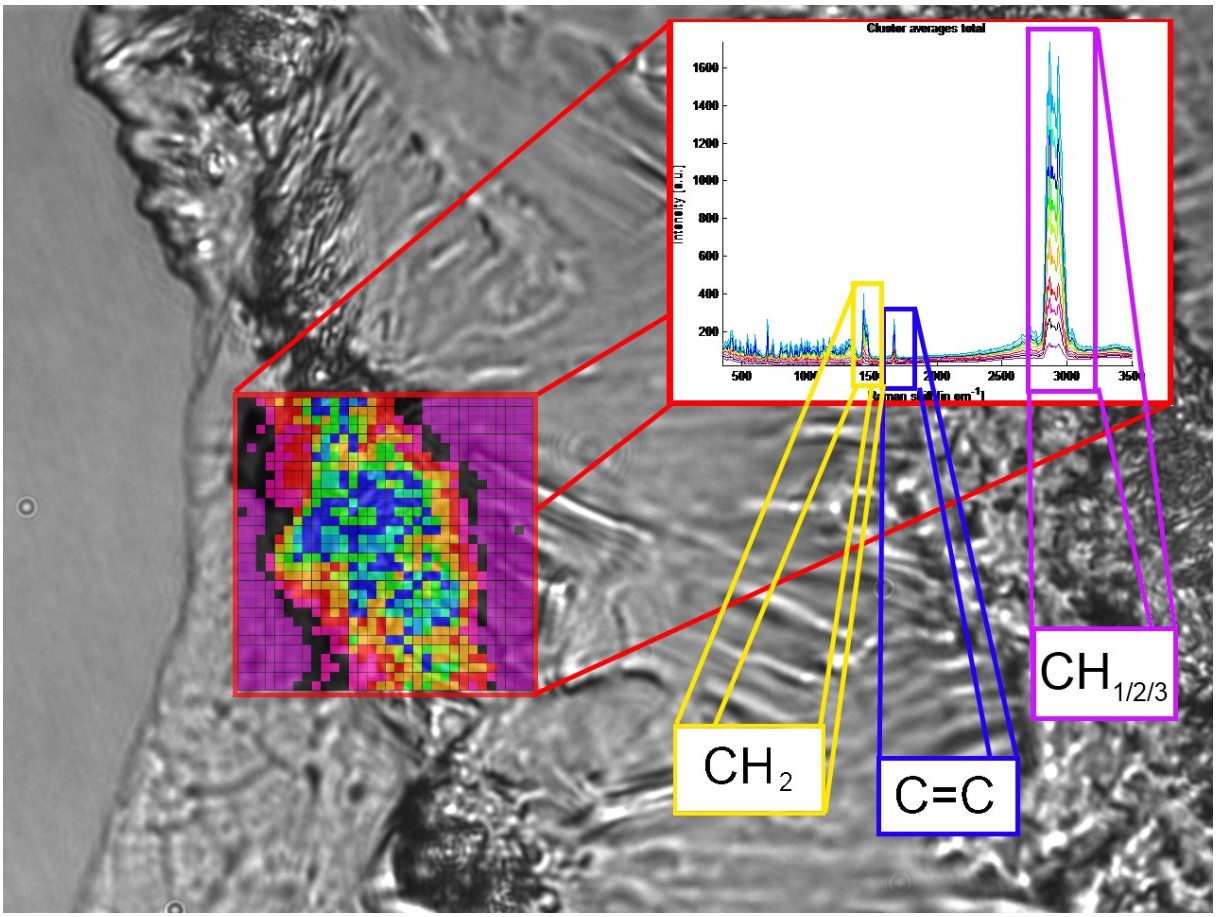
UNIVERSITEIT TWENTE.

Faculteit Technische Natuurwetenschappen

Opleiding BSc Biomedische Technologie



Raman analyse van lipiden in cellen

Remco Siero

13 juli 2011

UNIVERSITEIT TWENTE.

Faculteit Technische Natuurwetenschappen

Opleiding BSc Biomedische Technologie

Raman analyse van lipiden in cellen

Remco Siero – s0172316
13 juli 2011

Bacherloropdracht commissie:

Voorzitter:	Prof. Dr. Leon Terstappen
Dagelijks begeleider:	Dr. Cees Otto
Lid:	Ir. Liesbeth Hartsuiker
Lid andere vakgroep:	Dr. Mireille Claessen (NBP)

Reeksnummer BMT: BMT071

Vakgroep afstuderen: **Medical Cell Biophysics**

Voorwoord

Als afsluiting van mijn bacherlor Biomedische Technologie heb ik mijn bacherloropdracht gedaan bij de vakgroep Medical Cell Biophysics (MCPB) aan de Universiteit Twente. Deze vakgroep houdt zich bezig met verbeteren van de detectie en behandeling van kanker, door het toepassen van chemische, fysische en biologische kennis.

Onder leiding van Prof. Leon Terstappen had ik de kans om lipiden te analyseren met behulp van Raman spectroscopie, een identificatie methode die molecuul specifieke resultaten weergeeft. Begeleid door Dr. Ir. Cees Otto en Ir. Liesbeth Hartsuiker werd ik gesteund en begeleidt in mijn onderzoek naar het Raman spectrum van verschillende lipiden. Deze lipiden werden beschikbaar gesteld door de vakgroep Nanobiophysics (NBP), waarvan Mireille Claessen mijn externe begeleider en contactpersoon van deze vakgroep was.

Naast deze personen wil ik ook graag Aufried Lenferink en Arjen Pit bedanken voor hun begeleiding en uitleg bij de Raman opstelling. Ook wil ik Anja Stefanovic van de NBP groep graag bedanken voor haar hulp bij het maken van vesikels en het wegwijs worden in het laboratorium. Tevens wil ik mijn mede-bachelorstudenten Nick Beijer en Hans Ligtenberg bedanken voor hun hulp en steun tijdens onze projecten.

Met de hulp van alle voorgenoemde mensen heb ik mijn bacheloropdracht kunnen uitvoeren en zonder al deze hulp was het zeker niet gelukt om deze opdracht goed af te sluiten. In deze tijd heb ik veel ervaring opgedaan met het werken in het laberatorium en het uitvoeren van metingen. Daarnaast heb ik een bredere kennis van de theorie van de lichtinteractie bij Raman spectroscopie en van de lipide structuur verkregen. Dit stelt mij in staat om spectra te vergelijken en afwijkingen toe te schrijven aan reagerende groepen in het molecuul.

C.J. Siero - s0172316

Samenvatting

Met behulp van Raman spectroscopie heb ik metingen gedaan van verschillende typen lipiden, waarvan er ook enkele binnen het menselijke celmembraan voorkomen. Het Raman spectrum dat vervolgens ontstaat is specifiek voor de aanwezige moleculen zodat elk molecuul een ander Raman spectrum veroorzaakt.

Er zijn Raman metingen gemaakt van lipiden in vesikels, lipiden ingesloten in een spacer en lipiden op een CaF_2 plaatje. Bij de lipiden in vesikels is met fluorescentie microscopie aangetoond dat er zeker vesikels gevormd waren, maar dat er te weinig Raman signaal geproduceerd werd om de aanwezigheid lipiden aan te tonen.

De metingingen van het Raman signaal van de lipide ingesloten in een spacer leverde alleen een signaal van de lijmlaag die gebruikt werd om de spacer aan de ondergrond vast te plakken. Door de chloroform in het oplosmiddel van de lipiden is de lijm uitgelopen en overheerst het Raman spectrum van de uitgelopen lijm het signaal van de lipide. Hierdoor is het signaal van de lipide niet meer te herkennen uit het verkregen signaal.

Metingen van lipiden op een CaF_2 plaatje leveren duidelijke signalen die volgens de literatuur direct herleidt kunnen worden naar de gemeten lipiden. Er zijn in totaal van de fosfolipiden 4 verschillende kopgroepen en 4 verschillende staartgroepen gemeten. Uit metingen waarin alleen een soort groep werd afgebeeld kon duidelijk het signaal, dat door deze groep veroorzaakt wordt, herleidt worden. Zodoende is het signaal van één kopgroep duidelijk te herkennen en ook het signaal van één staartgroep is duidelijk toe te kennen. De signalen van andere groepen vertonen veel overeenkomsten en vereisen meer informatie voordat deze te herkennen zijn uit de spectra. Het spectrum van cholesterol is ook gemeten en dit sterol wijkt wat Raman spectrum erg af van de fosfolipiden en is duidelijk herkenbaar.

Summary

By means of Raman spectroscopy I have acquired the Raman spectra of several different types of lipids, of which a few are also present in the human cell membrane. The Raman spectrum is specific for the molecules present and in such a way each molecule causes a different Raman spectrum.

The Raman spectra of lipids in vesicles, lipids enclosed by a spacer and lipids on a CaF_2 disk have been taken. For the lipids in the vesicles we were able to prove vesicle formation by fluorescent microscopy but filtering the lipid spectrum out of the signal of the solution proved to be impossible due to the low influence of the lipids to the whole signal.

The Raman measurements of lipids enclosed by a spacer resulted in a clear signal of the adhesive used to stick the spacer to the CaF_2 disk. The chloroform in which the lipids were dissolved caused the adhesive to spread through the lipid sample and this signal overruled the lipid signal. It turned out to be impossible to determine which of the signals were caused by the lipids and which signals were created by the spacer.

The Raman measurements of lipids on a CaF_2 disk resulted in clear signals which, supported by literature, were caused by the lipids. In total the spectra have been taken from four different phospholipid headgroups and an equal amount of tailgroups. From these different measurements I was able to clearly recognize one specific headgroup and one specific tailgroup out of the spectra. To clearly distinguish between the other head and tailgroups more information is required. The spectrum of cholesterol has also been made and the spectrum of this sterol is clearly distinguishable from the spectra of the phospholipids.

Inhoudsopgave

Voorwoord ..... - 2 -
Samenvatting ..... - 3 -
Inhoudsopgave ..... - 4 -
Inleiding ..... - 6 -
Raman Spectroscopy ..... - 6 -
Lipiden ..... - 7 -
Methode en materialen ..... - 14 -
Raman Opstelling ..... - 14 -
Data correctie ..... - 15 -
Metingen Vesikels ..... - 15 -
Maken van vesikels ..... - 16 -
Metingen lipiden in spacer ..... - 16 -
Metingen lipiden ..... - 17 -
Resultaten & Discussie ..... - 18 -
Interval ..... - 18 -
Resultaat en Discussie - Metingen vesikels ..... - 18 -
Controle ..... - 18 -
Metingen aan vesikels ..... - 19 -
Resultaten en Discussie - Metingen lipiden in spacer ..... - 20 -
Metingen ..... - 20 -
Resultaten en Discussie - Metingen lipide druppels ..... - 22 -
Lipide kopgroepen ..... - 24 -
Lipide staartgroepen ..... - 25 -
Conclusies ..... - 28 -
Metingen van vesikels ..... - 28 -
Metingen van lipiden in een spacer ..... - 28 -
Metingen van lipide druppels ..... - 28 -
Aanbevelingen ..... - 30 -
Literatuurlijst ..... - 32 -
Appendix A – Lipiden spectra ..... - 34 -
Appendix B – Toekenning pieken van lipiden spectra ..... - 42 -
Appendix C – Afwijkende metingen ..... - 48 -

Inleiding

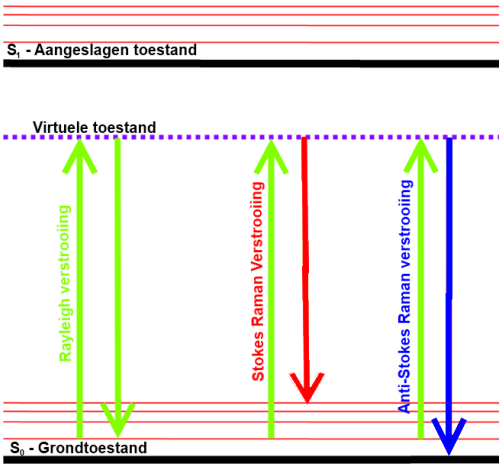
Al jaren lang staan hart- en vaatziekten samen met kanker op plaats een en twee in de sterftecijfers van Nederland[12]. Het is al enige tijd bekend dat een hogere BMI (verhouding tussen lengte en gewicht, [gewicht(kg)/lengte(m)^2] schadelijk is voor de gezondheid[13-15]. Bij de meeste mensen is de BMI een indicatie van de hoeveelheid lichaamsvet dat is opgeslagen[15]. Een recent onderzoek heeft aangetoond dat een vetrijker dieet ook de groei van een tumor vergroot[16] en hierdoor schadelijker is voor het lichaam dan een vetarm dieet. Echter, kanker is een aandoening waarvoor tot nog toe geen eenduidige indicator of bestrijdingmethode is gevonden.

Als er een verband aangetoond kan worden tussen kanker en de aanwezigheid van bepaalde soorten of concentraties van lipiden in een cel, dan kunnen deze cellen specifiek behandeld worden waardoor het omliggende weefsel gespaard blijft. Dit is een betere oplossing dan de huidige vormen van het bestrijden van kanker, zoals chemotherapy waarbij de patient vaak nog last heeft van neveneffecten van de behandeling[17-19]. Maar voordat het zover is zal onderzocht moeten worden of er een verband is tussen het soort en de hoeveelheid lipiden (vetten) die er in tumorweefsel voorkomt.

Een manier om stoffen te identificeren is door gebruik te maken van licht, want elke stof heeft een unieke respons op bestraling met licht. Het voordeel hiervan is dat de stof zelf niet aangepast hoeft te worden of kapot maken gemaakt moet worden om gedetecteerd te worden. Hierdoor kan op elk gewenst moment dezelfde procedure doorlopen worden met met dezelfde uitkomst. Raman spectroscopie is een manier om met behulp van de unieke interacties tussen licht en stof de structuren van deze stoffen te herkennen.

Raman Spectroscopy

Raman spectroscopie is een techniek waarmee direct en zonder voorbereidingen aan een preparaat gemeten kan worden. Door licht te schijnen op het preparaat, zal en deel van het licht door de verschillende chemische bindingen in het preparaat veranderen van golflengte en richting. Doordat de chemische en fysische bindingen voor elk molecuul verschillen, geven verschillende moleculen een andere verschuiving van het licht. Dit spectrum is karakteristiek voor het molecuul. Bij een goede belichting van het preparaat, zal dit preparaat tijdens het meten van het Raman spectrum, geen schade ondervinden. Hierdoor kan hetzelfde preparaat meerdere malen gemeten worden en telkens hetzelfde Raman spectrum verkregen worden. Hierdoor heeft Raman spectroscopie een groot voordeel t.o.v. fluorescentie spectroscopie, waarbij er eerst fluorescente markers gekoppeld moeten worden aan de moleculen van het preparaat en er rekening gehouden moet worden met photobleaching van het signaal[20] en bij gebruik van massaspectroscopie[21] of electronmicroscopie[22], waarbij het preparaat beschadigd wordt tijdens de meting.



Figuur 1: Verschillende soorten verstrooiing van licht in een stof. V.l.n.r. Rayleigh, Stokes Raman en Anti-Stokes Raman verstrooiing

Als licht op materie wordt gestraald, kunnen de moleculen via een aantal processen fotonen uitzenden. Deze processen zijn de absorptie (opname), de transmissie (doorlaten) en de verstrooiiing (afwijking) van licht. Het deel van de fotonen dat door de stof verstrooid zal worden, krijgt een andere richting krijgen dan ze voorheen hadden. Van deze verstrooide fotonen worden de meesten elastisch verstrooid, hetgeen inhoudt dat de fotonen alleen van richting veranderen in de materie. Er vindt op deze manier geen

energieverlies plaats. Deze vorm van verstrooiiing heet Rayleigh verstrooiing en hier veranderen de fotonen niet van frequentie. Een klein deel van de verstrooide fotonen verandert niet alleen van richting, maar ook van frequentie (zie Figuur 1). Dit is niet-lineaire verstrooiing en is vernoemd naar C.V. Raman die dit verschijnsel voor het eerst beschreef[23].

De Raman verstrooiing is vervolgens weer onder te verdelen in twee soorten verstrooiing. Het meestvoorkomende type Raman verstrooiiing is de Stokes Raman verstrooiing, waarbij het verstrooide foton een lagere frequentie (energie) heeft als het oorspronkelijke foton. Bij de andere soort verstrooiing heeft het resulterende foton een hogere energie dan het oorspronkelijke foton, dit is anti-Stokes Raman verstrooiing (zie Figuur 1). De anti-Stokes Raman verstrooiing komt veel minder vaak voor dan de Stokes Raman verstrooiing doordat het molecuul in een hoger energie niveau moet zijn voordat anti-Stokes Raman verstrooiing plaats kan vinden. Volgens de Boltzman distributie van moleculen over energieniveau's neemt de hoeveelheid moleculen in een energietoestand exponentieel af naarmate de energie van het molecuul hoger wordt[24].

Lipiden

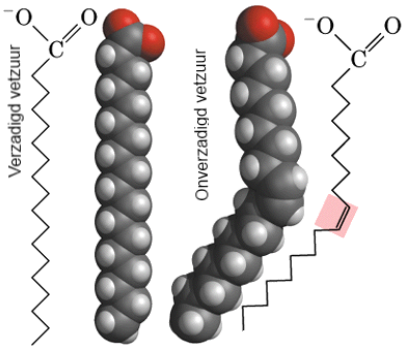
In dit hoofdstuk zal worden beschreven wat een lipide is en wat de functies van lipiden zijn in organismen. De definitie van een lipide is erg breed en beschrijft een groot aantal organische moleculen met als karakteristiek dat ze allemaal slecht oplosbaar zijn in water of andere polaire oplossingen, maar juist goed oplosbaar zijn in apolaire oplossingen als benzeen, chloroform, ether en tolueen. Dit wordt veroorzaakt door de structuur waarin zowel hydrofobe als hydrofiele delen aanwezig zijn binnen elk deel van de lipide.

Structuur

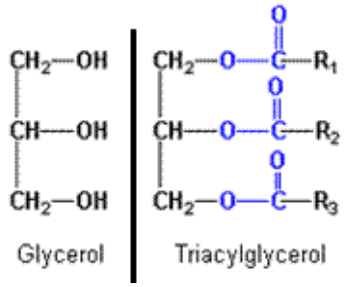
Lipiden zijn te vinden in veel verschillende structuren, de meest voorkomende lipiden zijn de vetzuren die te vinden zijn in alle cellen. Maar ook steroiden worden onder de lipiden geschaard terwijl hun structuur erg verschilt met die van op vetzuren gebaseerde lipiden[25].

Vetzuren

Vetzuren zijn er in verschillende soorten en maten, maar wat ze gemeenschappelijk hebben is de hydrofobe koolwaterstof-keten met daarop een hydrofiele kopgroep. Als de staart van het vetzuur een of meer dubbele bindingen bevat is het vetzuur onverzadigd (zie Figuur 2). De dubbele binding kan in twee verschillende configuraties voorkomen, cis en trans. In de cis-configuratie bevinden de waterstofatomen van de lipidestaart zich aan dezelfde kant van het vetzuur. Hierdoor wordt de staart van het vetzuur afgebogen. In de trans-configuratie bevinden de waterstofatomen zich tegenovergesteld aan elkaar en vertoont de vetzuurstaart geen afwijking. Door middel van additiereacties kan de staart verder verzadigd worden. De hydrofiele kop van een vetzuur heeft een zuurgroep (-COOH) die erg reactief is. In veel situaties is de groep geioniseerd (-COO^-), waardoor deze nog reactiever is[25].



Figuur 2: Structuur van een vetzuur, met links een verzadigd vetzuur en rechts een onverzadigd vetzuur in de cis configuratie van de dubbele binding.[5].



Figuur 3: Glycerol en triacyllglycerol

Triacylglycerol

Omdat de kop van een vetzuur erg reactief is, kan de kopgroep reageren met een alcoholgroep van een glycerol molecuul. Bij de vorming van een triacylglycerol molecuul zullen drie vetzuren reageren met de drie alcoholgroepen van de glycerol (zie Figuur 3). Het gevormde triacylglycerol (zie Figuur 3) zal sterk hydrofoob zijn waardoor het erg slecht oplost in polaire oplosmiddelen.

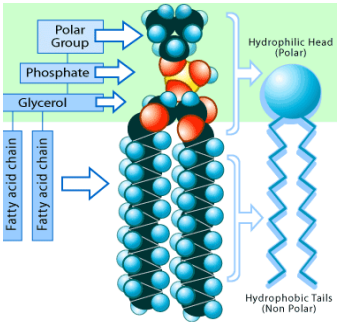
De reagerende vetzuren hoeven niet hetzelfde te zijn om een triacylglycerol molecuul te vormen. Als een van de vetzuren van de triacylglycerol een onverzadigd vetzuur is, zal dit echter wel de structuur van de triacylglycerol beïnvloeden. Verzadigde staarten zullen rechte koolwaterstofketens vormen en zorgen ervoor dat een triacylglycerol netjes geordend kan worden. Bij de onverzadigde staarten kan de dubbele binding een slag in de staart opleveren (zie Figuur 2), dit is afhankelijk van in welke configuratie het lipide zich bevindt. In het geval van een cis-configuratie ontstaat er een afwijking in de vetzuurstaarten en kunnen de triacylglycerol lipiden niet netjes geordend worden. Deze afwijkende ordening zal van invloed zijn op de structuur van micellen, vesikels en celmembranen.

Glycolipiden

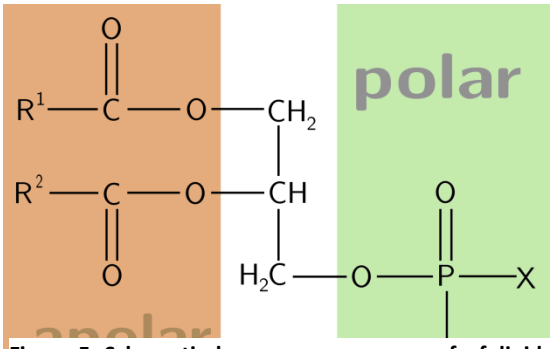
Glycolipiden lijken wat structuur betreft veel op de triacylglycerol lipiden, met als verschil dat een glycolipide slechts twee vetzuurstaarten bevat. Op de derde plek van het glycerol zit een koolhydraatgroep aan de lipide verbonden

Fosfolipiden

De fosfolipiden zijn weer een apparte soort van amfipatische lipiden. Net als de glycerolipiden, zijn er twee vetzuurmoleculen aan een glycerol molecuul gebonden, maar in plaats van een suikergroep aan de derde plek van het glycerol, is er nu een hydrofiele fosfaatgroep (zie Figuur 4) aan de glycerol verbonden. Door de aanwezigheid van de fosfaatgroep wijken de eigenschappen van de gevormde lipide af van glycolipiden en triaglycerolen. Doordat fosfolipiden zowel een hydrofiel als een hydrofoob deel bevatten zijn deze lipiden amfipatisch. Fosfolipiden zijn hoofdcomponent van celmembranen, dit wordt verder uitgewerkt.



Figuur 4: De structuur van een fosfolipide, twee vetstaarten en een polaire fosforkop[4].



Figuur 5: Schematische weergave voor een fosfolipide met X als substituent die de kopgroep bepaald en R^1 en R^2 als verschillende staartgroepen[8,11].

Fosfolipiden worden gekenmerkt door de soort staartgroepen en de gebruikte polaire kopgroep van de lipide. Bij de naamgeving van fosfolipiden zijn de eerste twee letters een indicatie van de staartgroepen die in de fosfolipide terug te vinden zijn (R^1 en R^2 in Figuur 5 zie Tabel 2). De laatste twee letters geven het type kopgroep weer, in

Substituent voor X (Figuur 5**)**	**Naamgeving**	**Afkorting kopgroep**
-OOH (zuurgroep)[26]	Fosfatide zuuur	PA
-O-CH_2-CH_2-$N^-(CH_3)_3$ (choline)[25-27]	Fosfatidylcholine	PC
-CH_2-CH_2-NH_3^+ (ethanolamine)[25-27]	Fosfatidylethanolamine	PE
-O-CH_2-CHOH-$CH_2O^{(-)}$(H) (glycerol)[26]	Fosfatidylglycerol	PG
-O-$C_6O_5H_{12}^-$ [26,27] (myo-inositil)[13,14]	Fosfatidylinositol	PI
-O-CH_2-$CH(NH_2)(COO^-)$ (serine)[26,27]	Fosfatidylserine	PS

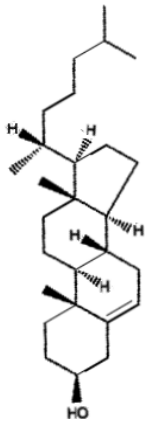
Tabel 1 is een overzicht te vinden van veelvoorkomende substituenten voor X in Figuur 5.

Substituent voor X (Figuur 5**)**	**Naamgeving**	**Afkorting kopgroep**
-OOH (zuurgroep)[26]	Fosfatide zuuur	PA
-O-CH_2-CH_2-$N^-(CH_3)_3$ (choline)[25-27]	Fosfatidylcholine	PC
-CH_2-CH_2-NH_3^+ (ethanolamine)[25-27]	Fosfatidylethanolamine	PE
-O-CH_2-CHOH-$CH_2O^{(-)}$(H) (glycerol)[26]	Fosfatidylglycerol	PG
-O-$C_6O_5H_{12}^-$ [26,27] (myo-inositil)[13,14]	Fosfatidylinositol	PI
-O-CH_2-$CH(NH_2)(COO^-)$ (serine)[26,27]	Fosfatidylserine	PS

Tabel 1: Een overzicht van substituenten van X in Figuur 5 en de naamgeving en afkorting van de gevormde kopgroep.

(Ketenlengte : aantal dubbele bindingen)		**Naamgeving**	**Afkorting staartgroep**
*R_1 (*Figuur 5*)*	*R_2 (*Figuur 5*)*		
18:1	18:1	1,2-dioleoyl	DO
16:0	16:0	1,2-dipalmitoyl	DP
16:0	18:1	1-palmitoyl-2-oleoyl	PO
18:0	18:1	1-stearoyl-2-oleoyl	SO

Tabel 2: Een overzicht van mogelijke staartgroepen van het lipide molecuul en de naamgeving



Figuur 6: Cholesterol[8]

Sterolen

Naast de lipiden met lange staarten en kopgroepen bestaan er nog andere typen lipiden. Deze lipiden hebben geen vetzuren of glycerol als basis van hun structuur, maar bevatten minimaal vier koolwaterstof ringen. De aanwezigheid van deze ringen maakt dit type lipiden stabieler, maar doet af aan hun mobiliteit. De werkelijke functie van de sterolen wordt bepaald door de verdere zij- en eindgroepen, deze beïnvloeden de werkelijke functie van het molecuul. Sterolen spelen een belangrijke rol in de signaal overdracht als hormoon en als receptor op het celmembraan.

Cholesterol

Cholesterol is waarschijnlijk het bekendste voorbeeld van een sterol (zie Figuur 6). Door de verschillende sacharidegroepen in cholesterol is er weinig mogelijkheid tot buiging, wat cholesterol tot ook een star molecuul maakt. In dierlijke cellen versterkt cholesterol het celmembraan. Door de onverzadigde ketens van de fosfolipiden en glycolipiden is het niet mogelijk om de lipiden van het celmembraan ordelijk te rangschikken en ontstaan er zwakke punten in het membraan. Cholesterol voegt zich

tussen de ontstane gaten in het celmembraan en zorgt er zodoende voor dat het celmembraan stabieler en starrer wordt.

Functies

De verschillende structuren van de lipiden is geoptimaliseerd voor verschillende doeleinden. De triacylglyceriden bevatten drie koolwaterstof staarten waarin veel energie zit opgeslagen. Deze lipiden worden dan ook gebruikt als energie opslag en zullen worden gebruikt zodra er een tekort aan energie dreigt te ontstaan.[25]

Glycolipiden bevatten een een koolhydraat structuur die buiten het celmembraan uitsteekt. Hierdoor kunnen ze, samen met suikerbevattende eiwitten, een laag vormen over het celmembraan heen. Deze tweede laag beschermt de fosfolipide laag en hierdoor dus de cel. Maar deze extra laag kan ook water absorberen en hierdoor een gelachtige laag vormen waardoor de cellen niet zullen clusteren en juist makkelijker langs elkaar glijden. Door de verschillende suikergroepen die mogelijk zijn aan de glycolipiden vormen deze lipiden ook herkenningspunten voor cellen wat weer belangrijk is bij het afweersysteem.[25]

Fosfolipiden

Fosfolipiden zijn door hun alifatisch delen een type lipiden apart, een deel van de lipide wil naar polaire moleculen gericht zijn, terwijl het andere deel van het molecuul zich juist wil verwijderen van de polaire moleculen. Dit levert een aantal problemen zodra de fosfolipiden in een polaire oplossing, zoals water, worden geplaatst.

Een enkel hydrofoob molecuul in een polaire oplossing is energetisch ongunstig omdat de polaire oplossing zich nu moet rangschikken om het hydrofobe molecuul[27]. Om de beperkingen in bewegingsvrijheid van de oplossing en de lipide te voorkomen, zullen de hydrofobe moleculen samenklonteren in de oplossing. Hierdoor vermindert hun totale oppervlak minder en hoeven er minder moleculen gerangschikt worden. Dit samenklonteren gebeurt zodra er een bepaalde concentratie lipiden bereikt wordt, de kritische micel-concentratie (CMC, critical micelle concentration)[24]. In deze toestand zijn er micellen onstaan met alle de hydrofobe staarten naar binnen gekeerd en de hydrofiele koppen naar de polaire oplossing gericht.

Omdat het voor alifatische lipiden erg ongunstig is om ofwel de hydrofiele ofwel de hydrofobe kant niet in zijn favoriete positie geplaatst te hebben is de CMC voor fosfolipiden erg klein. Typische waarden voor fosfolipide CMCs liggen in de orde van 10^{-12} M[27].

De structuur van de afzonderlijke lipiden is bepalend voor de uiteindelijke vorm van een lipide samenklontering. De lipide kan op drie verschillende manieren de uiteindelijke structuur bepalen:

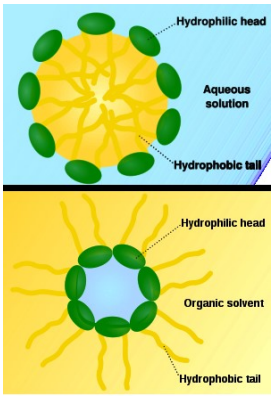
1) Oppervlak van de kopgroep (a_v): De lading op de kopgroepen van naburige lipiden bepaald hoeveel afstand er tussen de verschillende kopgroepen moet zitten. Dit is afhankelijk van de ionisatie van de kopgroepen en de pH van de oplossing. Voor fosfolipiden is de diameter van de kopgroep in de orde van 4,5-7,5 nm. Uitgaande van cirkelvormige kopgroepen, komt dit ongeveer overeen met een oppervlak van de kopgroep van 6.36 -17.67 x 10^{-15} m^2.
2) Lengte van de staarten (l): De lengte van de hydrofiele staarten van de lipiden kunnen elkaar hinderen en daardoor de structuur bepalen. De lengte van de staarten is afhankelijk van de hoeveelheid C-atomen in deze staart. Per extra C-atoom wordt de lipide staart 0.15 nm[25,28] langer, typische waarden zijn te bepalen met behulp van Tabel 2.
3) Moleculair volume van de staart (v): Het volume van de staart bepaald in hoeverre de staarten elkaar hinderen en wat de afstand tussen de individuele lipiden moet zijn.

Deze drie factoren beinvloeden volgens de volgende dimensieloze vormingsfactor de uiteindelijke structuur van het lipide complex. De invloed van deze vormingsfactor zal in de volgende paragrafen worden uitgelegd.

$$\frac{v}{a_v * l}$$

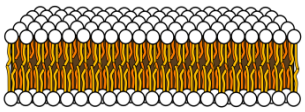
Micellen

De simpelste structuren om de lipiden te ordenen en de apolaire staarten af te wenden van de polaire oplossing is een micel. In een micel richten de lipiden hun ketens naar binnen, zodat de hydrofiele koppen naar de polaire oplossing gericht kunnen wenden. Als de lipiden in een apolaire oplossing worden gebracht zal de micel ontstaan met de koppen naar binnen en de staarten naar buiten (zie Figuur 7). Micellen zijn hierdoor bolvormige structuren en zijn sterk afhankelijk van het type lipiden die samenkomen. In een ideale micel zijn er hele grote koppen (a_v) en kleine staarten (l) zodat er zo weinig mogelijk hinder is van de afzonderlijke lipiden terwijl ze toch kunnen profiteren van de hydrofiele werking van de koppen. De vormingsfactor, zoals hierboven is beschreven, van een micel is ook kleiner dan 1/3. Een kleine vorminsfactor is juist ideaal voor micellen, door de kleinere lengte van de staarten en de relatief grote kopgroepen. Hierdoor wordt de lipide kegelvormig en is een bolvorm makkelijk te bereiken.



Figuur 7: Micellen; boven micellen in een polaire oplossing en beneden in een apolaire oplossing[9].

Vaak kunnen er zich ruim 1000 lipiden in een micel bevinden, maar in het geval van geioniseerde koppen stoten deze elkaar zo erg af dat een micel soms minder dan 100 lipiden bevat[24].

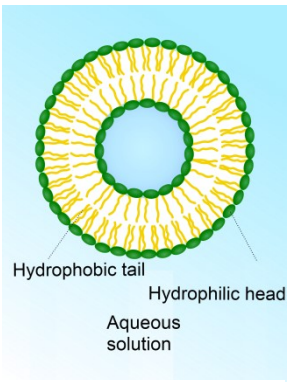


Figuur 8: Bilaag van fosfolipiden in een polaie oplossing[2].

Vesikels

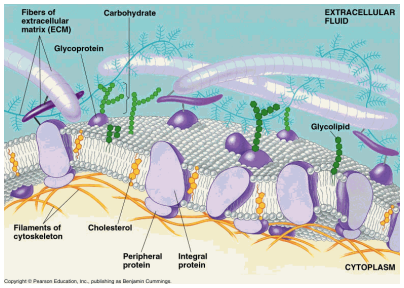
Als de staarten van de lipiden relatief groot zijn in vergelijking met de kopgroep, zouden de staarten elkaar hinderen als ze in een micel gerangschikt waren. Om toch te clusteren en zo minder last te hebben van de polaire oplossing zullen de verschillende lipiden zicht toch naast elkaar proberen te rangschikken. Dit levert een laag van 2 moleculen dik met aan beide kanten een polaire (waterige) oplossing waarnaar de kopgroepen gericht zijn. De hydrofobe staarten zijn naar binnen gericht en zijn op deze manier afgeschermd van de polaire oplossing (zie Figuur 8). De dubbellaag die nu gevormd is heeft een vormings factor: $\frac{1}{2} < \frac{v}{a_o * l} < 1$.

In een oplossing kan een dubbellaag niet op deze manier bestaan, want dan zou aan de zijkant de polaire oplossing wel aan de hydrofobe staartgroepen grenzen. Dit zou een geordende structuur opdringen aan de oplossing en ongunstig zijn. Daarom wordt dit opgelost door de open kanten van de dubbellaag aan elkaar te laten sluiten en zo vesikels te vormen (zie Figuur 9). Hier bevindt zich zowel binnen als buiten de bolvormige dubbellaag een polaire oplossing en zijn de hydrofobe staarten toch afgeschermd door de hydrofiele koppen naar de oplossing te laten wijzen. Als er een scheur in het vesikel ontstaat zal de structuur zichzelf hervormen om zo de energetisch gunstigere structuur te hervormen. Als de schade aan de dubbellaag echter te groot is zal de laag in stukken breken en meerdere kleindere vesikeles vormen om toch afgeschermd te zijn van de polaire oplossing[25].



Figuur 9: Vescicles in een polaire oplossing[6].

Celmembraan



Figuur 10: Schematische weergave van het celmembraan[3].

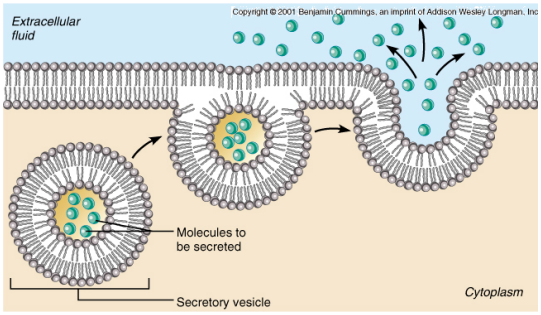
Het celmembraan bestaat uit een lange dubbellaag van fosfolipiden om zo de hydrofobe staarten af te schermen van polaire oplossingen door juist de hydrofiele kopgroepen hiernaar toe te richten. Als het ware is het celmembraan één groot vesikel dat voornamelijk uit fosfolipiden bestaat. Echter, ook glycolipiden en sterolen spelen een functie binnen het celmembraan. Binnen het celmembraan kunnen lipiden en sterolen kunnen binnen het membraam vrij bewegen en verschuiven, waardoor het membraan in staat is om te vervormen. De lipidesamenstelling van het menselijk celmembraan is weergegeven in Tabel 3. Het celmembraan functioneert als scheidingslaag tussen het cytoplasma in de cel en de extracellulaire vloeistof buiten de cel (zie Figuur 10). Door de samenstelling van het celmembraan wordt een concentratie verschil tussen de cel en zijn omgeving in stand gehoudenen dat de organellen van de cel ook in de cel doet blijven. Daarnaast regelt het celmembraan het stoffentransport tussen de cel en de extracellulaire matrix[7,25].

Tabel 3: Samenstelling van menselijke celmembraan[26]

Soort lipide	Cholesterol	PE	PC	Sphingomylin	PS	PI	Glycosphinolipid
Aanwezig in celmembraan (gewicht %)	25	18	19	18	9	1	10

Vesikulair transport

Transport van sommige stoffen tussen de cel en de extracellulaire omgeving wordt gehinderd door het polaire cytoplasma. Om problemen hiermee te voorkomen en stoffentransport te versnellen worden deze stoffen eerst omsloten door een vesikel van fosfolipiden. Door de afscherming van de polaire kopgroepen zullen de stoffen geen hinder ondervinden van het polaire cytoplasma. Door transmembraan eiwitten (SNARE) in het vesikel en het membraan zullen deze twee onderdelen elkaar herkennen. Als deze eiwitten van beide onderdelen binden zal het vesikel fuseren met het membraan zodat de inhoud van het vesikel kan worden afgegeven (zie Figuur 11). Deze fusie met het membraan kan voorkomen bij verschillende membranen, zoals het celmembraan, maar ook membranen van celorganellen zoals het Golgi apparaat en demitochondria. Dit proces komt ook voor bij hormoon afgifte, afgifte van neurotransmitters en bij de afvoer van afvalstoffen.[7,25,29]



Figuur 11: Vesicular transport van het cytoplasma naar de extracellulaire vloeistof[7].

Sommige medicijnen maken ook gebruik van vesikulair transport. Hierdoor kunnen de medicijnen op specifieke plekken werkzaam zijn, hetgeen de effectiviteit van het medicijn. Weefsel dat niet beschadigd of geinfecteerd is, hoeft op deze manier ook niet behandeld te worden. Vooral bij de behandeling van kanker worden schadelijke stoffen afgegeven aan tumorcellen om zo de tumor te doden of de groei te remmen. Door deze stoffen specifiek bij het tumorweefsel af te geven voorkom je beschadiging van omringend gezond weefsel.[7]

Kunstmatige vesikel vorming

Vesikels kunnen ook gemaakt worden door een laag lipiden te laten drogen. Als de lipiden vervolgens aan een polaire oplossing worden blootgesteld zullen de lipiden een dubbellaag vormen. Met behulp van een lage wisselspanning is de grootte van de te vormen vesikels te beïnvloeden. Deze vesikels (GUV, Giant Unilamellar vesikels) kunnen 1 tot 300 μm in diameter worden[30].

Doelstelling:

Met behulp van Raman spectroscopie zal er gekeken worden of er een correlatie is tussen kanker en de aanwezigheid van bepaalde soorten en concentraties lipiden in cellen. Maar voordat er onderzocht kan worden wat de aanwezigheid van lipiden in cellen is, zullen er Raman spectra van lipiden gemaakt moeten worden om deze vervolgens in het complexe Raman spectrum van de cel te kunnen herkennen. Het doel van dit onderzoek is dan ook om een database aan te leggen van de Raman spectra van een aantal bekende lipiden die ook in het menselijke celmembraan aanwezig zijn (zie Tabel 3).

Hypothese:

Er zal een database opgezet worden van Ramanspectra van lipiden, op basis waarvan lipiden herkend kunnen worden aan hun Raman spectrum. Deze database zal ook te gebruiken zijn als er gekeken gaat worden naar de aanwezigheid van lipiden in cellen.

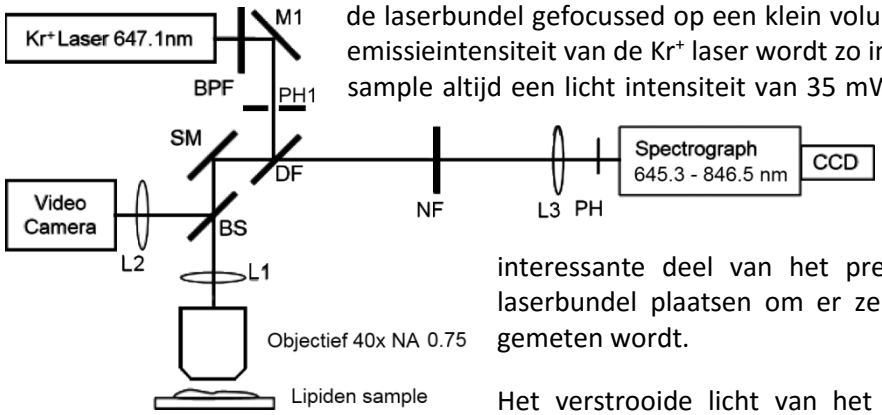
Methode en materialen

In dit hoofdstuk wordt beschreven op welke manier de verschillende soorten lipiden gemeten zijn en waarom er gekozen is voor de betreffende meetmethode. De lipiden die gemeten worden komen veelal ook voor in menselijke cellen (zie Tabel 3). Ook wordt er hier aandacht besteed aan het kalibreren en corrigeren van de verkregen data om een zo helder mogelijk het spectrum van de lipiden te verkrijgen. Maar eerst zal er begonnen worden met het beschrijven van de gebruikte Raman opstelling zodat het duidelijk wordt hoe het signaal wordt verkregen.

Raman Opstelling

Voor het meten van de Raman signalen van de verschillende lipiden, wordt gebruik gemaakt van een opstelling zoals hieronder beschreven. Deze opstelling is binnen de vakgroep ontwikkelen maakt gebruik van een 40x NA 0.75 objectief om de laserstraal op het preparaat te focusseren. De axiale resolutie van het meetvolume is 432 nm bij 432 nm bij 1328 nm, respectievelijk de X, Y en Z richting. Alle metingen worden uitgevoerd op een CaF_2 schijf om de invloed van het achtergrond signaal te onderdrukken[31].

De bron voor de Raman verstrooiing is een Kr^+ laser die via een pad beschreven in Figuur 12 het lipide sample bestraalt. Voordat het licht bij het preparaat aankomt wordt er met behulp van een band pass filter (BPF in Figuur 12) voor gezorgd dat alleen het laserlicht van 647.1 wordt doorgelaten. De plasma emissie van de laser wordt weggefilterd. De lichtbundel gaat vervolgens via een dichroische notch filter (DF in Figuur 12) richting het preparaat. Met behulp van een objectief wordt de laserbundel gefocussed op een klein volume in het lipide sample. De emissieintensiteit van de Kr^+ laser wordt zo ingesteld dat er op het lipide sample altijd een licht intensiteit van 35 mW valt. Met behulp van een video camera is het mogelijk om zelf eerst te kijken naar het preparaat. Zo is het mogelijk om het interessante deel van het preparaat precies binnen de laserbundel plaatsen om er zeker van te zijn dat er iets gemeten wordt.



Figuur 12: Schematische weergave van de home-built Raman opstelling waarvan gebruik wordt gemaakt[1,2].

Het verstrooide licht van het wordt vervolgens worden gefilterd met behulp van een long-pass filter. Hierdoor wordt de Stokes Raman verstrooiing doorgelaten en de invloed van de Rayleigh verstrooiing beperkt. Doormiddel van een lens en een pinhole (L3 resp. PH in Figuur 12) wordt de laserbundel gefocussed in de spectograaf. De spectograaf zal het Stokes Raman verstrooide laserlicht uit elkaar trekken, zodat het op frequentie gesplitst wordt, alvorens het op een CCD-camera wordt opgevangen. De chip in de CCD-camera heeft een afmeting van 1600 bij 200 pixels, waarop de verstrooiing van -43 cm^{-1} tot 3640 cm^{-1} geprojecteerd wordt. Deze waarden van verstrooiing zijn uitgedrukt relatief ten opzichte van de laserfrequentie. Door de laser uitgezonden bundel heeft een golflengte van 647.1, dit komt overeen met een absolute wavenumber waarde van 15453.56 cm^{-1}. Deze Raman verstrooiing die op de CCD-camera wordt opgevangen komt overeen met een bereik van 15496.56 cm^{-1} (645.3 nm) tot 11808.56 cm^{-1} (846.8 nm). Gemiddeld valt er op een pixel van de CCD-camera een energie interval van 2.3 cm^{-1}[11].

Voor het maken van afbeeldingen wordt gebruik gemaakt van een scanning mirror (SM in Figuur 12). Dit is een spiegel die zo gekanteld kan worden dat hij een raster maakt van 32 bij 32 of 64 bij 64

meetpunten, waarop een Ramaan meting uitgevoerd kan worden. Vervolgens kunnen deze 1024 respectievelijk 4096 verschillende metingen samengevoegd worden tot een afbeelding[31].

Data correctie

De verkregen data uit de Ramanopstelling heeft de vorm, van een aantal gemeten fotonen per pixel en is nog niet geordend op golflengte. Daarnaast is de apparatuur onderhevig aan ruis. Bovendien kan de respons van de opstelling verschillen per pixel door de frequentie-afhankelijke respons van de afzonderlijke onderdelen in de opstelling. Hieronder wordt uitgelegd welke kalibraties en correcties er worden uitgevoerd om de meetdata per pixel te verwerken tot verschuiving in het golfgetal (cm^{-1}). Deze correcties worden op de meetdata uitgevoerd met behulp van Labview™ 2009 SP1 van National Instruments™.

Witlicht

Een witlicht bron met een constante emissie wordt gebruikt om de CCD-camera te bestralen. Door de verschillende onderdelen in de lichtbaan vanaf het objectief tot de CCD-camera wordt het signaal sterk beïnvloedt. Dit leidt tot de detectie van een golvend signaal, terwijl er een constante input werd gegeven. Met behulp van de witlicht meting wordt vastgesteld wat deze frequentieafhankelijke respons van de opstelling is. Alle verdere metingen worden hiermee gecorrigeerd, waardoor elk inkomend signaal (foton) evenveel invloed zal hebben.

CCD Offset

Zelfs als er geen licht naar de CCD-camera wordt gezonden, wordt er toch nog een aantal counts gemeten. Dit komt doordat er constant een kleine spanning over de CCD chip wordt gezet om ervoor te zorgen dat de omzetting van fotonen naar spanning goed verloopt door geen negatieve waarden te krijgen[31]. Bij elke meting wordt ook een meting gemaakt van deze offset zodat dit bij elke meting gecorrigeerd kan worden.

Calibratie

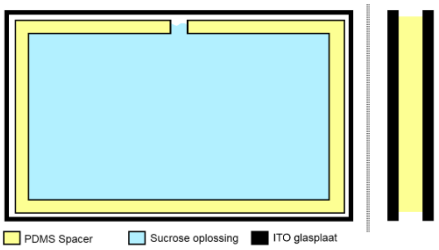
Door middel van een Raman meting van tolueen en van het emissie spectrum van een ArHg-lamp wordt de CCD-camera gekalibreerd zodat bekend is welke pixel met welke verschuiving overeenkomt. De Ramanverstrooiingspieken van tolueen zijn bekend[31], evenals de emissie lijnen van de ArHg-lamp. Omdat de spectograaf de Raman verstrooiing op frequentie uit de verstrooide bundel splitst, zal op de CCD-camera 2.3 cm^{-1} verschuiving per pixel worden opgevangen. Met behulp van de bekende emissielijnen van de ArHg-lamp en Raman verstrooiingen van tolueen wordt de CCD-camera gekalibreerd zodat bekend is welke pixel overeenkomt met een bepaalde Raman verstrooiing.

Metingen Vesikels

Lipiden komen onder normale omstandigheden voornamelijk voor in de celmembranen. Hier bevinden de lipiden zich in een dubbellaag met aan zowel de binnenkant als aan de buitenkant een polaire oplossing, namelijk cytoplasma respectievelijk extracellulaire vloeistof. De hydrofiele kopgroepen zullen zich naar de polaire oplossing richten en door de dubbellaag zullen de hydrofobe staarten afgeschermd worden van de vloeistof. De lipiden die gebruikt worden voor het vormen van vesikels zijn verkregen bij Avanti Polar lipids. Deze lipiden zijn opgelost in chloroform met een stock oplossing van 10 mg/ml (tenzij anders vermeldt) en in eppendorfjes opgeslagen in een diepvriezer ingesteld op een temperatuur van -80°C.

Maken van vesikels

In een eppendorf werd 7.6 µl POPC (zie Tabel 1 en Tabel 2), 1.0 µl DOPE-Rhod en 50 µl chloroform gepippetteerd. De DOPE-Rhod is een DOPE (zie Tabel 1 en Tabel 2) lipide met nog een extra fluorescerende marker aan de kopgroep gebonden[8], waarmee onder een fluorescentie microscoop gecontroleerd kan worden of de vesikels uiteindelijk zijn gevormd. Dit werd druppelsgewijs verdeeld over twee op 50°C voorverhitte geleidende ITO glasplaten en met de tip van het pipet uitgesmeerd tot een dunne film van lipiden zichtbaar was.



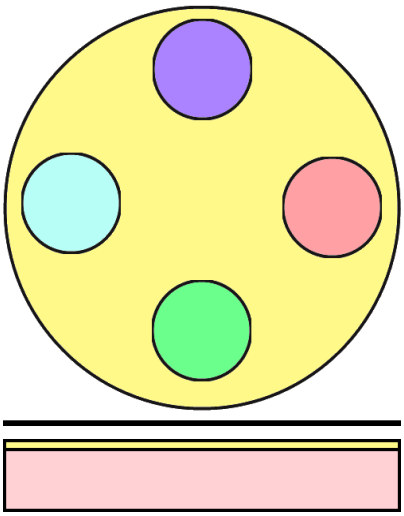
Figuur 13: Schematische weergave van de ITO glasplaten (zwart) met de PDMS spacer (geel) en de sucrose oplossing (blauw).

Onder vacuum werd gedurende 1 uur al het choloroform verdampt uit de lipide film op de ITO glasplaten, zodat alleen de lipiden overbleven. De ITO glasplaten worden met de lipiden film naar elkaar gericht en alleen gescheiden met een PDMS spacer. De ruimte die door de PDMS spacer wordt gemaakt tussen de ITO platen wordt opgevuld met ongeveer 2 ml van een 3,5 M sucrose oplossing (zie Figuur 13).

Met behulp van een lage wisselspanning (U = 1,2 V, f = 10 Hz) wordt de vorming van GUV's gedurende 2 uur gestimuleerd. Doordat de sucroseoplossing polair is zal de lipide film zich afzetten en de kop naar de oplossing richten. Hierbij zullen de lipiden opzwellen en loslaten van de ITO glasplaten.

Figuur 14: Objectiefglas met een holge voor oplossing (blauw) en een coverglas.

Het preparaat van de Raman metingen van vesikels is de sucrose oplossing met de aanwezige vesikels, zoals hierboven beschreven. Er zal 80 µl van de sucrose oplossing gepipetteerd worden op een objectiefglas met een holte. De holte met daarin de sucrose oplossing zal afgesloten worden met een coverglas (zie Figuur 14). Met de witlicht camera is het mogelijk om de vesikels op te zoeken in de oplossing om zo vervolgens een meting van de gekozen vesikels te maken.



Figuur 15: Boven: Bovenaanzicht van gebruikte spacer, kleuren representeren openingen in de spacer. Onder: Zijaanzicht spacer boven op CaF_2 geplaatst.

Metingen lipiden in spacer

Om de Raman spectra van verschillende lipiden te krijgen willen we de focale spot van de laser volledig gevuld hebben met lipiden. Uitgaande van de atomaire bindingslengten uit de literatuur[28] en de axiale resolutie van de Raman opstelling[1] hebben we 1.46 µl van de stockoplossing nodig om het laser volume te vullen. Dit pipetteren we in een spacer met een uitgesneden cirkel met een straal van 1 mm. Door middel van een spacer zorgen we ervoor dat de stockoplossing met de lipiden niet uitloopt over een groter oppervlak. Hierdoor kunnen we er zeker van zijn dat, zodra de chloroform verdampt is, de hoogte van de laag lipiden nog steeds groot genoeg is het volume van de gefocusseerde laser mee te vullen.

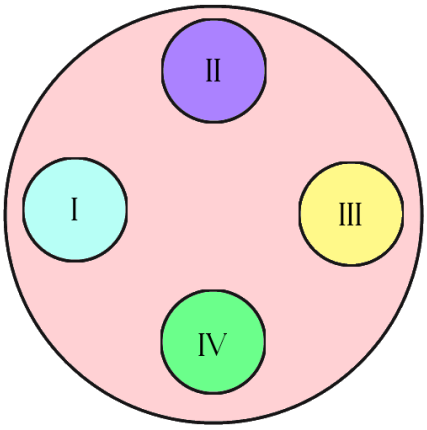
Als spacer gebruikten we een laag 3M™ Ultra-clean Laminating Adhesive 501FL, bestaand uit een polymeer van PET met een lijmlaag van acrylaat. Met behulp van een snijmachine van Craft Robo werd er een cirkel van 15 mm diameter uitgesneden. Daarbinnen werd op vier plekken een kleinere cirkel van 1 mm

diameter verwijderd. Deze spacer is op de CaF_2 ondergrond geplakt en door de lijm blijft deze goed zitten (zie Figuur 15).

Vervolgens wordt de stockoplossing van POPC in de spacer gepipetteerd, nadat deze al is opgewarmd met behulp van een warmhoudplaat ingesteld op 50^0C. Zodra de cloroform verdampt is zal de plaat nog een uur onder vacuümdruk geplaatst worden om er zeker van te zijn dat alle chloroform van de stockoplossing verdwenen is. Hierna worden er op meerdere plekken op de spacer een Raman meting gemaakt om zo een algemeen spectrum te krijgen van de lipide.

Metingen lipiden

Bij het verkrijgen van het Raman signaal van de afzonderlijke lipiden is gebruik gemaakt van een CaF_2 plaatje waarbij op verschillende posities een andere lipide werd gepipetteerd. De posities van de verschillende lipiden werd op de achterkant van het CaF_2 plaatje genummerd, zodat later achterhaald kan worden op welke positie een gekozen lipide aanwezig is (zie Figuur 16). Op basis hiervan wordt het verkregen Ramanspectrum aan de bijbehorende lipide gekoppeld.



Figuur 16: Schematische wergave van het CaF_2 plaatje zoals gebruik bij de metingen van lipiden.

Bij deze manier van het prepareren van het specimen worden de lipiden uit hun stockoplossing in chloroform (10 mg/ml voor de meeste lipiden en 5 mmol/ml voor cholesterol) direct op een op 50°C voorverwarmde CaF_2-plaat gepipetteerd. De chloroform heeft een kookpunt van 61°C waardoor het opwarmen tot 50°C van het CaF_2 ervoor zorgt dat de chloroform direct verdampt en alleen de lipiden achterblijven op het CaF_2 plaatje. Door op deze manier druppelsgewijs 2 µl te pipetteren op hetzelfde oppervlak zorgen we ervoor dat bij het meten van de Ramanspectra van de lipiden het volume van de laserbundel zoveel mogelijk is gevuld met de lipide. Vervolgens wordt het CaF_2-plaatje met de lipide nog een uur lang onder vacuüm druk geplaatst om zo de laatste sporen van de chloroform te doen verdampen uit de lipiden.

Op deze manier worden er metingen gemaakt van cholesterol en een aantal verschillende typen fosfolipiden gemeten (zie Tabel 4). Van elke lipide worden verschillende metingen gemaakt, elk op een andere locatie, en het gemiddelde spectrum van deze lipiden wordt vervolgens bekeken. Door het middelen van de metingen blijven alleen de signalen die voorkomen in alle metingen nog herkenbaar. Zo blijft alleen de signalen over die echt door de lipide veroorzaakt worden en geen signalen die door onzuiverheden en achtergrondsignalen veroorzaakt worden.

Tabel 4: Een overzicht van de gemeten kop- en staartgroepen (voor de betekenis zie

Substituent voor X (Figuur 5)	**Naamgeving Kopgroep**	**Afko kopg**
-OH (zuurgroep)[26]	Fosfatide zuur	PA
-O-CH_2-CH_2-N^+-(CH_3)$_3$ (choline)[25-27]	Fosfatidylcholine	PC
-CH_2-CH_2-NH_3^+ (ethanolamine)[27]	Fosfatidylethanolamine	PE
-O-CH_2-CHOH-$CH_2O^{(-)}$(H) (glycerol)[26]	Fosfatidylglycerol	PG
-O-$C_6O_5H_{12}^-$ (myo-inositil)[13,14] [26,27]	Fosfatidylinositol	PI
-O-CH_2-$CH(NH_2)(COO^-)$ (serine)[26,27]	Fosfatidylserine	PS

Staartgroepen	PA	PC	PG	PS
DO[50]	X	X	X	X
DP[50]		X		
PO[27]		X	X	X
SO[27]				X

Van de gemeten lipiden komen tenminste 7 van de gemeten lipidesoorten ook regelmatig voor in het menselijk celmembraan (zie Tabel 3). De andere lipiden komen voor in bacteriën en worden gebruikt om de verkregen Raman spectra te vergelijken.

Resultaten & Discussie

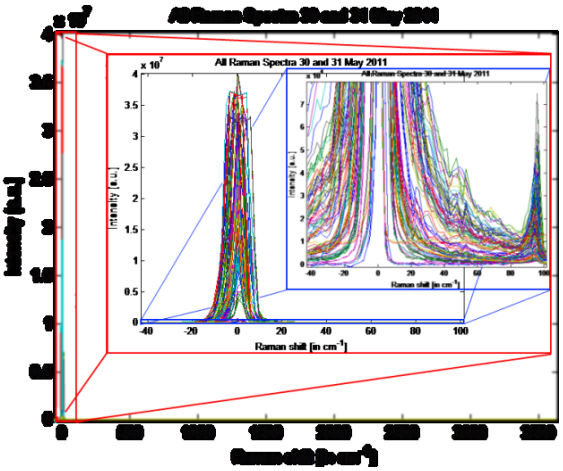
In dit hoofdstuk worden de resultaten van de Raman metingen van de lipiden worden besproken en wordt er een verband gelegd tussen de structuur van de gemeten lipide en het verkregen Raman spectrum. Naast deze resultaten zal er een verband worden gelegd tussen de verschillende aanwezige kop- en staartgroepen van de lipide en het gemiddelde spectrum dat van deze lipiden gevormd wordt.

Interval

Als er gekeken wordt naar alle spectra van het volledige meetbereik van de spectrograaf (van -43 cm^{-1} tot 3640 cm^{-1}) valt hier op dat er het signaal op sommige punten overheerst wordt door grote pieken die niet veroorzaakt worden door de stoffen waarvan we het signaal willen bekijken. Deze andere signalen overheersen de lipidesignalen. Om dit probleem te omzeilen zal we het golfgetalinterval van onze metingen zo gekozen worden dat alleen de regio's bekeken zullen worden, waar de lipidesignalensignalen te herkennen zijn boven de verstorende achtergrondsignalen.

De piek van de laser is te vinden rond een pixelshift van 0 cm^{-1} aangezien dit het licht is dat door de Rayleigh verstrooiing werd teruggekaatst en opgevangen. Deze piek ruim 1000 keer zo groot als de signalen van andere metingen (zie Figuur 17). Pas vanaf een Raman verstrooiing van 340 cm^{-1} komt het signaal echt op een waarde die laag genoeg is zodat een signaal van iets anders dan de laser ook herkenbaar wordt.

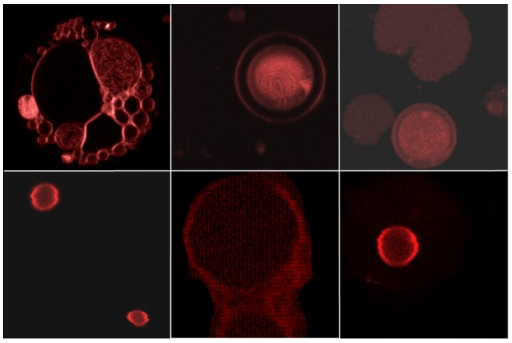
Door de piek van het CaF_2 rond de 322 cm^{-1} wordt het signaal in de nabije omgeving ook onherkenbaar. Hierdoor hoeven we pas vanaf een verschuiving van 340 cm^{-1} te kijken naar het signaal.



Figuur 17: Laserpiek, pas vanaf een verschuiving van 340 cm^{-1} is signaal te herkennen en dat alles hiervoor overheerst wordt door de laserpiek.

Resultaat en Discussie - Metingen vesikels

Op de manier zoals eerder besproken de materiaal en methode sectie is besproken worden vesikels gemaakt van POPC. In de volgende onderdelen zal besproken worden hoe de aanwezigheid van vesikels wordt gecontroleerd en wat de resultaten zijn van Ramanspectroscopie op deze stoffen.



Figuur 18: Fluorescentie van DOPE-Rhod in DOPC vesikels onder een 543 nm HeNe laser (verschillende vergrotingen).

Controle

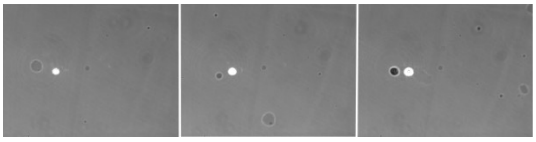
Allereerst zal worden gecontroleerd of er werkelijk vesikels zijn gevormd die groot genoeg zijn om met de Ramanopstelling te meten. Dit gebeurt met behulp van een confocale fluorescentiemicroscoop. De sucrose oplossing waarin de vesikels aanwezig zijn wordt eerst zes keer verdund met een 10 mM HEPES buffer en 150mM NaCl. De DOPE-Rhod heeft een absporptie piek op 560 nm en een emissie piek op 583 nm. Met een HeNe laser van 543 nm wordt de DOPE-Rhod geexciteerd.

Er zijn duidelijke vesikels te zien met een diameter van 3 tot 10 µm (zie Figuur 18) en dit is ruimvoldoende om

een Raman spectrum van te verkrijgen. Naast een aantal hele vesikels ook een aantal uiteengespatte vesikels zichtbaar zijn, maar er zijn nog genoeg intacte vesikels om aan te meten. De focal spot van de laser heeft een axiale resolutie van 432 nm bij 432 nm bij 432 nm (X/Y/Z) en deze resolutie is veel kleiner dan het volume van de lipiden. Met deze fluorescentie metingen hebben we aangetoond dat mogelijk is om vesikels te maken, zoals beschreven in de inleiding. Veel van de zichtbare vesikels bestaan uit meerdere dubbellagen genesteld in elkaar. De vesikels met meerd overlappende dubbellagen zijn beter zichtbaar dan de vesikels die slechts uit een paar lagen bestaan. Dit komt omdat de fluorescente DOPE-Rhod zich met de POPC lipiden hebben gemengd in de dubbellaag van de vesikels en door de fluorescentie van DOPE-Rho zichtbaar zijn.

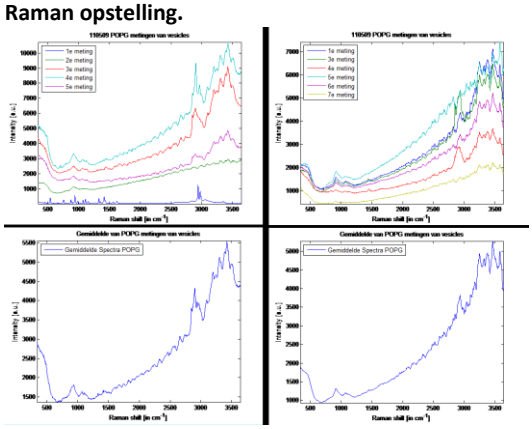
Metingen aan vesikels

Als we met de Ramanopstelling[1] gaan meten aan oplossing met de aangetoonde vesikels zien we met de witlichtcamera alleen grijze vlekken. Er is wel een verschil in intensiteit van grijs, wat zou kunnen duiden op meerdere bilagen in een vesikel, maar de vesikels zijn niet zo duidelijk als bij de fluorescentie meting (zie Figuur 19). De vesikels die gevonden worden zijn in beweging alsof er een stroming aanwezig is in de sucroseoplossing. Als een vesikel in de laserfocus belandt vertraagt het vesikel enigzins om er vervolgens een meting van te doen, maar na de meting blijkt het vesikel toch uit de laserfocus te zijn verdwenen.

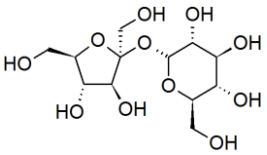


Figuur 19: Witlicht afbeeldingen van vesikels bij de Raman opstelling.

De Raman spectra zijn te zien in Figuur 21 en hier valt al snel op dat de metingen van de spectra oplopen naarmate de golflengte verschuiving groter wordt. Als we kijken naar de toekenning van de pieken (zie Tabel 5) dan zien we dat deze volgens de literatuur[32] overeenkomt met pieken die te verwachten zijn bij sucrose (Figuur 20).



Figuur 21: Metingen aan vesikels met boven de metingen en onder het gemiddelde van de metingen boven.



Figuur 20: Structuur-formule van Sucrose[10]

In deze gevormde oplossing is de concentratie van de lipiden te laag om het signaal van de lipiden van de signalen van water en sucrose te onderscheiden. Zelfs door vorming van vesikels en zo de lipiden te concentreren is het niet mogelijk om het lipidespectrum uit de andere spectra te naar voren te laten komen. Dit wordt nog moeilijker gemaakt doordat de vesikels binnen het preparaat nog steeds een stroming ondervinden, welke groter is dan de lasertrapping die vaker voorkomt bij kleine objecten in een laserspot.

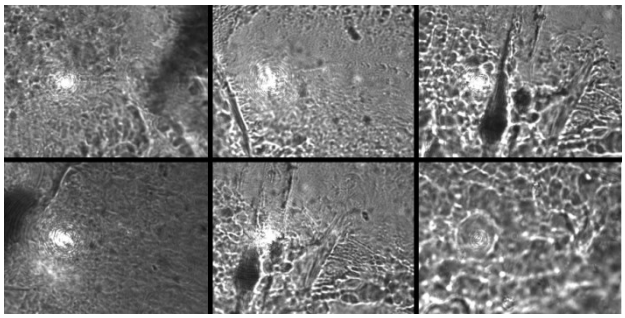
Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}][32] :	Toekenning:
914	913	glucose
1071	1071	glucose
2901	2900	CH stretch
2934	2933	CH_2 asymmetric stretch
3026-3358	>3000	CH stretching
3358-3518	3350-3550	O-H stretching

Tabel 5: Toegekende pieken bij de metingen aan vesikels

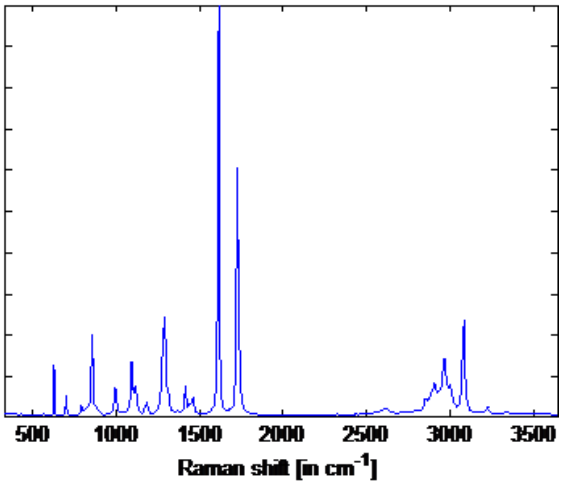
Het meten van de Ramanspectra van lipiden in vesikels zou wel mogelijk zijn als er zoveel vesikels in de oplossing aanwezig zijn zodat er altijd wel een paar in de focalspot van de laser aanwezig zijn. Dit vereist niet per sé GUV's, maar SUV's (small unilamellar vesikels, 20-50nm)voldoen, de focale spot maar genoeg vesikels bevat om signaal te ontvangen. Echter hiervoor zal de concentratie lipiden groter moeten worden in je meetvolume, zodat er meer signaal opgevangen kan worden.

Resultaten en Discussie - Metingen lipiden in spacer

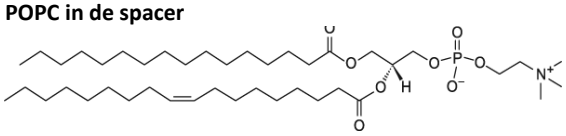
De opgedroogde lipiden op het CaF_2, verkregenn beschreven onder materiaal en methode, geven een wittige uitslag op het CaF_2. Na controle met de camera van de Raman opstelling is er duidelijk te zien dat er een structuur aanwezig is op het CaF_2. Het gat dat door de snijmachine is uitgesneden is duidelijk te herkennen doordat de op de spacer gefocuseerde laserpiek opeens wegvalt wanneer van de spacer afgeweken wordt. Door opnieuw te focusseeren in het gat worden de structuren van de opgedroogde lipiden zichtbaar en kunnen hier vervolgens de metingen van gemaakt worden (zie Figuur 22).



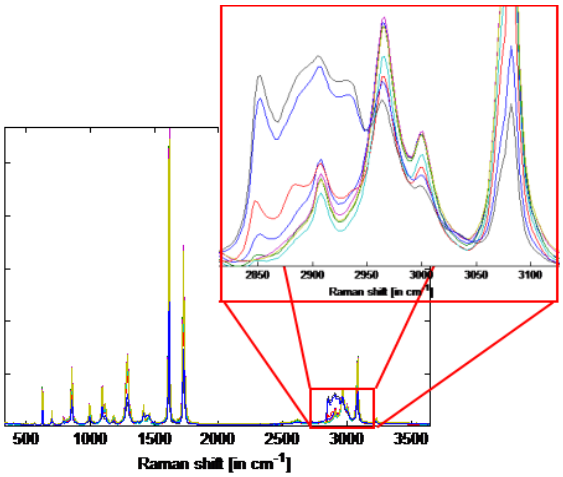
Figuur 22: Witlicht afbeeldingen van de lipide structuren in de spacer.



Figuur 23: Gemiddelde spectrum van de metingen van POPC in de spacer



Figuur 25: Structuur formule van POPC[8]



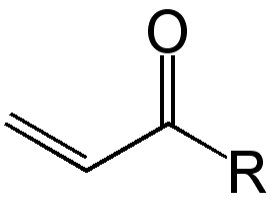
Figuur 24: Afzonderlijke metingen van POPC in de spacer. Uitvergroot 2850-3100 cm^{-1}

Metingen

Tijdens de meting was meteen opgevallen dat er veel signaal werd opgevangen van het beschenen preparaat. De zeer intense pieken op de 1615 en de 1727 cm^{-1} posities (zie Figuur 23) komen overeen met de dubbele binding (C=C) respectievelijk een ester groep (-(C=O)-O-C). De ester groep komt drie maal voor in het gemeten lipide (POPC, zie Figuur 33) terwijl de C=C binding maar een enkele keer voor komt in het gehele molecuul (zie Figuur 25). De banden tussen de 2700 en 3300 cm^{-1} die overeenkomen met het strekken van $CH_{(1,2,3)}$ komen hier juist veel minder voor terwijl de vetstaarten van POPC juist veel van deze groepen bevatten.

Omdat dit signaal zoveel anders is dan wat we zouden verwachten op basis van de structuur-formule van POPC (Figuur 25) zijn er ook een aantal metinging gemaakt van de spacer zelf en het signaal van de spacer komt sterk overeen met alle andere metingen van de lipiden in het uitgesneden gat van de spacer. Alleen in het gebied tussen 2850 en 3100 cm^{-1} zijn er enkele metingen die afwijken van het algemene beeld (zie Figuur 24). Deze metingen zijn midden in het gat van de spacer gemaakt en ruim boven het CaF_2 gemaakt. Ook deze metingen volgen nog sterk het patroon dat te zien is bij de metingen van de spacer maar tussen de 2700-3300 zijn hier wel brede en intensieve banden zichtbaar die kenmerkend zijn voor lipiden.

In Tabel 6 zijn de gevonden banden beschreven en toegekend aan een structuur die deze banden veroorzaakt[32]. Op basis van de grote aanwezigheid van de banden op 858, 1281, 1290, 1615, 1727 en 3082 cm^{-1} kunnen we aannemen dat het aandeel CH_2, =CH en –O-CO-groepen in de gemeten stof erg groot is. Als we vervolgens kijken naar de aanwezige stoffen in de spacer zien we dat de lijm gemaakt is van een polymeer van acrylaat. Acrylaat bevat een dubbelebinding die door de additie polymerisatie openklapt om zo een additie polymeer te vormen (zie Figuur 26). Dit acrylaat-monomeer kan, met een goede combinatie van restgroepen, alle duidelijke signalen uit het Raman spectrum (zie Tabel 6) veroorzaken.



Figuur 26: Acrylaat monomeer

Onder invloed van de chloroform is deze acrylaatlijm opgelost en heeft zich gemengd met de lipide.In het gevonden spectrum is het signaal van de lipide minder nadrukkelijk aanwezig in vergelijking met de signalen van de acrylaat lijm Echter, het lipidesignaal is alsnog te herkennen aan karakteristieke verschuivingen in het CH strekgebied tussen 2700 en 3000 cm^{-1}.

Tabel 6: Toekenning van pieken in het spectrum van POPC meting in de spacer (zie Figuur 24)

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	**Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):**	**Intensiteit (%) Relatief:**	**Toekenning:**
537.7	538	0.012	Cholesterol ester
630.2	630	0.126	Glycerol
701.3	702	0.053	Cholesterol, cholesterol ester
858	858	0.202	C-C stretching
996.7	996	0.073	C-O ribose, C-C
1095	1095	0.136	Phosphodioxy, C-N, lipids
1116	1115	0.078	CH_2 in-plane bend
1185	1185-1300	0.037	Anti-symmetric phosphate vibrations
1281	1280	0.198	CH_2 wagging
1290	*1288/1290* *1290-1400*	0.246	Phosphodiester groups in nucleic acids/Cytosine CH bending
1314	1314	0.064	CH_3CH_2 twisting of collagen or lipids
1416	1420-1450	0.077	CH_2 scissoring vibration (lipid band)
1461	1460	0.049	CH_2/CH_3 deformation of lipids
1615	1615	1	C=C
1727	1729	0.604	Esther group
2852	2850	0.05	CH_2, lipids, fatty acids
2908	2910	0.086	CH_3 stretching vibrations
2966	2960/2970	0.143	Antisymmetric CH_3 stretch/ CH_3, lipids, fatty acids
3001	>3000	0.082	CH stretching
3082	>3000	0.2378	CH stretching

Resultaten en Discussie - Metingen lipide druppels

De lipide preparaten die gemaakt zijn, zoals beschreven in Metingen lipiden' onder 'Methode en materialen', waren goed te vormen. Het was niet nodig om de stockoplossing in te sluiten, alvorens de chloroform te laten verdampen. De chloroform in de lipide stockoplossing verdampte binnen enkele seconden nadat dit op het verwarmde CaF_2 plaatje gepipetteerd werd. Doordat de lipiden in kleine hoeveelheden (0.25 µl - 0.5 µl per keer) op het plaatje werd gepipetteerd onstonden er op het CaF_2 druppels die ongeveer 2 mm in doorsnee waren alvorens de chloroform op te laten drogen. Enkele van deze kleine hoeveelheden op dezelfde plek leveren een witte neerslag zodra de chloroform verdampt was.

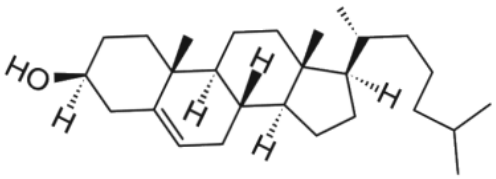
De Raman spectra van de lipiden zullen besproken worden in de komende paragrafen. In grove lijnen hebben de lipiden een gelijkvormig spectrum door de vele $–CH_2$- groepen die voorkomen in de vetzuurstaarten, maar de intensiteit van deze pieken verschilt per type lipide. Op elke soort lipide zijn verschillende Raman metingen uitgevoerd, op verschillende locaties van het preparaat. Van deze verschillende spectra is het gemiddelde genomen en dit gemiddelde wordt besproken. De offset van het signaal ligt meestal rond de 2% van de maximale band van het verkregen spectrum. signalen die een amplitude hebben die minder groot is dan 3% van de maximale waarde worden buiten beschouwing gelaten.

Een uitgebreide tabel van de gevonden pieken en banden zal te vinden zijn in de 'Appendix B – Toekenning pieken van lipiden spectra', net als de spectra zelf ('Appendix A – Lipiden spectra'). De banden die alle lipiden gemeen hebben zijn die rond 2725 cm^{-1} (CH stretches), 2847 cm^{-1} (symmetrische CH_2&CH_3) en 2900 cm^{-1} (anti-symmetrische CH_2 strek). De groepen die deze deze banden veroorzaken, komen in alle gemeten lipiden voor en het is ook niet verwonderlijk dat ze in alle spectra terug te vinden zijn.

Er zijn een paar metingen die niet helemaal naar wens waren verlopen en waarvan het Raman spectrum afwijkt van de Raman spectra op andere locaties van dezelfde lipide. Deze metingen worden niet meegenomen bij de analyse van de lipide, in de 'Appendix C' zal hier verder op worden ingegaan.

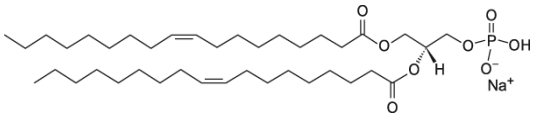
Cholesterol

Cholesterol is een sterol met een koolwaterstof staart aan de 4e cyclische verbinding (zie Figuur 27). Door zowel de cyclische verbindingen en de staart zijn er veel verschillende $CH_{(1/2/3)}$ groepen in het molecuul aanwezig die elk verschillende interacties aangaan met het inkomende licht. In het spectrum (zie Figuur 37) is ook te zien dat de banden tussen 2700 en 3300 cm^{-1} een stuk intenser zijn dan de rest van het signaal. Hier zijn meerdere banden te zien wat erop wijst dat er verschillende $CH_{(1/2/3)}$ groepen in het molecuul aanwezig zijn. In het gebied tussen 400 en 1400 cm^{-1} zijn een groot aantal pieken die overeenkomen met de cholesterol en lipide signalen.



Figuur 27: Structuurformule van cholesterol[8]

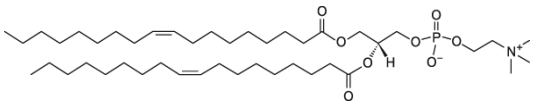
DOPA



Figuur 28: Structuurformule van DOPA (1,2-dioleoyl-fosfatide)[8]

In de structuurformule van DOPA (Figuur 28) zijn twee identieke lipide staarten zichtbaar. In het spectrum van deze stof (Figuur 38) leveren deze ook het meeste signaal rond de 2850 en 2898 cm^{-1} (CH_2/CH_3 symmetrische respectievelijk CH_2 asymmetrische strek). In het gebied tussen 800 en 1700 cm^{-1} zijn duidelijke pieken te zien, naast de pieken die overeenkomen met $CH_{(1/2/3)}$ interacties is er ook een duidelijke piek te vinden op 1654 cm^{-1} die veroorzaakt wordt door de dubbele binding in beide vetstaart ketens.

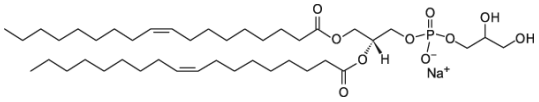
DOPC



Figuur 29: Structuurformule van DOPC (1,2-dioleoyl-fosfatidylcholine)[8]

Het spectrum van DOPC (Figuur 39) geeft hoge pieken op het gebied tussen 2800 en 3000 cm^{-1}. Deze pieken worden veroorzaakt door de $CH_{(1/2/3)}$ strekkende vibratie in de structuur van het molecuul (zie Figuur 29). Ook is er een verhoogde intensiteit gemeten voor de banden die een dubbele binding in de vetzuurstaarten vertegenwoordigen; 3007 (=CH strek) en 1654 (C=C strek) cm^{-1}. Ook is er een piek op 715 cm^{-1}, welke overeenkomt met de aanwezigheid van de choline kopgroep in de lipide.

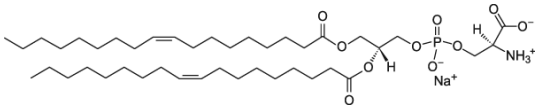
DOPG



Figuur 30: Structuurformule van DOPG (1,2-dioleoyl-fosfatidylglycerol)

Het spectrum van de DOPG metingen (Figuur 40) vertoont intense pieken in het $CH_{(1/2/3)}$ strek gebied tussen 2800 en 3000 cm^{-1}. Opvallend is de relatief lage waarden van de rest van het signaal, met name de lage waarde voor 1654 cm^{-1} die overeenkomt met het C=C strek gebied. De C=C strekkende vibratie wordt op basis van de structuurformule (zie Figuur 30) verwacht, maar komt niet naarvoren in het Ramansignaal.

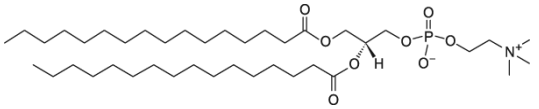
DOPS



Figuur 31: Structuurformule van DOPS (1,2-dioleoyl-fosfatidylserine)[8]

Ook in het spectrum dat bij DOPS behoort (Figuur 42) is duidelijk te zien dat er een groot aantal $CH_{(1/2/3)}$ gebieden aanwezig zijn, weergegeven door de banden tussen 2800 en 3000 cm^{-1}. De invloed van CH_2/CH_3 deformaties (1300, 1440 en 1655 cm^{-1}) is relatief veel hoger in dit spectrum dan in de andere spectra met dezelfe lipide staarten (DOPA, DOPC of DOPG). Ook het signaal van de C=O strek is groot in vergelijking met andere lipiden met dezelfde staartgroep. Dit komt omdat er in dit geval in de kopgroep ook een C=O groep aanwezig is (zie Figuur 31). De invloed van de lipide staarten speelt in DOPS een mindere rol in het 2800 en 3000 cm^{-1} gebied, maar de pieken tussen 1200 en 1700 cm^{-1} hebben echter wel meer invloed op het gehele spectrum.

DPPC

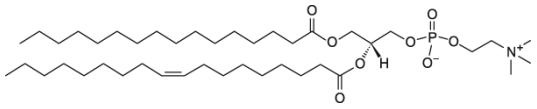


Figuur 32: Structuurformule van DPPC (1,2-dipalmitoyl-fosfatidylcholine[8]

Opvallend bij het spectrum van DPPC (Figuur 41) is dat de invloed van de pieken in het $CH_{(1/2/3)}$ strekgebied (2800 tot 3000 cm^{-1}) veel intenser zijn in vergelijking met de banden die liggen in het gebied tussen 700 en 1800 cm^{-1}. Ook valt op dat de piek op 3034 cm^{-1} bij deze stof veel minder intens is dan die van de andere fosfolipiden. Deze band wordt veroorzaakt door de =C-H groep in lipiden en deze groep is maar eenmaal aanwezig in DPPC (zie Figuur 32). Dit komt omdat de vetzuurstaarten van DPPC volledig verzadigd zijn. Ook is DPPC het enige gemeten fosfolipide dat een smeltpunt hoger dan kamertemperatuur heeft[8].

POPC

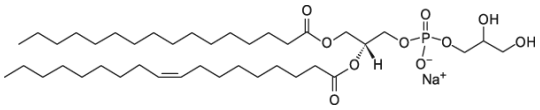
Het spectrum van POPC (Figuur 43) geeft sterke banden in het gebied tussen 2800 en 3000 cm^{-1}, die voornamelijk veroorzaakt worden door de $CH_{(1/2/3)}$ groepen in de vetzuurstaarten van het molecuurl (Figuur 33). In het gebied tussen 700 en 1800 cm^{-1} is nog een intense band rond 1438 cm^{-1}, welke veroorzaakt wordt door de CH_2 deformatie in het molecuul. Op 715 cm^{-1} is nog een herkenbare piek te zien die veroorzaakt wordt door de choline groep in de kopgroep van het POPC.



Figuur 33: Structuurformule van POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylcholine)[8]

POPG

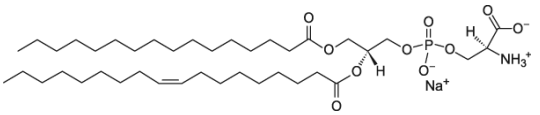
Het spectrum van POPG (Figuur 44) is ook herkenbaar als een lipide door de intense banden tussen 2800 en 3000 cm^{-1} door de karakteristieke $CH_{(1/2/3)}$ groepen (Figuur 34). Opvallend is dat naast de piek op 1436 (CH_2 deformatie) er geen intensieve banden aanwezig zijn in het spectrum. Dit komt doordat de kopgroep bestaat uit een koolwaterstofketen met CH_2 groepen. Deze groepen komen ook voor in de vetzuurstaarten en versterken de signalen, die al door de vetzuurstaarten werden gemaakt.



Figuur 34: Structuurformule van POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylglycerol)[8]

POPS

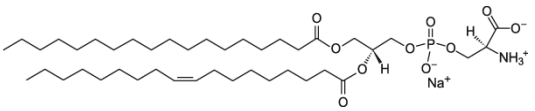
POPS bevat een dubbele binding in de vetzuurstaarten en een koolstofketen in de kopgroep (zie Figuur 35). In het spectrum van POPS (Figuur 46) zien we de structuur van de vetzuurstaarten terug in het gebied van 2800 tot 3000 cm^{-1}. In dit gebied spelen vooral de $CH_{(1/2/3)}$ groepen een grote rol in het vormen van het spectrum. Kijkend naar de rest van het spectrum is er alleen nog een intensieve band op 1435 cm^{-1} die veroorzaakt wordt door CH_2 deformatie en op 1653 cm^{-1} (C=O) van de ester groep tussen de glycerol en de vetzuurstaarten en in de serine kopgroep van de lipide.



Figuur 35: Structuurformule van POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylserine)[8]

SOPS

Het spectrum van SOPS (Figuur 45) wordt gekenmerkt door de intense pieken van $CH_{(1/2/3)}$ tussen 2800 en 3000 cm^{-1} en een paar piekjes rond de 1063, 1299 en 1439 cm^{-1}. Deze pieken worden veroorzaakt door respectievelijk C-C rek, CH_2/CH_3 draaiing en buiging en CH_2 deformatie. Opvallend is dat juist deze signalen hier intenser voorkomen dan in de spectra van de andere lipiden met gelijke groepen (bv. POPS en POPG) terwijl er weinig veranderd is in de structuur van het molecuul (Figuur 36). Dit wordt komt doordat de lipide staart meer CH_2 groepen bevat dan de andere fosfolipiden.



Figuur 36: Structuurformule van SOPS (1-stearoyl-2-oleoyl-fosfatidylserine)[8]

Lipide kopgroepen

De spectra van lipiden met dezelfde kopgroepen worden vergeleken met elkaar om zo de bijdrage van de verschillende kopgroepen aan het Raman signaal te bepalen. Allereerst wordt er van de verschillende metingen van de lipiden een gemiddeld spectrum gemaakt. Dit spectrum wordt geïntegreerd tot een totaal oppervlak van 1. Meerdere spectra met een oppervlak van 1 worden in één grafiek geplaatst en zo vergeleken. Op deze manier wordt is de invloed van de verschillende banden beter in verhouding te plaatsen.

Fosfatide zuur (PA)

De kopgroep van fosfatide zuur is, wat structuur betreft, de eenvoudigste kopgroep die we gemeten hebben (zie Figuur 28). In Figuur 47 zijn alle metingen aan lipiden met een DO-staart tegen elkaar uitgezet en zullen de verschillen in de spectra alleen veroorzaakt worden door de verschillende kopgroepen. De band rond 885 cm^{-1} wordt veroorzaakt door de C-O-C groepen in de kopgroep, onderdeel van de esterbindingen tussen glycerol en de vetzuren. Rond 1737 cm^{-1} is er een band zichtbaar die overeenkomt met de estergroep tussen de verzuurstaarten en de glycerolgroep. Deze signalen komen voor in een verhouding van 6:4 % van het maximale signaal. De overige signalen van de spectra zijn niet direct veroorzaakt door de fosfatidezuur kopgroep van de lipide.

Fosfatidylcholine (PC)

De kopgroep van fosfatidylcholine bevat een cholinegroep, deze groep is verantwoordelijk voor het verschil tussen de spectra van DOPA en DOPC (zie Figuur 47). De banden die in alle metingen van alle fosfatidylcholine-bevattende groepen (zie Figuur 49) voorkomen, worden ook door deze groep veroorzaakt. Hieruit blijkt dat de piek rond 717, 875 en 1083-95 cm^{-1} volledig wordt veroorzaakt door de cholinegroep. Het signaal van de estergroep rond cm^{-1} is ook hier herkenbaar. Echter het signaal van de estergroep rond 885 cm^{-1} dat bij fosfatide zuur herkenbaar is, wordt door het naburige signaal van choline op 875 cm^{-1} overheerst en is hierdoor niet herkenbaar in fosfatidylcholine. De verhouding van intensiteit van de signalen van rond 717, 875 1083-95 en 1727 cm^{-1} is respectievelijk 8/6/8/4 % van het maximale signaal.

Fosfatidylglycerol (PG)

De banden die gevormd worden in zowel DOPG én POPG voorkomen (zie Figuur 50), zijn gevormd door de fosfatidylglycerol kopgroep van de lipiden. De overeenkomstige banden rond 1739 cm^{-1} worden gevormd door de esterverbindingen tussen de kopgroep en de lipiden. De andere gelijkvormige signalen van Figuur 50 worden veroorzaakt door de lengte en onderdelen van de staartgroepen. De intensiteit van de band op 1739 cm^{-1} is bij POPG gelijk aan de intensiteit van de band op 1654 cm^{-1}, maar bij DOPG slechts half zo groot (4 % van maximale signaal).

Fosfatidylserine (PS)

De serine kopgroepen in DOPS, POPS en SOPS leveren weinig overeenkomstige signalen (zie Figuur 52). In het gebied rond 1738 cm^{-1} is wel weer het signaal van de estergroep duidelijk zichtbaar in alle metingen (4,5% van maximum). Maar in andere gebieden zijn geen banden die volledig overeenkomstig zijn en tevens herleid kunnen worden naar de kopgroep.

Lipide staartgroepen

De Raman spectra van lipiden met dezelfde staartgroepen worden met elkaar vergeleken. van de overeenkomstige signalen van de staartgroepen wordt besproken door welke structuur deze banden veroorzaakt worden. Deze analyse wordt uitgevoerd op basis van één gemiddeld spectra van alle verschillende metingen van dezelfde lipide. Deze gemiddelde spectra worden genormaliseerd zodat het oppervlak onder het spectrum gelijk is aan 1. Deze normalisatie gebeurt om de invloed van elke band beter in perspectief te kunnen plaatsen.

1,2-dioleyl (DO)

Kijkend naar de spectra van alle lipiden met DO staartgroepen, is de invloed van de staartgroep bepalend voor het spectrum. Tussen 2700 en 3100 cm^{-1} zijn de signalen van DOPA, DOPC en DOPS gelijkvormig (zie Figuur 47), maar het signaal van DOPG wijkt af van de andere signalen. Het spectrum heeft hier dezelfde vorm, onafhankelijk van de aanwezige kopgroep, en is geheel toe te schrijven aan de staartgroep. De DO-staartgroep bevat in beide staarten één dubbele binding, wat ervoor zorgt dat de piek van de staartgroep rond 2900 cm^{-1} brengt, omdat deze band veroorzaakt wordt door CH strekken in de lipide.

Rond de 1268 cm^{-1} is er alleen bij de DO groepen een piek te herkennen. Deze piek is toe te schrijven aan de =C-H bij een dubbele binding en is alleen te herkennen bij de DO groepen. De PO en SO groepen, waarbij een zelfde structuur maar half zo vaak voorkomt, geven bij de 1268 cm^{-1} geen zichtbare Ramanbijdrage.

De banden 870, 1268, 1300, 1438 en 1655 cm^{-1} worden veroorzaakt door de staartgroep die aanwezig is. De verhouding tussen deze banden is 3/2/4/6/3 en de verhouding tussen de pieken rond 2900 cm^{-1} en 870 cm^{-1} is 18:1.

1,2-dipalmitoyl (DP)

In het spectrum van alle fosfatidylcholine spectra (zie Figuur 49) is de invloed van de 1,2-dipalmitoyl groep te herkennen. De kopgroep is voor alle lipide metingen hetzelfde en alleen de staartgroepen verschilt per lipide. Het karakteristieke verschil tussen de signalen wordt dan ook veroorzaakt door de lipidestaarten. De DP lipide staarten bevatten geen dubbele bindingen en alleen maar CH_2- en CH_3-groepen.

De banden rond 1060, 1294 en 1438 cm^{-1} worden veroorzaakt door CH_2- en CH_3- groepen en C-C strekking. De intensiteitsverhoudingen van deze banden zijn 5/6/14 % van de maximale piek. Rond 1650 cm^{-1} ontbreekt de band die in spectra van de andere lipiden wel voorkomt, omdat er geen C=C bindingen in de vetzuurstaarten aanwezig zijn. In het gebied tussen 2800 en 3000 cm^{-1} is er een groter verschil tussen de CH_3 (2845 cm^{-1}, intensiteit van de band 88) en de CH_2 (2879 cm^{-1}, intensiteit van de band 100) pieken in dit gebied (zie Figuur 49).

1-palmitoyl-2-oleoyl (PO)

In de staarten van de PO-lipiden zit maar één dubbele binding in de staartgroep per lipide (zie Figuur 33). In het gezamelijke spectrum van alle lipiden met PO-staarten worden de overeenkomstige signalen veroorzaakt door de staartgroepen (zie Figuur 48). De PO banden liggen rond 1062, 1298, 1435, 1655, 2846 en 2881 cm^{-1} met de relatieve intensiteit: 5/7/14/4/95/100.

De band rond 1655 cm^{-1} is bij de PO-lipiden half zo groot als dezelfde band bij DO lipiden (zie Figuur 49). Dit omdat er bij de PO-lipiden maar één dubbele binding in de staarten aanwezig en bij de DO-lipiden zijn dit er twee. In het gebied van en 3100 cm^{-1} zijn de signalen van POPG en POPS gelijkvormig terwijl POPC eruit springt. De banden bij POPG en POPS zijn intenser, terwijl de band bij POPC vlakker en breder is.

1-stearoyl-2-oleoyl (SO)

Lipiden met SO staartgroepen hebben twee vetzuurstaarten van elk 18 koolstofatomen (zie Figuur 52) en maar één dubbele binding in de staartgroep. In Figuur 52 zijn de spectra van fosfatidylserine lipiden tegen elkaar uitgezet en hieruit is het aandeel van de SO-groep uit SOPS te filteren.

De banden die behoren tot de SO-groep zijn 1032, 1062, 1100, 1296, 1454 en 1653 cm^{-1}. Deze behoren bij de CH_2-ketens in de vetzuurstaarten en de piek van 1653 cm^{-1} behoort bij de C=C binding in de staartgroep. De verhoudingen van deze banden zijn 5/9/8/10/12/5. Doordat er maar 1 binding aanwezig is, is de intensiteit van deze band ook drie keer zo klein als de band van de DO-groep, waar een tweetal dubbele bindingen aanwezig is.

Het signaal is tussen 2700 en 3100 cm^{-1} is gelijkvormig aan het signaal van POPS, stijl en intens, terwijl DOPS breed en vlak is.

Conclusies

In dit hoofdstuk zullen conclusies worden getrokken uit de resultaten en discussie van de verschillende Raman metingen die zijn verricht in de loop van het onderzoek.

Metingen van vesikels

Tijdens het bekijken van de vesikels met behulp van fluorescentiemicroscopie blijkt dat er vesikels zijn gevormd van verschillende grote, varierend van 3 tot 10 µm in doorsnee. Een aantal vesikels waren gebarsten, maar het overgrote deel van de vesikels was intact en kon met de microscoop bekeken worden.

Tijdens de Ramanmetingen van deze vesikels kwam een ander probleem aan de orde. In de Raman opstelling verplaatst het vesikel zich door de oplossing en is het moeilijk om de vesikels direct te meten. Als het vesikel wordt beschenen met het laserlicht vertraagd het vesikel enigzins, maar het blijft niet lang aanwezig in de laserbundel. De signalen die gemeten worden van de vesikels, worden overheerst door signaal van de sucrose oplossing waar de vesikels in gevormd en in opgelost zijn.

Het is duidelijk mogelijk om vesikels te maken uit een lipide oplossing in chloroform, maar vesikels gemaakt middels de huidige lijken niet geschikt voor een Raman en.

Metingen van lipiden in een spacer

Bij de metingen van de lipiden in een spacer is de acrylaatlijm, die de spacer op zijn plek moet houden, uitgelopen en gemengd met de lipiden in het meetgebied. Uit het signaal uit de spacer en de lipiden is het lipide signaal nog wel vaag te herkennen, maar het Ramansignaal van de spacer levert pieken die het lipidesignaal overheersen. Door mogelijke overlappende banden van het lipide en het acrylaatsignaal, is het niet mogelijk om uit deze metingen het lipide signaal te identificeren. Het gebruik van een spacer bemoeilijkt in dit geval juist het analyseren van metingen.

Metingen van lipide druppels

Het uitvoeren van Ramanmeting aan gecondenseerde lipiden levert duidelijke spectra voor de verschillende lipiden. Er waren geen moeilijkheden om het signaal te herkennen uit de meting en met de uitgevoerde kalibraties werd er een duidelijk signaal verkregen. Met behulp van naslagmateriaal[32], kunnen de belangrijkste Raman banden toegekend worden aan groepen die in de structuurformule van de lipiden aanwezig waren. De maximale pieken van het spectrum lagen altijd tussen de 2850 en 2885 cm^{-1}, welk gebied overeenkomt met het CH strekgebied.

Alle lipiden met fosfatidylcholine kopgroepen zijn duidelijk te herkennen uit de Raman spectra door de choline banden rond 717 en 875 cm^{-1}. Deze banden hebben een amplitudeverhouding van 5-8 % van de maximum piek van het volledige spectrum. Kijkend naar het spectrum van DPPC, in vergelijking met de andere gemeten lipiden met een fosfatidylcholine kopgroep (Figuur 49), zien we dat DPPC inverhouding tot de andere lipiden een hogere intensiteit heeft voor de band op 717 cm^{-1}. Dit is te verklaren omdat bij DPPC beide vetzuurstaarten maar 16 koolstofatomen lang zijn, terwijl in de andere lipide er tenminster één vetzuurstaartgroep is die 18 koolstofatomen bevat. Per lipide is er maximaal één choline kopgroep, terwijl de vetzuurstaartgroepen nog van lengte kunnen veranderen. De verhouding van de banden op 717 en 875 cm^{-1} en de maximale piek in het CH strekgebied is zodoende een indicatie van de lengte van de staartgroepen van de lipide.

De fosfatidylserine en fosfatide zuur kopgroepen hebben een COO^- groep aan het uiteinde van de kopgroep, hierdoor zijn hun banden rond 1652 cm^{-1} iets hoger in vergelijking tot de andere gemeten kopgroepen (zie Figuur 47). In vergelijking met het maximum van het spectrum zijn de banden bij 1652 cm^{-1} ongeveer 3% hoger dan spectra, in vergelijking tot de maximum gemeten waarde van de lipide. Andere verschillen in de Raman spectra tussen de verschillende kopgroepen zijn er niet gevonden.

Het identificeren van de banden behorende bij verschillende staartgroepen bleek lastiger te zijn dan verwacht. Dit kom omdat er op maximaal één dubbele binding per vetzuurstaart aanwezig was en dat de meeste vetzuurstaarten ook even lang waren. Met meerdere dubbele bindingen per vetzuurstaart, of meer afwijkende vetzuurstaart lengten verandert het Ramansignaal ook en is deze verandering toe te schrijven aan de veranderde groep in de vetzuurstaart.

De DO-lipiden hadden een dubbele binding in beide vetzuurstaarten en hierdoor leverden ze rond 1654 cm^{-1} ook een signaal dat tweemaal zo hoog was dan dat van PO, een lipide waarbij er per molecuul maar één dubbele binding in de vetzuurstaarten aanwezig was (zie Figuur 49). Dit signaal dat bij DO door de C=C binding werdt geleverd was 13% van de maximale waarde en bij PO was dit slechts 4% van de maximale waarde. Een deel van de bijdrage aan de band rond de 1654 cm^{-1} kan toegeschreven worden aan de estergroepen die aanwezig waren bij de lipide. Het is echter duidelijk dat een C=C binding, per binding, meer invloed heeft op de piek, dan een estergroep. Dit is terug te zien bij de DP-metingen waar er geen C=C bindingen in de staart aanwezig zijn, maar wel twee estergroepen. Hier is nog wel een kleine band zichtbaar in het spectrum, maar onder de 3% grens van het signaal.
Ook hebben de DO-groepen nog een band bij 1270 cm^{-1}, die hier duidelijk herkenbaar is (zie Figuur 49). Deze band wordt veroorzaakt door de =C-H groepen van de dubbele binding en is niet te herkennen als een band bij de PO groepen waar er maar één dubbele binding aanwezig is. Bij DPPC is helemaal geen spraken van een verhoging van het signaal rond deze waarde. Deze band van de DO-lipiden ligt tussen 5 en 12 % van het maximale signaal, afhankelijk van welke kopgroep meting er werd gebruikt om dit te vergelijken.

De DP-lipiden hebben helemaal geen dubbele binding in de vetzuurstaarten (Figuur 32), hierdoor is er geen afwijkende configuratie van de lipide staarten mogelijk en zijn alle lipiden netjes te ordenen. Door de gerangschikte structuur heeft DPPC een hoger smeltpunt dan de andere lipiden en is deze in een andere fase[8] tijdens het uitvoeren van de meting. Dit is ook terug te zien in de grafiek waar alle fosfatidylcholine lipiden worden vergeleken (Figuur 49). Kijkend naar het gebied tussen 1050 en 1150 cm^{-1} valt op dat in de DOPC en POPC metingen er maar 2 banden aanwezig zijn met weinig terugval. Het signaal van DPPC heeft hier echter een drietal banden aanwezig zijn met een grote terugval en stijle hellingen. De banden in dit gebied van alle fosfatidylcholine lipiden worden veroorzaakt door de C-C strekking, maar bij DPPC wordt ook een groter deel van het signaal veroorzaakt door de C-N vibraties in het molecuul. Een splitsing van een brede band tussen 1050 en 1150 cm^{-1}, in drie pieken is een indicatie van een andere fase van de lipide.
Omdat het smeltpunt van DPPC op 44^oC ligt[8] en de smeltpunten van de andere lipiden onder de 18^OC ligt[8], is te concluderen dat het DPPC zich in de vloeibare kristalfase bevindt terwijl de andere gemeten fosfolipiden zich in de gelfase bevindt.

Aanbevelingen

In een vesikel zijn de lipiden waarschijnlijk anders gerangschikt dan dan wanneer de lipiden opdrogen vanuit hun oplossing in chloroform. Deze andere rangschikking wordt veroorzaakt door andere fysische bindingen die de lipiden in een bepaalde structuur forceren. Deze fysische bindingen hebben invloed op de vrijheid en de reactiviteit van de aanwezige groepen in de lipide, waardoor de groepen anders zullen reageren. Waarschijnlijk zullen de groepen daarom ook een ander signaal veroorzaken bij een Ramanmeting. Om te kijken of er een verandering van het lipide signaal optreedt bij lipiden in vesicles, zou er een hogere concentratie van lipiden gebruikt kunnen worden. Ook een keuze voor een ander polair oplosmiddel dat een minder intens of juist een specifiek Ramansignaal levert, is al een hele vooruitgang in vergelijking tot sucrose. Denk bijvoorbeeld aan water, waarbij voornamelijk interacties in het O-H gebied (3300-3500 cm^{-1}) te verwachten zijn. Het oplosmiddel heeft minder invloed op het signaal, zo krijg je juist het signaal van de lipiden in hun vesikels.

Een grote hindernis bij het meten aan lipide vesikels is dat de vesikel constant in beweging is. Door te zorgen dat er in het meetvolume van de laserbundel altijd een aantal vesikels aanwezig zijn, maakt het niet uit dat er beweging in het oplosmiddel is. Dit kan gedaan worden door de concentratie van de lipiden in de oplossing te verhogen. Het maakt ook niet uit hoe groot de vesikels nu worden, als er maar altijd een aantal in het meetvolume aanwezig zijn. Dit heeft als voordeel dat je geen GUV's hoeft te maken, alle vesikels volstaan in principe.

Het meten van de lipiden met behulp van een spacer is volstrekt onnodig. Het idee van een spacer was dat de lipiden op een kleine concentratie opgehoopt werden, voordat de chloroform verdampte. Echter, door de vluchtigheid van de chloroform op een voorverwarmde plaat verdampt de chloroform al snel genoeg en is het niet nodig om een spacer te gebruiken om het volume in te perken. Het volume lipiden kan nog verder beperkt worden door in plaats van een pipetpunt een naald te gebruiken om de lipide oplossing op een plaat te plaatsen. Zo kan een nog kleiner oppervlak verkregen worden en met eenzelfde volume van de oplossing vormt zich een dikkere laag lipiden om zo het meetvolume beter te vullen.

In totaal zijn er 9 metingen uitgevoerd, aan respectievelijk fosfolipiden met 4 verschillende kopgroepen, 4 verschillende staartgroepen, alsmede een meting aan het sterol cholestorol,. Door de grote verscheidenheid aan lipiden was het lastig om alle verschillen goed in kaart te brengen. Het was in veel gevallen niet mogelijk om met zekerheid de verschillen toe te kennen aan een bepaalde kop- of staartgroep omdat er weinig duidelijke verschillen bestaan tussen de diverse groepen. Door meer metingen de maken van dezelfde kop-en-staart groepen, dus elke combinatie tussen kop- en staartgroepen die mogelijk is, is er met grotere zekerheid te zeggen dat een signaal specifiek is voor een bepaalde groep.

Literatuurlijst

1 Pully, V. V., Lenferink, A. & Otto, C. Hybrid Rayleigh, Raman and two-photon excited fluorescence spectral confocal microscopy of living cells. *Journal of Raman Spectroscopy* 41, 599-608, doi:10.1002/jrs.2501 (2010).

2 Villarreal, M. R. Vol. 331x407 (ed Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg) ross section of the diferent strctures that phospholipids can take in a aqueous solution. The circles are the hydrophilic heads and the wavy lines are the fatty acyl side chains. (2007).

3 Zhao, L. & Feng, S. S. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *Journal of Colloid and Interface Science* 285, 326-335, doi:10.1016/j.jcis.2004.11.032 (2005).

4 Sam. *Phospholipid*, <http://alevelnotes.com/content_images/i38_phospholipid.gif> (

5 Cox, N. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. edn, (2000).

6 SuperManu. (ed Liposome scheme-en.svg) (2007).

7 Marieb, E. N. & Hoehn, K. *Human Anatyomy & Physiology*. Seventh Edition edn, (Pearson Education, Inc, 2004).

8 *Avanti Polar Lipids*, <http://www.avantilipids.com> (2011).

9 SuperManu. (ed Micelle_scheme-en.svg) (2007).

10 Physchim62. (ed Sucrose CASCC.png) A representation of the structure of sucrose as shown on CAS Common Chemistry. (2009).

11 B., L. *General structure of a phospholipid*, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phospholipid.svg> (2005).

12 Statistiek, C. B. v. d. Doodsoorzaken; maand en jaar van overlijden, 2011).

13 Cicoira, M. *et al.* Body mass index, prognosis and mode of death in chronic heart failure: Results from the Valsartan Heart Failure Trial. *European Journal of Heart Failure* 9, 397-402 (2007).

14 Poirier, P. *et al.* Bariatric surgery and cardiovascular risk factors: A Scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 123, 1683-1701 (2011).

15 Lennie, T. A. Nutritional recommendations for patients with heart failure. *Journal of Cardiovascular Nursing* 21, 261-268 (2006).

16 Le, T. T., Huff, T. B. & Cheng, J. X. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* 9, doi:10.1186/1471-2407-9-42 (2009).

17 Sommezer, M. & Oktay, K. Fertility reservation in female patients. *Human Reproduction Update* 10, 251-266 (2004).

18 Fujita, K. & Tsujimura, A. Fertility preservation for boys with cancer. *Reproductive Medicine and Biology* 9, 179-184 (2010).

19 Bold, R. J., Termuhlen, P. M. & McConkey, D. J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology* 6, 133-142, doi:10.1016/s0960-7404(97)00015-7 (1997).

20 Dittrich, P. S. & Schwille, P. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 73, 829-837, doi:10.1007/s003400100737 (2001).

21 Bruice, P. Y. *Organic Chemistry*. (2006).

22 Dudkiewicz, A. *et al.* Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 30, 28-43, doi:10.1016/j.trac.2010.10.007 (2011).

23 Raman, C. V. & Krishnan, K. S. A new type of secondary radiation [11]. *Nature* 121, 501-502 (1928).

24 Atkins, P. & Paula, J. d. *Physical Chemistry, 8th edition*. (Oxford University Press, 2006).

25 Alberts, B. *et al. Essential Cell Biology, 2nd edition*. 740 (Garland Science, 2004).

26 Vance, D. E. & Vance, J. E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 5th edition. 1st edn, (2008).

27 Bacia, K. & Schweizer, J. *Practical Course: Giant Unilamellar Vesicles*, Technische Universitat Dresden, (2005).

28 Verkerk, G. *et al. Binas*. (Wolters-Noordhoff, 2004).

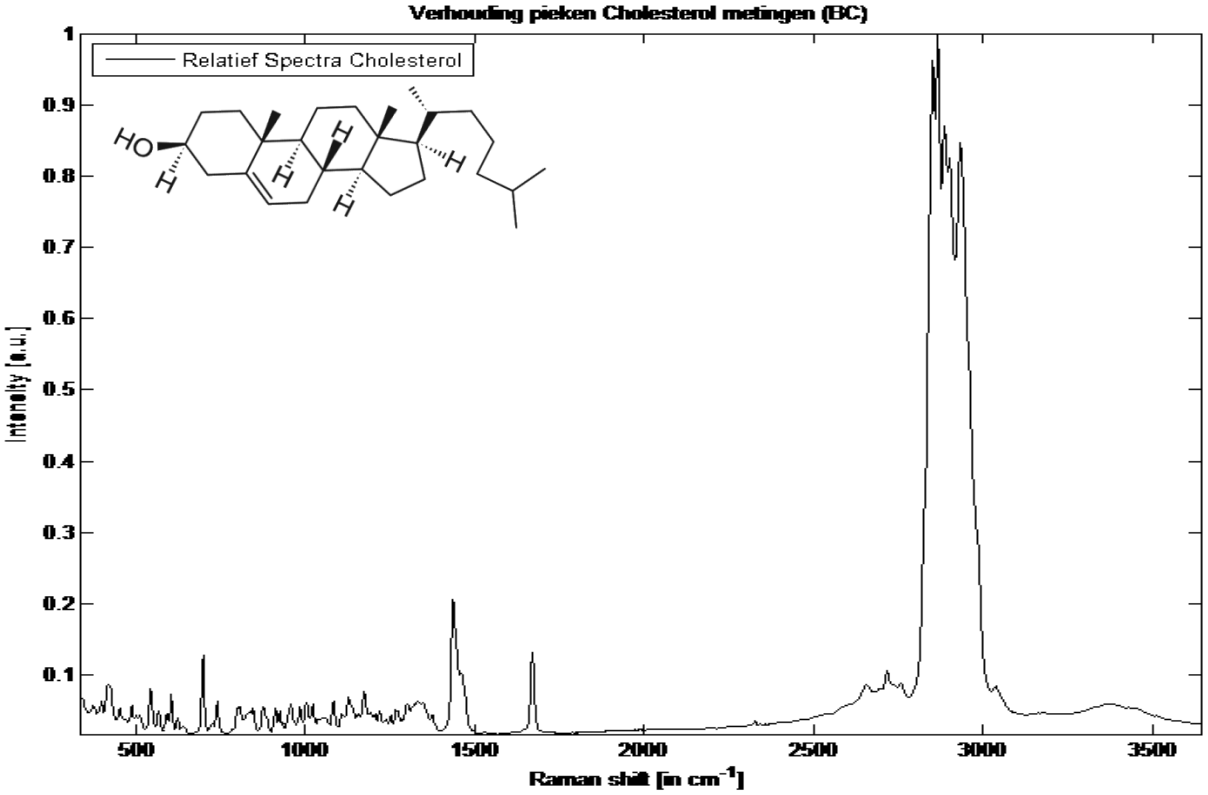
29 Purves, D. *et al. Neuroscience*. Fourth Editoin edn, (Sinauer Associates, Inc, 2008).

30 Rooijen, B. D. v. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INSIGHTS INTO INTERACTIONS OF OLIGOMERIC ALPHA-SYNUCLEIN WITH LIPID MEMBRANES, University of Twente, (2009).

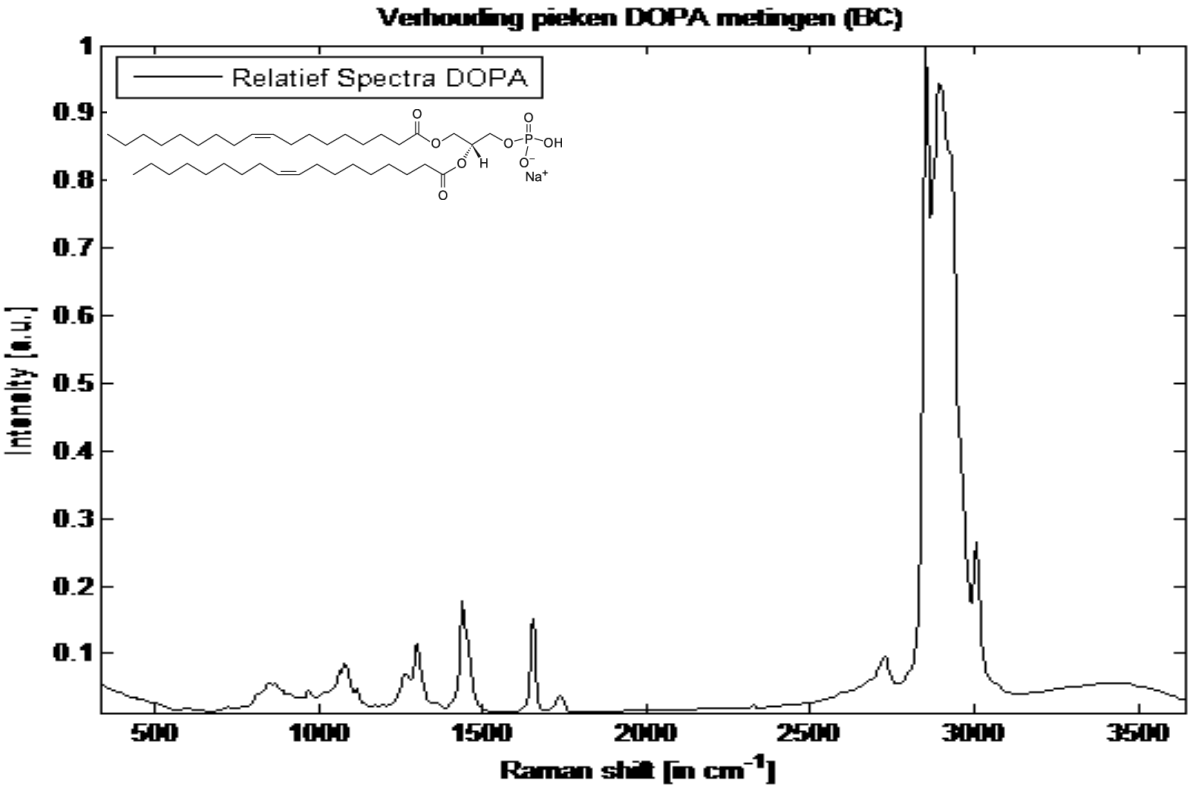
31 Hartsuiker, L. Microspectroscopic characterization of goldnanorod for cancer cell detection, (2011).

32 Movasaghi, Z., Rehman, S. & Rehman, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 42, 493-541 (2007).

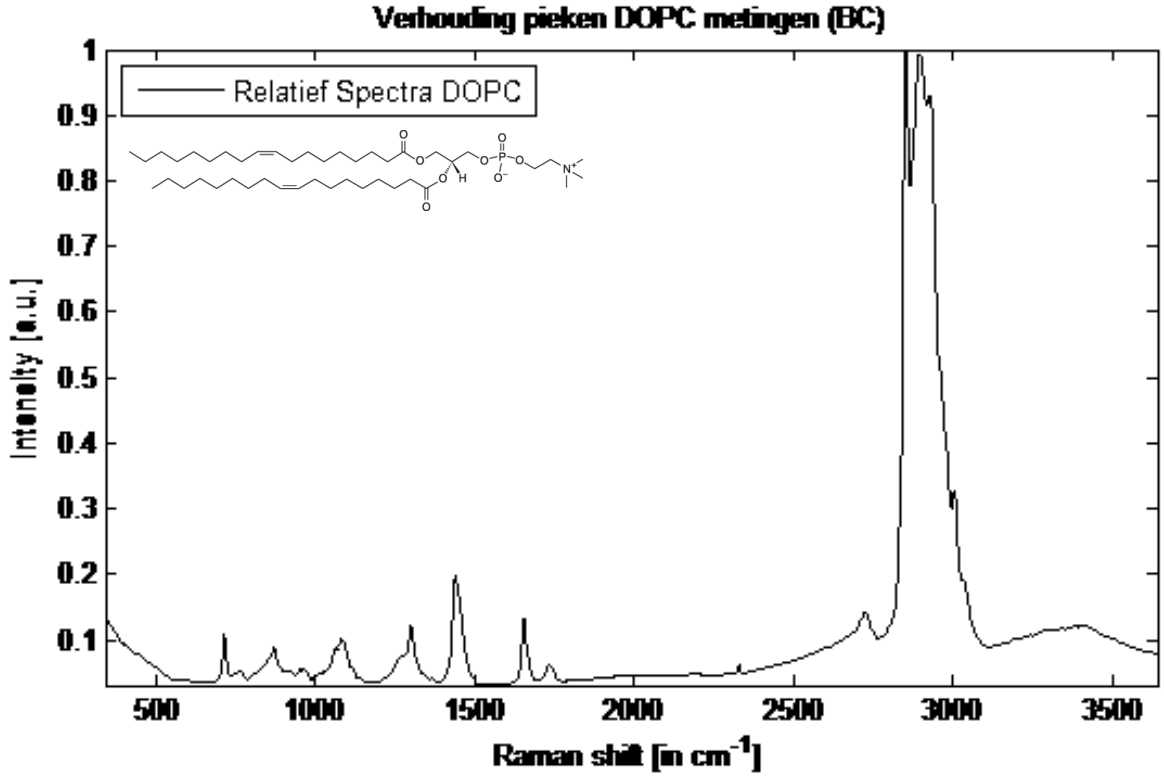
Appendix A – Lipiden spectra



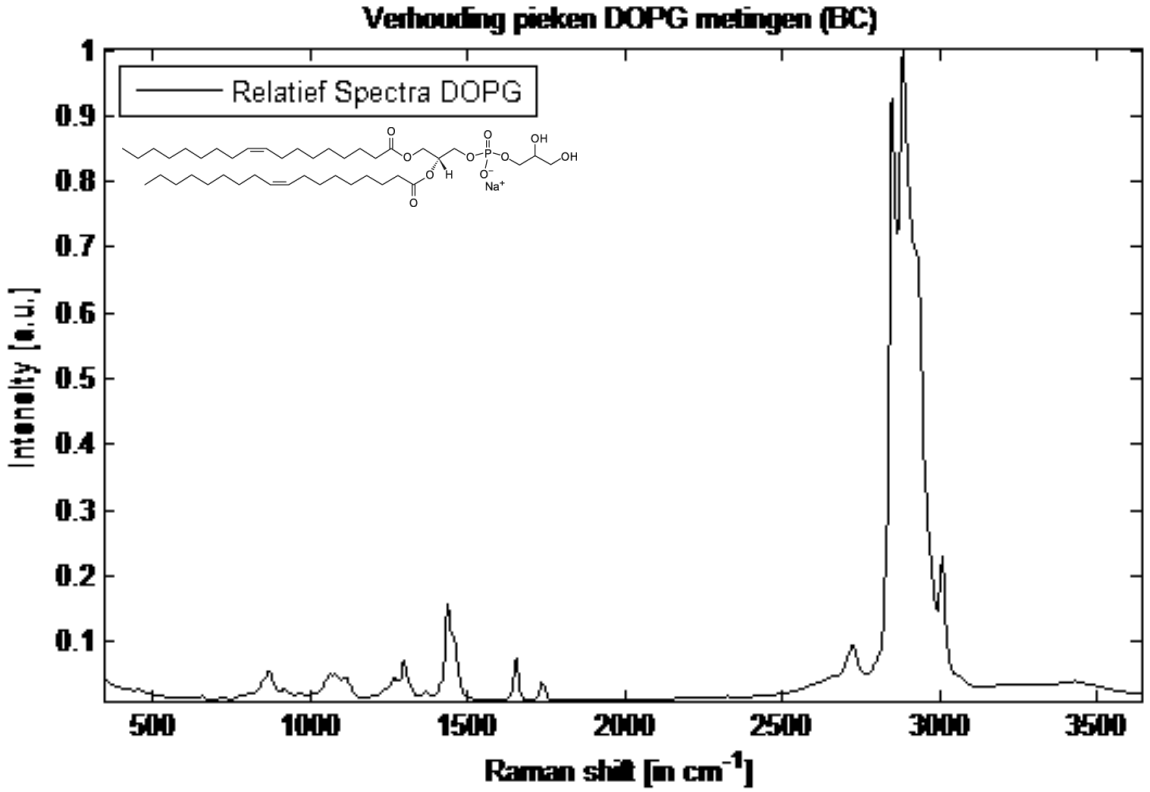
Figuur 37: Structuurformule[8] van cholecerol en gemiddelde spectrum van de cholesterol metingen



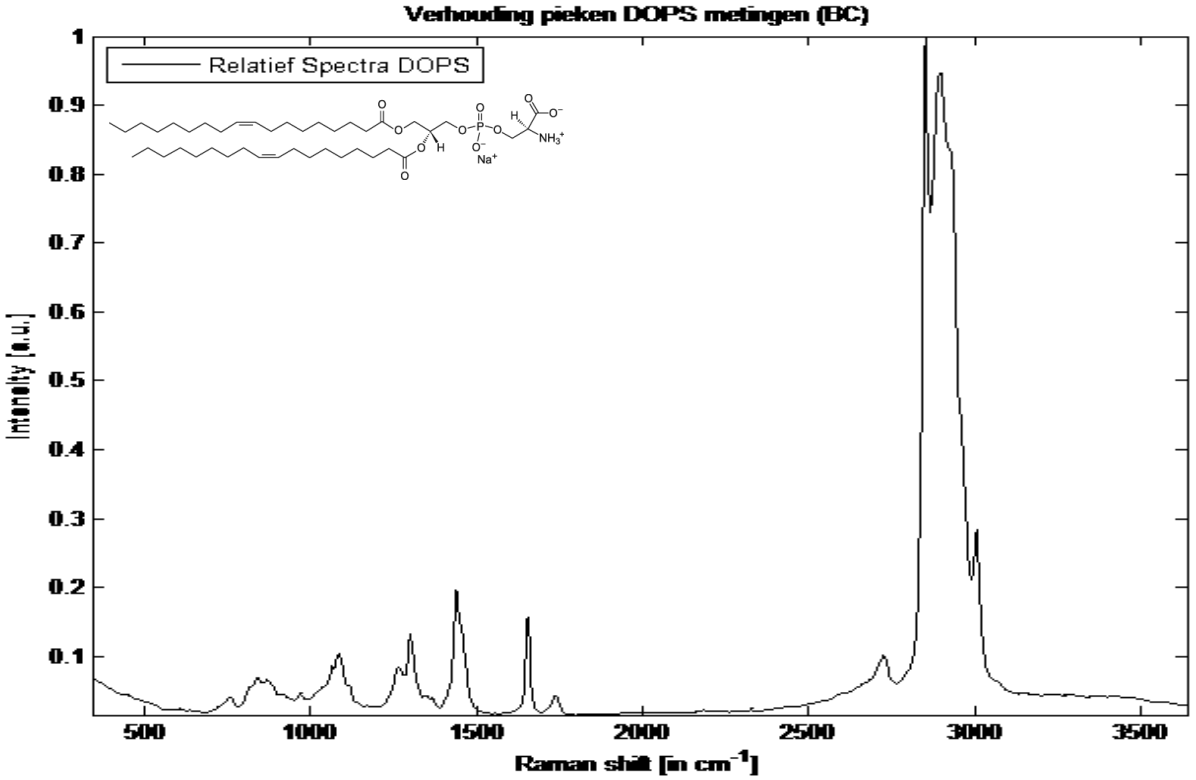
Figuur 38: Gemiddelde spectrum van de 1,2-dioleoyl-fosfatide zuur (DOPA) metingen met de structuurformule[8]



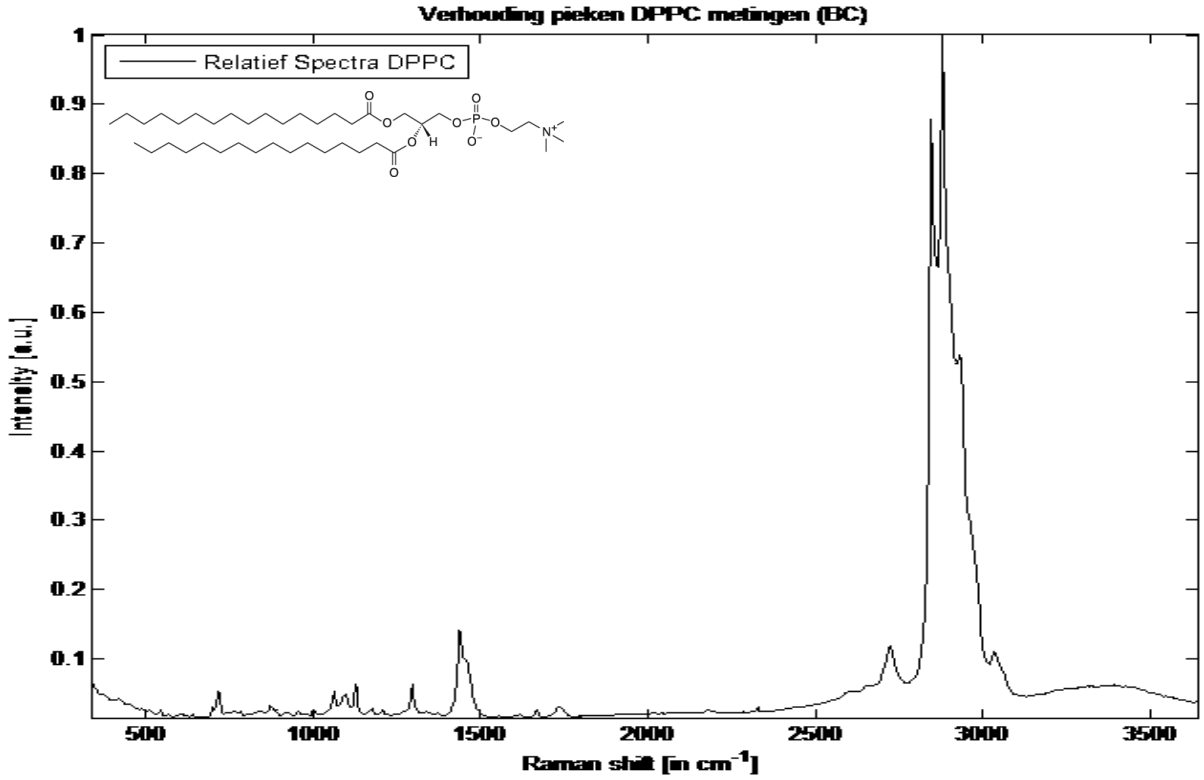
Figuur 39: Gemiddelde spectrum van de 1,2-dioleoyl-fosfatidylcholine (DOPC) metingen met de structuurformule[8]



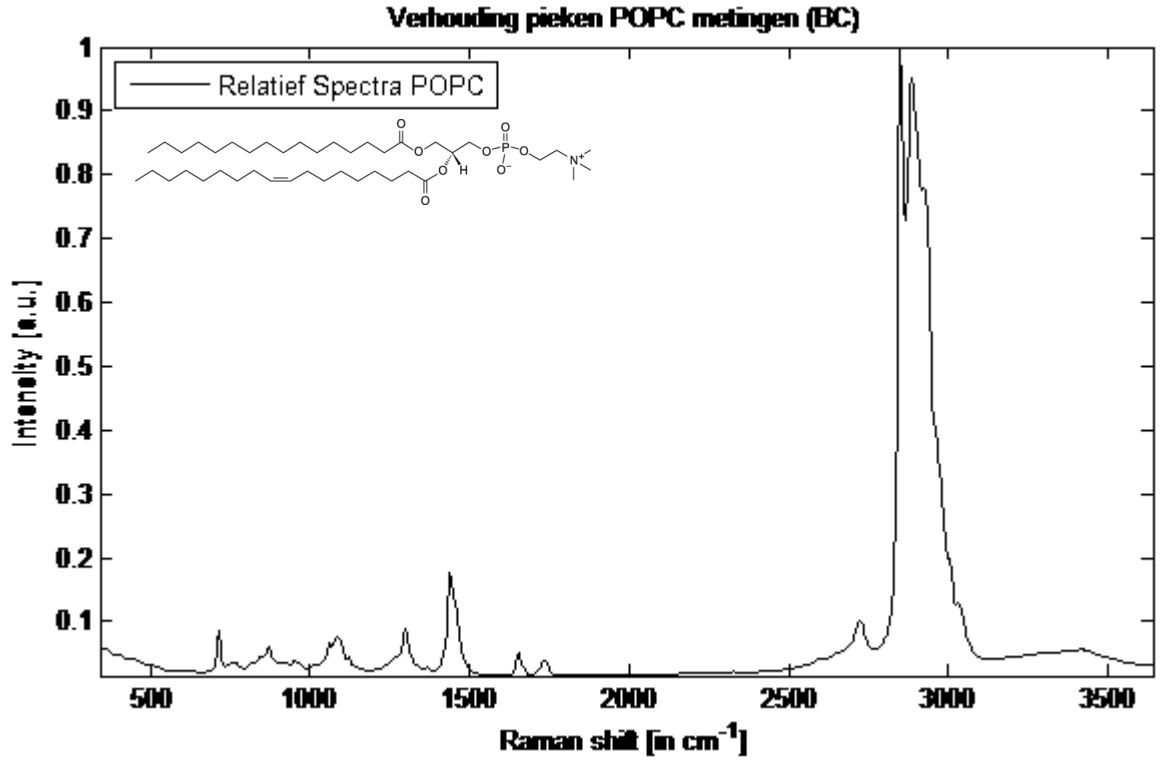
Figuur 40: Gemiddelde spectrum van de 1,2-dioleoyl-fosfatidylglycerol (DOPG) metingen met de structuurformule[8]



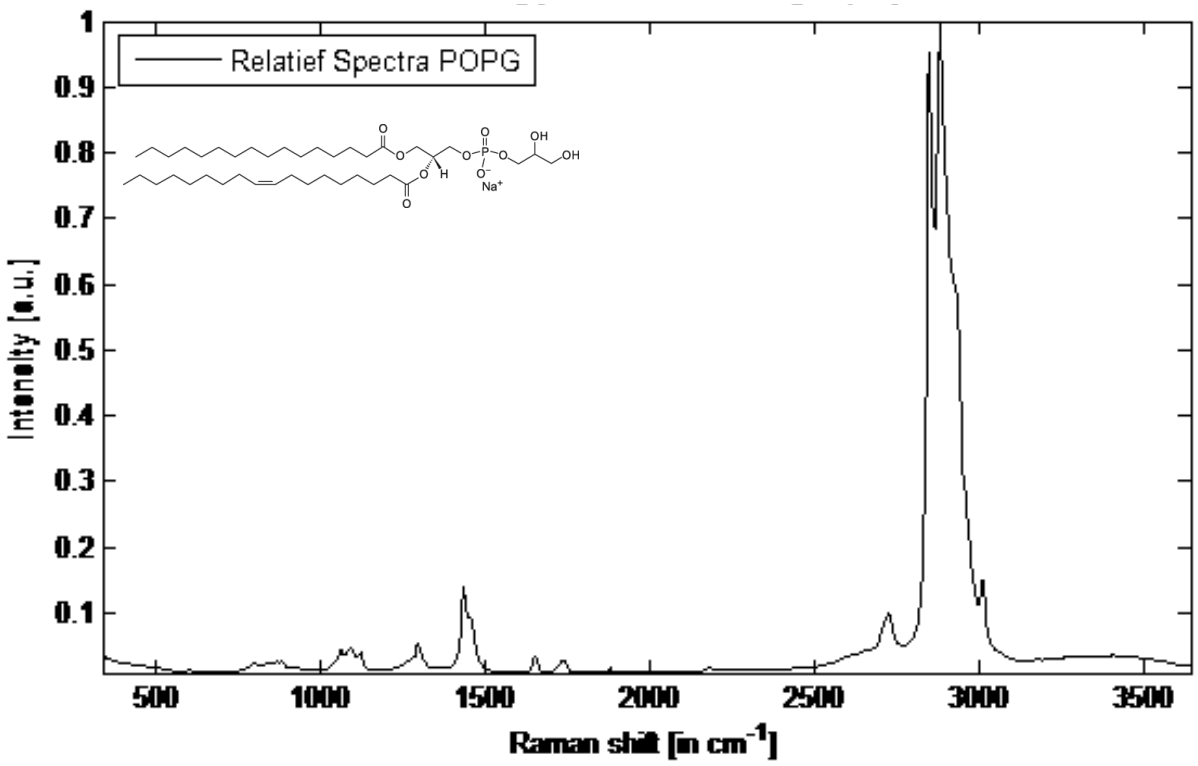
Figuur 42: Gemiddelde spectrum van de 1,2-dioleoyl-fosfatidylserine (DOPS) metingen met de structuurformule[8]



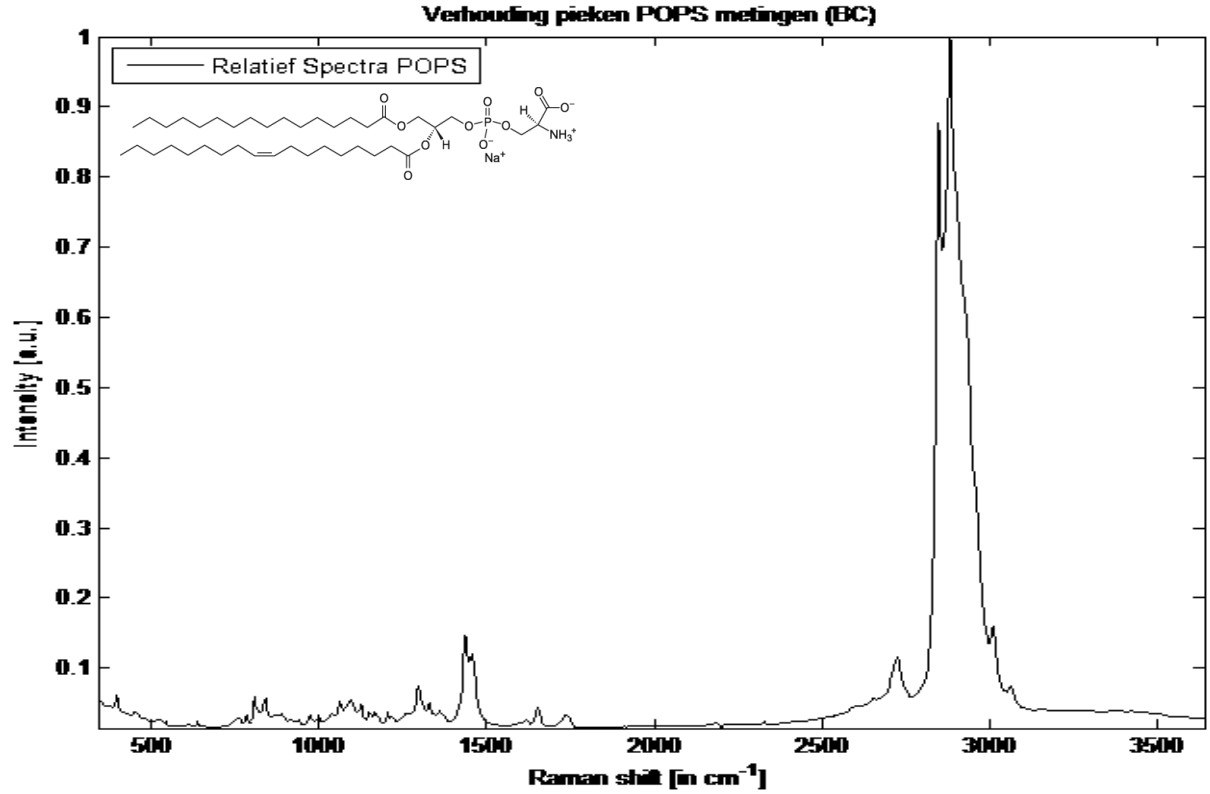
Figuur 41: Gemiddelde spectrum van de 1,2-dipalmitoyl-fosfatidylcholine (DPPC) metingen met de structuurformule[8]



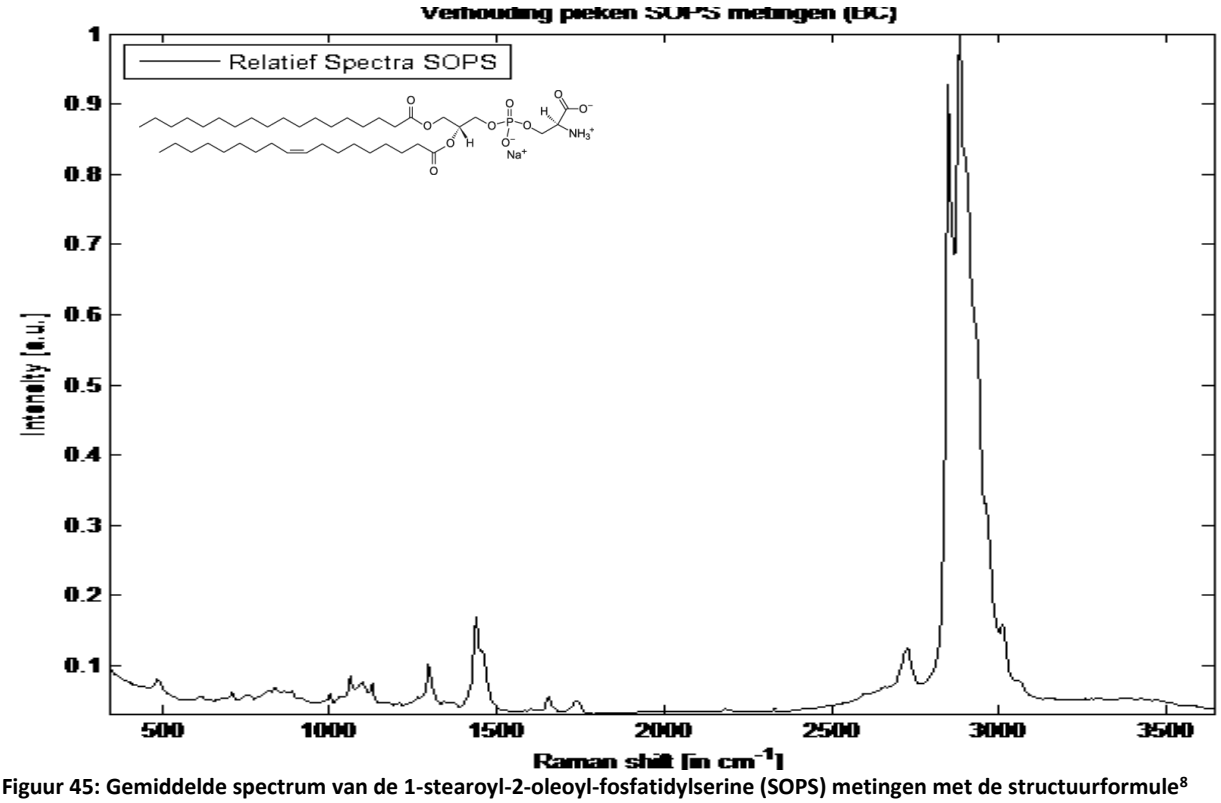
Figuur 43: Gemiddelde spectrum van de 1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylclorine (POPC) metingen met de structuurformule[8]



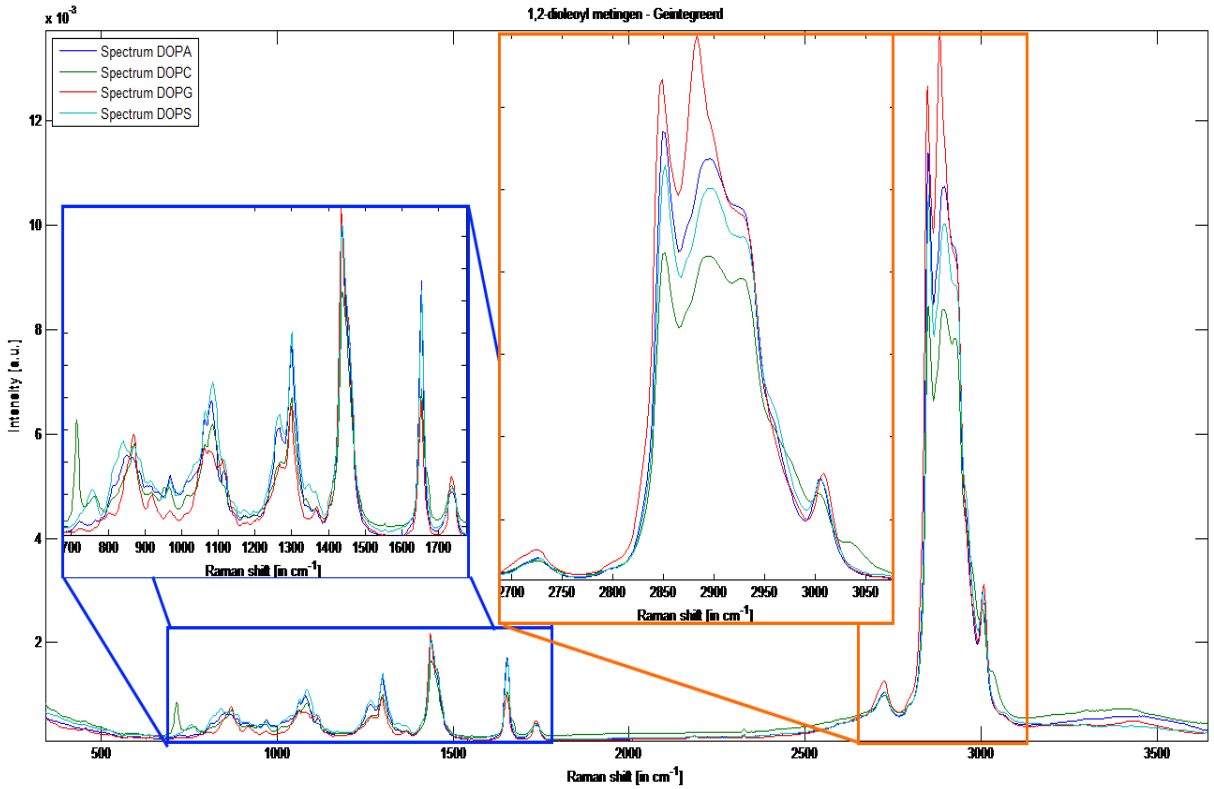
Figuur 44: Gemiddelde spectrum van de 1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylglycerol (POPG) metingen met de structuurformule[8]



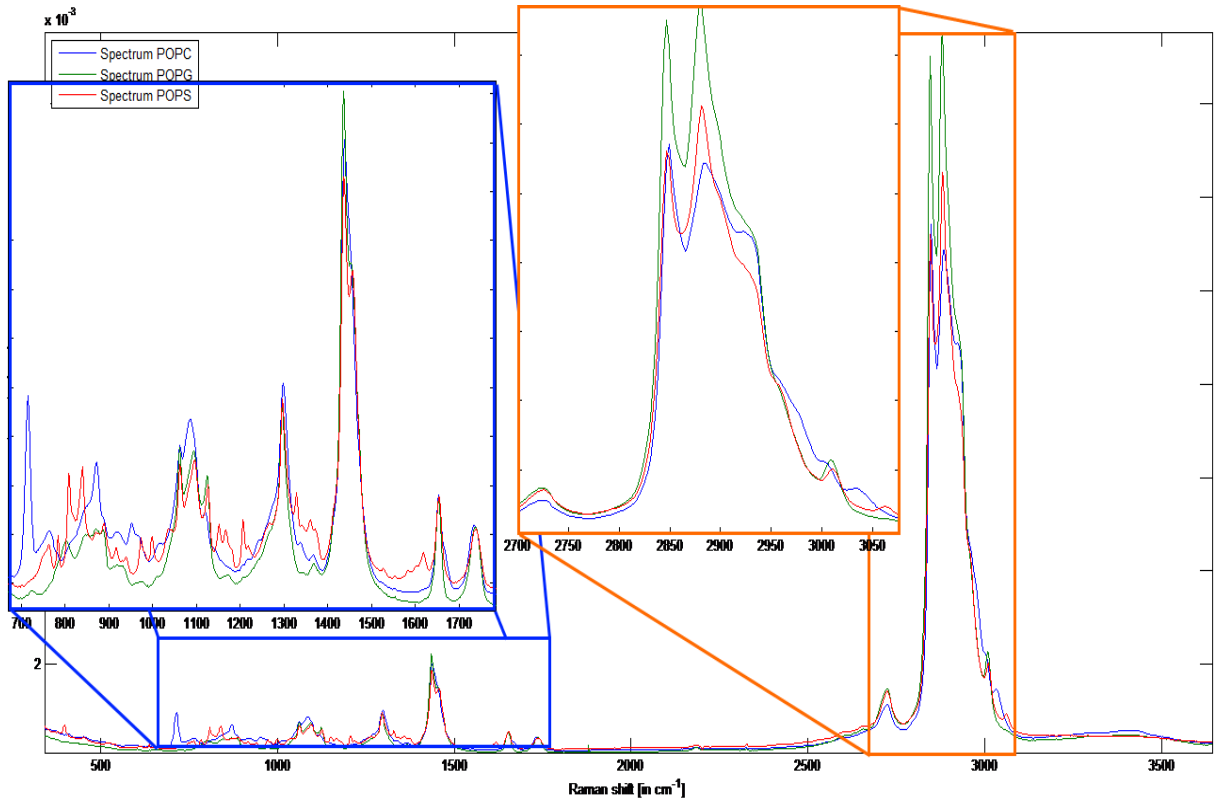
Figuur 46: Gemiddelde spectrum van de 1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylserine (POPS) metingen met de structuurformule[8]



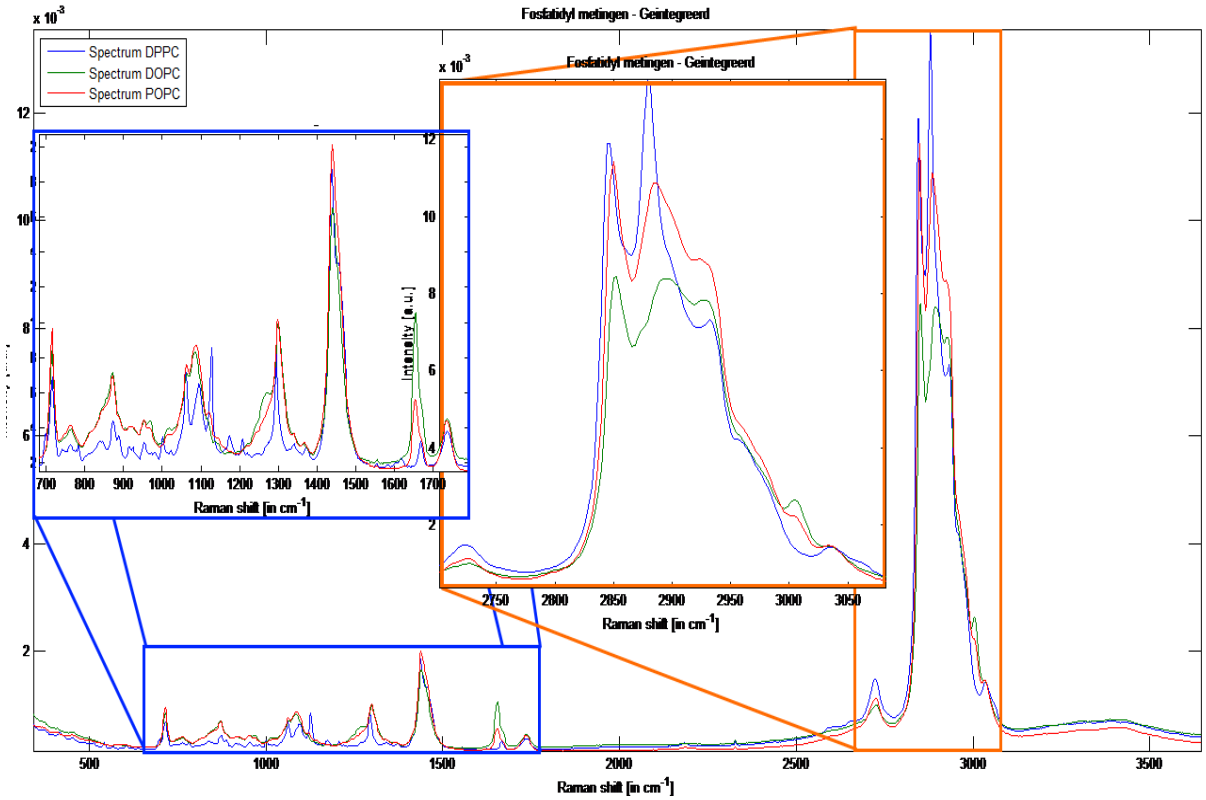
Figuur 45: Gemiddelde spectrum van de 1-stearoyl-2-oleoyl-fosfatidylserine (SOPS) metingen met de structuurformule[8]



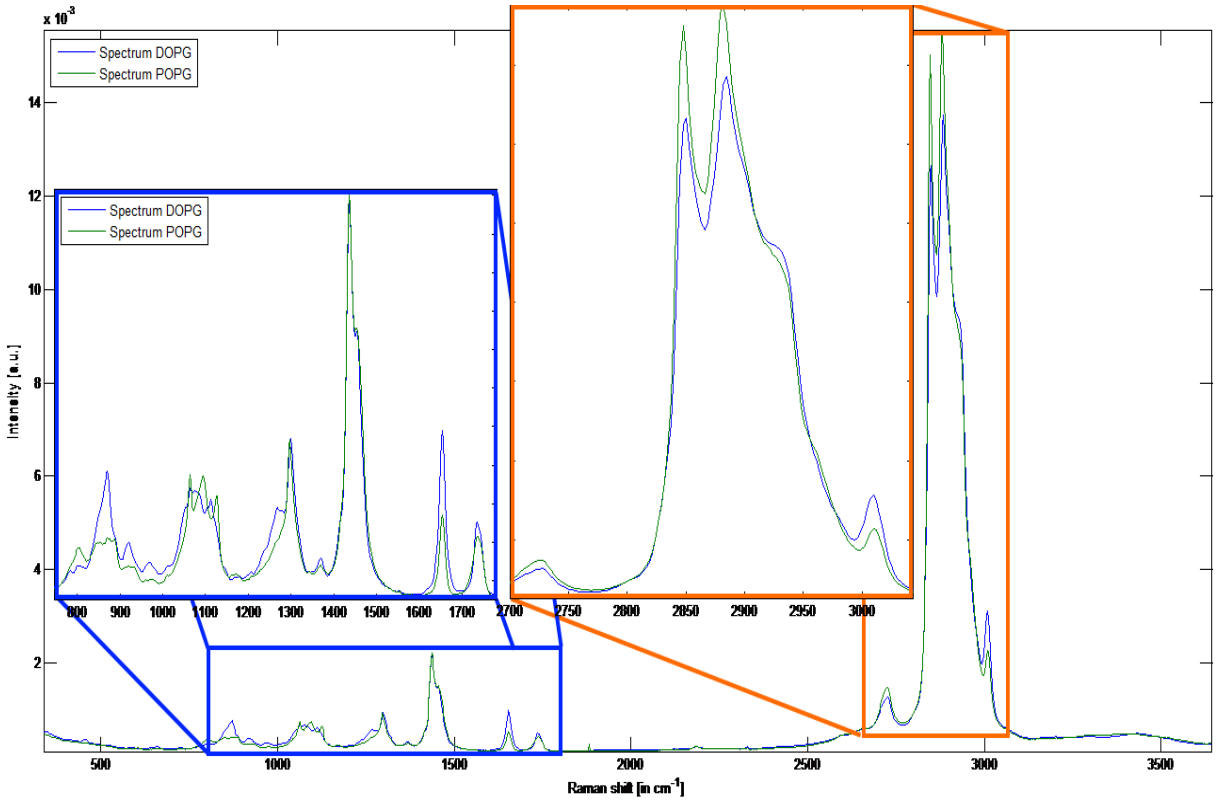
Figuur 47: Alle gemiddelde spectra met een DO (1,2-dioleoyl) staart



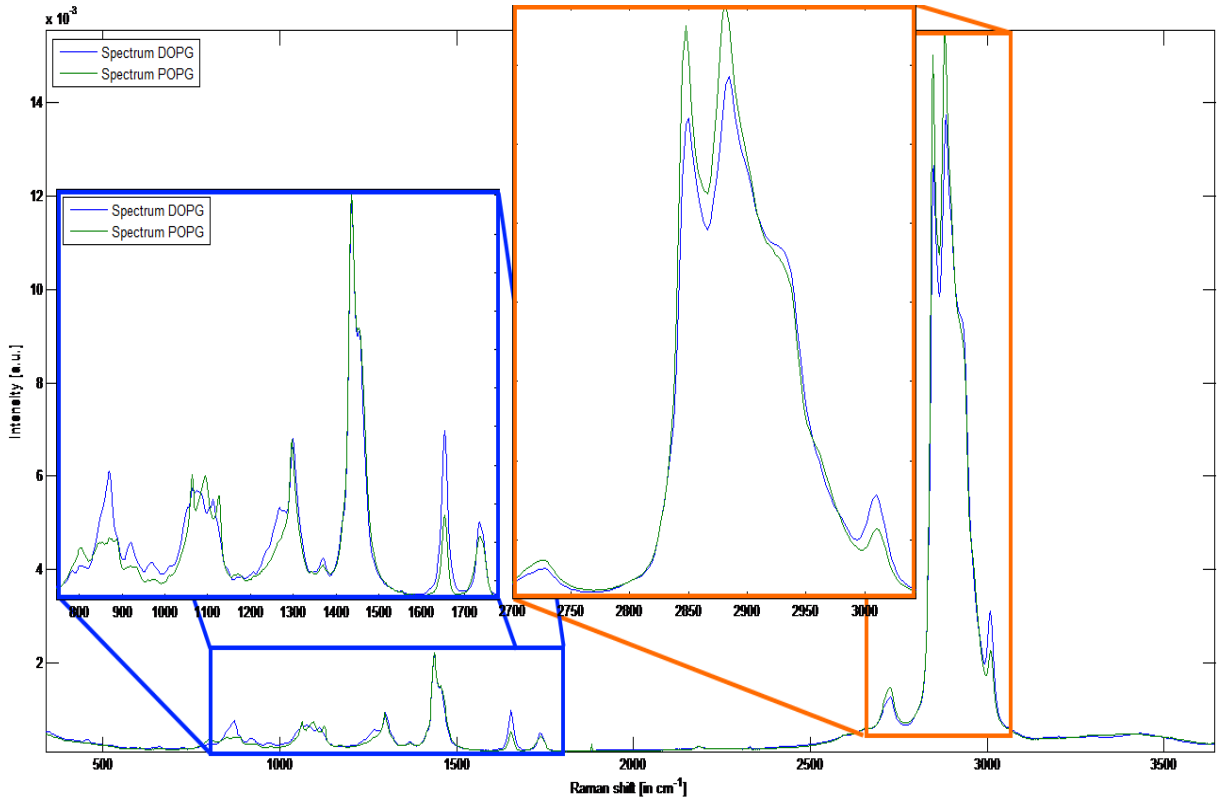
Figuur 48: Alle gemiddelde spectra met een PO (1-palmitoyl-2-oleoyl) staart



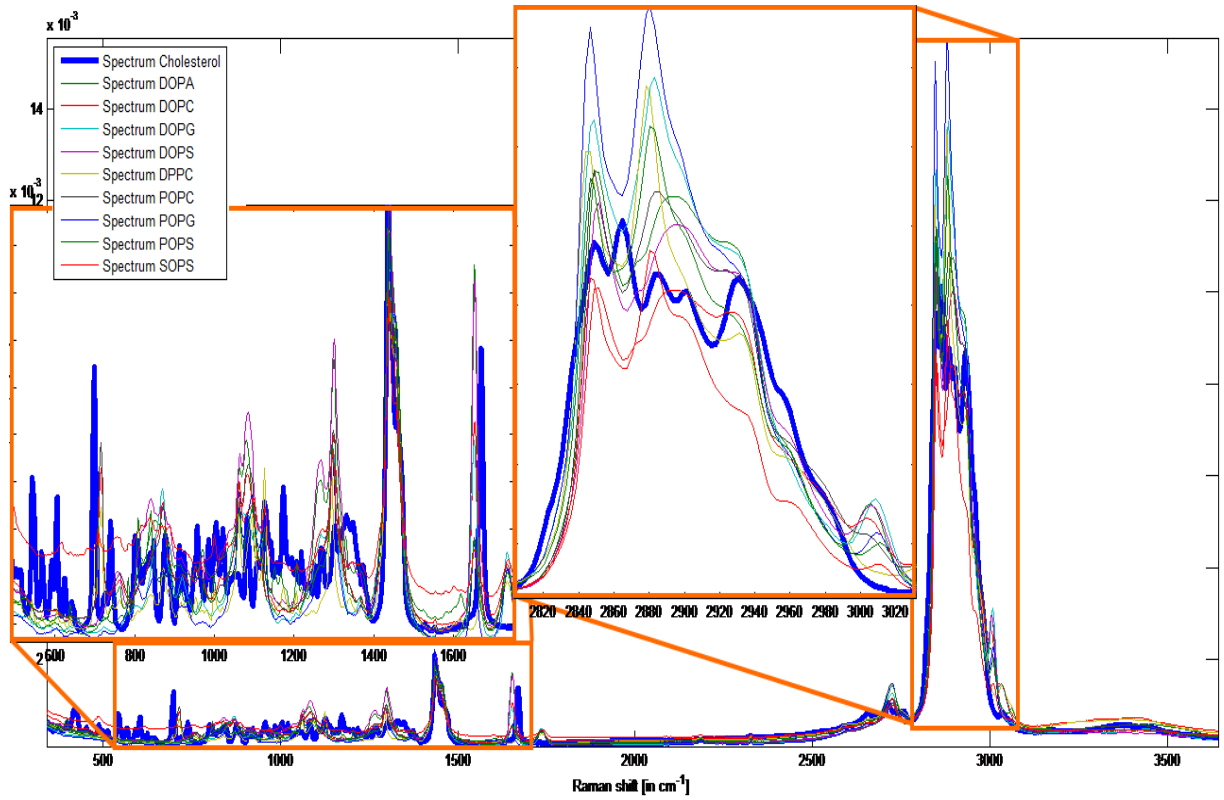
Figuur 49: Alle gemiddelde spectra van lipiden met een PC (fosfatidylcholine) kopgroep



Figuur 50: Alle gemiddelde spectra van lipiden met een PG (fosfatidylglycerol) kopgroep



Figuur 52: Alle gemiddelde spectra van lipiden met een PS (fosfatidylserine) kopgroep



Figuur 51: Alle metingen en de meting van cholesterol geaccentureerd (blauw).

Appendix B – Toekenning pieken van lipiden spectra

Cholesterol

Tabel 7: Relatieve intensiteiten van de pieken van cholesterol met de toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
421.9	418	0.077	Cholesterol
545	548	0.073	Cholesterol
607.3	608	0.065	Cholesterol
700.6	702	0.115	Cholesterol
1085	1086	0.058	C-C gauge
1128	1128	0.063	C=O stretching of carbohydrates, C-C skeletal stretch
1176	1174-1176	0.070	C-H bending of proteins
1437	1436-1443 1441-1441	0.190	CH_2 deformation Cholesterol
1462	1465	0.095	Lipids
1671	1669-1674 1665-1672 1670- 1674	0.122	Cholesterol C=O stretch C=C Stretch
2656	???	0.082	???
2718	2700-3300	0.105	CH stretches
2851	2840-2875 2850-2875	0.956	CH_3 symmetric stretch of lipids CH_2 symmetric stretch of lipids
2867	2850-2883	1	CH_2 asymmetric stretch of lipids
2885	2885	0.870	Lipids
2904	2700-3300	0.816	CH stretch
2933	2929-2940	0.842	CH_2 asymmetric stretch
3040	2700-3300	0.084	CH stretch

DOPA (1,2-dioleoyl-fosfatide zuur)

Tabel 8: Relatieve intensiteiten de pieken van DOPA met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
816.9	817	0.040	C-C stretching
868.9	868-874	0.055	C-C stretching
887.7	885	0.047	C-O-C skeletal mode
969.6	968	0.045	Lipids
1065	1060-1095	0.075	C-C chain stretching
1082	1083	0.085	C-N stretching in lipids
1117	1117-1119	0.048	C-C stretch (breast lipid)
1268	1266-1268	0.071	=C-H vibration
1301	1296-1313	0.115	CH_2/CH_3 twisting, wagging or bending
1439	1437-1453	0.178	CH_2 deformation
1654	1652-1656	0.151	C=C stretch & C=O stretch
1737	1716-1741	0.038	Ester group of lipids
2727	2700-3300	0.097	CH stretches
2850	2840-2875 2850-2875	1	CH_3 symmetric stretch of lipids CH_2 symmetric stretch of lipids
2898	2876-2919	0.944	CH_2 asymmetric stretch
3007	3008-3015	0.265	Unsaturated =CH stretch

DOPC (1,2-dioleoyl-fosfatidylcholine)

Tabel 9: Relatieve intensiteiten de pieken van DOPC met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
715.7	717-719	0.053	$CN^-(CH_3)_3$ (choline)
872.7	875	0.056	antisem $N^+(CH_3)_3$
969.3	968	0.088	Lipids
1065	1064-1065	0.102	C-C stretch of lipids, fatty acid
1084	1083	0.076	C-N stretch
1270	1270	0.123	Phospholipids, C=C groups in fatty acids
1301	1296-1307	0.108	$(CH_2)_n$ twisting, wagging CH vibration
1438-41	1437-1450	0.1974	CH_2 deformation
1656	1656	0.1317	C=Ccis (phospholipids
1736	1736	0.063	C=O ester (lipids)
2727	2700-3500	0.1426	CH stretches
2852	2850	1	CH_2, lipids, fatty acids, CH_2 symmetric
2895	2889-2908	0.993	CH_2 asymetric stretch of lipids
2929	2929-2940	0.928	CH_2 asymmetric stretch
3004	3008	0.3259	=C-H, lipids, fatty acids
3033	3015	0.192	=C-H of lipids

DOPG (1,2-dioleoyl-fosfatidylglycerol)

Tabel 10: Relatieve intensiteiten de pieken van DOPG met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
871.7	870	0.059	C-C stretching
972.5	971	0.024	C-C wagging
1064	1064	0.056	Skeletal C-C stretch of lipids
1113	1115/6	0.049	$CH_{2,6}$ in-plane bend and C_1-C α-$H\alpha$ bend
1269	1268/1270	0.046	(=C-H) phospholipids/Typical phospholipids
1300	1296-1307	0.076	CH_2 twisting, wagging, deformation, fatty acids
1371	1367	0.026	CH_3 phospholipis
1437	1437	0.1622	CH_2 lipids in normal tissue, CH_2 deformation in lipids
1655	1655	0.078	C=C of lipids
1738	1738	0.3954	Lipids
2728	2700-3500	0.098	CH stretches
2851	2850	0.931	CH_2, lipids, fatty acids
2885	2885	1	CH_3, lipids, fatty acids
3010	3008/3010	0.231	(=C-H), lipids, fatty acids/Unsaturated =CH stretch

DOPS (1,2-oleoyl-fosfatidylserine)

Tabel 11: : Relatieve intensiteiten de pieken van DOPS met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
756	759	0.041	Ethanolamine group
867.8	868	0.066	C-C stretching
886.6	885	0.059	C-O-C skeletal
970.7	968	0.046	Lipids
1064	1064	0.087	Skeletal C-C stretch of lipids, C-C trans
1086	1060-1095	0.104	Chain C-C stretching (lipids)
1116	1115-1116 1117-1119	0.058	$CH_{2,6}$ in plane band C-C stretch (breast lipid)
1267	1267	0.085	C-H (lipid)
1300	1299-1300	0.133	CH_2 deformation, $-(CH_2)_n-$ in plane twist
1347	1347	0.044	???
1438	1437-1442	0.194	CH_2 deformation
1655	1652-1656	0.157	C=C stretch & C=O stretch
1736	1736-1754	0.043	Ester group (C=O)
2729	2700-3300	0.103	CH stretches
2852	2850-2875	1	CH_2 symmetric stretch of lipids
2894	2876-2919	0.947	CH_2 asymmetric stretch
2928	2933	0.833	CH_2 asymmetric stretch
3006	3008-3015	0.283	Unsaturated =CH stretch

DPPC (1,2-palmitoyl-fosfatidylcholine)

Tabel 12: Relatieve intensiteiten de pieken van DPPC met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
716.1	717-719	0.053	Choline group
1063	1060-1095	0.052	C-C chain stretching
1095	1095-1099	0.0487	C-N vibration of lipids
1127	1126-1128	0.063	C-N stretching of lipids
1295	1296-1313	0.063	CH_2/CH_3 twisting, wagging or bending
1437	1437-1453	0.141	CH_2 deformation
2725	2700-3300	0.118	CH stretches
2845	2840-2875 2850-2875	0.878	CH_3 symmetric stretch of lipids CH_2 symmetric stretch of lipids
2879	2876-2919	1	CH_2 asymmetric stretch
2932	2929-2940	0.539	CH_2 asymmetric stretch
3036	???	0.111	???

POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylcholine)

Tabel 13: Relatieve intensiteiten de pieken van POPC met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
716.8	717-19	0.087	C-N phospholipids head, choline group
873.8	875	0.062	Antisymmetric stretch vibration of choline
1064	1064-1065	0.068	Skeletal C-C stretch of lipids/Palmitic acid, fatty acid
1087	1087-1090	0.078	C-C stretch
1122	1123	0.044	C-C stretching mode in lipids
1300	1300	0.091	$-(CH_2)_n-$ in plane twist vibration, fatty acids
1440	1437-1442	0.178	CH_2 deformation
1655	1656	0.051	C=C stretching (lipids), C=O stretching (lipids)
1735	1736	0.040	C=O ester (lipids)
2728	2700	0.103	C-H stretches
2851	2850	1	CH_2 symmetric, lipids, fatty acids
2885	2850	0.948	CH_3, lipids, fatty acids
3034	3015	0.1331	=CH of lipids

POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylglycerol)

Tabel 14: Relatieve intensiteiten de pieken van POPG met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
1063	1064	0.046	Skeletal C0C stretch of lipids
1095	1095	0.048	Lipid, (C-N)
1125	1124 - 1126	0.041	V(C-C) skeletal of acyl backbone in lipid
1297	1296/1298	0.057	CH_2 deformation / fatty acids
1436	1436	0.142	CH_2 scissoring
1454	1454	0.097	CH_2 stretching/CH_3 asymmetric deformation
1654	1654	0.035	C=C stretch of lipids (broader: C=O stretch)
1739	1738/9	0.029	Lipids/Ester group
2725	2700-3300	0.098	C-H stretch
2847	2850	0.966	$-CH_2-$ symmetric
2882	2883	1	CH_3 asymmetric
3010	3010	0.148	Unsaturated CH_3 stretch

POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphoserine)

Tabel 15: Relatieve intensiteiten de pieken van POPS met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
808.4	810	0.057	Phosphodiesther
1063	1060-1095	0.052	C-C skeletal stretch
1097	1095-1099	0.054	C-N vibration
1127	1027	0.046	C-N vibration
1297	1296-1313	0.072	CH_2/CH_3 twisting, wagging or bending
1330	1330	0.048	Typical phospholipids
1436	1437-1453	0.141	CH_2 deformation
1459	1459-1465	0.116	CH_2/CH_3
1654	1652-1656	0.043	C=C stretch & C=O stretch
1739	1736-1754	0.033	Ester group (C=O)
2727	2700-3300	0.113	CH stretches
2847	2840-2875 2850-2875	0.858	CH_3 symmetric stretch of lipids CH_2 symmetric stretch of lipids
2882	2876-2919	1	CH_2 asymmetric stretch
2927	2913-2938	0.623	CH stretch of lipids
2959	2956-2960	0.362	Out of plain chain end asymmetric CH_3 stretch
3012	3008-3015	0.157	Unsaturated =CH stretch

SOPS (1-stearoyl-2-oleoyl-phsphoserine)

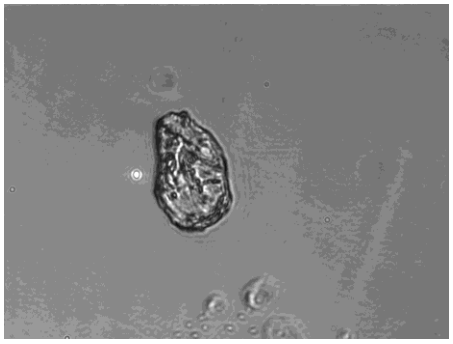
Tabel 16: Relatieve intensiteiten de pieken van SOPS met toekenning van de pieken

Pieken [cm^{-1}] (gemeten):	Referentie [cm^{-1}] (Movasaghi):	Intensiteit (relatief) :	Toekenning:
487.1	484-491	0.078	Glycogen
784.9	784-785	0.057	Phosphodiesther
1032	1032	0.056	CH_2CH_3 bending of phospholipids
1062	1064	0.087	C-C sketetal stretch of lipids
1101	1100	0.077	C-C vibration mode of the gauche-bonded chain
1128	1128 1130	0.074	C-C sketal stretch transformation Phospholipid structural changes
1296	1296	0.1015	CH_2 deformation
1438	1437-1442	0.1682	CH_2 deformation
1456	1454	0.1216	Asymmetric CH_3 & CH_2 scissoring
1653	1652-1656	0.055	C=C stretch & C=O stretch
1738	1736-1754	0.050	Ester group (C=O)
2726	2700-3300	0.126	CH stretches
2846	2840-2875	0.927	CH_3 symmetric stretch of lipids
2881	2883	1	CH_2 asymmetric stretch of lipids
2899	2900	0.824	CH stretch of lipids
2931	2933	0.578	CH_2 asymmetric stretch
2958	2957	0.332	CH_3 asymmetric stretch
3011	3008-3015	0.160	Unsaturated =CH stretch

Appendix C – Afwijkende metingen

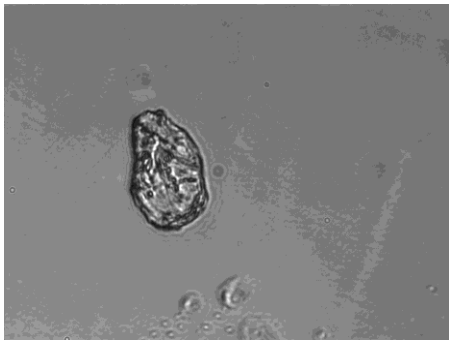
DOPC

Van alle metingen die van DOPC gemaakt zijn is er slechts een enkele meting die afwijkt van de anderen. Hier ontbreken ook de kenmerkende structuren van de lipiden, terwijl deze wel duidelijk naar voren zouden moeten komen. Dit zou een meting van DOPC moeten zijn, maar kijkend naar het gemeten spectrum (Figuur 57) komt niets overeen met de andere metingen die genomen zijn op dezelfde dag van dezelfde lipide (Figuur 58). Ook als je afwijkende metingen vergelijkt met de andere metingen van DOPC (Figuur 56) zie je dat de afwijking verder nergens voorkomt. Op basis van deze gegevens zijn deze metingen niet meegenomen hoeven te worden in de verder verwerking van de data van de lipide DOPC.



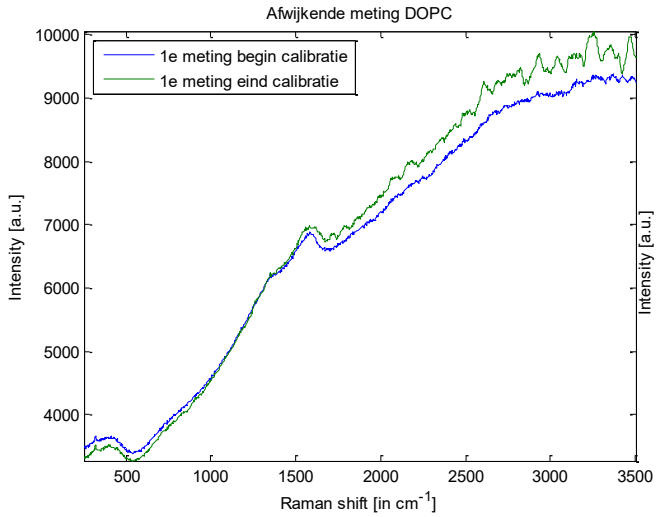
Figuur 53: Beeld van gemeten afwijking

De meting van de afwijking is genomen van een soort vlek boven het calciumfluoride (Figuur 53), de focal-spot van de laser verdwijnt onder invloed van de laser (Figuur 54). Dit bewijst dat er wel iets op het CaF_2 te vinden is, maar het is onduidelijk uit het signaal op te maken wat dit nu werkelijk is. Op het eerste gezicht lijkt dit het meest op het Raman-spectrum van glas. Op de CaF_2-plaat werden alleen druppels chloroform, met daarin opgelost lipiden, gepipetteerd en door verhitting en vacuüm trekken werd het cloroform verdampt. Er werd direct gemeten zonder gebruik van een glasplaat of iets dergelijks dus kan het signaal hier niet vandaan komen.

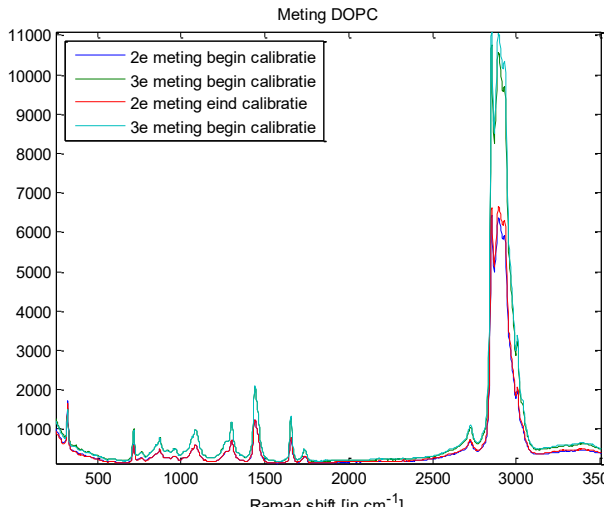


Figuur 54: Beeld van gemeten afwijking, verdwenen focalspot

Misschien dat er onzuiverheden op het CaF_2 waren achtergebleven en dat ik dit gemeten had.



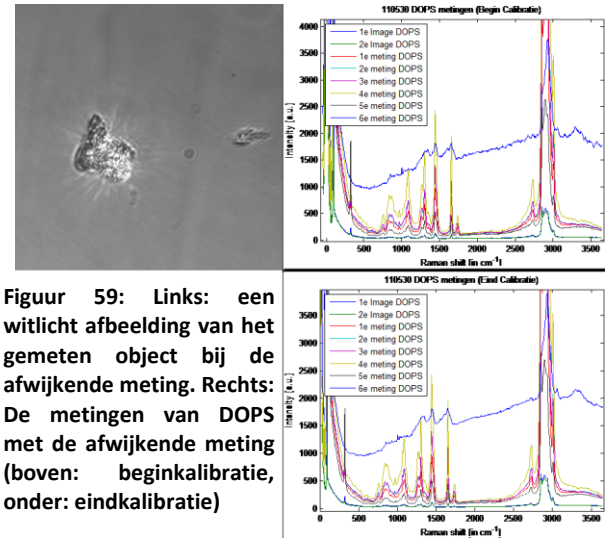
Figuur 57: Spectra van afwijkende meting, begin en eind calibratie



Figuur 58: Spectra van DOPC van de overige metingen op met begin en eind calibratie

DOPS

Bij het metingen van DOPS valt op dat bij zowel de begin- als eindcalibratie de afwijkende meting te vinden is. In beide gevallen gaat het ook om de 6e meting waarbij het signaal afwijkt van de andere signalen. Tijdens het meten was al opgevallen dat er een ander signaal ontstond dan in de metingen hiervoor te herkennen was. Het golvende signaal deed mij tijdens de meting denken aan een glassignaal terwijl ik wel met de focalspot van de laser boven het gebruikte CaF_2 aan het meten was. De focalspot werd erg verstrooid door de stof die we aan het meten waren en hierdoor ging ik er juist vanuit dat hier veel signaal zichtbaar was. Helaas heb ik geen verklaring voor de afwijking die is gevonden. Echter is te zien in Figuur 59 dat er maar één meting (met begin- en eindcalibraties) werkelijk foutief is en dat de overige metingen wel een spectrum hebben dat tussen de pieken door terug zakt naar een lagere intensiteit. Er zijn wel enkele overeenkomsten tussen de afwijkende meting en de andere metingen. Rond de CH_2 bending (1439 cm^{-1}), de C=C stretch van lipiden en amiden (1655 cm^{-1}) en het CH-stretch gebied (~3000 cm^{-1}) zijn voor alle metingen pieken te vinden. Maar de afwijkende meting heeft de O-H stretching (3350 cm^{-1}) terwijl de 'normale' metingen een ethanolamine piek (759 cm^{-1}), C-C stretching (878 cm^{-1}), een piek characteristiek voor lipiden (968 cm^{-1}) en C-C stretching voor lipiden (1064 cm^{-1}) heeft.

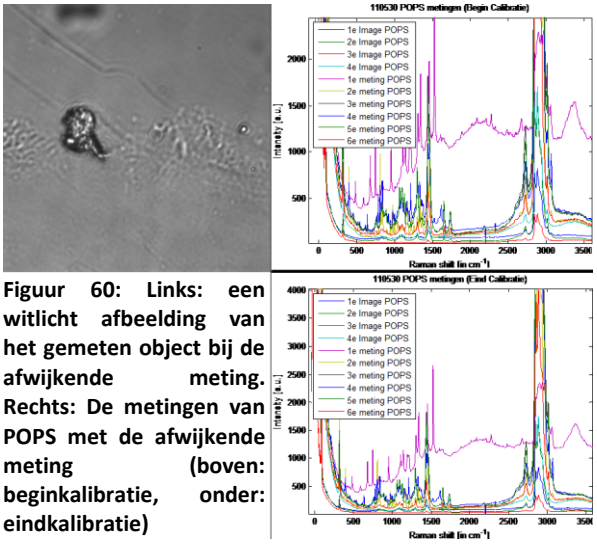


Figuur 59: Links: een witlicht afbeelding van het gemeten object bij de afwijkende meting. Rechts: De metingen van DOPS met de afwijkende meting (boven: beginkalibratie, onder: eindkalibratie)

Doordat het signaal van de 6e meting zo ver afwijkt van de andere metingen, terwijl deze wel allemaal op elkaar lijken, neem ik deze meting niet mee in verdere analyse van DOPS. Het is duidelijk genoeg dat deze meting niet van DOPS is maar van iets geheel anders (bv een stofdeeltje of een bacterie).

POPS

Bij de metingen van POPS valt op dat de 1e meting, bij zowel de begin- als eindcallibratie) van deze stof flink afwijkt van de andere metingen die hiervan gemaakt zijn. Tijdens de meting zelf was al opgevallen dat het gemeten signaal afweek van de meeste metingen van DOPS, de enige meting waar dit signaal wel op leek, was van de 6e meting, deze was ook fout. Het gemeten signaal was een beetje golvend en leek op het glas signaal. Ook deze keer is er maar 1 meting die iets anders weergeeft dan de andere metingen (zie Figuur 60). Er zijn wel wat pieken die overeenkomen zoals de verhoogde tussen 2850 en 2975 cm^{-1}, deze worden veroorzaakt door CH, CH_2 en CH_3 stretching. Omdat het gaat om de eerste meting denk ik dat ik nog geen lipide had gevonden, maar een meting heb gemaakt van een vuiltje of infectie.



Figuur 60: Links: een witlicht afbeelding van het gemeten object bij de afwijkende meting. Rechts: De metingen van POPS met de afwijkende meting (boven: beginkalibratie, onder: eindkalibratie)

Doordat alleen deze meting anders is dan de andere metingen kunnen we in het vervolg deze metingen wel buiten beschouwing laten. Het is duidelijk dat in deze meting geen POPS is gemeten en hierdoor deze meting geen waarde heeft in ons verdere onderzoek.