluktuation der lokalen Fluorophorkonzentration δC hervorgerufen wird (und nicht durch andere Prozesse wie Intersystem-Crossing in strahlungslose Triplet-Zustände etc.), erhält man

$$G(\tau) = \frac{B^2 \iint p(r)p(r') \langle \delta C(r,0)\delta C(r',\tau) \rangle dVd'V}{\left[BC \int p(r)dV \right]^2} \quad (3.25)$$

mit der mittleren Konzentration C , der Helligkeit B (als Produkt aus Detektionseffizienz, Absorptionsquerschnitt und Quantenausbeute der Emission), der Position r des Fluorophors zum Zeitpunkt $t=0$ (bzw. r' wenn $t=\tau$) sowie dem Detektionsprofil $p(r)$ (bzw. $p(r')$) an der Position r (bzw. r').

Das Detektionsprofil entspricht dem Intensitätsprofil des fokussierten Laserstrahls, das über eine konfokale Optik beobachtet wird und in guter Näherung durch eine dreidimensionale Gauß-Funktion beschrieben werden kann

$$p(r) = I_0 \exp\left[-2(x^2 + y^2)/s^2\right] \exp(-2z^2/u^2) \quad (3.26)$$

wobei s und u die Ausdehnung des ellipsoiden Volumens beschreiben (s. Abb. 3.4). Für dreidimensionale Diffusion ist die Korrelationsfunktion gegeben durch

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle = \bar{C} (4\pi D\tau)^{2/3} \exp\left[-|r - r'|^2 / 4D\tau\right] \quad (3.27)$$

mit dem Diffusionskoeffizient D . Durch Einsetzen der Gleichung 3.27 in Gleichung 3.25 sowie mathematischen Umformungen erhält man die Korrelationsfunktion für dreidimensionale Diffusion im Beobachtungsvolumen der FCS-Apparatur

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{4D\tau}{s^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{u^2}\right)^{-1/2} \quad (3.28)$$

mit der Amplitude $G(0)$ für $\tau=0$. Die konkrete Auswertung der FCS-Messdaten erfolgt mit der Gleichung [Rigler]

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (3.29)$$

die durch Umformen aus Gleichung 3.28 mit der mittleren Anzahl Fluorophore N im Beobachtungsvolumen V mit dem Verhältnis $S=z_0/r_0$ der axialen zur radialen Ausdehnung sowie der Diffusionszeit τ_D erhalten wird. Für fluoreszierende Partikel, die nicht dem Ideal eines punktförmigen Fluorophors entsprechen, hängt die Diffusionszeit τ_D mit dem Diffusionskoeffizient wie folgt zusammen [Rigler]:

$$D = (r_0^2 + R_h^2) / 4\tau_D \quad (3.30)$$

R_h ist der hydrodynamische Radius, der für sphärische Partikel über die Stokes-Einstein-Gleichung (vgl. Gl. 3.19) mit dem Diffusionskoeffizient D verknüpft ist, so dass zusätzlich ein Iterationsverfahren zur Auswertung nötig ist.

Die notwendige Bestimmung des Beobachtungsvolumens ($S=z_0/r_0$) wird klassischer Weise durch Kalibrierung mit einem Fluorophor wie Rhodamin 6G in Wasser durchgeführt, dessen Diffusionskoeffizient bekannt ist ($D_{25^\circ\text{C}} = 2.8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [Magde 1974]).

3.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) dient zur Strukturaufklärung, da sie Objekte mit Hilfe eines Elektronenstrahls vergrößert darstellt. Die Auflösung eines Lichtmikroskops ist begrenzt, da der dichteste Abstand Δx zweier Linien, die noch getrennt werden können, proportional von der Wellenlänge λ abhängt. Bei Verwendung sichtbaren Lichts ist daher nur eine Auflösung von Strukturen größer als 500nm möglich. Verwendet man anstelle des Lichts einen Elektronenstrahl, so ist ein Auflösungsvermögen bis in den molekularen Bereich von

etwa 2nm möglich, da beschleunigte Elektronen eine $\approx 10^5$ mal kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht besitzen.

Ein Elektronenmikroskop besteht aus einer Strahlquelle, meist einer Glühkathode zur Erzeugung des Elektronenstrahls, einem System aus magnetischen Linsen und einem Leuchtschirm bzw. einer Detektorplatte zur digitalen Verarbeitung der Aufnahmen. Eine schematische Zeichnung des Strahlengangs ist in Abbildung 3.6 gezeigt.

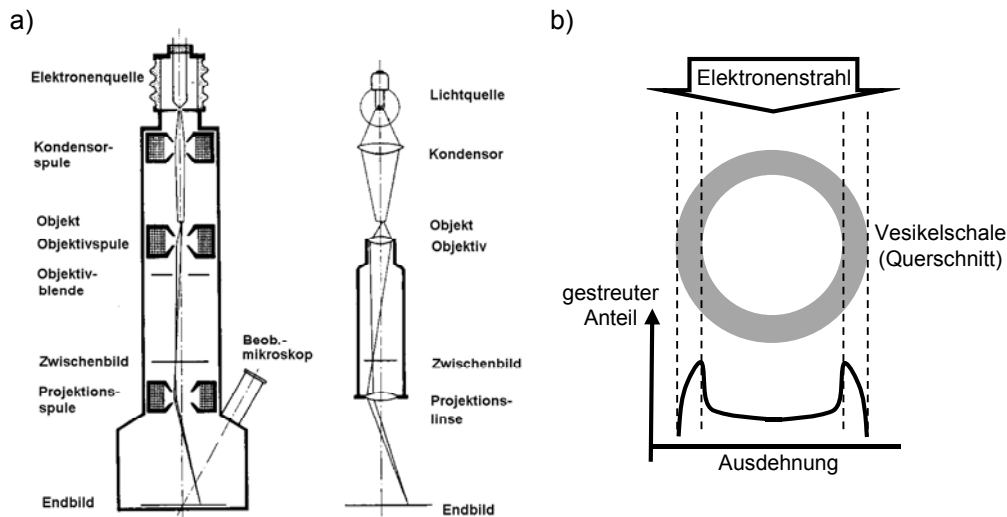


Abb. 3.6: a) [Vogel] Strahlengang im Elektronenmikroskop und im Lichtmikroskop; b) Kontrast nach Transmission durch ein Vesikel.

Durch Ultradünnschnitte aus festen Proben oder durch Eindampfen gelöster Proben auf ein graphitbeschichtetes Kupfergitter werden sehr dünne Schichten erzeugt, durch die der Primärstrahl geleitet wird. Beim Durchgang durch die Probe wird der Elektronenstrahl von Atomen höherer Ordnungszahl und von Objektbereichen mit größerer Dichte stärker gestreut (Massen-Dicken-Kontrast). Dadurch entsteht eine Intensitätsverteilung, die der Struktur der Probe entspricht und abgebildet werden kann. Die Intensitätsverteilung des transmittierten Strahls nach dem Durchgang durch ein Vesikel ist in Abbildung 3.6b schematisch dargestellt. Um während der Messung Stöße der Elektronen mit Molekülen der Luft zu verhindern, steht die Apparatur unter Hochvakuum. Daher sind TEM-Aufnahmen nur von getrockneten Proben möglich. Im Falle der polymeren Vesikel, deren Struktur nur durch das selektive Lösemittel stabil ist, würde das Trocknen zum Zerfall führen. Nur nach der Strukturfixierung durch Vernetzung (s. Abs. 2.1.5) sind die Vesikel auch im getrockneten Zustand existent und somit im TEM abbildbar. Um mikroskopische Aufnahmen der unvernetzten Vesikel zu erhalten, können cryogene TEM-Messungen durchgeführt werden.

Cryogene Transmissionselektronenmikroskopie

Die cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) ist eine Methode zur Messung biologischer Proben in einem Zustand, der ihrem natürlichen Zustand in Wasser sehr nahe kommt. Die gelöste Probe wird dabei auf ein graphitbeschichtetes Kupfergitter aufgetropft, dessen Kohlefilm Löcher einer definierten Größe im μm -Bereich aufweist. Das überschüssige Wasser wird abgetupft, so dass in den Löchern nur ein dünner ($\approx 100\text{nm}$) Film zurückbleibt,

in den die Zellen oder Vesikel eingebettet sind. Dieser Film wird in flüssigem Ethan (bei etwa -90°C) oder flüssigem Propan (bei etwa -40°C) schockgefroren. Dabei kristallisiert das Wasser nicht, sondern bildet vitrifiziertes (glasartiges) Eis. Eine Übersicht über die Probenpräparation ist in Abbildung 3.7 gezeigt.

An dieser gefrorenen Probe ist es nun möglich mit Hilfe eines gekühlten Halters TEM-Aufnahmen zu machen, da die Strukturen in einem nahezu natürlichen Zustand fixiert und gegen Vakuumeinflüsse geschützt sind [Vitrobot]. Da die Probe jedoch nur im umgebenden, vitrifizierten Wasserfilm abgebildet werden kann, sind die Kontrastunterschiede zwischen dem Wasserfilm (als Hintergrund) und der Probe selbst häufig sehr schwach. Aus diesem Grund sollten die Wasserfilme so dünn wie möglich sein.

Es sei angemerkt, dass die Strukturen durch den gefrorenen Wasserfilm in dieser Methode zwar, im Vergleich zu ihrem Zustand in Lösung, nahezu unverändert vorliegen, die dreidimensionale Information der Struktur geht durch die Abbildung in Transmission jedoch verloren. Das erhaltene Bild entspricht stets nur der zweidimensionalen Projektion der dreidimensionalen Struktur (vgl. Abb. 3.6b) [Discher 2002].

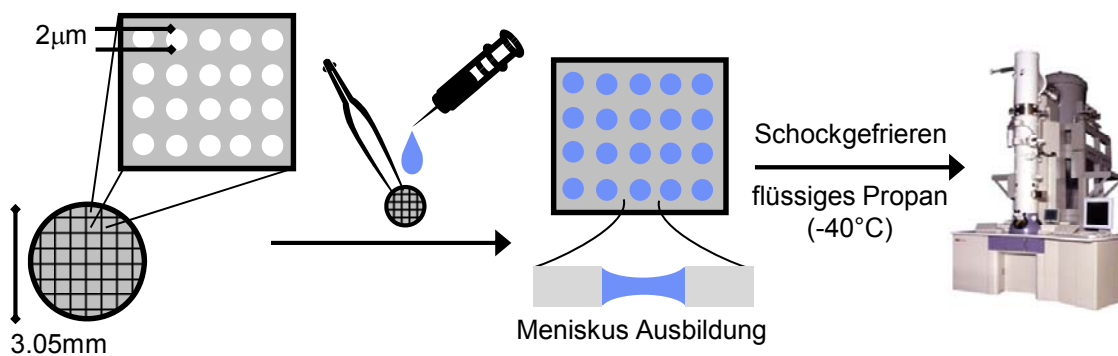


Abb. 3.7: Probenpräparation für cryo-TEM Messungen: Ausgehend von einem Kupfergitter mit löchrigem Kohlefilm, auf das die Probe aufgetropft wird, so dass nach Abtupfen ein dünner Wasserfilm bleibt, der dann schockgefroren wird.

3.4. Weitere Methoden

3.4.1. Absorptionsspektroskopie

In der UV/VIS-Absorptionsspektroskopie werden Moleküle mit elektromagnetischen Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Wellenlängenbereichs (VIS für 'visible') bestrahlt. Dabei werden im Molekül Valenzelektronen in den Orbitalen der äußeren Schalen angeregt und auf höhere Energieniveaus angehoben. Anhand der Energieabsorption erhält man Informationen über die Probe, wie z.B. die Anwesenheit bestimmter Moleküle oder Bindungsverhältnisse in Molekülen. Nach entsprechender Kalibrierung ist auch eine Konzentrationsbestimmung möglich.

Die Lichtquelle des Spektrometers strahlt Licht mit Wellenlängen im UV/VIS-Bereich aus. Im Monochromator wird während der Messung nach und nach jede einzelne Wellenlänge (im möglichen Bereich von 200nm bis 800nm) selektiert. Ein Sektorspiegel leitet das Licht abwechselnd durch die Probenküvette und durch die Vergleichsküvette mit reinem Lösemittel. Im Detektor werden die beiden Strahlintensitäten verglichen und anschließend am PC das Intensitätsspektrum der Probe in Abhängigkeit der Wellenlänge aufgetragen.

3.4.2. Fluoreszenzspektroskopie

Mit der Fluoreszenzspektroskopie können fluoreszierende Moleküle untersucht werden. Die Moleküle werden dabei mit elektromagnetischen Wellen aus dem UV/VIS-Bereich angeregt (s. Abs. 3.4.1) und auf höhere Energieniveaus angehoben. Innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} s nach der Anregung geben die Moleküle die absorbierte Energie in Form von Strahlung gleicher Wellenlänge (Resonanz-Fluoreszenz) oder langwelligerer Strahlung (Stokesche Regel) wieder ab. In seltenen Fällen kann die emittierte Strahlung auch energiereicher (d.h. kurzwelliger) als die Anregungsstrahlung sein. Die für solche Anti-Stokes-Linien zusätzlich erforderliche Energie kann z.B. aus dem thermischen Energievorrat stammen [Römpf]. Eine schematische Darstellung der möglichen Übergänge zwischen Grund-, Singulett- und Triplett-Zustand ist anhand des sogenannten Jablonski-Diagramms in Abbildung 3.8a gegeben.

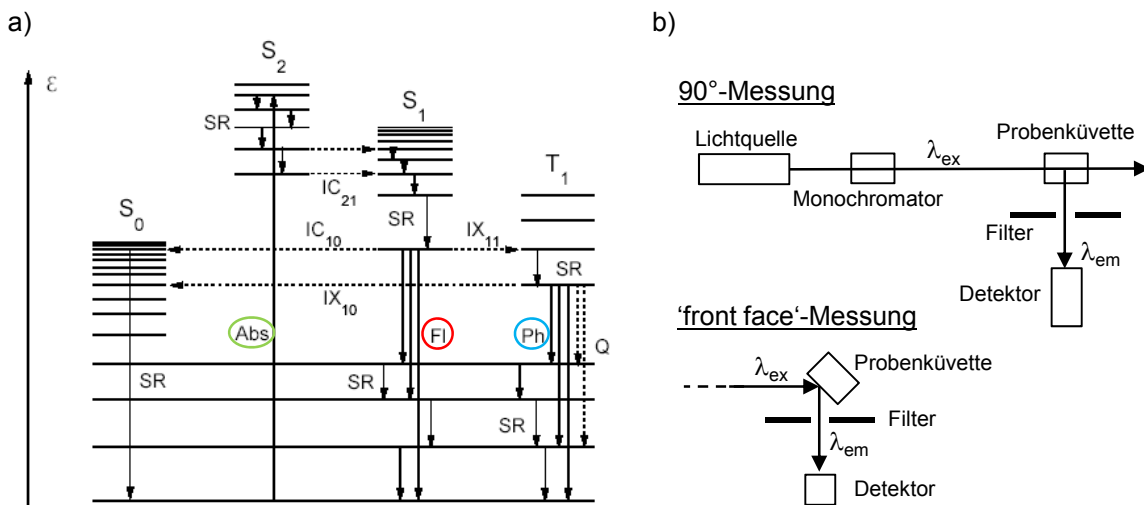


Abb. 3.8: a) Jablonski-Diagramm [Petzke], farblich hervorgehoben sind Absorption (grün), Fluoreszenz (Stokes-Linien, rot), Phosphoreszenz (blau); b) Prinzipieller Messaufbau

Die Lichtquelle des Spektrometers strahlt Licht mit Wellenlängen im UV/VIS-Bereich aus. Ein Monochromator ermöglicht die Selektion einzelner Wellenlängen des Anregungslichts (im möglichen Bereich von 220nm bis 750nm), das dann durch die Probenküvette geleitet wird. Orthogonal zur Anregung erfasst der Detektor die emittierte Fluoreszenzintensität. Zwischen Küvette und Detektor trennt ein passendes Filtersystem (Langpass-Filter) das emittierte Licht von eventuell gestreutem Anregungslicht (s. Abb. 3.8b). Für hochkonzentrierte Proben, die zu

Reabsorption des emittierten Fluoreszenzlichts neigen, kann es notwendig sein in 'front face' als Detektionsgeometrie zu messen, siehe dazu Abbildung 3.8b.

Prinzipiell sind zwei Messmethoden zu unterscheiden: Zur Messung von Emissionsspektren wird die Anregungswellenlänge im Bereich der Absorption λ_{abs} des zu untersuchenden Moleküls konstant eingestellt ($\lambda_{ex}=konstant$), der Detektor wertet die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der detektierten Wellenlänge λ_{em} aus. Zur Messung von Anregungsspektren wird hingegen die Wellenlänge der Detektion im Bereich des Emissionspeaks des zu untersuchenden Moleküls konstant eingestellt ($\lambda_{em}=konstant$) und die Anregungswellenlänge variiert, so dass der Detektor die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge λ_{ex} aufnimmt. Die Peakpositionen des Anregungsspektrums entsprechen dabei in der Regel denen des Absorptionsspektrums.

3.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Im zu untersuchenden Präparat befinden sich Fluorophore, die nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (λ_{ex}) die aufgenommene Energie als längerwelliges Fluoreszenzlicht (λ_{em}) wieder emittieren (s. Abs. 3.4.2). Über einen klassischen Auflichtmikroskop-Aufbau ist es möglich die fluoreszierenden Bereiche vergrößert abzubilden.

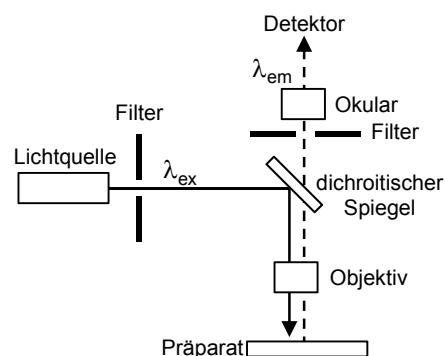


Abb. 3.9: Prinzipieller Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops

Der prinzipielle Aufbau eines sogenannten Epifluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Die Lichtquelle des Mikroskops strahlt Licht mit Wellenlängen im UV/VIS-Bereich aus. Durch einen passenden Filter wird die zur Anregung des Fluorophors geeignete Wellenlänge selektiert und über einen dichroitischen Spiegel und ein geeignetes Objektiv auf das zu untersuchende Präparat gelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht folgt der Richtung des Anregungslichts zurück, bis es den dichroitischen Spiegel passiert ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$) und über einen zusätzlichen Filter von eventuell reflektiertem Anregungslicht getrennt wird. Hinter dem Okular befindet sich ein Detektor (z.B. eine hochauflösende Kamera), der die digitale Verarbeitung des Bilds ermöglicht.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Polymere Vesikel

Das Blockcopolymer PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH bildet in Wasser Vesikel durch Selbstorganisation. In den in Abschnitt 2.1.4 vorgestellten Präparationsmethoden tritt ausschließlich die Vesikelstruktur als energetisch favorisierte Aggregatstruktur auf (vgl. Abs. 6.2). Abhängig von der Wahl der Präparationsmethode weisen die polymeren Vesikel unterschiedliche Größen und unterschiedliche Größenverteilungen auf. Dabei besitzen die Vesikel unabhängig von Präparation und Größe eine einheitliche Dicke der hydrophoben PB-Schale, die sich aus einer Doppelschicht der Polybutadien-Kettenenden zusammensetzt und durch deren Länge bestimmt ist. Durch cryogene TEM-Messungen wurde diese Dicke der hydrophoben Schale bestimmt, wobei in diesen Aufnahmen nur die kompakte PB-Schale einen ausreichenden Kontrast liefert [Discher 2002]. Die im Wasser gequollenen PEO-Kettenenden sind nicht vom Wasser-Hintergrund zu unterscheiden. Die Genauigkeit dieser Bestimmungsmethode ist limitiert, da die Vesikel nicht wie Kristalle durch scharfe Kanten begrenzt sind, sondern als sphärische Strukturen graduell in den Hintergrund übergehen (vgl. Abb. 3.6b).

Discher et al. zeigten anhand experimenteller Daten mehrerer Vesikel-formender PB-PEO-Copolymere, dass die Vesikelschalendicke d mit dem Molekulargewicht des hydrophoben PB-Blocks M_h nach $d \sim (M_h)^a$ mit $a \approx 0.5$ skaliert, wie theoretisch für ideale 'Random Coil'-Polymerketten gültig [Discher 2002]. Die Vesikel des PB₁₃₀-PEO₆₆-Copolymers müssten demnach eine Schalendicke von 15.2nm aufweisen (s. Anhang Tab. 7.1).

Abbildung 4.1 zeigt ein cryoTEM-Bild zweier PB₁₃₀-PEO₆₆-Vesikel und einen Teil eines großen Vesikels mit doppelter Schale. An Letzterem ist gut zu erkennen, dass die PEO-Schicht, die den Bereich zwischen den beiden PB-Schalen ausfüllt, nicht vom Wasser-Hintergrund zu unterscheiden ist. Außerdem wird deutlich, dass die Schalendicke für die kleinen wie auch für deutlich größere Vesikel konstant bleibt [Müller 2006]. Die Messungen ergeben eine PB-Schalendicke von etwa 15nm (d.h. etwa 7.5nm pro Lage). Für eine PEO-Einzellage erhält man aus Abbildung 4.1b eine Dicke von etwa 4nm. Eine PEO-Schicht, die nicht von beiden Seiten durch PB umgeben wird, kann allerdings stärker gequollen sein und daher von diesem unteren Grenzwert abweichen. Diese Ergebnisse entsprechen den erwarteten Dimensionen.

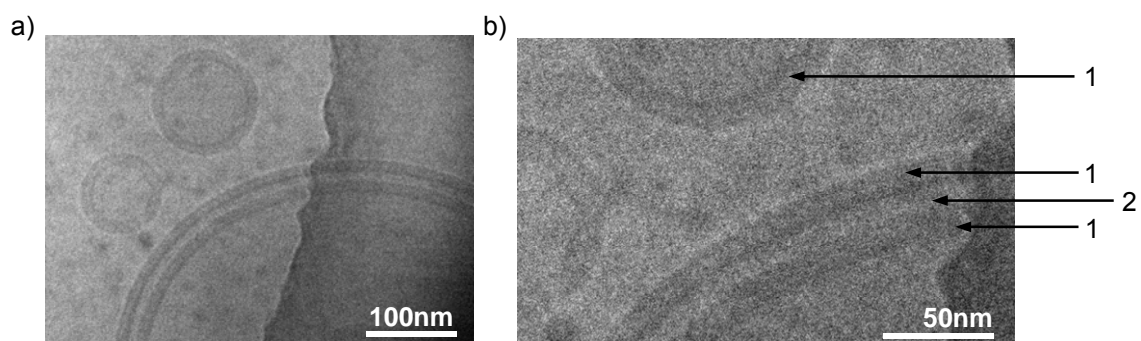


Abb. 4.1 [Müller 2006]: a) CryoTEM-Aufnahme einer Vesikellösung; b) Vergrößerung zur Bestimmung der Schichtdicken für PB (1) und PEO (2)

4.1.1. Vesikelpräparation

Präparation durch Co-Lösemittel

Bei der Präparation unter Verwendung von THF als Co-Lösemittel (vgl. Abs. 2.1.4) werden Vesikel mit $d < 100\text{nm}$ mit sehr enger Größenverteilung erhalten. Die Größe ist dabei abhängig von der Geschwindigkeit, mit der das Wasser in die Polymer/THF-Lösung zudosiert wird. Bei schneller Zugabe entstehen sehr kleine Vesikel, je langsamer die Tropfgeschwindigkeit, umso größer werden die erhaltenen Vesikel. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse dynamischer Lichtstreuung (vgl. Abs. 3.1) für drei Vesikellösungen zusammengestellt. Die Zugabegeschwindigkeit wurde über den gesamten Bereich der verwendeten Spritzenpumpe variiert, die Polymerkonzentration C_{1B} sowie das THF- bzw. Wasservolumen waren für alle Proben konstant.

Tab. 4.1: Einfluss der Geschwindigkeit der Wasserzugabe auf die Vesikelgröße

Probe	H ₂ O-Zudosierung / ml/h	$\langle R_h \rangle$ / nm	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$
PV53	1.2	46	0.06
PV54	9.9	34	0.05
PV55	70	27	0.07

Ausgangslösung: 5mg 1B in 2.1ml THF; Wasserzugabe: 5ml; nach THF-Abdampfen: End- $C_{1B}=1\text{g/l}$;
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Aus den mittleren hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle$ ist deutlich zu erkennen, dass schnelle Wasserzugabe zu sehr kleinen Strukturen führt. Die Minimalgröße eines Vesikels ist durch die Membrandicke bestimmt und entspricht einer Struktur, in der sich die inneren PEO-Schichten direkt berühren. Ausgehend von den oben erwähnten PB- und PEO-Schichtdicken läge der erwartete minimale Radius für ein Vesikel bei etwa 23nm. Der für 70ml/h Wasserzugabe gefundene gemittelte hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle$ von 27nm entspricht sehr gut dieser minimalen Vesikelgröße. Durch cryoTEM-Messungen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Aggregatstrukturen in diesem Größenbereich um Vesikel handelt.

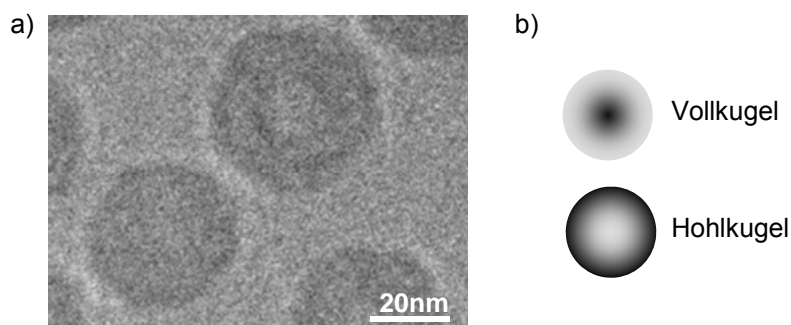


Abb. 4.2: a) Vergrößerte cryoTEM-Aufnahme von Vesikeln mit $d=42\text{nm}$ und $d=36\text{nm}$;
 b) Schematische Darstellung des Kontrastunterschieds im TEM für eine Vollkugel (Mizelle) und eine Hohlkugel (Vesikel)

Abbildung 4.2 zeigt ein cryoTEM-Bild von Vesikeln mit Durchmessern von etwa 42nm und 36nm. Bei dem größeren Vesikel kann der kontrastärkere Kern mit $d \approx 10\text{nm}$ noch aufgelöst werden, wohingegen bei 36nm kein Raum bleibt für eine gequollene PEO/Wasser-Domäne. Ein solches Mini-Vesikel ist daher durch einen durchgehenden, konstanten Kontrast zu erkennen. Ein Strukturübergang zu einer Mizelle kann dabei ausgeschlossen werden. Einerseits würden die polymeren Dimensionen keine Mizelle dieser Größenordnung ermöglichen, andererseits ist eine Mizelle als Vollkugel durch einen TEM-Kontrastgradienten gekennzeichnet, wie in Abbildung 4.2b schematisch gezeigt.

Solche minimalen Vesikelstrukturen sind derart komprimiert, dass die Krümmungsradien der Membran deutlich erhöht sind gegenüber 'entspannteren', größeren Vesikeln. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Mini-Vesikeln um kinetisch gefangene Aggregate handelt, die nicht der thermodynamisch favorisierten Struktur entsprechen.

Erfolgt die Wasserzugabe deutlich langsamer, bleibt dem System mehr Zeit eine energetisch günstigere Struktur zu formen und die Vesikel werden deutlich größer (vgl. Tab. 4.1). So bilden sich bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1.2ml/h Vesikel mit $\langle R_h \rangle = 46\text{nm}$.

Die Ergebnisse der DLS-Messungen zeigen darüber hinaus, dass diese Präparationsmethode über den gesamten Geschwindigkeitsbereich sehr eng verteilte Vesikelgrößen liefert. Wie in Tabelle 4.1 gezeigt, liefert der Kumulanten-Fit als Maß für die Polydispersität für alle Proben μ_2 -Werte kleiner 0.1 (vgl. Abs. 3.1). Somit ist es über die Wahl der Tropfgeschwindigkeit möglich, gezielt Vesikel einer bestimmten Größe zwischen $\langle d \rangle = 50\text{nm}$ und $\langle d \rangle = 100\text{nm}$ mit enger Verteilung zu präparieren.

Diese Ergebnisse wurden alle bei einem THF-Endgehalt von 27Gew.-% erhalten. Bei geringeren THF-Anteilen, d.h. einem größeren zugetropften Wasservolumen, wurden deutlich größere Vesikel mit breiteren Größenverteilungen gemessen. Bei 15Gew.-% THF-Endgehalt führte eine Tropfgeschwindigkeit von 8.5ml/h zu Vesikeln mit $\langle R_h \rangle = 63\text{nm}$ ($\mu_2 = 0.09$) und Zugabe mit 67ml/h zu Vesikeln mit $\langle R_h \rangle = 44\text{nm}$ ($\mu_2 = 0.08$) [Müller 2006]. Höhere THF-Anteile wurden nicht näher untersucht, da der kritische THF-Anteil, bis zu dem die Vesikelstruktur in Lösung stabil ist, für eine Vesikellösung mit $\langle R_h \rangle = 100\text{nm}$ durch DLS-Messungen einer THF-Titrationskurve zu 38Gew.-% bestimmt wurde. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis meiner Diplomarbeit [Müller 2006] brach oberhalb 38Gew.-% die strukturelle Ordnung zusammen, so dass alle Vesikelpräparationen mit THF-Endgehalten deutlich unterhalb 38Gew.-% durchgeführt wurden.

Da Vesikel mit einer engverteilten Größe um 100nm für spätere Anwendungen favorisiert sind (vgl. Abs. 2.4), wurde die Zugabegeschwindigkeit von 9.9ml/h bei einem THF-Endgehalt von 27Gew.-% (30Vol.-%) im Folgenden als Standardprozedur gewählt.

Weitere TEM-Aufnahmen sind im Anhang ab Abbildung 7.13 gezeigt.

Präparation durch Filmrehydrierung

Die Vesikelpräparation durch Rehydrierung eines getrockneten Polymerfilms (vgl. Abs. 2.1.4) führt zu Lösungen mit sehr breiten Größenverteilungen. Neben sehr großen Vesikeln mit Durchmessern von mehreren μm liegen kleine Vesikel mit $d < 100\text{nm}$ und sämtliche Größen

dazwischen vor. Der Polymerfilm ist in Wasser nur schwer löslich. Eine Temperaturerhöhung auf etwa 50°C sowie die Verwendung eines Ultraschallbads führt jedoch zum Lösungsprozess. Je mehr Energie dem System zugeführt wird, um so mehr der Riesen-Vesikel brechen auf und formen kleinere, offensichtlich stabilere Vesikel. Eine Größenbestimmung durch dynamische Lichtstreuung war auf Grund der starken Polydispersität der Proben nicht möglich. Auch cryoTEM-Messungen können nur einen groben Eindruck der Größenverteilung aufzeigen, da der etwa 100nm dicke Wasserfilm in den 2µm großen Kohlefilmlöchern nicht geeignet ist um Riesen-Vesikel mit $d \gg 1\mu\text{m}$ abzubilden. Messungen mit größeren Löchern im Kohlefilm, und somit dickerem Wasserfilm, waren wegen des schwachen Kontrasts des Polymers nicht erfolgreich.

Abbildung 4.3 zeigt beispielhaft cryoTEM-Bilder einer Vesikellösung durch Filmrehydrierung. Neben großen Vesikeln mit $d > 1\mu\text{m}$ sind Vesikel mit Größen $d \approx 400\text{nm}$ und $d < 100\text{nm}$ zu sehen. Ob in der Lösung zusätzlich Riesen-Vesikel mit $d \gg 1\mu\text{m}$ existieren kann, wie erwähnt, durch diese Messungen nicht nachgewiesen werden.

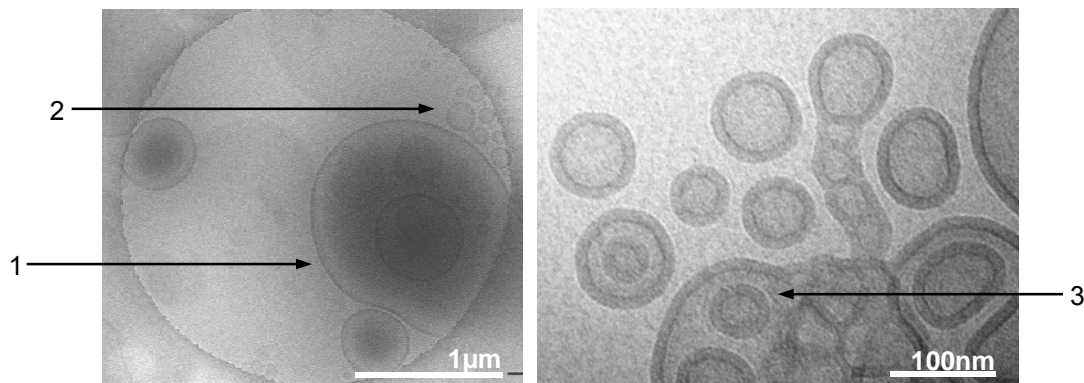


Abb. 4.3: CryoTEM-Aufnahmen einer Vesikellösung durch Filmrehydrierung mit breiter Größenverteilung von Vesikeln mit $d > 1\mu\text{m}$ (1) bis hin zu Vesikeln mit $d < 100\text{nm}$ (2); zusätzlich kann es zu multischalen bzw. ineinander gelagerten Vesikeln kommen (3)

Da mit dieser Präparationsmethode keine Größenkontrolle möglich ist, eignet sie sich nur für Problemstellungen in denen Riesen-Vesikel notwendig sind, wobei die breite Größenverteilung und die vielen kleinen Vesikel nicht stören dürfen (vgl. Abs. 4.2.2). Ein weiterer Nachteil ist das Auftreten von multischalen oder ineinander gelagerten Vesikeln, wie beispielhaft in Abbildung 4.3 (3) gezeigt. Mit zunehmender Vesikelgröße steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass während der Strukturbildung innerhalb des wassergefüllten Kerns weitere, kleinere Vesikel eingeschlossen werden.

4.1.2. Aggregationszahl und Molekulargewicht

Für eine Quantifizierung der angestrebten Vesikelbeladung ist es notwendig, die Polymerkonzentration in Masse pro Volumen in eine Vesikelkonzentration in Partikel pro Volumen umrechnen zu können. Der unbekannte Parameter ist die Aggregationszahl, d.h. die Kenntnis

der Anzahl an Polymerketten, welche ein Vesikel formen, bzw. das Gewicht eines Vesikels. Durch konzentrationsabhängige, statische Lichtstreu-Messungen ist es möglich das gemittelte Molekulargewicht M_w der diffundierenden Partikel in Lösung, in diesem Fall der Vesikel, zu bestimmen (vgl. Abs. 3.1). Da das Gewicht eines Vesikels stark von seiner Größe abhängt, wurde für drei Vesikellösungen mit unterschiedlichen Größen konzentrationsabhängig SLS gemessen. In Tabelle 4.2 sind die durch Extrapolation $C \rightarrow 0$ und $q \rightarrow 0$ erhaltenen Ergebnisse dieser Messungen zusammengestellt. Abbildung 4.4 zeigt den Zimm-Plot der Vesikellösung PV18 mit $M_w = 7.8 \cdot 10^7 \text{ g/mol}$ und $\langle R_g \rangle = 47 \text{ nm}$ (als $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}$ s. Abs. 3.1). Die experimentellen Daten für PV51 und PV2 sind im Anhang in den Abbildungen 7.1 und 7.2 gezeigt.

Zur Bestimmung des ρ -Verhältnisses (vgl. Abs. 3.1) wurde zusätzlich an allen drei Proben dynamische Lichtstreuung gemessen. Theoretische Berechnungen ergeben für Hohlkugeln mit unendlich dünner Schale ein ρ -Verhältnis von eins. Die experimentellen Daten der Vesikellösungen entsprechen somit den Erwartungen (s. Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Ergebnisse aus SLS und DLS für drei Vesikellösungen

Probe	$\langle R_g \rangle / \text{nm}$	$M_w / \text{g/mol}$	$\langle R_h \rangle / \text{nm}$	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$	$\rho = R_g/R_h$
PV51	28	$2.6 \cdot 10^7$	30	<0.05	0.93
PV18	47	$7.8 \cdot 10^7$	44	0.08	1.07
PV2	64	$2.4 \cdot 10^8$	65	<0.05	0.98

dn/dc wurde über das Massenverhältnis der Blöcke gewichtet mit $dn/dc=0.185$ abgeschätzt;
 $\langle R_g \rangle$: Wurzel des z-Mittels des Trägheitsradienquadrats $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}$ aus statischer Lichtstreuung;
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

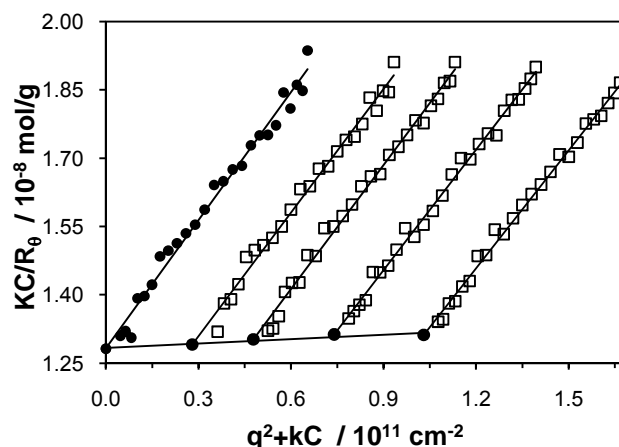


Abb. 4.4: Zimm-Plot einer Vesikellösung (PV18) mit $\langle R_g \rangle = 47 \text{ nm}$ und $M_w = 7.8 \cdot 10^7 \text{ g/mol}$

Aus den erhaltenen Molekulargewichten der Vesikel kann, zusammen mit dem Molekulargewicht des Polymers (s. Abb. 2.6), die Aggregationszahl Z in Abhängigkeit der Vesikelgröße berechnet werden (s. Tab. 4.3). Da die Molekulargewichte, wie auch die Radien, nur gemittelte Werte sind, kann die so bestimmte Aggregationszahl jedoch nur die Größenordnung wiedergeben.

Tab. 4.3: Größenabhängig berechnete Aggregationszahlen

$\langle R_h \rangle$ / nm	$M_w(\text{Vesikel})$ / g/mol	$\langle Z \rangle_w$
30	$2.6 \cdot 10^7$	2300
44	$7.8 \cdot 10^7$	6800
65	$2.4 \cdot 10^8$	21000

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung;
 $M_w(\text{Vesikel})$ aus SLS; Aggregationszahl $\langle Z \rangle_w = M_w(\text{Vesikel})/M_w(1B)$; $M_w(1B) = 11.6 \text{ kg/mol}$

4.1.3. Vesikelvernetzung

Wie in Abschnitt 2.1.5 bereits erwähnt, lassen sich die PB-PEO-Vesikel durch γ -Bestrahlung vernetzen. Um sicher zu gehen, dass die Bestrahlung neben der Vernetzung keinen Einfluss auf die Aggregatstrukturen in Lösung hat, wurden Vesikellösungen vor und nach Vernetzung mittels DLS und cryoTEM untersucht und die Ergebnisse verglichen. In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der Lichtstreu-Messungen für zwei Vesikellösungen zusammengestellt. Die Radien bleiben im Vergleich vor und nach Vernetzung innerhalb der Messgenauigkeit konstant.

Tab. 4.4: DLS-Ergebnisse von Vesikellösungen vor und nach Vernetzung

Probe	$\langle R_h \rangle$ / nm	μ_2 ($\theta = 90^\circ$)
PV14	54	0.09
PV14v	52	0.12
PV19	41	0.10
PV19v	40	0.08

v = vernetzte Lösung durch 61kGy Strahlungsdosis; 0.45 μm -filtriert;
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Auch durch cryogene TEM-Messungen kann nachgewiesen werden, dass die Vesikel nach Vernetzung weiterhin einzeln in Lösung und nicht aggregiert vorliegen, d.h. die Vernetzung nur innerhalb eines Vesikels stattfindet und nicht zu vernetzten Aggregaten führt. Ferner zeigen die cryoTEM-Aufnahmen einer Lösung vor und nach Vernetzung in Abbildung 4.5, dass keine Veränderung der Morphologie durch die Bestrahlung hervorgerufen wird. Die Aufnahmen stützen jedoch die Vermutung, dass die Vernetzung der PB-Ketten zu einer kompakteren und somit schmalere Vesikelschale führt. Auf Grund des hohen Fehlers solcher Größenmessungen im cryoTEM ist eine eindeutige Aussage diesbezüglich nicht möglich.

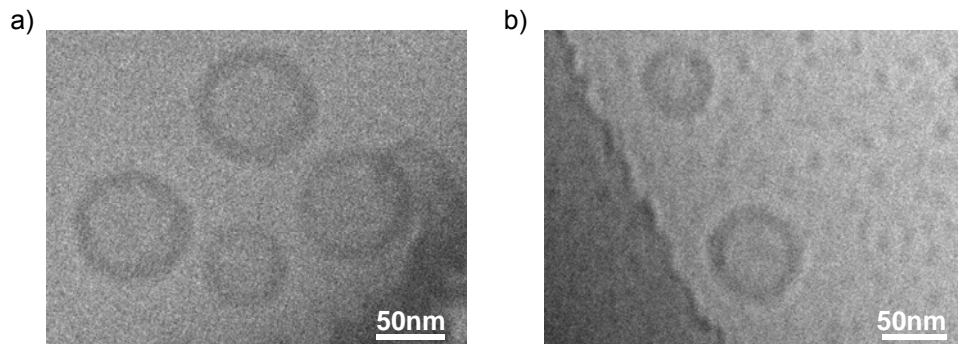


Abb. 4.5: CryoTEM-Aufnahmen einer Vesikellösung a) vor und b) nach Vernetzung

Die Fixierung der Vesikel durch γ -Bestrahlung konnte durch trockene TEM-Aufnahmen bestätigt werden. Während unvernetzte Proben im TEM keine Vesikelstrukturen, sondern nur die zerfallenen Polymerfilme aufweisen, ist in Abbildung 4.6a das TEM-Bild einer vernetzten Lösung gezeigt. Die Vesikel liegen hier zwar aggregiert auf dem TEM-Grid, dies ist jedoch auf den Trocknungsprozess des Lösemittels zurückzuführen, wie ein Vergleich mit einer cryoTEM-Aufnahme derselben Probe zeigt (s. Abb. 4.6b).

Vernetzte Lösungen bieten somit den Vorteil im trockenen TEM abbildbar zu sein, ohne dass durch die Vernetzung eine Veränderung der Struktur stattfindet. Trockene TEM-Aufnahmen sind dabei erheblich schneller durchführbar als die experimentell sehr aufwendigen cryogenen TEM-Messungen.

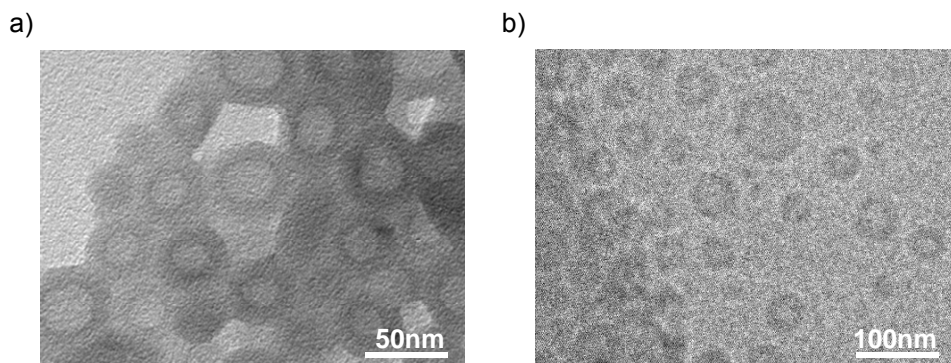


Abb. 4.6: a) Trockene TEM-Aufnahme und b) cryoTEM-Aufnahme einer Vesikellösung nach Vernetzung

Weitere TEM-Aufnahmen sind im Anhang ab Abbildung 7.15 gezeigt.

4.2. Hydrophobe Beladung mit Farbstoffen

Die Einlagerung hydrophober Substrate in die hydrophobe Polybutadien-Schicht der Vesikelschale wurde erfolgreich für verschiedene Farbstoffe als Modell-Substrate aus dem molekularen Größenbereich untersucht und detailliert charakterisiert.

4.2.1. Beladung durch Co-Lösemittel

Die Präparation hydrophob beladener Vesikel unter Verwendung des Co-Lösemittels THF erfolgte analog der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Standardprozedur. Der Polymer/THF-Ausgangslösung wurde einer der wasserunlöslichen Farbstoffe Oil Red EGN (ORE), Oil Blue N (OBN) oder Nilrot (NR) zugesetzt, so dass nach Wasserzugabe und THF-Abdampfen wässrige Lösungen der beladenen Vesikel erhalten wurden (Tropfgeschwindigkeit 9.9ml/h, THF-Endgehalt 27Gew.-%, $C_{1B}=1\text{g/l}$).

Oil Red EGN

Die in Abhängigkeit der angebotenen Farbstoffmenge deutliche Färbung der sonst farblosen Vesikellösungen deutet auf die erfolgreiche Beladung der Vesikelschale hin, wie in Abbildung 4.7a anhand ORE-beladener Vesikel gezeigt. Die zugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.7b abgebildet. Der ansteigende Untergrund für Wellenlängen $\lambda < 450\text{nm}$ ist auf Streueffekte, hervorgerufen durch die Vesikelgröße, zurückzuführen.

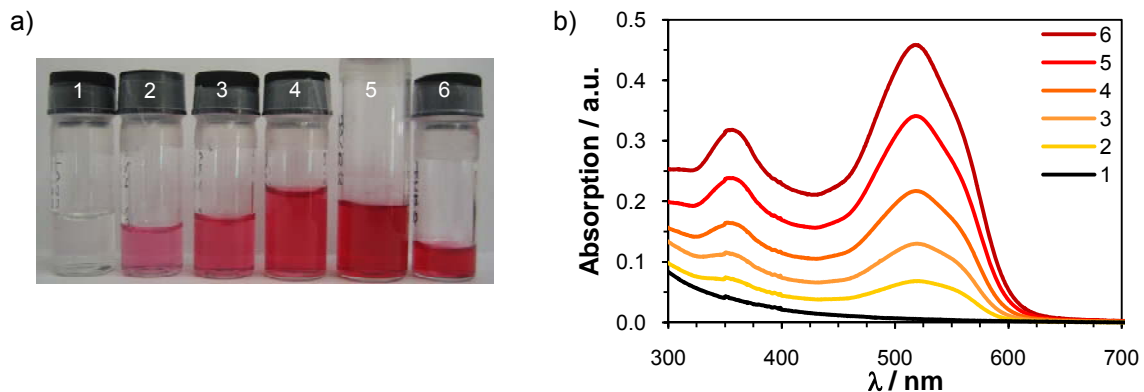


Abb. 4.7: a) Foto und b) Absorptionsspektren einer unbeladenen Vesikellösung (1) im Vergleich zu ORE-beladenen Vesikellösungen, sortiert nach steigendem ORE-Gehalt $C_{\text{ORE}} = 7/12/29/49/65\text{mg/l}$ (2-6)

Ist die während der Präparation angebotene Farbstoffmenge zu hoch, setzt Fällung ein und überschüssiger Farbstoff und möglicherweise Anteile des Polymers müssen abgetrennt werden. Für das ORE-System sind Lösungen bis 65mg/l Farbstoffanteil bei einer Polymerkonzentration von 1g/l stabil, d.h. man kann davon ausgehen, dass die Einlagerung bis zu dieser Menge quantitativ erfolgt. Auch eine Auftragung der Intensität der Absorption gegen die angebotene Farbstoffmenge für Abbildung 4.7b zeigt einen linearen Anstieg (s. Anhang Abb. 7.3). Für eine genauere Quantifizierung wäre eine ORE-Kalibrierung in Wasser notwendig, die jedoch auf Grund der Unlöslichkeit des Farbstoffs nicht möglich ist.

Ausgehend von einer quantitativen Einlagerung bis umgerechnet 65mg/l ORE, lässt sich für dieses System aus den Molmassen des Farbstoffs und des Polymers (vgl. Abb. 2.6 und 2.11) eine maximale Beladung von 176mol% (6.5Gew.-%) berechnen. Dies entspricht einer Verkapselung von 1.8 ORE-Molekülen pro Polymerkette.

Durch cryogene TEM-Aufnahmen wurde der Nachweis erbracht, dass die Selbstorganisation auch in Anwesenheit des hydrophoben Farbstoffs zu Vesikelstrukturen führt (s. Abb. 4.8a). Die vereinzelt kleineren Strukturen könnten auf die Qualität des vitrifizierten Wasserfilms zurückgeführt werden. In Abbildung 4.8b ist zusätzlich ein TEM-Bild einer Lösung mit 7mg/l ORE nach Vernetzung gezeigt (s. auch Anhang Abb. 7.18). Neben den erwarteten Vesikeln mit Größen um $\langle R_h \rangle = 33\text{nm}$ fallen auch hier kleinere Strukturen mit $d \approx 30\text{nm}$ auf. Ob es sich bei diesen Strukturen um stark komprimierte Vesikel mit polymerer Doppelmembran handelt ist ungewiss.

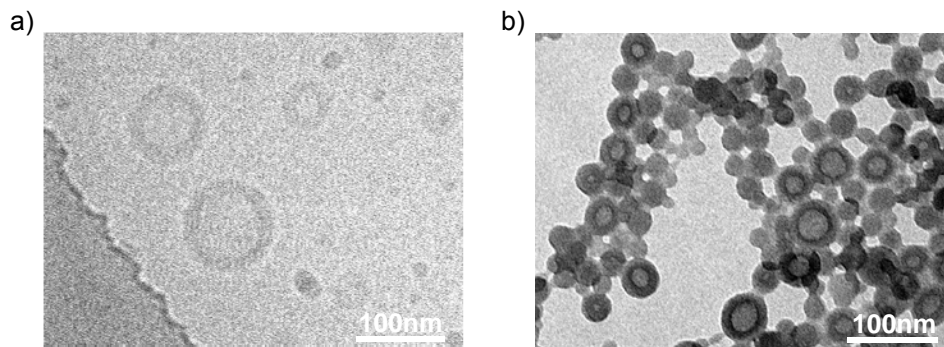


Abb. 4.8: a) CryoTEM-Aufnahme einer ORE-beladenen Lösung mit $C_{\text{ORE}}=12\text{mg/l}$;
b) TEM-Aufnahme einer ORE-beladenen Lösung mit $C_{\text{ORE}}=7\text{mg/l}$ nach strahlungsinduzierter Vernetzung

Durch das eingelagerte ORE ist der hydrophobe Gesamtanteil der Lösung gegenüber dem hydrophoben Anteil reiner Polymerlösungen erhöht. Da der hydrophile Anteil unverändert vorliegt, würde eine Vergrößerung des hydrophoben Volumens analog den Beschreibungen in Abschnitt 2.1.1 zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Doppelmembran führen. Demnach müsste sich eine eventuelle Morphologieänderung durch den Übergang zu planarerer Membranen, d.h. größeren Vesikeln auswirken. Der beobachtete Übergang zu kleineren Strukturen, und somit höheren Krümmungsradien ist so nicht zu erklären.

Im reinen Polymersystem konnten Mizellen als Erklärung für die gefundenen Strukturen mit $d \approx 35\text{nm}$ auf Grund der Dimensionen des Polymers ausgeschlossen werden (vgl. Abs. 4.1.1). Bei den in Abbildung 4.8 zu sehenden Strukturen mit $d \approx 30\text{nm}$ könnte es sich jedoch um abgewandelte Mizellen handeln, in denen der Kern aus aggregierten ORE-Farbstoffmolekülen besteht, die durch angelagerte Polymere in Lösung stabilisiert werden.

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse dynamischer Lichtstreu-Messungen zusammengefasst. Ein Vergleich mit den DLS-Ergebnissen der unbeladenen Vesikel (vgl. Tab. 4.1) zeigt, dass die Einlagerung des hydrophoben Farbstoffs, trotz dem Auftreten einiger kleinerer Strukturen, im Mittel zu keiner signifikanten Änderung der erhaltenen Strukturgröße oder ihrer Verteilungs-

breite führt. Auch in Anwesenheit des Oil Red EGN bilden sich unter Standardbedingungen Vesikelstrukturen mit $\langle R_h \rangle \approx 33\text{nm}$ bei enger Verteilung ($\mu_2 < 0.07$).

Tab. 4.5: DLS-Ergebnisse der ORE-beladenen Vesikellösungen

Probe	$C_{\text{ORE}} / \text{mg/l}$	$\langle R_h \rangle / \text{nm}$	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$
PV54	---	34	0.05
PVR1	7	33	0.07
PVR2	12	31	0.06
PVR6	29	33	0.05
PVR3	49	34	<0.05
PVR8	65	37	0.07

Ausgangslösung: 5mg 1B + ORE in 2.1ml THF; Wasserzugabe: 5ml mit 9.9ml/h; End- $C_{1B}=1\text{g/l}$;
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Nilrot

Der fluoreszierende Farbstoff Nilrot (NR) bietet auf Grund seiner starken Emission den Vorteil eines breiteren Spektrums an Methoden zur Probencharakterisierung und zum Beladungsnachweis. Im Weiteren sind, aufbauend auf den Ergebnissen des ORE-Systems, die Ergebnisse der Nilrot-Beladung zusammengefasst.

Die Präparation Nilrot-beladener Vesikel unter Verwendung des Co-Lösemittels THF erfolgte analog der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Standardprozedur. Um ausschließen zu können, dass der wasserunlösliche Farbstoff während der Präparation durch andere Mechanismen als die Einlagerung in die PB-Schale stabilisiert werden könnte, wurden analog 'Blindproben' präpariert. In diesen wurde entweder kein Polymer verwendet (Blind1), oder aber das PB-PEO-Copolymer durch ein reines, engverteiltes PEO-Polymer mit $M_w=3500\text{g/mol}$ ersetzt (Blind2).

Für Beladungsexperimente mit Nilrot ist in Abbildung 4.9a eine Aufnahme einer beladenen Probe (3) sowie der analog präparierten Blindproben ohne Polymer (1) und mit PEO (2) gezeigt. Die zugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.9b abgebildet. Auch hier ist der ansteigende Untergrund für Wellenlängen $\lambda < 450\text{nm}$ auf Streueffekte zurückzuführen, wie ein Vergleich mit der unbeladenen Vesikellösung (4) zeigt. In beiden Blindproben kommt es nicht zu einer Farbstoffaufnahme. Stattdessen kristallisiert das wasserunlösliche Nilrot nadelförmig aus und kann abfiltriert werden.

Fluoreszenzmessungen sind deutlich sensitiver als Absorptionmessungen, so dass Emissionsspektren die Möglichkeit bieten, den fluoreszierenden Farbstoff Nilrot bis in einen hohen Verdünnungsbereich nachzuweisen. Wie in Abbildung 4.10a zu sehen, zeigt das Spektrum der Blindprobe Blind1 ohne Polymer (3) keine Bande bei $\lambda_{\text{max}}=660\text{nm}$, die für Nilrot in wässriger Umgebung charakteristisch wäre [Fréchet 2005]. Demnach liegen keine Spuren überschüssigen Farbstoffs in Wasser vor. Auch die Blindprobe Blind2 mit PEO zeigt keine

Emission (4); es findet demzufolge keine Stabilisierung des Farbstoffs durch den hydrophilen Block des Copolymers allein statt. Die deutliche Emissionsbande der NR-beladenen Vesikellösung (1) kann demnach nur von Farbstoffmolekülen ausgehen, die durch den Polybutadien-Anteil des Polymers in Lösung stabilisiert werden.

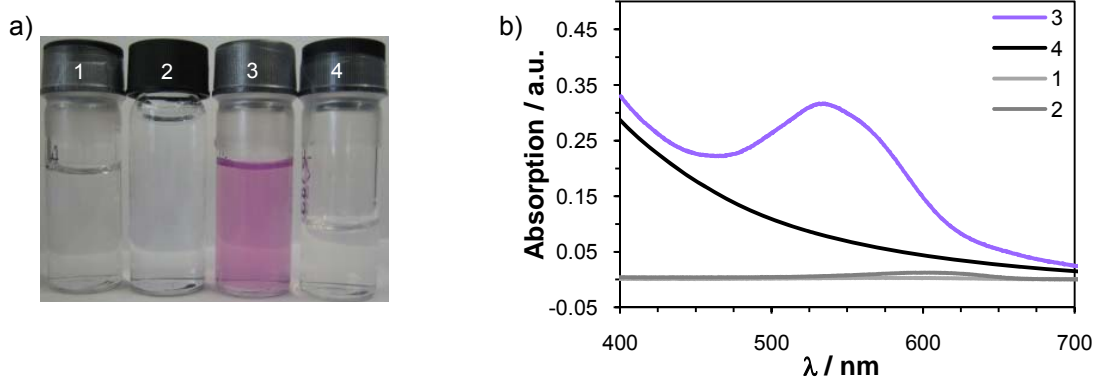


Abb. 4.9: a) Foto und b) Absorptionsspektren einer unbeladenen Vesikellösung (4) im Vergleich zu einer Nilrot beladenen Vesikellösung (3) und den zugehörigen Blindproben Blind1 ohne Polymer (1) und Blind2 mit PEO (2)

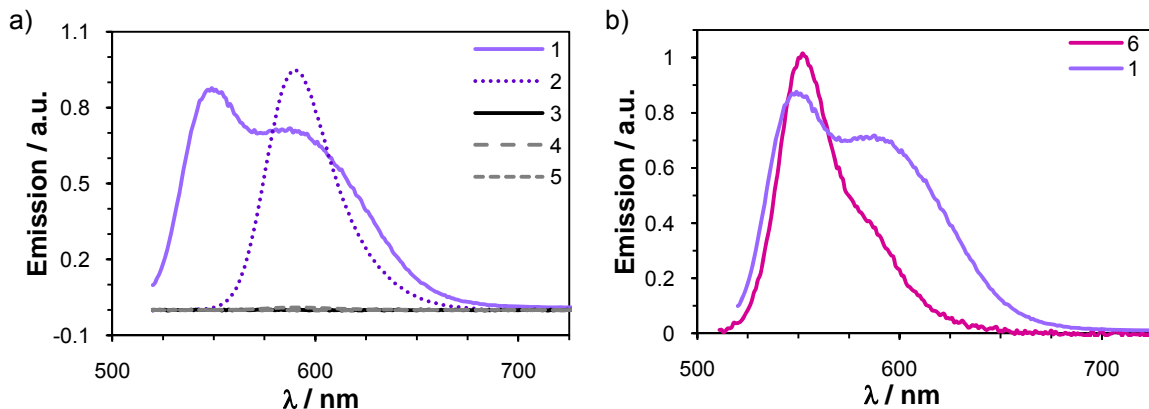


Abb. 4.10: Emissionsspektren (norm.): a) NR-beladene Vesikellösung (1), NR in THF (2), unbeladene Vesikellösung (3), Blind1 ohne Polymer (4), Blind2 mit PEO (5); b) NR-beladene Vesikellösung (1), NR in linearem Polybutadien (6)

Vergleicht man die Emissionsbande der NR-beladenen Vesikel (1) mit der Emission des Farbstoffs gelöst in THF (2) fällt eine starke, hypsochrome Verschiebung hin zu kürzeren Wellenlängen auf. Das Emissionsmaximum in THF liegt bei 590nm; der durch Polymer in wässriger Lösung stabilisierte Farbstoff zeigt dagegen eine Emission mit $\lambda_{\max}=550\text{nm}$ (s. Abb. 4.10a). Eine solche Verschiebung deutet auf veränderte Umgebungsbedingungen für den Farbstoff. Der Übergang von THF zu Wasser als Lösemittel kann nicht die Ursache sein, wie die Blindproben gezeigt haben. Löst man jedoch Nilrot in linearem Polybutadien ($M_n=1500\text{-}2000\text{g/mol}$) und vergleicht die Emission dieser Lösung (6) mit der Bande NR-beladener Polymerlösungen (1) bei gleicher Anregung bei $\lambda_{\text{ex}}=500\text{nm}$, findet man gute Übereinstimmung der Maxima. Wie in Abbildung 4.10b zu sehen, besitzt auch die Emission von NR in PB ihr Maximum bei 550nm. Die hypsochrome Verschiebung der Emission kann also direkt auf die Einlagerung des Farbstoffs in die PB-Domäne des Polymers zurückgeführt werden.

In der Emission NR-beladener Vesikellösungen (1) ist neben dem Maximum eine zusätzliche Schulter um 600nm auffällig (s. Abb. 4.10). Ein Grund für diese zweite Emissionsbande könnte die hohe lokale Konzentration in der PB-Domäne und die dadurch begünstigte Ausbildung von Excimeren oder Aggregaten sein. Excimere bestehen aus zwei oder mehr Molekülen, von denen sich eines im angeregten Zustand befindet. Die Energielücke in diesem kurzlebigen Zustand ist kleiner als die eines Monomers, so dass Excimere bei längeren Wellenlängen emittieren. In diesem Fall sind die zwei Emissionsbanden auf verschiedene Anregungszustände zurückzuführen. Wie in Abbildung 4.11 jedoch zu sehen, unterscheiden sich die Anregungsspektren der beiden Emissionsbanden ($\lambda_{em}=550\text{nm}$ und $\lambda_{em}=600\text{nm}$) im Falle NR-beladener Vesikellösungen nicht voneinander, d.h. beide Emissionen sind auf den gleichen Anregungszustand zurückzuführen. Somit kann die Bildung von Excimeren als Ursache für die deutliche Schulter bei 600nm ausgeschlossen werden.

Auch die Bildung eines sogenannten TICT-Zustands durch intramolekularen Ladungstransfer kann als Ursache ausgeschlossen werden, da dieser für Nilrot als strahlungsfrei bekannt ist [Bhattacharyya 1994].

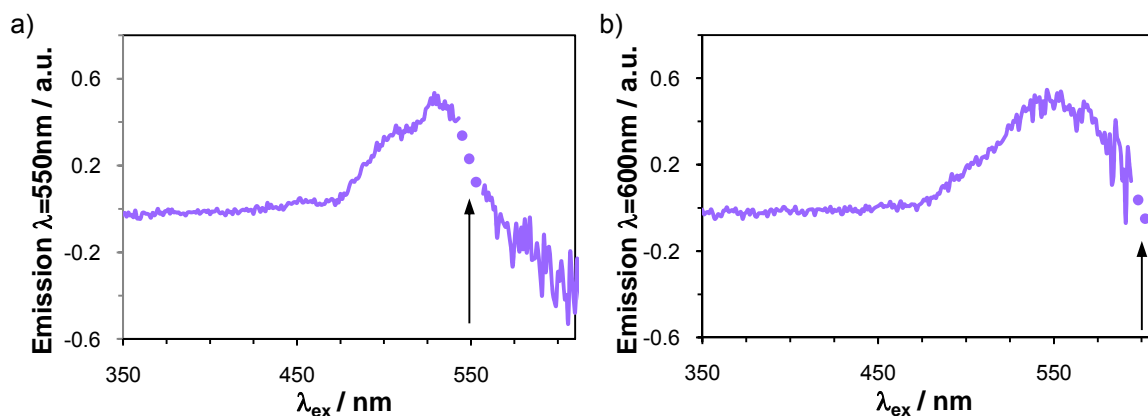


Abb. 4.11: Anregungsspektren einer NR-beladenen Vesikellösung a) bei $\lambda_{em}=550\text{nm}$ und b) bei $\lambda_{em}=600\text{nm}$; der Pfeil markiert jeweils die Position λ_{em} , an der die Emission nicht messbar ist (Punkte)

Auffällig ist, dass die Position der Schulter im Wellenlängenbereich der Emission von NR gelöst in THF (2) liegt (s. Abb. 4.10a). Da das Co-Lösemittel THF durch offenes Stehen der Proben abdampft, ist es möglich, dass kleine Restmengen THF aus der Präparation innerhalb der PB-Domäne vorhanden und somit für diese zweite Emissionsbande verantwortlich sind. Ein Vergleich der Emission einer NR-beladenen Lösung mit dem Spektrum der Lösung, nachdem sie zusätzlich Vakuumbedingungen (85mbar im 40°C Wasserbad) unterzogen wurde, zeigt jedoch keine Veränderung in der zweiten Emissionsbande (s. Anhang Abb. 7.4). Somit können THF-Reste als Ursache für diese Schulter ebenfalls ausgeschlossen werden.

Trotzdem entspricht die Lage der Schulter der Emission von Nilrot in einer stärker polaren Umgebung [Krishna 1999]. Zwar erfolgt durch den hydrophilen PEO-Block keine Stabilisierung des Farbstoffs, wie die Blindprobe (5) zeigt (s. Abb. 4.10a), in starker Vergrößerung des Spektrums ist jedoch eine schwache Emission im Bereich um 600nm sichtbar (Abb. 4.12a). Um die Emission von Nilrot in einer polaren Umgebung wie sie durch das PEO hervorgerufen wird näher zu untersuchen, bietet sich Diethylenglykol (DEG, $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$) an,

das den einzelnen PEO-Segmenten sehr ähnelt, jedoch den Vorteil bietet flüssig zu sein. Die Emission von NR gelöst in DEG (7) zeigt ein Maximum bei 600nm (s. Abb. 4.12b).

Vergleicht man nun das Spektrum einer NR-beladenen Vesikellösung (1) mit den Spektren von NR gelöst in DEG (7) bzw. NR gelöst in PB (6), liegt es nahe, dass sich bei der Einlagerung in die Vesikel zwei Populationen bilden. Nilrot lagert sich sowohl innerhalb der PB-Domäne der Vesikelschale an, als auch nahe der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche. Nahe der Grenzfläche verursacht die deutlich polarere Umgebung vermutlich die zweite Emissionsbande um 600nm.

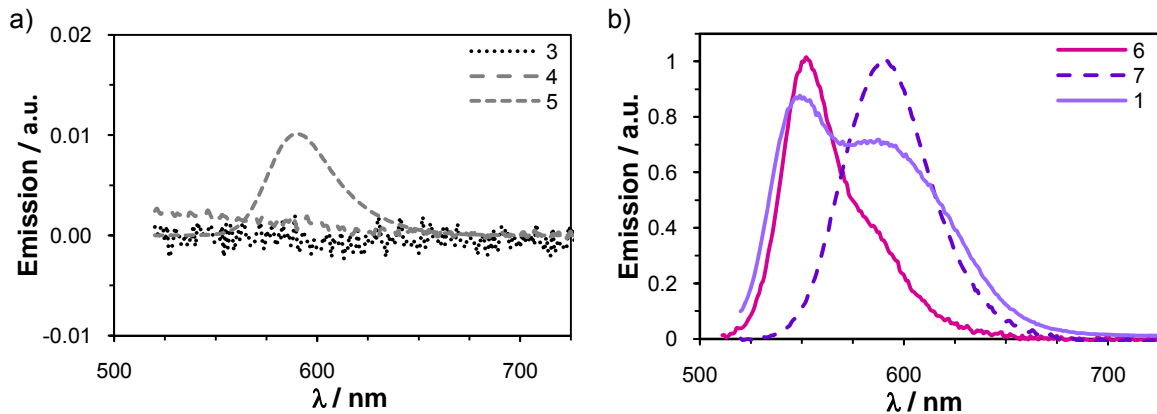


Abb. 4.12: Emissionsspektren a) vergrößert: unbeladene Vesikellösung (3), Blind1 ohne Polymer (4), Blind2 mit PEO (5); b) NR-beladene Vesikellösung (1), NR in linearem PB (6), NR in Diethylenglykol (7)

Wie in Abbildung 4.13a gezeigt, konnte auch für NR-beladene Lösungen durch cryogene TEM-Aufnahmen der Nachweis erbracht werden, dass die Selbstorganisation auch in Anwesenheit des hydrophoben Farbstoffs zu Vesikelstrukturen führt (s. auch Anhang Abb. 7.19). In den gefrorenen Wasserfilmen finden sich dabei keine Hinweise auf kleinere Strukturen wie sie im ORE-System auftraten. Trockene TEM-Aufnahmen nach Vernetzung zeigen jedoch vereinzelt Strukturen mit $d \approx 30\text{nm}$ (s. Abb. 4.13b).

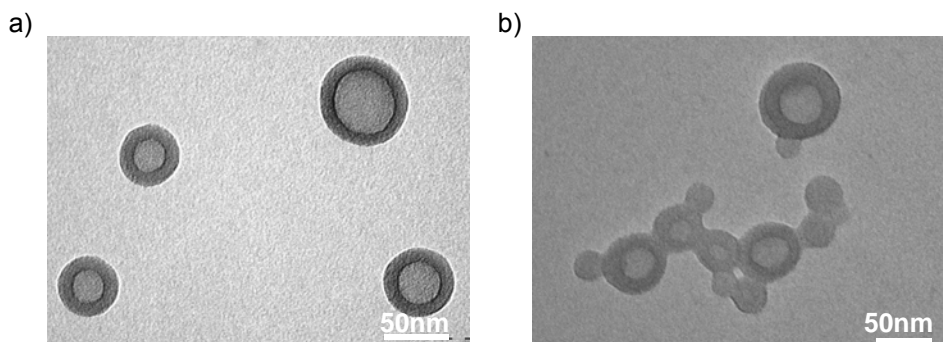


Abb. 4.13: a) CryoTEM-Aufnahme einer NR-beladenen Lösung mit $C_{\text{NR}}(\text{angeb.})=50\text{mg/l}$; b) TEM einer NR-beladenen Lösung mit $C_{\text{NR}}(\text{angeb.})=60\text{mg/l}$ nach Vernetzung

Die Ergebnisse aus dynamischen Lichtstreu-Messungen an NR-beladenen Vesikellösungen sind in Tabelle 4.6 zusammengestellt. Bei Standardpräparation (27Gew.-% THF-Endgehalt,

Wasserzugabe mit 9.9ml/h) entstehen bei einem NR-Angebot kleiner 0.1Gew.-% (bezogen auf 1B) kleine Strukturen mit $\langle R_h \rangle \approx 30\text{nm}$. Im Vergleich mit DLS-Ergebnissen unbeladener Vesikellösungen (vgl. Tab. 4.1) sind diese NR-beladenen Strukturen kleiner und entsprechen den Mini-Vesikeln, die bei sehr schneller Wasserzugabe (70ml/h) erhalten werden. Mit steigendem Farbstoffangebot wächst auch der mittlere Radius. Ab einem NR-Angebot von 3Gew.-% entstehen Strukturen mit $\langle R_h \rangle \approx 40\text{nm}$. Auch die doppelte Menge Farbstoff (6Gew.-%) führt zu keiner weiteren, signifikanten Größenzunahme ($\langle R_h \rangle = 43\text{nm}$). Dies hängt vermutlich mit der Fällung überschüssigen Nilrots bei einem Angebot größer 11mg/l zusammen, so dass während der Präparation kein weiterer Farbstoff eingelagert wird. Das Wachstum der Vesikel mit steigendem hydrophobem Farbstoffanteil steht damit in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Effekten: Eine Vergrößerung des hydrophoben Anteils (bei gleich-bleibendem hydrophilen Anteil) begünstigt eine Struktur mit flacheren Krümmungsradien, d.h. im Falle der Vesikel werden planarere Doppelmembranen und dementsprechend größere Vesikel stabilisiert.

Die Größenverteilung der Strukturen wird durch die angebotene Farbstoffmenge kaum beeinflusst. Zwar nimmt der μ_2 -Wert ebenfalls mit steigendem NR-Angebot zu, trotzdem sind alle Proben vergleichsweise eng verteilt mit $\mu_2 < 0.08$, so dass dieser Effekt vernachlässigt werden kann.

Tab. 4.6: DLS-Ergebnisse für NR-beladene Vesikellösungen

Probe	$C_{\text{NR}}(\text{angeboten}) / \text{mg/l}$	$\langle R_h \rangle / \text{nm}$	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$
PVN13	60	43	0.08
PVN8	32	41	0.07
PVN7	22	40	0.06
PVN11	11	37	0.07
PVN20	1	27	0.06
PVN21	0.5	29	<0.05
PV54	---	34	0.05

Ausgangslösung: 5mg 1B + NR in 2.1ml THF; Wasserzugabe: 5ml mit 9.9ml/h; End- $C_{1B}=1\text{g/l}$
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Im Vergleich mit der ORE-Beladung ist im Nilrot-System die Beladungseffizienz deutlich niedriger und schon bei sehr geringem Farbstoffangebot tritt Fällung auf. Anders als überschüssiges ORE, das Klumpen bildet, fällt überschüssiges Nilrot jedoch in Form kristalliner Nadeln aus. Lösungen bis zu einer NR-Konzentration von 11mg/l bei 1g/l Polymerkonzentration sind stabil. Analog zur ORE-Beladung lässt sich aus diesen Konzentrationen eine maximale NR-Beladung von 38mol% (1.1Gew.-%) berechnen. Dies entspricht einer Verkapselung von nur 0.4 NR-Molekülen pro Polymerkette im Vergleich zu 1.8 ORE-Molekülen pro Kette.

Diese geringere Beladungseffizienz für Nilrot ist vermutlich kein Hinweis auf eine verringerte Aufnahmefähigkeit der Vesikelschale für NR-Moleküle, sondern vielmehr das Resultat zweier Konkurrenzprozesse in Lösung. Das wasserunlösliche Nilrot kann einerseits durch die

Einlagerung in die PB-Schale den energetisch ungünstigen Kontakt zum Wasser minimieren, oder andererseits durch Kristallisation Stabilisierung erfahren. Sind erste Kristallkeime in der Lösung vorhanden, entzieht die zunehmende Kristallisation mehr und mehr Nilrot aus der Lösung und verhindert somit dessen Einlagerung in die Schale. Da Oil Red EGN nicht zur Kristallisation neigt sondern als amorphes Pulver ausfällt, ist im ORE-System die Einlagerung in die PB-Schale der favorisierte Prozess zur Stabilisierung und höhere Beladungsgrade sind möglich.

Für eine genauere Quantifizierung wäre eine NR-Kalibrierung in Wasser notwendig, die jedoch auf Grund der Unlöslichkeit des Farbstoffs nicht möglich ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurde stattdessen Nilrot in linearem Polybutadien (PB, $M_n=1500-2000\text{g/mol}$) gelöst. In Abbildung 4.14a sind beispielhaft die Absorptionsspektren für drei Konzentrationen NR in PB gezeigt. Die leichte, hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von NR in linearem PB im Vergleich zu NR-beladenen Vesikeln (s. Abb. 4.15) wurde auf Grund der relativ großen Ungenauigkeit der Methode vernachlässigt. Die resultierende Kalibrierung für $\lambda=525\text{nm}$ ist in Abbildung 4.14b aufgetragen. Innerhalb des Fehlers dieser Bestimmungsmethode liegen die erhaltenen Werte auf einer Geraden.

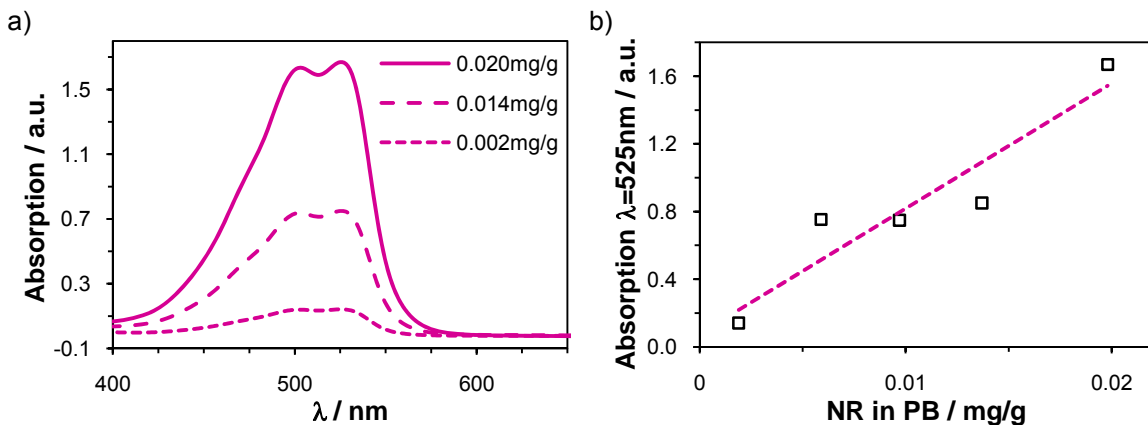


Abb. 4.14: a) Absorptions-Kalibrierung NR in linearem Polybutadien;
b) Absorption bei $\lambda=525\text{nm}$ gegen Konzentration NR in Polybutadien

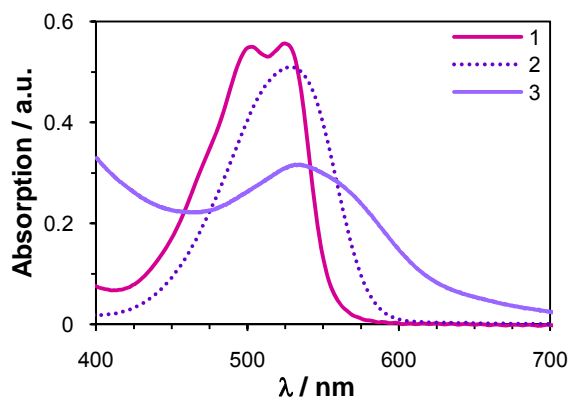


Abb. 4.15: Absorptionsspektren NR gelöst in linearem PB (1), NR in THF (2) und NR-beladene Vesikel (3)

Nachdem in den Absorptionsspektren der NR-beladenen Vesikel der Streuuntergrund (λ^4 -Korrektur) abgezogen wurde, kann ausgehend von dieser 'NR in PB'-Kalibrierung die maximale NR-Beladung der Vesikel genauer bestimmt werden. Diese Methode liefert einen deutlich geringeren Wert von 2.5mg NR pro 1g Polymer (0.1mol%, 0.3Gew.-%). Umgerechnet entspricht dies einer Einlagerung von 500-550 Farbstoffmolekülen pro Vesikel.

Verglichen mit der angebotenen Farbstoffmenge von umgerechnet 10mg/l (0.05mg NR auf 5mg 1B) verläuft die NR-Beladung jedoch mit einer Effizienz von nur 25Gew.-%. Auch ein größeres Farbstoffangebot von z.B. 60mg/l (0.3mg NR auf 5mg 1B) führt nur zu einer geringfügig höheren Vesikelbeladung von 3mg pro 1g Polymer, und somit einer Beladungseffizienz von gerade 5Gew.-%. Diese Ergebnisse können zwar nur die Größenordnung des Effekts wiedergeben, trotzdem ist gut ersichtlich, dass der Einfluss der NR-Kristallisation als Konkurrenzprozess zur Einlagerung in die Vesikelschale verhältnismäßig hoch ist. Für weitere Arbeiten sollte dieser Umstand bei der Wahl geeigneter hydrophober Substrate berücksichtigt werden.

Perylen-Derivat

Als weiterer fluoreszierender, hydrophober Farbstoff wurde das Perylen-Derivat N,N'-bis(1-hexylheptyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylbisimid (abgekürzt als Perylen, P) verwendet. Die Beladung der Vesikel erfolgte unter Verwendung des Co-Lösemittels THF analog der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Standardprozedur. Abbildung 4.16 zeigt die Absorptionsspektren für Perylen gelöst in THF (1) und für zwei Perylen-beladene Vesikellösungen mit $C_P=20\text{mg/l}$ (2) und $C_P=2\text{mg/l}$ (3). Auch hier ist der ansteigende Untergrund für Wellenlängen $\lambda < 450\text{nm}$ auf Streueffekte zurückzuführen, wie der Vergleich mit einer unbeladenen Vesikellösung (4) zeigt.

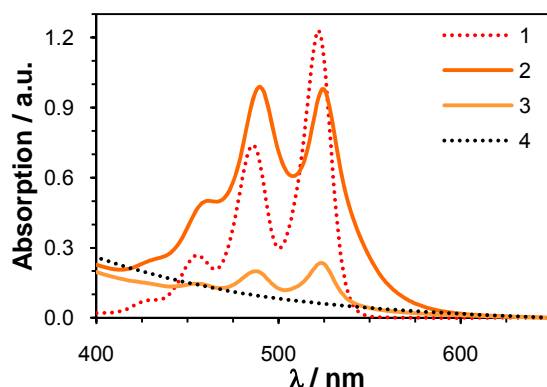


Abb. 4.16: Absorptionsspektren: Perylen in THF (1) im Vergleich zu P-beladenen Vesikellösungen mit $C_P=20\text{mg/l}$ (2) und mit $C_P=2\text{mg/l}$ (3) und einer unbeladenen Vesikellösung (4)

In Abbildung 4.17a sind die zugehörigen Emissionsspektren gezeigt. Durch die Einlagerung des Farbstoffs in die Vesikel kommt es nicht zu einer hypsochromen Verschiebung des

Maximums, wie es bei Nilrot der Fall ist (s.o.): P-beladene Lösungen (2,3) haben ebenso wie Perylen gelöst in THF (1) ein Emissionsmaximum bei $\lambda=528\text{nm}$. Das Perylen-Derivat reagiert also nicht wie Nilrot sensitiv auf die Polarität seiner direkten Umgebung. Die Schulter bei 568nm ist charakteristisch für den Farbstoff, wie normierte THF-Spektren mit $C_P=0.1/1/10\text{mg/l}$ in Abbildung 4.17b sowie Anregungsspektren der Perylen-beladenen Lösung mit $C_P=2\text{mg/l}$ bei $\lambda_{em}=530\text{nm}$ und $\lambda_{em}=568\text{nm}$ in Abbildung 4.18a zeigen.

Auffällig ist das Auftreten einer starken zweiten Emissionsbande um $\lambda=590\text{nm}$ bei hoher P-Beladung mit $C_P=20\text{mg/l}$ (s. Abb. 4.17a, (2)). Auch für die Perylen-Einlagerung kann es zur Ausbildung einer zweiten Population nahe der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche kommen. Da jedoch die Emission dieses Farbstoffs nicht von der Polarität der Umgebung abhängt, kann diese mögliche zweite Population nicht die Ursache für die zweite Emissionsbande sein. Die Bildung von Excimeren kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da Anregungsspektren der P-beladenen Lösung bei $\lambda_{em}=530\text{nm}$ und $\lambda_{em}=588\text{nm}$ zeigen, dass beide Emissionsbanden vom gleichen Anregungszustand ausgehen (s. Abb. 4.18b).

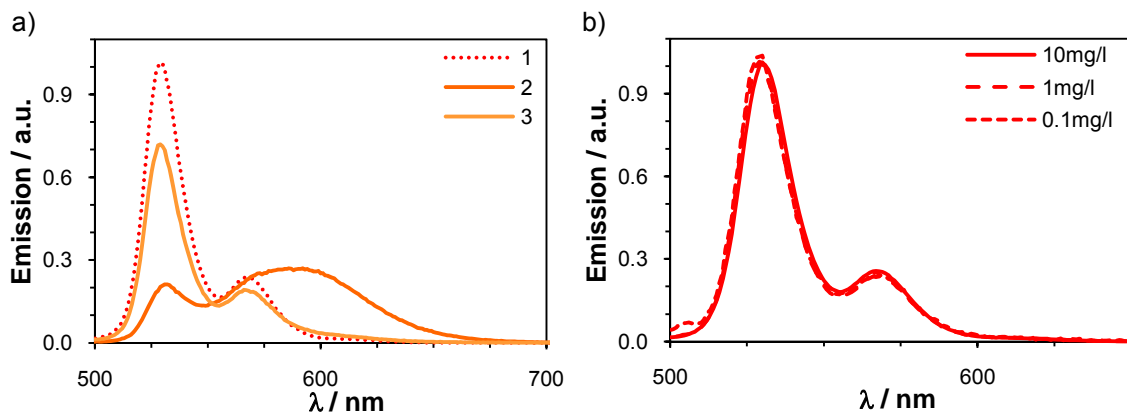


Abb. 4.17: Emissionsspektren: a) Perylen in THF (1), P-beladene Vesikellösungen mit $C_P=20\text{mg/l}$ (2), $C_P=2\text{mg/l}$ (3); b) Perylen konzentrationsabhängig in THF (norm.)

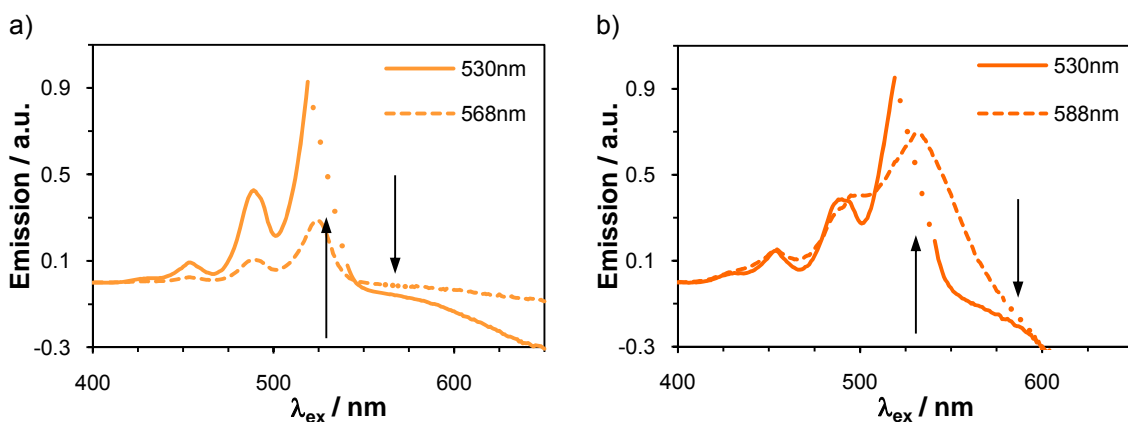


Abb. 4.18: Anregungsspektren Perylen-beladener Vesikellösungen: a) mit $C_P=2\text{mg/l}$ bei $\lambda_{em}=530\text{nm}$ und $\lambda_{em}=568\text{nm}$; b) mit $C_P=20\text{mg/l}$ bei $\lambda_{em}=530\text{nm}$ und $\lambda_{em}=588\text{nm}$; die Pfeile markieren jeweils die Positionen λ_{em} , an denen die Emission nicht messbar ist (Punkte)

Die zweite Emissionsbande tritt nur bei hohen Farbstoffkonzentrationen ($C_P=20\text{mg/l}$) auf. Die tatsächliche Perylen-Konzentration ist bei Einlagerung in die PB-Domäne, die umgerechnet nur 0.07Gew.-% der Lösung entspricht, lokal sehr viel höher. Eine partielle Aggregation innerhalb der Vesikelschale wird dadurch wahrscheinlicher und ist vermutlich der Grund für die zweite Emissionsbande.

Auch für P-beladene Lösungen konnte durch TEM-Aufnahmen nach Vernetzung der Nachweis erbracht werden, dass die Selbstorganisation auch in Anwesenheit des hydrophoben Perylen-Derivats zu Vesikelstrukturen führt, wie in Abbildung 4.19 und im Anhang in Abbildung 7.20 gezeigt.

Dynamische Lichtstreu-Messungen ergaben für die P-beladene Vesikellösung mit $C_P=20\text{mg/l}$ einen mittleren hydrodynamischen Radius von $\langle R_h \rangle = 36\text{nm}$ bei $\mu_2=0.08$.

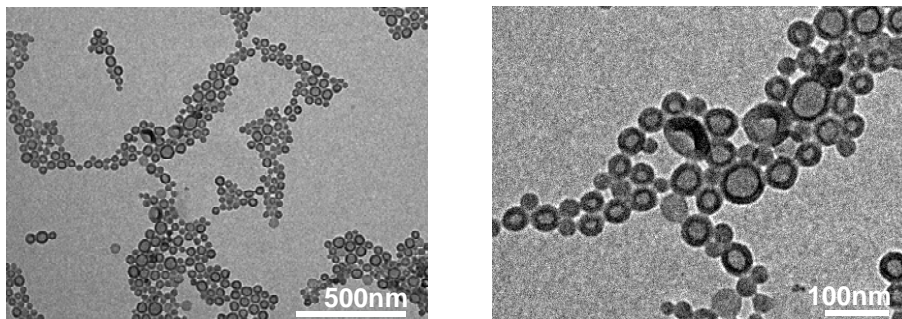


Abb. 4.19: TEM-Bilder einer Perylen-beladenen Lösung ($C_P=20\text{mg/l}$) nach Vernetzung

4.2.2 Beladung durch Filmrehydrierung

Die Vesikelpräparation durch Rehydrierung eines Polymerfilms führt, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, zu sehr großen Strukturen bis in den Größenbereich mehrerer μm . Durch Anwesenheit von Nilrot während der Filmbildung können auf diese Weise NR-beladene und somit fluoreszierende Riesen-Vesikel hergestellt werden.

Derart große Strukturen bieten die Möglichkeit durch Fluoreszenzmikroskopie farbige Aufnahmen der Vesikel in Lösung zu erhalten. Durch Verwendung eines Auflichtmikroskops und einem Wasser-Objektiv können die Vesikel direkt aus der verdünnten Lösung abgebildet werden (s. Abs. 3.4.3). In Abbildung 4.20 ist eine solche Aufnahme in Lösung gezeigt.

Zu sehen sind zwei NR-beladene Vesikel, die sich durch ihre starke Fluoreszenz von der umgebenden Lösung und dem Hintergrund (Objektträger) abheben. In der Vergrößerung ist am Beispiel des etwa $3\mu\text{m}$ großen Vesikels deutlich die erhöhte Fluoreszenzintensität am äußeren Rand der Struktur zu erkennen. Wie auch in cryogenen TEM-Aufnahmen entspricht diese Aufnahme der zweidimensionalen Projektion der Struktur in Lösung (vgl. Abs. 3.3 und

Abb. 3.6b). Demnach ist der hydrophobe Farbstoff wie erwartet nur innerhalb der Vesikelschale eingelagert und nicht im hydrophilen Kern.

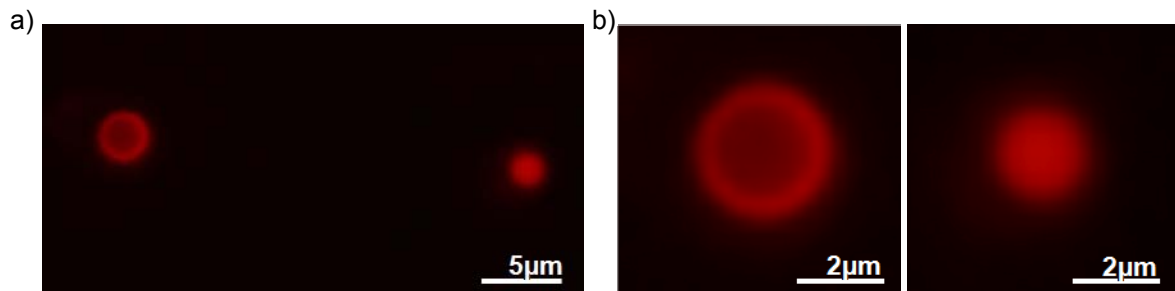


Abb. 4.20: a) Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme einer durch Filmrehydrierung präparierten NR-beladenen Lösung (PVN2); b) vergrößerte Darstellung

Die über die gesamte Struktur homogene Fluoreszenzintensität im Falle des etwa $2\mu\text{m}$ großen Vesikels lässt sich auf die limitierte Auflösung des Mikroskops zurückführen. Die Auflösungsgrenze verhindert, dass fluoreszierende Domänen mit einem Abstand kleiner $1.2\mu\text{m}$ separat abgebildet werden können. Daher können nur die Riesen-Vesikel ($d > 2.5\mu\text{m}$) strukturell aufgelöst werden.

Der Nachweis, dass es sich auch bei den kleineren fluoreszierenden Strukturen um Vesikel handelt, konnte durch cryogene TEM-Aufnahmen erbracht werden. Abbildung 4.21 zeigt cryoTEM-Bilder der gleichen, durch Filmrehydrierung präparierten, NR-beladenen Probe (PVN2). Weitere Aufnahmen sind im Anhang in Abbildung 7.21 gezeigt.

Wie zu sehen, liegen in der Lösung ausschließlich Vesikel vor. Die Größe der abgebildeten Strukturen reicht von $d \approx 60\text{nm}$ bis hin zu $d > 2\mu\text{m}$. In Kombination mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich demnach über den gesamten Größenbereich um in der Schale beladene Vesikel.

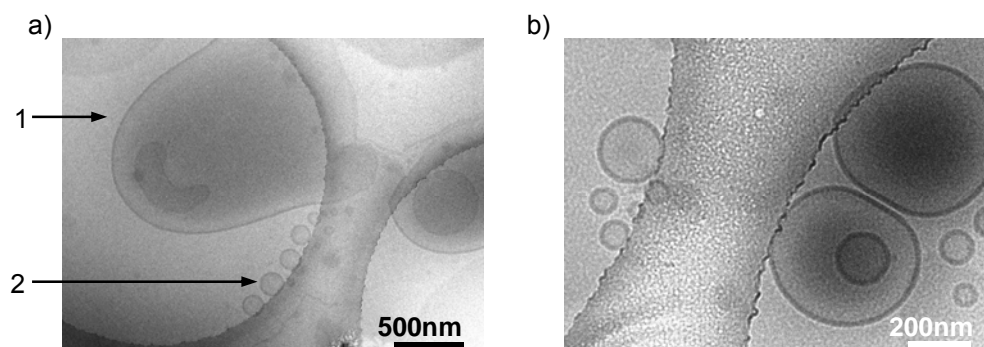


Abb. 4.21: CryoTEM-Aufnahmen einer NR-beladenen Vesikellösung (PVN2) via Filmrehydrierung: a) Vesikel mit $d > 2\mu\text{m}$ (1), Vesikel mit $d \approx 150\text{nm}$ (2); b) Vesikel mit $d = 60\text{-}500\text{nm}$

4.2.3. Beladung durch Phasentransfer

Flüssig/flüssig Phasentransfer

Bei der hydrophoben Beladung durch flüssig/flüssig Phasentransfer wird, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, die wässrige Vesikellösung mit einer Farbstofflösung in Toluol überschichtet und erschütterungsfrei gelagert. Durch einen Austauschprozess an der flüssig-flüssig Grenzfläche wird nach und nach Farbstoff in die Vesikel eingelagert und somit in die wässrige Phase überführt.

In Abbildung 4.22a sind Proben zu sehen, nachdem sie 25 Tage mit Oil Blue N (OBN) in Toluol ($C_{\text{OBN}}=5\text{g/l}$) überschichtet waren. Die zugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.22b gezeigt.

Für die überschichteten Vesikellösungen mit $C_{1\text{B}}=1\text{g/l}$ (1) bzw. $C_{1\text{B}}=2\text{g/l}$ (2) ist die Überführung des Farbstoffs in die wässrige Phase gut zu erkennen. Die Färbung ist dabei nahe der flüssig-flüssig Grenzfläche am intensivsten. Da die Blindproben Blind1 ohne Polymer (3) und Blind2 mit PEO (4) keinen OBN-Übergang in die wässrige Lösung begünstigen, muss die Farbstoffaufnahme durch die hydrophobe PB-Domäne der Vesikel erfolgen.

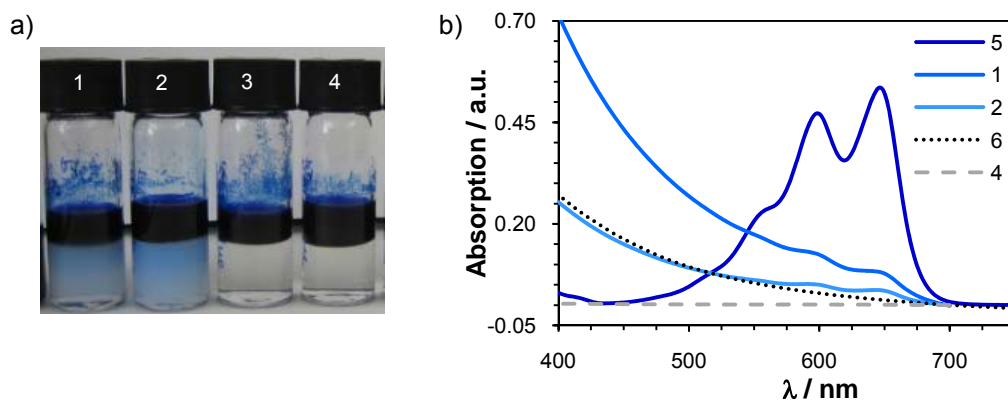


Abb. 4.22: a) Foto und b) Absorptionsspektren nach 25 Tagen flüssig/flüssig Phasentransfer bei $C_{\text{OBN}}=5\text{g/l}$: Vesikellösungen mit Polymerkonzentration $C_{1\text{B}}=1\text{g/l}$ (1) und $C_{1\text{B}}=2\text{g/l}$ (2), Blindproben Blind1 ohne Polymer (3) und Blind2 mit PEO (4), OBN in Toluol (5), unbeladene Vesikellösung (6)

Der Vergleich zwischen den beladenen Vesikellösungen mit unterschiedlicher Polymerkonzentration (1,2) lässt vermuten, dass ein größerer PB-Anteil (2) bei gleicher Experimentdauer zu einer höheren Farbstoffkonzentration in der wässrigen Lösung führt. Dies lässt sich durch die Absorptionsspektren jedoch nicht quantifizieren. Wie in Abbildung 4.22b zu sehen, setzt bereits bei Wellenlängen $\lambda < 600\text{nm}$ ein starker Anstieg des Untergrunds ein. Dies ist einerseits ein Streueffekt der Vesikel und somit mit höherer Polymerkonzentration stärker ausgeprägt, andererseits gehen vermutlich auch Spuren von Toluol in die wässrige Phase über und tragen zum höheren Untergrund bei. Die schwache Intensität der OBN-Peaks im Vergleich zu diesem starken Streuuntergrund lässt keine aussagekräftige Quantifizierung der Farbstoffaufnahme zu.

Wie Oil Blue N kann auch Oil Red EGN auf diese Weise in die Vesikel eingelagert werden. In Abbildung 4.23a ist das Ergebnis der OBN- und ORE-Beladung einer Vesikellösung mit

$C_{1B}=3.3\text{g/l}$ zu sehen. Die wässrigen Phasen wurden nach 250 Tagen vorsichtig abpipettiert und filtriert ($0.45\mu\text{m}$). Abbildung 4.23b zeigt die zugehörigen Absorptionsspektren.

Der Farbstofftransfer ist über diesen langen Zeitraum deutlich weiter vorangeschritten wie auch an der Struktur der Spektren zu erkennen ist. Trotzdem heben sich die Peaks nur wenig vom Untergrund ab.

Nach Vernetzung der Proben kann durch TEM-Aufnahmen gezeigt werden, dass die Vesikel durch den Farbstofftransfer strukturell nicht beeinflusst werden (s. Abb. 4.24 und Anhang ab Abb. 7.22). Auch die Ergebnisse dynamischer Lichtstreu-Messungen zeigen keine signifikante Veränderung des mittleren hydrodynamischen Radius und der Größenverteilung, wie in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

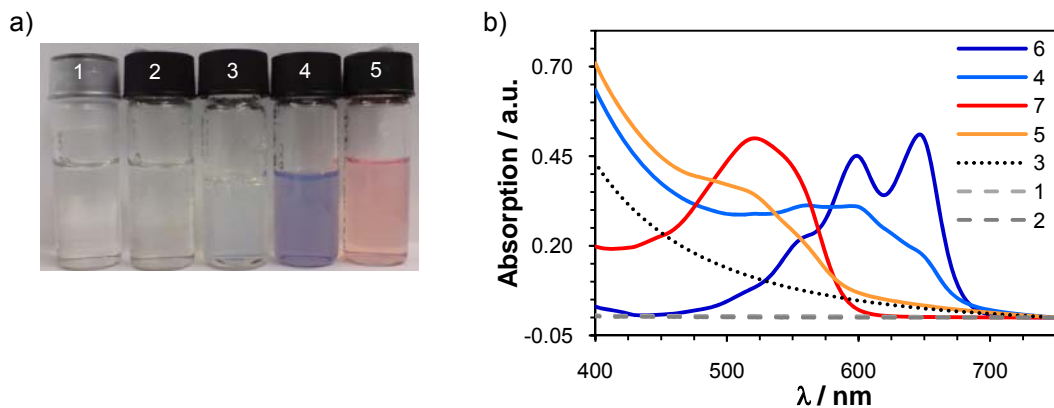


Abb. 4.23: Nach 250 Tagen Phasentransfer abgetrennte und filtrierte Proben;
 a) Foto: Vesikellösung mit $C_{1B}=3.3\text{g/l}$ (3) überschichtet mit OBN (4) bzw. ORE (5), PEO-Blindprobe für OBN (2) bzw. ORE (1);
 b) Absorptionsspektren: OBN in Toluol (6), ORE in Toluol (7)

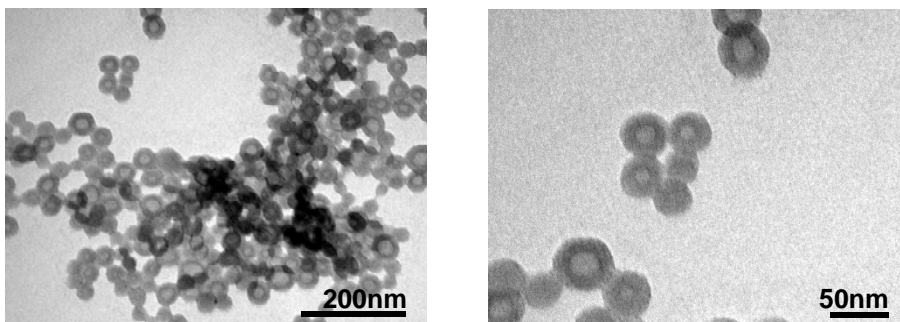


Abb. 4.24: TEM-Aufnahmen nach 250 Tagen ORE-Phasentransfer (vernetzt)

Tab. 4.7: DLS-Ergebnisse der Vesikellösungen vor und nach Beladung durch flüssig/flüssig Phasentransfer

Probe	Farbstoff	$\langle R_h \rangle / \text{nm}$	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$
PV30	---	29	<0.05
PV30-1	OBN	30	0.05
PV30-2	ORE	30	0.07

$C_{1B}=3.3\text{g/l}$; wässrige Lösungen nach 250 Tagen abpipettiert und filtriert ($0.45\mu\text{m}$);
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Der mögliche Einfluss des Toluols auf den Untergrund der Spektren, sowie das kontinuierliche Verdampfen, das über so lange Zeiträume eine variierende Farbstoffkonzentration an der Grenzfläche zur Folge hat und die Reproduzierbarkeit einschränkt, sind die Nachteile des flüssig/flüssig Phasentransfers.

Fest/flüssig Phasentransfer

Auch Überschichtung der Vesikellösungen mit festem Farbstoff führt zur Beladung. Ohne Toluol ist so im fest/flüssig Phasentransfer eine Beladung über längere Zeiträume möglich. Die Ergebnisse aus flüssig/flüssig Beladung deuteten auf eine Abhängigkeit der transferierten Farbstoffkonzentration von der Polymerkonzentration hin (vgl. Abb. 4.22). Um dies genauer zu untersuchen wurden Vesikellösungen mit $C_{1B}=1/2.7/5.3/7.4\text{g/l}$ mit feinpulvrigem ORE überschichtet. Abbildung 4.25a zeigt ein Foto der Proben nach 73 Tagen. Die zunehmende Farbintensität mit steigender Polymerkonzentration ist gut zu erkennen.

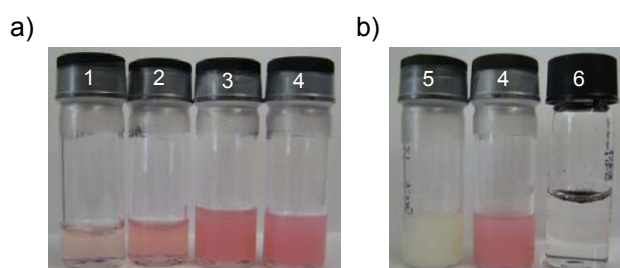


Abb. 4.25: Nach 73 Tagen fest/flüssig Phasentransfer mit ORE (abpipettiert, filtriert):
 a) nach steigender Polymerkonzentration $C_{1B}=1/2.7/5.3/7.4\text{g/l}$ (1-4);
 b) im Vergleich mit unbeladener Vesikellösung $C_{1B}=7.4\text{g/l}$ (5) und PEO-Blindprobe (6)

Bei hohen Polymerkonzentrationen liegen auch deutlich mehr Vesikel in Lösung vor, so dass diese Lösungen stark getrübt sind, wie am Beispiel der unbeladenen Vesikellösung mit $C_{1B}=7.4\text{g/l}$ (5) in Abbildung 4.25b zu sehen. Durch die Trübung ist auch hier der Streuuntergrund in Absorptionsspektren sehr hoch (s. Anhang Abb. 7.5). Die Verdünnung der Lösung reduziert diesen Effekt, da aber gleichzeitig auch die Farbstoffpeaks reduziert werden, ist eine verlässliche, quantitative Aussage über die transferierte Farbstoffkonzentration nicht möglich.

Um die Kinetik der Farbstoffüberführung in die wässrige Phase zu bestimmen, wurden außerdem ORE- und NR-Beladungen direkt in UV-Küvetten durchgeführt. Der Pegel der Vesikellösung war dabei so hoch, dass die Grenzfläche zum Farbstoff deutlich außerhalb des Lichtstrahls des Spektrometers lag und somit nur transferierter Farbstoff in der Lösung detektiert wurde. In den Abbildungen 4.26 und 4.27 sind die Absorptionsspektren und der Intensitätsverlauf im Maximum gegen die Beladungsdauer aufgetragen.

Diese Art der Farbstoffbeladung verläuft innerhalb der Messgenauigkeit in beiden Systemen linear mit der Zeit. Insgesamt ist dieser Transfervorgang jedoch sehr langsam. Auch nach 156

Tagen (ORE-System), bzw. 112 Tagen (NR-System) läuft die Intensitätskurve nicht in ein Sättigungsplateau, die maximale Beladung ist demnach noch nicht erreicht.

Über die 'NR in PB'-Kalibrierung kann die NR-Beladung nach 112 Tagen Phasentransfer zu etwa 0.8mg NR pro 1g Polymer bestimmt werden. Ausgehend von einer maximalen NR-Beladung von 3mg pro 1g Polymer (s. Abs. 4.2.1) entspricht dies einer erreichten Beladung von 25%.

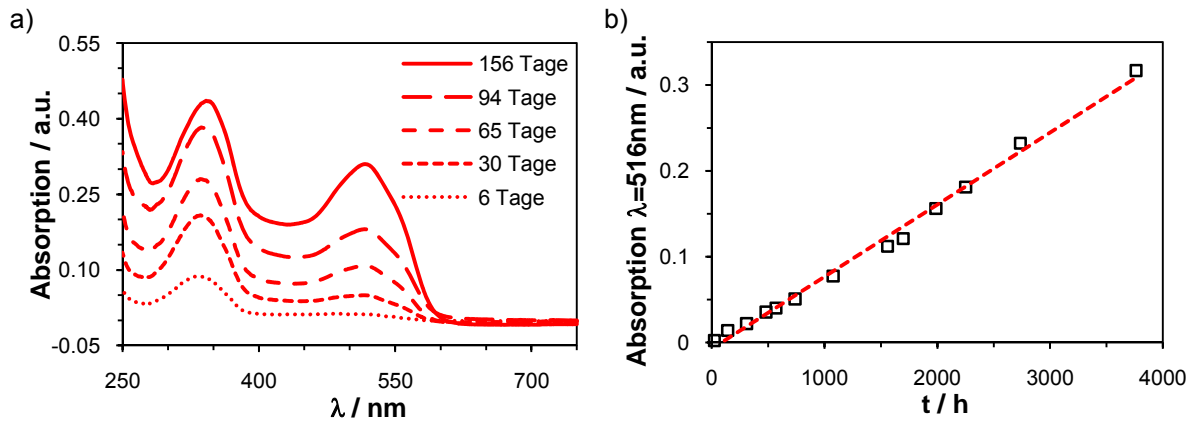


Abb. 4.26: Kinetik der ORE-Beladung durch fest/flüssig Phasentransfer
 a) Absorptionsspektren; b) Intensität bei $\lambda=516$ nm gegen Beladungsdauer t
 (Basislinie: zugehörige unbeladene Vesikellösung)

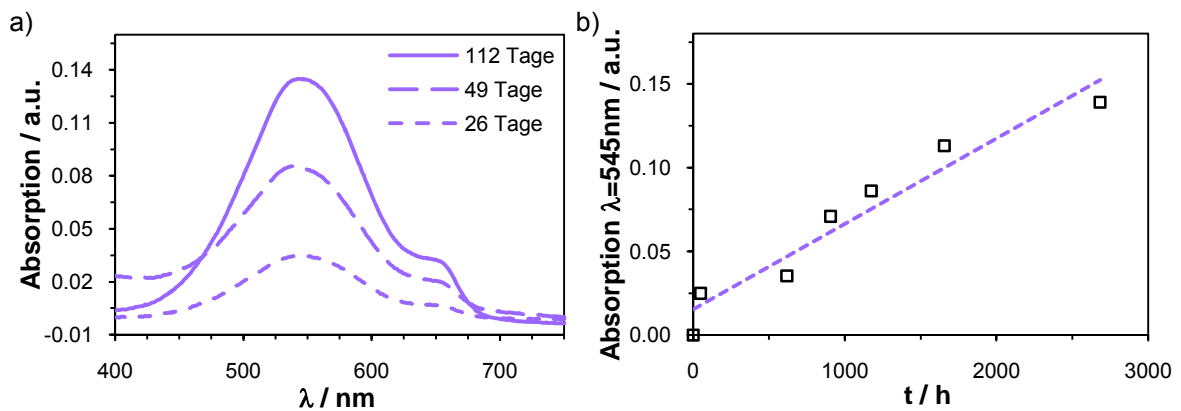


Abb. 4.27: Kinetik der NR-Beladung durch fest/flüssig Phasentransfer
 a) Absorptionsspektren; b) Intensität bei $\lambda=545$ nm gegen Beladungsdauer t
 (Basislinie: zugehörige unbeladene Vesikellösung)

4.3. Hydrophobe Beladung mit Quantum Dots

Als hydrophobe Modell-Substrate aus dem Nanopartikelbereich wurden fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle, sogenannte Quantum Dots, zur Einlagerung in die PB-Domäne der Vesikelschale verwendet. Diese tragen hydrophobe Oberflächenliganden und sind somit wasserunlöslich.

4.3.1. Quantum Dots mit $\langle d \rangle = 2.5 \text{ nm}$

Als kleinste Vertreter wurden CdSe-Kerne ohne Schale (QD1) verwendet, deren mittlerer Durchmesser auf Grund des charakteristischen Absorptionspeaks in Toluol bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ zu $\langle d \rangle = 2.5 \text{ nm}$ bestimmt wurde [Xie 2006]. Aus der Synthese sind diese Kerne mit TOPO (Triocetylphosphinoxid) stabilisiert [Mews 2005]. Durch dynamische Lichtstreuung wurde der mittlere hydrodynamische Radius, der zusätzlich den Einfluss der Oberflächenliganden auf die Partikelgröße berücksichtigt, zu $\langle R_h \rangle = 3.6 \text{ nm}$ in THF bestimmt (s. Anhang Abb. 7.6).

Ausgehend von einer QD1-Lösung in THF wurde die Präparation beladener Vesikel mittels der Co-Lösemittelmethode (vgl. Abs. 4.1.1) untersucht. Der Polymer/THF-Lösung wurden die hydrophoben Quantum Dots zugesetzt, so dass nach Wasserzugabe und THF-Abdampfen wässrige Lösungen der QD1-beladenen Vesikel erhalten wurden (Tropfgeschwindigkeit 9.9 ml/h , THF-Endgehalt 27 Gew.-% , $C_{1B} = 1 \text{ g/l}$). Überschüssige QDs fielen als orange Klumpen aus der Lösung aus und wurden abfiltriert ($0.45 \mu\text{m}$). In Abbildung 4.28a sind die Absorptionsspektren der QD1/THF-Lösung (1) und der QD1-beladenen Vesikellösung (2) zu sehen.

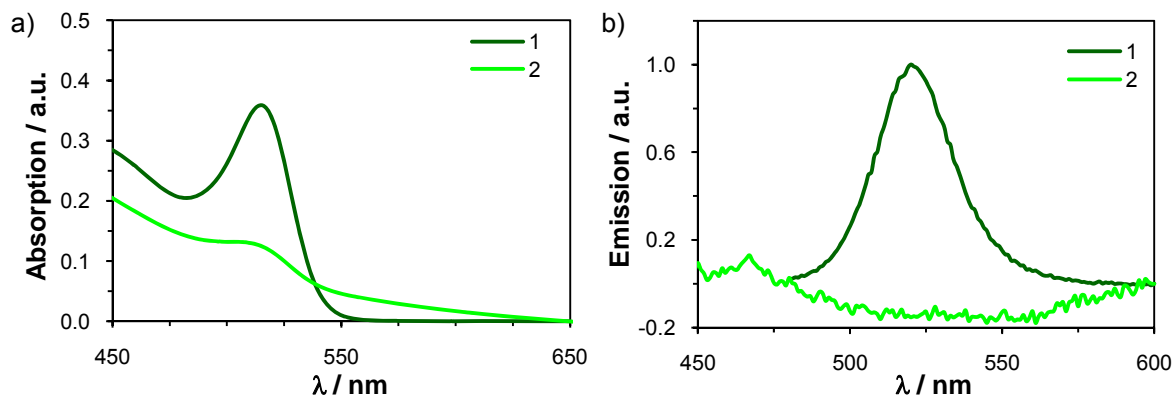


Abb. 4.28: a) Absorptionsspektren und b) Emissionsspektren: QD1 in THF (1), QD1-beladene Vesikellösung (2)

Die QD1-Lösung in THF (1) zeigt bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ einen Absorptionspeak, der für die Energielücke zwischen besetzten und unbesetzten Niveaus und somit für die Halbleiter-Kristallgröße charakteristisch ist. Für Wellenlängen unterhalb dieses Absorptionsmaximums tritt wie erwartet kontinuierliche Absorption auf (vgl. Abs. 2.2.2).

Die QD1-beladene Vesikellösung zeigt analog der THF-Lösung eine Absorption um 520 nm . Der ansteigende Untergrund für Wellenlängen $< 600 \text{ nm}$ ist eine Überlagerung der kontinuierlichen QD-Absorption unterhalb $\lambda = 520 \text{ nm}$ und Streueffekten auf Grund der Vesikelgröße (vgl. Abs. 4.2.1).

Der zusätzliche Beladungsnachweis durch Fluoreszenzmessung war nicht möglich. In Abbildung 4.28b sind die Emissionsspektren der QD1-Lösung in THF (1) und der QD-beladenen Vesikellösung (2) gezeigt. Während die CdSe-Kerne (QD1) in THF eine starke Emission um 520nm besitzen, konnte in der QD-beladenen Polymerlösung (2) keine Emission detektiert werden.

Die verwendeten CdSe-Kerne sind ohne Schale nicht von ihrer direkten Umgebung abgeschirmt. Da jedoch die dreidimensionale räumliche Begrenzung im Nanometerbereich für die charakteristischen Eigenschaften der Halbleiter-Nanokristalle verantwortlich ist (vgl. Abs. 2.2.2), können ohne schützende Schale Umgebungsveränderungen einen starken Einfluss z.B. auf die Fluoreszenzeigenschaften haben. Sehr wahrscheinlich ist im Falle der QD1-beladenen Vesikellösung die wässrige Umgebung für das Quenchen der Fluoreszenz verantwortlich [Basché 2001, Zhu 2007]. Dieser Effekt ist nicht reversibel; auch nach Gefriertrocknen der QD1-beladenen Probe und Resolubilisierung in THF ist keine Emission detektierbar, obwohl das Absorptionssignal erhalten bleibt (s. Anhang Abb. 7.7). Somit kann der für das Quenchen verantwortliche Kontakt zum Wasser bereits während der Präparation stattgefunden haben, und die Einlagerung in die PB-Schale hätte keinen weiteren Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten der CdSe-Kerne.

TEM-Aufnahmen der QD1-beladenen Lösung zeigten, dass auch in Gegenwart der hydrophoben Quantum Dots Selbstorganisation zu Vesikeln stattfindet. Ein mikroskopischer Nachweis der Einlagerung der CdSe-Kerne in die Vesikelschale konnte in der durch Co-Lösemittel präparierten Lösung nicht erbracht werden.

Eine QD1-beladene Vesikellösung präpariert durch Filmrehydrierung zeigte ebenfalls keine Emission. In TEM-Aufnahmen nach der Vernetzung konnten jedoch 'Schatten' abgebildet werden, die in ihrer Größe den verwendeten CdSe-Kernen entsprechen (s. Abb. 4.29a).

Zwar sollten die QDs auf Grund ihrer schwereren Atome einen deutlich höheren TEM-Kontrast besitzen als die polymeren Vesikel (vgl. Abs. 3.3), durch die Messung in Transmission kann dieser starke Kontrastunterschied jedoch verloren gehen, da die 2.5nm großen CdSe-Kerne im Vergleich zu den Vesikeln mit ihrer dicken Schale sehr klein sind (s. Abb. 4.29b).

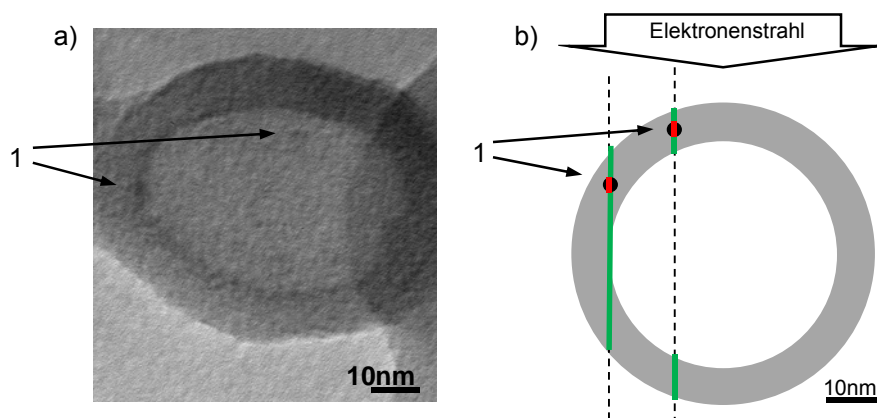


Abb. 4.29: a) TEM einer QD1-beladenen Lösung durch Filmrehydrierung nach Vernetzung; b) TEM-Kontrastanteil der CdSe-Kerne (1) mit $d=2.5\text{nm}$ in rot, relativ zu dem einer 15nm dicken Schale eines Vesikels mit $d=60\text{nm}$ in grün

Um eine detailliertere Charakterisierung der QD-Beladung zu ermöglichen wurden im Weiteren größere Quantum Dots mit Kern-Schale-Struktur verwendet.

4.3.2. Quantum Dots mit $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$

Quantum Dots mit Kern-Schale-Struktur sind durch ihre inorganische Schale vor Umgebungseinflüssen geschützt und besitzen deutlich höhere Fluoreszenzquantenausbeuten als ihre CdSe-Kerne allein. Um auch nach der Einlagerung in die Vesikelschale ein deutliches Fluoreszenzsignal zu erhalten, wurden CdSe-Kerne mit einer Schale aus vier Schichten CdS und einer Außenschicht ZnS verwendet (QD2). Der mittlere Durchmesser der Kerne wurde auf Grund des charakteristischen Absorptionspeaks in Toluol bei $\lambda = 585 \text{ nm}$ zu $\langle d \rangle = 4 \text{ nm}$ bestimmt [Xie 2006]. Zusammen mit der Schale besitzen die Partikel eine mittlere Größe von $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$ ($\pm 0.6 \text{ nm}$), wie aus TEM-Messungen hervorgeht (s. Anhang Abb. 7.8a). Aus der Synthese sind diese QDs mit Ölsäure und Oleylamin stabilisiert [Mews 2005]. Durch dynamische Lichtstreuung wurde der mittlere hydrodynamische Radius, der zusätzlich den Einfluss der Oberflächenliganden auf die Partikelgröße berücksichtigt, zu $\langle R_h \rangle = 5.4 \text{ nm}$ in Chloroform bestimmt (s. Anhang Abb. 7.9a).

Neben Toluol ist Chloroform ein sehr gutes Lösemittel für solche Quantum Dots mit Kern-Schale-Struktur und ein häufig gewähltes Lösemittel nach der Synthese. Ausgehend von dieser QD2-Lösung in Chloroform wurde die Vesikelbeladung untersucht. Da Chloroform und Wasser nicht miteinander mischbar sind, konnte keine Beladung über die Co-Lösemittel-methode durchgeführt werden. Auch die Beladung über fest/flüssig Phasentransfer ist nicht möglich, da getrocknete Quantum Dots auch im guten Lösemittel Chloroform selbst unter Energiezufuhr (Ultraschall) nur bedingt resolubilisiert werden können.

Stattdessen wurden QD2-beladene Vesikellösungen durch Filmrehydrierung präpariert. Durch anschließende Filtration ($0.45 \mu\text{m}$) wurde die Lösung von nicht resolubilisierten Anteilen abgetrennt und gleichzeitig auf Vesikel einer einheitlicheren Größe reduziert. In Abbildung 4.30a sind die Absorptionsspektren der QD2/Chloroform-Lösung (1) und der so erhaltenen QD2-beladenen Vesikellösung (2) zu sehen. Die zugehörigen Emissionsspektren sind in Abbildung 4.30b gezeigt.

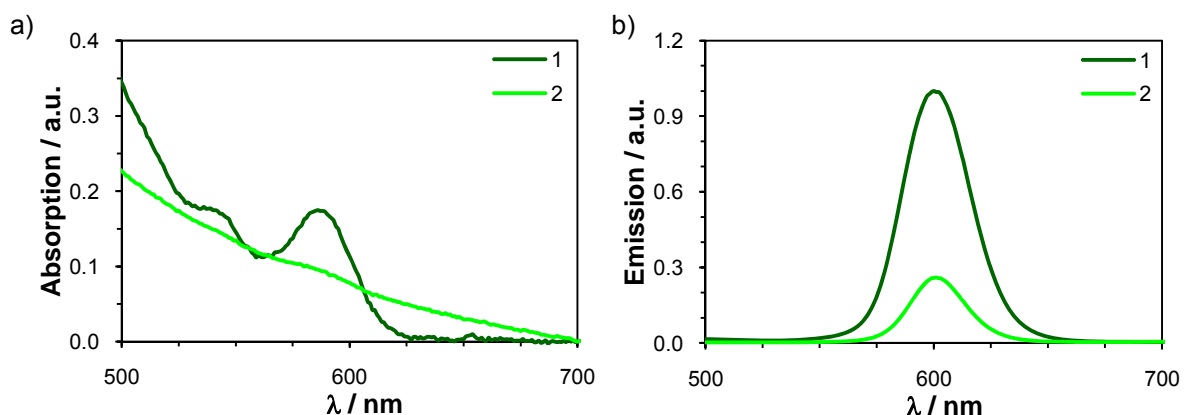


Abb. 4.30: a) Absorptionsspektren und b) Emissionsspektren: QD2 in Chloroform (1), QD2-beladene Vesikellösung (2)

Die QD2-Lösung in Chloroform (1) zeigt wie erwartet einen Absorptionspeak und kontinuierliche Absorption für Wellenlängen unterhalb dessen Maximum bei $\lambda=585\text{nm}$ (vgl. Abs. 2.2.2). Das Spektrum der QD2-beladenen Vesikellösung (2) lässt um 585nm ebenfalls eine schwache Absorption erkennen. Der ansteigende Untergrund für Wellenlängen $\lambda < 600\text{nm}$ ist auch hier auf eine Überlagerung der Streueffekte auf Grund der Vesikelgröße (vgl. Abs. 4.2.1) und der schwachen, aber kontinuierlichen QD-Absorption unterhalb 585nm zurückzuführen.

Das Fluoreszenzspektrum der QD2-beladenen Vesikellösung zeigt eine deutliche Emissionsbande bei 600nm , die dem Maximum der QD2 gelöst in Chloroform entspricht (s. Abb. 4.30b). Durch die inorganische Schale der QDs ist der CdSe-Kern demnach ausreichend von der Umgebung abgeschirmt, so dass die Fluoreszenz auch nach Einlagerung in die Vesikelschale erhalten bleibt.

Durch TEM- und cryoTEM-Aufnahmen konnte die erfolgreiche Vesikelbeladung auch mikroskopisch nachgewiesen werden. In Abbildung 4.31a ist eine cryoTEM-Aufnahme eines QD2-beladenen Vesikels gezeigt (s. auch Anhang Abb. 7.24). Abbildung 4.31b zeigt eine TEM-Aufnahme der gleichen Lösung nach Vernetzung. Die Quantum Dots besitzen auf Grund ihrer Zusammensetzung einen starken Kontrast und sind daher gut als schwarze Punkte innerhalb der Vesikelstruktur zu erkennen.

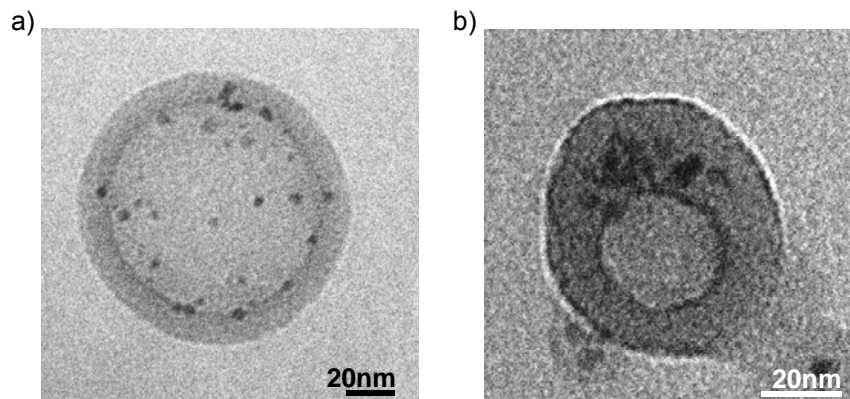


Abb. 4.31: a) CryoTEM-Aufnahme einer QD2-beladenen Vesikellösung;
b) TEM-Aufnahme nach Vernetzung

Durch die Messung in Transmission entspricht das TEM-Bild der Projektion der dreidimensionalen Struktur. Demnach sind auch die in der Vesikelmittle abgebildeten QDs in Wirklichkeit innerhalb der Vesikelschale positioniert (vgl. Abs. 3.3).

Dies lässt sich anhand von Kippserien während der Messung zeigen. Dabei wird der Halter mit dem Probengrid gekippt, wie in Abbildung 4.32a schematisch gezeigt. Durch das Kippen ändert sich der Winkel des Vesikels im Strahl, wodurch die Positionen der Quantum Dots in der Projektion 'wandern'. Abbildung 4.32b zeigt cryoTEM-Bilder eines QD2-beladenen Vesikels bei 0° und bei 30° Kippwinkel (vollständige Kippserie, s. Anhang Abb. 7.25).

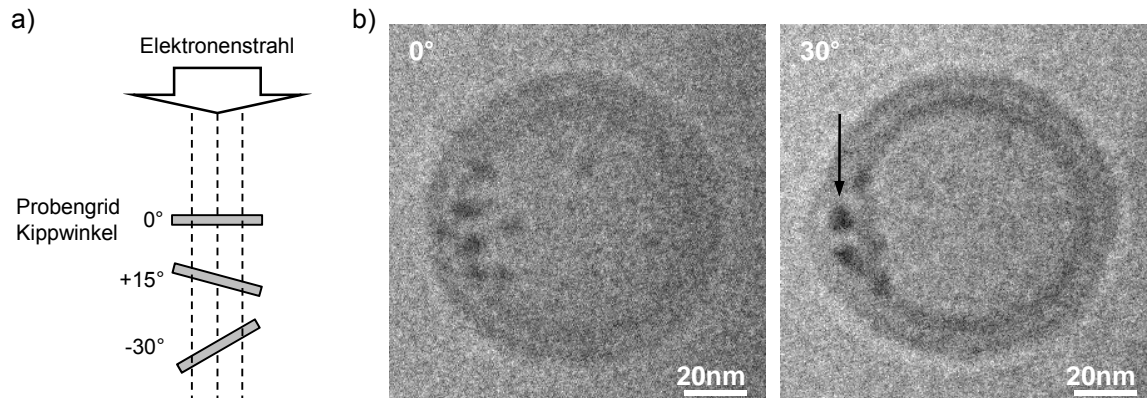


Abb. 4.32: Kippserie im cryoTEM: a) schematische Darstellung;
b) Aufnahmen eines QD2-beladenen Vesikels bei 0° und 30° Kippwinkel

Die 'Wanderung' der QDs ist gut zu verfolgen, und bei 30° Kippwinkel ist die Position der Nanopartikel innerhalb der Vesikelschale deutlich zu erkennen. Offensichtlich liegen die Nanopartikel mittig in der Schale, d.h. zwischen den beiden angrenzenden PB-Schichten der Doppelmembran. Dabei verursacht das Volumen der QDs, dass sich die Membran ausbeulen muss um die Partikel zu umschließen, wie in Abbildung 4.32b (rechts) zu sehen.

Die zusätzliche Krümmung der Membranschichten, die nötig ist um die Nanopartikel einzulagern, begünstigt vermutlich, dass die QDs selten einzeln über das gesamte Vesikel verteilt eingelagert werden (s. Abb. 4.31a), sondern bevorzugt in direkter räumlicher Nähe zueinander verkapselt sind. Denn liegen die Nanopartikel benachbart innerhalb der Membranschichten, ist die zusätzliche Krümmungsfläche deutlich kleiner als bei separiert eingelagerten QDs. Bereits in Abbildung 4.31b ist diese häufig nur einseitige Vesikelbeladung zu sehen. Weitere cryoTEM-Aufnahmen, die verschiedene Beladungszustände zeigen, sind in Abbildung 4.33 und im Anhang in Abbildung 7.24 gezeigt. Neben gering-beladenen und sehr hoch-beladenen Vesikeln liegen auch unbeladene Vesikel in Lösung vor.

Da die Filmrehydrierung außerdem zu keiner vollständigen Resolubilisierung des QD2/Polymer-Films führt und ungelöste Anteile durch die Filtration abgetrennt werden, ist eine Quantifizierung der QD-Beladung aus diesen Ergebnissen nicht möglich.

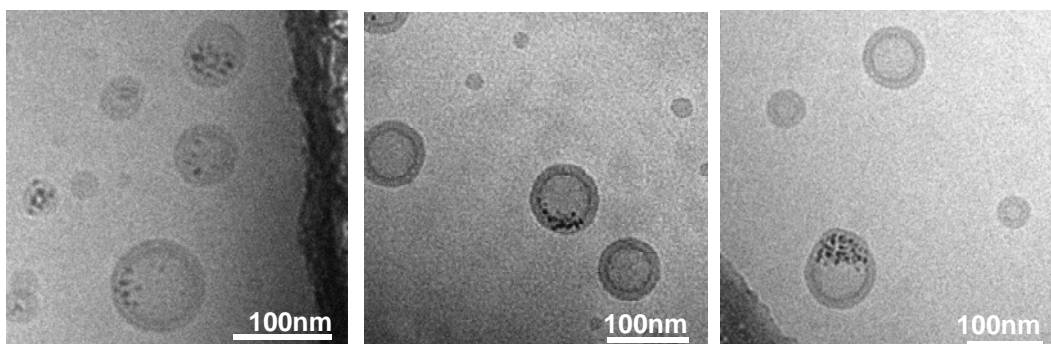


Abb. 4.33: CryoTEM-Aufnahmen einer QD2-beladenen Vesikellösung

Wie dynamische Lichtstreu-Messungen ergaben, sind die durch Filmrehydrierung präparierten QD2-beladenen Vesikellösungen auch nach Filtration ($0.45\mu\text{m}$) breit verteilt mit $\mu_2 \approx 0.18$ bei $\langle R_h \rangle = 67\text{nm}$ (Probe PVD6) bzw. $\mu_2 \approx 0.12$ bei $\langle R_h \rangle = 99\text{nm}$ (Probe PVD22). Da die Methode der Filmrehydrierung keine Größenkontrolle während der Präparation ermöglicht, sind die im Mittel größeren Vesikel in Lösung PVD22 vermutlich auf eine geringere Energiezufuhr während des Rehydrierungsprozess zurückzuführen.

Werden die Lösungen gut verschlossen aufbewahrt, sind sie über einen langen Zeitraum (>8 Monate) stabil, wie wiederholte Fluoreszenz- und Lichtstreu-Messungen zeigten.

4.3.3. Quantum Dots mit $\langle d \rangle = 7.6\text{nm}$

Als weitere Quantum Dots wurden CdSe-Kerne mit einer Schale aus 9 Schichten CdS und einer Außenschicht ZnS verwendet (QD3). Der mittlere Durchmesser der Kerne wurde auf Grund des charakteristischen Absorptionspeaks in Toluol bei $\lambda = 605\text{nm}$ zu $\langle d \rangle = 4.8\text{nm}$ bestimmt [Xie 2006]. Auf Grund der dickeren Schale besitzen diese Partikel eine mittlere Größe von $\langle d \rangle = 7.6\text{nm}$ ($\pm 1.5\text{nm}$), wie aus TEM-Messungen hervorgeht (s. Anhang Abb. 7.8b). Aus der Synthese sind diese QDs mit Ölsäure und Oleylamin stabilisiert [Mews 2005]. Durch dynamische Lichtstreuung wurde der mittlere hydrodynamische Radius, der zusätzlich den Einfluss der Oberflächenliganden auf die Partikelgröße berücksichtigt, zu $\langle R_h \rangle = 7.0\text{nm}$ in Hexan bestimmt (s. Anhang Abb. 7.9b).

Neben Toluol ist auch Hexan ein sehr gutes Lösemittel für die hier verwendeten Quantum Dots mit Kern-Schale-Struktur und in diesem Fall das Lösemittel nach der Synthese. Da auch Hexan nicht mit Wasser mischbar ist, konnte eine Vesikelbeladung unter Verwendung der Co-Lösemittelmethode nicht untersucht werden. Ausgehend von der QD3/Hexan-Lösung wurde jedoch eine beladene Vesikellösung durch Filmrehydrierung präpariert. Durch anschließende Filtration ($0.45\mu\text{m}$) wurde die Lösung von nicht resolubilisierten Anteilen abgetrennt und gleichzeitig auf Vesikel einer einheitlicheren Größe reduziert.

Spektroskopisch konnte weder vor noch nach Filtration eine stabile Einlagerung der QDs nachgewiesen werden. Abbildung 4.34 zeigt die Absorption und Emission der QD3/Vesikellösung durch Filmrehydrierung (2) im Vergleich mit den Quantum Dots gelöst in Hexan (1).

Zwar ist im Emissionsspektrum der QD3/Vesikellösung (2) eine schwache Fluoreszenz um $\lambda = 610\text{nm}$ zu erkennen (s. Abb. 4.34b), dieses Signal ist jedoch nicht über die Zeit stabil. Bei erneuten Messungen nach etwa zwei Wochen war keine signifikante Emission mehr detektierbar. Vermutlich sind geringe Anteile aggregierter QDs für die zunächst messbare Fluoreszenz verantwortlich, da die inorganische Schale auch Emission in der wässrigen Umgebung zulässt. Wegen der fehlenden Stabilisierung fallen diese jedoch nach und nach vollständig aus der Lösung aus.

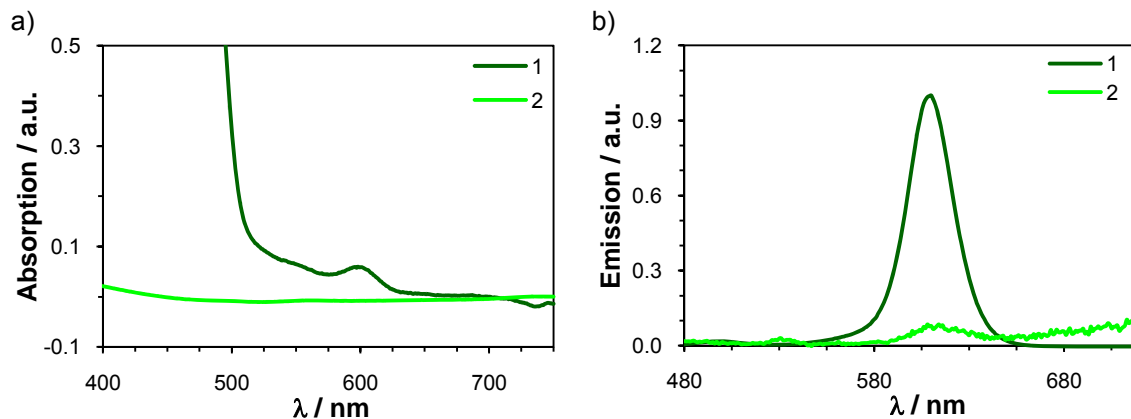


Abb. 4.34: a) Absorptionsspektren und b) Emissionsspektren: QD3 in Hexan (1), QD3/Vesikellösung (2)

Für einen weiteren Beladungsansatz wurde ein Teil der Quantum Dots in Methanol gefällt und in Chloroform resolubilisiert. Ausgehend von dieser QD3'/Chloroform-Lösung wurde ein neuer QD3'/Polymer-Film präpariert und analog der erfolgreichen QD2-Beladung rehydriert. Diese Vorgehensweise sollte mögliche Einflüsse des Hexans auf die Beladung ausschließen. In Abbildung 4.35 ist das Emissionsspektrum dieser QD3'/Vesikellösung nach Filtration gezeigt.

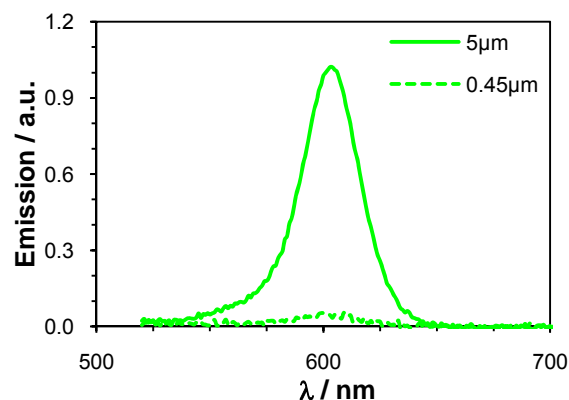


Abb. 4.35: Emissionsspektrum der QD3'/Vesikellösung durch Filmrehydrierung aus Chloroform (norm.) nach Filtration durch 5µm- bzw. 0.45µm-Filter

Nach Abtrennung der nicht resolubilisierten Anteile durch einen 5µm-Filter ist zunächst eine signifikante Emission der QDs detektierbar. Wird die Lösung zusätzlich durch 0.45µm filtriert um eine einheitlichere Vesikelgröße zu erhalten, lässt sich die Emission zwar noch erkennen, jedoch waren auch diese Lösungen nicht über einen längeren Zeitraum stabil, so dass keine weiteren Messungen durchgeführt wurden.

Für die nicht erfolgte Einlagerung dieser QDs sind zwei Hauptgründe denkbar: Zum einen kann Hexan als Lösemittel nach der QD-Synthese einen Einfluss auf das Verhältnis von Ölsäure und Oleylamin als Oberflächenliganden haben. Eine derartige, im Vergleich zur direkten Chloroform-Lösung möglicherweise geänderte Oberflächenbelegung wäre auch durch das Umfällen und erneute Lösen in Chloroform vermutlich nicht vollständig zu revidieren. Da jedoch Hexan im Vergleich zu Chloroform das unpolare Lösemittel ist, sollte

sich eine solche Oberflächenänderung nicht nachteilig auf die Einlagerung in die unpolare, hydrophobe Polybutadien-Umgebung der Vesikelschale auswirken – im Gegenteil.

Anzunehmen ist vielmehr, dass die zur Einlagerung der Nanopartikel nötige zusätzliche Krümmung der Membranschichten für eine Partikelgröße von $\langle d \rangle = 7.6 \text{ nm}$ nicht mehr möglich ist. Im Vergleich zu den stabil eingelagerten QD2 sind diese Quantum Dots im Mittel etwa 2 nm größer und erfordern daher eine deutlich stärkere lokale Aufweitung der Vesikelmembran. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass diese Strukturänderung für die Vesikel nicht realisierbar ist, und stattdessen Aggregation der QDs eintritt und diese aus der Lösung ausfallen. Demnach läge für dieses System die maximale Partikelgröße für stabile, hydrophobe Beladung der 15 nm dicken Vesikelschale unterhalb eines Trockendurchmessers von $d = 7.6 \text{ nm}$.

4.4. Nachweis durch Ensemble-Messungen

Die bisherigen Nachweismethoden lassen einige Fragen offen. Mikroskopische Messungen wie TEM-Aufnahmen sind stets geprägt von dem Bemühen des Experimentators die gewünschte Struktur abzubilden. Wegen der häufig auftretenden Artefakte und Verunreinigungen ist es teilweise schwer zu entscheiden, welche Strukturen der Probe entsprechen und welche auf methodische Fehler zurückzuführen und somit vernachlässigbar sind. Zusätzlich ist eine realistische Abbildung der vorliegenden Strukturen grundsätzlich durch die limitierte Anzahl an Bildern begrenzt. Die cryoTEM-Messungen selektieren zudem durch die Dicke des Wasserfilms den Größenbereich der abbildbaren Strukturen. Solche Aufnahmen geben demnach häufig nur einen kleinen Anteil einer Probe wieder.

Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Charakterisierung der Vesikelbeladung. Zusätzlich zu den bisher gezeigten Ergebnissen wurden daher Ensemble-Messungen als Nachweis durchgeführt, in denen über eine große Anzahl Partikel in Lösung gemittelt wurde.

Eine solche Methode ist die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS). Wie in Abschnitt 3.2 näher beschrieben, wird die Intensitätsfluktuation der Emission detektiert, die durch die Diffusion der fluoreszierenden Partikel in Lösung in und aus dem Beobachtungsvolumen verursacht wird. Nach Auswertung kann aus diesen Messdaten der gemittelte Diffusionskoeffizient der fluoreszierenden Partikel in Lösung bestimmt werden. Im Falle der hydrophob-beladenen Vesikel mit fluoreszierendem Farbstoff bzw. fluoreszierenden Quantum Dots mittelt diese Methode über die beladenen Vesikel sowie über möglicherweise anderweitig in Lösung vorliegende, fluoreszierende Aggregate. Alle nicht-fluoreszierenden Anteile sind in diesen Messungen 'unsichtbar'.

Kombiniert man diese FCS-Ergebnisse mit den aus dynamischer Lichtstreuung (DLS) erhaltenen gemittelten Diffusionskoeffizienten erhält man einen Eindruck, inwieweit diese fluoreszierenden Anteile der Gesamtheit der Probe entsprechen. In Abbildung 4.36 sind für beide Messmethoden die jeweils detektierten Signale schematisch dargestellt.

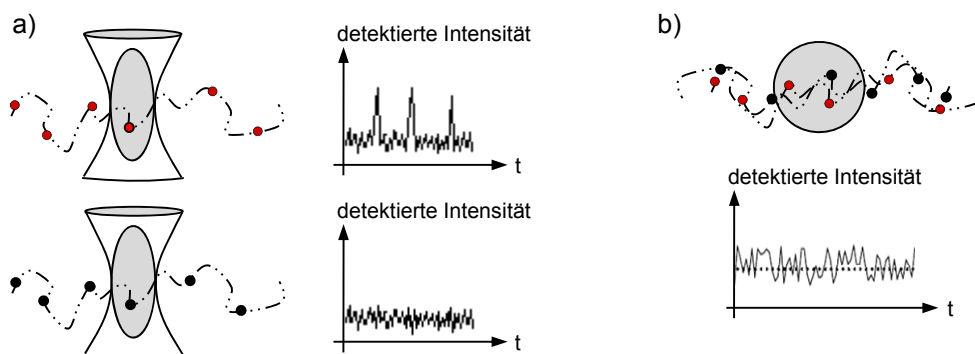


Abb. 4.36: Schematische Darstellung der erhaltenen Ergebnisse aus a) FCS und b) DLS (nicht-fluoreszierende Anteile der Lösung in schwarz, fluoreszierende in rot)

Die Auswertung der FCS-Messungen erfordert die Kalibrierung mit einem geeigneten Standard (vgl. Abs. 3.2). Das zu diesem Zweck in der Regel verwendete Rhodamin 6G (Rh6G) ist für die beladenen Vesikellösungen ungeeignet. Die durch die Einlagerung in die

Vesikelschale hohe, lokale Konzentration der fluoreszierenden Substrate führt zu einer deutlich erhöhten Helligkeit B der Vesikel im Vergleich zu einzelnen Rhodamin-Molekülen. Zusätzlich sind die Vesikel um Größenordnungen größer als die Farbstoffmoleküle und liefern einen signifikanten Streuuntergrund. Rh6G wurde daher nur zur Kontrolle des Beobachtungsvolumens und dessen Verhältnis $S=z_0/r_0$ der axialen zur radialen Ausdehnung genutzt ($S \approx 6$ für alle Messungen). Geeignete Standards zur Kalibrierung sind monodisperse, fluoreszenzmarkierte Polystyrol-Kugeln, die in verschiedenen Größen als wässrige Lösungen kommerziell erhältlich sind. Durch die hohe Farbstoffmarkierung weisen diese Fluospheres (FISp) eine vergleichbare Helligkeit wie beladene Vesikel auf.

Die exakte Größe der verwendeten Fluospheres wurde zunächst durch DLS-Messungen erhalten. Abbildung 4.37a zeigt den Verlauf der Korrelationsfunktion $g_I(t)$ sowie den biexponentiellen Fit für die Messung bei 90° . Der steile Abfall im lin/log-Plot ist ein Indikator für eine eng verteilte Probe (log/lin-Auftragung siehe Anhang Abb. 7.10). Winkelabhängige Messungen und Extrapolation für $q \rightarrow 0$ ergaben einen gemittelten hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle$ von 54nm bei enger Verteilung mit $\mu_2 < 0.05$.

In Abbildung 4.37b sind die FCS-Daten dieser Fluospheres gezeigt. Die normierte Korrelationsfunktion $(G(\tau)-1)/(G(0)-1)$ folgt, wie nach der Theorie erwartet (vgl. Abs. 3.2), einem polyhyperbolischen Verlauf und kann nach Gleichung 3.29 gefittet werden:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} \quad (3.29)$$

Als Ergebnis erhält man die Diffusionszeit τ_D der Fluospheres mit $\langle R_h \rangle = 54\text{nm}$, die im Weiteren zur Kalibrierung dient (bei Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 543\text{nm}$ (Messreihe I) $\tau_D = 2368\mu\text{s}$, bzw. in Messreihe II mit $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$ $\tau_D = 2021\mu\text{s}$).

Eine TEM-Aufnahme der Fluospheres ist im Anhang in Abbildung 7.11 zu sehen.

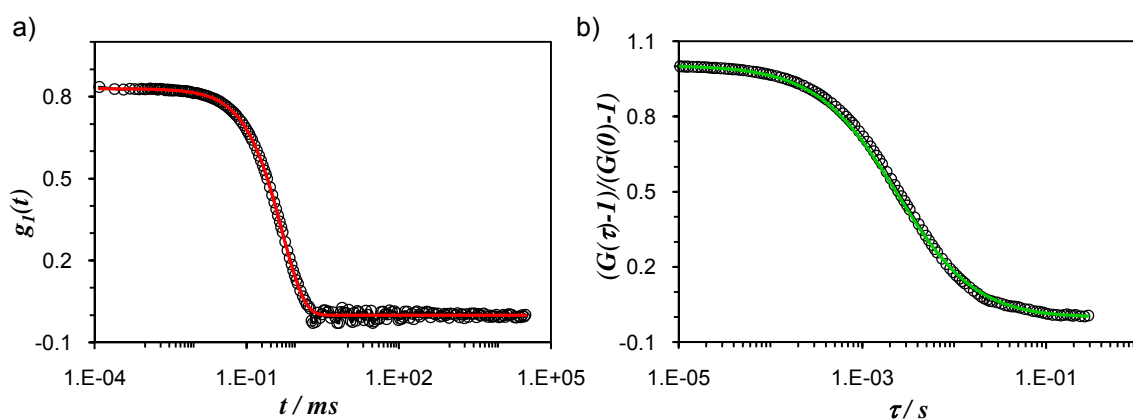


Abb. 4.37: Fluospheres a) DLS-Korrelationsfunktion $g_I(t)$ mit biexponentiellem Fit, $\theta=90^\circ$; b) normierte FCS-Korrelationsfunktion $(G(\tau)-1)/(G(0)-1)$ mit Fit nach Gl. 3.29

Es sei angemerkt, dass sämtliche Lichtstreu-Messungen bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt wurden, die FCS-Messungen aber bei 22°C (Raumtemperatur) erfolgten. Außerdem sind die durch FCS-Messungen erhaltenen hydrodynamischen Radien keine inversen z-Mittel wie im DLS-Ergebnis der Fall (vgl. Abs. 3.1, 3.2).

4.4.1. Farbstoff-beladene Vesikel

In der ersten FCS-Messreihe wurden die Proben bei $\lambda_{\text{ex}}=543\text{nm}$ angeregt und die Emission bei $\lambda_{\text{em}}>560\text{nm}$ (Langpass-Filter, LP 560nm) detektiert. In Abbildung 4.38 ist die FCS-Korrelationsfunktion einer NR-beladenen Vesikellösung via Co-Lösemittel gezeigt (PVN13). Auch für diese Probe folgt die Kurve einem polyhyperbolischen Verlauf und kann gut mit Gleichung 3.29 gefittet werden (grün). Die Fitfunktion liefert als Ergebnis die Diffusionszeit $\tau_D=1626\mu\text{s}$. Gemeinsam mit dem Ergebnis der Fluospheres mit bekannter Größe kann durch ein Iterationsverfahren aus Gleichung 3.30 und 3.19 der gemittelte, hydrodynamische Radius der NR-beladenen Vesikel zu $\langle R_h \rangle_{\text{FCS}}=39\text{nm}$ berechnet werden:

$$D = \left(r_0^2 + R_h^2 \right) / 4\tau_D \quad R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D} \quad (3.30, 3.19)$$

Die DLS-Messungen ergaben für die gleiche Lösung eine mittlere Größe von $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=43\text{nm}$. Demnach stimmt das Ergebnis der FCS, die nur die fluoreszierenden Lösungsanteile detektiert, gut mit dem DLS-Ergebnis überein, das über die gesamten Partikel in Lösung mittelt. Die erfolgreiche hydrophobe Beladung mit Nilrot ist somit nachgewiesen.

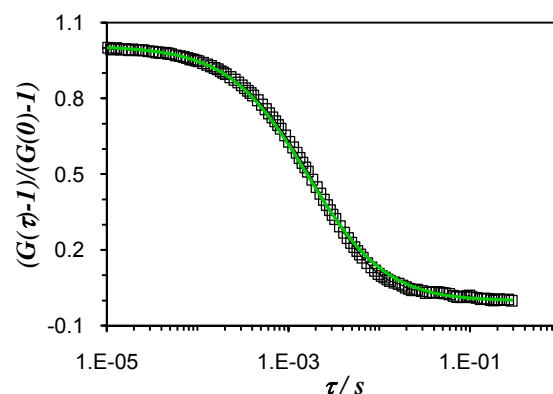


Abb. 4.38: NR-beladene Vesikellösung durch Co-Lösemittelmethode (PVN13), normierte FCS-Korrelationsfunktion $(G(\tau)-I)/(G(0)-I)$ mit Fit nach Gl. 3.29

In einer zweiten FCS-Messreihe bei einer Anregung von $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$ ($\lambda_{\text{em}}>505\text{nm}$) wurde eine weitere NR-beladene Vesikellösung PVN20 untersucht. Auch diese wurde unter Verwendung der Co-Lösemittelmethode präpariert, die angebotene Farbstoffmenge war jedoch mit $C_{\text{NR}}(\text{angeboten})=1\text{mg/l}$ deutlich geringer (statt 60mg/l für Probe PVN13, vgl. Tab. 4.6). Wegen der kleineren Anregungswellenlänge und einer geringeren Emissionsintensität musste auf den sonst verwendeten Abschwächer verzichtet werden um ein ausreichendes Messsignal zu erhalten. Da die Fluospheres wegen ihrer Helligkeit unter diesen Umständen nicht messbar sind, musste auf eine Kalibrierung mit Rhodamin 6G zurückgegriffen werden. Aus dem Fit-Ergebnis von $\tau_D=1277\mu\text{s}$ kann für die NR-beladenen Vesikel PVN20 so relativ zu Rh6G eine mittlere Größe von $\langle R_h \rangle_{\text{FCS,Rh6G}}=40\text{nm}$ berechnet werden. Verglichen mit dem DLS-Ergebnis dieser Probe von $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=27\text{nm}$ entspricht dies einer deutlichen Abweichung.

Diese Abweichung könnte auf eine vermehrte Farbstoffbeladung größerer Vesikel in Lösung hindeuten. Das Auftreten unbeladener, kleiner Vesikel neben beladener, großer Vesikel ist

jedoch unwahrscheinlich, so zeigten die Vesikel in den dynamischen Lichtstreu-Messungen keine bimodale Verteilung sondern mit $\mu_2=0.06$ eine enge Verteilung um $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=27\text{nm}$. Hauptgrund ist vermutlich die ungeeignete Kalibrierung mit Rh6G. Berechnet man für die NR-beladene Vesikellösung PVN13 aus Messreihe I die Größe relativ zur Rh6G-Kalibrierung, erhält man mit $\langle R_h \rangle_{\text{FCS,Rh6G}}=54\text{nm}$ ebenfalls einen deutlich größeren Wert als mit der Fluospheres-Kalibrierung ($\langle R_h \rangle_{\text{FCS,FISp}}=39\text{nm}$). Geht man von einem Einfluss gleicher Größenordnung für die Probe PVN20 aus und kalibriert trotz leicht geänderter Messbedingungen auf die Fluospheres, würde man einen Wert für $\langle R_h \rangle_{\text{FCS,theor.FISp}}$ von etwa 32nm erhalten. Dieser Wert würde wiederum besser mit dem DLS-Ergebnis $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=27\text{nm}$ übereinstimmen. Dieser Umstand verdeutlicht, wie wichtig die Wahl einer geeigneten Kalibrierung für diese Messmethode ist.

In der zweiten FCS-Messreihe bei einer Anregung von $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$ ($\lambda_{\text{em}}>505\text{nm}$) wurde außerdem eine Perylen-beladene Vesikellösung PVB1 mit $C_p=20\text{mg/l}$ untersucht. In Abbildung 4.39 ist die FCS-Korrelationsfunktion dieser ebenfalls via Co-Lösemittel präparierten Lösung gezeigt. Auch für diese Probe folgt die Kurve einem polyhyperbolischen Verlauf und kann gut mit Gleichung 3.29 gefittet werden (grün). Aus dem Fit-Ergebnis von $\tau_D=2515\mu\text{s}$ kann für die P-beladenen Vesikel PVB1 so relativ zu den Fluospheres eine mittlere Größe von $\langle R_h \rangle_{\text{FCS}}=65\text{nm}$ berechnet werden. Verglichen mit dem DLS-Ergebnis dieser Probe von $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=36\text{nm}$ entspricht dies jedoch einer deutlichen Abweichung, die nicht auf ungeeignete Kalibrierung zurückgeführt werden kann.

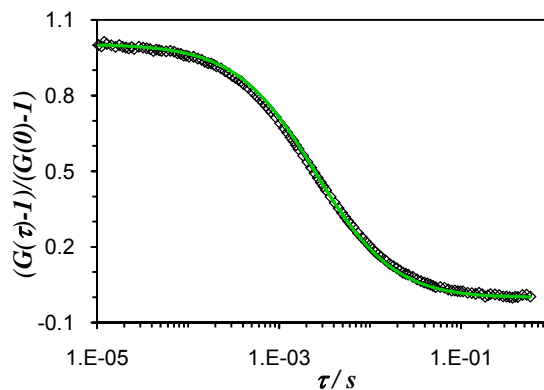


Abb. 4.39: Perylen-beladene Vesikellösung durch Co-Lösemittelmethode (PVB1), normierte FCS-Korrelationsfunktion $(G(\tau)-I)/(G(0)-I)$ mit Fit nach Gl. 3.29

Bei Probe PVB1 handelt es sich um die Lösung mit einem sehr hohen Perylen-Anteil von $C_p=20\text{mg/l}$, für die bereits in den Emissionsspektren (vgl. Abb. 4.17a) eine deutliche Bande aggregierter Moleküle auffiel. Nach den Ergebnissen der FCS zu urteilen, könnte es sich dabei nicht nur, wie zunächst vermutet, um Aggregation innerhalb der Vesikelschale handeln. Möglicherweise liegen neben den Vesikeln separate, größere Farbstoffaggregate vor. Dies würde den größeren, mittleren Radius aus FCS-Messungen erklären. Prinzipiell ist jedoch nicht zu verstehen warum diese größeren Strukturen in den DLS-Messungen nicht zu erkennen sind. Mit einem μ_2 von 0.08 ist diese Probe relativ eng verteilt um $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=36\text{nm}$. Strukturen, die selektiv gemittelt zu $\langle R_h \rangle_{\text{FCS}}=65\text{nm}$ führen, könnten also nur in sehr geringer

Anzahl vertreten sein und sämtliche kleineren Vesikel dürften keine fluoreszierenden Farbstoffmoleküle eingelagert haben.

Da bereits für die NR-beladene Lösung PVN20 große Abweichungen zwischen DLS und FCS auftraten, kann auch ein methodischer Fehler innerhalb der zweiten FCS-Messreihe nicht ausgeschlossen werden. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die erfolgreiche Perylen-Beladung aus den bisherigen Daten nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden kann.

Die Ergebnisse der FCS- und DLS-Messungen sind in Tabelle 4.8 zusammengestellt. Eine ausführliche Übersicht der Ergebnisse ist im Anhang in den Tabellen 7.2 bis 7.4 auf Seite 109 gegeben.

Tab. 4.8: Übersicht der FCS- und DLS-Ergebnisse der beladenen Vesikellösungen

Probe	$\langle R_h \rangle_{\text{FCS}} / \text{nm}$	$\langle R_h \rangle_{\text{DLS}} / \text{nm}$	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$
Fluospheres	---	54	<0.05
NR/Vesikel (PVN13) ⁽¹⁾	39	43	0.08
NR/Vesikel (PVN20) ^(2,*)	40 ^(**)	27	0.06
P/Vesikel (PVB1) ⁽²⁾	65	36	0.08
QD2/Vesikel (PVD6) ⁽¹⁾	62	67	0.18
QD2/Vesikel (PVD22) ⁽¹⁾	100	99	0.12

¹ Messreihe I, Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}}=543\text{nm}$, LP-Filter 560nm, gemessen mit Abschwächer

² Messreihe II, Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, LP-Filter 505nm, gemessen mit Abschwächer
* gemessen ohne Abschwächer; ** Ergebnis relativ zur Rh6G-Kalibrierung;

4.4.2. Quantum Dot-beladene Vesikel

In der ersten FCS-Messreihe bei einer Anregung von $\lambda_{\text{ex}}=560\text{nm}$ wurden zusätzlich zwei durch Filmrehydrierung präparierte QD2-beladene Lösungen untersucht. In Abbildung 4.40b ist die FCS-Korrelationsfunktion einer solchen QD2-beladenen Vesikellösung PVD6 gezeigt. Auch für diese Probe folgt die Kurve einem polyhyperbolischen Verlauf und kann gut mit Gleichung 3.29 gefittet werden (grün). Aus dem Fit-Ergebnis von $\tau_D=2750\mu\text{s}$ kann für die QD2-beladenen Vesikel PVD6 so relativ zu den Fluospheres eine mittlere Größe von $\langle R_h \rangle_{\text{FCS}}=62\text{nm}$ berechnet werden. Die DLS-Messungen ergaben für die gleiche Lösung eine mittlere Größe von $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=67\text{nm}$.

Eine zweite QD2-beladene Vesikellösung PVD22 mit $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=99\text{nm}$ wurde ebenfalls untersucht. Die Fitfunktion liefert als FCS-Ergebnis die Diffusionszeit $\tau_D=4051\mu\text{s}$, die relativ zur Fluosphere-Kalibrierung einem mittleren hydrodynamischen Radius von $\langle R_h \rangle_{\text{FCS}}=100\text{nm}$ entspricht. Auch diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 und im Anhang in den Tabellen 7.2 bis 7.4 auf Seite 109 zusammengestellt.

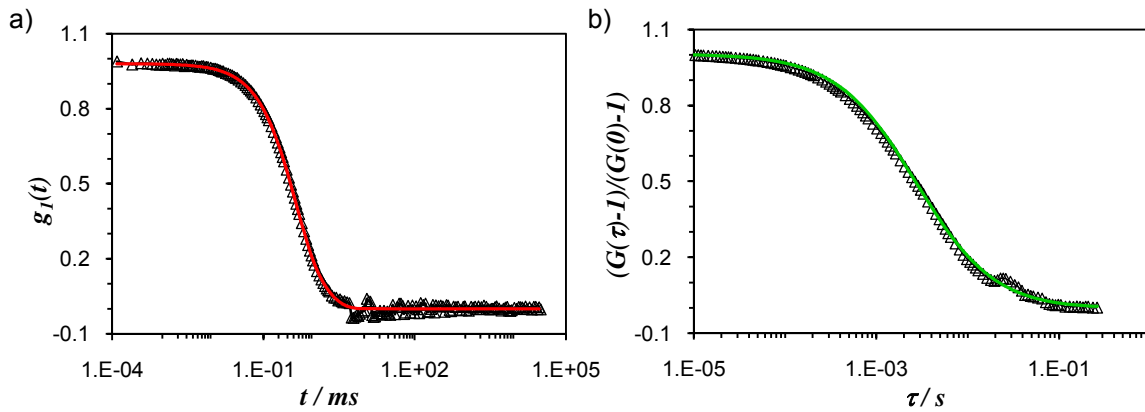


Abb. 4.40: QD2-beladene Vesikellösung durch Filmrehydrierung (PVD6):
 a) DLS-Korrelationsfunktion $g_I(t)$ mit biexponentiellem Fit bei $\theta=90^\circ$;
 b) normierte FCS-Korrelationsfunktion $(G(\tau)-I)/(G(0)-I)$ mit Fit nach Gl. 3.29

Demnach stimmen die Ergebnisse der FCS, die nur die fluoreszierenden Lösungsanteile detektiert, gut mit den Ergebnissen der DLS überein, bei der über die gesamten Partikel in Lösung gemittelt wird. Zusammen mit den Ergebnissen aus spektroskopischen und mikroskopischen Methoden (vgl. Abs. 4.3.2) ist die erfolgreiche hydrophobe Beladung der Vesikelschale mit QD-Nanopartikeln mit $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$ somit eindeutig nachgewiesen.

4.5. Hydrophile Beladung mit Farbstoffen

Die Einlagerung hydrophiler Substrate in den hydrophilen, wassergefüllten Kern der Vesikel wurde anhand des Indikator-Farbstoffs Phloxin B (PhB) als hydrophiles Modell-Substrat, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, erfolgreich durchgeführt.

Zunächst wurde die Fluoreszenz des Phloxin B in Abhängigkeit des pH-Werts der Lösung untersucht. Ausgehend von einer PhB-Lösung in Wasser ($C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$) mit $\text{pH}=6.5$ wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure (HCl, 0.1M) schrittweise auf $\text{pH}=2.0/1.7/1.5$ abgesenkt. In Abbildung 4.41 sind die zugehörigen Emissionsspektren zu sehen.

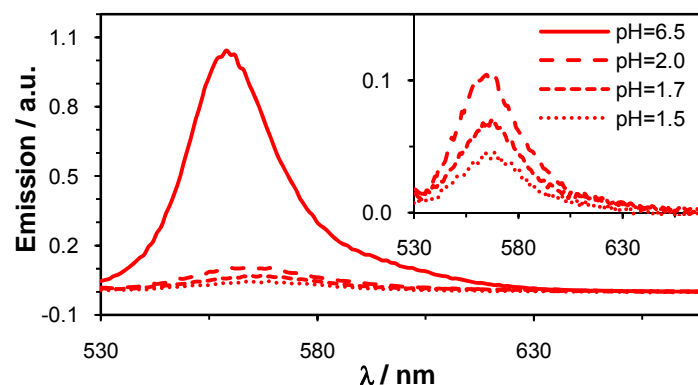


Abb. 4.41: Emissionsspektren einer PhB-Lösung ($C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$) bei $\text{pH}=6.5/2.0/1.7/1.5$

Die Fluoreszenz wird durch die Säurezugabe deutlich gequencht. Am Maximum bei $\lambda=560\text{nm}$ sind bei $\text{pH}=1.5$ nur noch 3.7% der ursprünglichen Emissionsintensität vorhanden. Diese Intensitätsverluste sind nicht auf den Verdünnungseffekt durch die Säurezugabe zurückzuführen. Da bei der PhB-Konzentration von $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$ noch Reabsorption auftritt, führt eine Verdünnung mit Wasser sogar zu einer Verstärkung der Emission wie in Abbildung 4.42 für eine Lösung mit $C_{\text{PhB}}=0.05\text{g/l}$ gezeigt.

Demnach sollte ein pH-Gradient über die Vesikelmembran von $\text{pH}=6.5$ innen auf $\text{pH}<2$ außen ausreichen um die Fluoreszenz freier Farbstoffmoleküle ausreichend zu quenchen und somit die hydrophile Beladung des Vesikelkerns, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, untersuchen zu können.

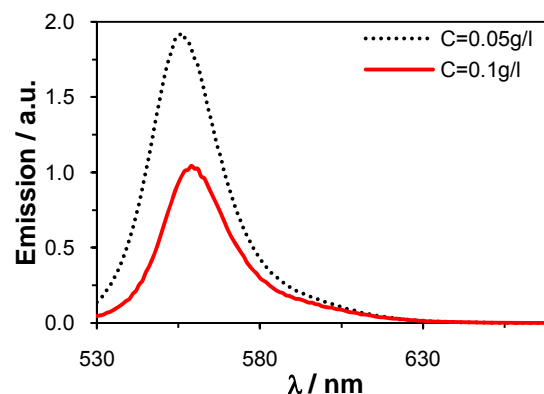


Abb. 4.42: Emissionsspektren einer PhB-Lösung mit $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$ (rot) im Vergleich zur verdünnten Lösung mit $C_{\text{PhB}}=0.05\text{g/l}$ (schwarz), jeweils bei $\text{pH}=6.5$

4.5.1. Präparation durch Co-Lösemittel

Die Präparation hydrophil beladener Vesikel unter Verwendung des Co-Lösemittels THF erfolgte analog der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Standardprozedur. Der Polymer/THF-Lösung wird eine wässrige PhB-Lösung mit $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$ bei $\text{pH}=6.5$ mit einer Tropfgeschwindigkeit von 9.9ml/h zugetropft. Nach Abdampfen des THF erhält man so Vesikellösungen, die im Vesikelkern und in der Umgebungslösung fluoreszierendes Phloxin B enthalten ($C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$, $C_{1\text{B}}=1\text{g/l}$). Durch Säurezugabe kann nun der pH-Wert der Umgebungslösung auf einen $\text{pH}<2$ abgesenkt werden, was gleichzeitig das Quenchen der Fluoreszenz aller frei gelösten Farbstoffmoleküle zur Folge hat. In Abbildung 4.43 sind die Emissionsspektren der PhB-beladenen Lösung PVPh1 vor und nach Säurezugabe gezeigt.

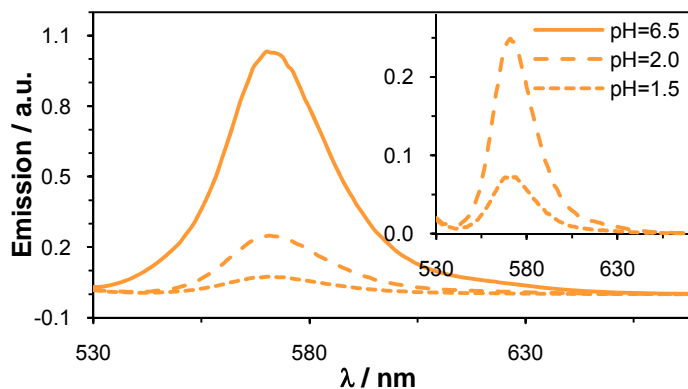


Abb. 4.43: Emissionsspektren einer PhB-beladenen Vesikellösung bei $\text{pH}=6.5/2.0/1.5$

Die nach Säurezugabe bei $\text{pH}=1.5$ verbleibende Emissionsintensität beträgt 7.2% der ursprünglichen Intensität bei $\text{pH}=6.5$. Diese verbleibende Intensität ist signifikant höher als im Falle der wässrigen PhB-Lösung mit gleicher Farbstoff-Konzentration, wie der direkte Vergleich in Abbildung 4.44 zeigt (alle Spektren normiert auf PVPh1 bei $\text{pH}=6.5$).

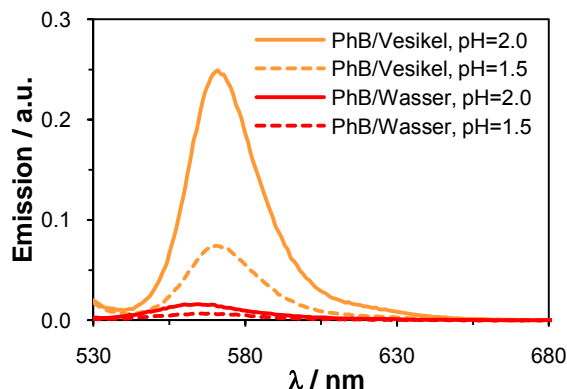


Abb. 4.44: Emissionsspektren einer PhB-beladenen Vesikellösung (PVPh1, $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$) bei $\text{pH}=2.0/1.5$ (orange) im Vergleich mit der wässrigen PhB-Lösung ($C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$) bei $\text{pH}=2.0/1.5$ (rot); normiert auf PVPh1 bei $\text{pH}=6.5$

Demnach liegen nicht-gequenchte Farbstoffmoleküle in der Vesikellösung vor, die keinen Kontakt zur Säure haben. Der geringe Wert der verbleibenden Emissionsintensität ist dabei

nicht verwunderlich, steht doch das vor Säure geschützte Volumen der Vesikelkerne in Relation zum Umgebungsvolumen in einem Verhältnis von etwa 1:1500.

Um sicher zu stellen, dass die verbleibende Intensität allein auf die Einlagerung in die hydrophilen Kerne der Vesikel zurückzuführen ist, wurden analog Blindproben präpariert, in denen kein Polymer verwendet wurde (Blind1), bzw. das Copolymer durch ein reines, engverteiltes PEO-Polymer mit $M_w=3500\text{g/mol}$ ersetzt wurde (Blind2). In Abbildung 4.45 sind die Emissionsspektren dieser Blindproben vor und nach Säurezugabe gezeigt. Die verbleibende Intensität beträgt bereits bei $\text{pH}=1.7$ nur noch 3.3% (Blind1) bzw. weniger 1% (Blind2). Demnach ist das Verbleiben nicht-gequenchter Farbstoffmoleküle im Falle der PhB-beladenen Vesikel auf die Copolymer-Umgebung zurückzuführen.

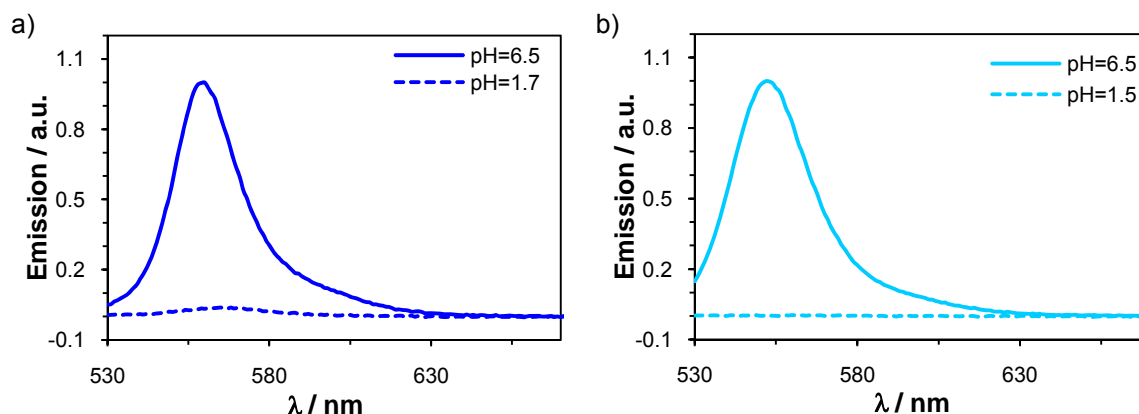


Abb. 4.45: Emissionsspektren bei $\text{pH}=6.5$ und $\text{pH}=1.7$ für Blindproben
a) ohne Polymer (Blind1) und b) mit PEO, $M_w=3500\text{g/mol}$ (Blind2)

In einer weiteren Blindprobe wurde zu einer fertigen Vesikellösung ($C_{1B}=1\text{g/l}$, $\langle R_h \rangle=33\text{nm}$) nachträglich Phloxin B zugesetzt, so dass ebenfalls $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$ galt (Blind3). Abbildung 4.46 zeigt die Emissionsspektren dieser Lösung vor und nach Säurezugabe. Die verbleibende Intensität beträgt bei $\text{pH}=1.5$ nur noch 3.5%.

Verglichen mit den verbleibenden 7.2% im Falle der während der Vesikelbildung mit PhB beladenen Vesikellösung, zeigt dieses Ergebnis, dass der Schutz vor Säurekontakt nicht allein durch die Copolymer-Anwesenheit, sondern vielmehr durch die Einlagerung des Farbstoffs innerhalb der Vesikelstruktur stattfindet.

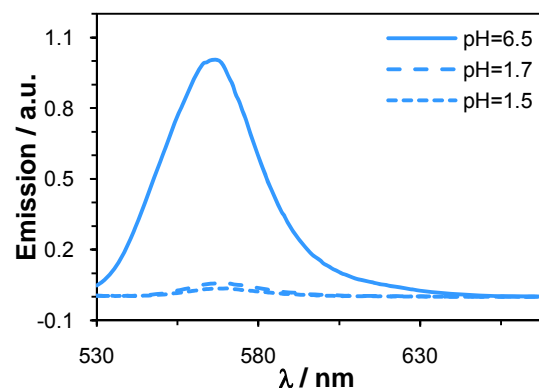


Abb. 4.46: Emissionsspektren bei $\text{pH}=6.5/1.7/1.5$ für eine nachträglich mit Phloxin B gefärbte Vesikellösung (Blind3, $C_{1B}=1\text{g/l}$, $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$)

Auch durch intensiven Ultraschall-Gebrauch war es nicht möglich in einer vierten Blindprobe Phloxin B in linearem Polybutadien ($M_n=1500-2000\text{g/mol}$) zu lösen. Demnach kann eine Einlagerung des hydrophilen Farbstoffs in die hydrophobe PB-Domäne der Vesikelschale ausgeschlossen werden.

Durch TEM-Aufnahmen nach Vernetzung der PhB-beladenen Lösungen konnte gezeigt werden, dass auch in Anwesenheit des hydrophilen Farbstoffs die Selbstorganisation zu Vesikeln stattfindet. In Abbildung 4.47 sind solche TEM-Aufnahmen gezeigt (s. auch Anhang Abb. 7.26). Auffällig ist jedoch die sehr breite Größenverteilung der Vesikel sowie das Auftreten großer Vesikel mit Durchmessern bis zu $d=200\text{nm}$. Dies unterscheidet die PhB-beladenen Lösungen deutlich von unbeladenen Vesikellösungen, die analog mit 9.9ml/h Tropfgeschwindigkeit präpariert wurden (vgl. Abs. 4.1.1). Möglicherweise beeinflusst die Beladung des Vesikelkerns über den osmotischen Druck die Größe der Vesikelstrukturen.

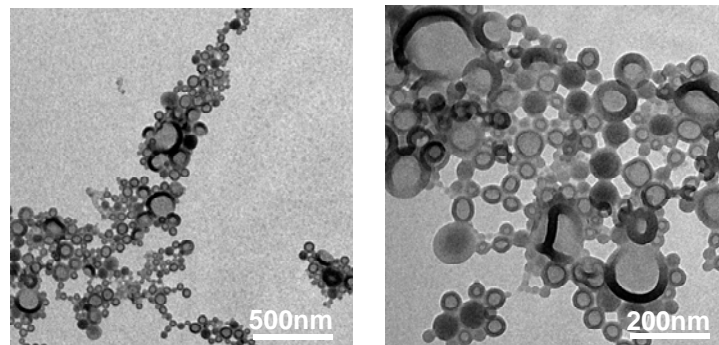


Abb. 4.47: TEM-Aufnahmen einer vernetzten PhB-beladenen Vesikellösung ($C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$)

Nachweis durch Ensemble-Messungen

Auch in DLS-Messungen waren diese Größenunterschiede durch die hydrophile Beladung während der Präparation zu sehen. Verglichen mit hydrodynamischen Radien von $\langle R_h \rangle = 34\text{nm}$ ($\mu_2=0.05$, vgl. Tab. 4.1) für unbeladene Vesikellösungen wurden für PhB-beladene Vesikellösungen Größen von $\langle R_h \rangle = 63\text{nm}$ (PVPh1, s. Abb. 4.48a) bzw. $\langle R_h \rangle = 77\text{nm}$ (PVPh2) bei breiterer Verteilung erhalten ($\mu_2=0.1$). Die zusätzliche Messung statischer Lichtstreuung (s. Anhang Abb. 7.12) ermöglichte die Bestimmung des ρ -Verhältnisses zu 0.97, welches die Vesikelstruktur bestätigte (vgl. Abs. 4.1.2). Die Lichtstreu-Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Die Einlagerung des hydrophilen Farbstoffs hat demnach keinen Einfluss auf die Morphologie der Selbstorganisation, wohl aber auf die Größe der Strukturen.

Um für die hydrophile Beladung ebenfalls den Nachweis über Ensemble-Methoden zu erbringen, wurden zusätzlich zu den DLS-Messungen auch FCS-Messungen durchgeführt. Letztere erfolgten bei $\text{pH}=1.5$, so dass nur die Emission der im Vesikelkern eingelagerten PhB-Moleküle detektiert wurde. In Abbildung 4.48b ist die Korrelationsfunktion einer PhB-beladenen Vesikellösung bei Anregung mit $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$ ($\lambda_{\text{em}}>505\text{nm}$) aufgetragen.

Tab. 4.9: Ergebnisse aus SLS und DLS für zwei PhB-beladene Vesikellösungen

Probe	$\langle R_g \rangle$ / nm	$\langle R_h \rangle$ / nm	$\mu_2 (\theta=90^\circ)$	$\rho = R_g/R_h$
PVPh1	61	63	0.1	0.97
PVPh2	---	77	0.1	---

dn/dc wurde über das Massenverhältnis der Blöcke gewichtet mit $dn/dc=0.185$ abgeschätzt;
 $\langle R_g \rangle$: Wurzel des z-Mittels des Trägheitsradienquadrats $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}$ aus statischer Lichtstreuung
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

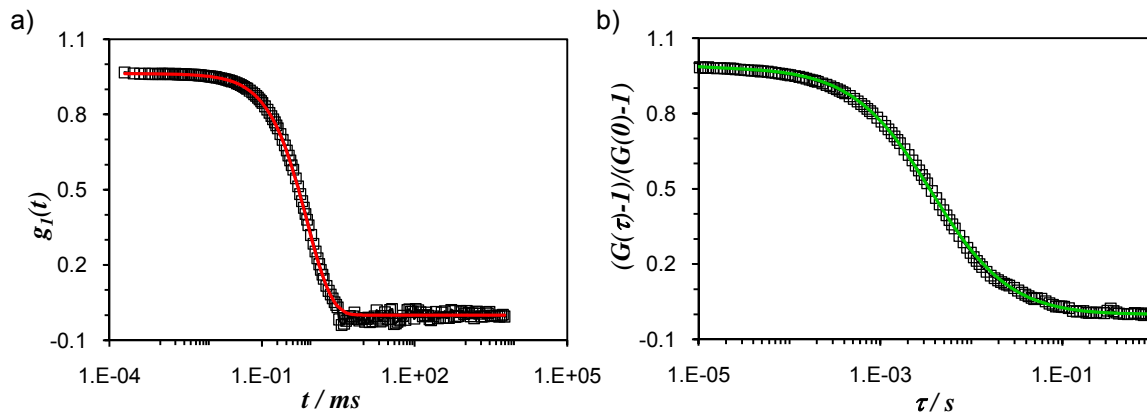


Abb. 4.48: PhB-beladene Vesikellösung (PVPh1) mit $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$ bei $\text{pH}=1.5$:
 a) DLS-Korrelationsfunktion $g_I(t)$ mit biexponentiellem Fit bei 90° ;
 b) normierte FCS-Korrelationsfunktion $(G(\tau)-1)/(G(0)-1)$ mit Fit nach Gl. 3.29

Auch für diese hydrophil-beladene Probe folgt die Kurve einem polyhyperbolischen Verlauf und kann gut mit Gleichung 3.29 gefittet werden (grün, vgl. Abs. 3.2). Aus dem Fit-Ergebnis von $\tau_D=3667\mu\text{s}$ kann für die PhB-beladenen Vesikel PVPh1 so relativ zu den Fluospheres eine mittlere Größe von $\langle R_h \rangle_{\text{FCS}}=87\text{nm}$ berechnet werden. Verglichen mit dem DLS-Ergebnis von $\langle R_h \rangle_{\text{DLS}}=63\text{nm}$ sind die fluoreszierenden Strukturen in Lösung demnach größer als erwartet.

Dies kann ein Effekt der sehr breiten Größenverteilung der Vesikel sein, die sowohl in den DLS-Messungen als auch in den TEM-Aufnahmen auffiel. Das Ergebnis der DLS als auch der FCS wird bei solch breiten Größenverteilungen maßgeblich von der intrinsischen Art der Mittelwertbildung beeinflusst und muss dadurch unterschiedliche Mittelwerte aufweisen (vgl. Abs. 3.1, 3.2).

Jedoch ist auch denkbar, dass die großen Vesikel deutlich mehr PhB-Moleküle tragen und somit stärker emittieren als kleinere, beladene Vesikel. Dadurch könnte sich das Ergebnis der FCS-Messungen zusätzlich zu größeren Radien verschieben.

Als Ergebnis bleibt in jedem Fall festzuhalten, dass die nach Säurezugabe verbleibende Emissionsintensität von PhB-Molekülen rührt, welche eingelagert in großen Strukturen diffundieren. In TEM-Aufnahmen konnten in diesem Größenbereich Vesikel abgebildet werden.

Langzeitstabilität

Durch zeitabhängige Fluoreszenzmessungen von PhB-beladenen Vesikellösungen kann die Stabilität der Vesikelmembran gegen die Diffusion von Protonen untersucht werden. Durch Säurezugabe wurde ein Teil einer PhB-beladenen Vesikellösung auf pH=1.5 eingestellt und über einen Zeitraum von 24h wurden mehrfach kleine Proben vermessen. Als Referenz für pH=6.5 diente ein zweiter Teil der Vesikellösung, der mit der gleichen Menge Wasser verdünnt wurde. In Abbildung 4.49 sind die zugehörigen Spektren zu sehen.

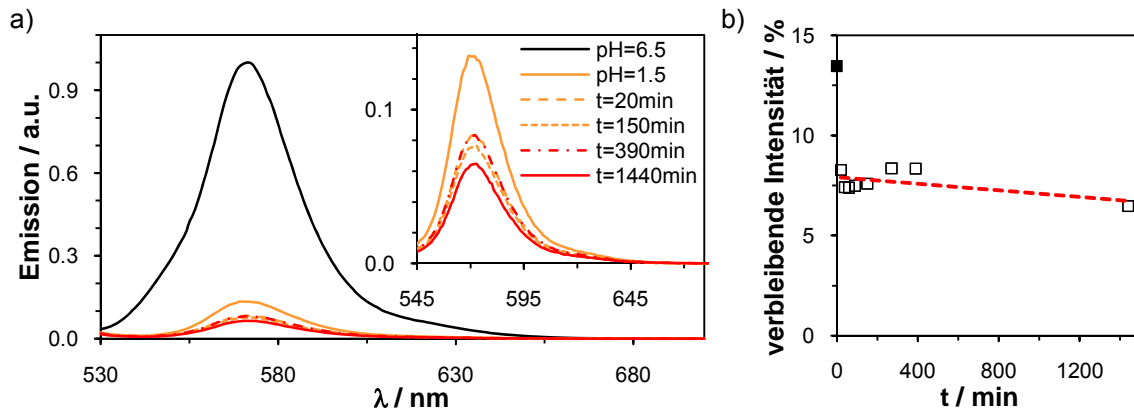


Abb. 4.49: a) Zeitabhängige Emissionsspektren einer PhB-beladenen Vesikellösung bei pH=1.5 für t=0/20/150min (orange) und t=390/1440min (rot), normiert für die analog verdünnte Lösung mit pH=6.5 (schwarz);
 b) Verbleibende Intensität prozentual bei $\lambda=572\text{nm}$ gegen die Zeit t (schwarz: vermutlich nicht ausreichende Lösungsdurchmischung für t=20min)

Aus der Auftragung der Intensität in Relation zur Ausgangsintensität bei pH=6.5 gegen die Zeit in Abbildung 4.49b ist deutlich zu erkennen, dass die Protonendiffusion durch die Vesikelmembran ein sehr langsamer Prozess ist. Die hohe Intensität von 13.5% direkt nach Säurezugabe (t=0) ist vermutlich auf nicht ausreichende Lösungsdurchmischung zurückzuführen, so dass die Trendlinie erst ab t=20min eingezeichnet wurde. Auch nach 24 Stunden bei pH=1.5 sind noch 6.5% des ursprünglichen Signals erhalten. Die im Vesikelkern eingelagerten PhB-Moleküle sind demnach auch über einen längeren Zeitraum effektiv vor den Protonen geschützt.

Das Quenchen der freien PhB-Moleküle in der Umgebungslösung ist eine adäquate Lösung um die hydrophile Beladung nachzuweisen. Für mögliche Anwendungen ist es jedoch von Interesse die beladenen Vesikel von nicht-ingelagerten Molekülen abzutrennen. Da die PhB-beladenen Proben auch über einen längeren Zeitraum von t>24h ausreichend stabil sind, bietet sich die Trennmethode der Dialyse an. Die Probe wurde daher in eine Membran (Cellulose-Ester, CE) mit definierter Porengröße (MWCO 5000) gefüllt und in ein großes Volumen Wasser gehängt, das mehrfach erneuert wurde. Durch den Konzentrationsgradienten werden somit alle kleineren Bestandteile, die die Membran passieren können, aus der Probe entfernt. Leider führte diese Methode nicht zum Erfolg, da der Farbstoff Phloxin B offensichtlich eine große Affinität zur CE-Membran besitzt und anstatt die Poren zu passieren an der Membran adsorbierte.

4.5.2. Präparation durch Filmrehydrierung

Die Vesikelpräparation durch Rehydrierung eines Polymerfilms führt, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, zu sehr großen Strukturen bis in den Größenbereich mehrerer μm . Durch Verwendung einer wässrigen PhB-Lösung zur Filmrehydrierung können auf diese Weise PhB-beladene und somit fluoreszierende Riesen-Vesikel hergestellt werden.

Derart große Strukturen bieten die Möglichkeit durch Fluoreszenzmikroskopie farbige Aufnahmen der beladenen Vesikel in Lösung zu erhalten. Durch Verwendung eines Auflichtmikroskops und einem Wasser-Objektiv können die Vesikel direkt aus der verdünnten Lösung abgebildet werden (s. Abs. 3.4.3). In Abbildung 4.50 sind solche Aufnahmen für eine PhB-beladene Vesikellösung nach Verdünnung bei $\text{pH}=6.5$ und $\text{pH}=1.5$ gezeigt.

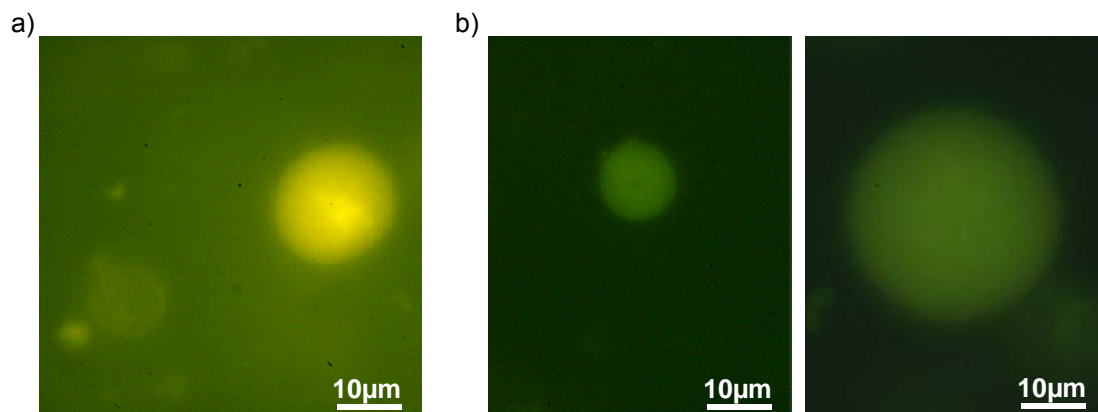


Abb. 4.50: a) Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen einer durch Filmrehydrierung präparierten PhB-beladenen Lösung (PVPh3) nach Verdünnung a) bei $\text{pH}=6.5$; b) bei $\text{pH}=1.5$

In allen Bildern heben sich die hydrophil beladenen Vesikel gut vom Hintergrund ab. Durch die Verdünnung um etwa 1:10 ist auch bei $\text{pH}=6.5$ ein ausreichender Kontrast zur fluoreszierenden Umgebungslösung gegeben. Nach Säurezugabe fluoresziert die Umgebung bei $\text{pH}=1.5$ nicht mehr, nur die beladenen Vesikel sind nun noch detektierbar. Wegen der insgesamt schwachen Intensität und der auslaufenden Ränder der Strukturen (vgl. Abs. 3.3) sind hohe Belichtungszeiten notwendig und nur sehr große Riesen-Vesikel sind eindeutig zu erkennen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Vesikelpräparation

Das verwendete amphiphile Copolymer PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH (1B, vgl. Abs. 2.1.3) wurde von Dr. Michael Maskos durch anionische Polymerisation synthetisiert (s. Abb. 2.8), charakterisiert zur Verfügung gestellt und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit destilliertem, entionisiertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Millipore präpariert. Tetrahydrofuran wurde von Merck, Acros oder Fluka in p.a. Qualität bezogen und durch Destillation vom enthaltenen Stabilisator befreit. Die verwendeten Filter stammen von Millipore.

Co-Lösemittel

Eine Stammlösung von 1B in THF mit einer Konzentration von 10mg/ml wurde hergestellt und filtriert (LG-F, 0.2µm). In einem 50ml Rundkolben mit Rührfisch wurden 1.6ml THF vorgelegt und 0.5ml dieser 1B-Stammlösung zugesetzt (entspricht 5mg Polymer in 2.1ml THF). Der Kolben wurde mit einem Septum verschlossen. Der Magnetrührer wurde gestartet und kontrolliert durch eine Spritzenpumpe (Bioblock Scientific) wurden der Polymer/THF-Lösung aus einer Plastikspritze ≈ 5ml Wasser zudosiert. Der THF-Endgehalt betrug demnach etwa 27Gew.-% (30Vol.-%). Die Tropfgeschwindigkeit wurde zwischen 1ml/h und 70ml/h eingestellt (Standard: 9.9ml/h, vgl. Abs. 4.1.1). Nach Beendeter Wasserzugabe standen die Proben offen bei 20°C Raumtemperatur bis das THF vollständig abgedampft war (Geruchs- und Gewichtskontrolle). Durch Wiegen wurde die Polymer-Endkonzentration bestimmt (Standard: C_{1B}=1g/l).

Filmrehydrierung

Ausgehend von einer 1B-Lösung in THF (oder Chloroform) mit einer Konzentration von 5mg/ml wurde aus 1ml Lösung ein dünner Film in einem Teflon-Gefäß präpariert. Der Film wurde nach Abdampfen des Lösemittels bei 50°C im Vakuum getrocknet. 5ml Wasser wurden zugefügt und das Gefäß gut verschlossen bei 50°C geschüttelt und im Ultraschallbad beschallt, bis der Großteil des Polymerfilms resolubilisiert war. Ungelöste Anteile wurden durch Filtration (LS-F, 5µm) entfernt.

Vesikelvernetzung

Zur Vernetzung wurden die Polymerlösungen in Glasgefäßen gut verschlossen zum Versand verpackt. Bei der Firma Isotron Deutschland GmbH (Firmensitz: Kesselbodenstr. 7, D-85391 Allershausen) wurden die Proben mit einer Durchschnitts-Dosis von 60kGy bestrahlt und anschließend zurückgeschickt.

5.2. Hydrophobe Beladung der Vesikelschale

Die hydrophoben Farbstoffe Oil Red EGN (ORE, CAS 447-79-6, Solvent Red 26, von Sigma-Aldrich), Oil Blue N (OBN, CAS 2646-15-3, Solvent Blue 14, 97% von Sigma-Aldrich) und Nilrot (NR, CAS 7385-67-3, 99% von Acros) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Der hydrophobe Farbstoff N,N'-bis(1-hexylheptyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylbisimid, ein Perylen-Derivat (abgekürzt als Perylen, P), wurde vom Arbeitskreis Prof. Basché zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Quantum Dots wurden von Michaela Wagner, Arbeitskreis Prof. Basché wie in [Mews 2005] beschrieben synthetisiert. Die CdSe-Kerne sind mit TOPO (Trioctylphosphinoxid) stabilisiert. Die Kern-Schale-QDs wurden nach der SILAR-Methode synthetisiert und tragen Ölsäure und Oleylamin als hydrophobe Oberflächenliganden. Alle QDs wurden in Lösung zur Verfügung gestellt. Die CdSe-Kerne (QD1) hatten, berechnet über ihren Absorptionspeak bei $\lambda=520\text{nm}$ in Toluol, eine Größe von $d=2.5\text{nm}$ und waren in THF gelöst. Die Kern-Schale-Nanopartikel QD2 waren aus einem Kern mit vier Schalen CdS und einer Außenschale ZnS aufgebaut und waren in Chloroform gelöst. Die größeren Kern-Schale-Nanopartikel QD3 waren aus einem CdSe-Kern mit neun Schalen CdS und einer Außenschale ZnS aufgebaut und in Hexan gelöst.

Das verwendete amphiphile Copolymer PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH (1B, vgl. Abs. 2.1.3) wurde ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit destilliertem, entionisiertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Millipore präpariert. Tetrahydrofuran wurde von Merck, Acros oder Fluka in p.a. Qualität bezogen und durch Destillation vom enthaltenen Stabilisator befreit. Die anderen Lösemittel wurden ebenfalls von Merck, Acros oder Fluka in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die verwendeten Filter stammen von Millipore.

Beladung durch Co-Lösemittel

Eine Stammlösung von 1B in THF mit einer Konzentration von 10mg/ml wurde hergestellt und filtriert (LG-F, 0.2 μm). Außerdem wurde eine Stammlösung des hydrophoben Farbstoffs in THF mit einer Konzentration deutlich unterhalb der Löslichkeitsgrenze hergestellt.

In einem 50ml Rundkolben mit Rührfisch wurden 1.5ml THF vorgelegt und 0.5ml der 1B-Stammlösung zugesetzt. Dieser Lösung wurde der jeweilige Farbstoffanteil in insgesamt 100 μl THF zugesetzt, so dass die Lösung 5mg Polymer plus Farbstoff in 2.1ml THF enthielt. Der Kolben wurde mit einem Septum verschlossen und der Magnetprüher gestartet. Kontrolliert durch eine Spritzenpumpe (Bioblock Scientific) wurden der Polymer/Farbstoff/THF-Lösung über eine Kanüle 5ml Wasser aus einer Plastikspritze zudosiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 9.9ml/h. Nach Beendeter Wasserzugabe standen die Proben offen bei 20°C Raumtemperatur im Dunklen bis das THF vollständig abgedampft war (Geruchs- und Gewichtskontrolle). Durch Wiegen wurde die Endkonzentration bestimmt (Standard: C_{1B}=1g/l). Eventuell überschüssiger Farbstoffanteil wurde durch Standard-Filtration (LCR-F, 0.45 μm) entfernt.

Beladung durch Filmrehydrierung

Ausgehend von einer 1B-Lösung in THF (oder Chloroform) mit einer Konzentration von 5mg/ml wurde zu 1ml Lösung (5mg 1B) die gewünschte Menge Farbstoff (Gewichtsverhältnis

Farbstoff/1B=1/20) bzw. Quantum Dots (Gewichtsverhältnis QD/1B=1/2.8, Molverhältnis 1/600) im jeweiligen Lösemittel zugefügt. Aus dieser Polymer/Substrat-Lösung wurde ein dünner Film in einem Teflon-Gefäß präpariert. Der Film wurde nach Abdampfen des Lösemittels bei 50°C im Vakuum getrocknet. 5ml Wasser wurden zugefügt und das Gefäß gut verschlossen bei 50°C geschüttelt und im Ultraschallbad beschallt, bis der Großteil des Films resolubilisiert war. Ungelöste Anteile wurden durch Filtration (LS-F, 5µm) entfernt.

Für DLS- und FCS-Messungen wurde zusätzlich durch 0.45µm-Filter filtriert um größere Strukturen zu entfernen und eine engere Größenverteilung zu erhalten.

Teilweise wurde während des Resolubilierungsprozesses zusätzlich THF (<30Vol.-%) verwendet, das anschließend wieder abgedampft wurde.

Beladung durch Phasentransfer

Für den flüssig/flüssig Phasentransfer wurden fertige Vesikellösungen vorsichtig mit einer Farbstoff/Toluol-Lösung (C=2g/l) überschichtet und gut verschlossen erschütterungsfrei über einen längeren Zeitraum im Dunkeln stehen gelassen.

Für den fest/flüssig Phasentransfer wurden die Farbstoffe feinpulvrig auf fertige Vesikellösungen aufgestreut und die Lösungen gut verschlossen erschütterungsfrei über einen längeren Zeitraum im Dunkeln stehen gelassen.

5.3. Hydrophile Beladung des Vesikelkerns

Der hydrophile Farbstoff Phloxin B (PhB, CAS 18472-87-2, von Sigma-Aldrich) wurde wie das verwendete amphiphile Copolymer PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH (1B, vgl. Abs. 2.1.3) ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit destilliertem, entionisiertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Millipore präpariert. Tetrahydrofuran wurde von Merck, Acros oder Fluka in p.a. Qualität bezogen und durch Destillation vom enthaltenen Stabilisator befreit. Die 0.1M Salzsäure stammte von Sigma-Aldrich.

Co-Lösemittel

Eine Stammlösung von 1B in THF mit einer Konzentration von 10mg/ml wurde hergestellt und filtriert (LG-F, 0.2µm). In einem 50ml Rundkolben mit Rührfisch wurden 1.6ml THF vorgelegt und 0.5ml dieser 1B-Stammlösung zugesetzt (entspricht 5mg Polymer in 2.1ml THF). Der Kolben wurde mit einem Septum verschlossen. Der Magnetrührer wurde gestartet und kontrolliert durch eine Spritzenpumpe (Bioblock Scientific) wurden der Polymer/THF-Lösung über eine Kanüle 5ml einer wässrigen PhB-Lösung mit C_{PhB}=0.1g/l aus einer Plastikspritze zudosiert. Die exakte Menge zudosiertes Phloxin B wurde durch Wiegen bestimmt. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 9.9ml/h. Nach Beendeter Wasserzugabe standen die Proben offen bei 20°C Raumtemperatur bis das THF vollständig abgedampft war (Geruchs- und Gewichtskontrolle). Durch Wiegen und nachträgliches Zudosieren von Wasser wurde die Endkonzentration auf C_{PhB}=0.1g/l eingestellt. Die Polymer-Endkonzentration betrug C_{1B}=1g/l. Die pH-Wert-Änderung erfolgte durch Zugabe einer 0.1M Salzsäure.

Filmrehydrierung

Ausgehend von einer 1B-Lösung in THF mit einer Konzentration von 5mg/ml wurde aus 1ml Lösung ein dünner Film in einem Teflon-Gefäß präpariert. Der Film wurde nach Abdampfen des Lösemittels bei 50°C im Vakuum getrocknet. 5ml einer wässrigen PhB-Lösung mit $C_{\text{PhB}}=0.1\text{g/l}$ wurden zugefügt und das Gefäß gut verschlossen und vor übermäßigem Licht geschützt bei 50°C geschüttelt und im Ultraschallbad beschallt, bis der Großteil des Polymerfilms resolubilisiert war. Ungelöste Anteile wurden durch Filtration (LS-F, 5 μm) entfernt.

5.4. Charakterisierung

Lichtstreuung

Die Lichtstreu-Messungen wurden an zwei verschiedenen Anlagen durchgeführt. Die eine Anlage besteht aus einem Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics, Beam Lok 2080, $\lambda=514.5\text{nm}$, $P=500\text{mW}$), einem Goniometer (ALV, SP-125-5/N-39) mit Single-Photon-Detektor (SO-SIPD), einem Thermostat (Haake, C25P) und einem Multiple-Tau Realtime Digital Korrelator (ALV-5000/EPP/60X0). Die zweite Anlage besteht aus einem Helium-Neon-Laser (JDS Uniphase, $\lambda=632.8\text{nm}$, $P=22\text{mW}$), einem Goniometer (ALV, SP-86#060) mit Avalanche-Photodiode und einem Digital Korrelator (ALV-3000).

Die dynamischen Messungen wurden in einem Winkelbereich von 30° bis 150° in 20°-Schritten durchgeführt. Das zur Auswertung verwendete, arbeitskreisinterne Fitprogramm basiert auf dem Simplex-Algorithmus (Simplexe Version 3.2, bzw. HDRC Version 5.1).

Zur Bestimmung des Kumulanten μ_2 wurde jeweils für die Daten der 90°-Messung ein Kumulantenfit $[a+b*\exp(-x/c+d*x^2)]$ verwendet. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D_{app} wurde ein biexponentieller Fit $[a+b*\exp(-x/c)+d*\exp(-x/e)]$ verwendet, und die winkelabhängigen Ergebnisse anschließend für $q \rightarrow 0$ extrapoliert.

Die statischen Messungen wurden in einem Winkelbereich von 30° bis 150° in 2.5°- bzw. 5°-Schritten durchgeführt und mit der Software ALV Statik Version 4.25 ausgewertet.

Die verdünnten Vesikellösungen wurden durch geeignete Filter (LCR/LH mit 0.45 μm bzw. LS mit 5 μm Poren) in staubfreie Küvetten filtriert.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die FCS-Messungen wurden mit einem kommerziellen FCS-Aufbau (Zeiss) bestehend aus dem Modul ConfoCor 2, einem invertierten Mikroskop Modul Axiovert 200 und einem 40x Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss, C-Apochromat 1.2W) durchgeführt. Die Fluorophore wurden mit einem Helium-Neon-Laser (bei $\lambda=543\text{nm}$ bzw. $\lambda=488\text{nm}$) angeregt. Detektion der Emission erfolgte mit einer Avalanche Photodiode hinter einem geeigneten Filter (Langpass-Filter 560nm bzw. 505nm).

Das konfokale Beobachtungsvolumen wurde mit Rhodamin 6G in Wasser kalibriert ($D_{25^\circ\text{C}}=2.8*10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$ [Magde 1974]). Das Verhältnis von axialer zu radialer Ausdehnung $S=z_0/r_0$ betrug in allen Messungen $S \approx 6$. Für die Messung der beladenen Vesikel wurde zusätzlich mit fluoreszierenden Polystyrol-Standards (Invitrogen, FluoSpheres: 'orange fluorescent

carboxylate-modified microspheres') kalibriert, da diese dem Vesikelsystem sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Helligkeit B besser entsprechen. Die exakte Größe der Referenz-Standards wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt ($D_{20^\circ\text{C}}=3.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$).

Die Lösungen wurden auf eine Konzentration von $\approx 1 \text{ nMol/l}$ verdünnt.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM-Messungen wurden an einem Tecnai 12 (FEI) bei einer Beschleunigungsspannung von 120kV durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einer CCD-Kamera.

Die Vitrifizierung der cryogenen TEM-Proben wurde mit Hilfe eines VitroBots (FEI) durchgeführt. Die Grids (Quantifoil 'Holey Carbon Films' R2/1) wurden zuvor im Plasma-Ofen für 30s im Argon-Strom gereinigt und direkt verwendet. Die Atmosphäre in der Präparationskammer war auf 20°C und 80-100% Luftfeuchtigkeit geregelt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 5µl. Das Schockgefrieren der Probe erfolgte in kondensiertem Propan.

Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie

Die Messungen der Absorption erfolgten an einem V-650 UV/VIS Spektrometer (Jasco) und die Messungen der Fluoreszenz an einem FP-6500 Spektrofluorometer (Jasco). Beide waren ausgestattet mit externer Temperaturkontrolle und die Messungen erfolgten in Präzisions-Küvetten der Firma Hellma aus optischem Spezialglas.

Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem 'Axio Imager A1'-Mikroskop (Zeiss) mit einem 100x Wasser-Objektiv (Zeiss) und 'Texas Red'- ($\lambda_{\text{ex}}=560\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=624\text{nm}$) bzw. 'Alexa'-Filterset ($\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=550\text{nm}$) mit passender dichroitischer Platte (Edmund Optics) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer digitalen Farbbild-Kamera (Canon) gemacht.

6. Kooperationsprojekte

6.1. Intermembran-Protein-Komplex LHCII

in Zusammenarbeit mit Prof. Paulsen, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz

Alle Zellen trennen sich von ihrer Umwelt durch eine Zellmembran, aufgebaut aus einer Lipid-Doppelschicht, ab. Damit die Zellen ihre Stoffwechselfunktionen im Organismus erfüllen können, verfügt die Natur über ein breites Spektrum an Intermembran-Proteinen, die eingelagert in die Zellmembran unter anderem Kanäle bilden. Diese Kanäle können dabei sehr spezifische Durchlässigkeit nur für bestimmte Substrate oder auch nur in eine Richtung aufweisen. Diese Kanalproteine wurden auch erfolgreich in künstliche Liposome eingelagert und behielten dabei ihre Funktionalität [Gregoriadis 1995].

Da polymere Vesikel sich durch erhöhte Membranstabilität und leichten Zugang zu Modifizierungen (z.B. der Oberfläche) auszeichnen (vgl. Abs. 2.1.2), besteht ein großes Interesse daran, Liposome durch Polymersome zu ersetzen. Wenn man Kanalproteine in polymere Vesikelmembranen einlagern könnte, wäre der Weg offen für sehr spezifische Containersysteme mit Anwendungen im Bereich der 'Mikro-Reaktoren' oder des 'Drug-Delivery' (vgl. Abs. 2.4).

Dabei wurden bereits erste Erfolge erzielt. Die verwendeten Polymersome amphiphiler Triblockcopolymeren zeichnen sich durch eine hydrophobe Membrandicke aus, die etwa dem Doppelten der Schichtdicke einer Zellmembran ($\approx 4\text{nm}$) entspricht. Die eingelagerten Kanalproteine stauchen die Polymermembran in diesem Fall auf eine ihnen entsprechende Dicke von etwa 4nm , so dass trichterförmige Vertiefungen an der Position der Proteine entstehen [Meier 2000/2006].

Die in dieser Arbeit verwendeten PB-PEO-Vesikel besitzen einen hydrophoben Membrankern von etwa 15nm (vgl. Abs. 4.1) und der Intermembran-Lichtsammelkomplex des Photosynthesystems II (LHCII) dient als Modell-System zur Untersuchung der möglichen Einlagerung eines Intermembran-Proteins in diese Vesikelmembran. Der LHCII bietet den Vorteil, dass er in wässriger Lösung auf die Membranstabilisierung angewiesen ist und seine Struktur sehr empfindlich auf Unterschiede der Umgebung reagiert. Da seine spektralen Eigenschaften leicht zu monitorieren sind, sind somit Ergebnisse über strukturelle Veränderungen durch Umgebungseinflüsse schnell und direkt aus der Lösung zugänglich.

Der Lichtsammelkomplex (LHC) II

Die für die Photosynthese notwendige Energie wird in den Reaktionszentren der Photosysteme (PS) I und II aus dem Sonnenlicht absorbiert. Die Reaktionszentren besitzen für diese Aufgabe sogenannte Lichtsammel-Antennensysteme. Der Lichtsammelkomplex des PSII, der LHCII (engl. Light Harvesting Complex II) hat in diesem Sinne eine herausragende Bedeutung in der Photosynthese.

Der LHCII ist ein Protein, das in der Pflanze vorwiegend als Trimer vorliegt und in Chloroplasten in die Thylakoidmembran eingelagert ist. Die Struktur konnte durch elektronen-

kristallographische Untersuchungen mit einer Auflösung von 2.5Å aufgeklärt werden [Kühlbrandt 2005]. Das gefaltete Protein durchspannt die Membran dreifach (s. Abb. 6.1) und gehört somit zur Gruppe der Intermembran-Proteine.

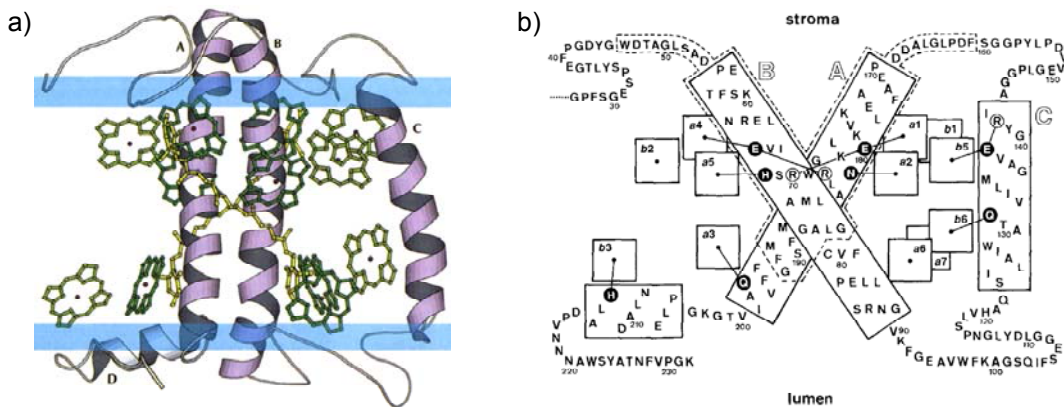


Abb. 6.1 [Kühlbrandt 1994]: Lichtsammelkomplex (LHC) II
 a) Modell des gefalteten Proteins in einer Thylakoidmembran ($d \approx 4\text{nm}$);
 b) Schematische Struktureinteilung des Proteins; A, B und C markieren die drei membrandurchspannenden Helices

Helix A (mit 4.3nm Länge) und Helix B (mit 5.1nm Länge) bilden das Zentrum des Proteins und winden sich in einer 'supercoiled'-Struktur linksgängig umeinander. Helix C besitzt eine fast senkrechte Orientierung zur Membran. Helix D hat einen amphiphilen Charakter und liegt der Membran an der inneren Seite auf. Desweiteren sind 14 Chlorophylle (8 Chl-a und 6 Chl-b Pigmente) und 4 Carotinoide an festgelegten Positionen in die Proteinstruktur eingelagert [Kühlbrandt 1994]. Die trimere Anordnung innerhalb der Thylakoidmembran ist in Abbildung 6.2 gezeigt.

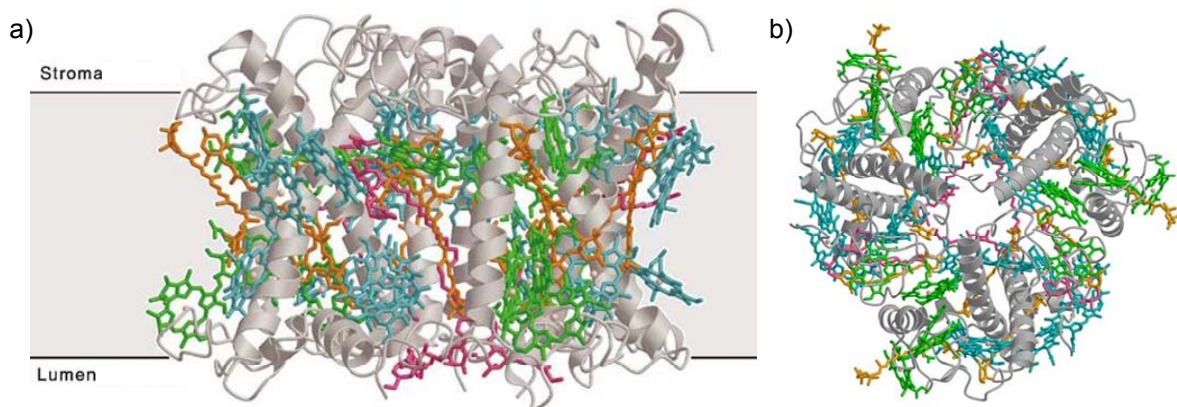


Abb. 6.2 [Kühlbrandt 2005]: Trimerer LHCII a) Modell des Trimers in einer Thylakoidmembran ($d \approx 4\text{nm}$); b) Aufsicht

Die gefaltete Struktur des LHCII ist in ihrer gesamten Dimension, und insbesondere auch in ihrer Einteilung in hydrophobe und hydrophile Bereiche, ideal passend für die etwa 4nm dicke Thylakoidmembran. Dabei reagiert die LHCII-Struktur sehr empfindlich auf die direkte Umgebung. Im intakten Komplex findet der Photosynthese-wichtige Energieübertrag von Chlorophyll b auf Chlorophyll a quantitativ statt, dies kann durch Fluoreszenzemissions-

spektren nachgewiesen werden. Die Strukturanalyse von CD-Spektren (Zirkulardichroismus) ermöglicht eine Aussage über die Stabilität und die direkte Umgebung des LHCII in Lösung als Folge der Positionierung der Chlorophyll-Pigmente zueinander.

Der LHCII kann in dieser Studie somit als Modellsystem dienen, um festzustellen, ob eine Stauchung der etwa 15nm dicken Polymermembran möglich ist, oder gar eine strukturelle Anpassung des Komplexes an die deutlich dickere Polymermembran stattfindet.

6.1.1. Ergebnisse und Diskussion

Die Insertion des LHCII in die Vesikel erfolgte durch Dr. Christoph Dockter (AK Prof. Paulsen, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) analog der Einlagerung in künstliche Liposome [Paulsen 2006], wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben. Dabei wird der LHCII zunächst durch TritonX100 (TX) Tensid-Mizellen in wässriger Pufferlösung stabilisiert. Nach Mischung mit den Vesikeln wird TritonX100 nach und nach durch die Behandlung mit BioBeads entfernt. Die Tensid-Moleküle adsorbieren an diese porösen Perlen aus Polystyrol-Polyvinylbenzol und der LHCII wird somit gezwungen eine Stabilisierung durch Einlagerung in die Vesikel zu suchen.

Die Insertion erfolgte im Verhältnis 1:15 zwischen LHCII und Blockcopolymer-Ketten, dies entspricht etwa 190 LHCII-Komplexen pro Vesikel mit Radius $\langle R_h \rangle = 35\text{nm}$. Zusätzlich wurden analog Blindproben präpariert in denen die Vesikellösung durch reine Pufferlösung (Blind1) bzw. die LHCII-Lösung durch ein Chl-a/Chl-b-Pigmentgemisch ersetzt wurden (Blind2). Desweiteren wurde für eine Ansatzreihe TritonX100 durch die gleiche Menge Laurylmaltosid ersetzt um den eventuellen Einfluss des Tensids zu untersuchen.

Die Ergebnisse nach der Entfernung des Tensids sind im Folgenden zusammengestellt.

Ergebnisse aus Emissionsspektren

Die direkte Nähe der Chlorophyll-a- und Chlorophyll-b-Pigmente im intakten LHCII verursacht einen quantitativen Energieübertrag von Chl-b auf Chl-a. Regt man ein Pigmentgemisch bei $\lambda = 470\text{nm}$ an, absorbiert nur Chl-b und dessen Emission bei $\lambda = 650\text{nm}$ ist detektierbar. Chl-a absorbiert in diesem Bereich nicht. Sind die Pigmente allerdings in direkter Nähe zueinander, z.B. bei hoher Konzentration, überträgt Chl-b seine Energie auf Chl-a und ausschließlich Chl-a emittiert bei $\lambda = 675\text{nm}$. Auf Grund dieses Energieübertrags lässt sich so eine Aussage über die räumliche Entfernung der Einzelpigmente machen. Da im intakten Komplex eine enge Positionierung der Pigmente vorliegt (vgl. Abb. 6.1), kann somit auch die Struktur des LHCII durch die Messung von Fluoreszenzspektren monitorisiert werden. Dabei ist die Emission im intakten LHCII im Vergleich zu einem hochkonzentrierten Chl-a/Chl-b-Pigmentgemisch zusätzlich zu höherer Wellenlänge verschoben.

Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über die Wellenlängen für Absorption und zugehörige Emission der Chlorophyll-Pigmente.

Tab. 6.1: Übersicht der Wellenlängen für Absorption und Emission der Chlorophyll-Pigmente

	Absorption λ_{ex} / nm	Emission λ_{em} / nm
Chlorophyll-a	430	675
Chlorophyll-b	470	650
Chl-a/Chl-b (nah)	470	675
intakter LHCII	470	680

Abbildung 6.3 zeigt die Emissionsspektren der verschiedenen Ansätze nach der Einlagerung. Es ist deutlich zu erkennen, dass die LHCII/Vesikel-Probe (1) eine starke Emission bei $\lambda=680\text{nm}$ zeigt, der LHCII-Komplex also durch die Vesikel stabilisiert und intakt ist und der Energieübertrag somit stattfinden kann. Die Vergleichsprobe ohne Copolymer Blind1 (2) zeigt auch eine Emissionsbande bei $\lambda=680\text{nm}$, diese ist aber sehr schwach ausgeprägt, was dafür spricht, dass der LHCII keine wirkliche Stabilisierung erfährt und nach und nach zerfällt. Die Vergleichsprobe Blind2 (3), in der ein Pigmentgemisch eingelagert wurde, hat eine Emissionsbande bei $\lambda=675\text{nm}$. Auch hier werden die Pigmente durch die Vesikel in der Lösung stabilisiert und durch die hohe lokale Konzentration findet der Energieübertrag von Chl-b auf Chl-a statt. Zusätzlich wurden Spektren der reinen Vesikellösung (4) und der reinen Pufferlösung (5) aufgetragen, sie zeigen wie erwartet keine Fluoreszenz.

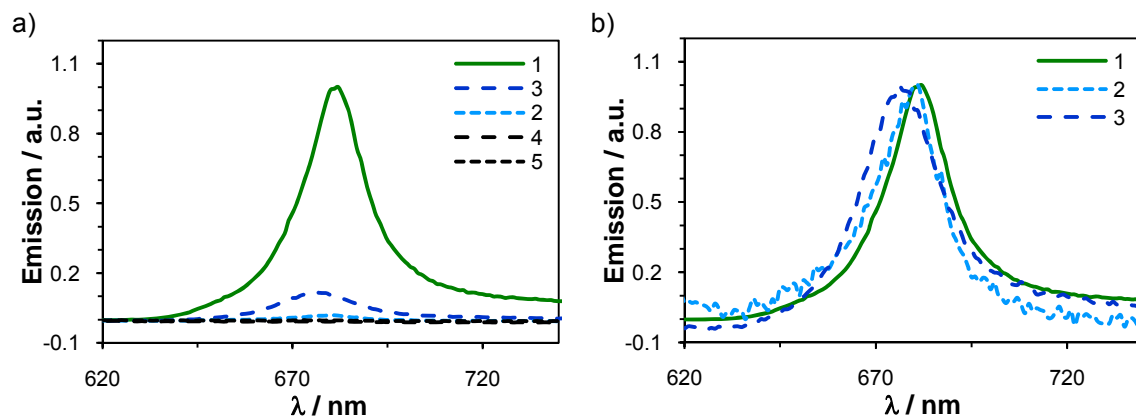


Abb. 6.3: Emissionsspektren nach Einlagerung bei Anregung $\lambda_{\text{ex}}=470\text{nm}$: LHCII/Vesikel (1), Blind1 ohne Copolymer (2), Blind2 mit Pigmentgemisch (3), Vesikellösung (4), Pufferlösung (5); a) norm. auf (1); b) norm. auf den Wert 1

Ergebnisse aus Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren sind in Abbildung 6.4 gezeigt. Die Spektren stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen in Bezug auf die Stabilisierung der eingelagerten Substrate durch die Vesikel. Hier ist auch deutlich zu sehen, dass der kleine Anteil LHCII, der in der Vergleichsprobe ohne Copolymer (Blind1, (2)) im Emissionsspektrum noch bei $\lambda=680\text{nm}$ emittiert, so gering ist, dass die Absorption bereits nicht mehr zu messen

ist. Die Aussagekraft der Absorptionsspektren im Vergleich zu den Emissionsspektren ist somit gering.

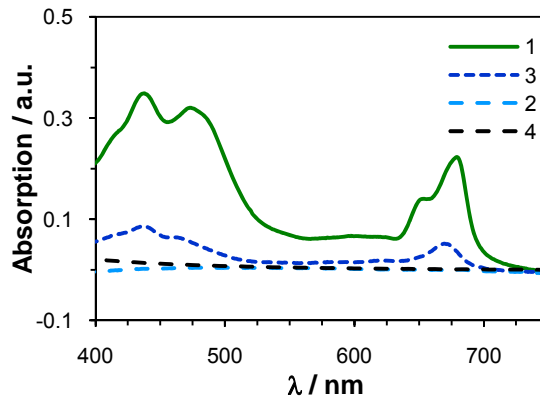


Abb. 6.4: Absorptionsspektren nach Einlagerung: LHCII/Vesikel (1), Blind1 ohne Copolymer (2), Blind2 mit Pigmentgemisch (3), Vesikellösung (4)

Ergebnisse aus CD-Spektren

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (engl. Circular dichroism, CD) beruht auf der Eigenschaft von optisch aktiven Strukturen, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Diese Differenz wird dabei in Abhängigkeit der Wellenlänge detektiert. In der Biologie wird diese Methode häufig angewandt, um Protein-Überstrukturen und Konformationsübergänge zu analysieren, aber auch zur Untersuchung der Kopplung von chromophoren Gruppen. Die enge elektronische Kopplung der LHCII-Moleküle im Trimer sowie die direkte Nähe der Chlorophylle und Carotinoide im Komplex verursachen eine charakteristische CD-Spektrenstruktur im sichtbaren Wellenlängenbereich. Diese ermöglicht Rückschlüsse auf die Intaktheit und den Oligomerisierungsgrad des LHCII [Dockter 2009].

Die Struktur des LHCII wurde vor, während und nach der Einlagerung durch die Messung von CD-Spektren verfolgt. Abbildung 6.5a zeigt die CD-Spektren für die LHCII/Vesikel-Probe (1) vor der Entfernung des TritonX100 und nach der Entfernung durch BioBeads-Behandlung, d.h. nach der Einlagerung.

Die intakte Struktur des Komplexes zeigt sich in negativen CD-Signalen bei den Wellenlängen 493nm, 650nm sowie 680nm. Trimere des LHCII zeigen zusätzlich ein negatives Signale bei $\lambda=473\text{nm}$ und eine deutliche Schulter nahe $\lambda=642\text{nm}$. Für Liposom-eingelagerte LHCII treten außerdem negative Signale bei $\lambda=426\text{nm}$ und $\lambda=457\text{nm}$ auf [Paulsen 1994/2006]. Die LHCII/Vesikel-Probe (1) zeigt alle erwarteten CD-Signale sowohl vor der Entfernung des TritonX100 als auch nach der BioBeads-Behandlung. Der LHCII liegt in der Lösung intakt und als Trimer vor, und ist somit durch die Vesikel stabilisiert.

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 6.6 die CD-Spektren für die Vergleichsprobe mit Pigmentgemisch (3), sowie für eine Vesikel/TritonX100-Lösung (4). Wie erwartet ist keine signifikante Spektrenstruktur erkennbar.

Darüber hinaus sind in Abbildung 6.5b die CD-Spektren der Blindprobe ohne Copolymer (2) vor und nach Einlagerung gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass auch in dieser Probe, selbst nach Entfernung des TritonX100, intakte und somit stabilisierte LHCII-Trimere vorliegen. Die Stabilisierung könnte auf unvollständiges Entfernen des TritonX100 hindeuten, auf Grund des starken Streusignals der Vesikel (ab $\lambda < 400\text{nm}$, bereits zu sehen in Abb. 6.4) konnte diese Vermutung jedoch nicht durch Absorptionsmessungen bestätigt werden (TritonX100 $\lambda_{\text{abs}} = 280\text{nm}$). Allerdings ist auf Grund der Intensitätsabnahme deutlich zu sehen, dass es sich nur um einen kleinen Anteil des ursprünglich eingesetzten LHCII handeln kann. Während im Falle der LHCII/Vesikel-Probe die Intensität um etwa 1/3 abnimmt, sinkt sie bei der Blindprobe um den Faktor 8.

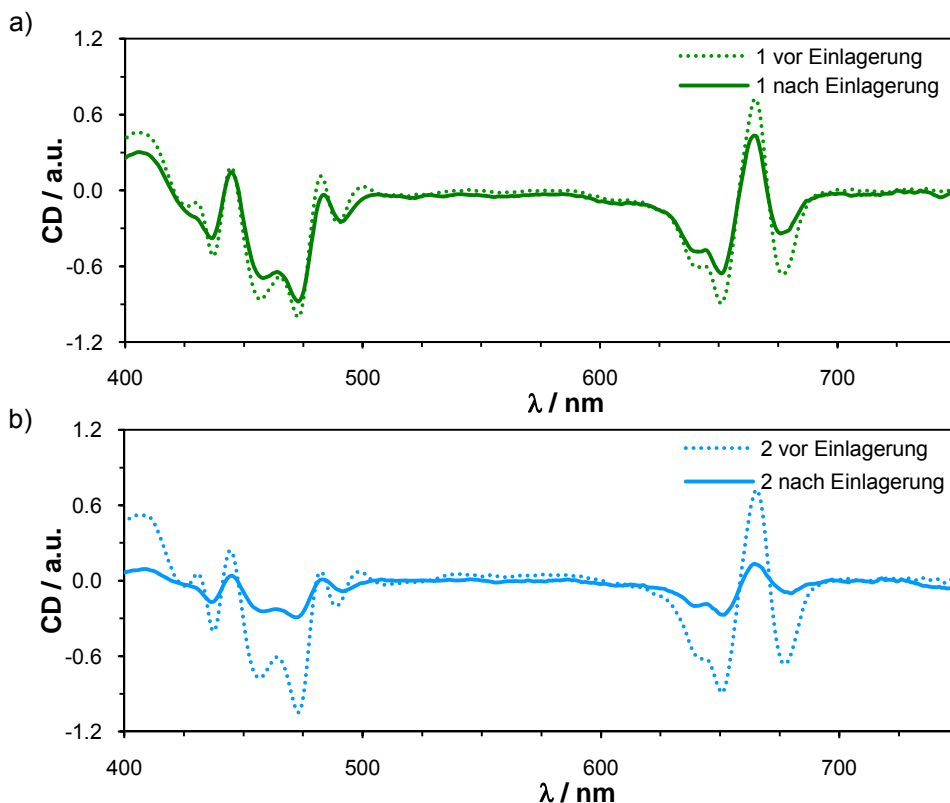


Abb. 6.5: CD-Spektren vor (gepunktet) und nach Insertion (durchgezogene Linie):
a) LHCII/Vesikel (1); b) Blind1 ohne Copolymer (2);
alle normiert auf (1) vor Einlagerung

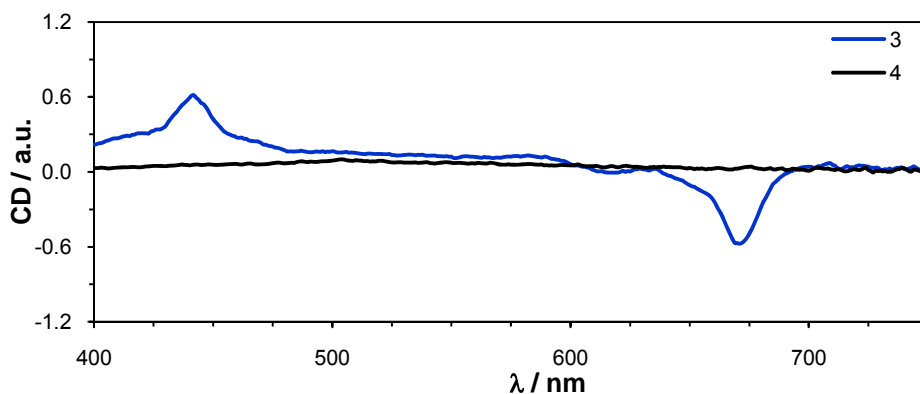


Abb. 6.6: CD-Spektren (normiert auf (1)) vor Entfernung des TritonX100:
Blind 2 mit Pigmentgemisch (3), Vesikel/TritonX100-Lösung (4)

Eine Aussage über die Stabilität des LHCII und seine Stabilisierung durch die Vesikel lässt sich durch Messung temperaturabhängiger CD-Spektren treffen. Die Intensitätsabnahme in Abhängigkeit von der Temperaturerhöhung ermöglicht einen Vergleich mit bekannten Daten nach LHCII-Liposomen-Einlagerung [Paulsen 2006].

Abbildungen 6.7 und 6.8 zeigen die temperaturabhängig gemessenen CD-Spektren und die kontinuierlichen Intensitätsmessungen bei fester Wellenlänge $\lambda=473\text{nm}$ (charakteristisches Signal für Trimere LHCII) für die Proben LHCII/Vesikel (Abb. 6.7) und die Blindprobe ohne Copolymer (Abb. 6.8). Ausgewertet wurden die Intensitätsmessungen. Dazu wurde jeweils die Temperatur $T_{1/2}$ bestimmt, bei der die Ausgangsintensität (bei 20°C) im Vergleich zur Endintensität (bei 85°C) um 50% abgenommen hat, d.h. 50% der LHCII-Komplexe zerstört sind [Dockter 2009].

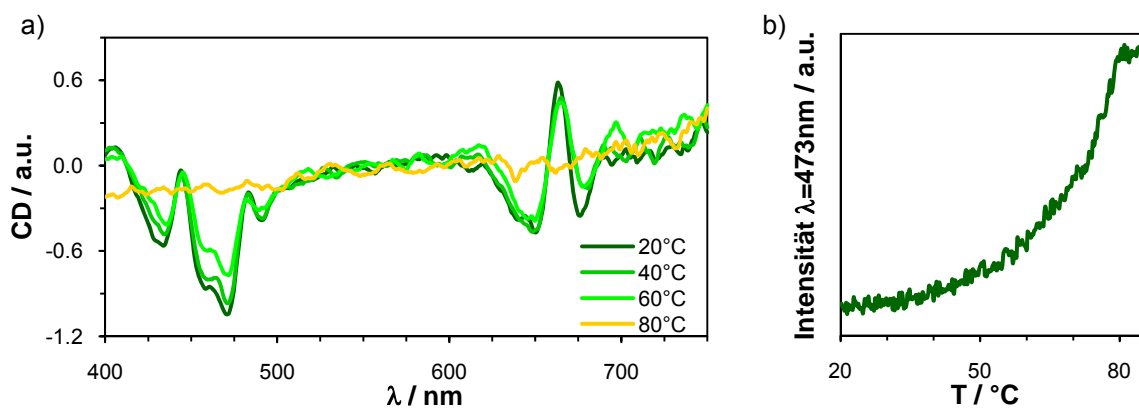


Abb. 6.7: a) Temperaturabhängige CD-Spektren (norm.) der LHCII/Vesikel-Probe
b) Temperaturabhängiges Intensitätssignal bei $\lambda=473\text{nm}$

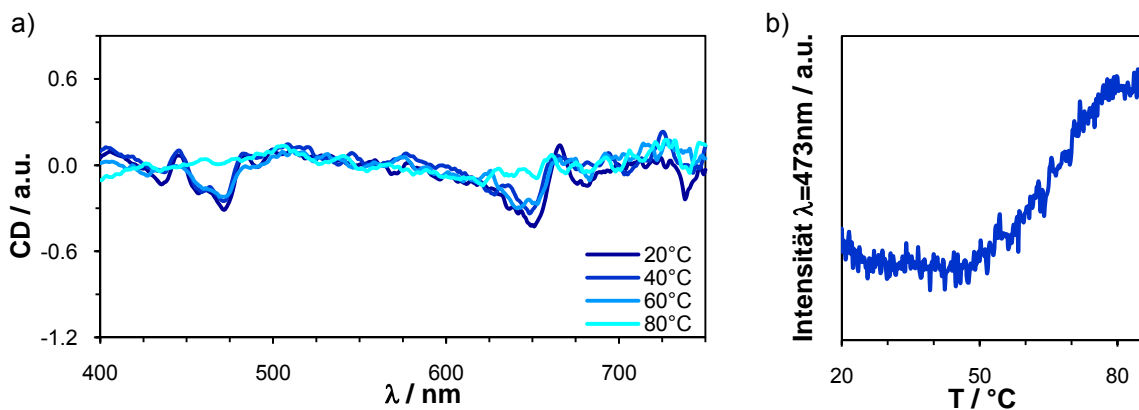


Abb. 6.8: a) Temperaturabhängige CD-Spektren (norm.) der Blindprobe ohne Copolymer
b) Temperaturabhängiges Intensitätssignal bei $\lambda=473\text{nm}$

Die Ergebnisse der Temperatureauswertung sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst. Es ist eindeutig zu sehen, dass die Einlagerung in die Vesikel (Probe LHCII/Vesikel, Abb. 6.7) mit $T_{1/2}=70^\circ\text{C}$ eine Stabilisierung des LHCII von vergleichbarer Stärke liefert wie die Einlagerung in Liposomen mit ebenfalls $T_{1/2}=70^\circ\text{C}$ [Paulsen 2006]. Darüber hinaus bestätigt sich auch, dass die Blindprobe ohne Copolymer (Abb. 6.8) mit $T_{1/2}=65^\circ\text{C}$ eine deutlich geringere Stabilisierung erfährt, die mit der Stabilisierung in TritonX100-Mizellen übereinstimmt.

Tab. 6.2: Übersicht der Temperatúrauswertung für die CD-Messungen

	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$
LHCII Trimer / TritonX100 Mizellen ^(#)	65
LHCII Trimer / Liposomen ^(#)	70
LHCII / Vesikel	70
LHCII / ohne Copolymer	65

Temperatur $T_{1/2}$ bei Intensitätshalbierung für $\lambda=473\text{nm}$, ^(#) [Paulsen 2006]

Thermolysin-‘Verdau‘

Thermolysin ist eine N-terminale Protease, ein Enzym das den LHCII beginnend mit dem N-Terminus ‘verdaut’, d.h. durch Hydrolyse in viele kleine Fragmente zerlegt. Im Falle eines in eine Membran eingelagerten LHCII ist dies nur für den nach außen ragenden, für das Enzym zugänglichen N-Terminus möglich. Das Enzym kann dabei nur das erste Fragment abspalten, da der übrige Anteil durch die Membran geschützt wird. Bezüglich der Orientierung erfolgt der LHCII-Einbau in solche Membranen rein statistisch. Bei etwa 50% des eingelagerten LHCII liegt der N-Terminus nach außen (bei den anderen 50% ragt der C-Terminus nach außen). Die Effizienz des Thermolysinverdau lässt sich nach Zerstörung des Enzyms und Auflösen der Membran durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nachweisen [Paulsen 1995]. Das Gel-Ergebnis kann wie folgt ausgewertet werden: (a) vollständig verdaute LHCII-Fragmente entsprechen nicht eingelagertem, frei zugänglichem LHCII in Lösung; (b) nur um ein kurzes Fragment verdaute LHCII-Anteile (24kDa) entsprechen dem mit N-Terminus nach außen eingelagerten LHCII; (c) unverdauter LHCII (25kDa) entspricht dem mit C-Terminus nach außen eingelagerten Anteil.

Abbildung 6.9 zeigt das Ergebnis des SDS-PAGE für die verschiedenen Ansätze sowie für einen LHCII-Standard (Probe (1), Mischung aus LHCII unverdaut und vollständig verdaute) und einen passenden Marker (Probe (2), mit 20/24/29/36/45/66kDa) zur Auswertung.

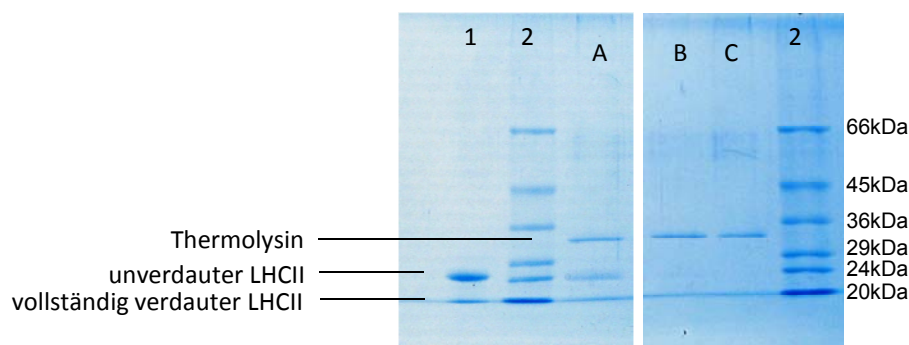


Abb. 6.9: SDS-PAGE nach Thermolysinverdau: (A) LHCII/Vesikel-Probe; (B) Blindprobe ohne Copolymer; (C) Blindprobe mit Pigmentgemisch (Auftragung: jeweils 20 μl); (1) LHCII-Standard, unverdaut und vollständig verdaute (2 μg); (2) SDS7-Marker, mit 20/24/29/36/45/66kDa (5 μl);

Alle Ansätze zeigen die Thermolysin-Bande bei 34.6kDa und eine Bande bei etwa 20kDa, die zum einen dem vollständig verdauten LHCII entspricht, zum anderen auch den Chlorophyll-Pigmenten selbst. Die detaillierte Auswertung für die einzelnen Proben ergab, dass die LHCII/Vesikel-Probe (A) eine Bande knapp unterhalb der Bande des unverdauten LHCII zeigt. Diese lässt sich LHCII zuordnen, der um ein Fragment verdaut wurde (24kDa) [Kleima 1999]. Somit besitzt diese Probe einen LHCII-Anteil, der mit dem N-Terminus nach außen in die Vesikelmembran eingelagert und somit vor weiterem Verdau geschützt ist. Allerdings zeigt diese Probe keine Bande für intakten LHCII, sondern nur noch die weitere Bande des vollständig verdauten Komplexes. Somit liegen neben den mit N-Terminus nach außen eingelagerten Komplexen zusätzlich noch frei zugängliche Komplexe vor, nicht aber mit C-Terminus nach außen eingelagerte LHCII. Eine ausschließlich gerichtete Einlagerung des LHCII in die Vesikelmembran könnte dieses Ergebnis erklären, bedarf aber weiterer Nachweise.

Die Blindprobe ohne Copolymer (B) zeigt nur die Bande des Thermolysins sowie die Bande des vollständig verdauten LHCII. Hier kommt es, wie erwartet, nicht zu einer Abschirmung vor dem Zugriff des Enzyms. Auch die Blindprobe mit Pigmentgemisch (C) zeigt neben der Bande des Thermolysins nur eine weitere Bande bei etwa 20kDa, die den freien Pigmenten zuzuordnen ist.

Ergebnisse dynamischer Lichtstreuung

Für die verschiedenen Insertions-Ansätze wurde vor und nach der Einlagerung dynamische Lichtstreuung gemessen, um den Einfluss des LHCII auf die Vesikelstruktur zu bestimmen. Demnach sind die Vesikellösungen vor der Insertionsprozedur eng verteilt um $\langle R_h \rangle = 31\text{nm}$ bzw. 35nm ($\mu_2 < 0.1$, s. Tab. 6.3). Nach der Insertion zeigen die Korrelationsfunktionen einen deutlich flacheren Abfall, was auf sehr breit verteilte Partikelgrößen schließen lässt. Dies zeigt sich auch in den zunehmenden μ_2 -Werten. Auf Grund der Verteilungsbreite und der damit verbundenen schlechten Fit-Güte sind die Ergebnisse für $\langle R_h \rangle$ nur als grobe Anhaltspunkte zu betrachten. Tabelle 6.3 zeigt eine Übersicht der DLS-Ergebnisse.

Tab. 6.3: Übersicht der DLS-Ergebnisse vor und nach Einlagerung

Probe	$\langle R_h \rangle$ / nm	μ_2 ($\theta=90^\circ$)
Vesikellösung PV36	31	0.08
LHCII/Vesikel (PV36)	[143]	[0.21]
Vesikellösung PV50	35	0.06
LHCII/Vesikel (PV50) ^(*)	[538]	[0.39]
LHCII/Vesikel (PV50)	[94]	[0.17]
nach Extrusion durch 100nm Poren	[100]	[0.13]

0.45 μm filtriert, ^(*)5 μm filtriert; Werte in eckigen Klammern sind nur Richtwerte auf Grund der schlechten Fit-Güte; $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Partikel nach der Einlagerung zu starker Aggregation neigen und die Aggregate ein breites Größenspektrum aufzeigen. Es ist bekannt, dass der LHCII Membran-Aggregation induzieren kann [Kühlbrandt 2009]. Ob es sich bei den Partikeln in Lösung demnach um Aggregate von Vesikeln handelt oder ob die Vesikelstruktur zerstört wurde, kann auf Basis der Messungen nicht entschieden werden. Insbesondere ist es möglich, dass dieser Effekt teilweise auch auf den Einfluss des TritonX100 auf die Vesikel zurückzuführen ist (siehe dazu: Einfluss der Vesikel auf die Insertion ab Seite 95).

Der Versuch, die möglichen Vesikelaggregate durch Extrusion durch eine Membran mit 100nm Poren zu 'zerscheren' und eine einheitlichere Größenverteilung zu erhalten führte zu keiner Verbesserung (s. Tab. 6.3). Der Zustand des LHCII wurde vor und nach Extrusion durch CD-Messung monitorisiert und zeigte ebenfalls keine Veränderung durch den Prozess, lediglich eine geringe Intensitätsabnahme, vermutlich zurückzuführen auf Filtrationsverluste. Nach Extrusion der grünen Lösung durch 50nm Poren wurde eine farblose, klare Lösung erhalten, so dass auf einen Filtrationsverlust sämtlicher LHCII-enthaltender Partikel durch diese kleinporigere Membran geschlossen werden kann.

AFM-Ergebnisse

Durch Spreiten der Blockcopolymer-Vesikel auf ein negativ geladenes Substrat, wie z.B. Mica, und anschließender Abbildung unter Wasser durch Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy, AFM), sollte es möglich sein die Position und die Verteilung des LHCII in der Polymermembran zu untersuchen.

Abbildung 6.10 zeigt zunächst die gepufferte Vesikellösung, die auf Mica gespreitet (über Nacht bei Raumtemperatur) und nach kräftigem Spülen mit Pufferlösung unter Lösung abgebildet wurde. Die Vesikel spreiten sehr gut auf der Mica-Oberfläche und bilden einen gleichmäßigen Polymerfilm mit nur wenigen Defektstellen.

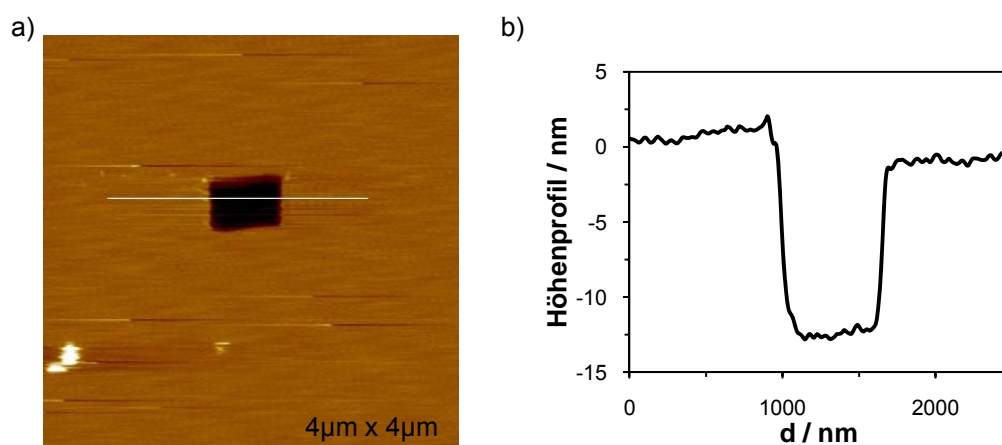


Abb. 6.10: a) AFM-Abbildung einer gepufferten Vesikellösung auf Mica, inkubiert über Nacht, abgebildet nach Spülen mit Pufferlösung; b) Höhenprofil zum Linienscan

Durch mehrmaliges Kratzen mit der AFM-Spitze konnte ein Teil des Mica wieder freigelegt werden und durch die Aufnahme des Höhenprofils die Polymerfilmdicke zu etwa 12nm bestimmt werden. Dies stimmt nicht ganz mit den erwarteten 15nm für den hydrophoben

Membrankern überein, liegt aber im Toleranzbereich, wenn man den Einfluss der Spitze und die Genauigkeit dieser Kratzmethode berücksichtigt. Die hydrophile PEO-Schicht der Membran bleibt bei der AFM-Messung in Lösung aufgequollen und ist dadurch so flexibel, dass sie mit der AFM-Spitze nicht abgebildet werden kann.

Abbildung 6.11 zeigt das AFM-Ergebnis der LHCII/Vesikel-Probe nach analoger Präparation. Auch hier bilden die Polymere einen gleichmäßigen Film auf dem Mica mit der erwarteten Dicke. Zusätzlich sind gleichmäßig verteilte Erhöhungen zu erkennen, die etwa 4nm über den Polymerfilm herausragen. In Abbildung 6.11a (1) ist eine größere Zusammenlagerung zu sehen, die im Höhenprofil eine erstaunlich glatte Oberfläche mit einer konstanten Höhe von ebenfalls 4nm aufweist. Die weiß erscheinenden Spots sind höher als 4nm. Ihre Anzahl sinkt mit dem Spülprozess, allerdings sind diese Ablagerungen auch nach starkem Spülen nicht vollständig zu entfernen.

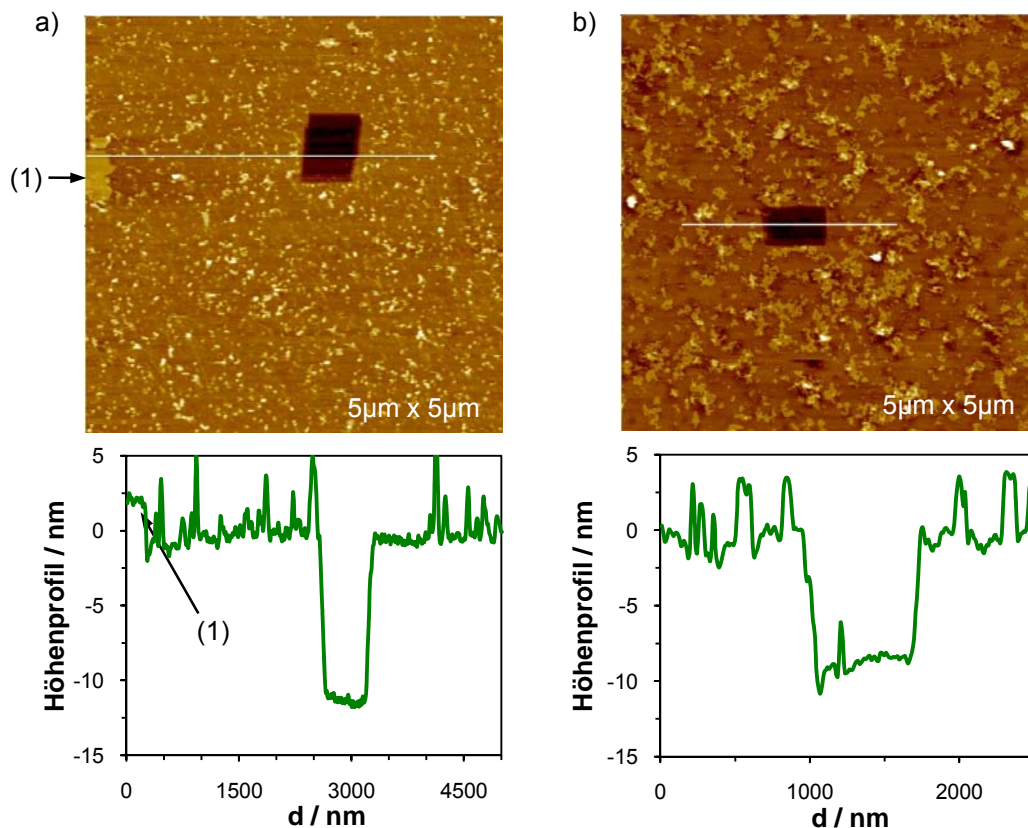


Abb. 6.11: a) AFM-Abbildung der LHCII/Vesikel-Probe auf Mica, inkubiert über Nacht und abgebildet nach Spülen mit Pufferlösung; Höhenprofil zum Linien scan; (1) siehe Text; b) erneute Messung nach 24 Stunden; Höhenprofil zum Linien scan

In den Abbildungen ist die hydrophob-hydrophile Grenzfläche der Vesikelmembran zu sehen. Die gleichmäßig verteilten Ablagerungen entsprechen sowohl in Anbetracht ihrer Anzahl als auch in ihrer Höhe von etwa 4nm dem LHCII. Gerade die gleichmäßige Höhe der großen Zusammenlagerung (s. Abb. 6.11a, (1)) spricht für eine sehr definierte Struktur. Demnach wäre der Komplex nicht, wie zunächst erwartet, in den hydrophoben Membrankern eingelagert, sondern nur an der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche zwischen Polybutadien- und Polyethylenoxid-Block angelagert und durch die PEO-Abschirmung ausreichend in

Lösung stabilisiert. Wie sich diese Anlagerung mit der intakten Struktur (s.o. CD-Spektren) vereinbaren lässt, bleibt zu untersuchen. Die Zusammenlagerung könnte außerdem ein Hinweis darauf sein, dass der LHCII immer noch ausreichend flexibel ist um durch Wanderung größere Aggregate zu formen und durch Protein-Protein-Interaktion eine höhere Stabilisierung zu erhalten [Renger 1997]. Dies würde auch erklären warum eine Messung nach 24 Stunden (Abb. 6.11b) immer noch gleichmäßig verteilte, aber augenscheinlich größere Ansammlungen des Komplexes auf dem Polymerfilm zeigt. Eine Auswertung der lateralen Dimension ist nicht möglich, da der Größenbereich von wenigen Nanometern außerhalb des Auflösungsvermögens des AFM-Scanners liegt. Auch könnte der augenscheinliche Größenunterschied direkt mit der Qualität der verwendeten AFM-Spitze oder mit der veränderten Position auf dem Film zusammenhängen, da es nicht möglich ist die exakte Position vom Vortag wiederzufinden.

Fluoreszenzmikroskopie

Da der LHCII in der Vesikellösung immer noch intakt ist und unverändert fluoresziert, kann die Abbildung der auf Mica gespreiteten Proben (s.o.) im Fluoreszenzmikroskop eine Zuordnung zwischen AFM-Bild und Fluoreszenz-Information ermöglichen. Diese Zuordnung kann nur vergleichend erfolgen, da es sich um zwei unabhängige Geräte handelt und es nicht möglich ist, die exakte Position im Fluoreszenzmikroskop wiederzufinden, die zuvor mit dem AFM abgebildet wurde.

Die mikroskopischen Messungen erfolgten fast drei Monate nach der Probenpräparation und den bisher genannten Charakterisierungsmethoden. Die Proben waren bis zur Messung kühl und lichtgeschützt gelagert und wurden, wie oben beschrieben, erneut auf Mica gespreitet. Ihr unveränderter Zustand wurde durch die erneute Messung von CD-Spektren nachgewiesen (s.u. Abb. 6.18). Auch die AFM-Bilder unterschieden sich nicht von früheren Messungen.

Abbildung 6.12 zeigt die erhaltenen Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen (TRITC-Filterset). Die Bilder wurden mit einer hochempfindlichen s/w-Kamera gemacht und nachträglich eingefärbt. Auch hier ist deutlich zu sehen, dass sehr gleichmäßig verteilt fluoreszierende Ablagerungen zu sehen sind. Der Polymerfilm, der sich über die gesamte Fläche erstreckt, fluoresziert nicht und entspricht dem dunklen Hintergrund. Vereinzelt finden sich größere Ablagerungen, die ebenfalls stark fluoreszieren.

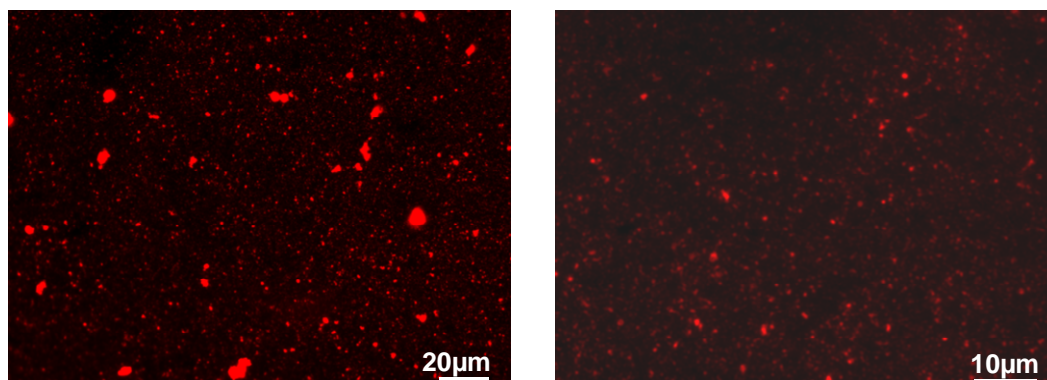


Abb. 6.12: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme der LHCII/Vesikel-Probe auf Mica

Eine laterale Ausmessung ist auf Grund der diffusen Emission und der Auflösungsgrenze des Mikroskops auch bei dieser Methode nicht möglich. Der direkte Vergleich der AFM- und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen bestätigt jedoch die Vermutung, dass es sich bei den im AFM abgebildeten 4nm hohen Strukturen um den fluoreszierenden LHCII handelt. Dieser ist an die hydrophob-hydrophile Grenzfläche angelagert und erfährt dort seine Stabilisierung.

Verwendung von Laurylmaltosid

Um den Einfluss des zur Einlagerung verwendeten Tensids zu untersuchen, wurde in einer analogen Ansatzreihe TritonX100 durch die gleiche Menge Laurylmaltosid (LM) ersetzt. Laurylmaltosid zeichnet sich durch ähnlich gute Insertionsergebnisse für LHCII-Liposomen-Einlagerung aus [Boggasch 2006]. Die Strukturen von TritonX100 und Laurylmaltosid sind in Abbildung 6.16 (s.u.) gegenüber gestellt.

Abbildung 6.13 zeigt Fluoreszenzspektren der verschiedenen LM-Ansätze nach der Einlagerung. Diese unterscheiden sich nicht von ihren TritonX100-Analoga (vgl. Abb. 6.3). Die LHCII/Vesikel-Probe (1) zeigt eine starke Emission bei $\lambda=680\text{nm}$, d.h. der Energieübertrag findet statt. Der LHCII-Komplex ist somit intakt. Die Vergleichsprobe ohne Copolymer Blind1 (2) zeigt auch eine Emissionsbande bei $\lambda=680\text{nm}$, diese ist aber schwächer ausgeprägt, was dafür spricht, dass der LHCII nach und nach zerfällt. Die Blindprobe mit Pigmentgemisch Blind2 (3) hat eine Emissionsbande bei $\lambda=675\text{nm}$. Auch hier werden die Pigmente durch die Vesikel in der Lösung stabilisiert und die hohe lokale Konzentration ermöglicht den Energieübertrag von Chl-b auf Chl-a.

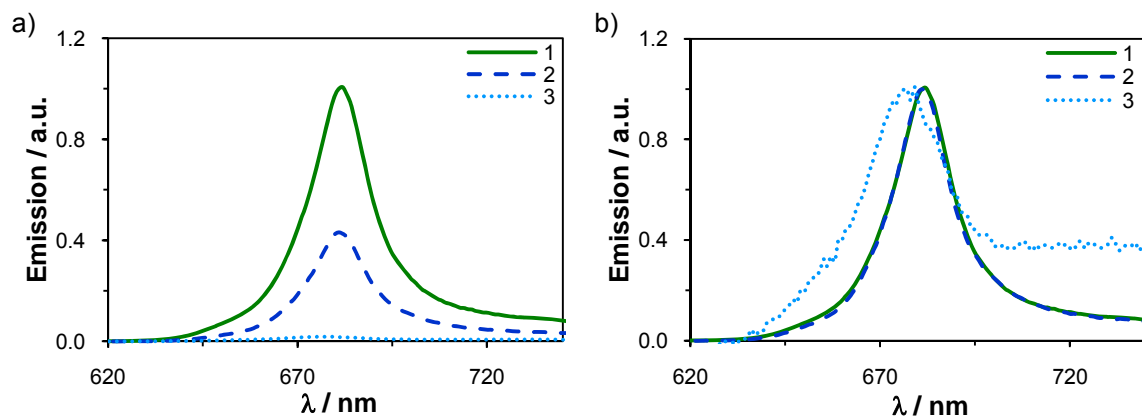


Abb. 6.13: Emissionsspektren nach Einlagerung mit Laurylmaltosid ($\lambda_{\text{ex}}=470\text{nm}$): LHCII/Vesikel (1), Blind1 ohne Copolymer (2), Blind2 mit Pigmentgemisch (3) a) normiert auf (1); b) normiert auf den Wert 1

Die erhaltenen CD-Spektren (s. Abb. 6.14) entsprechen ebenfalls dem Ergebnis der TritonX100-Ansätze. Auch der LM-Ansatz der LHCII/Vesikel-Probe (1) zeigt die für einen intakten Trimeren LHCII typischen CD-Signale (vgl. Abb. 6.5). Die Blindprobe ohne Copolymer (2) hat im Vergleich dazu eine deutlich geringere Intensität. Die Blindprobe mit Pigmentgemisch (3) und die reine Vesikellösung mit Laurylmaltosid (4) zeigen wie erwartet keine signifikante Spektrenstruktur (s. Abb. 6.14b).

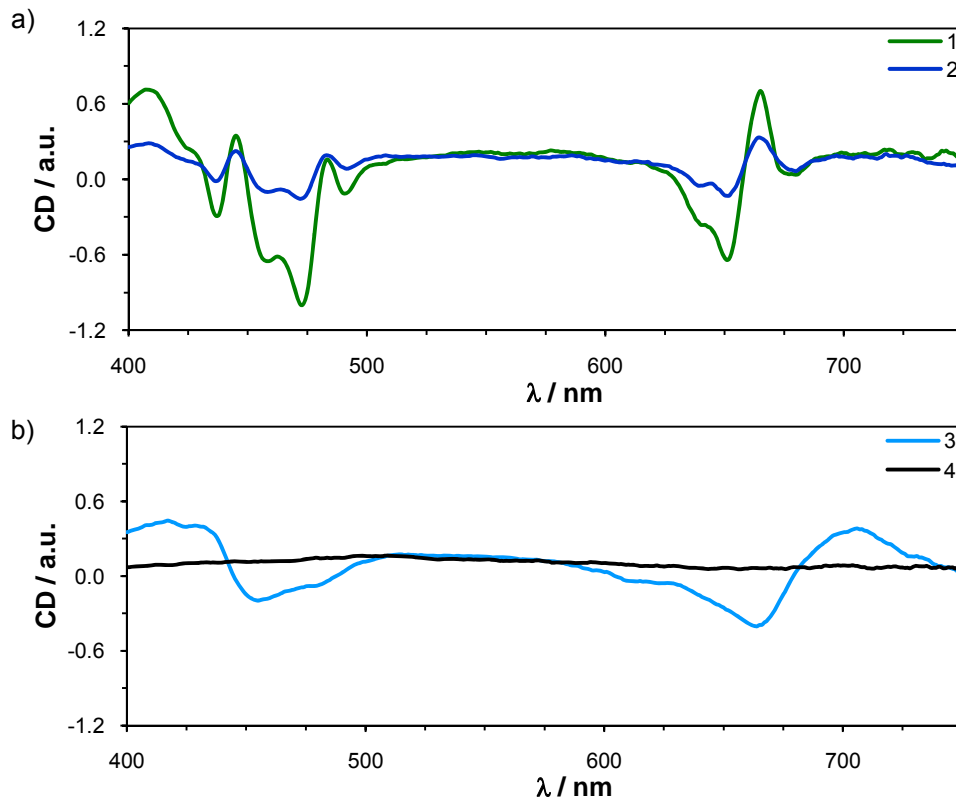


Abb. 6.14: CD-Spektren nach Insertion: a) LHCII/Vesikel-Probe (1), Blind1 ohne Copolymer (2); b) Blind2 mit Pigmentgemisch (3), Vesikel/LM-Lösung (4)

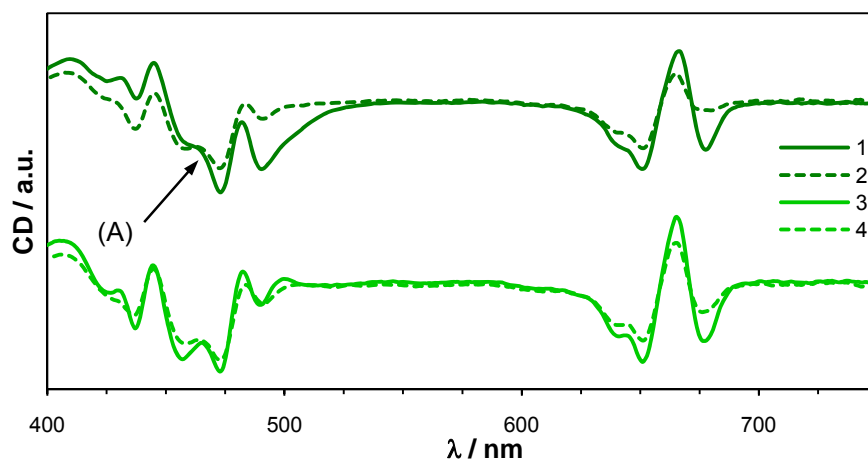


Abb. 6.15: CD-Spektren der LHCII/Vesikel-Proben:
 Insertiert mit Laurylmaltosid vor (1) und nach (2) Tensid-Entfernung;
 Insertiert mit TritonX100 vor (3) und nach (4) Tensid-Entfernung

In Abbildung 6.15 sind die Spektren der LHCII/Vesikel-Probe, eingelagert mit Laurylmaltosid, vor (1) und nach (2) der Entfernung des Tensids durch BioBeads-Behandlung aufgetragen. Zum Vergleich der Spektrenstruktur ist zusätzlich die analoge LHCII/Vesikel-Probe, eingelagert mit TritonX100, vor (3) und nach (4) der BioBead-Behandlung gezeigt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der LM-Ansatz die für einen intakten Trimeren LHCII typischen Signale bei $\lambda=426/457/473/493/650/680\text{nm}$ sowie die Schulter nahe $\lambda=642\text{nm}$ zeigt

(vgl. o.). Die Intensitätsrelation der Signale zueinander ist jedoch innerhalb der Laurylmaltosid-Mizellen (1) auf Grund der unterschiedlichen Umgebung eine andere als in TritonX100-Mizellen (3), wie für die Signale $\lambda < 500\text{nm}$ gut zu erkennen (A). Nach der LM-Entfernung (2) entspricht die Spektrenstruktur der durch TX inserierten Probe (4).

Dieses Ergebnis beweist, dass eine vollständige Entfernung des Tensids stattgefunden hat und gibt außerdem Aufschluss über die LHCII-Umgebung in den Vesikeln. Da die CD-Spektren nach Insertion mit Laurylmaltosid die gleiche Struktur aufweisen wie bei TX-Insertion vor und nach Tensid-Entfernung, muss die Umgebung des LHCII, eingelagert in die polymeren Vesikel, der Umgebung in TX-Mizellen sehr ähnlich sein. Der hydrophile Block des TritonX100 besteht wie der hydrophile Block des Copolymers aus Polyethylenoxid-Einheiten (s. Abb. 6.16). Demnach ist der LHCII in den Vesikeln sehr wahrscheinlich an der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche durch die gequollenen PEO-Kettenenden stabilisiert, deren Umgebung der TX-Umgebung ähnelt.

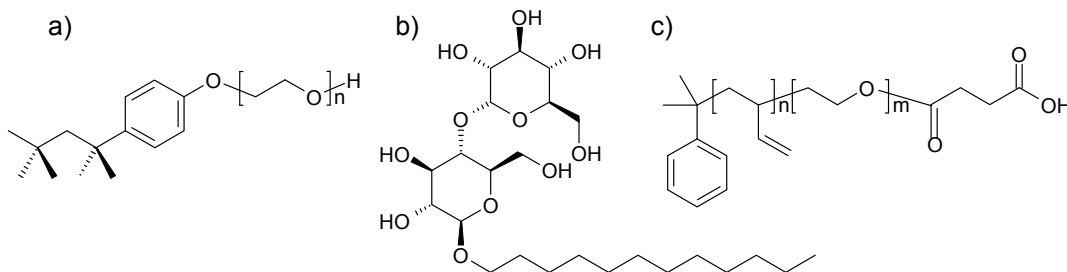


Abb. 6.16: Chemische Struktur von (a) TritonX100 ($n=9.5$); (b) Laurylmaltosid; (c) PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH ($n=130$, $m=66$)

Das Ergebnis der temperaturabhängigen CD-Messung bestätigt die Stabilisierung des LHCII durch die Vesikel (s. Abb. 6.17). Durch die Verwendung des Laurylmaltosid als Tensid wird für die LHCII/Vesikel-Probe eine noch höhere Temperatur $T_{1/2}$ von 72°C ermittelt (vgl. TX-Ansatz $T_{1/2}=70^\circ\text{C}$; Tab. 6.2). Dieser Wert liegt deutlich über dem $T_{1/2}$ -Wert für Tensid-Mizellen-Stabilisierung von 65°C [Paulsen 2006].

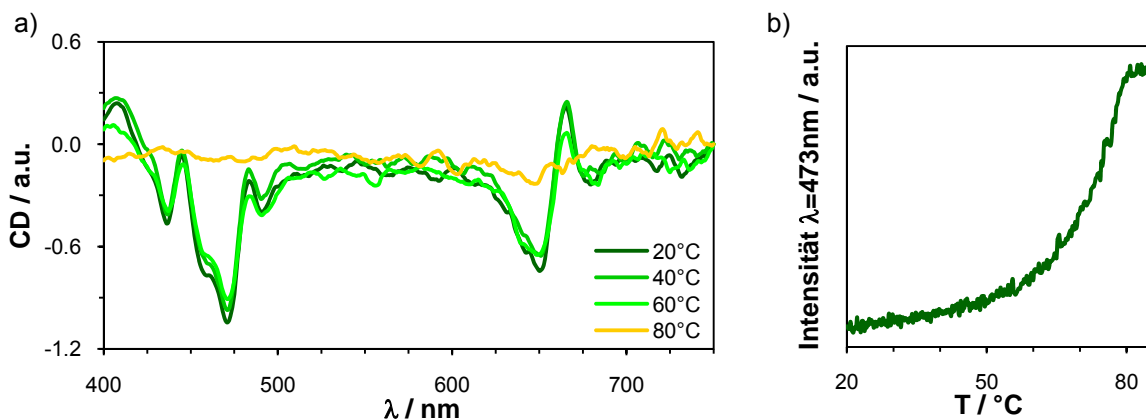


Abb. 6.17: a) Temperaturabhängige CD-Spektren (norm.) der LHCII/Vesikel-Probe
 b) Temperaturabhängiges Intensitätssignal bei $\lambda=473\text{nm}$

Auch für die mit Laurylmaltosid durchgeführten Einlagerungsproben zeigen die Korrelationsfunktionen der DLS-Messungen eine deutliche Strukturveränderung im Vergleich zu den Vesikel-Ausgangslösungen (s. Tab. 6.4). Der Wechsel des Tensids konnte die Bildung größerer Strukturen nicht verhindern, und auch hier kann durch Extrusion keine Verbesserung erzielt werden.

Tab. 6.4: Übersicht der DLS-Ergebnisse nach Insertion mit Laurylmaltosid

Probe	$\langle R_h \rangle$ / nm	μ_2 ($\theta=90^\circ$)
Vesikellösung PV50	35	0.06
LHCII/Vesikel (PV50) ^(*)	[615]	[---]
LHCII/Vesikel (PV50)	[105]	[0.17]
nach Extrusion durch 100nm Poren	[106]	[0.17]

0.45 μ m filtriert, ^(*)5 μ m filtriert; Werte in eckigen Klammern sind nur Richtwerte auf Grund der schlechten Fit-Güte;
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Langzeitstabilität der Einlagerung

Nach zweimonatiger Lagerung der Insertionsproben (kühl und dunkel) wurden erneut CD-Messungen durchgeführt. Der Vergleich der erhaltenen Spektren mit den Ursprungs-Spektren ist in Abbildung 6.18 zu sehen. Die Intensitätsabnahme ist signifikant, die Spektrienstruktur entspricht jedoch unverändert dem Spektrum intakter LHCII-Trimere. Dies ist sowohl für die TritonX100-Ansätze (1) als auch bei Verwendung des Laurylmaltosids (2) zu sehen. Auch dieses Ergebnis spricht für eine ausgeprägte Stabilisierung des LHCII durch die Vesikel bzw. durch die Blockcopolymere.

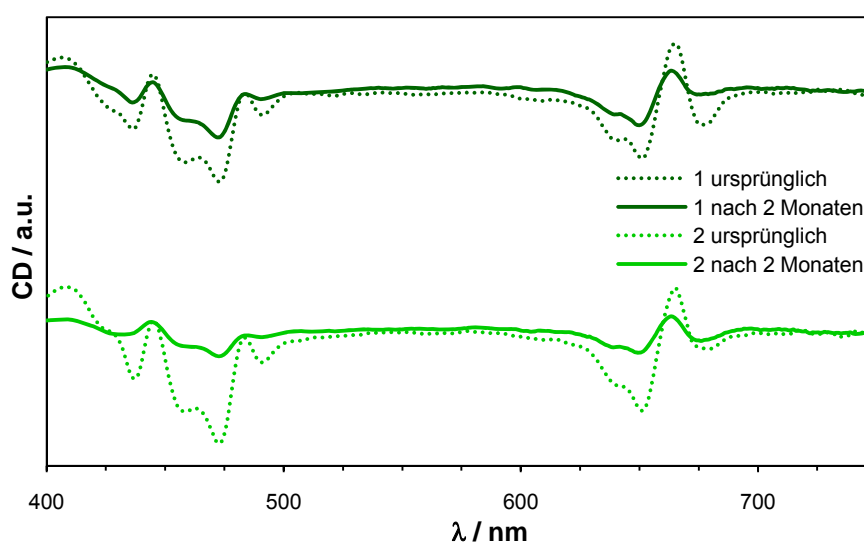


Abb. 6.18: CD-Spektren der LHCII/Vesikel-Proben nach 2 Monaten für TX-Insertion (1) und LM-Insertion (2) im Vergleich zu den ursprünglichen Spektren

Einfluss der Vesikel auf die Insertion

Um den Einfluss der Blockcopolymeren auf die einzelnen Schritte des LHCII-Insertionsprozesses zu untersuchen wurde eine Reihe von Blindversuchen ohne LHCII durchgeführt und entsprechend charakterisiert.

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde der Einfluss der einzelnen Komponenten der Insertionslösung sowie der Verdünnungseffekt für reine Vesikellösungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst.

Die Zugabe des Liposomenpuffers und des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT, zur Vermeidung der Ausbildung von Disulfidbrücken) sowie die resultierende Verdünnung haben keinen strukturellen Einfluss auf die Vesikel. In beiden Größenbereichen bleibt der gemittelte hydrodynamische Radius konstant. Nicht so bei der Zugabe des TritonX100. Die Korrelationsfunktionen werden deutlich flacher (verbreiterte Größenverteilung) und der gemittelte Radius verschiebt sich zu größeren Strukturen (im Falle der kleinen Vesikel auf annähernd doppelte Größe). Die anschließende BioBead-Behandlung führt zu keiner zusätzlichen Veränderung. Auch die BioBead-Behandlung auf die reine Vesikellösung (PV36, in der während der Insertion verwendeten Verdünnung) zeigt, dass die Vesikelstruktur unverändert erhalten bleibt. Letzteres Experiment zeigt außerdem über die Abnahme der Streuintensität (es wurde nicht erneut filtriert), dass der Konzentrationsverlust unter 5% liegt. Das bedeutet, dass die BioBeads kaum Copolymer absorbieren und somit die Oberfläche zur Tensid-Entfernung zur Verfügung steht.

Tab. 6.5: Übersicht der DLS-Ergebnisse für den Einfluss der Einzelkomponenten der Einlagerungsprozedur auf die Vesikellösung

Probe	$\langle R_h \rangle$ / nm	μ_2 ($\theta=90^\circ$)
Vesikellösung PV36	31	0.08
Verdünnung nach Insertion	33	0.07
nach BioBead-Behandlung	33	0.06
Vesikellösung PV46	86	0.05
mit Liposomenpuffer	82	0.07
mit DTT und gepuffert	82	0.08
mit TX, DTT und gepuffert	108	0.09
nach Insertionsprozess und BioBeads	106	0.11
Vesikellösung PV47	35	0.06
mit Liposomenpuffer	35	0.06
mit DTT und gepuffert	36	0.08
mit TX, DTT und gepuffert	66	0.11
nach Insertionsprozess und BioBeads	61	0.13
TX mit Liposomenpuffer	[134]	[0.18]

0.45 μ m filtriert; Werte in eckigen Klammern sind nur Richtwerte auf Grund der schlechten Fit-Güte; $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

In Bezug auf die Strukturveränderung durch das verwendete TritonX100 bleibt zu erwähnen, dass bereits die gepufferte Tensid-Lösung aus großen Partikeln (vermutlich die Tensid-Mizellen) mit sehr breiter Größenverteilung besteht. Blindversuche unter Verwendung des Laurylmaltosid wurden nicht durchgeführt, jedoch zeigte sich bereits in den LHCII-analogen Proben keine Verbesserung der strukturellen Kontrolle, so dass ähnliche Ergebnisse zu erwarten sind.

6.1.2. Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass der Intermembran-Protein-Komplex LHCII durch die PB-PEO-Vesikel in wässriger Lösung stabilisiert werden kann, seine Funktionalität beibehält und dabei eine vergleichbare Stabilität besitzt wie eingelagert in künstliche Liposome.

Die experimentellen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass diese Stabilisierung nicht von einer Insertion in die Vesikelmembran herrührt, sondern eine LHCII-Aggregatbildung innerhalb der PEO-Schicht an der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche stattfindet. Die 15nm dicke hydrophobe Vesikelschale wird demnach nicht, wie beabsichtigt, durch den LHCII als Intermembran-Protein gestaucht und durchspannt. Außerdem kommt es im Verlauf des Insertionsprozesses zu einer starken Aggregation, so dass auch Vesikelaggregate für die Stabilisierung des LHCII verantwortlich sein können.

Offen bleibt, ob die Ursache für die nicht erfolgte Insertion die ausreichende PEO-Stabilisierung, und damit die mangelnde Einlagerungs-Triebkraft, ist oder aber die hydrophobe Vesikelmembran mit 15nm für Intermembran-Proteine zu dick ist. Die bisher erfolgreichen Einlagerungen solcher Membranproteine erfolgten in polymere Vesikel mit hydrophoben Membrandicken von <10nm und Polymethyloxazolin als hydrophilem Block (s. Abb. 6.19a), welches deutlich polarer als PEO ist und dadurch wahrscheinlich die Protein-Einlagerung antreibt [10].

Für weitere Untersuchungen mit LHCII sollte eine niedrigere Protein-Konzentration und eine niedrigere Tensid-Konzentration gewählt werden, um die starke Aggregation zu reduzieren. Vielversprechend wäre auch ein Wechsel zu einem Intermembran-Protein mit größerer hydrophober Domäne, das sich nicht in der PEO-Schicht stabilisieren kann. Ionophore wie Valinomycin sind ebenfalls interessante Substrate, da sie die Kanalstruktur durch Stapeln bilden und somit auf keine Membrandicke fixiert sind (s. Abb. 6.19b).

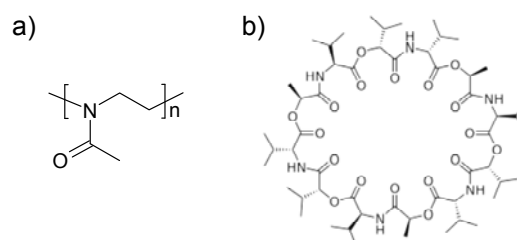


Abb. 6.19: Chemische Struktur von a) Poly(2-methyloxazolin); b) Valinomycin [Wikipedia]

6.1.3. Experimenteller Teil

Alle Lösungen wurden in destilliertem Wasser (Waters MilliQ System) präpariert. Folgende Materialien wurden ohne Aufreinigung verwendet: TritonX100 (Boehringer, Mannheim), Laurylmaltosid (Dodecylmaltosid), Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Tromethamin (s. Abb. 6.16, 6.20), BioBeads (poröse Polystyrol/Polydivinylbenzol-Copolymer Perlen, Bio-Rad). Der verwendete Liposomenpuffer besteht aus 10mM Tris-HCl Puffer (pH 7.5, Tromethamin, HCl), 0.1mM EDTA und 50mM NaCl. Die Vesikel wurden analog der Co-Lösemittelmethode, wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, präpariert. Die Gewinnung und Aufreinigung des trimeren LHCII aus Erbsenpflanzen (*Pisum sativum var Lisa*) erfolgte durch sukzessive Fällung wie in [Rühle 2004] beschrieben durch C. Dockter. Erhalten wird nativer LHCII, eine Mischung der Apoproteine LHCIIb1, LHCIIb2 und LHCIIb3, mit einem Molekulargewicht von etwa 25.5kDa.

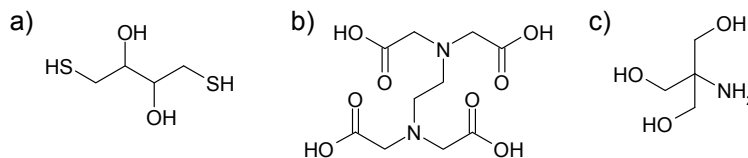


Abb. 6.20: Chemische Struktur von a) Dithiothreitol (DTT); b) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); c) Tromethamin;

Einlagerungsprozess

Die LHCII-Einlagerung in die Vesikel erfolgte analog zur Einlagerung in Liposomen durch C. Dockter [Paulsen 2006, Dockter 2009]. Die Ausgangslösungen wurden wie folgt vorbereitet: (L1) Die Vesikellösung wurde gepuffert durch Zugabe von 20 μ l Liposomenpuffer (10x) zu 200 μ l Vesikellösung ($C_{\text{Polymer}}=1\text{g/l}$); (L2) Die LHCII-Lösung wurde gepuffert durch Zugabe von 25 μ l Liposomenpuffer (2x) zu 15 μ l LHCII-Lösung und mit 10 μ l TritonX100 (1Gew.-%) versetzt. Die gekühlten Lösungen wurden wie folgt gemischt: 200 μ l Vesikellösung, gepuffert (L1); 50 μ l LHCII-Lösung, gepuffert, mit TritonX100 (L2); 3 μ l DTT-Lösung; 12.5 μ l TritonX100 (1Gew.-%); 25 μ l Liposomenpuffer (2x); 9.5 μ l Wasser. Erhalten wurden 300 μ l Einlagerungslösung, gepuffert, mit einer Endkonzentration $C_{\text{LHCII}}=4\mu\text{M}$.

Die Lösung wurde auf Eis und dunkel gelagert. Nach 3 Stunden wurden zum Entfernen des TritonX100 6mg BioBeads zugegeben und die Mischung über Nacht bei 0°C im Dunklen geschüttelt. Die Lösung wurde von den BioBeads abpipettiert und nach Zugabe von 12mg frischen BioBeads weitere 3 Stunden bei 0°C im Dunklen geschüttelt. Diese Prozedur wurde wiederholt, so dass insgesamt 30mg BioBeads verwendet wurden (ausreichend um die 20-fache Menge Detergenz zu entfernen).

Als Vergleichsproben wurde in einer Probe Blind1 die Vesikellösung durch Pufferlösung, bzw. in einer Probe Blind2 die LHCII-Lösung durch eine Chl-a/Chl-b-Pigmentmischung ersetzt. Desweiteren wurde für eine Ansatzreihe TritonX100 durch die gleiche Menge Laurylmaltosid ersetzt um den eventuellen Einfluss des Lipids zu untersuchen.

Charakterisierung

Der Thermolysin-Verdau erfolgte durch C. Dockter wie in [Dockter 2009] beschrieben.

Fluoreszenzemissions-Messungen erfolgten an einem Fluoromax-Spektrometer (Jobin Yvon, Spex, Gasbrunn), die Absorptions-Messungen an einem Shimadzu MPS-2000.

Die Messung der CD-Absorption wurde an einem Jasco J-810 CD-Spektrometer (bei 2nm Bandbreite und 500nm/min Scangeschwindigkeit) durchgeführt. Die temperaturabhängigen Messungen erfolgten in 1mm Küvetten in einem Bereich von 20-85°C mit einem Temperaturgradienten von 1°C/min. Die CD-Absorption der Trimere wurde bei $\lambda=473\text{nm}$ alle 0.2 Sekunden gemessen. Bei jeweils 5°C Temperaturerhöhung wurde ein CD-Spektrum im Wellenlängen-bereich von $\lambda=400\text{--}750\text{nm}$ aufgenommen, was zur Unterbrechung des Gradienten für 0.7 Minuten führte.

AFM-Messungen wurden an einem MFP-3D (Asylum Research, USA) mit Silizium-Nitrid-Cantilevern OMCL-TR 400 PSA (Olympus, Japan) im Tapping Modus durchgeführt.

Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten an einem BX-51 (Olympus, Japan) mit Wasser-Immersionsoberflächen (40x, 100x) und TRITC-Filterset.

6.2. Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer

in Zusammenarbeit mit Prof. Montesinos, Centro de Microprocesos,
Departamento de Ingeniería Química, Tecnológico de Monterrey, Monterrey Mexico

Der Prozess der Selbstorganisation ist von vielen Systemparametern abhängig und, wie für das PB₁₃₀-PEO₆₆/Wasser-System gezeigt, hat auch die Probenpräparation einen großen Einfluss auf die gebildeten Strukturen in Lösung (vgl. Abs. 2.1.2, 4.1.1). Die Kontrolle über diesen Prozess und die dadurch mögliche Beeinflussung der gebildeten Strukturen sind eine wichtige Voraussetzung für spätere Anwendungen.

Die Verwendung der Mikroprozess-Technik ist ein vielversprechender Ansatz. Mikromischer ermöglichen die kontrollierte und reproduzierbare Mischung zweier flüssiger Phasen miteinander, und erlauben ferner die Steuerung der Prozessparameter, wie beispielsweise der Flussraten oder des Flussverhältnisses. Das Copolymer wird im guten Lösemittel THF gelöst und die Mischung mit dem selektiven Lösemittel Wasser als zweite Phase erfolgt innerhalb des Mikromischer. Dort induziert das Wasser die Selbstorganisation und der Prozess verläuft kontrolliert durch die Mischparameter. Da auch Temperatur und Druck kontrolliert werden können, sind die Ergebnisse leicht reproduzierbar. Auf Grund des kontinuierlichen Mischprozesses (mit möglichen Flussraten bis zu 200l/h) sind gleichzeitig hohe Durchsätze realisierbar.

Mikromischer

Mikromischer sind Kanalsysteme im µm-Bereich. Neben den Prozessparametern wie Flussraten und Flussverhältnissen verursachen verschiedene Kanalgeometrien unterschiedliche Flussprofile und der Mischprozess kann somit dem Problem angepasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein CPMM-‘split and recombine‘-Mikromischer (Institut für Mikrotechnik Mainz, [IMM]) verwendet, der für flüssig/flüssig Mischungen gute Ergebnisse erzielt und mit Kanaldimensionen von 300µm der Problemstellung entspricht. Das stufenweise Mischprinzip ist in Abbildung 6.21b gezeigt.

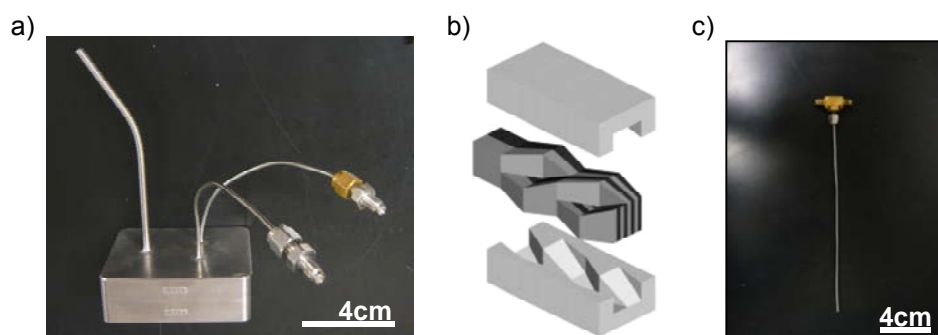


Abb. 6.21: a) CPMM-‘split and recombine‘-Mikromischer, b) Mischprinzip der zwei Phasen, schematisch für zwei von zwölf Mischstufen [IMM]; c) T-Stück mit Metallkanüle

Die Flussraten wurden zwischen 0.05ml/min und 10.00ml/min bei Flussverhältnissen (H₂O zu 1B/THF) von 42:1 bis 147:1 variiert, so dass der THF-Endgehalt für alle Proben unterhalb

5Gew.-% lag. Eine Übersicht über die Parameter der einzelnen Proben ist in Tabelle 6.6 gegeben. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden Vergleichsproben gekennzeichnet mit (II) bei gleichen Parametern aber in anderer Probenreihenfolge gemischt.

Zusätzlich wurde ein T-Stück mit einer 15cm langen Metallkanüle bei gleichen Prozessparametern als Mischer verwendet, um den Einfluss der Kanalgeometrie aufzeigen zu können (s. Abb. 6.21c). Eine Übersicht der Parameter ist in Tabelle 6.7 gegeben.

Tab. 6.6: Übersicht der Prozessparameter für die Proben gemischt im CPMM-Mikromischer

Probe	H ₂ O-Flussrate in ml/min	1B/THF-Flussrate in ml/min	H ₂ O:1B/THF	End-C _{1B} / g/l
U-1	10.00	0.24	42:1	1.0
U-2	6.30	0.15	42:1	1.0
U-3	2.10	0.05	42:1	1.0
V-1	10.00	0.16	63:1	0.7
V-2	6.30	0.10	63:1	0.7
V-3	3.15	0.05	63:1	0.7
W-1	10.00	0.12	84:1	0.5
W-2	6.72	0.08	84:1	0.5
W-3	4.20	0.05	84:1	0.5
X-1	10.00	0.10	105:1	0.4
X-2	8.40	0.08	105:1	0.4
X-3	5.25	0.05	105:1	0.4
Y-1	10.00	0.08	126:1	0.35
Y-2	6.30	0.05	126:1	0.35
Z-1	10.00	0.07	147:1	0.3
Z-2	7.35	0.05	147:1	0.3

Tab. 6.7: Übersicht der Prozessparameter für die Proben gemischt im T-Stück

Probe	CPMM-Analog	H ₂ O-Flussrate in ml/min	1B/THF-Flussrate in ml/min	H ₂ O:1B/THF
T-1	U-1	10.00	0.24	42:1
T-2	W-1	10.00	0.12	84:1
T-3	Z-1	10.00	0.07	147:1
T-4	V-2	6.30	0.10	63:1
T-5	Y-2	6.30	0.05	126:1
T-6	W-3	4.20	0.05	84:1
T-7	U-3	2.10	0.05	42:1

6.2.1. Ergebnisse und Diskussion

Anhand der Erfahrungen aus der konventionellen Probenpräparation (vgl. Abs. 2.1.4, 4.1.1) kann, nach der Präparation im Mischsystem (s. Abs. 6.2.3) und Abdampfen des Co-Lösemittels THF, bereits auf Grund rein optischer Kriterien auf einige Eigenschaften der Proben geschlossen werden.

Lösungen, die bei den verwendeten Polymerkonzentrationen unterhalb 1g/l eine starke Trübung aufweisen, sind häufig instabil und enthalten Aggregate unterschiedlicher Größenordnungen. Diese werden häufig so groß, dass sie nach kurzer Zeit ausfallen. Eine moderate Trübung der Lösungen deutet auf Strukturen mit Radien größer 100nm hin, die oft breit verteilt sind. Lösungen mit schwacher Trübung, die häufig opak erscheinen, sind dagegen vielversprechend, da sie optisch den Vesikellösungen mit Partikelgrößen <100nm entsprechen.

In Abbildung 6.22 sind Fotos der Proben nach Präparation im CPMM-Mikromischer gezeigt. Die Proben, die bei einem niedrigen Flussverhältnis H₂O:THF von 42:1 gemischt wurden (Proben U), weisen alle eine moderate Trübung auf. Die unterschiedlichen Flussraten haben keinen Einfluss auf das Erscheinungsbild der Proben. Auch die Proben (II), die zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit bei gleichen Parametern gemischt wurden, unterscheiden sich rein optisch nicht von Ihren Analoga.

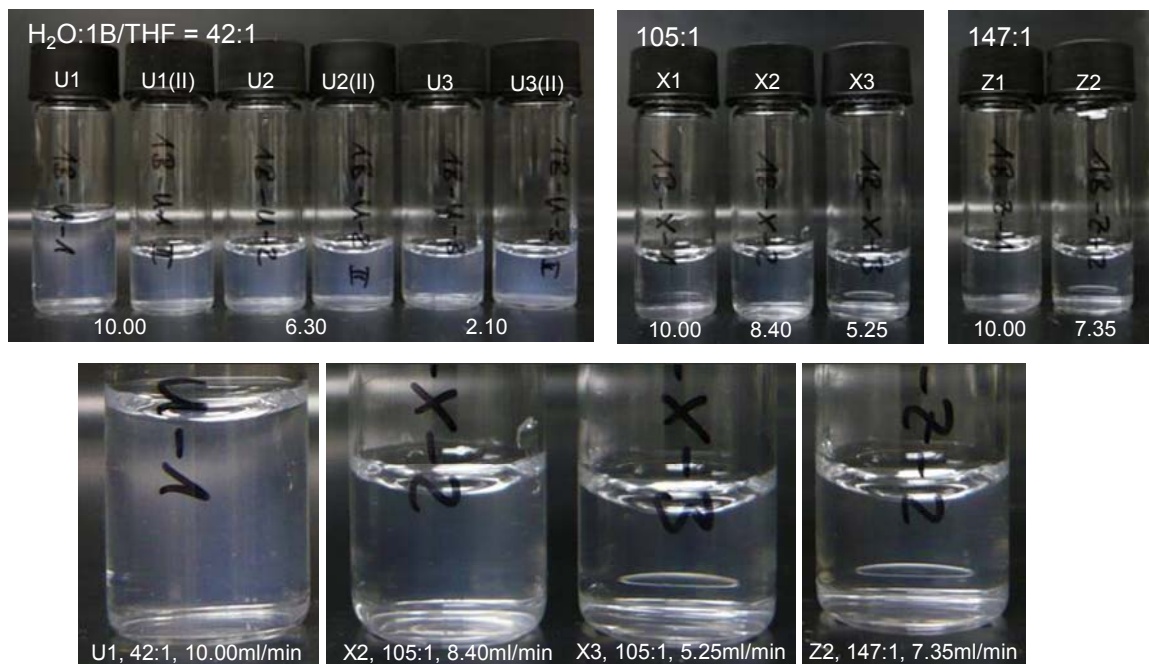


Abb. 6.22: CPMM-Mikromischer-Proben; oben: Proben U (42:1), X (105:1) und Z (147:1), jeweils sortiert nach sinkender H₂O-Flussrate angegeben in ml/min; unten: Vergrößerung U1, X2, X3, Z2

Erfolgt die Mischung bei deutlich höherem Flussverhältnis von 147:1 (Proben Z) weisen die Proben unabhängig von der Flussrate nur einen opaken Schimmer auf und sind deutlich klarer. Bei einem Flussverhältnis von 105:1 ist dieser stufenweise Übergang von leichter

Trübung bei einer H_2O -Flussrate von 8.4ml/min zu opakem Schimmer bei 5.25ml/min zu erkennen (vergrößerte Aufnahmen, Abb. 6.22).

Alle Proben waren über einen Zeitraum von mehr als zwei Monaten stabil und es trat keine sichtbare Veränderung oder Fällung auf.

Die zugehörigen Vergleichsproben, die zur Untersuchung des Einflusses der Kanalgeometrie mit dem T-Stück gemischt wurden, sind in Abbildung 6.23 zu sehen. Proben T1 bis T4 weisen starke Trübung auf, wie sie im Falle der CPMM-Mikromischer-Proben nicht auftrat. Die Strukturen sind vermutlich deutlich größer und teilweise aggregiert. Proben T5 bis T7 sind instabil. Das Polymer ist deutlich sichtbar in Flocken ausgefallen (vergrößerte Aufnahmen, Abb. 6.23). Demnach können durch den Mikromischer stabile Lösungen präpariert werden, wie sie durch eine einfache Kanalgeometrie, wie im Falle des T-Stücks, nicht zugänglich sind.

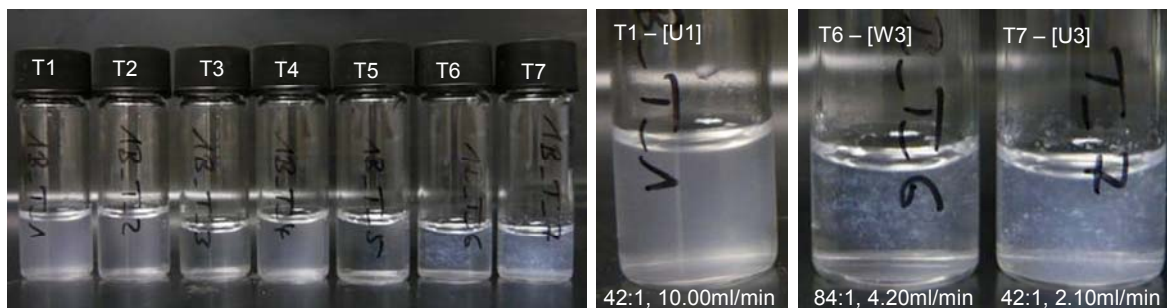


Abb. 6.23: T-Stück-Proben sortiert nach sinkender H_2O -Flussrate; Vergrößerung T1, T6, T7; zugehörige CPMM-Analoga in Klammern

Die Charakterisierung der Proben erfolgte unter anderem durch dynamische Lichtstreuung. Tabelle 6.8 zeigt die Ergebnisse der DLS-Messungen nach Filtration durch 0.45 μ m-Filter.

Die Proben liefern alle Ergebnisse mit Größen im Radienbereich kleiner 100nm. Mit μ_2 -Werten deutlich oberhalb 0.1, sind die Strukturen in ihrer Größe jedoch sehr breit verteilt um den jeweiligen Mittelwert (vgl. Abs. 3.1). Ein kontrollierter Selbstorganisationsprozess kann daher ausgeschlossen werden. Auch Proben, die bei gleichen Prozessparametern gemischt wurden, zeigen starke Unterschiede im Mittelwert. So liefert Probe U1 beispielsweise einen mittleren Radius von $\langle R_h \rangle = 35$ nm, während für U1(II) $\langle R_h \rangle = 47$ nm erhalten wird.

Als Trend lässt sich erkennen, dass die Strukturen im Mittel größer werden, je kleiner die Flussraten aber je höher das Flussverhältnis. Mit steigendem Flussverhältnis werden die erhaltenen Strukturen dabei nicht nur größer sondern auch deutlich breiter verteilt.

Im Vergleich zu den CPMM-Mikromischer-Proben sind die Proben nach Mischung im T-Stück größer und breiter verteilt. Dies geht soweit, dass die Fit-Prozedur auf Grund der schlechten Fit-Güte nur noch Richtwerte liefern kann. Der positive Einfluss der Kanalgeometrie im Mikromischer zeigt sich also auch in den DLS-Ergebnissen. Die angestrebte Kontrolle über den Selbstorganisationsprozess ist aber nicht gegeben.

Tab. 6.8: Übersicht der DLS-Ergebnisse der CPMM-Mikromischer Proben U bis Z sowie der T-Stück-Proben T

Probe	Details	$\langle R_h \rangle$ / nm	μ_2 ($\theta=90^\circ$)
U1	42:1 - 10.00ml/min	35	0.13
U1(II)	42:1 - 10.00ml/min	47	0.13
U2	42:1 - 6.30ml/min	54	0.12
U2(II)	42:1 - 6.30ml/min	45	0.1
U3	42:1 – 2.10ml/min	41	0.13
U3(II)	42:1 – 2.10ml/min	55	0.11
V1	63:1 – 10.00ml/min	51	0.13
V1(II)	63:1 – 10.00ml/min	59	0.09
V2	63:1 – 6.30ml/min	53	0.11
V3	63:1 – 3.15ml/min	53	0.11
W1	84:1 – 10.00ml/min	56	[0.19]
W1(II)	84:1 – 10.00ml/min	57	[0.19]
W2	84:1 – 6.72ml/min	81	[0.18]
W3	84:1 – 4.20ml/min	72	[0.18]
X1	105:1 – 10.00ml/min	65	[0.17]
X2	105:1 – 8.40ml/min	66	[0.19]
X3	105:1 – 5.25ml/min	97	[0.19]
Y2	126:1 – 6.30ml/min	71	[0.18]
Z1	147:1 – 10.00ml/min	77	[0.19]
Z2	147:1 – 7.35ml/min	92	[0.16]
T1	U1 – 42:1 – 10.00ml/min	[170]	[0.28]
T2	W1 – 84:1 – 10.00ml/min	[122]	[0.23]
T3	Z1 – 147:1 – 10.00ml/min	101	[0.18]
T4	V2 – 63:1 – 6.30ml/min	102	[0.16]
T5	Y2 – 126:1 – 6.30ml/min	70	[0.18]
T6	W3 – 84:1 – 4.20ml/min	[113]	[0.16]
T7	U3 – 42:1 – 2.10ml/min	88	[0.16]

Details: Flussverhältnis (H₂O:1B/THF) und H₂O-Flussrate, sowie CPMM-Analog für die T-Stück-Proben; 0.45µm filtriert; Werte in eckigen Klammern sind nur Richtwerte auf Grund der schlechten Fit-Güte; $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Nach strahlungsinduzierter Vernetzung wurden die Proben zusätzlich mittels TEM untersucht um nähere Informationen über die gebildeten Morphologien in Lösung zu erhalten. Einige dieser TEM-Aufnahmen der Mikromischer-Proben sind in den Abbildungen 6.24-6.28 und im Anhang ab Abbildung 7.27 gezeigt.

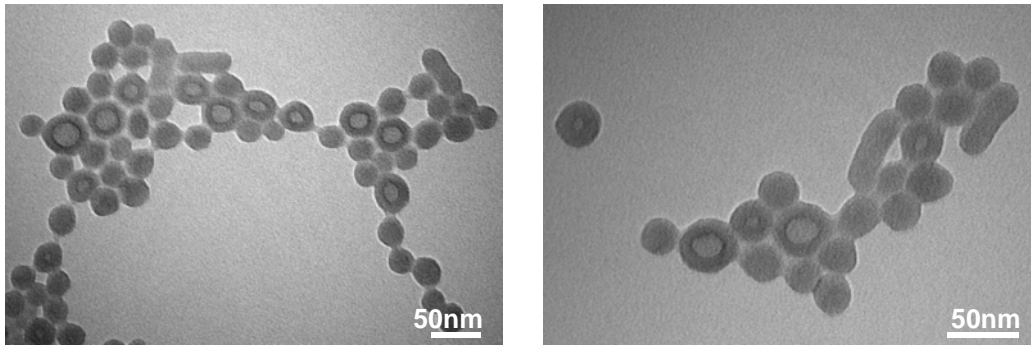


Abb. 6.24: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Probe U1, H₂O-Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Flussrate=0.24ml/min, H₂O:THF=42:1

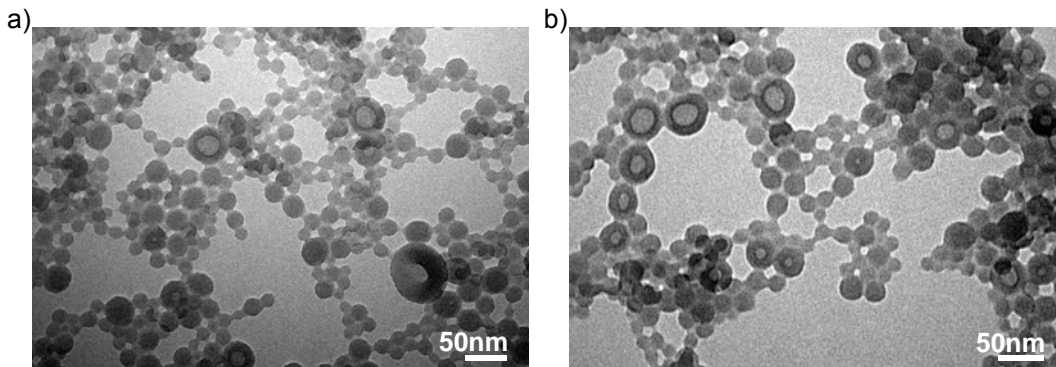


Abb. 6.25: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Proben
 a) U2, H₂O-Flussrate=6.30ml/min, 1B/THF-Rate=0.15ml/min, H₂O:THF=42:1;
 b) U3, H₂O-Flussrate=2.10ml/min, 1B/THF-Rate=0.05ml/min, H₂O:THF=42:1

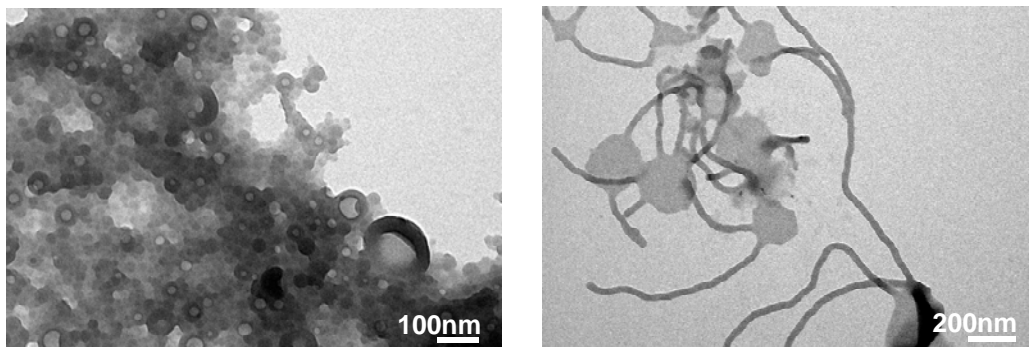


Abb. 6.26: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Probe Y2, H₂O-Flussrate=6.30ml/min, 1B/THF-Flussrate=0.05ml/min, H₂O:THF=126:1

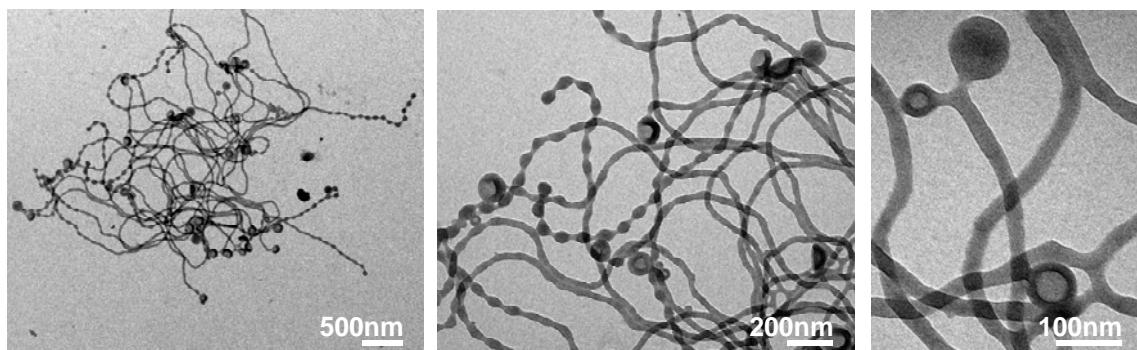


Abb. 6.27: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Probe Z2, H₂O-Flussrate=7.35ml/min, 1B/THF-Flussrate=0.05ml/min, H₂O:THF=147:1

In allen Proben treten mehrere Morphologien nebeneinander auf. Während in klassischen Probenpräparationsmethoden nur Vesikel als stabile Struktur durch Selbstorganisation gebildet wurden (s. Abs. 4.1.1), führen die veränderten Bedingungen im Mikromischer zur Bildung weiterer Morphologien. Neben sphärischen Mizellen mit Durchmessern von 10-15nm wurden auch Zylindermizellen unterschiedlicher Länge geformt.

In Probe U1, gemischt bei hohen Flussraten (H_2O :10.00ml/min, THF:0.24ml/min) und niedrigem Flussverhältnis (H_2O :THF=42:1), wurden hauptsächlich Vesikel geformt. Mini-Vesikel mit Durchmessern zwischen 23-35nm, deren kontrastärmerer Kern nicht aufgelöst werden kann (vgl. Abs. 4.1.1), bilden den Hauptbestandteil der abgebildeten Strukturen (s. Abb. 6.24). Auch Vesikel mit Größen zwischen $d=35\text{nm}$ und $d=70\text{nm}$ liegen in großer Anzahl vor. Neben diesen Vesikeln wurden jedoch auch vereinzelt Zylindermizellen mit $d=15\text{-}20\text{nm}$ und $l=50\text{-}60\text{nm}$ (s. Abb. 6.24) sowie stellenweise sphärische Mizellen mit $d=10\text{-}15\text{nm}$ abgebildet (s. Anhang Abb. 7.27).

Der Wechsel zu niedrigeren Flussraten bei gleichem Flussverhältnis 42:1 (Proben U2 und U3) beeinflusst das Mischungsverhältnis der einzelnen Morphologien. Sphärische Mizellen treten in deutlich größerer Anzahl auf, wohingegen keine Zylindermizellen mehr gefunden werden (s. Abb. 6.25).

Die weitere Variation der Prozessparameter liefert keine verbesserte Strukturkontrolle. Stets liegen Mischungen der sphärischen Mizellen (M), der Mini-Vesikel mit $d=23\text{-}35\text{nm}$ (V1) sowie der größeren Vesikel mit $d=35\text{-}70\text{nm}$ (V2) vor, die sich nur in ihrem Mischungsverhältnis leicht unterscheiden. Die Zigarren-ähnlichen Zylindermizellen wurden nur in den Proben U1 und V1 gefunden (s. Anhang Abb. 7.28a). Eine Übersicht der erhaltenen Struktur-Verhältnisse aus Abschätzung der TEM-Aufnahmen ist für die einzelnen Proben in Tabelle 6.9 gegeben.

Bei niedriger THF-Flussrate (0.05ml/min) und gleichzeitig hohen Flussverhältnissen, wie in Probe Y2 (H_2O :THF=126:1) und Z2 (H_2O :THF=147:1), treten zudem 'Würmer' mit Längen im μm -Bereich auf, wie in Abbildung 6.26 und 6.27 zu sehen. Zylindermizellen sind an ihren Enden auf Grund der starken Krümmungsradien instabil, wodurch das Längenwachstum begünstigt wird und solche 'Würmer' entstehen können (vgl. Abs. 2.1.1). Aus dem gleichen Grund gehen solche 'Würmer' außerdem häufig fließend in Vesikel oder Mizellen über, wie in Abbildung 6.27 zu sehen, oder beginnen sich in sphärische Mizellen zu zerlegen. In Probe Y2 gehen sie fließend in Strukturen mit Durchmessern um 200nm über, bei denen es sich wegen des einheitlichen TEM-Kontrasts nur um planare Scheiben handeln kann (s. Abb. 6.26 (rechts), vgl. Abb. 4.2b). Diese planaren Aggregate sind, wie die Zylindermizellen und 'Würmer', keine thermodynamisch stabile Struktur des Copolymers in Lösung. Vielmehr handelt es sich, hervorgerufen durch den schnellen Mischungsprozess innerhalb des Mikromischers, um kinetisch gefangene Nicht-Gleichgewichtsstrukturen, wie sie durch konventionelle Probenpräparation mit diesem $\text{PB}_{130}\text{-PEO}_{66}$ -Copolymer nicht erhalten werden können. Dies zeigt den hohen Einfluss des Mikromischers auf den Prozess der Selbstorganisation.

Tab. 6.9: Übersicht der CPMM-Ergebnisse aus TEM-Aufnahmen

Probe	Details	viele	mittel	wenige
U1	42:1 - 10.00ml/min	V1	V2	M, Z
U2	42:1 - 6.30ml/min	M	V1, V2	
U3	42:1 - 2.10ml/min	M	V1, V2	
V1	63:1 - 10.00ml/min	V1	M, V2	Z
V2	63:1 - 6.30ml/min		M, V1, V2	
V3	63:1 - 3.15ml/min	M	V1, V2	
W1	84:1 - 10.00ml/min	M, V2	V1	
W2	84:1 - 6.72ml/min		M	V1, V2
W3	84:1 - 4.20ml/min		M, V1, V2	
X1	105:1 - 10.00ml/min		M, V1, V2	
X2	105:1 - 8.40ml/min	V1	M, V2	
X3	105:1 - 5.25ml/min			V1, V2
Y2	126:1 - 6.30ml/min	M	V1, V2, 'Würmer'	
Z1	147:1 - 10.00ml/min	V1	M, V2	
Z2	147:1 - 7.35ml/min	'Würmer'	M, V2	

Details: Flussverhältnis (H₂O:1B/THF) und H₂O-Flussrate;
M=Mizelle (d=10-15nm), V1=Vesikel (d=23-35nm), V2=Vesikel (d=35-70nm),
Z=Zylinder (d=21nm, l=50-70nm), 'Würmer' (d=21nm, l>μm)

Der Trocknungsprozess während der TEM-Präparation führt stets zu nachträglicher Aggregation auf dem TEM-Grid, so dass aus den Aufnahmen nicht geklärt werden kann, inwieweit diese Aggregation bereits in Lösung stattgefunden hat. Jedoch liegen die sphärischen Mizellen häufig so dicht, dass sie kaum als einzelne Strukturen zu unterscheiden sind, wie u.a. in Abbildung 6.26 (links) zu sehen. In Kombination mit den DLS-Ergebnissen (s. Tab. 6.8), die größere und breiter verteilte Mittelwerte liefern als für einzelne Strukturen erwartet, kann daher davon ausgegangen werden, dass die Strukturen bereits in Lösung teilweise aggregiert vorliegen.

Auch die im T-Stück gemischten Proben bestehen aus einer Mischung der Mizellen- und Vesikelstrukturen (s. Abb. 6.28), teilweise treten auch Riesen-Vesikel auf (s. Abb. 6.28a). Zudem ist die Aggregation bei diesen Proben stärker ausgeprägt, wie bereits aus den DLS-Ergebnissen abzuleiten (vgl. Tab. 6.8).

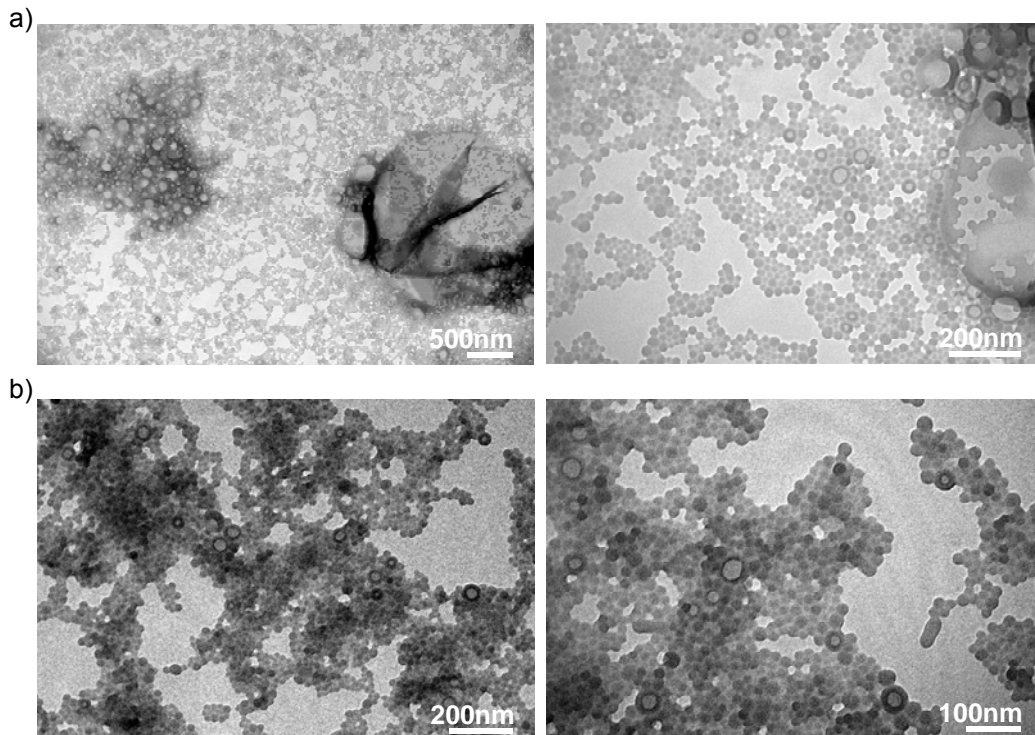


Abb. 6.28: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: T-Stück-Proben

a) T1, H₂O-Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Rate=0.24ml/min, H₂O:THF=42:1

b) T2, H₂O-Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Rate=0.12ml/min, H₂O:THF=84:1

6.2.2. Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Präparation im Mikromischer einen Einfluss auf den Prozess der Selbstorganisation des Copolymers in Lösung hat. Neben den, bei konventioneller Präparation gebildeten Vesikeln, wurden zusätzlich sphärische Mizellen und Zylindermizellen unterschiedlicher Länge erhalten. Das Mischungsverhältnis dieser Strukturen war dabei abhängig von den jeweiligen Prozessparametern.

Die hohen Molekulargewichte der Copolymerblöcke, die gegenseitigen Verwicklungen der langen Polymerketten sowie das Mischen bis zu THF-Anteilen <5Gew.-% sind vermutlich die Ursachen für eine deutlich eingeschränkte Reorganisation. Dadurch entstehen 'kinetisch gefangene' Strukturen, wie die Zylindermizellen und 'Würmer' mit Längen im µm-Bereich. Diese entsprechen nicht der energetisch favorisierten Aggregatstruktur des Systems, wie sie in konventionellen Präparationsmethoden erhalten wird. Die Möglichkeit über eine Steuerung des Mischungsprozesses direkt Einfluss auf den Prozess der Selbstorganisation zu nehmen, ist demnach gegeben. Die weitergehende Strukturkontrolle konnte jedoch in diesem System nicht realisiert werden.

Die vielversprechendsten Ergebnisse wurden bei hohen Flussraten (H₂O: 10.00ml/min, THF: 0.24ml/min) und niedrigem Flussverhältnis (H₂O:THF=42:1, Probe U1) erzielt. Hier bildeten Vesikel den Hauptbestandteil der Lösung. Ob eine weitere Erniedrigung des Flussverhältnisses ausschließlich Vesikelstrukturen liefert, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Auch die Kanalgeometrie hat einen entscheidenden Einfluss auf die Selbstorganisation. Zwar setzten sich die im T-Stück gemischten Proben ebenfalls aus Mizellen und Vesikeln zusammen, diese waren aber auf Grund des unkontrollierteren Mischungsprozesses deutlich stärker aggregiert und die Lösungen teilweise instabil. Der Übergang zu Mikromischern mit Kanalgeometrien, die deutlich feiner sind als die des CPMM-Mikromischers mit Kanaldimensionen von $300\mu\text{m}$, könnte ein weiterer Schritt in Richtung Strukturkontrolle sein.

6.2.3. Experimenteller Teil

Verwendet wurde ein 'split and recombine'-Mikromischer aus Edelstahl, Modell CPMM-VI.2-R300-12-ss-wt, der Firma IMM (Mainz) mit 12 Mischstufen, $300\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$ Mischkanälen und $10\mu\text{l}$ Mischvolumen. Das zusätzlich verwendete T-Stück der Firma Swagelok hatte einen Innendurchmesser von 1.27mm und war mit einer 15cm Metallkanüle (Außendurchmesser $d=1.6\text{mm}$) verbunden. Die Pumpen von Microglas hatten einen gepulsten Fluss mit möglichen Flussraten zwischen 0.01ml/min und 10ml/min in Schritten von 0.01ml/min.

Für alle Lösungen wurde destilliertes Wasser verwendet. Tetrahydrofuran wurde von J.T.Baker in p.a. Qualität bezogen und durch Destillation vom enthaltenen Stabilisator befreit. Die Proben wurden an der Tec de Monterrey in Mexiko präpariert und an der Universität Mainz charakterisiert.

Mischprozess

Eine Stammlösung des Copolymers $\text{PB}_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-COOH}$ in THF mit einer Konzentration von $C_{1B}=42\text{g/l}$ wurde hergestellt und durch einen $0.45\mu\text{m}$ LCR-Filter filtriert.

Über die Lösemittelpumpe wurde zunächst THF durch das Mischsystem gepumpt um Wasserspuren zu entfernen und dann mit der 1B/THF-Stammlösung gespült. Über die Wasserpumpe wurde der Mikromischer (bzw. das T-Stück) mit Wasser nachgespült.

Die Flussraten wurden auf die gewünschten Parameter eingestellt. Während die Wasserpumpe kontinuierlich lief, wurde die 1B/THF-Pumpe kurz ein- und wieder ausgeschaltet (2s), um Pfropfenbildung am Mischereingang zu reduzieren, und nach weiteren 2s laufen gelassen. Ein Vorlauf von $500\mu\text{l}$ wurde verworfen und die Probe anschließend gesammelt. Der Mikromischer (bzw. das T-Stück) wurde mit Wasser nachgespült, die nächsten Parameter eingestellt und wie beschrieben fortgefahren.

Nach Wiegen standen die Proben offen bis das THF abgedampft war. Durch erneutes Wiegen wurde die Polymer-Endkonzentration bestimmt.

7. Anhang

7.1. Zusätzliche Daten und Ergebnisse

Tab. 7.1: Molekulargewichts-Abhängigkeit der Vesikelschalendicke d aus [Discher 2002] (zu Abschnitt 4.1, Polymere Vesikel)

Copolymer	M_n / kg/mol	f_{PEO}	M_h / kg/mol	d / nm
PB ₄₆ -PEO ₂₆	3.6	0.28	2.6	9.6
PB ₅₅ -PEO ₅₀	5.2	0.37	3.3	10.6
PB ₁₂₅ -PEO ₈₀	10.4	0.29	7.4	14.8
PB ₂₅₀ -PEO ₁₅₀	20.0	0.28	14.4	21.0
PB ₁₃₀ -PEO ₆₆	11.0	0.29	7.8	15.2 ^(#)

Hydrophiler Anteil $f_{PEO} = m(PEO)/m(PB-PEO)$; Molekulargewicht des hydrophoben PB-Blocks $M_h = M_n(1 - f_{PEO})$; ^(#) berechnet nach $d \sim (M_h)^a$ mit $a = 0.5$ [Discher 2002]

Tab. 7.2: Übersicht der FCS-Ergebnisse für Messreihe I (0.45 μ m-filtriert) (zu Abschnitt 4.4, Nachweis durch Ensemble-Messungen)

Probe	τ_D / μ s	$\langle D \rangle_{FCS}$ / cm^2/s	$\langle R_h \rangle_{FCS}$ / nm
Fluospheres	2368	---	---
Rhodamin 6G	23	$2.8 \cdot 10^{-8}$ ^(#)	0.8 ^(#)
NR/Vesikel (PVN13)	1626	$5.82 \cdot 10^{-8}$	39
QD2/Vesikel (PVD6)	2750	$3.68 \cdot 10^{-8}$	62
QD2/Vesikel (PVD22)	4051	$2.28 \cdot 10^{-8}$	100

Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 543$ nm, LP-Filter 560nm, gemessen mit Abschwächer, ^(#) [Magde 1974]

Tab. 7.3: Übersicht der FCS-Ergebnisse für Messreihe II (0.45 μ m-filtriert) (zu Abschnitt 4.4, Nachweis durch Ensemble-Messungen)

Probe	τ_D / μ s	$\langle D \rangle_{FCS}$ / cm^2/s	$\langle R_h \rangle_{FCS}$ / nm
Fluospheres	2021	---	---
Rhodamin 6G ^(*)	24.5	$2.8 \cdot 10^{-8}$ ^(#)	0.8 ^(#)
NR/Vesikel (PVN20) ^(*)	1277	$5.68 \cdot 10^{-8}$ ^(**)	40 ^(**)
P/Vesikel (PVB1)	2515	$3.46 \cdot 10^{-8}$	65

Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 488$ nm, LP-Filter 505nm, gemessen mit Abschwächer, ^(#) [Magde 1974]
^(*) gemessen ohne Abschwächer, ^(**) Ergebnis relativ zur Rh6G-Kalibrierung

Tab. 7.4: Übersicht der DLS-Ergebnisse (0.45µm-filtriert)
(zu Abschnitt 4.4, Nachweis durch Ensemble-Messungen)

Probe	$\langle D \rangle_{\text{DLS}} / \text{cm}^2/\text{s}$	$\langle R_h \rangle_{\text{DLS}} / \text{nm}$	μ_2 bei 90°
Fluospheres	$3.93 \cdot 10^{-8}$	54	<0.05
NR/Vesikel (PVN13)	$5.01 \cdot 10^{-8}$	43	0.08
NR/Vesikel (PVN20)	$7.98 \cdot 10^{-8}$	27	0.06
P/Vesikel (PVB1)	$6.04 \cdot 10^{-8}$	36	0.08
QD2/Vesikel (PVD6)	$3.18 \cdot 10^{-8}$	67	0.18
QD2/Vesikel (PVD22)	$2.15 \cdot 10^{-8}$	99	0.12

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

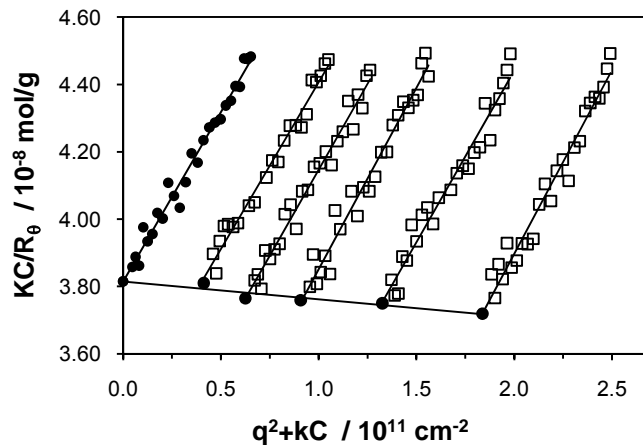


Abb. 7.1: Zimm-Plot einer Vesikellösung (PV51) mit $\langle R_g \rangle = 28 \text{ nm}$ und $M_w = 2.6 \cdot 10^7 \text{ g/mol}$
(zu Abschnitt 4.1.2, Aggregationszahl und Molekulargewicht)

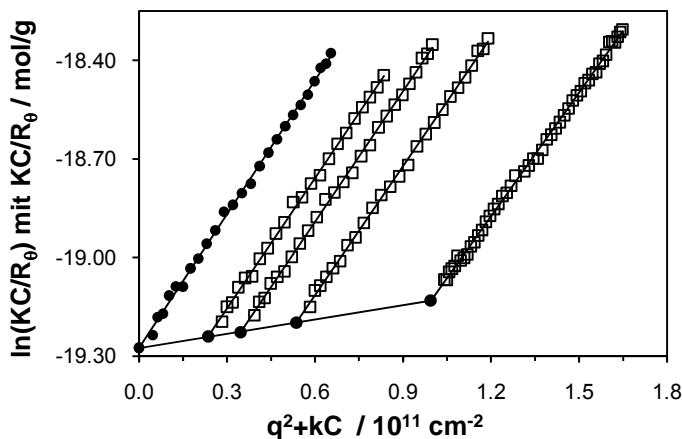


Abb. 7.2: Guinier-Plot einer Vesikellösung (PV2) mit $\langle R_g \rangle = 64 \text{ nm}$ und $M_w = 2.4 \cdot 10^8 \text{ g/mol}$
(zu Abschnitt 4.1.2, Aggregationszahl und Molekulargewicht)

In diesem Größenbereich ist $qR_g \ll 1$ als Voraussetzung für die Auswertung nach Zimm nicht mehr gegeben. Der Einfluss des Formfaktors $P(q)$ hat eine Aufwärtsbiegung im Zimm-Plot zur Folge.

Nach Guinier kann der Formfaktor mit $P(q) = \exp(1/3 \cdot q^2 R_g^2)$ angenähert werden und für $C \rightarrow 0$ erhält man als Auftragung $\ln(KC/R_\theta) = 1/3 \cdot R_g^2 q^2 - \ln M_w$ [Rheingans 1999, Schärtl].

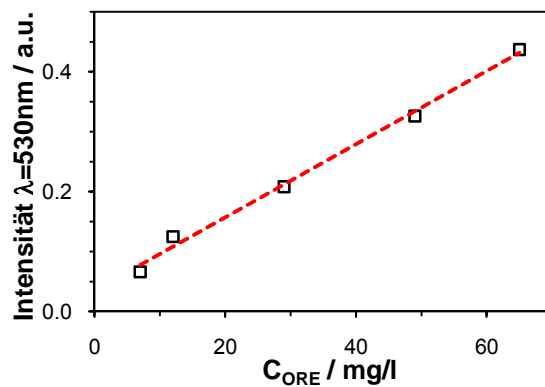


Abb. 7.3: Absorptionsintensität bei $\lambda=530\text{nm}$ gegen die angebotene ORE-Konzentration (zu Abschnitt 4.2.1, Beladung durch Co-Lösemittel - Oil Red EGN)

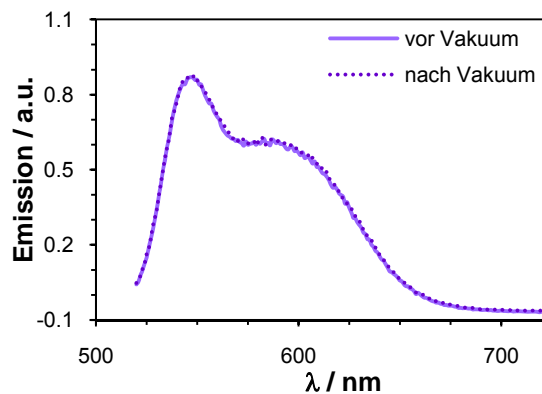


Abb. 7.4: Emissionsspektren einer NR-beladenen Vesikellösung via Co-Lösemittel vor und nach Vakuumbehandlung (zu Abschnitt 4.2.1, Beladung durch Co-Lösemittel - Nilrot)

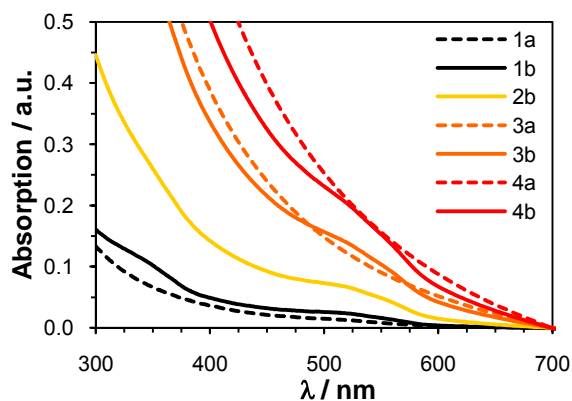


Abb. 7.5: Absorptionsspektren (verdünnt 1:10):
 (1a-4a) unbeladene Vesikellösungen nach steigender Polymerkonzentration $C_{1B}=1/2.7/5.3/7.4\text{g/l}$ (gepunktet);
 (1b-4b) nach 73 Tagen fest/flüssig Phasentransfer mit ORE, (Linien);
 (zu Abschnitt 4.2.3, Beladung durch Phasentransfer – fest/flüssig)

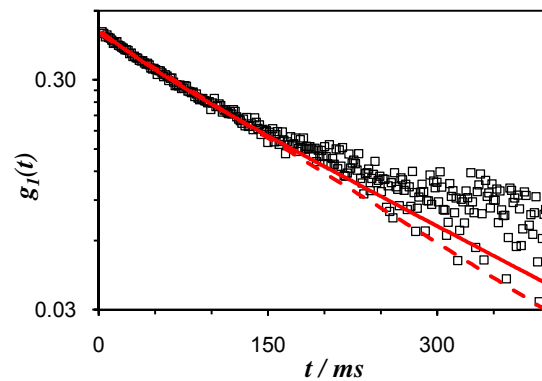


Abb. 7.6: Quantum Dots QD1 in THF: DLS-Korrelationsfunktion $g_I(t)$ (log/lin) mit zugehörigem Fit (in rot) bei $\theta=30^\circ$; biexponentieller Fit $\langle R_{h,app} \rangle = 3.3 \text{ nm}$ (durchgezogene Linie), monoexponentieller Fit $R_{h,app} = 2.3 \text{ nm}$ (gestrichelte Linie) (zu Abschnitt 4.3.1, Beladung mit QD1 $\langle d \rangle = 2.5 \text{ nm}$)

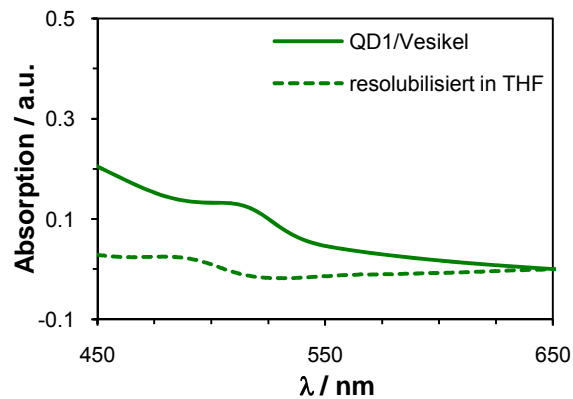


Abb. 7.7: Absorptionsspektren einer QD1-beladenen Vesikellösung vor und nach Trocknung und Resolubilisierung in THF (zu Abschnitt 4.3.1, Beladung mit QD1 $\langle d \rangle = 2.5 \text{ nm}$)

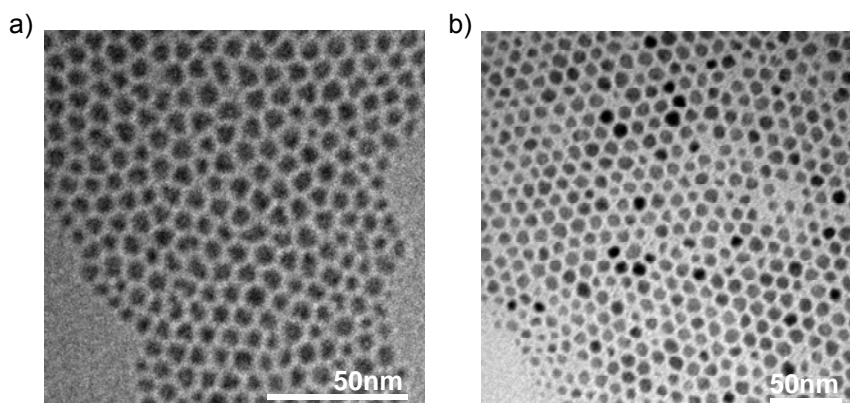


Abb. 7.8: a) TEM-Aufnahme zur Bestimmung der QD2-Größe (zu Abschnitt 4.3.2, Beladung mit QD2 $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$)
b) TEM-Aufnahme zur Bestimmung der QD3-Größe (zu Abschnitt 4.3.3, Beladung mit QD3 $\langle d \rangle = 7.6 \text{ nm}$)

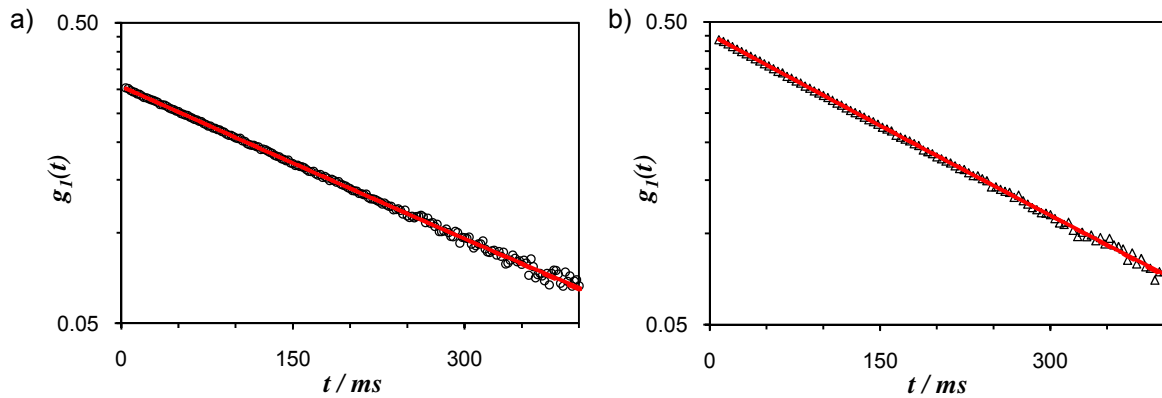


Abb. 7.9: DLS-Korrelationsfunktion $g_I(t)$ (log/lin) mit zugehörigem Fit (in rot) bei $\theta=30^\circ$:
 a) Quantum Dots QD2 in CHCl_3 , biexponentieller Fit $\langle R_{h,app} \rangle = 5.3 \text{ nm}$
 (zu Abschnitt 4.3.2, Beladung mit QD2 $\langle d \rangle = 5.7 \text{ nm}$)
 b) Quantum Dots QD3 in Hexan, biexponentieller Fit $\langle R_{h,app} \rangle = 7.0 \text{ nm}$
 (zu Abschnitt 4.3.3, Beladung mit QD3 $\langle d \rangle = 7.6 \text{ nm}$)

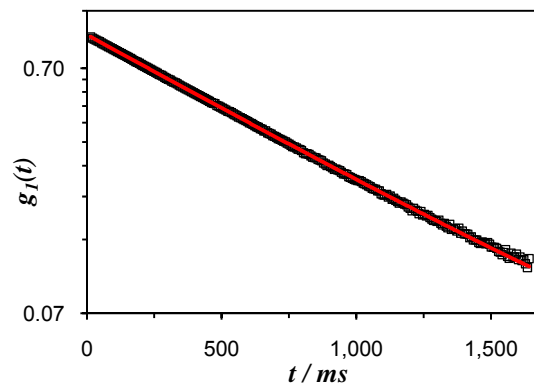


Abb. 7.10: Fluospheres DLS-Korrelationsfunktion $g_I(t)$ (log/lin) bei $\theta=90^\circ$,
 mit biexponentiellem Fit (in rot) $\langle R_{h,app} \rangle = 54 \text{ nm}$
 (zu Abschnitt 4.4, Nachweis durch Ensemble-Messungen)

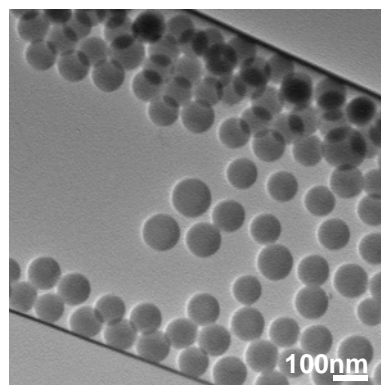


Abb. 7.11: TEM-Aufnahme der Fluospheres zur FCS-Kalibrierung
 (zu Abschnitt 4.4, Nachweis durch Ensemble-Messungen)

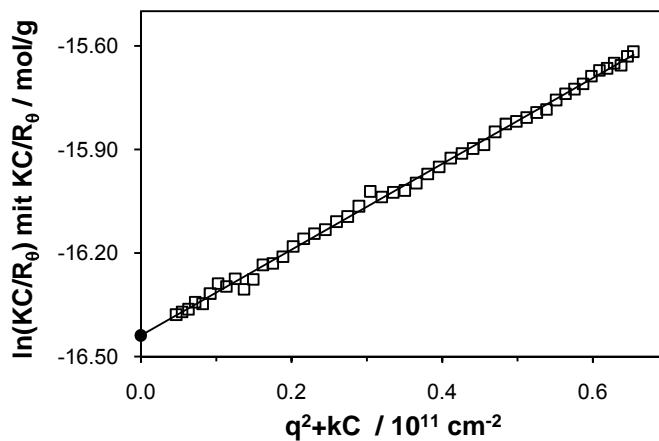


Abb. 7.12: Guinier-Plot einer PhB-beladenen Vesikellösung (PVPh1) mit $\langle R_g \rangle = 61 \text{ nm}$ (zu Abschnitt 4.5.1, Hydrophile Beladung – Co-Lösemittel)

In diesem Größenbereich ist $qR_g \ll 1$ als Voraussetzung für die Auswertung nach Zimm nicht mehr gegeben. Der Einfluss des Formfaktors $P(q)$ hat eine Aufwärtsbiegung im Zimm-Plot zur Folge.

Nach Guinier kann der Formfaktor mit $P(q) = \exp(1/3 * q^2 R_g^2)$ angenähert werden und für $C \rightarrow 0$ erhält man als Auftragung $\ln(KC/R_\theta) = 1/3 * R_g^2 q^2 - \ln M_w$ [Rheingans 1999, Schärtl].

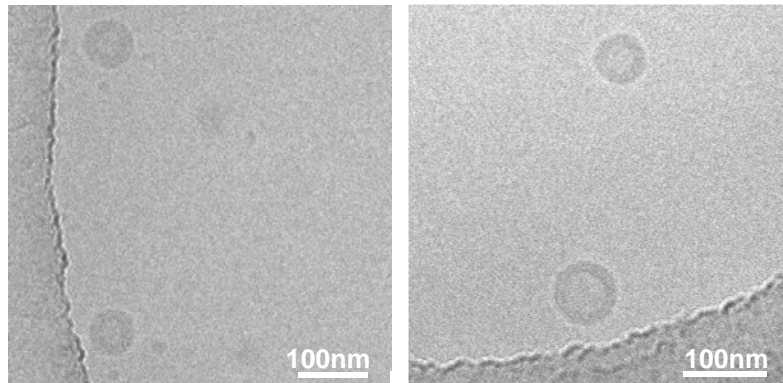


Abb. 7.13: CryoTEM-Aufnahmen einer Vesikellösung präpariert via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung und $C_{1B}=1\text{g/l}$ (zu Abschnitt 4.1.1, Polymere Vesikel – Co-Lösemittelmethode)

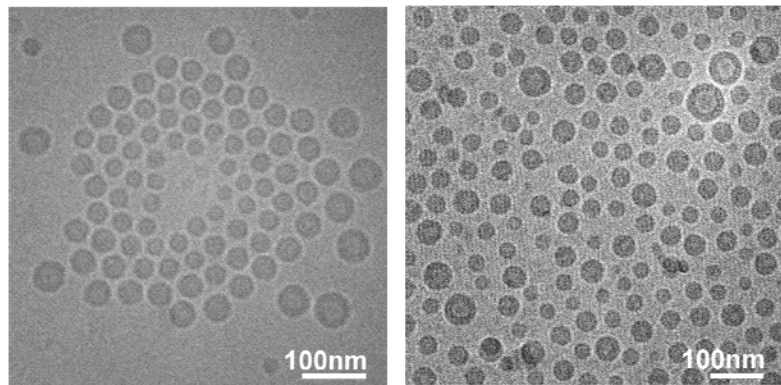


Abb. 7.14: CryoTEM-Aufnahmen einer Vesikellösung präpariert via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung und $C_{1B}=3.3\text{g/l}$ (zu Abschnitt 4.1.1, Polymere Vesikel – Co-Lösemittelmethode)

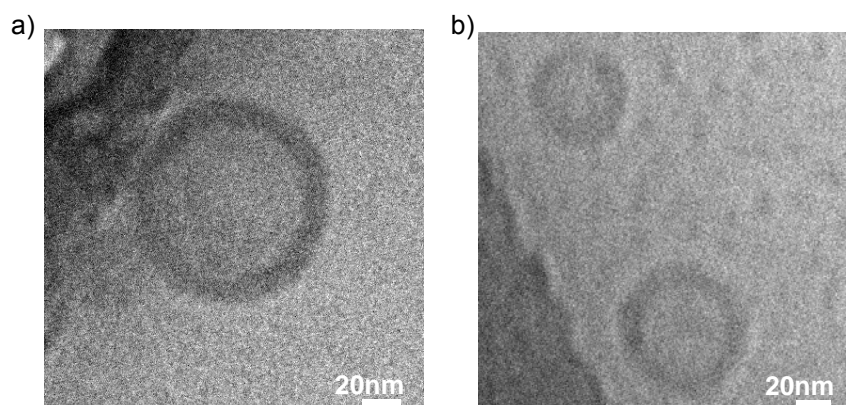


Abb. 7.15: CryoTEM-Aufnahmen einer Vesikellösung präpariert via Co-Lösemittel
a) unvernetzt; b) nach strahlungsinduzierter Vernetzung (zu Abschnitt 4.1.3, Polymere Vesikel – Vesikelvernetzung)

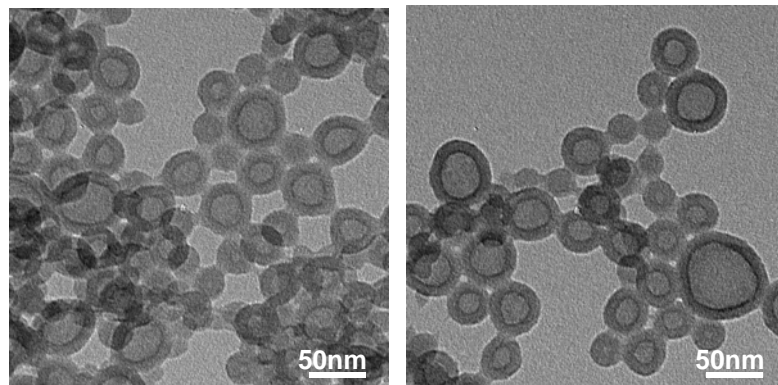


Abb. 7.16: TEM-Aufnahmen einer Vesikellösung präpariert via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung und $C_{1B}=1\text{g/l}$ (nach Vernetzung) (zu Abschnitt 4.1.3, Polymere Vesikel – Vesikelvernetzung)

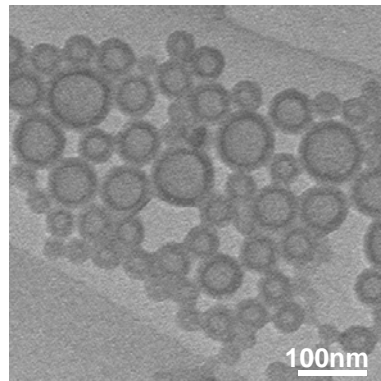


Abb. 7.17: TEM-Aufnahme einer Vesikellösung präpariert via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung und $C_{1B}=1\text{g/l}$ (nach Vernetzung) (zu Abschnitt 4.1.3, Polymere Vesikel – Vesikelvernetzung)

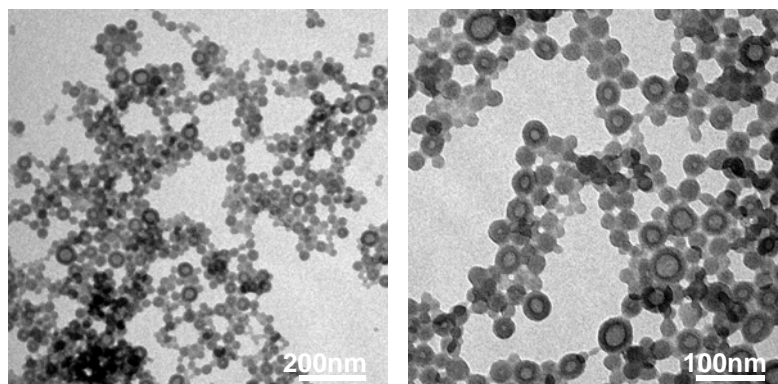


Abb. 7.18: TEM-Aufnahmen einer ORE-beladenen Vesikellösung $C_{1B}=1\text{g/l}$, $C_{\text{ORE}}=5\text{mg/l}$ via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung (nach Vernetzung) (zu Abschnitt 4.2.1, Hydrophobe Beladung – Co-Lösemittel)

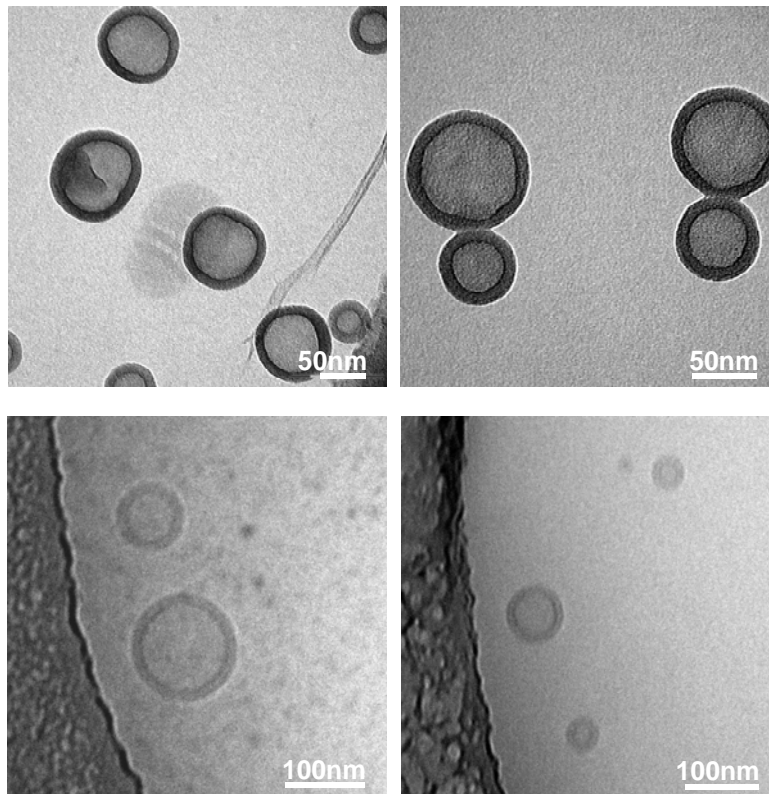


Abb. 7.19: CryoTEM-Aufnahmen einer NR-beladenen Vesikellösung $C_{1B}=1\text{g/l}$, $C_{NR}(\text{angeboten})=52\text{mg/l}$ via Co-Lösemittel bei 5.0ml/h Wasserzudosierung, $5\mu\text{m}$ -filtriert; separate cryoTEM-Messungen I (oben) und II (unten) (zu Abschnitt 4.2.1, Hydrophobe Beladung – Co-Lösemittel)

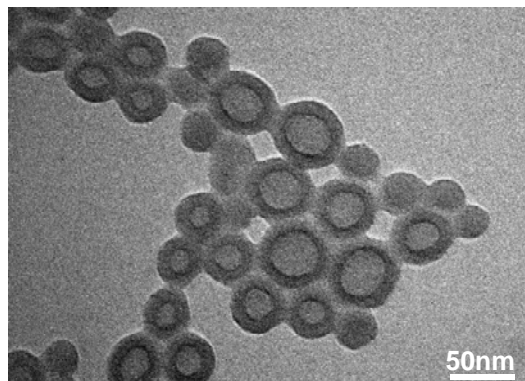


Abb. 7.20: TEM-Aufnahme einer P-beladenen Vesikellösung $C_{1B}=1\text{g/l}$, $C_P=20\text{mg/l}$ via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung (nach Vernetzung) (zu Abschnitt 4.2.1, Hydrophobe Beladung – Co-Lösemittel)

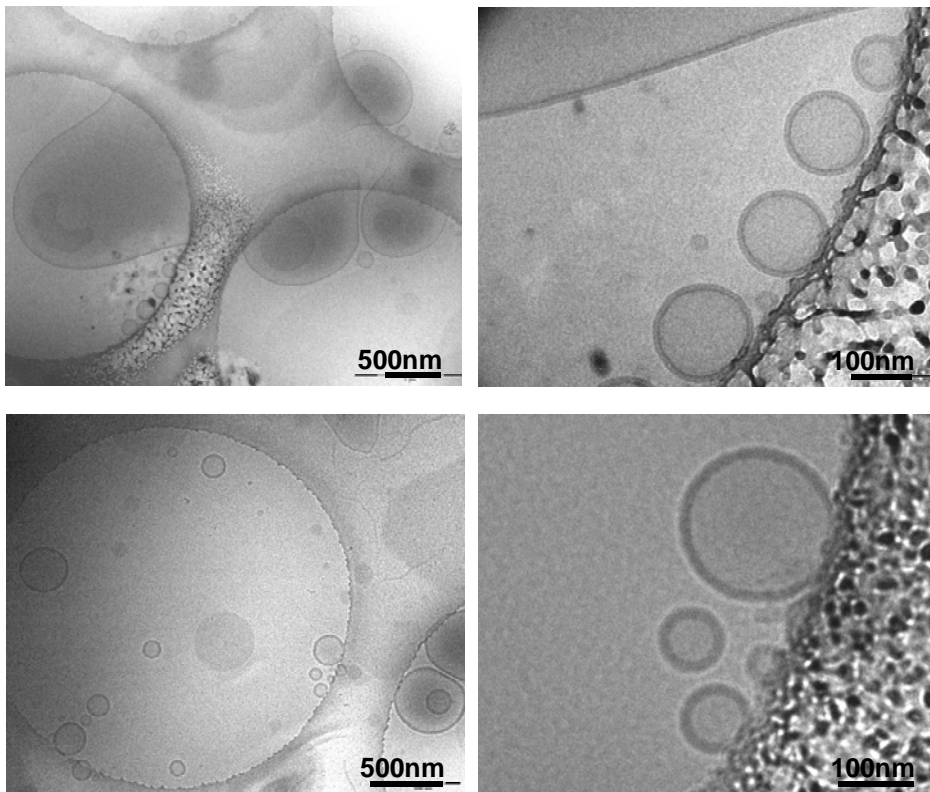


Abb. 7.21: CryoTEM-Aufnahmen einer NR-beladenen Vesikellösung $C_{1B}=1\text{g/l}$, $C_{NR}(\text{angeboten})=52\text{mg/l}$ via Filmrehydrierung (zu Abschnitt 4.2.2, Hydrophobe Beladung – Filmrehydrierung)

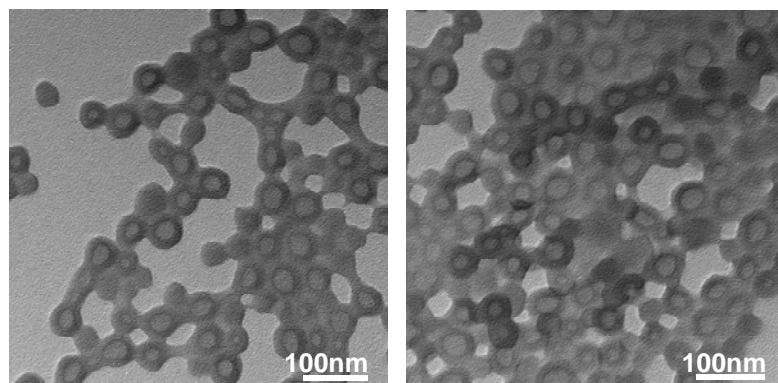


Abb. 7.22: TEM-Aufnahmen einer OBN-beladenen Vesikellösung $C_{1B}=1\text{g/l}$ via flüssig/flüssig Phasentransfer (nach Vernetzung) (zu Abschnitt 4.2.3, Hydrophobe Beladung - Phasentransfer)

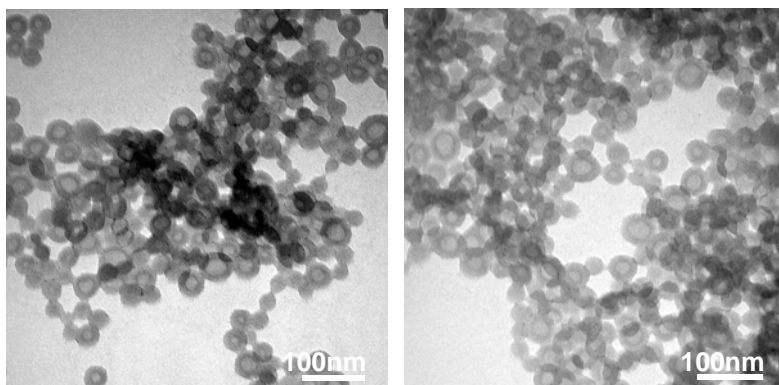


Abb. 7.23: TEM-Aufnahmen einer ORE-beladenen Vesikellösung $C_{1B}=3.3\text{g/l}$ via flüssig/flüssig Phasentransfer (nach Vernetzung)
(zu Abschnitt 4.2.3, Hydrophobe Beladung - Phasentransfer)

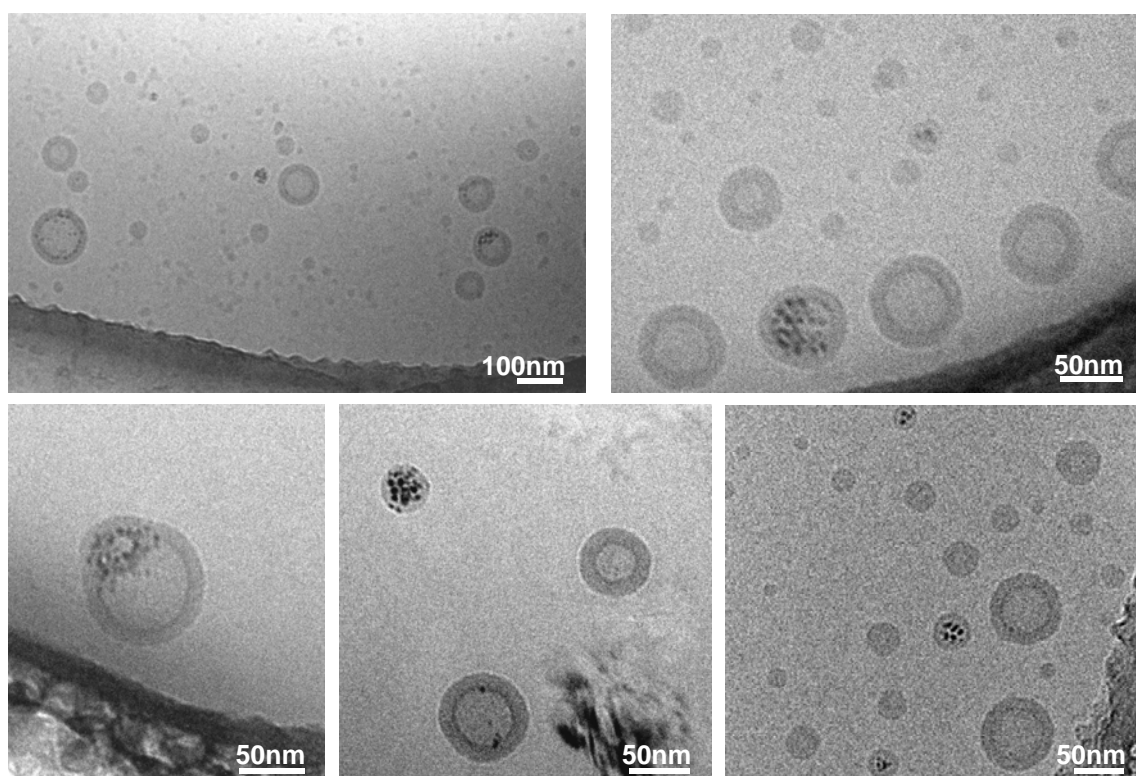


Abb. 7.24: CryoTEM-Aufnahmen einer QD2-beladenen Vesikellösung via Filmrehydrierung
(zu Abschnitt 4.3.2, Hydrophobe Beladung – QD2 $\langle d \rangle = 5.7\text{nm}$)

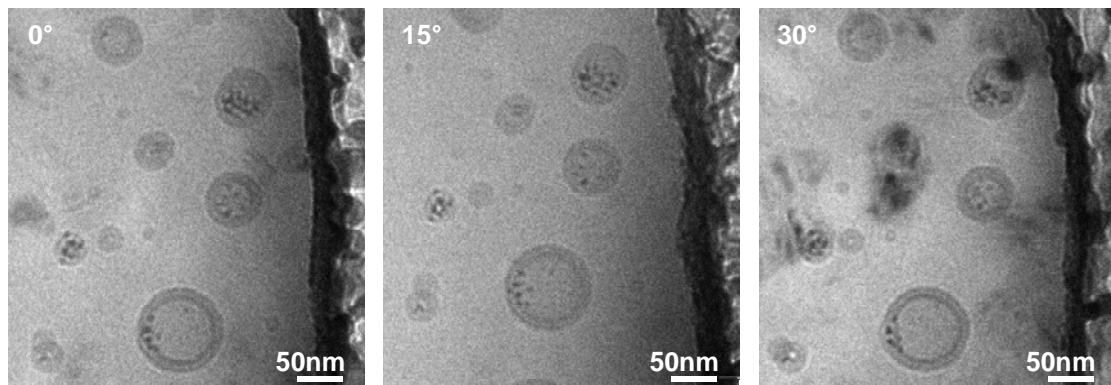


Abb. 7.25: Kippserie im cryoTEM für eine QD2-beladene Vesikellösung via Filmrehydrierung (zu Abschnitt 4.3.2, Hydrophobe Beladung – QD2 $\langle d \rangle = 5.7\text{nm}$)

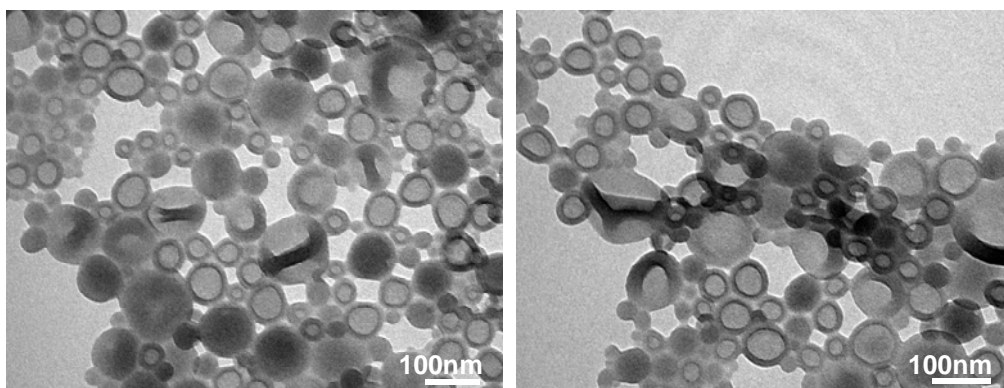


Abb. 7.26: TEM-Aufnahmen einer PhB-beladenen Vesikellösung $C_{1B} = 1\text{g/l}$, $C_{PhB} = 0.1\text{g/l}$ via Co-Lösemittel bei 9.9ml/h Wasserzudosierung (nach Vernetzung) (zu Abschnitt 4.5, Hydrophile Beladung – Co-Lösemittel)

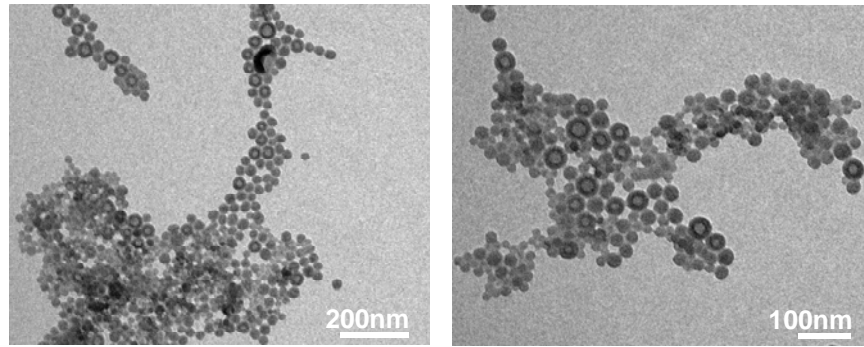


Abb. 7.27: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Probe U1, H₂O-Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Flussrate=0.24ml/min, H₂O:THF=42:1 (zu Abschnitt 6.2, Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer)

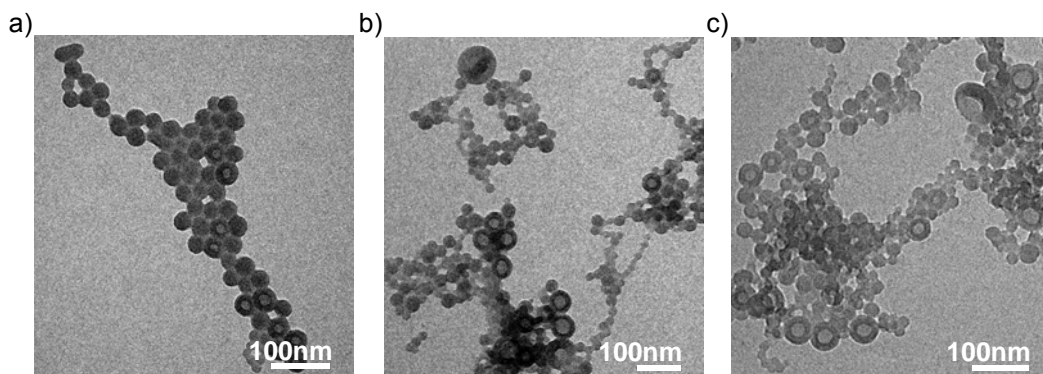


Abb. 7.28: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Proben
 a) V1, H₂O-Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Rate=0.16ml/min, H₂O:THF=63:1
 b) V2, H₂O-Flussrate=6.30ml/min, 1B/THF-Rate=0.10ml/min, H₂O:THF=63:1
 c) V3, H₂O-Flussrate=3.15ml/min, 1B/THF-Rate=0.05ml/min, H₂O:THF=63:1
 (zu Abschnitt 6.2, Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer)

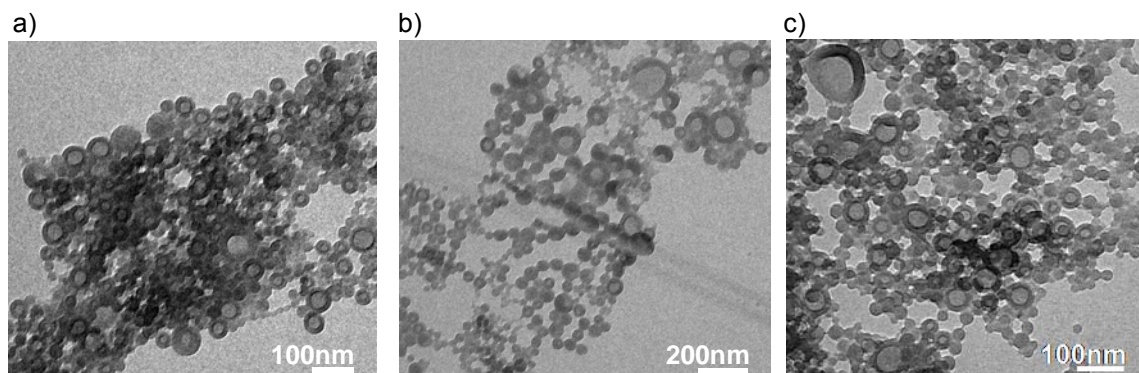


Abb. 7.29: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Proben
 a) W1, H₂O-Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Rate=0.12ml/min, H₂O:THF=84:1
 b) W2, H₂O-Flussrate=6.72ml/min, 1B/THF-Rate=0.08ml/min, H₂O:THF=84:1
 c) W3, H₂O-Flussrate=4.20ml/min, 1B/THF-Rate=0.05ml/min, H₂O:THF=84:1
 (zu Abschnitt 6.2, Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer)

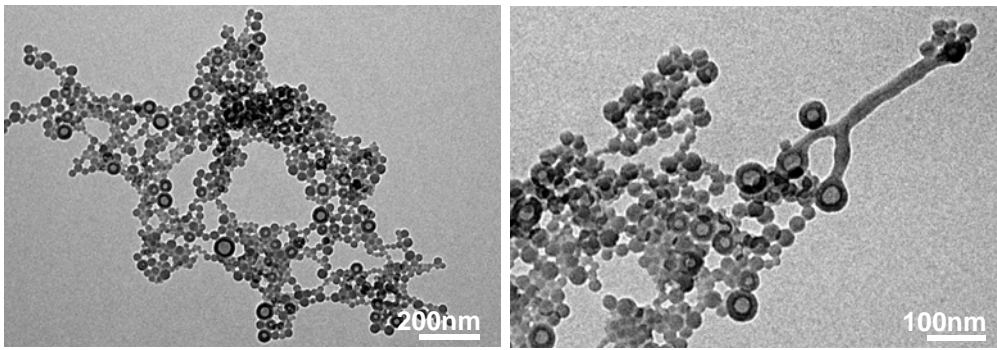


Abb. 7.30: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Probe X1, H_2O -Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Rate=0.10ml/min, H_2O :THF=105:1 (zu Abschnitt 6.2, Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer)

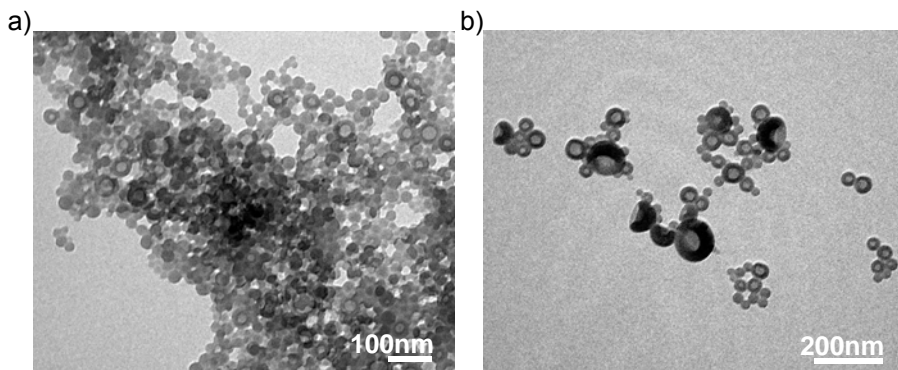


Abb. 7.31: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Proben
 a) X2, H_2O -Flussrate=8.40ml/min, 1B/THF-Rate=0.08ml/min, H_2O :THF=105:1
 b) X3, H_2O -Flussrate=5.25ml/min, 1B/THF-Rate=0.05ml/min, H_2O :THF=105:1
 (zu Abschnitt 6.2, Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer)

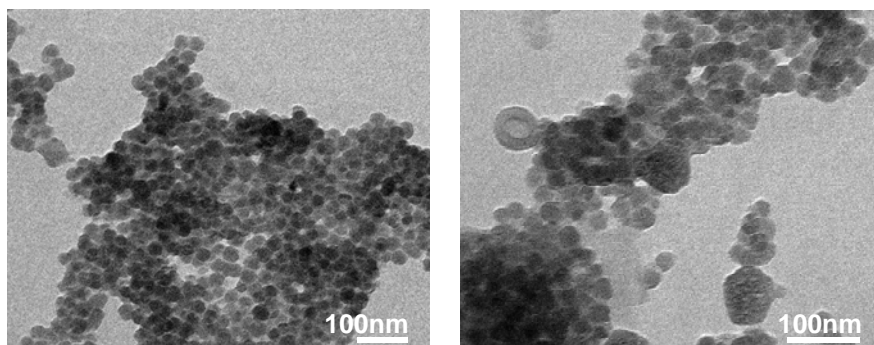


Abb. 7.32: TEM-Aufnahmen nach Vernetzung: CPMM-Mikromischer-Probe Z1, H_2O -Flussrate=10.00ml/min, 1B/THF-Rate=0.07ml/min, H_2O :THF=147:1 (zu Abschnitt 6.2, Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer)

7.2. Abkürzungsverzeichnis

1B	Copolymer PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ -COOH
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AFM	Rasterkraftmikroskopie
C _x	Konzentration x
CD	Zirkulardichroismus
CdSe	Cadmiumselenid
CdS	Cadmiumsulfid
Chl-a	Chlorophyll a
Chl-b	Chlorophyll b
CPMM	'split and recombine'-Mikromischer
CryoTEM	Cryogene Transmissionselektronenmikroskopie
d	Durchmesser
D	Diffusionskoeffizient
DEG	Diethylenglykol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
LHCII	Lichtsammelkomplex des Photosystems II
l	Länge
LM	Laurylmaltosid
LS	Lichtstreuung
M _n	Zahlenmittel der Molmasse
M _w	Gewichtsmittel der Molmasse
NR	Nilrot
ORE	Oil Red EGN
OBN	Oil Blue N
P	Perylen-Derivat: N,N'-bis(1-hexylheptyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylbisimid
PB	Polybutadien
PEO	Polyethylenoxid
QD	Quantum Dot, Halbleiter-Nanokristall
R _g	Trägheitsradius
R _h	Hydrodynamischer Radius
SLS	Statische Lichtstreuung
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
TX	TritonX100
ZnS	Zinksulfid
Gew.-%	Gewichtsprozent
Vol.-%	Volumenprozent

7.3. Ausführliches Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung der Arbeit	2
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Polymere Vesikel.....	3
2.1.1. Prinzip der Selbstorganisation	3
2.1.2. Polymere Selbstorganisation	5
2.1.3. Das Blockcopolymer Polybutadien-b-Polyethylenoxid (PB-b-PEO).....	6
2.1.4. Vesikelpräparation	8
2.1.5. Vesikelvernetzung	10
2.2. Hydrophobe Beladung der Vesikelschale	10
2.2.1. Hydrophobe Farbstoffe	10
2.2.2. Quantum Dots.....	11
2.2.3. Präparation hydrophob beladener Vesikel.....	13
2.3. Hydrophile Beladung des Vesikelkerns.....	13
2.4. Mögliche Anwendungen	15
3. Charakterisierungsmethoden	17
3.1. Lichtstreuung.....	17
3.2. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	22
3.3. Transmissionselektronenmikroskopie	24
3.4. Weitere Methoden	26
3.4.1. Absorptionsspektroskopie.....	26
3.4.2. Fluoreszenzspektroskopie	27
3.4.3. Fluoreszenzmikroskopie	28
4. Ergebnisse und Diskussion	29
4.1. Polymere Vesikel.....	29
4.1.1. Vesikelpräparation	30
4.1.2. Aggregationszahl und Molekulargewicht	32
4.1.3. Vesikelvernetzung	34

4.2. Hydrophobe Beladung mit Farbstoffen	36
4.2.1. Beladung durch Co-Lösemittel	36
Oil Red EGN	36
Nilrot.....	38
Perylen-Derivat	44
4.2.2 Beladung durch Filmrehydrierung	46
4.2.3. Beladung durch Phasentransfer	48
Flüssig/flüssig Phasentransfer	48
Fest/flüssig Phasentransfer	50
4.3. Hydrophobe Beladung mit Quantum Dots	52
4.3.1. Quantum Dots mit $\langle d \rangle = 2.5\text{nm}$	52
4.3.2. Quantum Dots mit $\langle d \rangle = 5.7\text{nm}$	54
4.3.3. Quantum Dots mit $\langle d \rangle = 7.6\text{nm}$	57
4.4. Nachweis durch Ensemble-Messungen	60
4.4.1. Farbstoff-beladene Vesikel.....	62
4.4.2. Quantum Dot-beladene Vesikel	64
4.5. Hydrophile Beladung mit Farbstoffen	66
4.5.1. Präparation durch Co-Lösemittel.....	67
Nachweis durch Ensemble-Messungen.....	69
Langzeitstabilität	71
4.5.2. Präparation durch Filmrehydrierung.....	72
5. Experimenteller Teil	73
5.1. Vesikelpräparation	73
Co-Lösemittel.....	73
Filmrehydrierung	73
Vesikelvernetzung.....	73
5.2. Hydrophobe Beladung der Vesikelschale.....	74
Beladung durch Co-Lösemittel.....	74
Beladung durch Filmrehydrierung	74
Beladung durch Phasentransfer	75
5.3. Hydrophile Beladung des Vesikelkerns	75
Co-Lösemittel.....	75
Filmrehydrierung	76
5.4. Charakterisierung	76

6. Kooperationsprojekte	79
6.1. Intermembran-Protein-Komplex LHCII	79
Der Lichtsammelkomplex (LHC) II.....	79
6.1.1. Ergebnisse und Diskussion	81
Ergebnisse aus Emissionsspektren.....	81
Ergebnisse aus Absorptionsspektren	82
Ergebnisse aus CD-Spektren	83
Thermolysin-‘Verdau‘.....	86
Ergebnisse dynamischer Lichtstreuung.....	87
AFM-Ergebnisse.....	88
Fluoreszenzmikroskopie.....	90
Verwendung von Laurylmaltosid	91
Langzeitstabilität der Einlagerung	94
Einfluss der Vesikel auf die Insertion.....	95
6.1.2. Zusammenfassung und Ausblick.....	96
6.1.3. Experimenteller Teil	97
6.2. Morphologie-Kontrolle durch Mikromischer	99
Mikromischer	99
6.2.1. Ergebnisse und Diskussion	101
6.2.2. Zusammenfassung und Ausblick.....	107
6.2.3. Experimenteller Teil	108
7. Anhang	109
7.1. Zusätzliche Daten und Ergebnisse.....	109
7.2. Abkürzungsverzeichnis	123
7.3. Ausführliches Inhaltsverzeichnis	124
Literaturverzeichnis	132

Veröffentlichungen

W. Mueller, K. Koynov, K. Fischer, S. Hartmann, S. Pierrat, Th. Basché, M. Maskos,
Hydrophobic Shell Loading of PB-b-PEO Vesicles

Macromolecules **2009**, 42, 357-361

W. Müller, M. Maskos, D. Metzke, P. Löb,

Synthesis of Block Copolymer Vesicles in a Micromixer

Proceedings of the European Conference on Microfluidics **2008**, 185

W. Müller, M. Maskos, D. Metzke, P. Löb,

Synthesis of Block Copolymer Vesicles in a Micromixer

La Houille Blanche – International Water Journal **2009**, accepted

C. Scherer, S. Noskov, S. Utech, C. Bantz, W. Mueller, K. Krohne, M. Maskos,

Characterization of Polymer Nanoparticles by Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation

Journal of Nanoscience and Nanotechnology **2009**, accepted

ein Herzliches Dankeschön

allen mithelfenden Händen,
allen mitdenkenden Köpfen
und allen geduldigen Ohren...

Literaturverzeichnis

Veröffentlichungen (nach Autor und Jahr)

- Alivisatos A.P., *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100, 13226
- Alivisatos A.P., et al., *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 7019
- Antonietti M., Förster S., *Advanced Materials* **2003**, 15, 1323
- Basché Th., Koberling F., Mews A., *Advanced Materials* **2001**, 13, 672
- Bates F.S., Won Y.Y., Davis H.T., *Science* **1999**, 283, 960
- Bates F.S., Jain S., *Science* **2003**, 300, 460
- Bates F.S., Jain S., *Macromolecules* **2004**, 37, 1511
- Bhattacharyya K., Sarkar N., Das K., Nath D.N., *Langmuir* **1994**, 10, 326
- Boggasch S., *Dissertation* **2006**, Mainz
- Caliceti P., Veronese F.M., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 1261
- Discher D.E., Hammer D.A., et al., *Science* **1999**, 284, 1143
- Discher D.E., et al., *Macromolecules* **2002**, 35, 8203
- Discher D.E., et al., *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, 2848
- Discher D.E., Eisenberg A., *Science* **2002**, 297, 967
- Dockter C., *Dissertation*, Mainz **2009**
- Eisenberg A., Luo L., *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 1012
- Eisenberg A., Luo L., *Langmuir* **2001**, 17, 6804
- Eisenberg A., Choucair A., Soo P.L., *Langmuir* **2005**, 21, 9308
- Förster S., Konrad M., *Journal of Materials Chemistry* **2003**, 13, 2671
- Förster S., et al., *Physical Review* **2004**, E 70, 041408
- Förster S., et al., *Small* **2005**, 1, 1177
- Fréchet J.M.J., et al., *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 9952
- Gregoriadis G., *Trends in Biotechnology* **1995**, 13, 527
- Gruen D.W.R., *Journal of Physical Chemistry* **1985**, 89, 146
- Guyot-Sionnest P., Hines M.A., *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100, 468
- Haag R., *Angewandte Chemie* **2004**, 116, 280
- Haag R., Kratz F., *Angewandte Chemie* **2006**, 118, 1218
- Ho D., et al., *Nanotechnology* **2004**, 15, 1984
- Kleima F.J., et al., *Biochemistry* **1999**, 38, 6587
- Klimov V.I., *Los Alamos Science* **2003**, 28, 214
- Krishna M.M.G., *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, 103, 3589
- Kühlbrandt W., *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, 4, 519
- Kühlbrandt W., et al., *EMBO Journal* **2005**, 24, 919
- Kühlbrandt W., Barros T., *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1787, 753
- Lecommandoux S.B., Sandre O., et al., *Advanced Materials* **2005**, 17, 712
- Magde D., Elson E.L., Webb W.W., *Biopolymers* **1974**, 13, 29
- Maskos M., Harris J.R., *Macromolecular Rapid Communications* **2001**, 22, 271
- Maskos M., *Polymer* **2006**, 47, 1172
- Mayer C., Förster S.F., et al., *Journal of Chemical Physics* **2004**, 120, 8740
- Meier W., et al., *Chemical Communications* **2000**, 1433

- Meier W., Nardin C., Winterhalter M., *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2000**, 39, 4599
Meier W., et al., *Polymer* **2005**, 46, 3540
Meier W., Mecke A., Dittrich C., *Soft Matter* **2006**, 2, 751
Mews A., Basché Th., et al., *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 7480
Müller W., *Diplomarbeit*, Mainz **2006**
Müller W., M. Maskos, et al., *Macromolecules* **2009**, 42, 357
Paulsen H., et al., *EMBO Journal* **1994**, 13, 3423
Paulsen H., Kuttkat A., Grimm R., *Plant Physiology* **1995**, 109, 1267
Paulsen H., et al., *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1757, 1642
Renger G., et al., *Biochemistry* **1997**, 36, 7503
Rheingans O., *Dissertation*, Mainz **1999**
Ringsdorf H., Schlarb B., Venzmer J., *Angewandte Chemie* **1988**, 100, 117
Rühle W., Paulsen H., *Photosynthesis Research Protocols* **2004**, 274, 93
Ryan A.J., Battaglia G., *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 8757
Schmidt M., Buchard W., *Macromolecules* **1981**, 14, 210
Therien M.J., Hammer D.A., Ghoroghchian P.P., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 2922
Torchilin V.P., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1532
Xie R., *Dissertation*, Mainz **2006**
Zhu C., Xia Y., Zhang T., Diao X., *Chemistry Letters* **2007**, 36, 242

Allgemeine Quellen und Bücher

- Brown W., *Dynamic Light Scattering*, Clarendon Press, Oxford, 1993
Green F.J., *The Sigma-Aldrich handbook of Stains, Dyes and Indicators*, 1990
Handbook of Chemistry and Physics, Linde D.R., 76th Ed., CRC Press 1995
Hosokawa M., et al., *Nanoparticle Technology Handbook*, Elsevier 2007
Israelachvili J.N., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press 1992
Institut für Mikrotechnik, *The Catalogue*, Mainz 2006
Lakowicz J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer-Verlag 2006
Lazzari M., Liu G., Lecommandoux S., *Block Copolymers in Nanoscience*, Wiley-VCH 2006
Literatursammlung, Dr. Karl Fischer, Universität Mainz
Petzke F., *Praktikums-Skript Spektroskopie*, Universität Mainz 2003
Polymer Handbook, Brandrup J., Immergut E.H., 3rd Ed., Wiley 1989
Rigler R., Elson E., *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Springer-Verlag 2001
Rogach A.L., *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots*, Springer-Verlag 2008
Römpp, Basislexikon Chemie, Thieme Verlag 1998
Schärtl W., *Light Scattering from Polymer Solutions*, Springer, Heidelberg, 2007
Sigma-Aldrich Produkt Informationen, <http://www.sigmaaldrich.com>
Tieke B., *Makromolekulare Chemie*, VCH Wiley, 2005
Vitrobot Guide, FEI Company, V.6.0
Vögtle F., *Supramolekulare Chemie*, Teubner, Stuttgart, 1992
Vogel H., *Gerthsen Physik*, Springer-Verlag 1999
Wikipedia, <http://de.wikipedia.org>
Williams D.B., Carter C.B., *Transmission Electron Microscopy*, Springer-Verlag 1996