

Technische Universität München
Physik-Department
Lehrstuhl für Biophysik E22

Enzymkinetik von Phospholipase C und Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen

Eine Untersuchung mittels Laserfallen-kontrollierter
Mikroelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie

Reinhard Josef Galneder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. K. Dietrich

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schliwa
(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 01.03.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 30.05.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Motivation	5
3	Laserfallen-kontrollierte Mikroelektrophorese Experimenteller Aufbau und Test der Methode	8
3.1	Experimenteller Aufbau einer optischen Pinzette	8
3.1.1	Prinzip.....	8
3.1.2	Konzeption	10
3.1.3	Komponenten des Aufbaus.....	14
3.1.4	Justage der optischen Pinzette	18
3.2	Elektrophorese	19
3.2.1	Theoretische Grundlagen.....	19
3.2.2	Konzeption einer Elektrophoresekammer	22
3.2.3	Hydrodynamik im Kreuzkanal	26
3.2.4	Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einer neutralen Lipidmembran.....	31
3.2.5	Beschichtung der Elektroden.....	33
3.3	Detektorsystem	35
3.3.1	Videomikroskopie mit digitaler Bildverarbeitung.....	35
3.3.2	Quadrantdiode	38
3.3.3	Datenaufzeichnung	41
3.4	Datenanalyse	43
3.4.1	Theoretische Grundlagen.....	43
3.4.2	Kalibrierung.....	45
3.4.3	Test der Methode	48
3.4.4	Sensitivität der Methode.....	51
4	Enzymaktivität von Phospholipase C	53
4.1	Einführung	53
4.2	Material	57
4.2.1	Phospholipase C- δ	57
4.2.2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat.....	59
4.2.3	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	60
4.3	Präparation	62
4.3.1	Reinigung der Silika-Kugeln.....	62
4.3.2	Präparation der lipidbeschichteten Silika-Kugeln	62

4.3.3	Versuchsdurchführung	64
4.3.4	Pufferbedingungen	66
4.4	Resultate	68
4.4.1	Enzymkinetik.....	68
4.4.2	Kontrollexperimente.....	73
4.4.3	Interpretation der Enzymkinetik.....	75
4.5	Diskussion.....	80
5	Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen	85
5.1	Einführung	85
5.2	Fluoreszenzmikroskopie	88
5.2.1	Grundlagen der Fluoreszenz.....	88
5.2.2	Quantitative Fluoreszenzmikroskopie	90
5.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	93
5.3.1	Theoretische Grundlagen.....	93
5.3.2	Fluoreszenzspektrometer	95
5.4	Material und Präparation.....	97
5.4.1	Polymere.....	97
5.4.2	Alveofact	99
5.4.3	Fluorophore	99
5.4.4	Präparation der DNA-Komplexe	101
5.5	Theoretische Grundlagen der kolloidalen Aggregation.....	102
5.6	Resultate	105
5.6.1	Quantitative Fluoreszenzmikroskopie	105
5.6.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	117
5.7	Diskussion.....	125
6	Anhang.....	128
6.1	Abkürzungen und Akronyme.....	128
6.2	Referenzen	129
6.3	Publikationen	138

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Laserfallen-kontrolliertes Mikroelektrophorese-Experiment aufgebaut und getestet, das zeitaufgelöste Messungen des Oberflächenpotentials an einzelnen kolloidalen Teilchen ermöglichte. Mit dieser Methode konnte im folgenden die Enzymkinetik von Phospholipase C (PLC) mit einer bisher nicht erreichten Zeitauflösung gemessen werden. Dabei wurden die Änderungen des Oberflächenpotentials durch eine kleine Zahl von Enzymen hervorgerufen. Die eingesetzten PLC-Konzentrationen lagen bei den Messungen im nanomolaren Bereich. Des weiteren wurde das Aggregationsverhalten, die Größenverteilung und die Packungsdichte von DNA/Polylysin-Komplexen mit Hilfe von verschiedenen Fluoreszenztechniken untersucht.

Für die Laserfallen-kontrollierte Mikroelektrophorese wurde eine optische Pinzette und eine Quadrantdiode zur Bestimmung der lateralen Position des Partikels im Laserfokus aufgebaut. Des weiteren war die Konzeption einer speziellen Elektrophoresekammer für die Experimente zur Reaktionskinetik von entscheidender Bedeutung. Ein alternierendes elektrisches Feld versetzte bei den Experimenten das geladene Partikel in der optischen Pinzette in Oszillationen. Mit der Quadrantdiode wurde die Position des Partikels mit einer Frequenz von 16 kHz und einer Ortsauflösung im Nanometer-Bereich detektiert. Es konnte die Amplitude der erzwungenen Schwingung simultan zur Änderung des Oberflächenpotentials als Funktion der Zeit bestimmt werden. Aus der Kalibrierung der optischen Pinzette folgte die Sensitivität des Detektors und die Kraftkonstante des harmonischen Potentials. Mit diesen Parametern wurde die elektrophoretische Kraft und mit der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung das Oberflächenpotential berechnet. Des weiteren haben Kontrollexperimente demonstriert, daß die Resultate der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese mit den konventionellen Messungen des Zetapotentials übereinstimmen. Die Sensitivität der Methode hatte bei den Experimenten einen Wert von ca. 1 mV, der nach den angestellten theoretischen Überlegungen noch weiter verbessert werden kann.

Mit der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese wurde die Kinetik der Enzymreaktion von Phospholipase C bestimmt. Es handelte sich hier um die ersten Messungen der Enzymaktivität von PLC an festkörpergestützten Lipidmembranen mit einer Zeitauflösung von 1 sec. Diese Methode ermöglichte eine Aufzeichnung der Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) durch eine kleine Zahl von Enzymen. Das Zetapotential einer lipidmembranbeschichteten Silika-Kugel mit 2% PIP_2 konnte dabei simultan zur Enzymreaktion als Funktion der Zeit für verschiedene PLC-Konzentrationen aufgenommen werden. Die Messungen zeichneten sich generell durch ihre Reproduzierbarkeit aus und erlaubten eine quantitative Analyse der Enzymkinetik. Sie konnten zeigen, daß zwischen der Rate der Hydrolyse und der eingesetzten PLC-Konzentrationen ein

linearer Zusammenhang existiert. Die gemessenen Kurven lassen sich mit einem Modell zur Enzymkinetik in sehr guter Übereinstimmung erklären. Es handelt sich bei der PLC-induzierten Hydrolyse um eine Enzymreaktion, die zum Quadrat der Konzentration von PIP_2 in der Lipidmembran proportional ist. Diese Vorstellung ist mit der molekularen Struktur und der biologischen Funktion der verschiedenen Domänen des Enzyms konsistent. Für die maximale Rate der Hydrolyse pro Enzym¹ konnte ein Wert von 20 s^{-1} gemessen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen mit verschiedenen Fluoreszenztechniken untersucht. Die Messungen zur inneren Stabilität und Packungsdichte der Komplexe erfolgten mit der Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers in einem Spektrometer. Für den Försterradius des verwendeten Donor-Akzeptor-Paares (FITC/BOBO) wurde unter den experimentellen Bedingungen ein Wert von $R_F = 54 \text{ \AA}$ ermittelt. Es konnte auch der Energietransfer bei der Kondensation der DNA² und die Dissoziation von isoelektrischen DNA/Polylysin-Komplexen durch monovalente Ionen und anionische Polymere bestimmt werden. Des Weiteren wurde der Effekt von Lungen-Surfactant (Alveofact) auf die Packungsdichte und innere Stabilität von DNA/Polylysin-Komplexen untersucht.

Mit der Methode der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Größenverteilung von DNA/Polylysin-Komplexen bestimmt und die Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex berechnet. Die Verteilungsfunktion zeigte bei der kolloidalen Aggregation ein dynamisches Skalenverhalten. So konnte demonstriert werden, daß es sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen bei der Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen um einen diffusionslimitierten Prozeß (DLA) handelt. Darüber hinaus wurde ein signifikanter Effekt von Lungen-Surfactant (Alveofact) auf das Aggregationsverhalten der Komplexe beobachtet. So hatte die Größenverteilung nach der Inkubation mit Surfactant im Vergleich zur Referenz eine deutlich kleinere Polydispersität. Für die mittlere Größe der Gentransfer-Komplexe mit und ohne die Einwirkung von Alveofact ergaben sich Werte von $\langle n \rangle_{\text{Alveo}} = 6.3$ bzw. $\langle n \rangle = 35.3$. Das Surfactant beendete praktisch die kolloidale Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen. Mit diesen Resultaten wurde ein Modell zum Aggregationsverhalten von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen entwickelt.

¹ Im Englischen auch als *turnover number* eines Enzyms bezeichnet.

² DNA: **D**esoxyribonukleinsäure.

2 Motivation

Elektrostatische Phänomene spielen in biologischen Systemen eine zentrale Rolle, da die Konformation und Funktionalität von Biomolekülen durch geladene chemische Gruppen auf ihrer Oberfläche bestimmt werden. Des Weiteren verhindern die Oberflächenladungen unter den physiologischen Bedingungen die Präzipitation und die Phasenseparation der Biomoleküle im Zytoplasma (Gelbart, 2000). Nukleinsäuren und Proteine sind prominente Beispiele für Makromoleküle mit einer großen Zahl von Ladungen, die im allgemeinen als Polyelektrolyte bezeichnet werden. Im Fall von Proteinen orientieren sich die geladenen Seitenketten der Aminosäuresequenz in Richtung des polaren Lösungsmittels, während die unpolaren Ketten das hydrophobe Zentrum eines globulären Proteins bilden. Die Aktivierung eines Proteins kann über die kovalente Bindung einer negativ geladenen Phosphatgruppe (Phosphorylierung) an eine bestimmte Seitenkette der Aminosäuresequenz erfolgen (Stryer, 1995). Die daraus resultierende Änderung der Konformation von Biomolekülen ist für die Regulation von vielen molekularbiologischen Prozessen von entscheidender Bedeutung.

Viele wichtige biochemische Reaktionen in der Zelle wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Allerdings liegen zur Kinetik vieler Prozesse keine detaillierten Kenntnisse vor, die auf Messungen an einer kleinen Zahl oder einzelnen Molekülen basieren. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese zur Messung der Kinetik von biochemischen Reaktionen entwickelt. Mit dieser Methode ist es prinzipiell möglich, Einblicke in das komplexe Verhalten von Biomolekülen zu gewinnen, die den Messungen an einem großen Ensemble nicht zugänglich sind. So erfolgen bei den Experimenten an makroskopischen Populationen von Molekülen eine statistische Mittelung über alle individuellen Ereignisse. Die Erkenntnisse aus Einzelmolekül-Experimenten können nicht nur die erwarteten Ergebnisse bestätigen, die aus Messungen an einem Ensemble stammen, sondern geben substantielle neue Informationen über die Komplexität von Biomolekülen (Bai, 1999).

In dieser Arbeit wurde die Enzymaktivität von Phospholipase C (PLC) untersucht, die eine zentrale Rolle in der Signalübertragung der Zelle spielt und durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran zwei wichtige intrazelluläre Mediatoren generiert. Das Prinzip der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese ist in Abb. 2.1A dargestellt. Mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur erfolgt die Bündelung des parallelen Laserstrahls zu einem beugungslimitierten Fokus ($d \approx \lambda$), mit dem ein dielektrisches Partikel im näherungsweise harmonischen Potential einer Laserfalle stabil gehalten werden kann. Im diesem Fall handelt es sich um eine negativ geladene lipidmembranbeschichtete Silika-Kugel mit einem Radius von 0.5 μm . Ein oszillierendes

elektrisches Feld definierter Frequenz versetzt die geladene Kugel in Schwingungen um die Gleichgewichtslage. Die Amplitude Δx der Oszillation wird als eine Funktion der Zeit aufgenommen. Nach der Kalibrierung der Laserfalle kann die elektrophoretische Kraft F_{el} und das Zetapotential des Partikels berechnet werden, das zur Anzahl der negativen Oberflächenladungen der Kugel proportional ist.

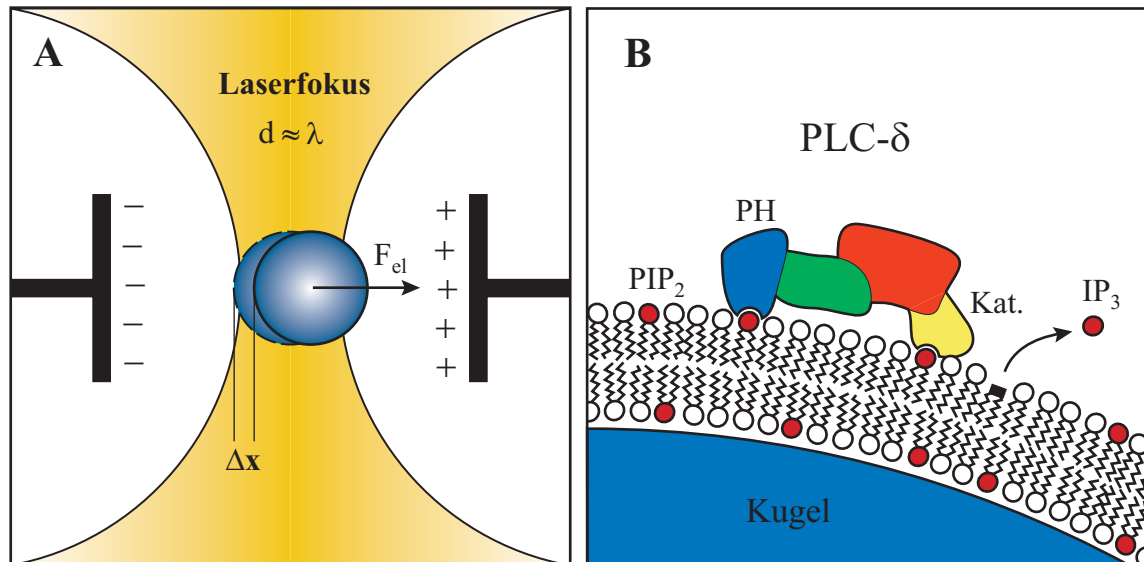


Abb. 2.1: Prinzip der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese: In (A) ist eine negativ geladene lipidmembranbeschichtete Kugel im Fokus einer Laserfalle gezeigt. Das homogene elektrische Feld generiert eine elektrophoretische Kraft F_{el} , die zu einer Auslenkung Δx der Kugel aus der Gleichgewichtsposition proportional ist. Die schematische Darstellung in (B) illustriert die Hydrolyse der negativ geladenen Komponente Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) in der Lipidmembran durch das Enzym der Phospholipase C ($PLC-\delta$).

In Abb. 2.1B ist ein Ausschnitt der beschichteten Kugel mit einem an die Lipidmembran gebundenen Enzym gezeigt. Die schematische Darstellung illustriert die PLC-induzierte Hydrolyse von PIP_2 durch die katalytische Domäne (Kat.) des Enzyms. Vor diesem Prozeß muß jedoch die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) von PLC mit einem anderen PIP_2 -Molekül der Lipidmembran assoziieren. In der Zeichnung symbolisieren die kolorierten Bereiche die vier unterschiedlichen funktionellen Einheiten des Enzyms. Bei der Hydrolyse von PIP_2 werden die negativ geladenen Kopfgruppen (IP_3) der Moleküle abgespalten, die nach der Reaktion in das umgebende Medium diffundieren, während die neutralen Komponenten in der Lipidmembran zurückbleiben. Die resultierende Abnahme der Oberflächenladung der Kugel kann mit der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese als Funktion der Zeit aufgezeichnet werden. Mit der beschriebenen Technik soll die Aktivität von einzelnen Enzymen an Lipidmembranen untersucht werden. Des weiteren sollen die folgenden Experimente demonstrieren, daß mit der etablierten Methode generell die Kinetik von biochemischen Prozessen auf molekularer Ebene studiert werden kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die physikalischen Grundlagen der Aggregation von synthetischen Gentransfer-Komplexen untersucht. Die Oberflächenladungen spielen auch hier eine zentrale Rolle, da die Kondensation der DNA mit kationischen Substanzen durch die elektrostatische Wechselwirkung vermittelt wird. Des Weiteren bestimmen sie das Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen, da die Partikel eines Kolloids in der Regel gleichartig geladene Objekte darstellen, die von einer diffusen elektrischen Doppelschicht umgeben sind. Die geladenen Teilchen unterliegen der thermischen Bewegung und erfahren bei der gegenseitigen Annäherung eine repulsive elektrostatische Kraft.

Das Ziel der somatischen Gentherapie ist die Heilung von Erbkrankheiten, wie z. B. der Mukoviszidose oder der Duchenne-Muskeldystrophie, durch den Transfer von Genen³ in den Nukleus von Zellen. Es stellt sich nun die Frage, wie und in welcher Form die therapeutischen Gene in den Nukleus von Zellen transportiert werden können und welche Barrieren dabei überwunden werden müssen. In der Natur haben sich Viren darauf spezialisiert, ihre Erbsubstanz mit einer hohen Effizienz in das Genom einer Wirtszelle einzubauen, um sich so zu reproduzieren (Felgner, 1997). Das Prinzip von Adeno- und Retroviren wird auch im Rahmen der Gentherapie ausgenutzt. Der virale Gentransfer hat jedoch den großen Nachteil, daß es bei der klinischen Anwendung zu unkontrollierbaren Immunreaktionen kommen kann (Lee, 1996). Aus diesem Grund werden heute diverse nicht-virale synthetische Genfähren (Vektoren) untersucht, die ein geringeres biologisches Risiko darstellen. Sie bestehen im allgemeinen aus kationischen Lipiden (Felgner, 1994) oder Polymeren (Wagner, 1991), die mit zirkulären DNA-Sequenzen (Plasmide) zu einem Komplex⁴ kondensieren, der über Endozytose von der Zelle aufgenommen werden kann. Die synthetischen Gentransfer-Komplexe haben aber eine geringe Transfektionseffizienz und wirken unspezifisch auf alle Zellen (keine Spezifität). Die Lösung dieser Probleme erfordert ein besseres Verständnis der physikalischen Aspekte der Aggregation, der inneren Stabilität und Packungsdichte der synthetischen Gentransfer-Komplexe sowie der verschiedenen Wechselwirkungen mit der Umgebung.

³ Der Transfer von DNA-Sequenzen wird im allgemeinen als Transfektion bezeichnet.

⁴ Diese Komplexe werden in diesem Zusammenhang auch als Lipo- und Polyplexe bezeichnet.

3 Laserfallen-kontrollierte Mikroelektrophorese

Experimenteller Aufbau und Test der Methode

3.1 Experimenteller Aufbau einer optischen Pinzette

3.1.1 Prinzip

Die Erfindung des Lasers als eine intensive Quelle kohärenter Strahlung eröffnete neue Möglichkeiten, die Wechselwirkungen von Licht mit Materie und die daraus resultierenden Effekte für praktische Anwendungen zu nutzen. So können durch die Prozesse der Absorption, Reflexion und Streuung von Photonen kleine Kräfte auf dielektrische Objekte im Laserstrahl übertragen werden. Diese Kräfte liegen für ein mikroskopisches Partikel im Fokus eines intensiven Laserstrahls nur im Pikonewton-Bereich. Ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur fokussiert dabei den parallelen Laserstrahl zu einem beugungslimitierten Punkt mit dem Durchmesser d , der durch die Wellenlänge λ des Lasers vorgegeben ist. Experimente konnten zeigen, daß dielektrische Partikel unter diesen Voraussetzungen stabil im Laserfokus gehalten werden können. Das beschriebene Konzept der Fokussierung eines einzelnen Laserstrahls wird im allgemeinen als optische Pinzette bezeichnet (Block, 1992).

Im folgenden stellt sich die Frage, welche Kräfte für ein eingefangenes Partikel in der optischen Pinzette eine wichtige Rolle spielen. Für die Stabilität eines Teilchens im Laserfokus ist die sogenannte Gradientenkraft⁵ verantwortlich. Dies gilt allerdings nur, wenn das dielektrische Objekt einen größeren Brechungsindex als das umgebende Medium hat. Elektromagnetische Strahlung induziert bei der Transmission durch das polarisierbare Material fluktuierende elektrische Dipole, die mit dem Gradienten des Strahlungsfeldes interagieren. Die daraus resultierende Kraft ist im allgemeinen proportional zum lokalen Gradienten der elektromagnetischen Energiedichte. Für den Fall eines sphärischen Partikels mit $\lambda \gg d$ (Rayleigh-Bereich) ist die Gradientenkraft $\mathbf{F}_{\text{Gradient}}$ durch die Lorentz-Kraft der fluktuierenden elektrischen Dipole gegeben (Svoboda, 1994):

$$\mathbf{F}_{\text{Gradient}} = \frac{\alpha}{2} \nabla \langle E^2 \rangle \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Hierbei sind E die Amplitude des elektrischen Feldvektors und α die Polarisierbarkeit des dielektrischen Materials. Der algebraische Term $\langle E^2 \rangle$ symbolisiert dabei den zeitlichen Mittelwert der elektromagnetischen Energiedichte. Die Gradientenkraft ist näherungsweise in die Richtung der maximalen Intensität des Strahlungsfeldes orientiert. Sie stellt die

⁵ Im Englischen als *gradient force* bezeichnet.

rücktreibende Kraft für die thermischen Fluktuationen des Partikels im Zentrum des Laserfokus dar. Im Unterschied dazu werden dielektrische Objekte mit einem kleineren Brechungsindex als das umgebende Medium (z. B. Luftblasen) in den Bereich minimaler Intensität gezogen (Ashkin, 1980).

Des Weiteren kann durch die Streuung der Photonen eine Kraft auf das dielektrische Teilchen in der optischen Pinzette übertragen werden. Sie wird in diesem Kontext auch als Streuungskraft⁶ bezeichnet und ist zur Intensität der Laserstrahlung direkt proportional. Die Orientierung der Kraft ist mit der Ausbreitungsrichtung des einfallenden Laserstrahls identisch. Für den Fall eines sphärischen Partikels mit $\lambda \gg d$ gilt die folgende Gleichung:

$$\mathbf{F}_{\text{Streuung}} = n_m \frac{\langle \mathbf{S} \rangle \sigma}{c} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Es bezeichnen \mathbf{S} den Poynting-Vektor, σ den entsprechenden Rayleigh-Streuquerschnitt, n_m den Brechungsindex des umgebenden Mediums und c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum. Die Streuungskraft hat einen negativen Effekt auf die Stabilität der optischen Pinzette, da sie das Partikel aus dem Laserfokus drücken kann. Um dies zu verhindern, muß die Gradientenkraft gegenüber der Streuungskraft dominieren. Dieses Kriterium ist bei der Konzeption einer optischen Pinzette von entscheidender Bedeutung.

Daneben existieren auch noch andere Kräfte, die jedoch in diesem Zusammenhang keine zentrale Rolle spielen. Ein Beispiel ist die optische Bindungskraft, die die Wechselwirkung zwischen den fluktuierenden Dipolen im elektromagnetischen Strahlungsfeld beschreibt (Burns, 1989). Die Ursachen der radiometrischen Kraft sind thermische Gradienten auf Grund der Absorption von Laserstrahlung im dielektrischen Partikel (Ashkin, 1971). Auf diese und andere Kräfte wird nicht näher eingegangen.

Die geometrische Strahlenoptik ermöglicht die näherungsweise Berechnung der optischen Kräfte auf ein sphärisches Partikel im Laserfokus. Beugungseffekte werden in diesem Fall *per definitionem* nicht berücksichtigt. Im Rahmen dieses Modells sind die optischen Kräfte vom Radius des Teilchens unabhängig. Aus diesem Grund gilt das Modell nur für sphärische Partikel, deren Durchmesser d deutlich größer als die Wellenlänge λ ist. Dieser Grenzfall wird auch als Mie-Bereich bezeichnet. Die Berechnung der optischen Kräfte erfolgte über die Impulserhaltung bei der Reflexion und Refraktion der Strahlen an der Oberfläche des Partikels (Ashkin, 1992) (Block, 1992).

Mit der Elektromagnetischen-Theorie⁷ können die optischen Kräfte auf kleine Partikel im Laserfokus berechnet werden. In diesem Fall spielen Beugungseffekte eine signifikante

⁶ Im Englischen als *scattering force* bezeichnet.

⁷ Auch mit EM-Theorie abgekürzt.

Rolle. Das Modell basiert auf der Bestimmung des elektromagnetischen Feldtensors. Die Resultate zeigen jedoch nur für $\lambda \gg d$ eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment (Rayleigh-Bereich). Für Partikel mit den Dimensionen $\lambda \approx d$ kann die Situation weder durch die geometrische Strahlenoptik noch durch die Elektromagnetische-Theorie richtig beschrieben werden (Wright, 1993) (Svoboda, 1994).

Die Emission des Lasers in der transversalen Grundmode TEM_{00} ist mit entscheidenden Vorteilen für die optische Pinzette verbunden. So entspricht die Verteilung der Intensität des elektromagnetischen Feldes für diese Mode einem Gaußschen Profil. Dabei ist der effektive Radius des Laserstrahls durch die Distanz zum Zentrum der Verteilung definiert, bei der die Intensität der Strahlung um den Faktor $(1/e^2)$ abgenommen hat. Im Unterschied zu anderen Moden existieren in diesem Fall quer zum Strahl keine Phasenverschiebungen im elektrischen Feld. Aus diesem Grund zeichnet sich der Laserstrahl durch seine vollständige räumliche Kohärenz aus. Des weiteren kann ein Laserstrahl in der transversalen Grundmode auf den kleinsten Punkt gebündelt werden. Die Dimension des Fokus ist in diesem Fall nur durch die Beugung limitiert. Für diese Konfiguration hat der Gradient des elektromagnetischen Strahlungsfeldes einen maximalen Wert (Lange, 1994) (Hecht, 1991).

In der Regel werden für biologische Anwendungen Infrarot-Laser eingesetzt, um das zu untersuchende Präparat durch die Absorption von Strahlung und die damit verbundenen photochemischen Reaktionen nicht zu schädigen. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, daß biologisches Material in diesem Wellenlängenbereich eine hohe Transparenz besitzt. Für dieses Verhalten sind im Prinzip zwei konkurrierende Prozesse verantwortlich. Zum einen absorbieren organische Moleküle mit zunehmender Wellenlänge kontinuierlich geringere Strahlungsenergien, wobei sich diese Tendenz bis in den nahen Infrarot-Bereich fortsetzt. Ab einer Wellenlänge von ~ 800 nm kann von Transparenz gesprochen werden. Für die Absorptionsbanden des H_2O -Moleküls sind die Verhältnisse umgekehrt. Im visuellen Bereich existiert eine hohe Transparenz, während die Absorption im Infraroten ein signifikantes Maximum erreicht (Mehta, 1998).

3.1.2 Konzeption

Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, eine optische Pinzette in ein konventionelles Lichtmikroskop zu integrieren. Die normale Funktion des Mikroskops sollte dabei durch den in das optische System eingekoppelten Laserstrahl nicht eingeschränkt werden. Des weiteren müssen bei der Konzeption Aspekte zur Sicherheit berücksichtigt werden, da Laserstrahlen eine potentielle Gefahr für die Augen darstellen.

Die Basis für den experimentellen Aufbau einer optischen Pinzette bildete ein invertiertes Mikroskop mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur. Dabei handelte es sich um das

Modell Axiovert 135 TV von Zeiss mit einer zusätzlichen Apertur auf der Unterseite des Mikroskops, an die eine Kamera über einen Adapter angeschlossen werden kann. Das Axiovert 135 TV basiert dabei auf dem sogenannten ICS⁸-Prinzip. In diesem Fall projiziert ein entsprechendes Objektiv das Bild des Präparates in unendliche Entfernung. Erst die Tubuslinse formt aus den parallelen Strahlen in der Fokalebene ($f_{\text{Tubus}} = 164.5 \text{ mm}$) ein reelles Bild, das durch eine CCD-Kamera aufgezeichnet werden kann. Im Unterschied zu den klassischen Mikroskopen mit endlicher Tubuslänge erzeugen bei diesem System das Objektiv und die Tubuslinse ein endgültig korrigiertes Bild (Kapitza, 1994). Für die Fluoreszenzmikroskopie besteht ein Vorteil darin, daß die notwendigen dichroitischen Spiegel und Emissionsfilter in den parallelen Strahlengang zwischen Objektiv und Tubuslinse integriert werden können, ohne die Qualität der optischen Abbildung wesentlich zu beeinträchtigen (Pluta, 1988). Darüber hinaus kommt das ICS-Prinzip mit einem minimalen Satz von optischen Komponenten im Strahlengang aus.

Abb. 3.1 zeigt eine schematische Darstellung aller wichtigen Komponenten der optischen Pinzette im experimentellen Aufbau. Außerdem ist der Strahlengang des Lasers und der Durchlicht-Beleuchtung dargestellt. Der Nd-YAG-Laser emittierte einen kontinuierlichen Strahl mit der Wellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ parallel zur optischen Achse mit einem Radius von $R = 0.5 \text{ mm}$. Ein zentrierter Strahlaufweitzer vergrößerte anschließend den Radius des Strahls um den Faktor 6.25, bevor er mit zwei justierbaren Spiegeln um 180° umgelenkt wurde. Die Linse L_3 ($f = 160 \text{ mm}$) bündelte den Laserstrahl in die zur Tubuslinse konjugierte Fokalebene f_3 . Der in einem konventionellen Fluoreszenz-Filterschieber montierte dichroitische Spiegel (1) (Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA) reflektierte den Laserstrahl in Richtung der Tubuslinse, die den Fokus des Lasers in unendliche Entfernung projizierte. Ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur (100x 1.3, Zeiss) fokussierte den parallelen Laserstrahl in die Objektebene. Im folgenden bildete der Kondensator den Laserfokus in die zum Präparat konjugierte Ebene der Feldblende ab, bevor der Strahl nach einer weiteren Linse wieder parallel zur optischen Achse verlief. Des weiteren traf der Laserstrahl auf einen zweiten dichroitischen Spiegel (2) (Laseroptik, Garbsen, Deutschland), der im Unterschied zum ersten (1) eine hohe Transmission für die Laserstrahlung im Infrarot-Bereich hatte. Damit konnten die Reflexionen des Laserstrahls an den Komponenten der Beleuchtungs-Einheit minimiert werden.

⁸ ICS (engl.): Infinity Corrected System.

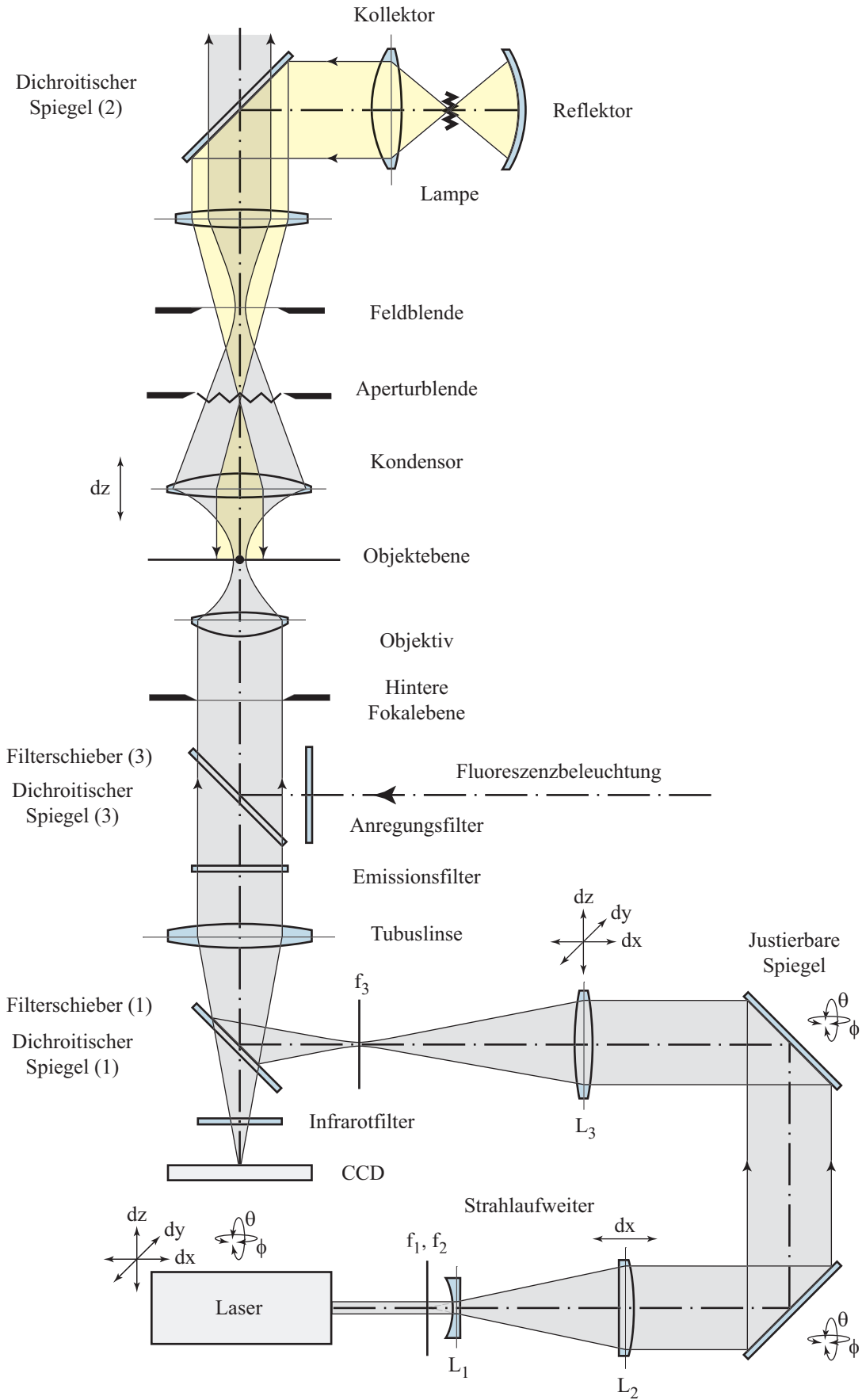


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus einer optischen Pinzette.

Im allgemeinen kann die optische Pinzette parallel zur Mikroskopie betrieben werden. Zur homogenen Beleuchtung des Präparates wurde die Halogenlampe in die hintere Fokalebene des Kondensors projiziert, in der sich auch die Aperturblende zur Regulierung der Bildhelligkeit befindet. Dieses Prinzip der Illumination wird generell als Köhler-Beleuchtung bezeichnet. Im folgenden bildeten das Objektiv und die Tubuslinse das im Laserfokus gehaltene Objekt auf die CCD-Kamera ab. Der dichroitische Spiegel (1) war für Licht im sichtbaren Bereich transparent, während die Laserstrahlung im Infrarot-Bereich reflektiert wurde.

Die Einkoppelung des Laserstrahls über die Apertur auf der Unterseite des Mikroskops erforderte die Konstruktion eines speziellen Adapters, der einen zusätzlichen Fluoreszenz-Filterschieber (Zeiss) aufnehmen konnte und die Montage einer CCD-Kamera ermöglichte. In den Filterschieber wurden der dichroitische Spiegel sowie ein Infrarotfilter eingebaut. Der Adapter mußte mit einer hohen Präzision hergestellt werden, um negative Effekte auf die Abbildungseigenschaften des optischen Systems auszuschließen. Am Deckglas des Präparats und an den verschiedenen optischen Komponenten im Mikroskop erfolgte eine Reflexion der Laserstrahlung. Ein kleiner Anteil dieses Lichtes konnte den dichroitischen Spiegel und den Infrarotfilter passieren. Diese Reflexionen projizierten ein Bild des Laserfokus als hellen Punkt mit einem definierten Beugungsmuster auf die CCD-Kamera. Dadurch konnte bei einer lateralen Translation des Laserfokus in der Objektebene die momentane Position auf der CCD-Kamera genau beobachtet werden, was das Einfangen von Partikeln mit der optischen Pinzette entscheidend vereinfachte.

Für den experimentellen Aufbau einer optischen Pinzette ist ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur notwendig, um den Laserstrahl auf einen beugungslimitierten Punkt fokussieren zu können. Daraus folgt ein maximaler elektrischer Feldgradient in der Fokalebene, der proportional zur Gradienten-Kraft und damit für die Stabilität der optischen Pinzette verantwortlich ist. Als Voraussetzung dafür muß der Laserstrahl die Eintrittspupille des Objektivs vollkommen ausfüllen. Dies bedeutet, daß der effektive Radius des Strahls mindestens dem der Eintrittspupille des Objektivs entspricht (Svoboda, 1994). Die im allgemeinen erforderliche Vergrößerung des Radius kann durch den Einsatz eines Strahlaufweiters und/oder durch die natürliche Divergenz des Laserstrahls über einen längeren optischen Weg erreicht werden. Darüber hinaus ermöglicht die Translation der positiven Linse L_3 in die verschiedenen Richtungen eine Positionierung des Laserfokus relativ zum Präparat. Eine laterale Translation von L_3 korrespondiert dabei mit einer Verschiebung in der Objektebene, während sich in axialer Richtung die Lage des Fokus entlang der optischen Achse ändert. Dabei muß die Illumination der Eintrittspupille des Objektivs bei der lateralen Verschiebung des Fokus in der Präparatebene garantiert sein. Der Laserfokus sollte zur Visualisierung des eingefangenen Partikels auf der CCD-Kamera mit der Fokalebene des Objektivs zusammenfallen. Diese Koinzidenz wird im allgemeinen als parfokaler Fall bezeichnet. In der Regel ist die Optik eines Mikroskops so konzipiert,

daß die Aberrationen in der Objektebene minimal sind. Aus diesem Grund hat der Laserfokus im parfokalen Fall seine optimale Form, die durch einen beugungslimitierten Punkt charakterisiert ist. Des weiteren werden die justierbaren Spiegel bzw. der Laser zur Orientierung des Strahles parallel zur optischen Achse eingesetzt. Im Unterschied zur Einkoppelung des Lasers über eine Glasfaser oder Akusto-Optische-Modulatoren stellt das beschriebene System eine einfache und ökonomische Lösung dar, die sich durch eine geringe Absorption von Laserstrahlung auszeichnet (Svoboda, 1994).

Mit diesem Design des experimentellen Aufbaus kann die optische Pinzette auch simultan zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden, da zwei voneinander unabhängige Filterschieber (3) existieren. Bei der Einkoppelung des Lasers über den Auflicht-Strahlengang der Fluoreszenz-Beleuchtung ist dies nicht mehr ohne weiteres möglich (Sterba, 1998). Darüber hinaus ist es aus Gründen der Sicherheit ausgeschlossen, mit den Augen über das Okular in Kontakt mit der Laserstrahlung zu kommen. Ein Schieber blockiert beim Umschalten auf das Okular den Laserstrahl am Kamera-Ausgang des Mikroskops. Um Fluktuationen des Lasers durch die Konvektion von Luft oder Staubpartikel zu verhindern, wird der Strahl in einem abgeschlossenen Tubus geführt (Allersma, 1998). Dadurch kann auch ein sicherer Betrieb der optischen Pinzette gewährleistet werden.

3.1.3 Komponenten des Aufbaus

Laser:

Für den experimentellen Aufbau einer optischen Pinzette wurde ein Nd-YAG⁹-Laser verwendet (Coherent, Lübeck), der Lichtstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ emittiert. Da biologisches Material für diese Wellenlänge eine hohe Transparenz hat, können kaum Schäden am Präparat durch die Absorption von Laserstrahlung entstehen. Die Emission des Lasers erfolgt in der transversalen Grundmode TEM₀₀ mit einem kontinuierlichen Strahl¹⁰. Des weiteren entspricht die Intensitätsverteilung des elektromagnetischen Feldes für die TEM₀₀-Mode einem Gaußschen Profil. Der Laser mit einer Divergenz von ca. 1 mrad und einem Durchmesser von 1.0 mm hat eine maximale Ausgangsleistung von 300 mW.

Im allgemeinen wirken sich Schwankungen in der Laserleistung kritisch auf die Stabilität der optischen Pinzette aus. Aus diesem Grund wurde in den Experimenten ein diodengepumpter Festkörperlaser eingesetzt. Aktives Material ist in diesem Fall ein zylindrischer Nd-YAG-Kristall. Das optische Pumpen erfolgt dabei über eine Halbleiter-Laserdiode. Da

⁹ Nd-YAG: Neodym-Yttrium Aluminium Garnet.

¹⁰ In der allgemeinen Terminologie auch als (engl.) *continuous wave* oder mit der Abkürzung *cw* bezeichnet.

die emittierte Wellenlänge der Laserdiode mit der Temperatur variiert, ist ihre exakte Regulierung mit einem thermoelektrischen Element notwendig. Dies gewährleistet die optimale Anregung des aktiven Materials über die entsprechenden Absorptionsbanden. In älteren Systemen wurde zum Pumpen eine Entladungslampe verwendet, was ein kompliziertes Kühlsystem erforderte und mit großen Schwankungen in der Ausgangsleistung von bis zu 20% verbunden war. Die Vorteile des Pumpens mit einer Laserdiode bestehen jedoch in der höheren Effizienz, längeren Lebensdauer und einer kompakteren Konstruktion des Lasers. Außerdem zeichnen sich die moderneren Versionen mit einem Rauschen von nur 1% durch ihre höhere Stabilität aus (Sterba, 1998).

Objektiv:

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren noch keine Objektive, die speziell für die Anwendung im nahen Infrarot-Bereich optimiert worden sind. Aus diesem Grund kommt es bei der Fokussierung des Lasers zu Abweichungen vom idealen optischen Abbildungsverhalten eines Objektivs. So sind achromatische Aberrationen für die Deformation des beugungslimitierten Laserfokus verantwortlich und reduzieren damit den Intensitätsgradienten des elektromagnetischen Feldes. Im speziellen Fall der sphärischen Aberration ist die Brennweite eines parallelen Strahls vom Abstand zur optischen Achse abhängig. Daraus resultiert im allgemeinen eine Abnahme der Stabilität der optischen Pinzette mit zunehmender Distanz zum Deckglas (Sterba, 1998).

Des weiteren absorbieren Objektive einen großen Teil der einfallenden Laserstrahlung. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die optischen Komponenten eines Objektivs mit einer Antireflexions-Beschichtung versehen sind, die sich durch eine hohe Transmission im visuellen und ultravioletten Bereich auszeichnen. Im Infrarot-Bereich führen diese Beschichtungen zu internen Reflexionen und einer signifikanten Absorption der Laserstrahlung in den optischen Komponenten. Für das im Experiment verwendete Immersionsobjektiv von Zeiss (100× 1.3) beträgt die Transmission bei einer Wellenlänge von 1064 nm nur ca. 59% (Svoboda, 1994). Thermisch induzierte Schäden am Objektiv durch die Absorption von Strahlung können für Laserleistungen unter 1 W ausgeschlossen werden.

Strahlaufweiter:

Der effektive Radius des Laserstrahls muß mindestens dem der Eintrittspupille des Objektivs entsprechen, um eine Fokussierung auf einen beugungslimitierten Punkt zu gewährleisten. Für den Durchmesser der Eintrittspupille gilt nach Zeiss die folgende Formel:

$$d_{\text{Pupille}} = \frac{500 \cdot \text{N. A.}}{M} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Hierbei bezeichnet N. A. die numerische Apertur und M die Vergrößerung des Objektivs. Mit Gl. 3.3 folgt für das verwendete Objektiv mit $M = 100$ und $\text{N. A.} = 1.3$ ein Durchmesser der Pupille von 6.5 mm. Im vorliegenden Fall wird die erforderliche Vergrößerung des Radius durch einen Strahlaufweiter und der Divergenz des Laserstrahls von 1 mrad erreicht. Prinzipiell ist der Aufbau eines Strahlaufweiters dem eines astronomischen Teleskops äquivalent. Für den experimentellen Aufbau standen zwei Bauformen zur Diskussion. Sie werden in Analogie zu den entsprechenden Teleskopen in der Astronomie als Keplerscher- bzw. Galileischer Strahlaufweiter bezeichnet und bestehen aus einer Kombination aus zwei verschiedenen Linsen. Ihr Abstand L ist dabei durch die Summe der beiden Brennweiten $L = f_1 + f_2$ gegeben. Des weiteren gilt für die Vergrößerung des effektiven Strahlradius die Beziehung: $V = f_2 / f_1$. Der Keplersche Strahlaufweiter stellt dabei eine Kombination aus zwei positiven Linsen dar. Im Unterschied dazu handelt es sich beim Galileischen Typ um die Kombination aus einer negativen sowie einer positiven Linse. Während für den Keplerschen Strahlaufweiter die Möglichkeit existiert, einen Raumfilter in der Fourierebene der ersten Linse zu installieren, zeichnet sich der Galileische Typ durch seine kleinere Baulänge L bei gegebener Vergrößerung aus.

Der entscheidende Parameter für die Realisierung des Galileischen Strahlaufweiters im experimentellen Aufbau war die geringere Baulänge. Im konkreten Fall hatten die Linsen L_1 und L_2 die Brennweiten von $f_1 = -40$ mm bzw. $f_2 = 250$ mm, was einer Baulänge von $L = 210$ mm entspricht. Daraus folgt eine Vergrößerung des Strahldurchmessers von 1 mm um den Faktor $V = -6.25$. Das negative Vorzeichen deutet auf eine invertierte optische Abbildung hin, die für ein symmetrisches Intensitätsprofil der TEM_{00} -Mode des Lasers keine Rolle spielt. Der Strahl hat unter Berücksichtigung der Divergenz des Lasers und einer optischen Weglänge von ca. 0.8 m an der Eintrittspupille des Objektivs einen Durchmesser von ca. 6.5 mm. Dadurch ist ein wichtiges Kriterium für die Stabilität der optischen Pinzette erfüllt. Wie Abb. 3.1 zeigt, wurde der Strahlaufweiter direkt nach dem Laser in das optische System integriert. Darüber hinaus minimierten Plankonkav- bzw. Plankonvexlinsen in der richtigen Orientierung die sphärischen Aberrationen des Galileischen Strahlaufweiters.

Optische Komponenten:

Die in das optische System integrierten Linsen (1), (2) und (3) aus Borosilikat-Kronglas (BK 7) wurden mit einer speziellen Antireflexions-Beschichtung für die Wellenlänge $\lambda = 1064 \text{ nm}$ versehen (Melles Griot, Bensheim, Deutschland). Dazu werden dem Substrat im allgemeinen dünne Schichten geeigneter optischer Materialien mit definierten Brechungsindizes aufgedampft. Reflexionen an den Oberflächen der verschiedenen Schichten löschen sich dabei durch destruktive Interferenz aus. Der Reflexionskoeffizient der Beschichtung für die Nd-YAG-Laserlinie hat einen maximalen Wert von ca. 0.2%.

Die justierbaren Spiegel nach dem Strahlaufweiter ermöglichen die Ausrichtung des Laserstrahls parallel zur optischen Achse. Sie lassen sich über Feingewindeschrauben in zwei zueinander orthogonalen Achsen um die Winkel φ und θ verkippen. Mit Hilfe einer weiteren Schraube kann zusätzlich eine Verschiebung des Drehpunkts erreicht werden. Bei den Spiegeln handelt es sich um Silber-bedampfte Substrate aus Glas mit einem Reflexionskoeffizienten von ca. 98.5%.

Die Bikonvex-Linse (3) zur Fokussierung des Laserstrahls in der Ebene f_3 ist auf einem Reiter montiert, der auf einer optischen Schiene verschoben werden kann. Eine Translation der Linse in die Richtungen senkrecht zur optischen Achse erfolgt dabei über ein Positionierungselement mit Mikrometerschrauben.

Optischer Tisch:

Die mechanische Stabilität ist für den experimentellen Aufbau von entscheidender Bedeutung, da ein im Laserfokus gefangenes Partikel durch Vibrationen aus der optischen Pinzette geschlagen werden kann. Aus diesem Grund war es notwendig, das Mikroskop mit allen anderen Komponenten auf einen schwingungs isolierten optischen Tisch zu montieren. Dazu wurde eine 15 cm dicke Steinplatte mit zentraler Apertur für die CCD-Kamera auf ein stabiles Metallgestell mit ca. 50 drucklosen Tennisbällen plaziert. Eine entsprechende Montageplatte mit Lochraster ermöglichte eine einfache Befestigung des Mikroskops und aller anderen optischen Komponenten mit einem Systembausatz. Die Einkoppelung des Lasers über den TV-Anschluß eines inversen Mikroskops hatte dabei den Vorteil, daß die Strahlführung des Lasers parallel zur Montageplatte erfolgen konnte. Diese Konfiguration zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität aus. Auf Grund des schwingungs isolierten optischen Tisches stellten Vibrationen in der Umgebung für die Experimente kein Problem dar.

3.1.4 Justage der optischen Pinzette

Die Ausrichtung des Laserstrahls parallel zur optischen Achse des Mikroskops hat einen entscheidenden Einfluß auf die Funktion einer optischen Pinzette. Da die Einkoppelung des Lasers in ein kommerzielles Mikroskop erfolgte, konnte die Durchlicht-Beleuchtung zur Justage der optischen Komponenten im Laserstrahlengang verwendet werden. Der in einem Filterschieber montierte dichroitische Spiegel (1) reflektierte einen geringen Teil der Durchlicht-Beleuchtung. Die zentrierte Feldblende des Kondensors in der Objektebene definierte dabei die optische Achse des Mikroskops. Des weiteren wurde die Abbildung der Feldblende im optischen System sukzessive bis zur Eintrittspupille des Strahlaufweiters verfolgt. Die justierbaren Spiegel ermöglichten eine Zentrierung der Durchlicht-Beleuchtung mit den optischen Komponenten im Laserstrahlengang.

Im nächsten Schritt wurde der Laserstrahl parallel zur optischen Achse des Mikroskops ausgerichtet. Dies erforderte eine exakte räumliche Positionierung des Lasers mit Hilfe der dafür vorgesehenen Justierschrauben. Dazu war es notwendig, das Objektiv aus dem Mikroskop zu entfernen und den Laserstrahl in der Apertur des Objektivrevolvers zu zentrieren. Zur Visualisierung des unsichtbaren Infrarot-Laserstrahls wurden IR-Sensor-Karten eingesetzt. Im Idealfall stellte der Laserstrahl in der Eintrittspupille des Objektivs ein paralleles Strahlenbündel dar. Daraus folgt die Koinzidenz des Laserfokus mit der Fokalebene des Objektivs (parfokaler Fall).

Darüber hinaus kann die optische Pinzette über das definierte Beugungsmuster des Laserfokus justiert werden. Reflexionen der einfallenden Laserstrahlung an der Grenzfläche zwischen dem Deckglas und dem Präparat werden dabei durch die CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Positionierung der optischen Pinzette in die Grenzfläche ermöglicht die Abbildung des Laserfokus als beugungslimitierten Punkt. Eine Fokussierung des Lasers über- und unterhalb der Grenzfläche führt zur Expansion bzw. Kontraktion des Beugungsmusters. Zeigt sich dabei ein unsymmetrisches Profil in der Intensität, dann trifft der Laserstrahl nicht exakt orthogonal auf das Deckglas. Mit Hilfe der beiden justierbaren Spiegel kann ein symmetrisches Beugungsmuster des Laserstrahls eingestellt werden. Bei dieser Prozedur muß die Orientierung der Spiegel abwechselnd solange variiert werden, bis sich ein symmetrisches Profil ergeben hat (Sterba, 1998).

3.2 Elektrophorese

3.2.1 Theoretische Grundlagen

Im elektrischen Feld einer geladenen Oberfläche akkumulieren die Gegenionen eines Elektrolyten, während die Ionen mit gleichem Vorzeichen eine Repulsion erfahren. Dies führt zu einer Abschirmung der Ladung des Partikels und reduziert die Reichweite des elektrostatischen Potentials. Die Hülle aus den Gegenionen wird im allgemeinen als diffuse elektrische Doppelschicht bezeichnet und im Rahmen der Gouy-Chapman-Theorie mathematisch eingeführt. Das Modell geht von einer homogen geladenen Oberfläche in einem Elektrolyten aus, die eine Äquipotentialfläche mit einem Potential ψ_0 darstellt. Die Ionen des Elektrolyten werden dabei als Punktladungen in einem kontinuierlichen dielektrischen Medium betrachtet. Unter diesen Voraussetzungen gilt für das Potential ψ die Poisson-Gleichung: $\Delta\psi = -\rho/\epsilon_r \epsilon_0$. Hierbei sind ρ die Ladungsdichte, ϵ_r die relative Permeabilität und ϵ_0 die Influenzkonstante.

Die elektrostatische Wechselwirkung konkurriert jedoch mit der thermodynamischen Bewegung der Ionen im Elektrolyten, die durch die Boltzmann-Gleichung beschrieben werden kann: $n_i = n_i^0 \exp(-z_i e \psi / k T)$. Der Index i bezieht sich auf die unterschiedlichen Ionen mit der Valenz z_i des Elektrolyten. Weiter bezeichnen n_i die lokale und n_i^0 die Konzentration der Ionen für große Distanzen zur geladenen Oberfläche, e die Elementarladung, k die Boltzmann-Konstante sowie T die absolute Temperatur. Aus der Kombination der zwei fundamentalen Beziehungen resultiert die Poisson-Boltzmann-Gleichung:

$$\Delta\psi = -\frac{1}{\epsilon_r \epsilon_0} \sum_i z_i e n_i^0 \exp\left\{-\frac{z_i e \psi}{k T}\right\} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

Dabei ist die Ladungsdichte der Ionen im Elektrolyten durch die Formel: $\rho = \sum_i n_i z_i e$ gegeben. Gl. 3.4 stellt eine nicht-lineare Differentialgleichung dar, für die nur unter bestimmten Annahmen eine analytische Lösung existiert. Die Exponentialfunktion kann jedoch für den Fall kleiner Exponenten durch eine Taylor-Entwicklung 1. Ordnung substituiert werden. Aus der Poisson-Boltzmann-Beziehung folgt die Differentialgleichung: $\Delta\psi = \chi^2 \psi$, die im allgemeinen als Debye-Hückel-Approximation bezeichnet wird. Der Parameter χ ist durch die folgende Formel definiert:

$$\chi = \left(\frac{e^2 \sum_i n_i^0 z_i^2}{\epsilon_r \epsilon_0 k T} \right)^{1/2} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Der sogenannte Debye-Hückel-Parameter χ stellt eine zentrale Größe in kolloidalen Systemen dar und ist hauptsächlich von der Konzentration und Valenz der unterschiedlichen

Ionen des Elektrolyten abhängig. Darüber hinaus kann der reziproke Wert des Parameters als die Dicke der diffusen elektrischen Doppelschicht oder die Abschirmlänge des elektrostatischen Feldes interpretiert werden (Russel, 1989).

Auf Grund der Ladungsneutralität des Gesamtsystems müssen die akkumulierten Gegenionen in der diffusen elektrischen Doppelschicht die Oberflächenladungen kompensieren. Aus dem Integral $\sigma_0 = -\int \rho \, dx$ folgt der Zusammenhang zwischen der Oberflächenladungsdichte σ_0 und dem Oberflächenpotential ψ_0 für ein homogen geladenes planares System. Die Verteilung der Gegenionen ist dabei durch die Poisson-Boltzmann-Gleichung gegeben. Im Fall eines symmetrischen Elektrolyten ergibt sich der Zusammenhang:

$$\sigma_0 = \sqrt{8 n^0 \varepsilon_r \varepsilon_0 k T} \sinh\left(\frac{z e \psi_0}{2 k T}\right) \quad (\text{Gl. 3.6})$$

Eine analoge Formel gilt für eine Kugel mit der Oberflächenladung Q und dem Radius r :

$$Q = 4 \pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r (1 + \chi r) \psi_0 \quad (\text{Gl. 3.7})$$

Es muß jedoch betont werden, daß es sich im Unterschied zu Gl. 3.6 bei der Variable Q nicht um eine Oberflächenladungsdichte handelt (Hunter, 1981).

Elektrophorese:

Die Elektrophorese beschreibt die Wanderung geladener kolloidaler Teilchen in einem elektrischen Feld. Für ein geladenes Partikel, das sich im elektrischen Feld E mit einer konstanten Geschwindigkeit v bewegt, ist das Zetapotential ζ durch die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung gegeben (McLaughlin, 1977):

$$\zeta = \frac{\eta v}{\varepsilon_0 \varepsilon_r E} \quad (\text{Gl. 3.8})$$

Hierbei sind η die Viskosität, ε_r die relative Permeabilität und ε_0 die Influenzkonstante. Das Zetapotential stellt dabei das elektrische Potential der Oberflächenladungen in der hydrodynamischen Scherebene¹¹ dar. Die Einhüllende der adsorbierten Ionen oder Moleküle, die dem geladenen Partikel bei der Elektrophorese folgen, wird als hydrodynamische Scherebene bezeichnet. Ihr Abstand zur Lipidmembran-Beschichtung einer Silika-Kugel beträgt ca. 0.2 nm. Das Zetapotential ist also in guter Näherung mit dem Oberflächenpotential identisch: $\zeta = \psi_0$. Eine Substitution kann auch in Gl. 3.6 und Gl. 3.7 vorgenommen werden.

¹¹ Im Englischen als *surface of shear* bezeichnet.

Außerdem gilt Gl. 3.8 nur unter der Voraussetzung, daß Relaxationseffekte bei der Elektrophorese keine Rolle spielen. Bei diesen Effekten handelt es sich um kleine Störungen in der diffusen Doppelschicht des geladenen Partikels auf Grund des äußeren elektrischen Feldes. Sie können im allgemeinen vernachlässigt werden, wenn die Oberflächenladung gering und die Abschirmlänge in Relation zu den Dimensionen des Partikels klein ist. Aus diesem Grund können Relaxationseffekte für die geplanten Experimente ausgeschlossen werden (Overbeek, 1967) (O'Brien, 1978).

Die Bestimmung des Zetapotentials nach der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung basiert auf der Messung der konstanten Driftgeschwindigkeit v eines geladenen Partikels in einem äußeren elektrischen Feld E . In diesem Fall kompensieren sich die elektrophoretische Kraft F_{el} und die hydrodynamische Reibungskraft F_R auf das Partikel. Für ein sphärisches Teilchen mit dem Radius r in einem Medium der Viskosität η ist die Reibungskraft durch die Stokes-Gleichung: $F_R = 6\pi\eta r v$ gegeben. Mit der Formel für das Gleichgewicht der Kräfte ($F_{el} = 6\pi\eta r v$) kann Gl. 3.8 modifiziert werden zu:

$$\zeta = \frac{F_{el}}{6\pi r \epsilon_r \epsilon_0 E} \quad (\text{Gl. 3.9})$$

Diese Gleichung gilt auch für ein in der optischen Pinzette gefangenes Partikel. Im Unterschied zu einem freien Teilchen wird jedoch die elektrophoretische Kraft F_{el} durch das harmonische Potential der optischen Pinzette kompensiert.

Elektroosmose

Die Elektroosmose basiert auf den gleichen physikalischen Prinzipien wie die Elektrophorese. Es wandern jedoch keine geladenen Partikel im elektrischen Feld, sondern die Ionen des Elektrolyten bewegen sich relativ zu einer stationären, planaren und geladenen Festkörperoberfläche. Im konkreten Fall erzeugt ein elektrisches Feld parallel zu einer Kapillare einen hydrodynamischen Fluß des Elektrolyten. An der geladenen Oberfläche der Kapillare kommt es zu einer Akkumulation von Gegenionen, die sich zusammen mit den Molekülen der Flüssigkeit in Richtung des elektrischen Feldes bewegen. Die Geschwindigkeit des Elektrolyten ist dabei parallel zur Phasengrenze. Der Zusammenhang zwischen der elektroosmotischen Mobilität und dem Zetapotential der Oberfläche kann bis auf ein negatives Vorzeichen mit der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (Gl. 3.8) beschrieben werden (Hunter, 1981).

Das Flußprofil in einer offenen Kapillare zeichnet sich bis auf einen schmalen Bereich an der Oberfläche durch eine konstante elektroosmotische Geschwindigkeit aus. Auf Grund der Inkompressibilität von Flüssigkeiten kommt es bei einem abgeschlossenen System zu

einem Rückfluß im Zentrum der Kapillare. In der stationären Ebene hat die Flußgeschwindigkeit den Wert Null, da sich Hin- und Rückfluß kompensieren. Bei einer Kapillare mit rechteckigem Querschnitt kann eine einfache analytische Lösung für die stationäre Ebene angegeben werden, wenn die Breite b im Vergleich zur Höhe h des Kanals groß ist:

$$y_{\text{Stationäre Ebene}} = \pm \frac{h}{2\sqrt{3}} \quad (\text{Gl. 3.10})$$

Der Nullpunkt des Koordinatensystems liegt dabei im Zentrum der Kapillare. Außerdem sind die Achsen des Systems parallel zu den Kanten des Kanals orientiert (Abb. 3.4). Die elektrophoretische Mobilität eines Partikels kann in einem abgeschlossenen System nur in der stationären Ebene gemessen werden. Eine ideale Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einer neutralen Lipidmembran eliminiert die Elektroosmose und ermöglicht die Bestimmung des Zetapotential unabhängig von der Distanz zur Oberfläche.

3.2.2 Konzeption einer Elektrophoresekammer

Die Experimente zur Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese stellten sehr spezielle Anforderungen an eine Elektrophoresekammer. Da keine entsprechenden kommerziellen Produkte auf dem Markt existierten, war die Konzeption eines neuen Kammertyps notwendig, mit dem die Kinetik einer Enzymreaktion bestimmt werden konnte.

Abb. 3.2 zeigt eine schematische Darstellung der realisierten Elektrophoresekammer. Prinzipiell bestand sie aus einem Haupt- und Seitenkanal, die orthogonal zueinander angeordnet waren. Darüber hinaus wurde jede Öffnung des Kreuzkanals über ein Ventil mit einem separaten Flüssigkeits-Reservoir verbunden. Das Niveau jedes Reservoirs konnte mit Hilfe einer Mikrometerschraube exakt eingestellt werden. Ein definierter Höhenunterschied erzeugte den notwendigen hydrostatischen Druck, um Flüssigkeit durch die Kanäle zu befördern, wobei die eingezeichneten Pfeile die Richtung der angelegten Flüsse andeuten. Die Positionierung der optischen Pinzette erfolgte dabei im zentralen Kreuzungsbereich der beiden Kanäle. Integrierte Elektroden am Ein- und Ausgang des Hauptkanals generierten ein elektrisches Feld, das die geladene Kugel in der optischen Pinzette in Oszillationen versetzte. Der Hauptkanal diente dabei dem Transport von beschichteten Kugeln zum Kreuzungspunkt. Nach dem Einfangen einer Kugel mit dem Laserfokus wurde der Hauptkanal an jedem Ende mit zwei Ventilen geschlossen. Im folgenden konnten Enzyme oder Substanzen mit definierter Konzentration über den Seitenkanal eingeströmt werden. Die daraus resultierende Änderung der Oberflächenladung der Kugel konnte simultan zur Reaktion bestimmt werden. Dabei haben hydrodynamische Effekte beim Einströmen von Flüssigkeit senkrecht zur Richtung des äußeren elektrischen Feldes keinen Einfluß auf das detektierte Signal, das dem Quadrat der Amplitude der

Oszillation entspricht. Dieses wichtige Kriterium für die Bestimmung der Kinetik einer Reaktion wird in Kap. 3.4.3 mit einem Kontrollexperiment gezeigt.

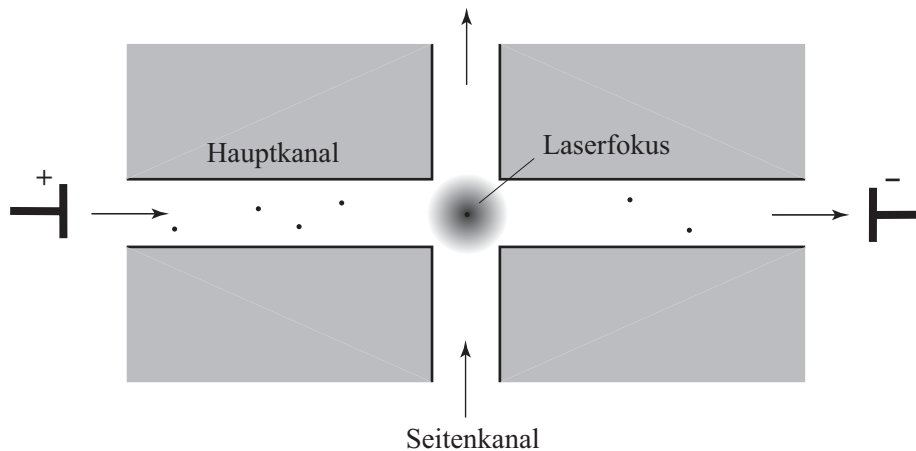


Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines Kreuzkanals. Die Pfeile deuten die Richtung des angelegten Flusses an. Der Ein- und Ausgang jedes Kanals war mit einem separaten Reservoir für die Flüssigkeit verbunden. Ein Transport der beschichteten Silika-Kugeln (Punkte) an die optische Pinzette erfolgte über den Hauptkanal. Nach dem Einfangen eines Partikels mit dem Laserfokus wurde der Hauptkanal geschlossen. Das Einströmen von Substanzen über den Seitenkanal ermöglichte die Messung der Kinetik des Zetapotentials. Die integrierten Elektroden erzeugten ein elektrisches Wechselfeld, in dem die geladene Silika-Kugel in der optischen Pinzette oszilliert.

Das Konzept der beschriebenen Elektrophoresekammer war im Rahmen der Experimente zur Reaktionskinetik mit folgenden Vorteilen verbunden:

1. Der Seitenkanal ermöglichte das Einströmen von Substanzen unter definierten Bedingungen mit einer geringen Totzeit. Dazu mußte vor dem Experiment die entsprechende Substanz in den Kanal sowie in ein zusätzliches Reservoir injiziert werden. Das Einfangen einer zweiten Kugel mit der optischen Pinzette durch Diffusion aus dem Hauptkanal war durch den Kreuzkanal nahezu ausgeschlossen.
2. Die Absorption von Laserstrahlung durch das umgebende Medium führt im allgemeinen zu einer lokalen Erwärmung, was einen Einfluß auf die verschiedenen Parameter des Systems haben kann. So stellte z.B. die Viskosität eine wichtige Größe für die Analyse der Daten dar, die entscheidend von der Temperatur abhängig ist. Untersuchungen haben ergeben, daß sich die Temperatur des umgebenden Mediums im Verhältnis zur Leistung eines Infrarotlasers um ca. 1.7 °C pro 100 mW erhöht (Kuo, 1998). Der kontinuierliche Fluß durch den Seitenkanal während der Messung transportierte die im Medium deponierte Energie ab und hielt somit die Temperatur annähernd konstant.

3. Mit hydrostatischem Druck konnte der Fluß durch die Kanäle in einem großen Bereich variiert werden, der von wenigen Piko- bis hin zu mehreren Mikrolitern pro sec reichte. Das Flußsystem stand durch die Reservoirs permanent unter einem leichten Überdruck, was die Bildung von Luftblasen verhinderte. Diese können den hydrodynamischen Fluß durch die Kanäle beeinträchtigen oder zerstören die homogene Beschichtung der Kammer mit der neutralen Lipidmembran.
4. Ein permanenter Fluß durch den Seitenkanal gewährleistete eine konstante Konzentration der zur Reaktion erforderlichen Substanzen. Die Verluste durch die Diffusion in den Hauptkanal oder die irreversible Bindung des Reagens an die Innenflächen der Elektrophoresekammer wurden damit kompensiert. Außerdem transportierte der angelegte Fluß die bei der Reaktion entstehenden Produkte ab, die einen Einfluß auf die Kinetik des Prozesses haben können. Dies gilt im besonderen für Enzyme, da die Produkte einer katalysierten Reaktion in vielen Fällen die Aktivität des Enzyms regulieren. In den Experimenten zur Enzymkinetik von Phospholipase C kommt es durch ein Reaktionsprodukt zu einer Inhibierung des Enzyms.

Erläuterungen zur Konstruktion der Kammer:

Zur Fokussierung des Lasers ist ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur notwendig. Auf Grund des geringen Arbeitsabstandes dieser Objektive können Partikel bei einem invertierten Mikroskop nur bis zu einer bestimmten Distanz vom Deckglas stabil im Laserfokus gehalten werden. Generell nimmt die Haltekraft der optischen Pinzette bei Distanzen über 20 µm kontinuierlich ab. Folglich ist die Wandstärke der Elektrophoresekammer auf der Unterseite durch die Dicke eines Deckglases limitiert. Außerdem erfordert das Anlegen von hohen elektrischen Feldern Kanäle mit einer kleinen Querschnittsfläche, damit durch die Kammer nur minimale Ströme fließen. Dadurch können Polarisierungseffekte der Elektroden ausgeschlossen werden, die einen entscheidenden Einfluß auf die elektrische Feldverteilung im Kanal haben.

Wie in Abb. 3.3 illustriert, handelte es sich bei der Elektrophoresekammer um eine Konstruktion aus verschiedenen Komponenten und Materialien. Ein optisch transparenter Polycarbonat-Block (90 x 26 mm) fungierte dabei als Halter für einen Einsatz aus Glas mit integriertem Kreuzkanal. Darüber hinaus waren Anschlüsse für die beiden Elektroden und die Teflonschläuche im Polycarbonat-Block vorgesehen. Die Basis des Einsatzes bildete ein Objektträger mit vier kreuzförmig angeordneten Bohrungen, die die Ein- und Ausgänge der Kanäle darstellten. Aus einer thermoplastischen Polyolefin-Folie (Xiro, Schmitt, Schweiz) wurde ein entsprechender Kreuzkanal herausgeschnitten und das Negativ der Form zusammen mit einem Deckglas auf den präparierten Objektträger plaziert. Das thermische Verkleben der Komponenten erfolgte bei einer Temperatur von ca. 140 °C

unter leichtem Druck. Haupt- und Seitenkanal hatten eine Länge von 48 mm bzw. 14 mm. Beide Kanäle zeichneten sich durch eine kleine rechteckige Querschnittsfläche mit einer Breite von ca. 1.5 mm und einer Höhe von ca. 90 μm aus. Die Einsätze aus Glas mit dem integrierten Kreuzkanal konnten nach einer Reinigungsprozedur im allgemeinen wieder verwendet werden. Der Laserfokus wurde in den Experimenten 20 μm über dem Deckglas in der stationären Ebene positioniert (Hunter, 1981). Durch das Design der Elektrophoresekammer konnte erreicht werden, daß die stationäre Ebene des Kanals mit dem optimalen Arbeitsbereich der optische Pinzette übereinstimmte.

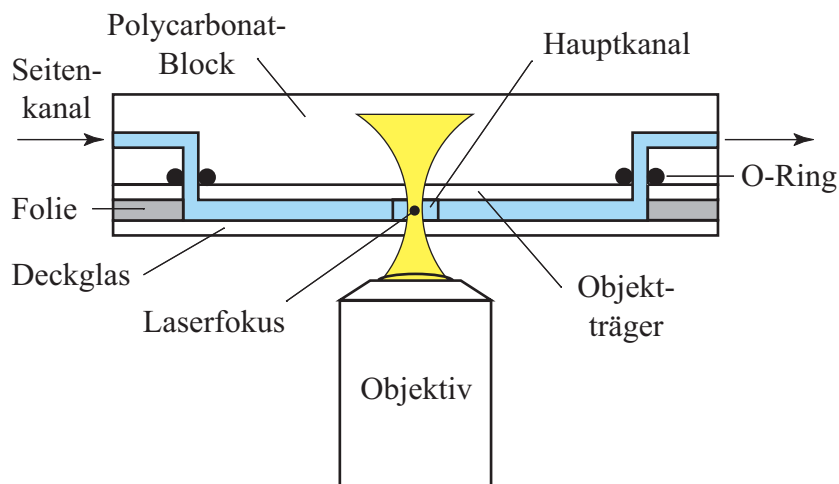


Abb. 3.3: Aufbau der Elektrophoresekammer. Ein Schnitt durch den Seitenkanal zeigt, daß es sich bei der Kammer um eine Konstruktion aus verschiedenen Materialien handelt. In dem Polycarbonat-Block sind die Elektroden und die Anschlüsse für die Teflonschläuche integriert. Außerdem fungiert er als Halter für einen Einsatz aus Glas, in dem der Kreuzkanal eingearbeitet ist. Der Einsatz besteht aus einem Objektträger mit vier Bohrungen, der über eine thermoplastische Folie mit einem Deckglas verbunden ist. In die Folie wurde die Form des Kreuzkanals geschnitten.

Alle erforderlichen Zuleitungen und Ventile des Flußsystems bestanden aus dem chemisch inerten Material Teflon. Als Ventile wurden dabei 3-Wege-Hähne eingesetzt, die manuell umgeschaltet werden konnten. Ihre Betätigung führte zu keiner Verdrängung von Flüssigkeit in der Elektrophoresekammer. Aus diesem Grund ermöglichten sie das Öffnen und Schließen der Kanäle während der Messung, ohne die gefangene Kugel in der optischen Pinzette zu verlieren. Dies war eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung der Experimente. Außerdem wurden die Hähne in einem Halter fixiert, um beim Umschalten keine Vibrationen auf die Flußkammer zu übertragen. Das Entlüften der Elektrophoresekammer und die Injektion aller Substanzen erfolgte über die 3-Wege-Hähne ohne großen Aufwand.

3.2.3 Hydrodynamik im Kreuzkanal

Das Verhalten von Strömungen wird im allgemeinen durch die Navier-Stokes-Gleichung beschrieben. Sie stellt eine Bewegungsgleichung für viskose Flüssigkeiten dar und ermöglicht die Berechnung des Strömungsfeldes im Kanal der Elektrophoresekammer. Ihre allgemeine Form ist gegeben durch (Landau, 1991):

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \eta \Delta \mathbf{v} + (\zeta + \eta/3) \nabla (\nabla \cdot \mathbf{v}) \quad (\text{Gl. 3.11})$$

Hierbei bezeichnet ρ die Dichte, \mathbf{v} den lokalen Geschwindigkeitsvektor, p den Druck, ζ und η die Viskositätskoeffizienten der Flüssigkeit. Die Navier-Stokes-Gleichung gilt allgemein für laminare und turbulente Strömungen. In der Hydrodynamik kann allgemein mit Hilfe der Reynoldszahl die Strömung charakterisiert werden. Sie ist ein dimensionsloser Parameter und durch die Formel $Re = v d \rho / \eta$ definiert. Dabei stehen die Symbole v und d für die charakteristische Geschwindigkeit bzw. die Dimension des Systems. Die Reynoldszahl setzt die im System auftretenden Trägheitskräfte in Relation zu den Scherkräften in der viskosen Flüssigkeit. Für kleine Reynoldszahlen liegt eine laminare und für große eine turbulente Strömung vor. In der Navier-Stokes-Gleichung können für kleine Reynoldszahlen die Beschleunigungsterme $(\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}$ und $\partial \mathbf{v} / \partial t$ vernachlässigt werden. Darüber hinaus gilt für inkompressible Flüssigkeiten die Beziehung $\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$, was den letzten Term in Gl. 3.11 eliminiert. Eine Strömung wird im allgemeinen als stationär bezeichnet, wenn $\partial \mathbf{v} / \partial t = 0$ ist.

Die Abb. 3.4 stellt den Kanal der konzipierten Elektrophoresekammer mit der Länge l , der Breite b und der Höhe h schematisch dar. Dabei ist das Koordinatensystem so orientiert, daß alle Achsen parallel zu den Kanten des Kanals verlaufen. Ein hydrostatischer Druck Δp erzeugt im Kanal einen konstanten Druckgradienten, der durch $\Delta p / l$ gegeben ist. Da der Puffer im Experiment als inkompressible Flüssigkeit betrachtet werden kann, existiert nur die Komponente der Geschwindigkeit in x -Richtung. Außerdem spielen Beschleunigungsterme keine Rolle, da die Reynoldszahl der Elektrophoresekammer kleiner als Eins ist. Die Gl. 3.11 kann unter Berücksichtigung aller Punkte geschrieben werden als:

$$\frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} = -\frac{\Delta p}{\eta l} \quad (\text{Gl. 3.12})$$

Eine einfache Lösung der Differentialgleichung kann angegeben werden, wenn die Breite b im Vergleich zur Höhe h des Kanals groß ist ($b \gg h$). In diesem Fall dominiert die Krümmung des Geschwindigkeitsprofils in y -Richtung gegenüber der z -Richtung. Also kann der Term $\partial^2 v_x / \partial z^2$ im Rahmen dieser Näherung vernachlässigt werden. Mit der Nebenbedingung $v_x(-h/2) = v_x(h/2) = 0$, folgt für die Lösung der Differentialgleichung:

$$v_x(y) = \frac{\Delta p}{8 \eta l} (h^2 - 4y^2) \quad (\text{Gl. 3.13})$$

Das Geschwindigkeitsprofil hat also in y -Richtung eine parabolische Form und ist von der Variable z unabhängig. Eine Integration von Gl. 3.13 über die Querschnittsfläche ergibt die Flußrate durch den Elektrophoresekanal:

$$Q = \int_{-h/2}^{h/2} v_x(y) b \, dy = \frac{\Delta p b h^3}{12 \eta l} \quad (\text{Gl. 3.14})$$

Dabei hat die Geometrie des Kanals einen entscheidenden Einfluß auf Q , da die Höhe h mit der 3. Potenz in die Gleichung eingeht. Außerdem ist die Flußrate dem Druckgradienten im Kanal direkt proportional. Die Differenz des hydrostatischen Druckes Δp resultiert aus dem Unterschied Δy im Niveau der Flüssigkeit in den beiden Reservoirs und ist durch die Formel $\Delta p = \rho g \Delta y$ gegeben. Hier bezeichnet ρ die Dichte der Flüssigkeit und g die Gravitationskonstante. Mikrometerschrauben ermöglichen die exakte Positionierung aller Reservoirs und damit die Einstellung einer definierten Druckdifferenz, die auf Grund der Flußrate Q eine Funktion der Zeit ist, da keine automatische Nachregelung des Höhenunterschiedes erfolgte.

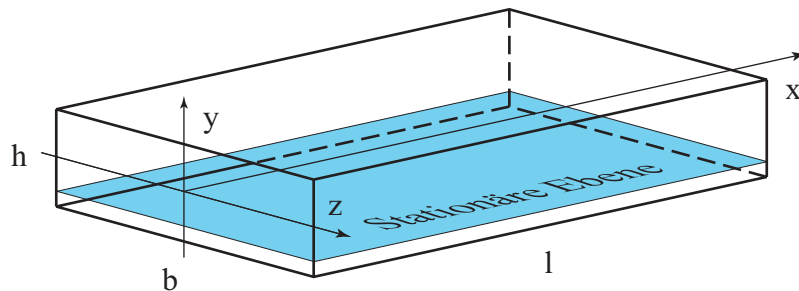


Abb. 3.4: Schematische Darstellung eines Kanals der Elektrophoresekammer mit rechteckigem Profil der Länge l , der Breite b und der Höhe h . Die x -Achse zeigt in die Richtung der Strömungsgeschwindigkeit im Kanal. Außerdem ist die für die Experimente wichtige stationäre Ebene im unteren Teil des Kanals eingezeichnet.

Für den Parameter Δp gilt die Differentialgleichung $d(\Delta p)/dt = -\tau^{-1}\Delta p$, die durch eine Exponentialfunktion $\Delta p = \Delta p_0 \exp(-\tau^{-1}t)$ gelöst wird. Es sind Δp_0 die Druckdifferenz beim Öffnen der Ventile des Kanals und τ die Zeitkonstante. Dabei ist τ von der Geometrie des Kanals sowie den Dimensionen der Reservoirs abhängig und hat für das Flußsystem einen Wert von ca. 3000 s. Folglich kann der Fluß durch den Kanal als stationär betrachtet werden, wenn die Kinetik des Zetapotentials viel kleiner als die Zeitkonstante des Flußsystems ist. Für extrem lange Meßzeiten kann der Höhenunterschied jedoch manuell nachgeregelt werden.

Bisher wurden nur Aussagen über das Strömungsverhalten von Flüssigkeiten in einem einzelnen Kanal mit rechteckiger Querschnittsfläche und konstantem Druckgradienten gemacht. Für die Hydrodynamik eines Kreuzkanals existiert keine einfache analytische Lösung. Das hydrodynamische Strömungsfeld im Kreuzungsbereich ist jedoch für die Messung der Kinetik von Reaktionen von besonderem Interesse, da sich beim Einströmen von Substanzen über den Seitenkanal in kurzer Zeit definierte Konzentrationsverhältnisse an der optischen Pinzette einstellen müssen. Abb. 3.5 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von FITC¹²-markierten Latex-Kugeln mit einem Radius von 1 μm , die auf Grund eines konstanten hydrostatischen Druckgradienten kontinuierlich über den Seitenkanal einströmen. Mit der CCD-Kamera am TV-Ausgang des Mikroskops konnten die Trajektorien der Partikel während der Belichtungszeit aufgezeichnet werden.

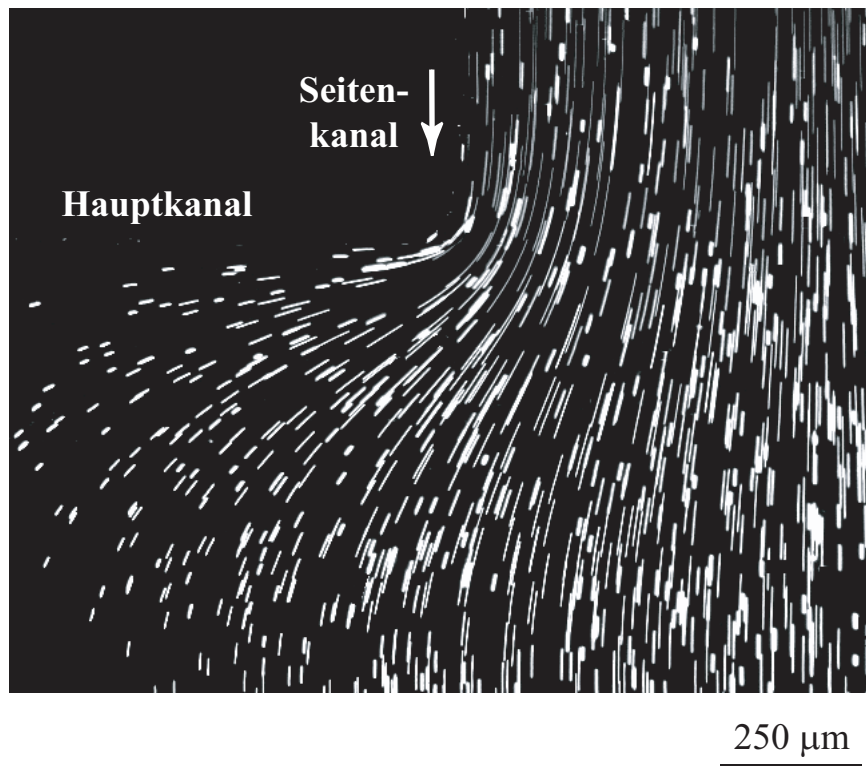


Abb. 3.5: Visualisierung des Strömungsfeldes im Kreuzungsbereich von Haupt- und Seitenkanal mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Aufnahme zeigt FITC-markierte Latex-Kugeln mit einem Radius von 1 μm , die auf Grund eines konstanten hydrostatischen Druckgradienten kontinuierlich über den Seitenkanal einströmen.

Die momentane Geschwindigkeit einer Latex-Kugel spiegelt sich in der Länge ihrer Trajektorie wider. Es ist das hydrodynamische Strömungsfeld für einen Quadranten des Kreuzungsbereiches der beiden Kanäle dargestellt. Der eingezeichnete Pfeil deutet dabei die Richtung des Flusses an. Im allgemeinen sind die Flußlinien zur Mittellinie des Seitenkanals symmetrisch. Des weiteren ist aus Abb. 3.5 zu erkennen, daß es sich um eine

¹² FITC: Fluoreszein-5-isothiocyanat.

laminare Strömung handelt. Dieses Resultat entspricht den theoretischen Vorstellungen für eine Elektrophoresekammer mit einer Reynoldszahl von ca. 1.5. Beim Einströmen der Latex-Kugeln kommt es zu einer Verbreiterung des Strömungsprofils im Hauptkanal. Aus diesem Grund muß der Hauptkanal nach jedem Experiment gründlich gespült werden, um alle Spuren der Substanz zu entfernen.

Wie aus Gl. 3.13 hervorgeht, hat das Geschwindigkeitsprofil in einem einzelnen Kanal in y -Richtung eine parabolische Form und ist von der Variable z unabhängig. Es stellt sich nun die Frage, ob dies auch für den Kreuzungsbereich von Haupt- und Seitenkanal gilt. Abb. 3.6 stellt das Geschwindigkeitsprofil am Kreuzungspunkt beim Einströmen von Flüssigkeit über den Seitenkanal dar. Zur Bestimmung der lokalen Geschwindigkeit wurde eine Silika-Kugel mit der optischen Pinzette auf eine definierte Distanz zum Deckglas angehoben und mit Videomikroskopie die Trajektorie verfolgt. Während des Experimentes waren die Ventile des Hauptkanals geschlossen. Für den hydrostatischen Druck wurde ein konstanter Wert eingestellt, der einer Höhendifferenz zwischen den Reservoiren von 1 mm entsprach. Es zeigte sich, daß auch in diesem Fall ein parabolisches Profil in Flußrichtung vorliegt, wobei in der Mitte des Kanals eine maximale Flußgeschwindigkeit von ca. $60 \mu\text{m/s}$ herrschte. In der stationären Ebene – ca. $20 \mu\text{m}$ über dem Deckglas – hatte die Geschwindigkeit noch einen Wert von ca. $40 \mu\text{m/s}$. Sie ist für die Bestimmung der Totzeit des Flußsystems beim Einströmen von Substanzen relevant.

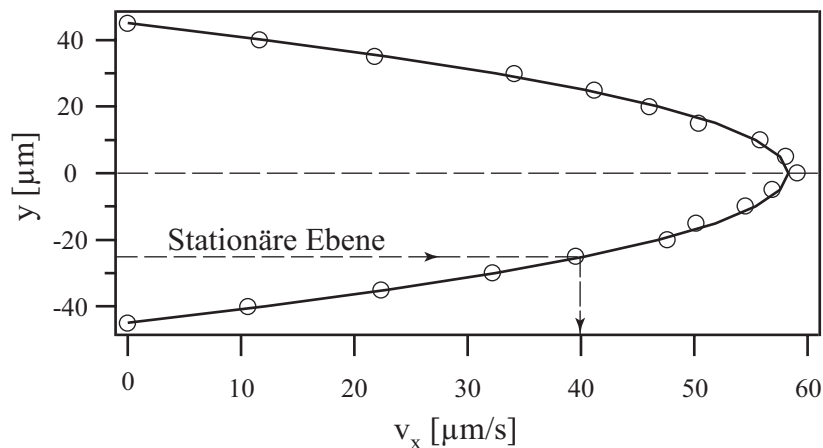


Abb. 3.6: Geschwindigkeitsprofil im Zentrum des Kreuzungsbereiches von Haupt- und Seitenkanal, an dem die optische Pinzette positioniert wurde. Das Profil hat wie im Fall eines einzelnen Kanals mit einer Höhe von ca. $90 \mu\text{m}$ eine parabolische Form und ist von der Variable z unabhängig. Videomikroskopie ermöglichte die Messung der lokalen Geschwindigkeit über die Aufzeichnung der Trajektorie der Silika-Kugel im Strömungsfeld. Der eingestellte hydrostatische Druck entsprach einem Höhenunterschied zwischen den Reservoiren von 1.2 mm. Für die Strömungsgeschwindigkeit in der stationären Ebene konnte in diesem Fall ein Wert von ca. $40 \mu\text{m/s}$ bestimmt werden. Sie ist für die Bestimmung der Totzeit des Flußsystems relevant.

Das Zetapotential einer Kugel als Funktion der Zeit wurde für alle Experimente in einem Abstand von $20\ \mu\text{m}$ über dem Deckglas bestimmt. Der effektive Transport von Substanzen über den Seitenkanal muß mit einer hohen Geschwindigkeit erfolgen, damit sich bei den Messungen zur Kinetik möglichst schnell definierte Konzentrationen einstellen können. Auf der anderen Seite destabilisiert ein hoher hydrodynamischer Fluß die in der optischen Pinzette gehaltene Kugel. Abb. 3.7 zeigt die Strömungsgeschwindigkeit in der stationären Ebene in Abhängigkeit vom hydrostatischen Druck. Offensichtlich existiert für beide Größen bis zu einem kritischen Wert ein linearer Zusammenhang. Dies ist mit Gl. 3.13 konsistent und durch eine numerische Anpassung einer Geraden durch den Nullpunkt angedeutet. Bei einem Höhenunterschied der Reservoirs $\Delta h > 3.6\ \text{mm}$ wird der kritische Wert für die Strömungsgeschwindigkeit v_{kritisch} erreicht. In diesem Fall kann die Silika-Kugel von der optischen Pinzette nicht mehr gehalten werden. Für den hydrostatischen Druck wurde deshalb in den Experimenten ein Wert von $\Delta h \sim 2\ \text{mm}$ eingestellt. Dabei waren die Einstellungen der optische Pinzette mit denen zur Messung der Enzymaktivität in Kap. 4 identisch.

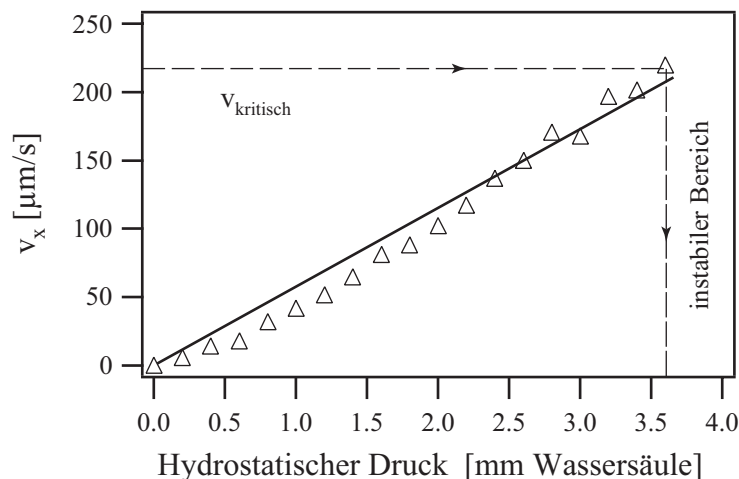


Abb. 3.7: Strömungsgeschwindigkeit in einer Distanz von $20\ \mu\text{m}$ über dem Deckglas (stationäre Ebene) als Funktion des hydrostatischen Druckes. Die Geschwindigkeit v_x ist in erster Näherung dem hydrostatischem Druck direkt proportional (numerische Anpassung einer Geraden durch den Nullpunkt). Für einen Höhenunterschied der Reservoirs $\Delta h > 3.6\ \text{mm}$ wird ein kritischer Wert für die Strömungsgeschwindigkeit v_{kritisch} erreicht. In diesem Fall kann die Silika-Kugel von der optischen Pinzette nicht mehr gehalten werden.

3.2.4 Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einer neutralen Lipidmembran

Die Elektrophoresekammer wurde zu Beginn der Experimente mit einer neutralen Lipidmembran (POPC¹³) beschichtet, was im wesentlichen auf zwei Gründe zurückgeführt werden kann:

1. Eine ideale Beschichtung eliminiert die Elektroosmose in der Kammer, da die neutrale Lipidmembran mit der im Vergleich zum Puffer niedrigen relativen Permeabilität das elektrische Feld der Oberflächenladungen des Glases abschirmt. So liegen die konkreten Werte der Permeabilität für die Lipidmembran und dem Puffer bei ca. $\epsilon_r = 2$ bzw. $\epsilon_r = 80$. Diese Tatsache ermöglicht eine Fokussierung der optischen Pinzette unabhängig von der Distanz zum Deckglas. Kleine Defekte in der festkörpergestützten Lipidmembran führten jedoch zu einer minimalen Elektroosmose, die durch eine Positionierung des Laserfokus in die stationäre Ebene kompensiert werden konnte (Hunter, 1981).
2. Außerdem kann die Adhäsion von hydrophilen Molekülen an die Innenflächen der Elektrophoresekammer durch eine neutrale Beschichtung reduziert bzw. verhindert werden. So zeigen Enzyme wie z. B. Phospholipase C eine sehr starke Affinität u. a. zu Glas- und Plastikoberflächen. Sie gehen im allgemeinen eine irreversible Bindung mit allen Oberflächen ein. Folglich kann es durch die Adhäsion zu unkalkulierbaren Änderungen in der Enzym-Konzentration kommen, was auf die Reproduzierbarkeit der Experimente einen entscheidenden Einfluß hätte. Dies gilt im besonderen für die geplanten Messungen zur Enzymaktivität, da die eingesetzten Konzentrationen extrem gering sind. Ausnahmen von diesem Verhalten stellen Teflon- und neutrale lipidmembranbeschichtete Oberflächen dar (Rebecchi, 1992).

Zur Beschichtung wurden kleine unilamellare Vesikel in die Elektrophoresekammer injiziert. Die nicht fusionierten Vesikel mußten durch gründliches Spülen aus der Kammer entfernt werden. Um die Qualität der festkörpergestützten Lipidmembran überprüfen zu können, war die Messung der Driftbewegung von neutralen multilamellaren Vesikel unter niedrigen Salzkonzentrationen notwendig. Für eine gute Beschichtung zeigten neutrale Vesikel unabhängig von der Distanz zum Deckglas kaum eine elektrophoretische Mobilität.

Darüber hinaus stellt die Fluidität der Lipidmembran einen weiteren wichtigen Parameter in Zusammenhang mit dem selbständigen Ausheilen von Defekten dar. Je höher die laterale Diffusion der Lipide in der Membran ist, desto schneller „heilen“ auftretende

¹³ POPC: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin.

Defekte aus. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann die festkörpergestützte Lipidmembran visualisiert und auf ihre Fluidität bzw. Homogenität untersucht werden. Dazu war es notwendig, die zur Beschichtung eingesetzten kleinen unilamellaren Vesikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff NBD-C₁₂-HPC zu markieren. Abb. 3.8 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der Lipidmembran nach kontinuierlicher Illumination der Probe mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur (Zeiss 100x 1.3). Dies führt zum Ausbleichen aller Fluorophore innerhalb der Feldblende, die den beleuchteten Bereich in der Objektebene begrenzt. Durch die laterale Diffusion ungebleichter Fluorophore von außen formiert sich eine fluoreszente Korona an der Innenseite der Feldblende. Dabei korrespondiert die Breite des Profils der Intensitätsverteilung Γ in erster Näherung mit der Fluidität des Fluorophors in der Membran. Die Methode der kontinuierlichen Fluoreszenz-Mikrophotolyse, die auch mit CFM¹⁴ bezeichnet wird, basiert auf diesem Prinzip und ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Diffusion in der Lipidmembran (Dietrich, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik nur eingesetzt, um qualitative Aussagen über die Fluidität der Lipidmembran machen zu können. Das unsymmetrische Profil der Korona geht dabei auf den hydrodynamischen Fluß in der Elektrophoresekammer zurück.

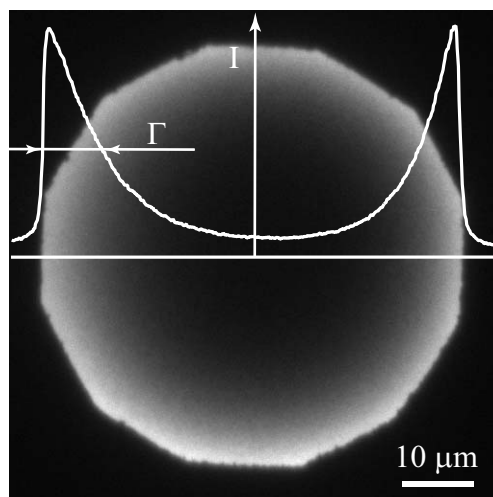


Abb. 3.8: Fluoreszenzaufnahme einer festkörpergestützten Lipidmembran nach kontinuierlicher Illumination der Probe mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur. Die Membran wurde mit dem Fluorophor NBD-C₁₂-HPC im Verhältnis von 0.1% markiert. Eine kontinuierliche Beleuchtung führte zum Ausbleichen aller Fluorophore innerhalb der Feldblende. Durch die Diffusion ungebleichter Fluorophore von außen kommt es zur Formation einer fluoreszenten Korona an der Innenseite der Feldblende. Dabei korrespondiert die Breite des Profils der Intensitätsverteilung Γ in erster Näherung mit der Fluidität des Fluorophors in der Membran.

¹⁴ CFM (engl.): Continuous Fluorescence Microphotolysis.

3.2.5 Beschichtung der Elektroden

Ein kritischer Parameter bei der Elektrophorese ist im allgemeinen die Polarisierung der Elektroden. Sie tritt dann auf, wenn sich hydratisierte Ionen eines Elektrolyten beim Anlegen einer elektrischen Spannung in die Richtung der entgegengesetzten Pole bewegen. An der Oberfläche der Elektroden findet dabei ein Ladungsaustausch mit den eintreffenden Ionen statt. Können nun nicht alle in einem Zeitintervall ankommenden Ionen ihre Ladung auf die Elektroden transferieren, so bildet sich eine diffuse Ladungsschicht von hydratisierten Gegenionen an den Elektroden aus, die das äußere elektrische Feld teilweise abschirmen. Dieser Effekt wird als Polarisierung bezeichnet. Eine genaue Aussage über die Größe der lokalen elektrischen Feldstärke am Ort eines geladenen Objektes ist kaum mehr möglich. Der elektrische Strom in der Elektrophoresekammer nimmt bei einer konstanten Spannung an den Elektroden mit der Formation der diffusen Ladungsschicht als Funktion der Zeit ab, bis sich ein entsprechender Gleichgewichtszustand eingestellt hat. Die Polarisierung wird durch die Formel $P = (I_0 - I_p)/I_0$ definiert. Dabei bezeichnet I_0 den Stromfluß beim Anlegen einer Spannung und I_p den Plateauwert, der sich im Gleichgewichtszustand für $t \rightarrow \infty$ einstellt. Der Wert für die Polarisierung der Elektroden sollte im allgemeinen unter zwei Prozent liegen. Im Gegensatz zu hochfrequenten Wechselfeldern, wo sich durch die schnell wechselnde Polarität kaum Ladungsschichten ausbilden können, spielen Polarisierungseffekte bei Gleichspannungen eine größere Rolle.

Generell ist es für die Experimente zur Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese sehr wichtig, die Polarisierung der Elektroden zu verhindern. Voraussetzung dafür sind eine ausreichend große Oberfläche der Elektroden, eine niedrige Salzkonzentration des Elektrolyten und ein Elektrophoresekanal mit einer geringen Querschnittsfläche. Ein geeignetes Material für die Elektroden stellt dabei das Element Platin dar, weil keine unkalkulierbaren Reaktionen mit den verwendeten Substanzen während der Elektrophorese zu erwarten sind. So können nach den bisherigen Erfahrungen negative Einflüsse von Platin auf die biologische Funktion von Enzymen, Phospholipiden und DNA ausgeschlossen werden. Um die Polarisierungseffekte der Platinelektroden zu minimieren, wurden sie mit einer speziellen Oberflächenbeschichtung versehen, die im allgemeinen als *Platin and black* bezeichnet wird.

Das folgende Protokoll beschreibt die Herstellung einer solchen Platin-Beschichtung (Stuart McLaughlin, Stony Brook, NY, USA). Im ersten Schritt wurde dazu eine Hexachloroplatin (IV)-Säure mit einer kleinen Menge an Blei (IV)-Acetat zur Beschichtung der Elektroden hergestellt (3 g H_2PtCl_6 und 0.02 g $Pb(CH_3COO)_4$ in 100 ml deionisiertem Wasser). Diese gefährliche Säure kann in einer Glasflasche ohne Probleme über mehrere Monate aufbewahrt werden. Ein erstes Waschen der Platinelektroden erfolgte mit einem Detergens und in deionisiertem Wasser. Die Elektroden wurden dann in konzentrierte Salpetersäure (HNO_3) getaucht und eine Spannung von ± 2 V angelegt, um alle organischen

Verbindungen auf der Oberfläche zu entfernen. Sobald sich Blasen gebildet hatten, wurde die Spannung an den Elektroden umgepolt. Diese Prozedur wiederholte sich für 2 min. Nach dem Waschen mit deionisiertem Wasser und dem Trocknen mit einem Heißluftfön wurden die Elektroden mit einer Flamme kurz zum Glühen (ca. 30 sec) gebracht, bevor sie für 2 min in Aqua Regia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$; zweifache Verdünnung) getaucht und mit deionisiertem Wasser gespült wurden. Im nächsten Schritt konnten die Elektroden mit Hexachloroplatin (IV)-Säure beschichtet werden. An den Elektroden wurde eine Spannung von ca. 2 V angelegt und mit einem Amperemeter der Strom gemessen, der einen Wert von 30 mA nicht überschreiten sollte. Für die folgenden 20 min wurde die Spannung alle 30 sec umgepolt. Ein erster schwarzer Niederschlag auf den Elektroden war schon nach ca. 2 min zu erkennen. Die Beschichtung sollte sich kontinuierlich und homogen aufbauen, wobei darauf geachtet werden muß, daß es zu keiner Blasenbildung an den Elektroden kommt. Bilden sich jedoch Blasen, so müssen sie durch ein Anheben der Elektroden entfernt und die angelegte Spannung reduziert werden. Anschließend wurden die Elektroden wieder mit deionisiertem Wasser gespült und eine Elektrolyse mit einer Spannung von ± 1 V ($T = 1$ min) in konzentrierter H_2SO_4 für 10 min durchgeführt. Die Lagerung der Elektroden erfolgt am besten in deionisiertem Wasser.

3.3 Detektorsystem

3.3.1 Videomikroskopie mit digitaler Bildverarbeitung

Die Bestimmung der Position eines Partikels in der optischen Pinzette erfolgte im Rahmen der ersten Experimente mit Hilfe der Videomikroskopie und digitaler Bildverarbeitung. Mit einer am TV-Ausgang des Mikroskops montierten Video-Kamera konnten digitale Bildsequenzen des Partikels mit einer Frequenz von 50 Hz aufgezeichnet werden. Des Weiteren ermöglichte das speziell zur Partikelverfolgung entwickelte Programm *Trekking Image* die automatische Bestimmung der Koordinaten des Teilchens für jedes Bild der Sequenz. Generell kann durch die numerische Anpassung analytischer Funktionen an das Graustufenprofil des Partikels die Position mit einer Auflösung im Sub-Pixel-Bereich detektiert werden (Ziemann, 1997).

Um quantitative Aussagen über die wirkenden Kräfte auf das gefangene Partikel machen zu können, ist eine Kalibrierung der optischen Pinzette notwendig. Dazu wurden die thermischen Fluktuationen des Teilchens auf Grund der Brownschen Bewegung analysiert. In Abb. 3.9 ist die Brownsche Bewegung einer lipidmembranbeschichteten Silika-Kugel mit einem Radius von $0.5\ \mu\text{m}$ im harmonischen Potential der optischen Pinzette dargestellt. Die Membranbeschichtung der Kugel besteht aus einem neutralen (POPC¹⁵) sowie zu 3% aus einem negativ geladenen Lipid (POPS¹⁶) und hat für den verwendeten Puffer aus 2 mM NaCl, 2 mM HEPES bei pH = 7 ein Zetapotential von ca. $-50\ \text{mV}$. Dieser Wert folgt aus Driftmessungen mit einer konventionellen Elektrophoresekammer.

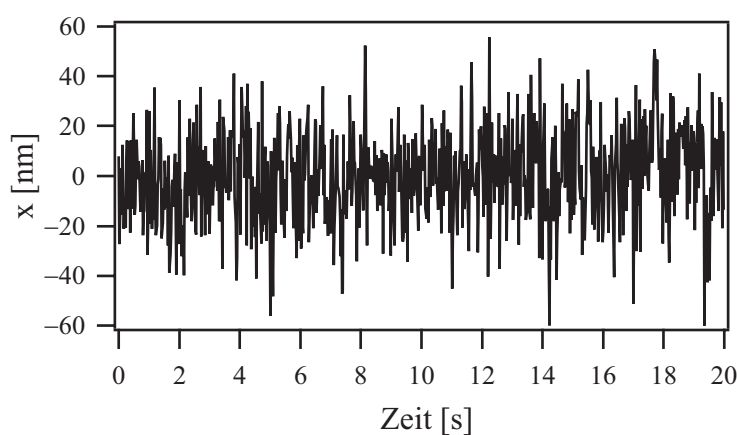


Abb. 3.9: Brownsche Bewegung einer lipidmembranbeschichteten Silikakugel in x-Richtung mit einem Radius von $0.5\ \mu\text{m}$ im harmonischen Potential der optischen Pinzette. Die Aufzeichnung der Kugel mit einer Videokamera erfolgte mit einer Frequenz von 50 Hz.

¹⁵ POPC: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin.

¹⁶ POPS: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serin].

Das Potential der optischen Pinzette kann durch die Boltzmann-Statistik der thermischen Fluktuationen des eingefangenen Partikels bestimmt werden. Im allgemeinen gilt für das thermische Gleichgewicht die folgende Beziehung (Florin, 1998):

$$\rho(x) dx = C e^{-\frac{U(x)}{kT}} \quad (\text{Gl. 3.15})$$

Dabei bezeichnet $\rho(x) dx$ die Wahrscheinlichkeit, das Partikel in der optischen Pinzette mit einer Energie $U(x)$ zu finden. Die Konstante C stellt dabei den Normierungsfaktor der Wahrscheinlichkeitsverteilung, k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur des Systems dar. Mit einer statistischen Auswertung der Amplituden in Abb. 3.9 konnte das Potential der optischen Pinzette als Funktion der Distanz x mit Hilfe von Gl. 3.15 berechnet werden. Das Resultat ist zusammen mit der numerischen Anpassung einer parabolischen Funktion in Abb. 3.10 gezeigt. Die Approximation mit einem harmonischen Potential gilt generell nur für kleine Auslenkungen. Für die Kraftkonstante κ des harmonischen Potentials konnte ein Wert von $\sim 0.5 \cdot 10^{-5}$ N/m ermittelt werden.

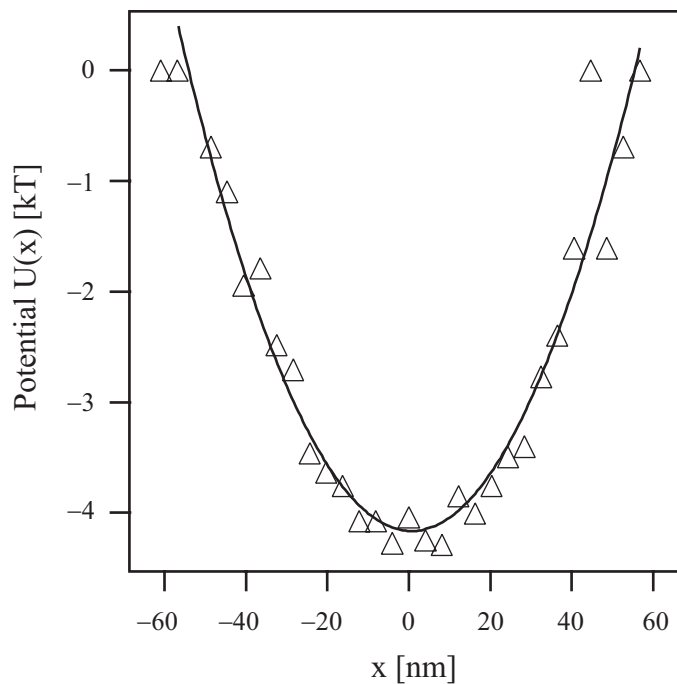


Abb. 3.10: Potential der optischen Pinzette mit numerischer Anpassung einer parabolischen Funktion. Die Bestimmung erfolgte über die Boltzmann-Statistik der thermischen Fluktuationen des Partikels in der optischen Pinzette. Das Potential ist an der Ordinate in Einheiten von $k \cdot T$ angegeben.

Das Ziel der geplanten Experimente sind Messungen zur Kinetik von Reaktionen oder Prozessen, die mit einer Änderung der Oberflächenladung verbunden sind. Dazu müssen die Zetapotenziale einer beschichteten Kugel als Funktion der Zeit bestimmt werden. Im folgenden stellt sich die Frage, ob die Detektion des Partikels in der optischen Pinzette mittels Videomikroskopie und digitaler Bildverarbeitung mit der notwendigen Auflösung

prinzipiell möglich ist. In Abb. 3.11 ist die Auslenkung der negativ geladenenen Kugel in der optische Pinzette als Funktion der Zeit in einem äußeren elektrischen Feld dargestellt. Die Amplitude des alternierenden elektrischen Feldes hatte dabei einen konstanten Wert von 10 V/cm. Außerdem wurde die Polarität ca. alle 2 sec manuell umgeschaltet. Es zeigen sich Sprünge mit einer definierten Amplitude x_{el} von ca. 90 nm. Dabei kompensieren sich an den Umkehrpunkten die elektrophoretische Kraft F_{el} auf das Partikel und die rücktreibende Kraft durch das harmonische Potential: $F_{el} = \kappa \cdot x_{el}$. Mit Gl 3.9 konnte daraus ein Zetapotential von ca. -65 mV für das Teilchen berechnet werden. Darüber hinaus haben entsprechende Messungen mit verschiedenen Spannungen ergeben, daß zwischen der Auslenkung des Teilchens und dem elektrischen Feld ein linearer Zusammenhang existiert. Auf diese Proportionalität wird in Kap. 3.4.3 noch detaillierter eingegangen.

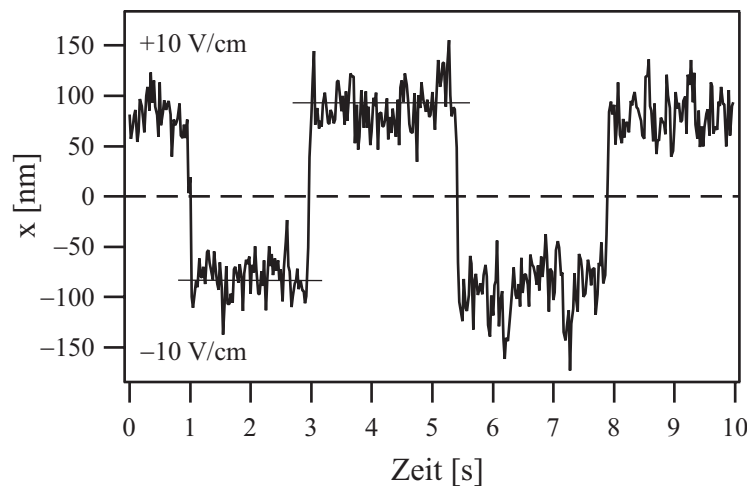


Abb. 3.11: Auslenkung einer negativ geladenenen Silika-Kugel in der optische Pinzette als Funktion der Zeit in einem äußeren elektrischen Feld. Die Amplitude des alternierenden elektrischen Feldes hatte dabei einen konstanten Wert von 10 V/cm. Außerdem erfolgte das manuelle Umschalten der Polarität ca. alle 2 sec.

Die thermischen Fluktuationen des Partikels haben in Relation zur Amplitude der Sprünge einen signifikanten Wert. Für kleinere Zetapotentiale einer beschichteten Kugel lassen sich die Sprünge von der Brownschen Bewegung kaum mehr unterscheiden. Um das Zetapotential eines Partikels mit einer sinnvollen Genauigkeit bestimmen zu können, müssen deshalb viele Perioden aufgezeichnet werden. Diese Tatsache limitiert jedoch die Zeitauflösung zur Messung der Kinetik von Reaktionen. Außerdem ist eine Analyse der Bildsequenz während der Datenerfassung nicht möglich und die Bestimmung des Zetapotentials aus der Amplitude mit großen Fehlern verbunden, was die Diskrepanz mit dem Resultat der konventionellen Messung verdeutlicht.

Ein kritischer Punkt der Detektion des Partikels mit Videomikroskopie stellt die niedrige Frequenz bei der Aufzeichnung von Bildern mit der CCD-Kamera dar. Die Dokumentation der hochfrequenten Fluktuationen der Kugel ist mit dieser Methode nicht möglich.

Interessante Aspekte der molekularen Bewegung bleiben dadurch verborgen. Es wird in diesem Zusammenhang auch von einem Tiefpaßfilter gesprochen (Allersma, 1998) (Gittes, 1998b). Darüber hinaus ist die Detektion der lateralen Position des Partikels in der optischen Pinzette mit Sub-Pixelauflösung nicht ausreichend. Aus den beschriebenen Gründen war die Realisierung eines Detektionssystems mit einer höheren zeitlichen und räumlichen Auflösung notwendig.

3.3.2 Quadrantdiode

Im Unterschied zur Videomikroskopie mit digitaler Bildverarbeitung handelt es sich bei der folgenden Methode um die Detektion der Auslenkung eines Partikels mit Nanometer-Auflösung, die nicht auf ein bildgebendes Verfahren¹⁷ basiert. Mit Hilfe einer segmentierten Photodiode kann die Position eines Partikels in der optischen Pinzette mit hoher Präzision und Frequenz aufgezeichnet werden. Der einfachste Fall stellt dabei die Abbildung der am Partikel in Vorwärtsrichtung gestreuten Laserstrahlung auf eine Quadrantdiode dar (Pralle, 1999). Die einfallenden Photonen erzeugen in jedem Segment einen elektrischen Strom, der zur deponierten Strahlungsleistung proportional ist. Abb. 3.12 zeigt neben dem Strahlverlauf des Lasers im Detektionssystem auch eine schematische Darstellung der Quadrantdiode. Der graue Kreis symbolisiert den vom Laserstrahl beleuchteten Bereich auf dem Detektor. Eine Auslenkung des Partikels in der optischen Pinzette führt zu einer Änderung der Intensitätsverteilung des Lasers auf der Quadrantdiode. Die laterale Position des Laserstrahls relativ zum Zentrum des Detektors ist dabei durch die Differenz der Photoströme bzw. nach einem Strom-Spannungs-Konverter durch die entsprechenden Spannungen gegeben. Für die x- und y-Richtung gelten die folgenden Gleichungen:

$$\begin{aligned}\Delta U_x &= (U_1 + U_4) - (U_2 + U_3) \\ \Delta U_y &= (U_1 + U_2) - (U_3 + U_4)\end{aligned}\tag{Gl. 3.16}$$

Hierbei bezeichnen U_i ($i = 1, 2, 3, 4$) die Spannungen zu den nummerierten Quadranten. Trifft ein symmetrischer Strahl im Zentrum der segmentierten Photodiode auf, dann sind die Spannungen U_i der einzelnen Segmente identisch und die Differenzen der Signale ΔU_x sowie ΔU_y aus Gl. 3.16 verschwinden. Außerdem ermöglicht die Summe aller Spannungen $\sum U_i$ eine Detektion der Auslenkung des Partikels in Richtung der optischen Achse. Eine Normierung der Signale ΔU_x und ΔU_y auf die Summe $\sum U_i$ eliminiert den Einfluß von Schwankungen der Laserleistung. Segmentierte Photodioden können im visuellen sowie im Infrarot-Bereich eingesetzt werden (Stout, 1998).

¹⁷ Im Englischen auch als *nonimaging detection* bezeichnet.

Die Integration des Detektorsystems in den bestehenden experimentellen Aufbau ist mit dem Strahlengang des Lasers in Abb. 3.12 illustriert. Wie bereits in Kap. 3.1.2 beschrieben, bildete der Kondensator den Laserfokus in die Ebene der Feldblende ab, bevor der Strahl nach einer weiteren Linse wieder parallel zur optischen Achse verlief. Im folgenden traf der Laser auf den dichroitischen Spiegel (2), der sich durch eine hohe Transmission im Infrarot-Bereich auszeichnete. Mit Hilfe der positiven Linse L_4 erfolgte die Projektion des Strahls auf die Quadrantdiode. Die Intensitätsverteilung der auf den Detektor einfallenden Laserstrahlung konnte mit der orthogonal zur optischen Achse installierten Video-Kamera simultan zur Messung visualisiert werden. Eine dünne Glasplatte im Strahlengang reflektierte dabei einen kleinen Teil des Laserlichtes in Richtung der Kamera. Außerdem war die Positionierung der Komponenten des Detektorsystems mit Mikrometerschrauben in allen Raumrichtungen möglich. Damit konnte die Quadrantdiode vor jedem Experiment in der optischen Achse zentriert und die Video-Kamera in eine konjugierte Ebene zum Detektor gebracht werden.

Es lassen sich prinzipiell zwei Grenzfälle bei der Projektion des Laserstrahls auf die Quadrantdiode unterscheiden. Im ersten Fall wird die hintere Fokalebene des Kondensators auf den Detektor abgebildet, die der Fourierebene des Partikels in der optischen Pinzette entspricht. Der Vorteil dieser Anordnung besteht darin, daß eine laterale Translation des Laserfokus in der Objektebene keinen Einfluß auf die Intensitätsverteilung der gestreuten Strahlung in der Fourierebene hat. Damit können die Auslenkungen des Partikels in der optischen Pinzette unabhängig von der Position des Lasers detektiert werden. Das Intensitätsprofil in der hinteren Fokalebene des Kondensators repräsentiert die Winkelverteilung der in Vorwärtsrichtung gestreuten Laserstrahlung. Die Detektion in der Fourierebene ist im allgemeinen zu einem Streuexperiment äquivalent (Gittes, 1998a).

Im zweiten Fall handelt es sich um eine reelle optische Abbildung des Laserfokus auf die Quadrantdiode, was eine Positionierung des Detektors in eine zum Präparat konjugierte Ebene erfordert. Dieser Modus zeichnet sich durch ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis aus. Der Durchmesser des Laserfokus auf der Quadrantdiode limitiert aber den Meßbereich für Auslenkungen des Partikels in der optischen Pinzette. Eine lineare Beziehung zwischen der Position des Intensitätsprofils und den Spannungssignalen der Segmente nach Gl. 3.16 gilt jedoch nur für kleine Amplituden des Partikels. Eine Vergrößerung des dynamischen Meßbereiches kann durch die Defokussierung des Lasers auf dem Detektor erreicht werden (Mehta, 1998).

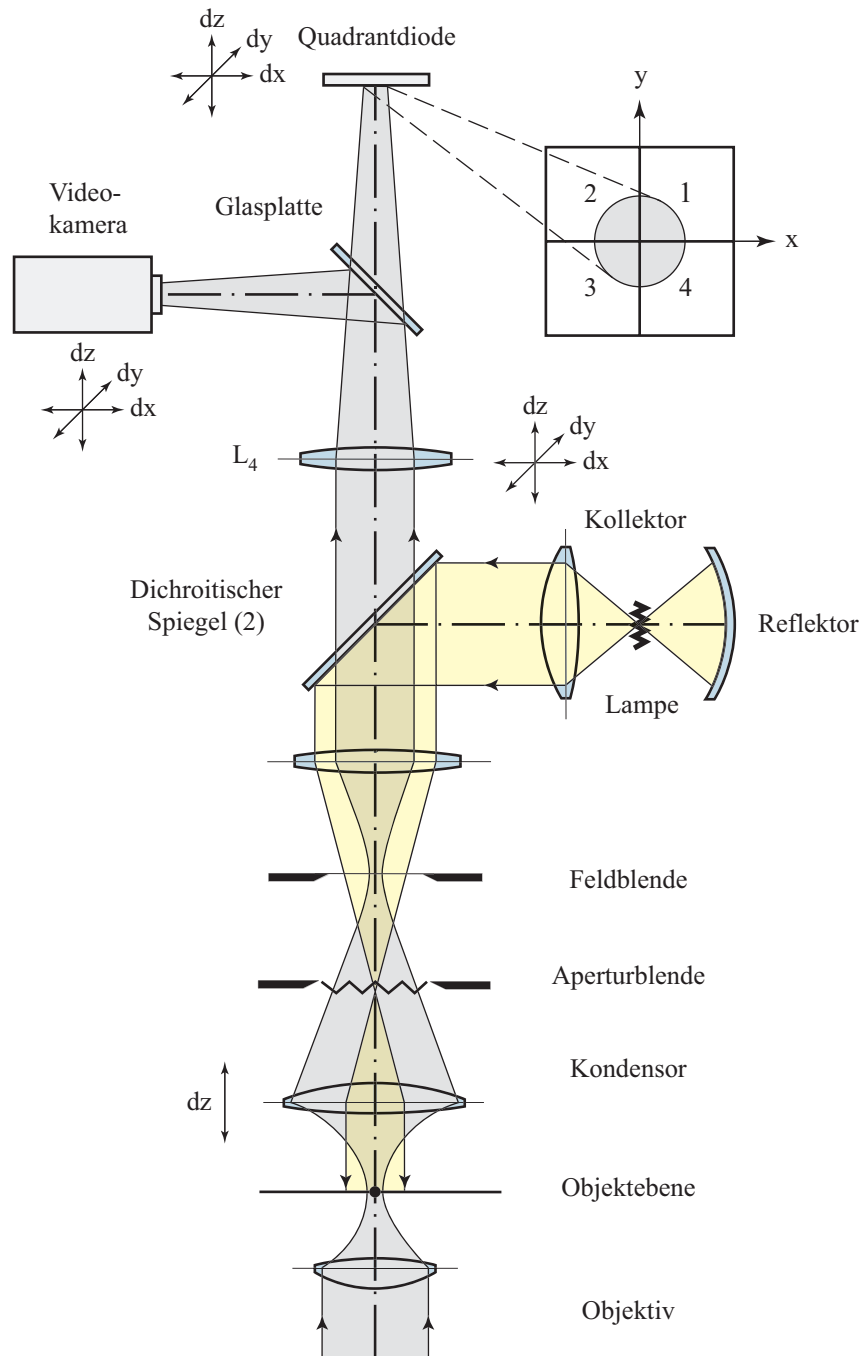


Abb. 3.12: Strahlverlauf des Lasers im Mikroskop mit Detektionssystem und schematische Darstellung der Quadrantdiode.

In den Experimenten konnte die Quadrantdiode nicht exakt in die hintere Fokalebene des Kondensors positioniert werden. Der Detektor hätte in diesem Fall nicht das gesamte parallele Strahlenbündel des Lasers nach dem dichroitischen Spiegel (2) erfassen können. Messungen mit dieser Einstellung zeigten ein kleines Signal/Rausch-Verhältnis. Die Quadrantdiode wurde aus diesem Grund geringfügig aus der konjugierten Fourierebene des

Kondensors verschoben. Dies konnte durch die in den Stahlgang integrierte Linse L_4 oder durch eine Verstellung des Kondensors in Richtung der optischen Achse erreicht werden. Damit war es möglich, den Durchmesser des Laserstrahls auf die Größe der Quadrantdiode zu reduzieren und das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich zu verbessern. Die Detektion der Auslenkung des Partikels in der optischen Pinzette ist jedoch nicht mehr von der Position des Laserfokus in der Objektebene unabhängig. Dies spielte aber keine Rolle, da während des Experiments die Position der optischen Pinzette nicht verändert wurde. Der Detektor, bestehend aus der Quadrantdiode (Hamamatsu, S5981) sowie der entsprechenden elektronischen Schaltung, wurde von Dr. Öffner konzipiert und hergestellt (EMBL, Heidelberg).

Im Unterschied zu einem abbildenden System, bei dem das Auslesen aller Pixel einer CCD-Anordnung einen zeitintensiven Prozeß darstellt, können die Signale der Quadrantdiode mit einer Frequenz aufgezeichnet werden, die nur durch die elektronische Bandbreite des Detektors limitiert ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß eine segmentierte Photodiode die laterale Position des Partikels im Nanometer-Bereich detektieren kann, während die Videomikroskopie nur eine Auflösung im Sub-Pixel-Bereich ermöglicht.

3.3.3 Datenaufzeichnung

Jedes Segment der Quadrantdiode stellt eine Stromquelle dar und ist mit dem invertierenden Eingang eines gegengekoppelten Operationsverstärkers verbunden, der als Strom-Spannungs-Konverter fungiert. Im konkreten Fall hatte die elektronische Bandbreite der Quadrantdiode mit dem Strom-Spannungs-Konverter einen Wert von >70 kHz. Dies entspricht einer Zeitauflösung des Detektors von mindestens $15 \mu\text{sec}$. Theoretisch liegen die elektronischen Bandbreiten von Photodioden im MHz-Bereich. Limitierende Faktoren für die Sensitivität des Detektors sind in der Praxis Fluktuationen durch die endliche Zahl der detektierten Photonen pro Zeitintervall¹⁸ oder das elektronische Rauschen im Vorverstärker (Gittes, 1998b).

Mit der entsprechenden Analog-Elektronik wurde die Addition und Subtraktion der verschiedenen Spannungen U_i nach Gl. 3.16 durchgeführt und die Signale nach einer weiteren Verstärkung in den Computer eingelesen. Eine spezielle A/D-Karte¹⁹ (National Instruments, Austin, TX, USA) digitalisierte die Signale mit einer Frequenz von 16 kHz. Nach der Aufnahme einer definierten Zahl von Datenpunkten erfolgte die Spektralanalyse der Sequenz mit einem FFT²⁰-Algorithmus und die Darstellung des Spektrums auf einem

¹⁸ Im Englischen als *shot noise* bezeichnet.

¹⁹ Es handelte sich um eine Analog-Digital-Karte des Typs: PCI-MIO-16E4.

²⁰ FFT (engl.): Fast-Fourier-Transformation.

Monitor. Das Resultat einer Fourier-Transformation stellt im allgemeinen eine komplexe Funktion dar. Zur Analyse des Spektrums wurde das Quadrat der Amplitude gebildet und die berechneten Werte auf dem Computer abgespeichert. Mit der Aufnahme einer weiteren Sequenz von Datenpunkten konnte das nächste Spektrum berechnet und aufgezeichnet werden. Die Periodendauer für einen Zyklus definiert die zeitliche Auflösung bei den Experimenten zur Reaktionskinetik.

Der FFT-Algorithmus stellt einen zeitintensiven Prozeß im Programmablauf dar, der sich nur dann durch eine hohe Effizienz auszeichnet, wenn die Zahl der Datenpunkte durch eine ganzzahlige Potenz 2^n gegeben ist (Press, 1992). In der Regel wurden in den Experimenten 8192 Datenpunkte ($= 2^{13}$) mit einer Frequenz von 16 kHz in einem Zeitintervall von ca. 500 msec eingelesen. Die Spektralanalyse mit Fourier-Transformation nahm ungefähr die gleiche Zeit in Anspruch. Daraus folgte für die Experimente zur Reaktionskinetik eine Zeitauflösung von ca. 1 sec.

Das große Volumen an aufgezeichneten Daten sowie der Rechenaufwand bei der Fourier-Transformation erforderten einen leistungsfähigen Computer (PC mit zwei Pentium-II Prozessoren). Die Algorithmen und Prozeduren zur Aufnahme, Analyse sowie Darstellung der Daten programmierte V. Kahl (Technische Universität München) mit der Software *LabView* (National Instruments, Version 5.0). Zur weiterführenden Auswertung der Daten wurde das Programm Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) eingesetzt.

3.4 Datenanalyse

3.4.1 Theoretische Grundlagen

Der aufgezeichnete Satz aus N Datenpunkten kann prinzipiell als zeitabhängige Sequenz oder mit Hilfe der Spektralanalyse in einer äquivalenten Form als Funktion der Frequenz dargestellt werden. Im ersten Fall lassen sich singuläre Ereignisse bei der Bewegung des Partikels besonders deutlich erkennen, während der zweite eine einfache Interpretation der Daten ermöglicht. So können Oszillationen oder thermische Fluktuationen eines Partikels in der optischen Pinzette durch ihr Spektrum am besten charakterisiert werden. Die Spektralanalyse erfordert jedoch die Fourier-Transformation des diskreten Satzes von N Datenpunkten x_n . Das Zeitintervall Δt zwischen zwei aufeinanderfolgenden Punkten ist durch die Aufnahme Frequenz f_s bei der Detektion vorgegeben. Für die N unabhängigen komplexen Fourier-Komponenten $X(f_m)$ gilt im allgemeinen die Formel:

$$X(f_m) = \sum_{n=1}^N x_n e^{\frac{2\pi i n m}{N}} \quad (\text{Gl. 3.17})$$

Die diskreten Frequenzen f_m sind durch die Beziehung $f_m = m \cdot \Delta f$ definiert. Dabei liegen die Werte für den Index m im Intervall von $-N/2 \leq m \leq N/2$. Des weiteren bezeichnet die Variable Δf die Breite des Frequenzintervalls und folgt aus der Gleichung $\Delta f = 1/(N \cdot \Delta t)$. Sie entspricht also dem reziproken Wert der totalen Aufnahmezeit einer Sequenz aus N Punkten (Press, 1992).

Da der Datensatz im allgemeinen aus reellen Werten besteht, sind die Komponenten $X(f_m)$ und $X(-f_m)$ zueinander konjugiert komplexe Zahlen. Die Information über die Phasen der Fourier-Komponenten ist für die Analyse der Daten im Rahmen der Experimente zur absoluten Bestimmung des Zetapotentials nicht relevant. Aus diesem Grund erfolgte die Bildung des diskreten Leistungsspektrums²¹ $S_x(f_m)$ aus dem Quadrat der Amplitude der Fourier-Komponenten $|X(f_m)|^2$ für die Frequenzen $f_m \geq 0$. In diesem Zusammenhang wird die maximale Frequenz im Leistungsspektrum als Nyquist-Frequenz bezeichnet. Sie ist durch den halben Wert der Aufzeichnungsfrequenz gegeben: $f_{\text{Nyq}} = 0.5 f_s$ (Gittes, 1998b).

Aus der Summation über die Komponenten des diskreten Leistungsspektrums multipliziert mit dem Frequenzintervall folgt im allgemeinen die Varianz der Auslenkung des Partikels $\text{Var}(x)$ in der optischen Pinzette:

²¹ Im Englischen als *powerspectrum* bezeichnet.

$$\sum_{m=1}^{N/2} S_x(f_m) \cdot \Delta f = \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2 = \text{Var}(x) \quad (\text{Gl. 3.18})$$

Hierbei sind $\langle x^2 \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung und $\langle x \rangle$ der Erwartungswert für die Position des Partikels im Laserfokus. Gl. 3.18 beschreibt formal eine Integration der spektralen Dichte $S(f_m)$ über das Frequenzintervall $[f_1, f_{N/2}]$. Der Term mit dem Index $m = 0$ stellt das Quadrat des Erwartungswertes dar: $S_x(0) \cdot \Delta f = \langle x \rangle^2$. Außerdem gilt für ein Partikel in der optischen Pinzette das Äquipartitionsprinzip: $\text{Var}(x) = kT / \kappa$. So ist die Varianz der Fluktuationen eines Teilchens dem Quotienten aus der thermischen Energie des Systems kT und der Kraftkonstante κ direkt proportional.

Die Brownsche Bewegung eines Partikels kann allgemein mit der Langevin-Gleichung beschrieben werden. Ein Teilchen im harmonischen Potential einer optischen Pinzette ist durch die Kollisionen mit den Molekülen des umgebenden Mediums einer stochastischen Kraft $F(t)$ ausgesetzt. Daraus folgt für die Bewegungsgleichung (Wang, 1945) (Reif, 1987):

$$\gamma \frac{dx}{dt} + \kappa x = F(t) \quad (\text{Gl. 3.19})$$

Es bedeuten die Parameter κ die Kraftkonstante des harmonischen Potentials und γ der Reibungskoeffizient des Mediums, der im Fall eines sphärischen Teilchens die Form $\gamma = 6\pi\eta r$ hat. Die Variable x bezeichnet im folgenden die Auslenkung des Partikels aus dem Minimum des Potentials. Darüber hinaus spielt der Trägheitsterm $m\ddot{x}$ in der Bewegungsgleichung für ein hydrodynamisches System mit kleiner Reynoldszahl keine Rolle. Für den zeitlichen Mittelwert der stochastischen Kraft gilt generell $\langle F(t) \rangle = 0$. Das entsprechende Leistungsspektrum hat einen konstanten Wert: $S_F(f) = 4\gamma kT$.

Die Fourier-Transformation von Gl. 3.19 und die Bildung des Quadrates der Amplitude der komplexen Terme ermöglichen die Lösung der Langevin-Gleichung für ein Partikel im Laserfokus. Die Dynamik der Brownschen Bewegung ist im Leistungsspektrum durch eine Lorentz-Funktion charakterisiert:

$$S_x(f) = \frac{kT}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (\text{Gl. 3.20})$$

Hierbei sind k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und f_c die sogenannte charakteristische Frequenz²², die durch folgende Gleichung definiert ist:

$$f_c = \frac{\kappa}{2\pi\gamma} \quad (\text{Gl. 3.21})$$

²² In der Fachterminologie auch (engl.) *corner frequency* genannt.

Die Einführung der entsprechenden Parameter erfolgte bereits im Zusammenhang mit der Langevin-Gleichung. In Abb. 3.13A ist ein typisches Leistungsspektrum der Brownschen Bewegung eines Partikels in der optischen Pinzette illustriert, das mit dem beschriebenen experimentellen Aufbau gemessen werden konnte. Bei dem Partikel handelte es sich um eine lipidmembranbeschichtete Silika-Kugel mit einem Radius von $0.5 \mu\text{m}$. Die Membranbeschichtung der Kugel bestand aus einem neutralen (POPC) sowie zu 2% aus einem negativ geladenen Lipid.

Es lassen sich im Leistungsspektrum der Brownschen Bewegung zwei Bereiche unterscheiden, die durch die charakteristische Frequenz f_c vorgegeben sind. Die Lorentzkurve hat für den Bereich $f \ll f_c$ in erster Näherung einen konstanten Wert. Im diesem Fall stellt das harmonische Potential eine Barriere für die Amplitude der thermischen Fluktuationen pro Frequenzintervall dar. Für den dazu komplementären Bereich $f \gg f_c$ zeigt sich eine Abnahme im Leistungsspektrum mit der Funktion $1/f^2$, was in log-log-Darstellung einer Steigung von $m = -2$ entspricht. Dieses Verhalten ist für die freie Diffusion eines Partikels in einem Medium charakteristisch und folgt für den Limes $\kappa \rightarrow 0$ direkt aus Gl. 3.20 und Gl. 3.21 (Svoboda, 1994) (Gittes, 1998b).

3.4.2 Kalibrierung

Die detektierten Spannungssignale der Quadrantdiode in x-Richtung ΔU_x können als Leistungsspektrum $S_v(f)$ dargestellt werden. In diesem Fall ist die Ordinate der spektralen Dichte in physikalischen Einheiten von $[\text{V}^2/\text{Hz}]$ gegeben. Abb. 3.13A zeigt ein unkalibriertes Leistungsspektrum der Brownschen Bewegung eines sphärischen Partikels in der optischen Pinzette. Dabei handelt es sich um eine Mittelung über 10 Spektren, die am gleichen Objekt aufgenommen wurden. Die Spannungssignale des Detektors sind den Auslenkungen x des Partikels im Laserfokus direkt proportional. Das entsprechende Amplituden-Leistungsspektrum $S_x(f)$ in Einheiten von $[\text{m}^2/\text{Hz}]$ folgt aus der Gleichung: $S_v(f) = \beta^2 S_x(f)$. Der Parameter β wird in diesem Kontext auch als Detektor-Sensitivität bezeichnet. Im Rahmen einer Kalibrierung müssen die Kraftkonstante κ des harmonischen Potentials und die Detektor-Sensitivität β ermittelt werden (Allersma, 1998).

Die Bestimmung von β erfolgt über die Spektralanalyse der Brownschen Bewegung eines sphärischen Partikels in der optischen Pinzette (Abb. 3.13A). Dieses Prinzip stellt im Unterschied zur Kalibrierung mit piezoelektrischen Positionierungselementen eine indirekte aber unkomplizierte Methode dar. Der Parameter β kann aus einem unkalibrierten Leistungsspektrum der Quadrantdiode durch die Multiplikation mit dem Faktor f^2 (Quadrat der Frequenz) gewonnen werden, ohne die Kraftkonstante κ des Potentials zu kennen. Das resultierende Spektrum aus dem Produkt $f^2 S_v(f)$ erreicht für die Frequenzen

$f \gg f_c$ ein Plateau mit einem Wert P^V . Die Detektor-Sensitivität β ist durch die folgende Formel gegeben (Allersma, 1998):

$$\beta^2 = \frac{P^V \pi^2 \gamma}{k T} \quad (\text{Gl. 3.22})$$

Es bedeuten γ der Reibungskoeffizient, k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Detektor-Sensitivität von der charakteristischen Frequenz f_c des Leistungsspektrums unabhängig ist. Darüber hinaus ist zur Bestimmung von β nur der hochfrequente Bereich des Spektrums relevant.

Die charakteristische Frequenz f_c folgte aus der numerischen Anpassung einer Lorentz-Funktion mit der kleinsten quadratischen Abweichung an das unkalibrierte Leistungsspektrum in Abb. 3.13A. Sie hatte für das in (A) dargestellte Spektrum einen Wert von ca. 360 Hz. Im folgenden konnte die Kraftkonstante κ mit Gl. 3.21 unter der Annahme der Stokes-Beziehung für den Reibungskoeffizienten berechnet werden (Florin, 1998) (Gittes, 1998b).

Nach der Kalibrierung konnte das Zetapotential des geladenen Partikels in der optischen Pinzette bestimmt werden. Dazu war es notwendig, ein alternierendes elektrisches Feld definierter Frequenz in x-Richtung anzulegen und die Amplitude der erzwungenen Schwingung des Partikels zu messen. Abb. 3.13B zeigt das kalibrierte Leistungsspektrum einer lipidmembranbeschichteten Silika-Kugel, die mit der Frequenz des elektrischen Feldes f_{ext} von 160 Hz oszillierte. Die Spannung an den Elektroden mit einer Distanz von 4.8 cm hatte eine Amplitude von 100 V. Darüber hinaus stellen die Graphen in (A) und (B) eine Mittelung über 10 Leistungsspektren des gleichen Partikels dar. Dabei ist jedes Spektrum durch die Fourier-Transformation einer Sequenz aus 2^{13} Datenpunkten gegeben. Das signifikante Maximum in Graph (B) korrespondiert zur erzwungenen Schwingung des Partikels mit der Frequenz f_{ext} des äußeren elektrischen Feldes und ist zum Quadrat der Amplitude der Oszillation direkt proportional.

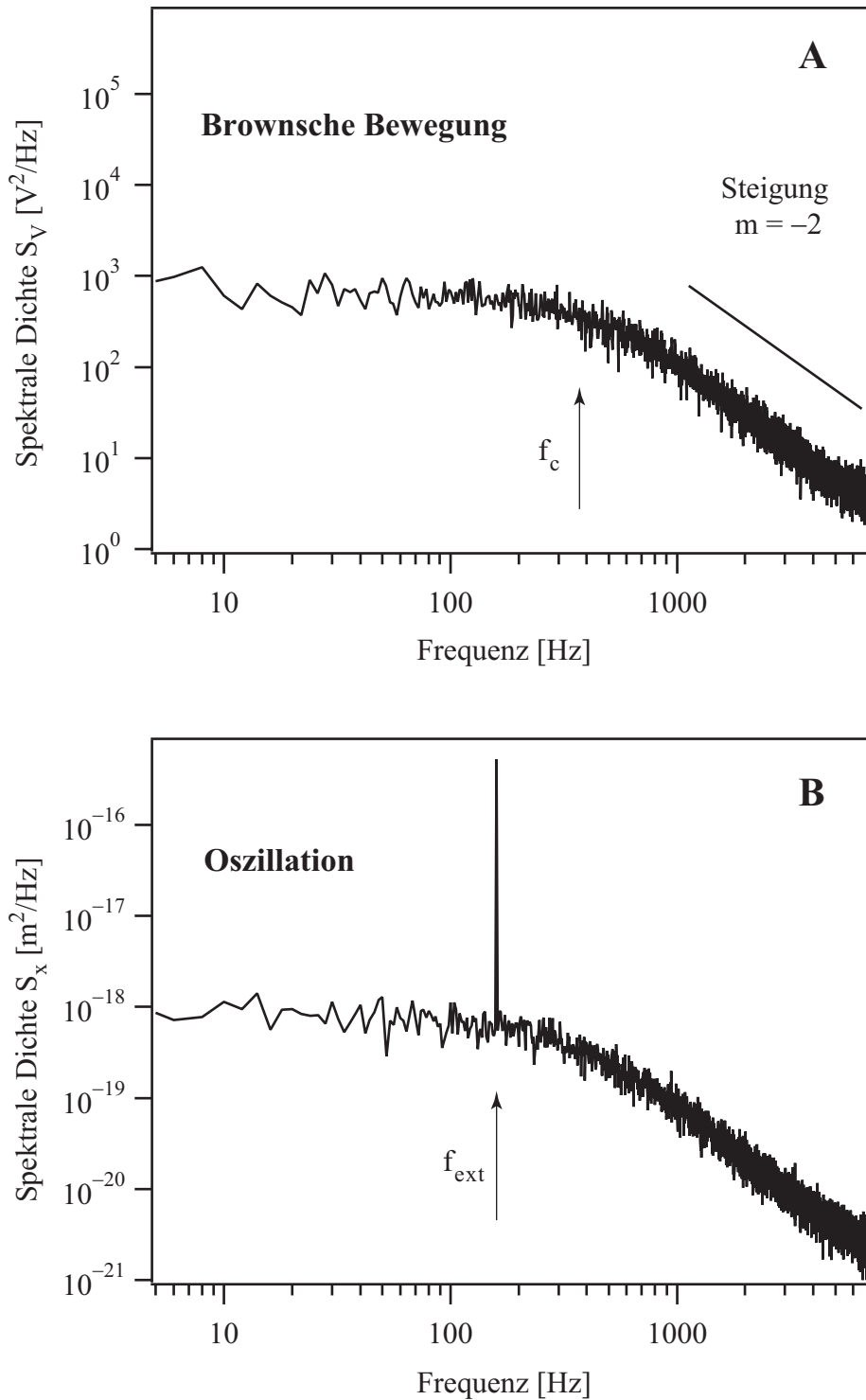


Abb. 3.13: Kalibrierung der optischen Pinzette. In (A) ist ein unkalibriertes Leistungsspektrum $S_V(f)$ der Brownschen Bewegung einer negativ geladenen membranbeschichteten Silika-Kugel in der optischen Pinzette dargestellt. Eine Spektralanalyse ermöglicht die Bestimmung der Detektor-Sensitivität β und der Kraftkonstante κ des harmonischen Potentials. Graph (B) zeigt das kalibrierte Leistungsspektrum der geladenen Silika-Kugel, die erzwungene Schwingungen in einem äußeren elektrischen Wechselfeld mit der Frequenz $f_{\text{ext}} = 160$ Hz ausführt. Das Maximum der Kurve ist zum Quadrat der Amplitude der Oszillation proportional. Aus der Amplitude kann die elektrophoretische Kraft und das Zetapotential bestimmt werden. Es wurde eine Mittelung über 10 Leistungsspektren vorgenommen.

Die Bewegungsgleichung eines geladenen Partikels im Laserfokus hat unter dem Einfluß einer äußeren periodischen Kraft eine äquivalente Form zu Gl. 3.19. Der Term $F(t)$ bezeichnet in diesem Fall die Summe aus der elektrophoretischen Kraft auf das Teilchen im elektrischen Feld und der stochastischen Kraft durch die Kollisionen mit den Molekülen des umgebenden Mediums (Svoboda, 1994). Für die elektrophoretische Kraft F_{el} auf das geladene Teilchen in der optischen Pinzette gilt die folgende Gleichung:

$$F_{el} = \kappa x_{el} \sqrt{1 + f_{ext}^2 / f_c^2} \quad (\text{Gl. 3.23})$$

Es bedeuten die Parameter κ die Kraftkonstante des harmonischen Potentials der optischen Pinzette, x_{el} die Amplitude der Oszillation durch das alternierende elektrische Feld und f_c die charakteristische Frequenz. Im allgemeinen spielen Trägheitseffekte für die Dynamik eines Partikels in der optischen Pinzette keine Rolle (Berg, 1993). Aus diesem Grund stellt das schwingungsfähige System mit kleiner Reynoldszahl unter den experimentellen Bedingungen einen überdämpften harmonischen Oszillator dar. Für kleine Frequenzen des alternierenden elektrischen Feldes $f_{ext} \ll f_c$ kann die erzwungene Schwingung des Partikels als quasistationärer Prozeß beschrieben werden. Unter dieser Voraussetzung ist es möglich, den Reibungsterm $\gamma \dot{x}$ in Gl. 3.19 zu vernachlässigen, da die Geschwindigkeit des Partikels in der optischen Pinzette nur kleine Werte annehmen kann. Folglich ist im quasistationären Fall der frequenzabhängige Dämpfungsfaktor²³ identisch Eins. In den Experimenten hatte der entsprechende Faktor einen davon minimal unterschiedlichen Wert von 1.09. Die erzwungene Schwingung mit einer Frequenz von 160 Hz kann in erster Näherung als ein quasistationärer Prozeß interpretiert werden (Abb. 3.13B) (O'Brien, 1978).

Nach der Bestimmung der elektrophoretischen Kraft erfolgte mit Gl. 3.9 die Berechnung des Zetapotentials für das geladene Partikel in der optischen Pinzette. Für eine negativ geladene lipidmembranbeschichtete Silika-Kugel mit einem Radius von $r = 0.5 \mu\text{m}$ konnte ein Zetapotential von -55 mV ermittelt werden. Das dazu gemessene Leistungsspektrum ist in Abb. 3.13B dargestellt. Die Lipidmembranbeschichtung der Silika-Kugel bestand aus einem neutralen (POPC) sowie zu 2% aus einem negativ geladenen Lipid. Außerdem wurden die Messungen des Zetapotentials weitgehend in einem Puffer aus 10 mM HEPES, 300 μM EGTA, 200 μM CaCl_2 bei $\text{pH} = 7$ durchgeführt.

3.4.3 Test der Methode

Zur Kontrolle der beschriebenen Methode erfolgte die Bestimmung des Zetapotentials eines geladenen Partikels mit einer konventionellen Technik (Bangham, 1958). Dazu

²³ Bezeichnung für den frequenzabhängigen Term mit der Wurzel-Funktion in Gl. 3.23.

wurde die Driftgeschwindigkeit des Teilchens in einem konstanten elektrischen Feld gemessen und das Zetapotential mit der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung berechnet. Die Trajektorie des Partikels konnte mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet werden. Im folgenden ermöglichte die Analyse der Bildsequenz eine Bestimmung der Driftgeschwindigkeit aus der zurückgelegten Distanz pro Zeitintervall. Das Zetapotential wurde vor und nach einem Experiment zur Kinetik einer Enzymreaktion am identischen Partikel mit der klassischen Methode gemessen. Es zeigte sich dabei in allen Fällen eine gute Übereinstimmung der Resultate.

Ein weiteres wichtiges Kontrollexperiment besteht darin, die aus der Kombination von Gl. 3.9 und Gl. 3.23 folgende direkte Proportionalität zwischen der Amplitude der Oszillation und dem elektrischen Feld zu verifizieren. In Abb. 3.14 sind die Ergebnisse der Experimente für eine lipidmembranbeschichtete Silika-Kugel mit einem Zetapotential von -55 mV dargestellt. Dabei ist auf der Abszisse die zum elektrischen Feld korrespondierende Spannung an den Elektroden aufgetragen. Es existiert also ein den theoretischen Vorstellungen entsprechender linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Im allgemeinen kann die Kraftkonstante κ der optischen Pinzette für Amplituden bis 150 nm als ein konstanter Parameter angenommen werden (Svoboda, 1994). Der typische Korrelationskoeffizient der Kurve hatte einen Wert von >0.99 und entspricht einer Genauigkeit von ca. 1%.

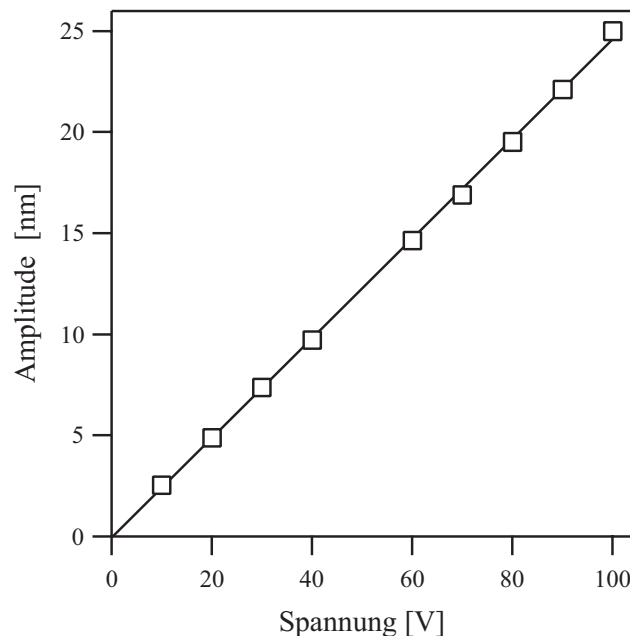


Abb. 3.14: Amplitude der Oszillation einer lipidmembranbeschichteten Silika-Kugel als Funktion der äußeren Spannung. Es existiert eine direkte Proportionalität zwischen den beiden Variablen mit einem Korrelationskoeffizienten von >0.99 . Die Werte für die Amplituden stellen eine Mittelung über 15 Leistungsspektren dar. Außerdem korrespondiert die Größe der Symbole für die Datenpunkte (\square) mit den berechneten Standardabweichungen der Amplituden.

Im folgenden stellt sich die Frage, ob die kontinuierliche Strömung im Seitenkanal einen Einfluß auf das Signal im Leistungsspektrum hat. Dazu wurde Flüssigkeit über den Seitenkanal eingeströmt und das gemessene Signal für eine lipidmembranbeschichtete Silika-Kugel mit definierter Oberflächenladung als Funktion der Zeit aufgenommen (Abb. 3.15). Der Puffer im Haupt- und Seitenkanal war in diesem Fall identisch und bestand aus 10 mM HEPES, 300 μ M EGTA, 200 μ M CaCl₂ bei pH = 7. Das Einströmen von Puffer erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ und hatte keinen Effekt auf die Messung des Zetapotentials. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der hydrodynamische Fluß im Seitenkanal eine konstante Kraft auf das Partikel orthogonal zur Richtung der Oszillation ausübt. Die Bewegungsgleichung für die erzwungene Schwingung im elektrischen Feld ändert ihre Form dadurch nicht. Es treten jedoch Instabilitäten auf, wenn die Flußgeschwindigkeit überhalb eines kritischen Wertes liegt. In diesem Fall kann das Partikel aus der optischen Pinzette katapultiert werden.

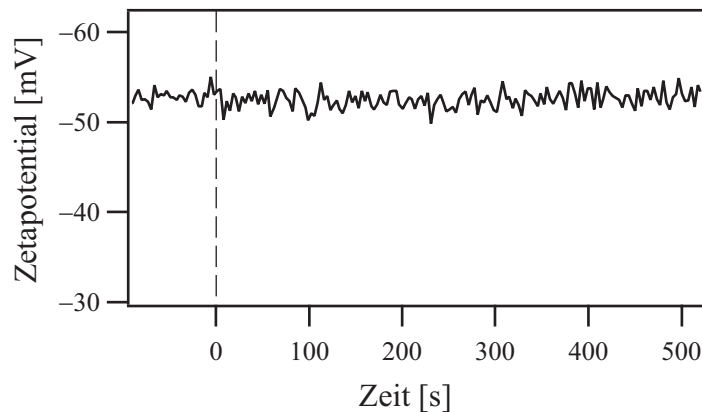


Abb. 3.15: Einfluß der Strömung im Seitenkanal auf das Zetapotential einer membranbeschichteten Kugel mit definierter Oberflächenladung. Der Puffer im Haupt- und Seitenkanal war identisch und bestand aus 10 mM HEPES, 300 μ M EGTA, 200 μ M CaCl₂ bei pH = 7. Das Einströmen von Puffer erfolgte über den Seitenkanal zum Zeitpunkt $t = 0$ und hat keinen Effekt auf das Zetapotential.

Des weiteren konnte die charakteristische Frequenz f_c simultan zum Experiment als eine Funktion der Zeit aufgezeichnet werden. Sie hatte für die verwendeten Einstellungen in erster Näherung einen konstanten Wert von ca. 360 Hz. Daraus folgt nach Gl. 3.21 auch eine definierte Kraftkonstante und damit die Stabilität des harmonischen Potentials der optischen Pinzette mit der Zeit. Die Abweichungen von ca. 4% sind vermutlich auf Schwankungen in der Laserleistung zurückzuführen, da sie in der gleichen Größenordnung liegen. Dies haben Aufnahmen des Summensignals ΣU_i der Quadrantdiode ergeben, das der emittierten Strahlungsleistung des Lasers proportional ist.

Außerdem konnte demonstriert werden, daß im Fall einer idealen Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einer neutralen Lipidmembran aus POPC die Messung des Zetapotentials von der Distanz zur Glasoberfläche des Kanals unabhängig war. Diese

Beobachtung ist mit den in Kap. 3.2.1 beschriebenen theoretischen Vorstellungen konsistent. Im Unterschied dazu hatte bei einer unbeschichteten Elektrophoresekammer die Distanz zum Deckglas einen großen Einfluß auf den Wert des Zetapotentials, da sich in einem geschlossenen hydrodynamischen System auf Grund der Elektroosmose ein definiertes Strömungsprofil ausbildet.

3.4.4 Sensitivität der Methode

Die Nachweisgrenze der Methode wird erreicht, wenn die Oszillation der geladenen Kugel im äußeren elektrischen Feld von der Brownschen Bewegung des Teilchens in der optischen Pinzette nicht mehr unterschieden werden kann. Der Wert des Leistungsspektrums für die Frequenz des elektrischen Feldes $S_x(f_{\text{ext}})$ ist also im Rahmen der statistischen Schwankungen mit dem des Plateaus identisch (Abb. 3.13). Im allgemeinen gilt für die mittlere quadratische Abweichung der thermischen Fluktuationen pro Frequenzintervall Δf die Formel:

$$\langle x^2 \rangle |_{f=f_0} = S_x(f=f_0) \cdot \Delta f \quad (\text{Gl. 3.24})$$

Dabei stellt der Parameter f_0 eine definierte Frequenz im diskreten Spektrum dar. Die kleinste noch zu detektierende Amplitude x_{el} der Oszillation des Partikels im elektrischen Feld der Frequenz f_{ext} ist durch die folgende Beziehung gegeben: $x_{\text{el}} = [S_x(f=f_{\text{ext}}) \cdot \Delta f]^{1/2}$. Nach dem Einsetzen dieses Zusammenhangs in Gl. 3.23 folgt unter Verwendung von Gl. 3.20 und Gl. 3.21 die kleinste meßbare elektrophoretische Kraft $F_{\text{el}}^{\text{min}}$:

$$F_{\text{el}}^{\text{min}} = \sqrt{4 k T \gamma \Delta f} \quad (\text{Gl. 3.25})$$

Es bedeuten Δf das Frequenzintervall, γ der Reibungskoeffizient, k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Dieser algebraische Ausdruck kann für die elektrophoretische Kraft F_{el} in Gl. 3.9 eingesetzt werden. Daraus folgt mit der Formel $\gamma = 6\pi\eta r$ der kleinste noch zu detektierende Wert für das Zetapotential ζ_{min} :

$$\zeta_{\text{min}} = \frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r E} \sqrt{\frac{2 k T \eta \Delta f}{3 \pi r}} \quad (\text{Gl. 3.26})$$

Hierbei bezeichnen E die Amplitude des elektrischen Feldes, r den Radius der Kugel, η die Viskosität des Mediums, ϵ_r die relative Permeabilität und ϵ_0 die Influenzkonstante. Mit den numerischen Werten für $E \approx 20 \text{ V/cm}$, $r = 0.5 \text{ }\mu\text{m}$, $\Delta f \approx 2 \text{ Hz}$ und $\eta \approx 10^{-3} \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ergibt sich für die Experimente ein minimales Zetapotential ζ_{min} von ca. 1 mV.

Es bestehen mehrere Möglichkeiten, die Sensitivität der Methode weiter zu verbessern. Die Erhöhung des elektrischen Feldes stellt auf Grund der indirekten Proportionalität in

Gl. 3.26 die effektivste Option dar. Dies kann durch eine höhere Spannung und/oder einen kleineren Abstand zwischen den Elektroden erreicht werden. Des weiteren ist es möglich, das Frequenzintervall Δf des diskreten Leistungsspektrums zu reduzieren. Dazu müssen bei einer konstanten Aufzeichnungsfrequenz mehr Datenpunkte pro Sequenz aufgenommen werden, was mit einer längeren Meßzeit t_{total} verbunden ist. Wie bereits im Zusammenhang mit Gl. 3.17 beschrieben, ist die Breite des Frequenzintervalls im allgemeinen über die Formel $\Delta f = 1/t_{\text{total}}$ gegeben. Darüber hinaus hätte auch eine Vergrößerung des Radius der Kugel einen positiven Effekt auf das kleinste noch zu detektierende Zetapotential ζ_{min} . Auf die verschiedenen Punkte wird in der Diskussion zur Enzymaktivität von Phospholipase C Kap. 3.5 noch detaillierter eingegangen.

4 Enzymaktivität von Phospholipase C

4.1 Einführung

Phospholipasen C spielen eine zentrale Rolle in vielen Prozessen der Signalübertragung der Zelle und generieren zwei äußerst wichtige intrazelluläre Mediatoren²⁴ durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂). Es handelt sich dabei um die Mediatoren Inositol 1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol, die auch mit IP₃ bzw. DAG abgekürzt werden. Prinzipiell lassen sich drei Klassen von Phospholipasen C unterscheiden, die mit den Symbolen β , γ und δ bezeichnet werden. Die Regulation der Phospholipasen C erfolgt über zwei unterschiedliche Prozesse (Abb. 4.1). Im ersten Fall kommt es zu einer Aktivierung des Enzyms über einen G-Protein-assoziierten Rezeptor und im zweiten über einen katalytischen Rezeptor (Berridge, 1993).

Beim ersten Prozeß induziert die Bindung eines extrazellulären Liganden eine Änderung der Konformation des G-Protein-assoziierten Rezeptors auf der zytoplasmatischen Seite, was die Bindungsstelle für das G-Protein aktiviert. G-Proteine stellen trimere Strukturen dar, die aus drei verschiedenen Polypeptidketten α , β und γ bestehen. Die α -Untereinheit bindet GDP²⁵ im inaktiven bzw. GTP²⁶ im aktiven Zustand, β und γ bilden einen Komplex, der das G-Protein auf der Innenseite der Plasmamembran verankert. Die Diffusion des G-Proteins in der Plasmamembran ermöglicht die Assoziation mit dem Ligand-Rezeptor-Komplex. Daraus resultiert die Dissoziation von GDP und die anschließende Bindung von GTP. In der Folge spaltet sich die α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex ab und aktiviert ihre Bindungsstelle für PLC- β . Inaktive Enzyme aus dem Zytosol diffundieren zur Plasmamembran und koppeln an die katalytische Domäne der α -Untereinheit an. Im aktivierten Zustand bewegen sich die Enzyme an der Plasmamembran entlang. Die Hydrolyse von GTP durch die α -Untereinheit stellt die ursprüngliche Konformation des G-Proteins wieder her und beendet die Aktivierung von PLC- β . Solange die extrazellulären Liganden an den Rezeptoren gebunden sind, kann das G-Protein wieder stimuliert werden. Das aktivierte PLC- β hydrolysiert das in die Plasmamembran integrierte PIP₂ und produziert IP₃ und DAG (Alberts, 1994) (Rhee, 2000).

Dabei ist IP₃ ein kleines hydrophiles Molekül, das von der Plasmamembran ins Zytosol diffundiert. Es induziert das Öffnen von Ca²⁺-Ionenkanälen in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums, das ein Ca²⁺-Reservoir in der Zelle darstellt, und erhöht somit die Konzentration im Zytosol. In ihrer Struktur zeigen die IP₃ abhängigen Ionenkanäle eine

²⁴ Im Englischen auch als *second messenger* bezeichnet.

²⁵ GDP: Guanosin 5'-diphosphat.

²⁶ GTP: Guanosin 5'-triphosphat.

große Ähnlichkeit zu Ryanodin-Rezeptoren, die bei Muskelzellen für die Kontraktion verantwortlich sind. Da Ca^{2+} -Ionen durch den Metabolismus nicht synthetisiert werden können, müssen sie in intrazellulären Reservoire gespeichert oder durch Ionenkanäle in der Plasmamembran von außen in die Zelle transportiert werden. Aus diesem Grund ist die Regulation der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration für die Zelle von entscheidender Bedeutung (Clapham, 1995) (Berridge, 1999). So können die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen ihre eigenen Ionenkanäle stimulieren und ermöglichen die Amplifizierung des Signals (positive Rückkopplung). Dephosphorylierung von IP_3 durch spezielle Phosphatasen und der Transfer von Kalzium durch Ionenpumpen aus dem Zytosol sind Prozesse, die das Ca^{2+} -Niveau wieder reduzieren und den Gleichgewichtszustand einstellen. Darüber hinaus kann durch die Phosphorylierung von IP_3 zu einem geringen Teil ein weiterer intrazellulärer Mediator, IP_4^{27} , erzeugt werden, der in einem Konkurrenzprozeß das Auffüllen der Ca^{2+} -Reservoire initiiert.

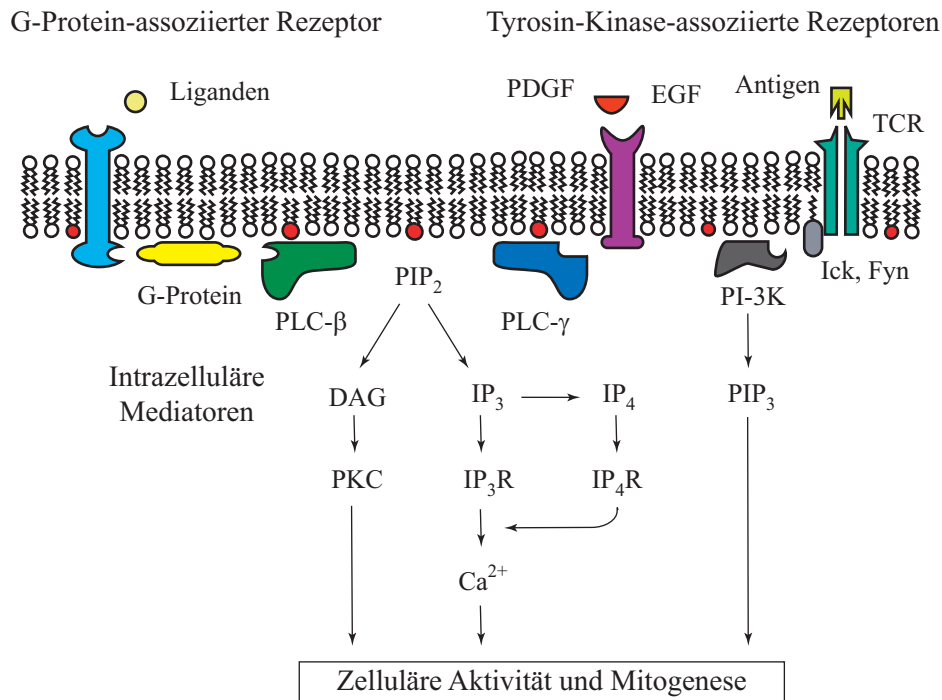


Abb. 4.1: Zusammenfassung der Prozesse, die durch eine Aktivierung der Phospholipasen C die Bildung der wichtigen intrazellulären Mediatoren DAG, IP_3 und IP_4 initiieren. Die Regulation von PLC- β bzw. PLC- γ erfolgt dabei über zwei unterschiedliche Klassen von Rezeptoren. Im ersten Fall kommt es zu einer Aktivierung des Enzyms über einen G-Protein-assoziierten Rezeptor und im zweiten über eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase. PLC hydrolysiert im aktiven Zustand das in die Membran integrierte PIP_2 und generiert IP_3 und DAG. Das Molekül IP_3 induziert das Öffnen der Ca^{2+} -Ionenkanäle im ER (IP_3R) und DAG stimuliert Protein Kinasen C. Die Phosphorylierung von IP_3 zu IP_4 hat den umgekehrten Effekt und reduziert die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol mit den Rezeptoren IP_4R . Bei PIP_3 handelt es sich um einen Mediator, der aus der Phosphorylierung von PIP_2 mit PI-3K entsteht und für die Zellteilung wichtig ist (Berridge, 1993).

²⁷ IP_4 : Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat.

Im Gegensatz zu IP_3 bleibt DAG nach der Hydrolyse von PIP_2 in der Plasmamembran integriert und übernimmt zwei wichtige Funktionen. Im ersten Fall kann dem Molekül mit Hilfe einer Phospholipase A_2 die Fettsäurekette Arachidonsäure entfernt werden, die als eigener Botenstoff fungiert oder zu Eicosanoiden synthetisiert werden kann. Die bedeutendere Rolle spielt DAG jedoch bei der Aktivierung von speziellen Serin/Threonin Protein Kinasen. Sie werden im allgemeinen als PKC bezeichnet, wobei der Buchstabe C auf ihre Ca^{2+} -Abhängigkeit hindeutet. Das Ansteigen der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol auf Grund von IP_3 führt zur Bindung von PKC an die Plasmamembran, wo durch den Einfluß von DAG und Phosphatidylserine eine Aktivierung des Enzyms erfolgt (Alberts, 1994).

Alternativ zu der oben beschriebenen Signalübertragung durch G-Protein-assoziierte Rezeptoren, existieren noch die katalytischen Rezeptoren, die sich durch eine intrinsische Enzymaktivität ihrer zytoplasmatischen Domänen auszeichnen oder direkt mit Enzymen assoziieren. Im Zusammenhang mit der Aktivierung von PLC- γ sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen relevant, die durch die Wachstumsfaktoren PDGF²⁸ oder EGF²⁹ stimuliert werden. Eine Bindung von extrazellulären Signalmolekülen induziert dabei die Dimerisierung der Rezeptoren, die durch ihre intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Aktivität für die Phosphorylierung der Tyrosin-Seitenketten des anderen Rezeptors mit ATP verantwortlich sind. Der Transfer von Phosphatgruppen innerhalb des Dimers wird als Autophosphorylierung bezeichnet. PLC- γ diffundiert aus dem Zytosol zur Plasmamembran und bindet über seine SH2 Domäne (Src Homologie Region 2) an die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors. Die Assoziation mit dem Rezeptor führt zur Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung und bringt es in Kontakt mit der Plasmamembran, wo es PIP_2 hydrolysiert. Die folgende Kaskade der intrazellulären Mediatoren ist mit der schon beschriebenen identisch.

Eine Aktivierung von PLC- γ ist auch über Rezeptoren möglich, die auf ihrer zytoplasmatischen Seite keine Tyrosin-Kinase aufweisen. Sie kompensieren diese Defizienz durch Assoziation mit Protein-Tyrosin-Kinasen aus der Src-Familie. So stimulieren die für das Immunsystem wichtigen Antigen-Rezeptoren in T-Zellen (TCR) oder IgM-Rezeptoren in B-Lymphozyten mit den Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie Ick, Fyn, etc. die enzymatische Funktion von PLC- γ in der Zelle. Darüber hinaus können Rezeptor-Tyrosin-Kinasen das Enzym PI-3Kinase³⁰ aktivieren, das durch Phosphorylierung von PIP_2 den intrazellulären Mediator PIP_3 generiert, dem verschiedene Aufgaben bei der Regulation der Zellteilung zugeschrieben werden (Rameh, 1999) (Stephens, 2000) (Newton, 2000).

Die Aktivierung von PLC ist generell in allen Stadien der zellulären Entwicklung relevant. So spielt sie während der Gametogenese, Fertilisation, Teilung und Differenzierung von

²⁸ PDGF (engl.): Platelet Derived Growth Factor.

²⁹ EGF (engl.): Epidermal Growth Factor.

³⁰ PI-3K: Phosphatidylinositol 3'-Kinase

Zellen eine entscheidende Rolle in der Signalübertragung. Dabei zeichnet sich die Stimulierung der intrazellulären Mediatoren IP₃ und DAG durch ihre molekulare Heterogenität aus, die es differenzierenden Zellen ermöglicht, sich auf spezielle Mechanismen der Signalübertragung zu spezialisieren. In allen Fällen erfolgt eine Regulation der Aktivität der Zelle durch die Ca²⁺-Ionen und die Protein-Tyrosin-Kinasen.

4.2 Material

4.2.1 Phospholipase C- δ

In jeder Klasse der Phospholipasen C können wieder mehrere Gruppen unterschieden werden, die durch eine Numerierung charakterisiert werden. Phospholipasen C der verschiedenen Kategorien werden auch als Isoformen bezeichnet und differieren in ihrer Sequenz auf verschiedenen Domänen. Die δ -Isoformen haben eine Größe von $95 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$ und sind mit einem relativen Molekulargewicht von $M_r = 85 \text{ k}$ deutlich kleiner als die beiden anderen Isoformen mit $M_r = 150 \text{ k}$. Mit der Methode der Röntgen-Struktur-Analyse konnte die 3-dimensionale Struktur von PLC- δ bestimmt werden. Für die Aktivierung von allen Phospholipasen C sind Ca^{2+} -Ionen erforderlich, was durch das Symbol C zum Ausdruck gebracht wird. Im Gegensatz zu den β - und γ -Isoformen, die durch die oben beschriebenen Mechanismen aktiviert werden, ist die enzymatische Funktion von PLC- δ nur von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Darüber hinaus haben die δ -Isoformen die einfachste Struktur und bestehen nur aus Domänen, die auch in den beiden anderen Klassen vorkommen (Abb. 4.2). Die große Verbreitung in verschiedenen Organismen und ihre einfache Struktur deuten darauf hin, daß sie sich in Eukaryonten während der Evolution als erstes entwickelt haben (Essen, 1996).

Prinzipiell bestehen sie aus vier Domänen, die vom N- zum C-terminalen Ende als PH, EF-Hand, TIM-Barrel und C2 bezeichnet werden. Die PH-Domäne stellt eine Pleckstrin-Homologie dar und ist für die Verankerung von PLC mit der Plasmamembran verantwortlich. Der Terminus ist auf die Ähnlichkeit ihrer Struktur mit dem Protein Pleckstrin zurückzuführen. PH-Domänen haben eine Bindungsstelle für Inositol-Phospholipide und diverse Proteine (Ferguson, 1996) (Yagisawa, 1998). Die Enzyme binden mit ihren PH-Domänen an die Plasmamembran und ermöglichen so die Hydrolyse von PIP_2 durch ihre katalytische Region (Lemmon, 1995). Das entstehende IP_3 inhibiert im Gegenzug die Aktivität von PLC, da es die Bindungsstelle der PH-Domäne mit der Plasmamembran blockiert (Hurley, 1997). Bei der EF-Hand-Domäne handelt es sich um vier aufeinander folgende Einheiten mit jeweils zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen. Die orthogonal zueinander angeordneten Helizes E und F des Proteins bestimmen dabei die Konformation, wobei die Ca^{2+} -Bindungsstelle in der Schlaufe zwischen den Helizes lokalisiert ist und durch sieben Sauerstoffatome mit einer definierten räumlichen Struktur gebildet wird (Stryer, 1995) (Yamamoto, 1999). Das TIM-Barrel stellt die katalytische Domäne von PLC dar und hydrolysiert PIP_2 an der Phosphodiester-Bindung. Dazu ist die Adhäsion des TIM-Barrels an die Plasmamembran erforderlich, die durch eine hydrophobe Region um die katalytische Domäne ermöglicht wird. Im Unterschied zu den anderen Isoformen sind bei PLC- γ drei SH-Domänen in das TIM-Barrel integriert, die zur Aktivierung des Enzyms mit

stimulierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen assoziieren. Die C2-Domäne gehört zur Familie der Immunoglobuline und zeichnet sich durch mehrere Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen aus. Vermutlich bindet sie über Ca^{2+} -Ionen an die Phospholipide der Plasmamembran und stabilisiert die Orientierung der katalytischen Domäne im TIM-Barrel (Lomasney, 1999). Im Fall der β -Isoformen folgt der C2-Domäne noch eine Sequenz, die als β -Regulator bezeichnet wird. Sie ist für die spezifische Bindung an die α -Untereinheit eines G-Proteins bei der Aktivierung des Enzyms verantwortlich (Essen, 1997). In Abb. 4.2 ist auch das Konstrukt PLC-Kern dargestellt, dem im Vergleich zur δ -Isoform die PH-Domäne fehlt. Experimente mit diesem Konstrukt haben gezeigt, daß die PH-Domäne keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität von PLC- δ hat. Die Hydrolyse von Phosphoinositiden ist jedoch deutlich eingeschränkt, da die Bindung des Enzyms an die Plasmamembran nicht mehr möglich ist.

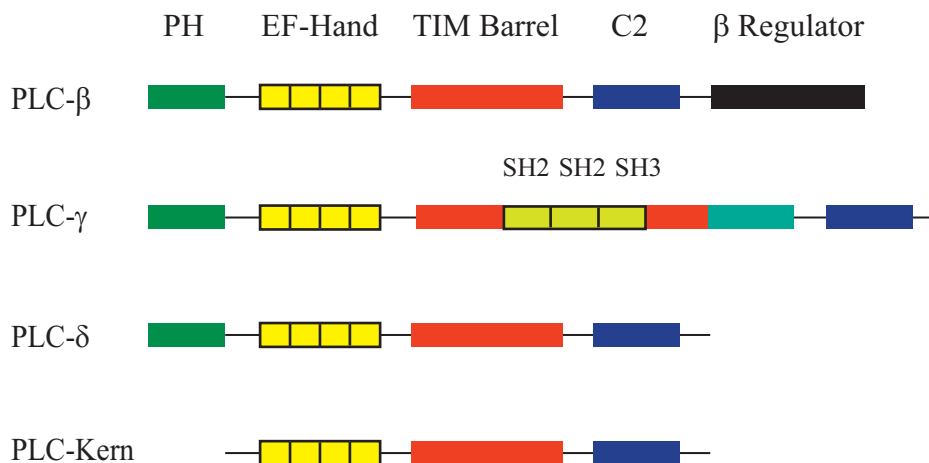


Abb. 4.2: Funktionelle Einheiten der Phospholipasen C. Die PH-Domäne am N-terminalen Ende ist für die Bindung an die Plasmamembran verantwortlich; EF-Hand und C2-Domäne haben mehrere Ca^{2+} -Bindungsstellen; das TIM-Barrel stellt die katalytische Region des Enzyms dar; SH-Domänen und β -Regulator sind für die Aktivierung der entsprechenden Isoformen wichtig. Bei PLC-Kern handelt es sich um ein Konstrukt, das keine PH-Domäne am N-terminalen Ende hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Experimente zur Enzymkinetik mit PLC- δ durchgeführt, was mit zwei entscheidenden Vorteilen verbunden war. So ist die Aktivität des Enzyms nur von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Dieser Parameter kann im Experiment durch die Verwendung eines Ca^{2+} -Puffers (300 μM EGTA) genau kontrolliert werden. Eine Aktivierung der anderen Isoformen würde entsprechende G-Proteine, Tyrosin-Kinasen sowie Cofaktoren erfordern. Die Experimente wären in biochemischer Hinsicht und in ihrer Durchführung wesentlich komplizierter. Außerdem wurde PLC- δ auf Grund seines vergleichsweise einfachen Aufbaus am intensivsten untersucht. Deshalb existieren

detaillierte Informationen zur Struktur und zum molekularen Mechanismus der Hydrolyse von Phosphoinositiden³¹ (Hondal, 1998).

Das für die Experimente notwendige PLC- δ wurde von M. Rebecchi (Stony Brook, NY, USA) hergestellt. Dabei erfolgte die Expression von humanen PLC- δ im E. coli Stamm BL-21(DE3) unter Verwendung des Vektors pET3a nach dem Protokoll von Tall. Die Aktivität des Enzyms wurde während der Reinigungsprozedur mit einem Detergent/PIP₂-Mizellen-Assay bestimmt (Cifuentes, 1993) und die Konzentration aus dem Wert des molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_m = 116262 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 280 nm berechnet (Tall, 1997). Das Enzym wurde in einer Stammlösung der Konzentration von 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ unter den Pufferbedingungen von 12.5 mM NaCl, 1 mM MES, 2 mM DTT, pH = 6 und 40% Glycerin bei -20°C aufbewahrt. Da in der Stammlösung starke Konzentrationsgradienten existieren, muß vor einer Entnahme mit einem Teflonstab umgerührt werden, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Außerdem muß die Stammlösung während des Experiments mit Eis gekühlt werden, damit keine Inaktivierung des Enzyms eintritt. Die Zugabe des Antioxidationsmittels 1,4-Dithio-DL-threit (DTT) zur Stammlösung stabilisiert die Monothiol-Gruppen in Enzymen und verhindert die Bildung von Disulfidbrücken, die zu einer Inaktivierung des Enzyms führen.

4.2.2 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat

Inositol Phospholipide³² sind hauptsächlich auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und werden durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PI) gebildet. Für den Transfer von Phosphatgruppen auf den Inositolring sind entsprechende Kinasen und ATP erforderlich. Im ersten Schritt entsteht Phosphatidylinositol 4-phosphat (PIP) und im zweiten Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂). Von allen Phosphoinositiden hat PIP₂ die größte Bedeutung in der Signalübertragung, obwohl es im Vergleich zu den anderen nur 10% der Gesamtmenge repräsentiert. Im Verhältnis zu allen Phospholipiden der Plasmamembran stellt es nur 1% an der Gesamtmenge dar (Alberts, 1994).

PIP₂ besteht aus einer hydrophilen Kopfgruppe, die zu den polarsten in der Natur zählt und drei negative Ladungen trägt. Der hydrophobe Bereich wird aus den beiden Kohlenwasserstoffketten Stearin- und Arachidinsäure gebildet. In Abb. 4.3 ist die chemische Strukturformel von PIP₂ wiedergegeben. Neben den in der Einleitung beschriebenen Punkten spielt es vermutlich auch bei der Ca²⁺-induzierten Exozytose in Zellen eine Rolle (Martin, 1998) und kann über spezielle Proteine auch an Aktin-Filamente binden.

³¹ Phosphoinositide sind Lipide mit phosphorylierten Inositol Derivaten.

³² Sie werden auch als Phosphoinositide bezeichnet.

PIP₂ (Böhringer, Mannheim) wird im allgemeinen aus einem Extrakt des Gehirns von Rindern isoliert und ist als Ammonium- oder Natriumsalz erhältlich. Das Ammoniumsalz hat ein relatives Molekulargewicht von $M_r = 1098$ und besitzt in Chloroform eine deutlich höhere Löslichkeit als das Natriumsalz, das sich fast gar nicht auflösen läßt. Die Herstellung einer homogenen Mischung aus verschiedenen Lipiden erfolgt im allgemeinen über das Lösen aller Komponenten in Chloroform, das im folgenden durch eine Vakuumpumpe abgedampft wird. Für die Experimente ist eine homogene Mischung von PIP₂ mit einem neutralen Lipid notwendig. Es hat sich gezeigt, daß dies für das Natriumsalz von PIP₂ nicht möglich ist, da es im Unterschied zu Ammoniumsalz nach dem Abdampfen keinen homogenen Lipidfilm bildet (Toner, 1988).

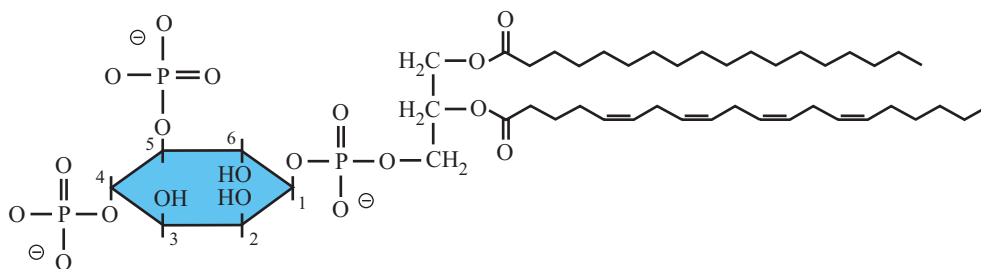


Abb. 4.3: Chemische Struktur von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂).

4.2.3 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin

Das neutrale Phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, auch mit POPC bezeichnet, wird synthetisch mit hoher Reinheit (>99%) hergestellt (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Es ist ein amphiphiles Molekül mit einem relativen Molekulargewicht von $M_r = 760$, das aus einer polaren hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Bereich besteht (Abb. 4.4). Charakteristisch für die polare Kopfgruppe ist ihre zwitterionische Struktur, bei der sich beide Partialladungen kompensieren. Die beiden Kohlenwasserstoffketten stellen den hydrophoben Bereich dar und sind im Fall von POPC nicht identisch. Bei der ersten handelt es sich um eine Palmitoylkette, die aus 16 Kohlenstoffatomen aufgebaut ist und keine Doppelbindungen aufweist, bei der zweiten um eine Oleoylkette mit 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung. Im allgemeinen sind Phospholipide mit ungesättigten Fettsäureketten als Pulver nicht stabil und extrem hygroskopisch. Die Absorption von Wasser kann zur Hydrolyse oder Oxidation des Phospholipids führen. Deshalb werden ungesättigte Phospholipide in Chloroform bis zu Konzentrationen von 25 mg/ml gelöst und bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

POPC erfüllt im Rahmen dieser Arbeit eine wichtige Funktion und wird zur Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einer neutralen und fluiden Lipidmembran eingesetzt. Fluidität bedeutet dabei, daß die laterale Diffusion von Phospholipiden in der Membran bei Raumtemperatur möglich ist. Eine ideale Beschichtung verhindert Elektroosmose in der Kammer und die irreversible Bindung von PLC- δ an Kunststoff- und Glasoberflächen, die mit einer Denaturierung des Enzyms verbunden wäre. Die Bindung von PLC- δ an die Innenflächen der Kammer würde die Konzentration beim Einströmen des Enzyms unkontrolliert verändern und damit die Reproduzierbarkeit der Experimente gefährden. Um Defekte in der Lipidmembran erkennen zu können, wurde sie mit 0.2% des Fluoreszenzfarbstoffs NBD-C₁₂-HPC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) markiert. Bei diesem Fluorophor handelt es sich um ein neutrales Phospholipid, bei dem an eine Fettsäurekette mit 12 Kohlenstoffatomen das fluoreszierende Molekül NBD kovalent gebunden ist.

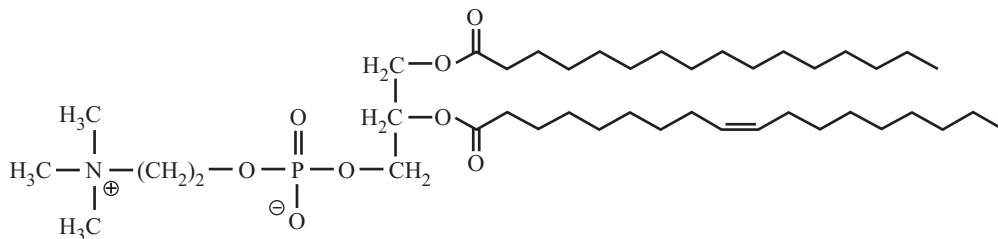


Abb. 4.4: Chemische Struktur von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, daß für die Experimente nur elektisch neutrale Fluorophore verwendet werden können. Minimale Konzentrationen von geladenen Molekülen in der Lipidmembran führen in der Kammer zu einer meßbaren Elektroosmose. Dies gilt im besonderen auch für die geringen Mengen an Verunreinigungen, die in den Phospholipiden nach ihrer Herstellung enthalten sind. Phospholipide mit zwei ungesättigten Fettsäureketten haben dabei den größten Anteil an Verunreinigungen. Ein Beispiel aus dieser Kategorie wäre das 1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, das im folgenden mit DOPC bezeichnet wird und sich im Vergleich zu POPC durch eine höhere laterale Diffusion in der Lipidmembran bei Raumtemperatur auszeichnet. Der entscheidende Punkt bei der Verwendung von POPC zum Beschichten der Elektrophoresekammer war jedoch die höhere Reinheit.

Eine weitere Rolle spielt POPC bei der Beschichtung der Silika-Kugeln. Aus Gl 3.6 folgt, daß die Oberflächenladung einer lipidmembranbeschichteten Kugel nur bis zu einer Konzentration von 2% PIP₂ dem Zetapotential direkt proportional ist. Für die Experimente zur Enzymaktivität ist der lineare Zusammenhang von fundamentaler Bedeutung. Aus diesem Grund ist die Herstellung einer binären Lipidmischung aus POPC mit 2% PIP₂ notwendig.

4.3 Präparation

4.3.1 Reinigung der Silika-Kugeln

Die Silika-Kugeln (Duke Scientific, Palo Alto, CA, USA) haben einen Durchmesser von $(0.99 \pm 0.05) \mu\text{m}$ und werden als eine wässrige Lösung mit ca. zwei Prozent an festen Bestandteilen geliefert. Auf Grund ihrer Größe sedimentieren die Silika-Kugeln in der Lösung. Um bei einer Entnahme aus dem Vorratsbehälter die Konzentration nicht zu verändern, ist es notwendig, die Suspension vorher gut zu mischen. Im ersten Schritt wird eine entsprechende Menge der Lösung in einem Röhrchen für 1 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wird zum Reinigen Methanol dazugegeben, die Kugeln resuspendiert und für 10 min in einem Bad beschallt. Diese Prozedur sollte mindestens einmal wiederholt werden. Die Zugabe von 1 M Kaliumhydroxid-Lösung nach dem Abnehmen des Überstandes macht die Oberfläche der Silika-Kugeln hydrophil, was für eine spätere Beschichtung mit einer Lipidmembran von Vorteil ist. Dazu wird das Röhrchen mit den Kugeln wieder für 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Danach werden die Silika-Kugeln der Suspension durch Zentrifugation (5000 U/min für 1 min) wieder sedimentiert und zum Waschen mit deionisiertem Wasser versetzt. Im letzten Schritt sollte der Zyklus aus Resuspendieren, Zentrifugieren und dem Austausch des Überstandes mit deionisiertem Wasser mindestens fünfmal wiederholt werden. Beim Abnehmen des Überstandes gehen mit jedem Schritt viele Silika-Kugeln verloren. Deshalb kann sich die Konzentration der Kugeln am Ende der Reinigungsprozedur deutlich von der am Anfang unterscheiden. Dies muß bei der Beschichtung der Silika-Kugeln mit einer Lipidmembran durch kleine unilamellare Vesikel berücksichtigt werden. Die Messung des Zetapotentials von lipidbeschichteten Silika-Kugeln kann durch überschüssige unilamellare Vesikel in der Suspension beeinträchtigt werden.

4.3.2 Präparation der lipidbeschichteten Silika-Kugeln

Die gereinigten Silika-Kugeln werden mit kleinen unilamellaren Vesikel beschichtet, die aus POPC und zu zwei Prozent aus PIP_2 bestehen. Ihre Herstellung beginnt mit dem Mischen der Lipide im entsprechenden Verhältnis in Chloroform. In den Stammlösungen liegen POPC und PIP_2 in Chloroform mit den Konzentrationen von 25 mg/ml bzw. 1 mg/ml vor. Das Mischen findet dabei in einem Rundkolben aus Glas statt, wobei die Lösungen mit einer speziellen Pipette (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) transferiert werden. Die Pipette zeichnet sich dadurch aus, daß die Lipide beim Aufziehen nur mit Glas und Teflon in Kontakt kommen. Bei herkömmlichen Glasspritzen mit Kanüle aus Edelstahl können Metallionen in Lösung gehen. Im Fall von PIP_2 wirken sich Metallionen

besonders negativ aus (persönliche Mitteilung von Stuart McLaughlin). Die Pipette und der Rundkolben wurden zur Reinigung vorher mehrmals mit Methanol und Chloroform gespült. Auf Grund der im Vergleich zu POPC geringeren Löslichkeit von PIP₂ in Chloroform, führt ein zu langsames Abdampfen des Lösungsmittels zur Phasenseparation der Lipidmischung. Deshalb ist für die Herstellung eines homogenen Lipidfilms ein Vakuum-Rotations-Verdampfer notwendig, der ein schnelles Abdampfen des Lösungsmittels ermöglicht. Zu Beginn wurde ein Vakuum von 100 mbar eingestellt, wobei der Rundkolben aus Glas mit den in Chloroform gelösten Lipiden in einem Wasserbad der Temperatur von 25 °C rotierte, bis sich ein homogener Lipidfilm gebildet hatte. Bilden sich bei dieser Prozedur Blasen, so deutet dies auf eine inhomogene Mischung der Lipide hin. In diesem Fall müssen die Lipide durch Zugabe von Chloroform wieder gelöst und mit dem Abdampfen neu begonnen werden. Anschließend wurde das Vakuum für die folgenden zwei Stunden auf 10 mbar erhöht, um alle Spuren von Chloroform aus dem Lipidfilm zu entfernen. Dies stellt ein wichtiges Kriterium für die Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikel dar, da Chloroform während des Beschallens die Dekomposition der Lipide katalysiert (Huang, 1969). Nach der Zugabe von deionisiertem Wasser formierten sich multilamellare Vesikel, was an der Opazität der Lösung zu erkennen war. Die Suspension wurde mit einer Titanspitze, die mit einem Ultraschallgenerator (Bachhofer, Reutlingen) verbunden war, für 10 min bei kleinster Leistung beschallt, bis die Lösung transparent erschien. Um ein Überhitzen der Suspension zu vermeiden, war sie in Kontakt mit einem Wasserbad der Temperatur von ca. 10 °C und wurde in Intervallen von 10 sec beschallt, zwischen denen eine Pause von 30 sec lag. Durch Ultrazentrifugation für 30 min bei 30.000 U/min konnten die multilamellaren Vesikel sedimentiert und die kleinen unilamellaren mit dem Überstand abgenommen werden.

Da Ca²⁺-Ionen bei der Beschichtung von Glas mit negativ geladenen unilamellaren Vesikel eine wichtige Rolle spielen, wurde der Suspension der Vesikel aus POPC mit 2% PIP₂ ca. 1 µM CaCl₂ dazupipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte das Mischen der Silika-Kugeln mit den kleinen unilamellaren Vesikel. Um die Kugeln in einer endlichen Zeit beschichten zu können, wurde eine 50-fach höhere Konzentration der Suspension eingesetzt, als für die Oberfläche der Kugeln eigentlich notwendig gewesen wäre. Nach zwei Stunden Sedimentation bei 4 °C wurden die nicht mit den Kugeln fusionierten Vesikel mit dem Überstand abgenommen und durch den im Experiment verwendeten Puffer (10 mM HEPES, 300 µM EGTA, 200 µM CaCl₂ bei pH = 7) ersetzt. Die beschichteten Kugeln können für maximal zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt werden, da nach dieser Zeit PIP₂ durch die spontane Hydrolyse in Wasser abgebaut ist. Außerdem darf die Suspension nur durch sanftes Pipettieren gemischt und aufgenommen werden. Ein Zentrifugieren und Schütteln ist nicht möglich, da im ersten Fall die Kugeln miteinander aggregieren und im zweiten die Lipidbeschichtung beschädigt wird.

4.3.3 Versuchsdurchführung

Die Elektrophoresekammer wurde zu Beginn einer Meßreihe gereinigt und zusammengebaut. Das Reinigen des Polykarbonat-Trägers sowie der Elektroden erfolgte mit Alkohol und deionisiertem Wasser. Der Glaskanal-Einsatz wurde für 30 min bei einer Temperatur von 40 °C in eine 2%-Hellmanex-Lösung (Hellma, Mühlheim) gelegt und anschließend mehrmals mit deionisiertem Wasser gespült. Bei starker Verschmutzung konnte er auch für mehrere Minuten im Detergens in ein Ultraschallbad gestellt werden. Die vorbereitete Elektrophoresekammer wurde nun an das Flußsystem angeschlossen und entlüftet. Zuvor wurden die Reservoirs für den hydrostatischen Fluß mit dem für das Experiment notwendigen Puffer gefüllt und ihr Niveau equilibriert.

Im folgenden werden zur Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einer neutralen Lipidmembran kleine unilamellare POPC-Vesikel unter den Pufferbedingungen von 5 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 8.0 in die Kammer injiziert (Groves, 1997) (Groves, 1998). Prinzipiell handelt es sich bei der Herstellung von kleinen unilamellaren POPC-Vesikel um das im Zusammenhang mit PIP₂ beschriebene Verfahren. Jedoch vereinfacht sich die Prozedur erheblich, da bei Systemen mit nur einer Komponente auf einen Vakuum-Rotations-Verdampfer verzichtet werden kann. Stattdessen wird das Chloroform der Probe in einem Vakuumschrank für mehrere Stunden abgedampft. Fünf Minuten nach der Injektion der kleinen unilamellaren POPC-Vesikel kann mit dem Spülen der Elektrophoresekammer begonnen werden. Es ist ein hydrostatischer Fluß von bis zu 500 µl/s notwendig, um alle nicht mit der Oberfläche fusionierten Vesikel zu entfernen, was bis zu einer halben Stunde dauern kann. Die Prozedur der Beschichtung basiert auf ein von Barenholz im Detail beschriebenes Verfahren (Barenholz, 1977).

Um Aussagen über die Homogenität der Beschichtung der Kammer machen zu können, wurde dem Lipid 0.2% des Fluoreszenzfarbstoffs NBD-C₁₂-HPC dazugegeben. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte die Lipidmembran visualisiert und auf ihre Fluidität untersucht werden. Die Frage, inwieweit in der Kammer Elektroosmose auftritt, wurde durch die Bestimmung der Driftgeschwindigkeit von multilamellaren POPC-Vesikel im elektrischen Feld beantwortet. Im Idealfall von vernachlässigbarer Elektroosmose zeigten die neutralen Vesikel unabhängig von der Distanz zum Deckglas keine Driftbewegung. Anschließend mußte die Elektrophoresekammer wieder gründlich gespült werden.

Vor dem Experiment zur Bestimmung der Kinetik mußte der Teflonschlauch zum Seitenkanal mit PLC- δ gefüllt werden. Dies geschah mit Hilfe der Methode, die weiter oben beschrieben wurde. Eine homogene Konzentration von Enzym im Seitenkanal konnte durch das Spülen mit PLC- δ gewährleistet werden. Bei der Präparation ist darauf zu achten, daß der Lösung mit dem PLC- δ 2 mM DTT zugegeben werden, um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern, die das Enzym inaktivieren würden.

Für das eigentliche Experiment wurden die POPC/PIP₂-beschichteten Silika-Kugeln mit geringer Konzentration in den Hauptkanal injiziert, da für die Messung mit der optischen Pinzette nur eine Kugel notwendig ist. Die starke Verdünnung der Silika-Kugeln (bis zu 1000-fach) reduzierte die Wahrscheinlichkeit, daß die optische Pinzette während der Messung eine weitere Kugel oder ein diffundierendes Vesikel einfängt. In diesem Fall hätte die Messung abgebrochen werden müssen. Eine klassische Bestimmung des Zeta-potentials durch die Messung der Driftgeschwindigkeit einer Kugel in einem konstanten elektrischen Feld war zur Kontrolle vor jedem Experimenten notwendig. Dazu wurde die Kugel mit der optischen Pinzette ca. 20 µm über das Deckglas angehoben und an den Elektroden eine alternierende Spannung von ±10 V angelegt, deren Polarität sich mit der Frequenz von 0.1 Hz änderte. Es konnten immer nur die ersten Perioden ausgewertet werden, da die Kugel durch Sedimentation die Fokalebene des Objektivs verließ. Das Zetapotential konnte aus der elektrothoretischen Mobilität und dem elektrischen Feld berechnet werden.

Zur Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese wurde die identische Kugel wieder eingefangen und mit einer Distanz von 20 µm über dem Deckglas gehalten, was ungefähr der stationären Ebene des Kanals entsprach. Die optische Pinzette wurde dabei in die Mitte der Kreuzung des Haupt- und Seitenkanals positioniert. Eine an den Elektroden angelegte Wechselspannung der Amplitude von 100 V und der Frequenz von 160 Hz versetzte die geladene Kugel in Oszillationen. Die Detektion der momentanen Position erfolgte durch die Quadrantdiode als Funktion der Zeit, wobei die Frequenz der Datenerfassung im allgemeinen bei 16 kHz lag. Dies ermöglichte das Aufnehmen eines Leistungsspektrums pro Sekunde. Es war auch sinnvoll, das arithmetische Mittel von mindestens drei Leistungsspektren zu bilden. Das Signal des Spektrums für die Frequenz der angelegten Wechselspannung wurde als Funktion der Zeit aufgenommen. Zur Messung der Enzymkinetik wurden die Ventile des Seitenkanals nach ca. 100 s geöffnet und das Enzym mit einem definierten hydrostatischen Druck in die Elektrophoresekammer eingeströmt. Die Ventile des Hauptkanals waren dagegen während der Messung immer geschlossen. Das gesamte Experiment konnte mit DIC-Mikroskopie auf einer CCD-Kamera simultan beobachtet werden. Für die folgenden Experimente wurde der Seitenkanal geschlossen und neue Silika-Kugeln über den Hauptkanal zum Kreuzungspunkt transportiert. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Tatsache, daß das gesamte PLC-δ aus dem Hauptkanal entfernt worden ist. Mit der optischen Pinzette konnte nun wieder eine neue Kugel eingefangen und Enzym aus dem Seitenkanal eingeströmt werden.

4.3.4 Pufferbedingungen

Im folgenden stellt sich die Frage, unter welchen Pufferbedingungen die geplanten Experimente durchgeführt werden sollen. Eine wichtige Funktion des Puffers ist dabei die Stabilisierung des pH-Werts in biochemischen Systemen. Die Experimente zur Elektrophorese erfordern außerdem eine definierte Ionen-Konzentration in der Lösung, da sie einen entscheidenden Einfluß auf den Wert des Zetapotentials eines geladenen Partikels hat. Wie aus Gl. 3.6 hervorgeht, ist das Zetapotential bei einer konstanten Oberflächenladungsdichte umso größer, je kleiner die Ionen-Konzentration ist. Jedoch wirken sich Kontaminationen in den verwendeten Substanzen bei zu geringen Ionen-Konzentrationen deutlich kritischer aus. Daneben darf der Puffer keine negativen Einflüsse auf das Enzym und die festkörpergestützten Lipidmembranen haben. Deshalb wurde 10 mM HEPES zur Einstellung von $\text{pH} = 7.0$ in den Messungen verwendet, was einer Ionenstärke von ca. 3 mM entspricht.

Ein zentraler Parameter bei den Experimenten zur Enzymkinetik von PLC stellen die Ca^{2+} -Ionen in der Pufferlösung dar, da sie zur Aktivierung des Enzyms notwendig sind. Sie spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Formation und der thermodynamischen Stabilität von festkörpergestützten Lipidmembranen. So kann eine zu geringe Ca^{2+} -Konzentration zur Ablösung der Beschichtung von den Silika-Kugeln und der Elektrophoresekammer führen. Auf der anderen Seite verursachen hohe Konzentrationen eine irreversible Aggregation der beschichteten Kugeln und eine signifikante Abnahme des Zetapotentials. Wahrscheinlich können Ca^{2+} -Ionen die Aggregation von PIP_2 -Molekülen in angrenzenden Lipidmembranen auslösen. Dieser Mechanismus übernimmt vermutlich in der Zelle im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -induzierten Exozytose eine entscheidende Funktion.

In Abb. 4.5 ist der Einfluß der Ca^{2+} -Konzentration auf das Zetapotential von multilamellaren Vesikel aus neutralem Lipid (POPC) mit verschiedenen Anteilen von PIP_2 dargestellt. Die Bestimmung der Zetapotentiale erfolgte durch Driftmessungen in einer konventionellen Elektrophoresekammer. Für die Kurven mit dem molaren Anteil an PIP_2 von 2% bzw. 1% nimmt das Zetapotential mit steigender Ca^{2+} -Konzentration deutlich ab. Dieser Effekt ist auf die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das negativ geladene PIP_2 zurückzuführen. Die multilamellaren Vesikel ohne PIP_2 haben eine minimale negative Ladung, was einem Zetapotential von ca. -5 mV entspricht. Dafür sind Verunreinigungen verantwortlich, die bei der Synthese der Phospholipide sowie bei der Herstellung der Vesikel entstehen. In erster Näherung spiegeln die drei Kurven auch den linearen Zusammenhang zwischen der Oberflächenladung und dem Zetapotential der multilamellaren Vesikel wider. Der optimale Wert für die Ca^{2+} -Konzentration in den Experimenten liegt bei $0.5 \mu\text{M}$ und ist durch einen Pfeil an der Abszisse von Abb. 4.5 gekennzeichnet. Diese Konzentration ermöglicht zum einen die Aktivierung von PLC- δ , zum anderen hat sie kaum einen Einfluß auf den maximalen absoluten Wert des Zetapotentials und gewährleistet so einen großen

dynamischen Meßbereich. Zur Einstellung einer freien Ca^{2+} -Konzentration von $0.5 \mu\text{M}$ wird dem Puffer $300 \mu\text{M}$ EGTA und $200 \mu\text{M}$ CaCl_2 zugegeben. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, daß das Einstellen des pH-Wertes nach der Zugabe aller Substanzen erfolgt, da EGTA bei der Bindung von Ca^{2+} -Ionen die H^+ -Konzentration erhöht.

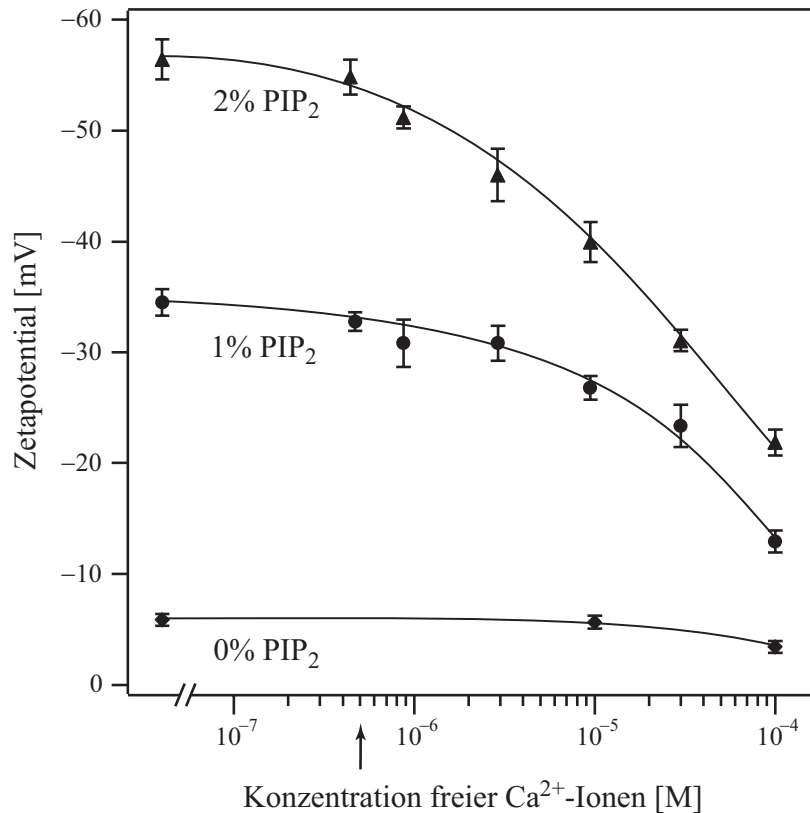


Abb. 4.5: Effekt der Ca^{2+} -Konzentration auf das Zetapotential von multilamellaren Vesikel aus neutralem Lipid (POPC) mit verschiedenen Anteilen von PIP_2 . Die Bestimmung der Zetapotentiale erfolgte durch Driftmessungen in einer konventionellen Elektrophoresekammer. Der verwendete Puffer bestand aus 10 mM HEPES, $150 \mu\text{M}$ EGTA und der entsprechenden Ca^{2+} -Konzentration bei $\text{pH} = 7.0$. Es sind drei Kurven mit einem molaren Anteil an PIP_2 von 2%, 1% und 0% dargestellt. Das Zetapotential nimmt mit steigender Ca^{2+} -Konzentration signifikant ab. Dieser Effekt ist auf die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das negativ geladene PIP_2 zurückzuführen. In erster Näherung spiegeln die drei Kurven auch den linearen Zusammenhang zwischen der Oberflächenladung und dem Zetapotential der multilamellaren Vesikel wider. Ein Pfeil an der Abszisse deutet auf die in den Experimenten verwendete Ca^{2+} -Konzentration von $0.5 \mu\text{M}$ hin.

Wie in Kap. 4.2.1 beschrieben, werden dem Puffer noch 2 mM DTT zugesetzt, um eine Denaturierung des Enzyms zu verhindern. Darüber hinaus ist ein Entgasen des Puffers vor dem Experiment aus den folgenden Gründen unbedingt notwendig. Es reduziert die Konzentration von freien Radikalen, die einen negativen Einfluß auf die Enzymreaktion haben können. Dies gilt speziell für den molekularen Sauerstoff, der ein besonders effektives Radikal darstellt. Außerdem unterbindet das Entgasen des Puffers die Bildung von Luftblasen im Flußsystem. Sie ändern einerseits die hydrodynamischen Verhältnisse im Kreuzkanal und führen andererseits zu Defekten in der Lipidmembran.

4.4 Resultate

4.4.1 Enzymkinetik

Die Messungen zur Enzymkinetik von PLC erfolgten an Silika-Kugeln mit einem Radius von 500 nm, die mit einer Lipidmembran aus POPC und 2% PIP₂ beschichtet waren. Dazu wurde die geladene Kugel im harmonischen Potential der optischen Pinzette mit einer Distanz von 20 µm zum Deckglas gehalten und durch ein alternierendes elektrisches Feld definierter Amplitude bzw. Frequenz in Oszillationen um die Gleichgewichtslage versetzt. Eine Quadrantdiode detektierte die Amplitude der Oszillationen als Funktion der Zeit mit einer Frequenz von 16 kHz. Die Kraftkonstante κ des harmonischen Potentials der optischen Pinzette sowie die Sensitivität der Quadrantdiode β wurde über die in Kap. 3.4.2 beschriebene Kalibrierung von Allersma bestimmt. Dazu war es notwendig, die Brownsche Bewegung der Kugel in der optischen Pinzette ohne ein äußeres elektrisches Feld aufzuzeichnen und daraus ein Leistungsspektrum zu erstellen. Auf Grund der höheren Genauigkeit wurde eine Mittelung über 10 Spektren durchgeführt (Abb. 3.13A). Eine Analyse des resultierenden Leistungsspektrums ermöglichte die Bestimmung der Kraftkonstanten κ sowie der Sensitivität der Quadrantdiode β . Mit diesen Parametern konnte die Auslenkung x sowie die elektrophoretische Kraft F_{el} der im äußeren elektrischen Feld oszillierenden Kugel aus den gemessenen Spannungssignalen berechnet werden. Das Maximum des Leistungsspektrums bei der Frequenz des angelegten elektrischen Feldes entspricht dabei dem Amplitudenquadrat der Oszillation (Abb. 3.13B). Außerdem ist die elektrophoretische Kraft auf die Kugel dem Zetapotential und in erster Näherung auch der Zahl von PIP₂-Molekülen auf der Außenseite der Lipidmembran direkt proportional. Die Hydrolyse von PIP₂ durch PLC reduziert die negative Oberflächenladung der Kugel, da als Reaktionsprodukt in der Membran das neutrale Molekül DAG entsteht. In den Experimenten konnte simultan zur Enzymreaktion die Abnahme des Zetapotentials als Funktion der Zeit bestimmt werden.

Abb. 4.6A zeigt das Leistungsspektrum einer membranbeschichteten Silika-Kugel (POPC mit 2% PIP₂) in der optischen Pinzette vor der Injektion von PLC. Die geladene Kugel oszillierte mit der Frequenz des äußeren elektrischen Wechselfeldes von 160 Hz, wobei das alternierende elektrische Feld eine Amplitude von ca. 20 V/cm hatte (dies folgt aus dem Quotienten der an den Elektroden anliegenden Spannung mit einer Amplitude von 100 V und der Länge des Hauptkanals von 4.8 cm). Das Maximum des Leistungsspektrums ist mit der Oszillation der Kugel im äußeren Feld korreliert. Es liegt ca. 500-fach über dem Niveau der Brownschen Bewegung bei dieser Frequenz und entspricht einem Zetapotential von ca. -55 mV.

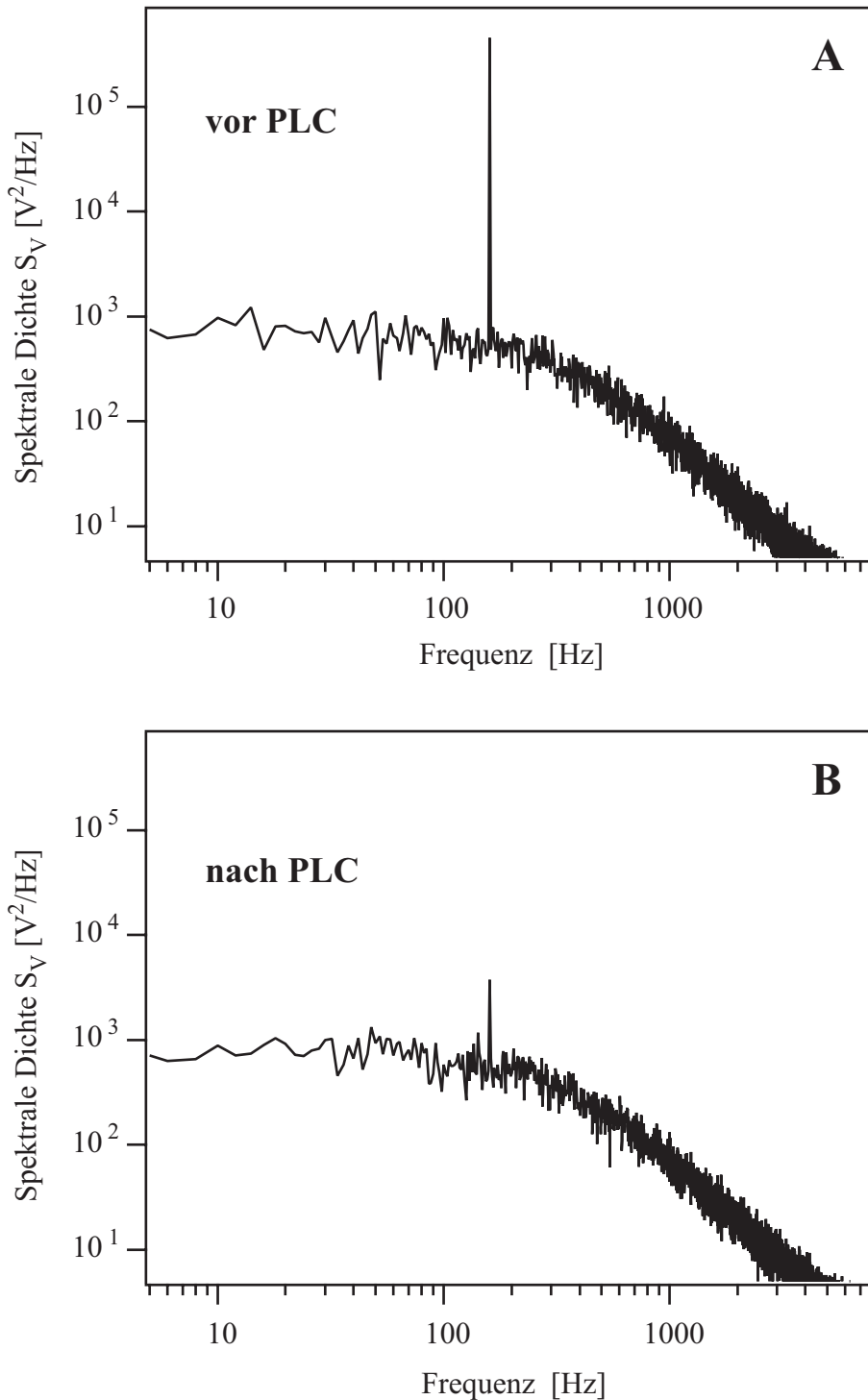


Abb. 4.6: Mittelung über 10 Leistungsspektren einer membranbeschichteten Silika-Kugel mit 2% PIP_2 vor und nach der Injektion von PLC. Die geladene Kugel oszillierte mit der Frequenz des äußeren elektrischen Wechselfeldes von 160 Hz. Das alternierende elektrische Feld hatte eine Amplitude von ca. 20 V/cm. Der Wert des Maximums entspricht dem Amplitudenquadrat der Oszillation. Für die Kugel in (A) konnte ein Zetapotential von -55 mV bestimmt werden. In (B) ist das gemittelte Leistungsspektrum nach der Hydrolyse von PIP_2 durch PLC der Konzentration von 9 nM dargestellt. Das Zetapotential der Kugel hatte in diesem Fall einen Wert von -5 mV. Die 100-fache Abnahme des Signals korrespondiert mit einer Änderung des Zetapotentials um den Faktor 10.

Beide Kurven in Abb. 4.6 stellen eine Mittelung über 10 Leistungsspektren dar. Für alle Kugeln wurde vor und nach dem Experiment ein Spektrum aufgezeichnet und konventionelle Driftmessungen zur Bestimmung des Zetapotentials durchgeführt. Beide Methoden zeigten eine sehr gute Übereinstimmung in den ermittelten Werten für das Zetapotential. Wie aus der Abb. 4.5 hervorgeht, gilt dies auch für die Zetapotentiale von multilamellaren POPC-Vesikel mit 2% PIP₂.

Abb. 4.6B gibt die Situation der identischen Kugel nach dem Einströmen von PLC über den Seitenkanal mit einer Konzentration von 9 nM wieder. Die Hydrolyse von PIP₂ war in diesem Fall schon nach ca. 500 sec abgeschlossen. Für das Zetapotential der Kugel ergibt sich aus dem Maximum des Leistungsspektrums ein Wert von ca. -5 mV. Wie bereits in Kap. 4.3.4 beschrieben, sind Verunreinigungen für die minimale negative Ladung der Kugel nach der Hydrolyse von PIP₂ verantwortlich. So können sich u. a. in der Membran negativ geladene Fettsäureketten bilden, die sich von den Phospholipiden abgespalten haben. Diese Tatsache wurde auch bei den Experimenten mit Vesikel beobachtet. Aus dem Vergleich der beiden Leistungsspektren folgt für das Signal eine Abnahme um den Faktor 100, was mit einer 10-fachen Änderung des Zetapotentials verbunden ist.

Das Zetapotential als Funktion der Zeit wurde simultan zur Enzymreaktion aufgezeichnet und ist in Abb. 4.7 für die drei verschiedenen PLC-Konzentrationen von 1 nM, 3 nM sowie 9 nM gezeigt. Dazu wurde pro Sekunde ein Leistungsspektrum der im elektrischen Feld oszillierenden Kugel aufgenommen, eine Mittelung über drei aufeinanderfolgende Maxima durchgeführt und das Zetapotential berechnet. Für die Zeitauflösung der Enzymkinetik folgte deshalb ein Wert von 3 sec. Der Seitenkanal mußte vor dem Experiment mit der entsprechenden Enzymlösung gefüllt werden, um die Totzeit des Flußsystems (~1 sec) zu minimieren und definierte Konzentrationsverhältnisse beim Einströmen zu gewährleisten. Für alle Zeiten $t < 0$ war die Kugel in der optischen Pinzette vom Puffer des Hauptkanals umgeben, der kein Enzym bzw. DTT enthielt. Alle Kugeln hatten bis zum Öffnen der Ventile des Seitenkanals zum Zeitpunkt $t = 0$ ein konstantes Zetapotential von ca. -55 mV. Danach erfolgte das kontinuierliche Einströmen der PLC-Lösung für $t > 0$ mit einem definierten hydrostatischen Druck. Aus der Abb. 4.7 ist zu erkennen, daß es sich bei der Hydrolyse von PIP₂ um einen von der PLC-Konzentration abhängigen Prozeß handelt. Je höher die PLC-Konzentration in der Umgebung der Kugel ist, desto mehr Enzyme sind an der Hydrolyse beteiligt und desto schneller läuft die Reaktion ab. Offensichtlich ist die Zahl der an der Reaktion beteiligten Enzyme auch von der PIP₂-Konzentration in der Lipidmembran abhängig, da die Rate der Hydrolyse mit zunehmender Zeit abnimmt. Eine Interpretation der gemessenen Daten und deren Anpassung an ein theoretisches Modell wird in Kap. 4.4.3 vorgenommen.

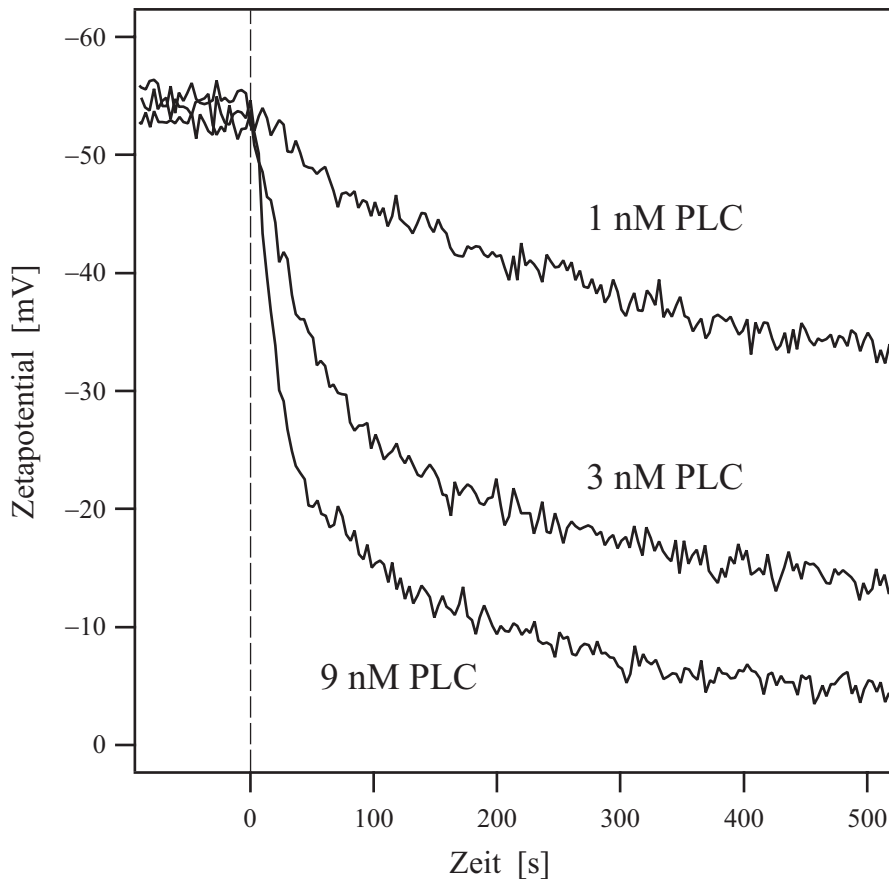


Abb. 4.7: Zetapotential von membranbeschichteten Silika-Kugeln mit 2% PIP₂ als Funktion der Zeit. Die Aufzeichnung des Zetapotentials erfolgte simultan zur Hydrolyse von PIP₂ mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von PLC (1 nM, 3 nM und 9 nM). Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden die Ventile des Seitenkanals geöffnet und die entsprechende PLC-Konzentration mit einer definierten Flußrate eingeströmt. Es ist zu erkennen, daß die Rate der Hydrolyse von der PLC-Konzentration abhängig ist. Dies gilt im besonderen für die Raten zu Beginn der Reaktion, die der Enzymkonzentration direkt proportional sind.

Die Messungen zur Enzymkinetik in Abb. 4.7 sind für alle PLC-Konzentrationen mindestens dreimal wiederholt worden. Es zeigte sich in allen Fällen eine sehr gute Übereinstimmung im Kurvenverlauf. In Abb. 4.8 ist die Reproduzierbarkeit der gemessenen Kurven am Beispiel der PLC-Konzentration von 3 nM dargestellt. Obwohl jede Messung mit einer anderen membranbeschichteten Silika-Kugel durchgeführt wurde, haben alle Graphen eine identische Form und geben die Kinetik der Enzymreaktion eindeutig wieder. Die Zetapotentiale der Kugeln vor der Reaktion variierten dabei minimal um einen Mittelwert von ca. -55 mV. Im Rahmen der Experimente war es sinnvoll, am gleichen Tag einen kompletten Satz von Messungen mit verschiedenen Konzentrationen aufzuzeichnen. So stellte die Präparation der Enzymlösungen einen kritischen Faktor dar, da ein exaktes Pipettieren der hochviskosen PLC-Stammlösung äußerst kompliziert war. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe konnten jedoch die Konzentrationen relativ zueinander sehr genau eingestellt werden. Allerdings beschränkte sich die Verwendbarkeit der präparierten Enzymlösungen auf einen Tag.

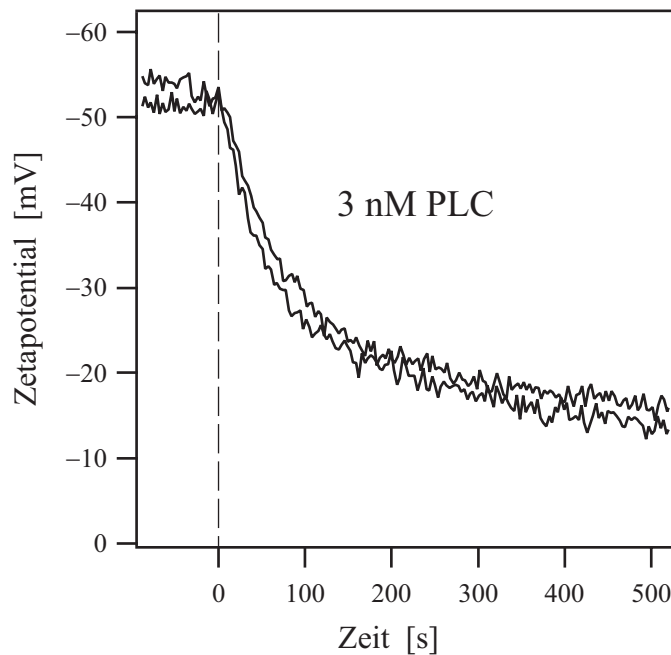


Abb. 4.8: Reproduzierbarkeit der Messungen. Die Experimente zur Enzymkinetik in Abb. 4.7 sind für alle Konzentrationen von PLC mindestens dreimal wiederholt worden. In allen Fällen zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung des Kurvenverlaufs. Hier sind zwei Messungen zur Enzymkinetik für die PLC-Konzentration von 3 nM dargestellt.

Wie aus der Abb. 4.7 hervorgeht, ist die Enzymkinetik von der PLC-Konzentration abhängig. Signifikante Unterschiede ergeben sich für die Raten der Hydrolyse zu Beginn der Reaktion. In Abb. 4.9 wurde die zeitliche Änderung des Zetapotentials $d|\zeta|/dt$ zum Zeitpunkt $t=0$ als Funktion der PLC-Konzentration aufgetragen. Es existiert in erster Näherung zwischen diesen beiden Größen ein linearer Zusammenhang. Dieses Resultat ist mit der bekannten Struktur des Enzyms und seiner Funktion als Monomer konsistent, was den theoretischen Vorstellungen zur Enzymkinetik von PLC entspricht (Rhee, 2000). Der Datenpunkt im Ursprung folgte dabei aus einem Kontrollexperiment, auf das in Kap. 4.4.2 eingegangen wird. Das Einströmen von Puffer mit 2 mM DTT ohne Enzym führte zu keiner Änderung des Zetapotentials der membranbeschichteten Kugel. Daraus resultiert ein verschwindender Differentialquotient $d|\zeta|/dt$. Die Anpassung einer Ursprungsgerade an die Datenpunkte mit der kleinsten quadratischen Abweichung ergibt eine Steigung der Gerade von ca. -0.1 mV/s pro nM PLC. Im Rahmen einer Interpretation der Kinetik wird dieser Zahlenwert in die Berechnung der Aktivität eines einzelnen Enzyms eingehen. Konkret soll die Frage beantwortet werden, wieviele PIP_2 -Moleküle ein Enzym pro Sekunde umsetzen kann.

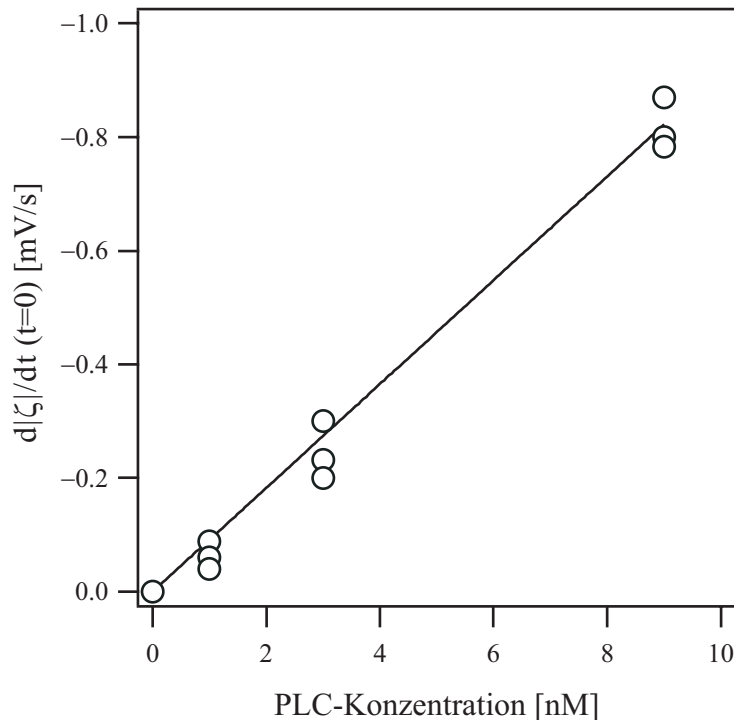


Abb. 4.9: Die zeitliche Änderung des Zetapotentials $d|\zeta|/dt$ in Abb. 4.7 ist zu Beginn der Enzymreaktion ($t=0$) der PLC-Konzentration direkt proportional. Dieses Verhalten entspricht auch den theoretischen Vorstellungen zur Enzymkinetik von PLC. Darüber hinaus haben Kontrollexperimente gezeigt, daß sich das Zetapotential der membranbeschichteten Kugel beim Einströmen von Puffer ohne PLC nicht ändert und damit der Differentialquotient verschwindet. Die Anpassung einer Ursprungsgerade an die Datenpunkte mit der kleinsten quadratischen Abweichung ergibt für die Steigung der Gerade einen Wert von ca. -0.1 mV/s pro nM PLC.

4.4.2 Kontrolleexperimente

Es waren verschiedene Kontrolleexperimente notwendig, die eindeutig zeigten, daß es sich bei den gemessenen Daten tatsächlich um die PLC-induzierte Hydrolyse von PIP_2 und nicht um andere Effekte handelte. Wie bereits in Kap. 3.4.3 beschrieben, hat das Einströmen von Flüssigkeit über den Seitenkanal keinen Einfluß auf das Signal im Leistungsspektrum, sofern der Puffer im Haupt- und Seitenkanal identisch ist. Darüber hinaus war die Amplitude der oszillierenden Kugel in der optischen Pinzette unterhalb eines kritischen Wertes unabhängig von der Flußgeschwindigkeit im Seitenkanal.

Experimente mit Enzymen erfordern im allgemeinen die Zugabe eines Antioxidationsmittels, das eine Bildung von Disulfidbrücken inhibiert und damit eine Denaturierung des Enzyms verhindert. Diese Funktion wurde in den Experimenten von DTT übernommen, das der Enzymlösung mit einer Konzentration von 2 mM zugesetzt wurde. Es stellt sich nun die Frage, welchen Effekt das neutrale Molekül DTT auf das Zetapotential einer lipidmembranbeschichteten Kugel hat. Das Einströmen von DTT-Lösung ohne Enzym über den Seitenkanal hatte keine Auswirkung auf den Wert des Zetapotentials der Silika-

Kugel und entspricht als ein wichtiges Resultat den Erwartungen für ein neutrales Molekül (Abb. 4.10).

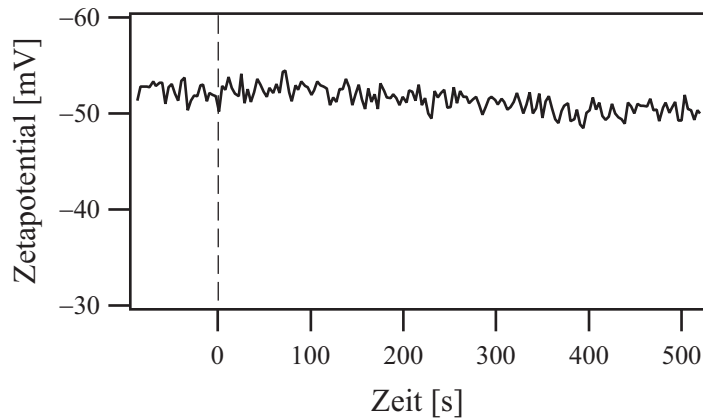


Abb. 4.10: Einfluß von DTT auf das Zetapotential der Kugel. Der Puffer im Haupt- und Seitenkanal war bis auf das Enzym und die Substanz DTT identisch. DTT verhindert die Denaturierung von PLC, da es die Monothiolgruppen stabilisiert und die Bildung von Disulfidbrücken inhibiert. Unterschiede in den Pufferbedingungen zwischen Haupt- und Seitenkanal führen zu Änderungen im Zetapotential der Kugel. Um den Einfluß von DTT auf das Zetapotential ausschließen zu können, wurde in einem Kontrollexperiment dem verwendeten Puffer nur 2 mM DTT, aber kein Enzym zugesetzt. Das Einströmen dieses Puffers erfolgte über den Seitenkanal zum Zeitpunkt $t = 0$ und hat keinen Effekt auf das Zetapotential.

Das entscheidende Kontrollexperiment stellt jedoch die Abhängigkeit der katalytischen Funktion des Enzyms von der Ca^{2+} -Konzentration dar. Eine Reduzierung der ungebundenen Ca^{2+} -Ionen in der Lösung von $0.5 \mu\text{M}$ auf $0.05 \mu\text{M}$ sollte zu einer Abnahme der Enzymaktivität um den Faktor 10 führen. In Abb. 4.11 ist die Enzymkinetik für eine PLC-Konzentration von 3 nM für beide Ca^{2+} -Niveaus gezeigt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgte wieder das Öffnen der Ventile des Seitenkanals. Für die Rate der Hydrolyse $d|\zeta|/dt$ ($t = 0$) konnte im ersten Fall ein Wert von -0.364 mV/s und im zweiten von -0.032 mV/s bestimmt werden, was mit den Erwartungen sehr gut übereinstimmt. Mit diesem Kontrollexperiment konnte demonstriert werden, daß die gemessene Enzymkinetik in Abb. 4.7 auf die PLC-induzierte Hydrolyse von PIP_2 und nicht auf Kontaminationen in der Enzymlösung zurückzuführen sind, die an der membranbeschichteten Kugel adhäreren und damit die Ladungsdichte verändern.

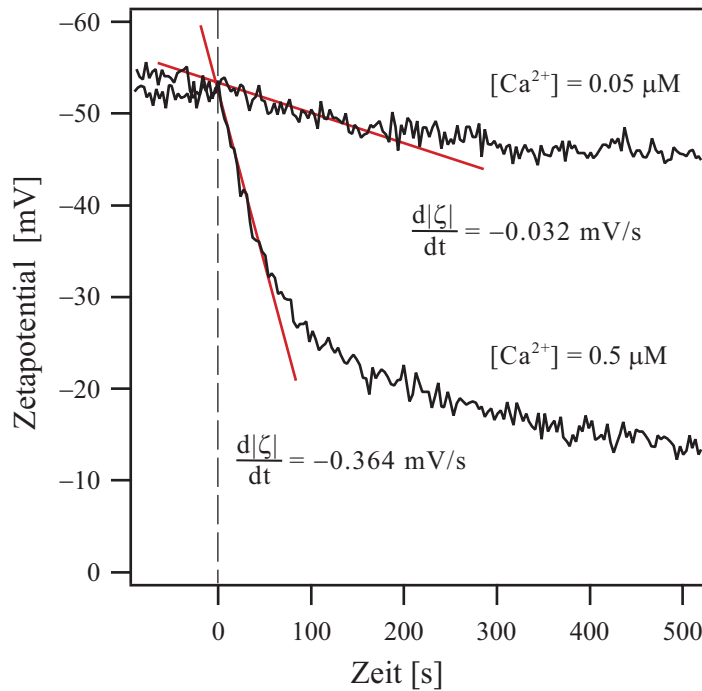


Abb. 4.11: Kontrollexperimente zur Aktivität des Enzyms. Die katalytische Funktion von PLC- δ ist von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Im Fall von PLC sollte eine Reduzierung des Ca^{2+} -Niveaus von $0.5 \mu\text{M}$ auf $0.05 \mu\text{M}$ zu einer Abnahme der Enzymaktivität um den Faktor 10 führen. Die gezeigten Kurven stellen die Situation für beide Ca^{2+} -Niveaus bei der PLC-Konzentration von 3 nM dar. Für die Rate der Hydrolyse von PIP_2 $d|\zeta|/dt$ ($t = 0$) konnte im ersten Fall ein Wert von -0.364 mV/s und im zweiten von -0.032 mV/s bestimmt werden. Dieses wichtige Kontrollexperiment zeigt, daß die gemessene Enzymkinetik in Abb. 4.7 auf die PLC-induzierte Hydrolyse von PIP_2 und nicht auf Kontaminationen in der Enzymlösung zurückzuführen sind.

4.4.3 Interpretation der Enzymkinetik

Im folgenden wurde ein Modell zur Enzymkinetik von PLC- δ entwickelt, das den zeitlichen Verlauf der Enzymreaktion beschreibt. Dies ist möglich, da das Zetapotential als Funktion der Zeit der Oberflächenladung der Silika-Kugel und damit der Konzentration von PIP_2 in der Lipidmembran direkt proportional ist. Eine typische Enzymreaktion hat die Form: $\text{E} + \text{S} \xrightarrow{k} \text{E} + \text{P}$. Dabei bezeichnen E das Enzym, S das Substrat, P die Produkte der Reaktion und k die Geschwindigkeitskonstante. Bei dieser Reaktionsgleichung ist nur der Anfangs- und Endzustand angegeben, obwohl Enzymreaktionen im allgemeinen mehrstufige Prozesse sind. Auf entsprechende Zwischenzustände, wie der Formation von Enzym/Substrat-Komplexen, wird in diesem ersten einfachen Modell nicht eingegangen. Die Kinetik dieser Enzymreaktion ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$\frac{d[\text{S}]}{dt} = -k [\text{S}][\text{E}] \quad (\text{Gl. 4.1})$$

Bei dieser Reaktion liegen Enzym und Substrat als Monomere mit den Konzentrationen $[S]$ bzw. $[E]$ in wässriger Lösung vor. Kann die Konzentration des Enzyms während des Experimentes als konstant angenommen werden, dann folgt aus Gl. 4.1 die Differentialgleichung $d[S]/dt = -k'[S]$. Die Konstante k' ist durch das Produkt $k' = k[E]$ definiert. Als allgemeine Lösung der Differentialgleichung ergibt sich:

$$[S] = [S]_0 e^{-k' \cdot t} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Dabei ist $[S]_0$ die Konzentration des Substrates zum Zeitpunkt $t = 0$. In der Abb. 4.12 ist die numerische Anpassung der Exponentialfunktion aus Gl. 4.2 (gestrichelte Linie) an die Kurve des Zetapotentials dargestellt, bei der PLC- δ mit einer Konzentration von 9 nM injiziert wurde. Die Kinetik der PLC-induzierten Hydrolyse von PIP_2 kann durch die Exponentialfunktion aus Gl. 4.2 nicht optimal beschrieben werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die Vorstellung einer Enzymreaktion im Volumen in diesem Fall nicht zutrifft. So ist ausschließlich das über seine PH-Domäne an die Lipidmembran gebundene PLC für die Hydrolyse von PIP_2 verantwortlich. Die folgende Gleichung gibt die Kinetik der Enzymreaktion durch die katalytische Domäne von PLC wieder:

$$\frac{d[\text{PIP}_2]}{dt} = -k [\text{PIP}_2] [\text{PLC}]_{\text{Membran}} \quad (\text{Gl. 4.3})$$

$[\text{PLC}]_{\text{Membran}}$ bezeichnet dabei die Konzentration von PLC, das an die Lipidmembran gebunden ist. Da sich die Enzymreaktion an der Oberfläche einer Lipidmembran abspielt, sind die Konzentrationen aller Variablen nicht auf das Volumen, sondern auf die Fläche bezogen. Das Produkt $k \cdot [\text{PIP}_2]$ in Gl. 4.3 kann dabei als die Aktivität eines einzelnen Enzyms oder *turnover number* interpretiert werden. Sie ist von der Konzentration des Substrates abhängig und gibt die Zahl der PIP_2 -Moleküle an, die ein einzelnes Enzym pro Sekunde umsetzen kann.

Die Assoziation von PLC mit der Lipidmembran ist ein Gleichgewichtsprozeß der Form $\text{PLC}_{\text{Aqua}} + \text{PIP}_2 \rightleftharpoons \text{PLC}_{\text{Membran}}$. Dabei bedeutet PLC_{Aqua} die im Volumen diffundierende inaktive Form des Enzyms. Das Massenwirkungsgesetz des Gleichgewichtsprozesses lautet:

$$[\text{PLC}]_{\text{Membran}} = K [\text{PIP}_2] [\text{PLC}]_{\text{Aqua}} \quad (\text{Gl. 4.4})$$

Für die Bindungskonstante K wurde im Fall einer neutralen Lipidmembran mit PIP_2 ein Wert von $K \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt (Rebecchi, 1992) (Cifuentes, 1993) (Bromann, 1997) (Wang, 1996). Im Unterschied zu den anderen Variablen in Gl. 4.4 hat $[\text{PLC}]_{\text{Aqua}}$ die Einheit einer Volumenkonzentration $[\text{M}]$. Eine membranbeschichtete Silika-Kugel mit einem Zetapotential von ca. -55 mV hat auf seiner Außenseite ca. 10^5 PIP_2 -Moleküle. Damit sind bei den Konzentrationen $[\text{PLC}]_{\text{aqua}}$ von 1 nM, 3 nM und 9 nM ca. 10, 30 bzw.

90 Enzyme an der Lipidmembran gebunden. Eine Substitution der Variablen $[PLC]_{\text{Membran}}$ in Gl. 4.3 ergibt die Formel:

$$\frac{d[\text{PIP}_2]}{dt} = -k K [\text{PIP}_2]^2 [\text{PLC}]_{\text{Aqua}} \quad (\text{Gl. 4.5})$$

Die Rate der Hydrolyse ist also zum Quadrat der Konzentration von PIP_2 in der Lipidmembran proportional, was auch als Reaktion zweiter Ordnung bezeichnet wird. In erster Näherung können im Experiment die Parameter k , K und $[\text{PLC}]_{\text{Aqua}}$ als Konstanten betrachtet werden. Dadurch vereinfacht sich die nichtlineare Differentialgleichung zu $d[\text{PIP}_2]/dt = -\chi [\text{PIP}_2]^2$, wobei die Konstante χ durch das Produkt $\chi = k K [\text{PLC}]_{\text{Aqua}}$ definiert ist (Voet, 1995). Die allgemeine Lösung dieser Gleichung hat die Form:

$$[\text{PIP}_2] = \frac{1}{\gamma + \chi t} \quad (\text{Gl. 4.6})$$

Dabei ist die Konstante γ die reziproke Konzentration von PIP_2 auf der Silika-Kugel zum Zeitpunkt $t = 0$ ($\gamma = 1/[\text{PIP}_2]_0$). Für kleine Zetapotentiale existiert ein linearer Zusammenhang mit der Oberflächenladung, die der Konzentration von PIP_2 auf der Kugel entspricht. Mit einer Proportionalitätskonstante α folgt $\zeta = \alpha [\text{PIP}_2]$, und Gl 4.6 kann geschrieben werden als:

$$\zeta = \frac{\alpha}{\gamma + \chi t} \quad (\text{Gl. 4.7})$$

Die numerische Anpassung dieser Funktion an die Kurve der PLC-Konzentration von 9 nM in Abb. 4.12 demonstriert, daß Gl. 4.7 die Hydrolyse von PIP_2 besser beschreibt als die Exponentialfunktion aus Gl. 4.2. Für den Parameter χ folgt aus der numerischen Anpassung ein Wert von ca. $2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. Mit der Beziehung $\chi = k K [\text{PLC}]_{\text{Aqua}}$ kann die Konstante k aus Gl. 4.3 ermittelt werden, die zur Berechnung der Aktivität eines einzelnen Enzyms notwendig ist. Zu Beginn der Reaktion (10^5 PIP_2) ergibt sich für die Rate der Hydrolyse pro Enzym ein Wert von ca. 20 s^{-1} . Die Enzymaktivität für $t = 0$ kann auch direkt aus der in Abb. 4.9 bestimmten Steigung von $d|\zeta|/dt = -0.1 \text{ mV/s}$ pro $[\text{PLC}]_{\text{Aqua}}$ unter Berücksichtigung der Anzahl von lipidmembrangebundenen Enzymen und der Beziehung $\zeta = \alpha [\text{PIP}_2]$ berechnet werden.

Es existiert eine sehr gute Übereinstimmung der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen mittleren Aktivität eines einzelnen Enzyms mit den in der Literatur bekannten Werten, die an Lipidmembranen und Monoschichten unter vergleichbaren Bedingungen bestimmt wurden (Singer, 1997) (Katan, 1997) (Rhee, 2000). Des weiteren haben konventionelle Experimente mit radioaktiven Sonden gezeigt, daß die PLC-induzierte Hydrolyse von PIP_2 kaum von der Ionenstärke der verwendeten Pufferlösung abhängig ist (Stuart McLaughlin,

Stony Brook, NY, USA). Aus diesem Grund kann die bestimmte Rate für die Aktivität pro Enzym von 20 s^{-1} auch unter physiologischen Bedingungen angenommen werden.

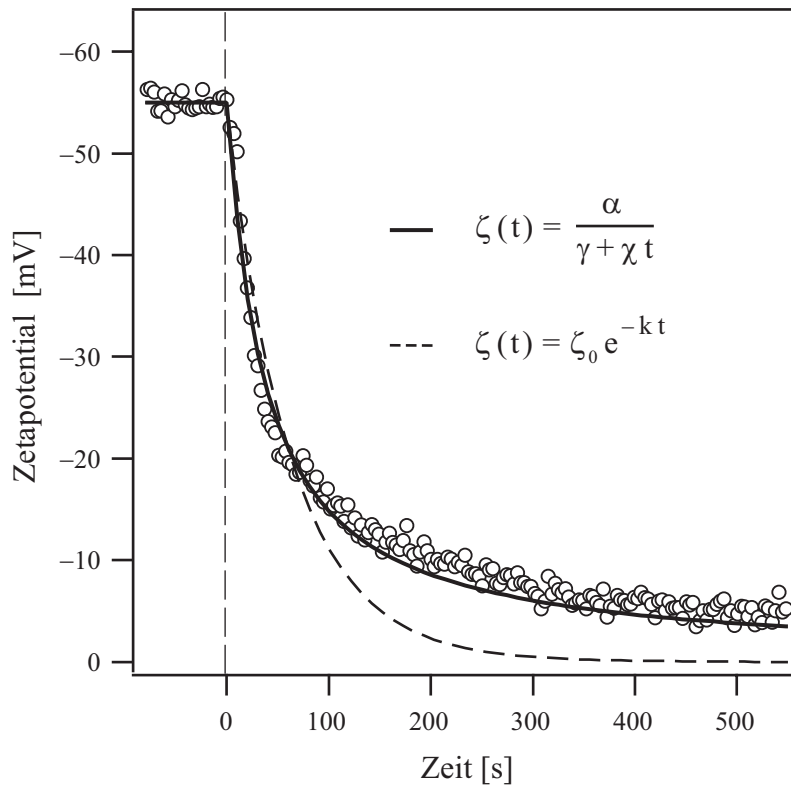


Abb. 4.12: Numerische Anpassung einer Funktion an die Enzymkinetik. Das gemessene Zetapotential als eine Funktion der Zeit ist für eine PLC-Konzentration von 9 nM dargestellt (Kreise). Die Datenpunkte werden durch die Gl. 4.7 (durchgezogene Linie) besser beschrieben als durch eine einfache Exponentialfunktion (gestrichelte Linie).

Im Rahmen dieses ersten Modells konnte eine geschlossene analytische Lösung der Differentialgleichung aus Gl. 4.5 angegeben werden. Es waren jedoch bei dieser Entwicklung mehrere Annahmen bzw. Näherungen notwendig, auf die im folgenden kurz eingegangen wird:

1. Die direkte Proportionalität des Zetapotentials ζ zur Oberflächenladungsdichte σ der Kugel gilt nur für kleine Werte des Potentials. Der exakte Zusammenhang der beiden Variablen ist in Gl. 3.6 angegeben. Für ein Zetapotential am Beginn der Messung von -55 mV sowie einer Lösung aus monovalenten Ionen beträgt der maximale Fehler der Approximation ca. 20 Prozent.
2. Darüber hinaus wurde in Gl. 4.4 die Gleichgewichtskonstante K eingeführt, die die Bindung des Enzyms über die PH-Domäne an das PIP_2 der Lipidmembran beschreibt. Bei dieser stereospezifischen Bindung spielt vermutlich auch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Gruppen der PH-Domäne

und den negativen Ladungen der Lipidmembran eine Rolle. Mit der Hydrolyse von PIP_2 nimmt die negative Ladung der Lipidmembran kontinuierlich ab. Dies könnte auch mit einer Abnahme der Gleichgewichtskonstanten K verbunden sein.

3. Außerdem hat die lokale Ca^{2+} -Konzentration an der Lipidmembran einen entscheidenden Einfluß auf die enzymatische Aktivität von gebundenem PLC- δ . Sie wird im Modell in erster Näherung als konstant angenommen. Auf Grund der abnehmenden negativen Ladung in der Lipidmembran kann es auch zu Änderungen in der lokalen Ca^{2+} -Konzentration kommen, die die Aktivität von PLC- δ beeinflussen.
4. Das Zetapotential von Silika-Kugeln mit neutraler Lipidbeschichtung sowie von neutralen multilamellaren Vesikel ist unter den experimentellen Bedingungen nicht exakt Null, sondern beträgt ca. -5 mV. Im Rahmen dieses ersten Modells wurde in Gl. 4.7 kein Offset berücksichtigt.

Um die beschriebenen Punkte in das theoretische Modell einführen zu können, sind weitere Messungen zur Enzymkinetik mit der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese notwendig.

4.5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Methode der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese zur Messung der Enzymaktivität etabliert werden. Diese Technik ermöglichte die Aufzeichnung der Hydrolyse von PIP_2 durch eine kleine Zahl von membrangebundenen Enzymen. Damit konnten detaillierte Aussagen über die Kinetik dieses Prozesses gemacht werden. Experimente haben auch gezeigt, daß zwischen der Rate der Hydrolyse und der PLC-Konzentration ein linearer Zusammenhang existiert. Darüber hinaus folgte aus der numerischen Anpassung verschiedener Funktionen an die gemessene Enzymkinetik, daß es sich bei der Hydrolyse um eine Reaktion zweiter Ordnung handelt. Die Rate der Hydrolyse ist also zum Quadrat der Konzentration von PIP_2 in der Lipidmembran proportional. Das Modell ist mit der molekularen Struktur und den Funktionen der verschiedenen Sequenzen des Enzyms konsistent. Es handelte sich bei den Experimenten um die ersten Messungen der Kinetik von PLC an Lipidmembranen.

Die Vorteile der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese liegen gegenüber konventionellen Methoden zur Bestimmung der Enzymkinetik in der schnellen und simultanen Messung des Zetapotentials. So war es möglich, Leistungsspektren mit einer Frequenz von 1 Hz aufzunehmen und für jeden Datenpunkt den Mittelwert aus drei Spektren zu bilden. Darüber hinaus zeichnen sich die Messungen durch ihre Reproduzierbarkeit und hohe Genauigkeit von ca. 2% aus. Dies gilt vor allem für die direkte Proportionalität der Amplitude der oszillierenden Kugel mit der des elektrischen Feldes. Es existiert auch eine gute Übereinstimmung zwischen den Messungen des Zetapotentials an unterschiedlichen Kugeln der entsprechenden Konzentrationen von PLC. Durch das Einströmen von Enzym über einen Seitenkanal stellte sich schon nach ca. 1 sec eine definierte Konzentration von PLC an der optischen Pinzette ein. Dabei minimierte die Beschichtung der Elektrophoresekammer mit einem neutralen Lipid den Verlust von Enzym durch die irreversible Bindung an die Glasoberflächen des Kanals. Ein kontinuierlicher Fluß von PLC kompensierte mögliche Verluste und gewährleistete somit eine konstante Konzentration während des Experiments.

Mit der beschriebenen Technik konnte die Kinetik von Enzymen an einzelnen substratbeschichteten Kugeln bestimmt werden. Damit spielte sich die Enzymreaktion nicht an vielen verschiedenen Oberflächen, sondern an einer einzigen Lipidmembran mit definierter Form ab. Dies stellt ein wichtiges Kriterium für die Bestimmung der Kinetik einer Enzymreaktion dar und gilt speziell auch für die Hydrolyse von PIP_2 durch PLC. Experimente an einer Suspension aus Mizellen bzw. Vesikel mit integriertem PIP_2 haben gezeigt, daß in solchen komplexen Systemen Effekte auftreten, die eine Interpretation der Daten kaum zulassen. Dazu gehören Prozesse, wie der mögliche Austausch von Enzymen zwischen den

Mizellen oder Vesikel der Suspension. Die Abnahme in der Rate der Hydrolyse resultiert aus der mittleren Diffusionszeit des Enzyms zwischen den Mizellen bzw. Vesikel. Daneben führt die irreversible Bindung von PLC an die Innenseite des Reagenzglases zu Verlusten von Enzym und damit zu unkalkulierbaren Änderungen in der Konzentration. Außerdem beeinflussen die durch die Hydrolyse von PIP₂ entstehenden Produkte die Aktivität von PLC. Dies gilt im besonderen für das Molekül IP₃, das durch die Signalübertragung in der Zelle im Rahmen der negativen Rückkopplung für die Inhibierung von PLC verantwortlich ist. Bei den Experimenten zur Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese treten diese Komplikation nicht auf, da nur eine definierte Oberfläche existiert, Verluste von PLC durch einen konstanten Fluß kompensiert und die Reaktionsprodukte abtransportiert werden.

Ein System mit einer definierten Oberfläche stellt auch eine Lipidmonoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche dar. So konnte der Einfluß des lateralen Oberflächendrucks der Monoschicht auf die Aktivität von PLC an diesem System bestimmt werden (Boguslavsky, 1994). Messungen zur Enzymkinetik sind jedoch damit kaum möglich, da die Diffusion von PLC durch die Nernstsche Totwasserschicht³³ (Pohl, 1998) die Zeitauflösung der Methode limitiert. Für eine Lipidmonoschicht ergibt sich eine Dicke der Totwasserschicht von ca. 100 µm. Die Zeitauflösung des Systems entspricht der Diffusionszeit des Enzyms durch diese Schicht und beträgt ca. 100 sec. Im Unterschied dazu hat die Totwasserschicht für die verwendeten Silika-Kugeln eine Dicke von 0.5 µm. Das Enzym benötigt zur Diffusion durch diese Schicht nur einige Millisekunden. Diese Tatsache ermöglicht die rasche Einstellung von definierten Enzymkonzentrationen an der Oberfläche der membranbeschichteten Kugel. Ein weiterer Vorteil der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese gegenüber konventionellen Methoden liegt darin, daß eine Markierung von Enzym oder Substrat mit Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Sonden nicht notwendig ist. Damit können negative Effekte der Markierung auf die Funktionalität von Enzym und Substrat ausgeschlossen werden.

Für die Experimente mit der optischen Pinzette wurden membranbeschichtete Silika-Kugeln mit einem Radius von 500 nm verwendet. Dafür lassen sich im wesentlichen zwei Gründe anführen. Zum einen ist für die Stabilität der optischen Pinzette der effektive Unterschied im Brechungsindex zwischen der Silika-Kugel und dem umgebenden Medium entscheidend, zum anderen können durch den definierten Radius quantitative Aussagen gemacht werden. Die bisherigen Messungen zur Enzymaktivität basierten auf konventionellen Modellsystemen wie Vesikel, Mizellen aus Detergenzien oder Lipidmonoschichten. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit sich die gemessenen Enzymaktivitäten

³³ In der Fachterminologie als (engl.) *Nernstian unstirred layer* bezeichnet. Sie charakterisiert die an eine Oberfläche angrenzende Flüssigkeitsschicht, die nicht gemischt werden kann. In erster Näherung hängt sie von der Krümmung der Oberfläche ab. Für sphärische Objekte entspricht die Dicke der Schicht ca. dem Radius, für eine planare Fläche hat sie einen Wert von ca. 100 µm.

auf die ersten Experimente mit festkörpergestützten Lipidmembranen übertragen lassen. So könnten Substrat-induzierte laterale Spannungen oder Defekte in der Membran einen Einfluß auf die Funktionalität des Enzyms haben.

Die physikalischen Eigenschaften von adsorbierten Lipidmembranen auf Mikrokugeln aus Glas wurden erstmals im Zusammenhang mit NMR³⁴-Studien untersucht (Bayerl, 1990). Die Beschichtung erfolgte dabei mit kleinen unilamellaren Vesikel, die eine einfache kontinuierliche Membran auf einer Kugeloberfläche erzeugen (Brian, 1984). Darüber hinaus konnte die Fluidität der Lipidmembran durch die Bestimmung der lateralen Diffusionskoeffizienten durch NMR-Untersuchungen gezeigt werden (Köchy, 1993). Im allgemeinen haben Phospholipide die Tendenz, hydrophile Oberflächen wie Glas vollständig zu benetzen. Des weiteren können Defekte in der Beschichtung prinzipiell durch den Prozeß des Ausheilens der Lipidmembran behoben werden (Nissen, 1999). Alle diese Punkte deuten darauf hin, daß für Messungen zur Enzymkinetik membranbeschichtete Silika-Kugeln ein geeignetes Modellsystem für Vesikel bzw. Mizellen darstellen. Es sind aber noch weitere Experimente notwendig, um alle möglichen Komplikationen auszuschließen. Dazu gehören u. a. eine Asymmetrie in der Verteilung von PIP₂ zwischen der inneren und äußeren Lipidschicht der Membran auf Grund der negativ geladenen Glasoberfläche und entsprechende Austauschprozesse innerhalb der Lipidmembran. Der erste Fall hätte nur einen Einfluß auf das Zetapotential am Beginn der Messung, der zweite wäre für den Transfer von PIP₂ von der Innen- zur Außenseite der Membran verantwortlich und würde mit dem Prozeß der Hydrolyse konkurrieren. Austauschprozesse spielen vermutlich für die betrachteten Zeitskalen und PLC-Konzentrationen kaum eine Rolle, da ihre Wahrscheinlichkeit viel zu gering ist. Dies zeigt auch die gute Übereinstimmung der gemessenen Enzymkinetik von PLC mit den erwarteten Vorstellungen auf festkörpergestützten Lipidmembranen.

Die Laserfallen-kontrollierte Mikroelektrophorese hat das Potential zur Messung der Aktivität von einzelnen Enzymen, was die Experimente mit der niedrigsten PLC-Konzentration von 1 nM demonstrieren konnten. In diesem Fall waren zu Beginn der Reaktion ca. 10 Enzyme pro Silika-Kugel an der Hydrolyse von PIP₂ beteiligt. Das erfordert jedoch eine weitere Optimierung des experimentellen Aufbaus und die geeignete Wahl aller Parameter. Nach Gl. 3.26 ist es möglich, die Sensitivität der Methode durch die Erhöhung des elektrischen Feldes zu verbessern. Dies kann durch das Anlegen von höheren Spannungen und/oder durch die Reduzierung der Distanz zwischen den Elektroden erreicht werden. Damit lassen sich die erforderlichen elektrischen Felder realisieren, um die Sensitivität der Methode mindestens um den Faktor 100 zu erhöhen. Auf Grund der kleinen Dimensionen der Kanäle könnten auch in diesem Fall Polarisierungseffekte der Elektroden ausgeschlossen werden. Des weiteren ist die Verwendung von Kugeln mit einem kleineren Radius für die

³⁴ NMR (engl.): Nuclear Magnetic Resonance.

Messung der Aktivität von einzelnen Enzymen von entscheidender Bedeutung. Es kann damit die Zahl der Substrat-Moleküle auf der beschichteten Kugel weiter reduziert werden. Auf das Zetapotential der Kugel hätte dies nach Gl 3.6 bei gleicher Oberflächenladungsdichte aber keinen Einfluß. Unter diesen Voraussetzungen wäre es möglich, enzymatische Reaktionen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die thermischen Fluktuationen der Kugel in der optischen Pinzette nehmen jedoch mit kleineren Radien enorm zu. Dieser Effekt würde wiederum die Sensitivität der Methode herabsetzen (Gl. 3.26). Der Schlüssel zur Lösung dieses Problems liegt vermutlich in der Optimierung aller Parameter. Darüber hinaus könnte die Enzymaktivität durch höhere Ca^{2+} -Konzentrationen gesteigert werden, um die Kinetik der Reaktion in einem sinnvollen Zeitintervall beobachten zu können. Die Zeitauflösung der Methode von ca. einem Leistungsspektrum pro Sekunde stellte bei den Experimenten keinen limitierenden Faktor dar. Auf Grund der Zeitskala der Enzymkinetik war es sogar möglich, für jeden Datenpunkt den Mittelwert aus drei Leistungsspektren zu bilden. Prinzipiell könnte die Zeitauflösung der Methode durch eine höhere Frequenz beim Auslesen der Quadrantdiode bzw. eine noch effizientere Datenverarbeitung verbessert werden (Visscher, 1999).

Prinzipiell lassen sich mit der etablierten Technik alle molekularbiologischen Prozesse untersuchen, die zu einer Änderung der Oberflächenladung eines Partikels in der optischen Pinzette führen. So wäre auch die Aktivierung von PLC- β durch ein G-Protein an einer Lipidmembran (Rhee, 2000), die Phosphorylierung von PIP_2 durch PI-3Kinasen (Rameh, 1999) (Stephens, 2000) oder die Phospholipase D katalysierte Hydrolyse der zwitterionischen Phosphocholin-Kopfgruppe von Interesse (Sciorra, 2000). Des weiteren könnte mit dieser Methode die Aktivität von Polymerasen gemessen werden, die eine wichtige Rolle bei der Replikation von DNA spielen. Dies würde die kovalente Bindung von einsträngigen DNA-Sequenzen an die Oberfläche der Kugel erfordern. Die Polymerisation zu einem neuen DNA-Strang wäre mit einer Verdopplung der negativen Ladung verbunden. Außerdem könnte die Adsorption von Polyelektrolyten an Oberflächen studiert werden. In diesem Fall wurden schon die ersten Experimente mit positiv geladenen Polylysin-beschichteten Silika-Kugeln unternommen. Die Messungen haben gezeigt, daß es beim Einströmen von Plasmid-DNA (4.7 kbp) zu einer Umladung der kationischen Oberfläche durch die Adsorption von DNA kommt. Darüber hinaus war die Kinetik dieses Prozesses von der Konzentration der Plasmid-DNA abhängig. So nahm mit zunehmender Konzentration von Plasmiden im Seitenkanal die Dauer zur Umladung der kationischen Oberfläche ab. Auf Grund der definierten Ladung eines Plasmids hätte sich der Prozeß jedoch in diskreten Schritten vollziehen müssen. Im Unterschied dazu wurde eine kontinuierliche Abnahme des Zetapotentials als Funktion der Zeit gemessen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Plasmide bei der Kollision nur partiell an die kationische Oberfläche binden und in einem langsameren Prozeß auf der gesamten Länge adhären. Um diese Hypothese beweisen und quantitative Aussagen zur Umladung kationischer Oberflächen machen zu können, sind jedoch noch weiterführende Experi-

mente notwendig. Mit der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese wäre es auch möglich, fundamentale Phänomene in kolloidalen Systemen zu studieren, wie z. B. die Effekte der Relaxation einer elektrischen Doppelschicht. Eine Kombination einer Laserfalle mit der Elektrophorese konnte bereits zur Untersuchung der kolloidalen Eigenschaften von Latex-Kugeln eingesetzt werden (Palberg, 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten lipidmembranbeschichteten Silika-Kugeln stellen ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung kolloidaler Partikel dar, da sie eine glatte Oberfläche mit definierter Oberflächenladung aufweisen.

5 Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen

5.1 Einführung

In den letzten Jahren wurden viele Anstrengungen unternommen, um die Effizienz des Gentransfers bei der Behandlung der Mukoviszidose zu verbessern (Rosenecker, 1998). Es handelt sich bei dieser Krankheit um eine der häufigsten genetisch bedingten Störungen im Metabolismus einer Zelle, deren Ursache die Defizienz des Regulationsproteins CFTR³⁵ in der Plasmamembran ist. Die Patienten leiden an einer lebensbedrohlichen Verschleimung der Lunge. Mit der Klonierung des CFTR-Gens besteht nun die Möglichkeit der somatischen Gentherapie (Caplen, 1994). Die Effizienzen des Gentransfers sind jedoch noch so gering, daß ein klinischer Einsatz keine großen Aussichten auf einen Erfolg hat. Ein Grund dafür liegt in der natürlichen Aufgabe des respiratorischen Trakts, inhalierte Partikel aus der Lunge zu entfernen. Außerdem existieren noch weitere physikalische und biologische Barrieren, die die therapeutischen Vektoren beim somatischen Gentransfer inaktivieren. In Abb. 5.1 ist ein Querschnitt durch die Lungenepithelschicht schematisch dargestellt.

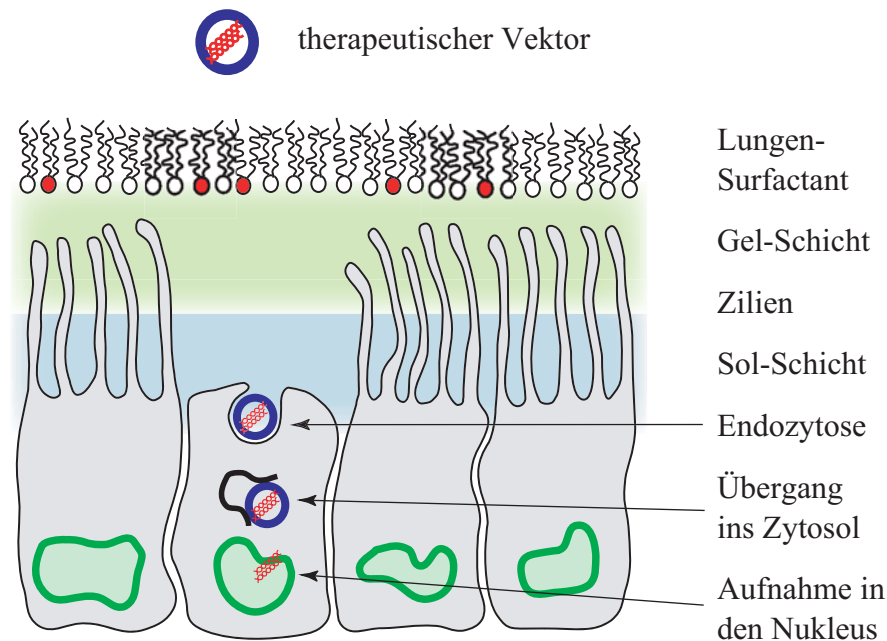


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Lungenepithelschicht mit den verschiedenen Stadien des somatischen Gentransfers. Die therapeutischen Genvektoren müssen viele Barrieren überwinden, um das Zytoplasma der Zelle zu erreichen. Nach der Dissoziation des Komplexes kann die freigesetzte DNA durch die Kernporen in den Nukleus gelangen.

³⁵ CFTR (engl.): Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein.

Die Barrieren für exogene therapeutische Genvektoren sind das Lungen-Surfactant³⁶, die Gel- und Solschicht (Mucus) mit den Zilien, die Glykokalix und die Plasmamembran. Hat ein Gentransfer-Komplex diese Barrieren überwunden, so kann er durch Endozytose von der Zielzelle aufgenommen werden, bevor endosomolytische Prozesse den Übergang des Gentransfer-Komplexes ins Zytoplasma ermöglichen. Nach der Dissoziation des Komplexes kann die freigesetzte DNA durch die Kernporen in den Nukleus gelangen.

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von synthetischen Gentransfer-Komplexen mit einem natürlichen Surfactant aus Rinderlungen (Alveofact) untersucht. Es haben *in vitro* Experimente gezeigt, daß Alveofact den liposomalen Gentransfer inhibiert, während der polymerbasierte Gentransfer davon nicht beeinträchtigt wird (Ernst, 1999). Aus diesem Grund sind die polymerbasierten Gentransfer-Komplexe bei der Behandlung der Mukoviszidose von besonderem Interesse. In den folgenden Experimenten wurde Polylysin als kationisches Polymer zur Kondensation der DNA eingesetzt (Wagner, 1992) (Lee, 1996) (Katayose, 1997). In Abb. 5.2 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von DNA/Polylysin-Komplexen dargestellt (Laemmli, 1975) (Wagner, 1991).

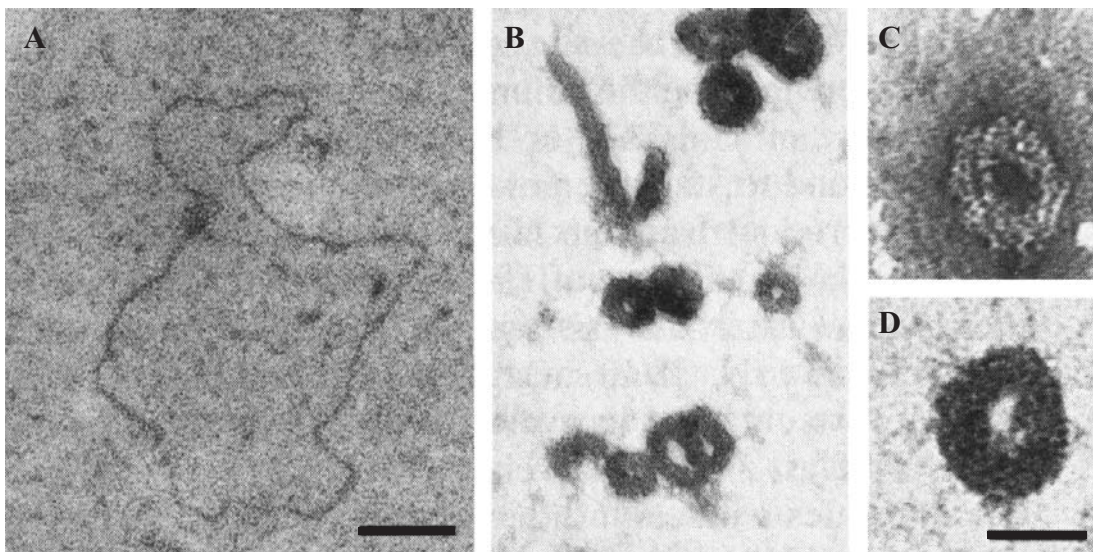


Abb. 5.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen in (A) ein Plasmid, in (B)-(D) diverse DNA/Polylysin-Komplexe. Der Maßstab für die Bilder (A) und (B) hat eine Länge von 100 nm, für (C) und (D) von 50 nm (Wagner, 1991).

Nach Abb. 5.2 haben DNA/Polylysin-Komplexe keine definierte Form, bilden aber in der Regel ringförmige Strukturen unterschiedlicher Größe. Da es im allgemeinen noch viele offene Fragen zu den synthetischen Genvektoren gibt, werden im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden beschrieben, die es ermöglichen, die physikalischen Aspekte der kolloidalen Aggregation, die Größenverteilung und die Packungsdichte von DNA/Polylysin-

³⁶ Das Lungen-Surfactant spielt eine wichtige Rolle beim Atemzyklus, da es die Oberflächenspannung reduziert und damit das Kollabieren der Alveolen verhindert.

Komplexen zu untersuchen. Die quantitative Fluoreszenzmikroskopie ist dabei eine geeignete Methode, um Größen- und Intensitätsverteilungen zu bestimmen und daraus die Zahl der Plasmide pro Komplex zu berechnen. Der Vorteil dieser Technik liegt gegenüber anderen Methoden in der einfachen Anwendung und der Möglichkeit, das System unter physiologischen Bedingungen zu studieren. Mit der Spektroskopie soll der Energietransfer von DNA/Polylysin-Komplexen gemessen und damit Aussagen über die Packungsdichte sowie die innere Stabilität gemacht werden. Außerdem ist die Formation und Dissoziation der isoelektrischen Komplexe als Funktion von monovalenten Ionen und anionischen Polymeren von Interesse.

5.2 Fluoreszenzmikroskopie

5.2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung durch einen Fluorophor kann als ein Übergang zwischen zwei diskreten Energiezuständen des Elektronensystems beschrieben werden. In Abb. 5.3 sind alle relevanten quantenmechanischen Prozesse in einem Termschema dargestellt. Fluorophore sind im allgemeinen stabile organische Moleküle, die von Ausnahmen abgesehen, aus einer geraden Zahl von Elektronen bestehen. Die Molekülorbitale werden von den Elektronen im Grundzustand S_0 paarweise mit antiparalleler Orientierung des Spins besetzt (Singulett-Zustand). Mit der Absorption von elektromagnetischer Strahlung, die nur ein Zeitintervall von 10^{-15} sec erfordert, kann das Molekül in höhere Singulett-Energiezustände S_1 übergehen. Außerdem existieren zu jedem Energieniveau des Elektronensystems mehrere äquidistante Schwingungszustände des Moleküls. Da die Schwingungen des Moleküls eine Periodendauer von ca. 10^{-12} sec haben, können nach dem Franck-Condon-Prinzip die Kernabstände während der Anregung als konstant angenommen werden. Die Relaxationszeit der höheren Schwingungszustände ist im allgemeinen viel kleiner als die Lebensdauer des angeregten Singulett-Zustands S_1 im Schwingungsgrundzustand. Aus diesem Grund erfolgen alle weiteren Prozesse, wie die Fluoreszenz, die innere Konversion und die Interkombination aus dem Grundzustand der Molekülschwingungen (Hoppe, 1982).

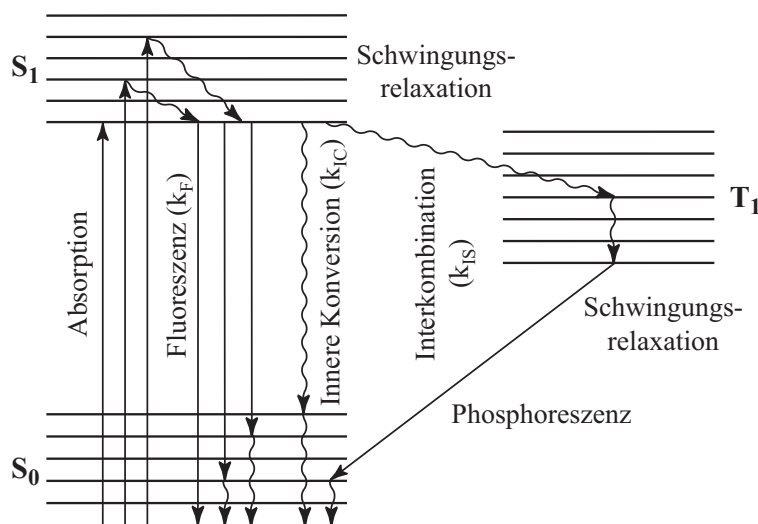


Abb. 5.3: Jablonski-Diagramm. Das Termschema zeigt die relevanten quantenmechanischen Prozesse, die bei der Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung eine Rolle spielen. Im Termschema sind die energetisch niedrigsten Singulett- (S) und Triplettzustände (T) eines Moleküls mit den strahlenden (—) bzw. strahlungslosen (~~~~) Übergängen illustriert.

Fluoreszenz (k_F) stellt die direkte Emission von elektromagnetischer Strahlung dar, bei der das Molekül von einem angeregten Singulett-Zustand in die verschiedenen Schwingungsniveaus des Grundzustands übergehen kann. Sie ist im allgemeinen nur für elektronische Übergänge zwischen Zuständen gleicher Multiplizität möglich. Typische Werte für die Fluoreszenzlebensdauer eines angeregten Zustandes liegen im Bereich von ca. 10^{-9} sec.

Darüber hinaus existieren auch noch die zur Fluoreszenz konkurrierenden strahlungslosen Prozesse. Im Fall der inneren Konversion und der Schwingungsrelaxation sind Kollisionen des Fluorophors mit den Molekülen des Lösungsmittels für die Abregung des Systems verantwortlich. Aus diesem Grund nimmt die inneren Konversion (k_{IC}) bei einer Erhöhung der Temperatur drastisch zu, was mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors verbunden ist. Dieser Effekt wird auch als dynamische Fluoreszenzlösung oder *dynamic quenching* bezeichnet. Des weiteren kann es durch Kollisionen mit freien Radikalen in der Lösung zur Abregung des Fluorophors kommen. Molekularer Sauerstoff und Iod-Ionen sind besonders effektive Radikale, die annähernd bei jeder Kollision mit einem Fluorophor zur Abregung führen. Die Fluoreszenzlösung ($k_q(Q)$) ist nur von der Diffusionskonstante und der Konzentration der Radikale in der Lösung abhängig. Da sie in den Experimenten einen entscheidenden Einfluß auf das Fluoreszenzsignal haben kann, werden in der Fluoreszenzmikroskopie oft Antioxidantien eingesetzt, die die Bildung von freien Radikalen in der Lösung minimieren. Außerdem existiert neben der dynamischen auch die statische Fluoreszenzlösung, bei der sich Komplexe aus Fluorophoren und fluoreszenzlöschenden Molekülen bilden. Die Fluorophore der Komplexe gehen unmittelbar nach der Absorption von Strahlung ohne die Emission eines Photons in den Grundzustand zurück (Lakowicz, 1983).

Bei der Interkombination (k_{IS}) handelt es sich um Übergänge, die einen Singulett- in einen Triplett-Zustand überführen. Im folgenden kann dieser Zustand durch Phosphoreszenz oder innere Konversion wieder in den Singulett-Grundzustand übergehen. Auf Grund des Interkombinationsverbotes hat dieser Übergang jedoch eine geringe quantenmechanische Wahrscheinlichkeit. Des weiteren kann die Abregung des Singulett-Zustandes S_1 auch über den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (k_{ET}) erfolgen, wenn zwei Arten von Fluorophoren existieren, die ein passendes Donor-Akzeptor-Paar darstellen. In diesem Fall transferiert der Donor seine Anregungsenergie strahlungslos auf den Akzeptor. Die Rate dieses Prozesses ist jedoch vom Abstand des Donors zum Akzeptor abhängig. Auf die theoretischen Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers wird in Kap. 5.3.1 detaillierter eingegangen.

Die Quantenausbeute Φ_F ist im allgemeinen durch das Verhältnis der emittierten zu den absorbierten Photonen des Systems definiert. Sie kann mit den entsprechenden Raten der verschiedenen Prozesse geschrieben werden als:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q(Q) + k_{ET}} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

Die Raten der angegebenen Prozesse beziehen sich auf den Energietransfer (ET), die Fluoreszenz (F), die innere Konversion (IC), die Interkombination (IS) und die Fluoreszenzlöschung durch spezielle Moleküle (Q).

5.2.2 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie

Aus den allgemeinen Betrachtungen von Kap. 5.2.1 folgt, daß die Quantenausbeute der Fluoreszenz bei einem Fluorophor von vielen Faktoren abhängig ist. Die Quantifizierung der Fluoreszenz gestaltet sich deshalb so kompliziert, da im Experiment alle relevanten Parameter kontrolliert werden müssen, die einen entscheidenden Einfluß auf die Quantenausbeute eines Fluorophors haben könnten. Mit dem vorliegenden experimentellen Aufbau war es möglich, die Fluoreszenzintensität von Gentransfer-Komplexen zu quantifizieren.

Experimenteller Aufbau:

Die Messungen erfolgten mit dem invertierten Mikroskop Axiovert 135 TV (Zeiss, Jena), das schon in Kap. 3.1.2 detailliert beschrieben wurde. Auf Grund der Stokes-Verschiebung zwischen dem Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors ist es möglich, das Anregungslicht mit einer speziellen Filterkombination von der emittierten Fluoreszenzstrahlung zu separieren. Die Stokes-Verschiebung ist zum einen auf das Franck-Condon-Prinzip und zum anderen auf die Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle in der Umgebung eines Fluorophors nach der Absorption zurückzuführen (Lakowicz, 1983). Ohne dieses Phänomen wäre die Fluoreszenzmikroskopie nicht denkbar.

Die emittierte Fluoreszenzstrahlung kann nur mit einer geeigneten Filterkombination beobachtet werden, die aus einem dichroitischen Spiegel, einem Anregungs- und einem Emissionsfilter besteht. Es wurde in dieser Arbeit ausschließlich der Filtersatz 10 (Zeiss, Jena) mit den optischen Komponenten BP(450-490), FT(510) und BP(530-585) verwendet. Der Anregungsfilter selektiert aus dem gesamten Spektrum der Strahlungsquelle nur das Licht eines definierten Wellenlängenintervalls, das vom dichroitischen Spiegel in Richtung des Präparats reflektiert wird. Das emittierte Fluoreszenzlicht kann im Unterschied dazu den dichroitischen Spiegel und den Emissionsfilter passieren.

Strahlungsquelle des Fluoreszenzmikroskops war eine Quecksilber-Dampfampe des Typs HBO 103 (Osram, München) mit einer maximalen Leistung von 100 W. Die Intensität der Lampe konnte mit einer regulierbaren Spannungsversorgung innerhalb des vorgegebenen Intervalls auf einen konstanten Wert eingestellt werden. Das emittierte Spektrum der Quecksilber-Dampfampe hat diskrete Linien mit einer hohen Intensität, die eine effiziente Anregung eines Fluorophors ermöglichen. Um das Ausbleichen der Fluorophore nach der Aufnahme eines Fluoreszenzbildes zu verhindern, wurde ein vom Computer gesteuerter Fotoverschluß direkt nach der Lampe in den Strahlengang integriert.

Das verwendete Objektiv war ein Plan-Neofluar 100× 1.3 mit Öl-Immersion (Zeiss, Jena). Die beiden Zahlen bezeichnen die laterale Vergrößerung (100×) und die numerische Apertur (1.3) des Objektivs. Mit dem Einsatz von Immersionsflüssigkeiten lassen sich höhere Werte für die numerische Apertur erzielen und Verluste durch die Reflexion von Strahlung an den Grenzflächen minimieren.

Bei der verwendeten CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, USA) handelte es sich um eine 12 Bit Interline-Kamera mit 1300×1030 Pixel, die mit einer Frequenz von 5 MHz ausgelesen werden konnte. Die elektrischen Signale der CCD-Kamera wurden mit einem A/D-Konverter digitalisiert und in den Computer eingelesen. Des weiteren erfolgte die Analyse der aufgezeichneten Fluoreszenzbilder mit dem Programm *IPLab* (Scanalytics, Fairfax, VA, USA).

Die Montage der CCD-Kamera erfolgte am TV-Adapter auf der Unterseite des invertierten Mikroskops (Abb. 3.1). Diese Konfiguration hat im Unterschied zur Montage der CCD-Kamera am Binokulartubus den großen Vorteil, daß im Fluoreszenz-Strahlengang nur ein minimaler Satz von optischen Komponenten vorhanden ist. Im konkreten Fall befinden sich zwischen dem Objektiv und der CCD-Kamera nur der Fluoreszenz-Filterschieber und die Tubuslinse des Mikroskops. Damit kann die Absorption und Streuung des emittierten Fluoreszenzlichtes durch die optischen Komponenten im Strahlengang minimiert werden.

Digitale Bildverarbeitung:

Die Beleuchtung des Präparates in der Objektebene durch die Quecksilber-Dampfampe ist im allgemeinen nicht vollkommen homogen. Aus diesem Grund müssen die digitalisierten Bilder der CCD-Kamera vor einer Intensitätsanalyse auf ihre inhomogene Beleuchtung korrigiert werden. Dazu wurde das Fluoreszenzbild eines FITC³⁷-beschichteten Deckglases in der Objektebene mit definierter Einstellung von Apertur- und Feldblende aufgenommen.

³⁷ FITC: Fluoreszein-5-isothiocyanat.

Die Intensitätsverteilung dieses Bildes korrespondiert mit dem Beleuchtungsprofil (A) der Quecksilber-Dampflampe in der Objektebene. Darüber hinaus erfordert die Korrektur der inhomogenen Beleuchtung die Aufnahme des thermischen Rauschens der CCD-Kamera (B). Die Formel zur Korrektur eines Fluoreszenzbildes (C) lautet:

$$\text{Korrigiertes Bild} = \langle A - B \rangle \cdot \frac{C - B}{A - B} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Das Bild des thermischen Rauschens der CCD-Kamera (B) wird vom unkorrigierten Bild (C) und dem Beleuchtungsprofil in der Objektebene (A) subtrahiert. Mit der Division der resultierenden Bilder (C – B) und (A – B) kann jedes Pixels auf die Intensitätsverteilung der einfallenden Strahlung normiert werden. Die folgende Multiplikation des Quotienten mit dem Mittelwert von Bild (A – B) skaliert die Intensitätswerte des normierten Bildes wieder auf das ursprüngliche Intervall.

Des weiteren kann mit der digitalen Bildverarbeitung die Intensitätsverteilung des korrigierten Fluoreszenzbildes analysiert werden. Das Programm *IPLab* ermöglicht nun die Markierung aller Pixel eines Bildes, deren Intensitätswerte in einem bestimmten Intervall liegen. Im folgenden werden die zusammenhängenden markierten Bereiche eines Bildes als Segmente bezeichnet. Außerdem können mit dem Programm alle wichtigen physikalischen Parameter für jedes Segment bestimmt werden. Dazu gehören u. a. die Intensität, die Fläche, die verschiedenen Momente der Intensitätsverteilung und die entsprechenden Standardabweichungen. Die Ergebnisse der Analyse werden für alle Segmente in Form einer Tabelle abgespeichert und in das Programm *IGOR* geladen und ausgewertet. Das für den vorliegenden Fall entwickelte Stapelverarbeitungsprogramm ermöglichte die effiziente Analyse von umfangreichen Bildsequenzen, was ein entscheidendes Kriterium für eine zuverlässige Statistik der Daten darstellt.

5.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

5.3.1 Theoretische Grundlagen

Die Abregung eines Fluorophors kann neben den in Kap. 5.2.1 beschriebenen Prozessen auch über den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer³⁸ (FRET) erfolgen. Dazu müssen jedoch zwei verschiedene Populationen von Fluorophoren existieren, die ein passendes Donor-Akzeptor-Paar darstellen. In diesem Fall transferiert der Donor D seine Anregungsenergie strahlungslos auf den Akzeptor A. Die Rate dieses Prozesses k_{ET} ist jedoch entscheidend von der Distanz des Donors zum Akzeptor abhängig und kann nach Fermis-Goldener-Regel geschrieben werden als (Hoppe, 1982):

$$k_{ET} \propto \left| \langle \Psi_{D^*} \Psi_A | \mathbf{V} | \Psi_D \Psi_{A^*} \rangle \right|^2 \quad (\text{Gl. 5.3})$$

Hierbei bezeichnen Ψ_D und Ψ_A die Wellenfunktion von Donor bzw. Akzeptor sowie \mathbf{V} den Wechselwirkungsoperator des Prozesses. Der Index * symbolisiert den entsprechenden angeregten Zustand der Fluorophore. Für den Energietransfer ist der Operator \mathbf{V} durch die Dipol-Dipol-Wechselwirkung gegeben (Förster, 1946):

$$\mathbf{V} = \frac{\kappa |\boldsymbol{\mu}_D| |\boldsymbol{\mu}_A|}{r^3} \quad (\text{Gl. 5.4})$$

Es repräsentieren $\boldsymbol{\mu}_D$ und $\boldsymbol{\mu}_A$ die entsprechenden elektrischen Dipolmomente sowie r die Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Der geometrische Faktor κ beschreibt die Orientierung der elektrischen Dipolmomente und folgt aus theoretischen Überlegungen, da er nicht direkt gemessen werden kann.

Voraussetzung für den Energietransfer ist die Kopplung des angeregten Donormoleküls D^* mit einem Akzeptormolekül A im Grundzustand. In Abb. 5.4 ist der Mechanismus des Transfers anhand eines quantenmechanischen Systems mit zwei Niveaus dargestellt. Im ersten Fall wird die Energie über ein virtuelles Photon zwischen den Elektronen (1) und (2) übertragen. Die Übergangswahrscheinlichkeit ist durch das Matrixelement β_C charakterisiert. Beim zweiten Fall handelt es sich um einen Austausch der beiden Elektronen zwischen Donor und Akzeptor. Der Prozeß mit dem Matrixelement β_{ex} erfolgt jedoch nur bei einem direkten Kontakt der beiden Elektronenhüllen und spielt für größere Distanzen der beiden Fluorophore keine Rolle mehr. Im Zusammenhang mit der Formation und Dekomposition von DNA-Komplexen ist für den Energietransfer nur die Dipol-Dipol-Wechselwirkung von Donor und Akzeptor relevant.

³⁸ Im folgenden auch als Energietransfer bezeichnet.

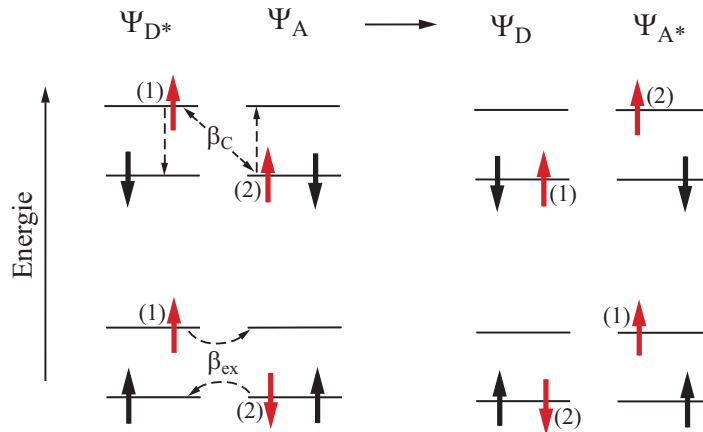


Abb. 5.4: Darstellung der quantenmechanischen Prozesse beim Energietransfer. Die Spins der Elektronen eines Zwei-Niveau-Systems sind als Pfeile angedeutet. Im oberen Teil der Darstellung ist der Energietransfer über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung, im unteren als Elektronenaustausch zwischen Donor und Akzeptor illustriert.

Der Energietransfer als Funktion von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor ist durch folgende Gleichung gegeben (Förster, 1948):

$$E_T = \frac{R_F^6}{R_F^6 + r^6} \quad (\text{Gl. 5.5})$$

Hierbei sind E_T der Energietransfer, r die Distanz zwischen Donor und Akzeptor und R_F der Försterradius. Für kleine Abstände $r \rightarrow 0$ strebt der Energietransfer zum maximalen Wert von Eins, während Gl. 5.5 für $r \rightarrow \infty$ gegen Null konvergiert. Der Försterradius R_F repräsentiert die Distanz von Donor und Akzeptor, bei der der Energietransfer auf die Hälfte abgenommen hat. Die Formel zur Berechnung des Försterradius lautet:

$$R_F^6 = C \frac{J \kappa^2 \Phi_D}{n^4} \quad (\text{Gl. 5.6})$$

Es beschreiben J das Überlappungsintegral, κ den geometrischen Faktor der Orientierung, Φ_D die Quantenausbeute des Donors ohne einen Akzeptor, n den Brechungsindex des Lösungsmittels und C eine Konstante. Typische Werte für den Försterradius liegen in einem Intervall von 40 Å bis 80 Å. Das Überlappungsintegral ist im allgemeinen durch die folgende Gleichung definiert:

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{Gl. 5.7})$$

Hierbei sind $\varepsilon_A(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors und $f_D(\lambda)$ das normierte Emissionsspektrum des Donors, für das bei der Integration über alle Wellenlängen die Gleichung $\int f_D(\lambda) d\lambda = 1$ gilt. Die experimentelle Bestimmung der Quantenausbeute des

Donors Φ_D und des Überlappungsintegrals J ermöglicht nach Gl. 5.6 die Berechnung des Försterradius für das Donor-Akzeptor-Paar. Im Fall einer statistischen Verteilung der elektrischen Dipolmomente folgt für das Quadrat des geometrischen Orientierungsfaktors κ^2 ein Wert von $2/3$ (Cantor, 1980).

Es stellt sich nun die Frage, wie der Energietransfer im konkreten Fall gemessen werden kann. Die Definition des Energietransfers ist durch den Quotienten aus der Rate des Transfers und der Summe über alle möglichen Prozesse gegeben. Äquivalent dazu ist die Darstellung als eine Funktion der Fluoreszenz-Quantenausbeute des Donors in Ab- und Anwesenheit des Akzeptors (Lakowicz, 1983):

$$E_T = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q(Q)} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (\text{Gl. 5.8})$$

Hierbei bezeichnen I_D die Fluoreszenzintensität des Donors in Ab- und I_{DA} in Anwesenheit des Akzeptors. Die Raten der angegebenen Prozesse beziehen sich auf den Energietransfer (ET), die Fluoreszenz (F), die innere Konversion (IC), die Interkombination (IS) und der Fluoreszenzlöschung durch spezielle Moleküle (Q). Zur Bestimmung des Energietransfers müssen zwei identische Experimente durchgeführt werden, die sich nur in einem Punkt unterscheiden. Im ersten Fall erfolgen die Messungen der Fluoreszenzintensität des Donors mit Akzeptor und im zweiten Fall an einem Präparat ohne Akzeptor.

5.3.2 Fluoreszenzspektrometer

Die Messungen der Emissions- und Absorptionsspektren erfolgten mit einem Spektrometer von SPEX-Industries (Edison, New Jersey, USA), das mit den entsprechenden Komponenten in Abb. 5.5 schematisch dargestellt ist. Eine Quecksilber-Dampfampe mit einer Leistung von 450 W wurde als intensive Strahlungsquelle eingesetzt. Das Spektrometer ist mit zwei motorisierten Monochromatoren ausgestattet, die unabhängig voneinander auf eine bestimmte Wellenlänge eingestellt werden können. Monochromatoren ermöglichen die spektrale Aufspaltung durch Beugung von elektromagnetischer Strahlung an einem Parallelstrichgitter. Mit der Rotation des Gitters kann aus dem Spektrum eine bestimmte Wellenlänge auf den Austrittsspalt abgebildet werden. Die spektrale Auflösung der Monochromatoren hatte im konkreten Fall einen Wert von ca. 0.2 nm. Dabei kompensiert der z-förmige Strahlengang die Abbildungsfehler der beiden konkaven Spiegel (Hecht, 1991).

Nach dem Anregungsmonochromator trifft der Strahl in der Probenkammer auf die Küvette mit dem Präparat. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes erfolgt in diesem Fall orthogonal zur Richtung des einfallenden Strahls. Ein weiterer Monochromator ist für die spektrale Aufspaltung der emittierten Strahlung verantwortlich. Der am Emissions-

monochromator montierte Photomultiplier (PM) detektiert die ankommenden Photonen, die über ein bestimmtes Zeitintervall integriert werden. Die gemessene Rate korrespondiert zur Intensität der Fluoreszenz pro Wellenlängenintervall und wird in den physikalischen Einheiten von $[\text{sec}^{-1} \text{ nm}^{-1}]$ angegeben. Außerdem reflektiert ein Strahlteiler aus Quartz-Glas einen Teil des Anregungslichtes in Richtung einer Referenzküvette, die mit einer konzentrierten Rhodamin-Lösung gefüllt ist. Ein weiterer Photomultiplier detektiert das Referenzsignal, das zur Korrektur von Schwankungen der Quecksilber-Dampf lampen-Intensität herangezogen wird.

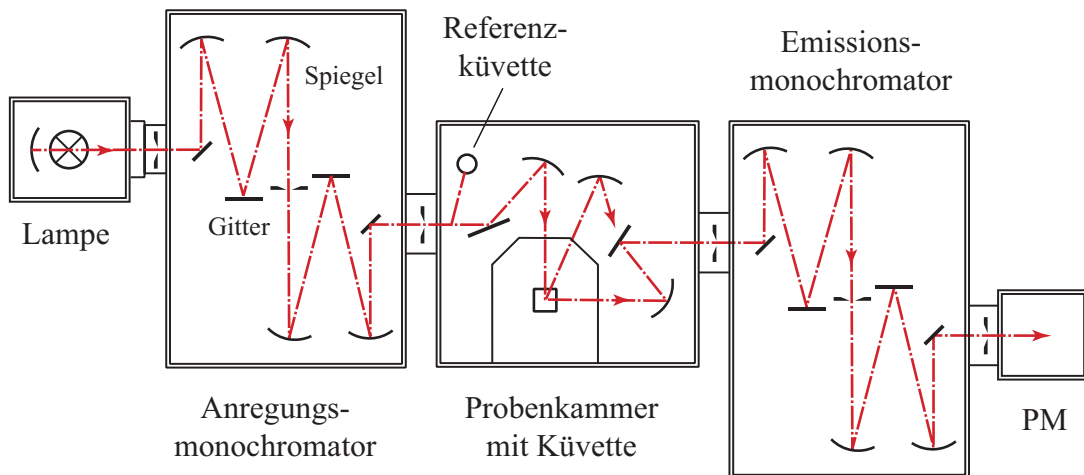


Abb. 5.5: Schematische Darstellung eines Spektrometers. Die temperierbare Probenkammer ist an einem Magnetrührer angeschlossen. Damit können bei den Titrationsmessungen Konzentrationsgradienten in der Küvette vermieden werden.

Mit einem Spektrometer können Emissions- und Absorptionsspektren aufgenommen werden. Die Aufzeichnung eines Emissionsspektrums erfordert das Positionieren des Anregungsmonochromators auf eine bestimmte Wellenlänge, während der Emissionsmonochromator ein vorgegebenes Wellenlängenintervall abrastert. Bei der Aufnahme eines Absorptionsspektrums sind die Verhältnisse genau umgekehrt. Ein Computer mit dem installierten Programm *DM 3000 F* ermöglichte die elektronische Steuerung aller Komponenten des Spektrometers, die Datenerfassung und die Darstellung der Resultate auf dem Monitor. Des weiteren war der Küvettenhalter der Probenkammer mit einem Magnetrührer ausgestattet. Das ständige Rühren der Lösung während der Messung verhinderte bei der Titration von Substanzen die Bildung von Konzentrationsgradienten in der Küvette. Darüber hinaus konnte die Temperatur der Küvette in der Probenkammer während des Experimentes auf einem konstanten Wert gehalten werden. Damit war es möglich, den Einfluß der Temperatur auf die Fluoreszenz der Fluorophore in Lösung auszuschließen.

5.4 Material und Präparation

5.4.1 Polymere

Desoxyribonukleinsäure (DNA):

Es handelt sich bei der DNA um ein lineares anionisches Polymer, das für die Kodierung der genetischen Information in einer Zelle verantwortlich ist. Die monomeren Bausteine der DNA sind die sogenannten Nukleotide, die aus einer organischen Base, einem Zucker-Molekül (Desoxyribose) und mindestens einer Phosphatgruppe bestehen. Im allgemeinen lassen sich vier verschiedene organische Basen unterscheiden, die mit Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G) bezeichnet werden. Die Nukleotide sind über Phosphodiester-Bindungen kovalent zu einem linearen Polymer verbunden (Primärstruktur). Im Fall der DNA bilden zwei komplementäre Polynukleotid-Sequenzen durch Basenpaarung einen gewundenen Doppelstrang, der im allgemeinen eine rechtsdrehende Helix darstellt (Sekundärstruktur). Prinzipiell können nur Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin über Wasserstoffbrückenbindungen eine Basenpaarung eingehen. Da die Phosphatgruppen der DNA in wässrigen Lösungen bei einem neutralen pH-Wert dissoziieren, tragen die Basenpaare eine zweifach negative Ladung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für ein Basenpaar (bp) ein mittleres Molekulargewicht von $M_r = 660$ angenommen. Die quantitative Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit den speziellen Plasmiden pEGFP von Clontech (Palo Alto, CA, USA), die aus einer definierten Sequenz von Nukleotiden mit einer Länge von 4.7 kbp bestehen. Außerdem wurden die Plasmide für die Untersuchungen der Transfektionseffizienz von Gentransfer-Vektoren an humanen Epithelzellen der Lunge eingesetzt. Im allgemeinen sind Plasmide zirkuläre DNA-Moleküle, die im Nukleus einer Zelle in verschiedenen Konformationen und Längen vorkommen. Das Plasmid pEGFP kodiert ein grün fluoreszierendes Protein³⁹, das die Ribosomen im Zytoplasma nach der Transkription synthetisieren. Die Expression dieses Proteins in der Zelle kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Da die Messung des Energietransfers im Spektrometer eine erhebliche Menge an Reagenzien erfordert, wurde in den Experimenten Kalbs-Thymus-DNA mit einer Länge von mindestens 30 kbp verwendet (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Im allgemeinen ist die Lagerung der DNA in wässrigen Lösungen mit 10 mM TRIS, 500 μ M EDTA und pH = 8 bei einer Temperatur von -20 °C über einen längeren Zeitraum möglich.

³⁹ Im Englischen auch als **Green Fluorescent Protein** (GFP) bezeichnet.

Poly-L-Lysin:

Poly-L-Lysin ist ein kationisches Polymer mit einer linearen molekularen Struktur, das in der somatischen Gentherapie zur Kondensation von DNA eingesetzt werden kann. Das Monomer des Makromoleküls ist die Aminosäure Lysin mit ihrer hydrophilen und positiv geladenen Seitenkette. Die Aminosäuren werden bei der Synthese des Makromoleküls über Peptidbindungen zu einem linearen Polymer verbunden. Abb. 5.6 zeigt die chemische Struktur von Poly-L-Lysin in wässriger Lösung unter neutralen Bedingungen. In diesem Fall liegen die primären Amine der Seitenketten hauptsächlich im protonierten Zustand vor ($pK = 10.2$). Des Weiteren hat Lysin in Relation zu allen anderen Aminosäuren eine der längsten Seitenketten (Tang, 1997). Die beiden Spiegelbilder der Aminosäuren werden auf Grund der Chiralität als L- und D-Isomere bezeichnet. Da Proteine generell nur aus den L-Isomeren der Aminosäuren bestehen, wird im folgenden auf das Symbol des Isomers im Namen des Polymers verzichtet (Stryer, 1995).

In den Experimenten zur quantitativen Fluoreszenzmikroskopie wurde Polylysin-Hydrobromid mit einem Molekulargewicht von maximal 10^4 kD verwendet (Fluka, Neu-Ulm). Dies entspricht unter Berücksichtigung des Molekulargewichts für Lysin von $M_r = 209$ einem Polymer mit ca. 50 Monomeren. Daneben erfolgten die Messungen des Energie-transfers im Spektrometer mit fluoreszenzmarkiertem Polylysin. Dazu wurden ca. 1.3 FITC-Moleküle pro 100 Monomere kovalent an die Seitenketten des Polymers gebunden (Christian Plank, Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München). Das kationische Polymer kann in wässriger Lösung einige Tage bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und mehrere Monate bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

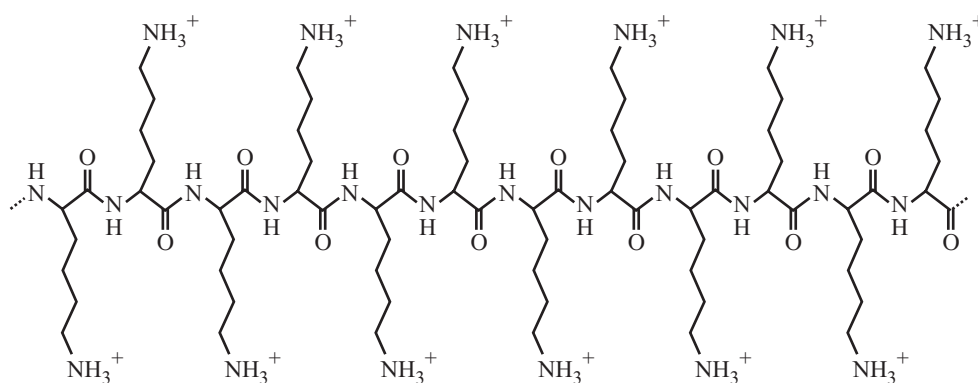


Abb. 5.6: Chemische Struktur von Poly-L-Lysin. Die primären Amine der Seitenketten liegen in wässriger Lösung unter neutralen Bedingungen hauptsächlich im protonierten Zustand vor.

5.4.2 Alveofact

Alveofact (Boehringer, Ingelheim) ist ein natürliches Surfactant aus Rinderlungen, das in der Medizin zur Behandlung des neonatalen Atemnot-Syndroms eingesetzt wird. Das Surfactant besteht aus verschiedenen Lipiden (90%), Proteinen (8%) und Kohlenhydraten (ca. 2%). Dabei setzen sich die Lipide hauptsächlich aus dem zwitterionischen Phosphatidylcholin (80%) und dem negativ geladenen Phosphatidylglycerol (12%) zusammen. Bei den Surfactant-Proteinen (SP) sind die Formen A, B, C und D bekannt, die sich in der räumlichen Struktur, den chemischen Eigenschaften und der physiologischen Funktion unterscheiden. SP-A initiiert bei der Kontraktion der Alveolen die Bildung von lamellaren Strukturen im Surfactant. Sie stellen ein extrazelluläres Reservoir von Surfactant in den Alveolen dar. Im Unterschied dazu reduzieren SP-B und SP-C die Oberflächenspannung, indem sie die lamellaren Strukturen des Surfactants bei der Expansion der Alveolen auflösen. Damit kann sich das Surfactant an die variierende Oberfläche der Alveolen beim Ein- und Ausatmen anpassen. Nach der Präparation von Alveofact sind nur noch die hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C in der Suspension enthalten. Das Produkt kann in Form eines Pulvers oder in Lösung mit einem mittleren Molekulargewicht von $M_r = 760$ bezogen werden (Boehringer, 1998).

5.4.3 Fluorophore

Die delokalisierten Elektronen in den konjugierten Doppelbindungen von bestimmten chemischen Gruppen sind für die Fluoreszenz von vielen Fluorophoren verantwortlich (Lakowicz, 1983). So handelt es sich auch bei den Farbstoffen der TOTO-Serie, zu denen auch die Derivate von BOBO gehören, um symmetrische positiv geladene Cyanin Dimere mit delokalisierten π -Elektronen. Sie haben eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren und interkalieren in die Doppelhelix der DNA (Abb. 5.8). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Markierung der DNA die Fluorophore BOBO und TOTO von Molecular Probes⁴⁰ (Eugene, Oregon, USA) verwendet. Die Markierung von Polylysin erfolgte durch die kovalente Bindung von FITC⁴¹ an die Seitenketten des Polymers. FITC zeichnet sich durch seine hohe Quantenausbeute in neutralen und alkalischen Lösungen aus. In Abb 5.7 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von Polylysin-gebundenem FITC und DNA-interkaliertem BOBO dargestellt. Sie wurden mit dem in Kap. 5.3.2 beschriebenen Spektrometer unter den experimentellen Pufferbedingungen gemessen. Die Fluorophore FITC und BOBO stellen ein ideales Donor-Akzeptor-Paar für die Experimente zum Ener-

⁴⁰ Es handelt sich um die Derivate BOBO-3 und TOTO-1.

⁴¹ FITC: Fluoreszein-5-isothiocyanat.

gietransfer dar. So liegen die Absorptions- und Emissionsmaxima von FITC und BOBO bei den Wellenlängen $\lambda = 490 \text{ nm}$, 515 nm , 570 nm und 604 nm .

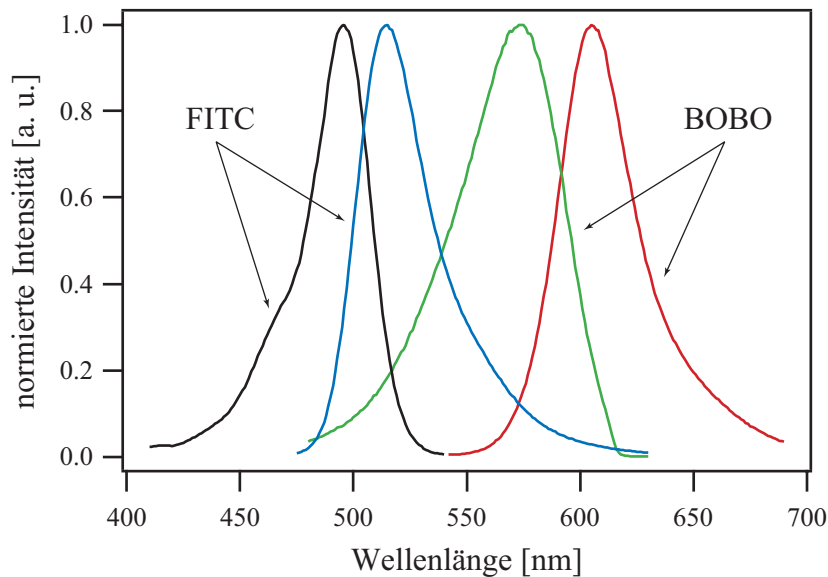


Abb. 5.7: Gemessenes Absorptions- und Emissionsspektrum der Fluorophore FITC und BOBO, die in den Experimenten zum Energietransfer ein passendes Donor-Akzeptor-Paar bilden. Das Überlappungsintegral des Emissionsspektrums von FITC mit dem Absorptionsspektrum von BOBO stellt einen wichtigen Parameter für die Berechnung des Förster-Radius R_F dar.

Die Interkalation von BOBO oder TOTO in die Doppelhelix der DNA ist mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität verbunden. Der Effekt ist darauf zurückzuführen, daß die Rotation von bestimmten chemischen Gruppen der Cyanin Dimere durch die Interkalation eingeschränkt ist (Spielmann, 1995). Das Diagramm in Abb. 5.8 zeigt die auf das Emissionsmaximum normierte Fluoreszenzintensität von ungebundenem (A) in Relation zu interkaliertem BOBO (B) unter definierten experimentellen Bedingungen. Die Fluoreszenz nimmt bei der Interkalation von BOBO mindestens um den Faktor 100 zu. Aus diesem Grund spielt in den Experimenten die Fluoreszenz der ungebundenen Fluorophore in der Lösung keine Rolle. Des weiteren ist in Abb. 5.8 die 3-dimensionale Struktur eines DNA-BOBO-Komplexes illustriert. Die symmetrischen Cyanin Dimere von BOBO und TOTO ordnen sich dabei parallel zu den Basenpaaren an. Das Mischen des Farbstoffs mit der DNA erfolgte immer in verdünnten wässrigen Lösungen im Volumenverhältnis von 1:1. Um den Prozeß der Interkalation zu beschleunigen, wurde die Lösung für 5 min bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA kann maximal mit einem TOTO- bzw. BOBO-Molekül pro fünf Basenpaaren markiert werden.

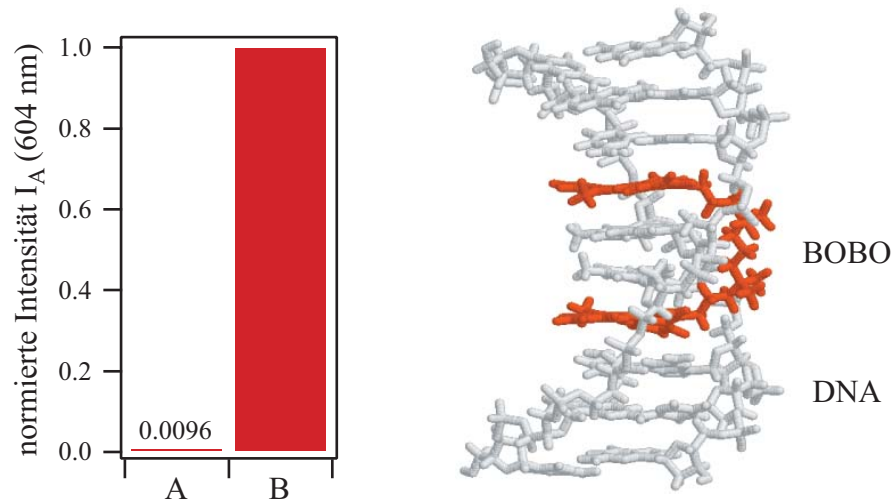


Abb. 5.8: Im Diagramm ist die normierte Fluoreszenzintensität von ungebundenem (A) in Relation zu interkaliertem BOBO (B) dargestellt. Die Fluoreszenz nimmt bei der Interkalation von BOBO mindestens um den Faktor 100 zu. Des weiteren ist die 3-dimensionale Struktur eines DNA-BOBO-Komplexes illustriert.

5.4.4 Präparation der DNA-Komplexe

Die Aggregation von DNA mit kationischen Polymeren oder Lipiden erfolgte immer in deionisierten wässrigen Lösungen (Millipore, Eschborn, Deutschland) bei hohen Verdünnungen im mikromolaren Bereich. Dabei wurden immer die kationischen Substanzen der fluoreszenzmarkierten DNA im Volumenverhältnis 1:1 zugegeben und die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Aggregation in deionisiertem Wasser wurden die experimentellen Pufferbedingungen eingestellt und mit der Messung nach einer weiteren Inkubation von 10 min begonnen. Mit der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie konnte der Effekt von Lungen-Surfactant auf die Größenverteilung von Gentransfer-Komplexen untersucht werden. Dazu wurde den Komplexen nach der Aggregation in deionisiertem Wasser eine mit Ultraschall homogen verteilte Suspension aus Alveofact zugesetzt. Nach dem Einwirken des Surfactants für 10 min erfolgte die 10000-fache Verdünnung der Lösung mit dem im Experiment verwendeten Puffer aus 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und 2 mM Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel. Bei den Messungen ohne Surfactant wurde lediglich ein entsprechendes Volumen an Puffer zugegeben. Da die Komplexe in wässriger Lösung kein stabiles kolloidales System darstellen, müssen sie vor jeder Messung neu hergestellt werden. In den Experimenten zum Energietransfer wurden Gentransfer-Komplexe am isoelektrischen Punkt und in der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie mit zweifacher positiver Überschussladung ($n_+ = 2 n_-$) untersucht.

5.5 Theoretische Grundlagen der kolloidalen Aggregation

Im allgemeinen bestimmen die Wechselwirkungen zwischen den kolloidalen Teilchen die physikalischen Grundlagen der Aggregation. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Fall die elektrostatische Wechselwirkung, da die Partikel eines Kolloids in der Regel gleichartig geladene Objekte darstellen, die von einer diffusen elektrischen Doppelschicht umgeben sind (Kap. 3.2.1). Die geladenen Teilchen unterliegen außerdem der thermischen Bewegung und erfahren bei der gegenseitigen Annäherung eine repulsive elektrostatische Kraft. Für zwei sphärische Teilchen mit einem Abstand r und einem Oberflächenpotential ψ_0 kann die elektrostatische Wechselwirkungsenergie W_R näherungsweise geschrieben werden als (Israelachvili, 1985):

$$W_R(r) = (2 \pi R \varepsilon_r \varepsilon_0 \psi_0^2) e^{-\frac{r}{\lambda_D}} \quad (\text{Gl. 5.9})$$

Hierbei sind R der Radius der beiden sphärischen Teilchen, ε_r die relative Permeabilität, ε_0 die Influenzkonstante und λ_D die Debye-Hückel-Abschirmlänge. Allerdings gilt Gl. 5.9 nur für geladene Teilchen mit kleinen Oberflächenpotentialen ($<25\text{ mV}$). Im Unterschied zu den repulsiven elektrostatischen Kräften ist die attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkung die Ursache für die irreversible Aggregation von kolloidalen Teilchen, bei der sich Komplexe mit einer fraktalen Struktur bilden. Die Wechselwirkungsenergie W_A zwischen den zwei sphärischen Teilchen ist als Funktion ihres Abstandes durch die folgende Formel gegeben (Israelachvili, 1985):

$$W_A(r) = -\frac{1}{12} \frac{A \cdot R}{r} \quad (\text{Gl. 5.10})$$

Es bezeichnen A die Hamaker-Konstante und R den Radius der beiden sphärischen Teilchen. Im Rahmen der DLVO-Theorie⁴² wird die Summe aus der elektrostatischen und der Van-der-Waals-Wechselwirkung betrachtet, um quantitative Aussagen über die Stabilität von kolloidalen Systemen machen zu können. Generell dominieren zwischen den Teilchen für niedrige Ionen-Konzentrationen und hohen Oberflächenpotentialen langreichweitige repulsive elektrostatische Kräfte. Die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte sind nur für kleine Abstände von Bedeutung. Eine Aggregation der kolloidalen Teilchen ist also nur dann möglich, wenn sie bei der Kollision die erforderliche kinetische Energie haben, um die Potentialbarriere überwinden zu können. Im Fall einer hohen Barriere ($>10\text{ kT}$) führen die Kollisionen der Teilchen nur mit einer extrem kleinen Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Komplexes. Kolloidale Lösungen stellen unter diesen Voraussetzungen eine zeitlich stabile Suspension dar (Hunter, 1981).

⁴² Es handelt sich hier um eine von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek entwickelten Theorie.

Eine Erhöhung der Ionen-Konzentration ist mit einer Abnahme der Potentialbarriere zwischen den geladenen Teilchen verbunden. Des weiteren bildet sich ein zweites Minimum im Potential vor der Barriere aus. Die kolloidalen Teilchen können mit ihrer thermischen Energie die Potentialbarriere nach endlich vielen Kollisionen überwinden. Die Koagulation der kolloidalen Teilchen ist unter diesen Voraussetzungen ein langsamer Prozeß, der als reaktionslimitierte Aggregation (RLA) bezeichnet wird. Überhalb einer kritischen Ionen-Konzentration⁴³ und einem verschwindenden Oberflächenpotential existiert zwischen den kolloidalen Teilchen ein langreichweitiges attraktives Van-der-Waals-Potential. In diesem Fall setzt eine spontane Koagulation des Kolloids ein, bei der jede Kollision von Teilchen in einer Aggregation resultiert. Es handelt sich bei dieser Form der Koagulation um die sogenannte diffusionslimitierte Aggregation (DLA). Die Kinetik der Aggregation ist nur durch die Diffusionszeit der Teilchen zwischen den Kollisionen limitiert (Lin, 1989).

Die kolloidale Aggregation beginnt in der Regel mit einer Suspension aus monodispersen Teilchen, die im folgenden auch Monomere genannt werden. Es entstehen mit der Zeit kleinere Komplexe, die durch Brownsche Bewegung in der Lösung diffundieren und bei Kollision immer größere Komplexe bilden können. Dieses Prinzip der Koagulation wird im allgemeinen als *cluster-cluster aggregation*⁴⁴ bezeichnet. Die Kinetik der irreversiblen kolloidalen Aggregation kann mit der Smoluchowski-Koagulations-Gleichung beschrieben werden (Broide, 1990):

$$\frac{dc_n}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i+j=n} k_{ij} c_i c_j - c_n \sum_{i=1}^{\infty} k_{ni} c_i \quad (\text{Gl. 5.11})$$

Hierbei ist c_n mit $n \in \mathbb{N}$ die Konzentration der Komplexe, die aus n Monomeren bestehen. Des weiteren definieren die Koeffizienten k_{ij} mit $i, j \in \mathbb{N}$ die Raten⁴⁵ der Aggregation, bei der zwei Partikel aus i und j Monomeren zu einem Komplex fusionieren. Die erste Summe in Gl. 5.11 bedeutet die Bildung von Komplexen mit n Monomeren, während die zweite Summe die Formation von größeren Komplexen darstellt. Im folgenden ist es sinnvoll, mit den Beziehungen $X_n \equiv c_n/c_0$, $\tilde{t} \equiv t/t_{\text{agg}}$ und $K_{ij} \equiv 2k_{ij}/k_{11}$ dimensionslose Variable einzuführen. Dabei bezeichnen die Parameter $c_0 = \sum_{n=1}^{\infty} n c_n$ die gesamte Konzentration von Monomeren in Lösung und $t_{\text{agg}} \equiv 2/c_0 k_{11}$ die charakteristische Zeit des kolloidalen Systems. Die analytischen Lösungen der Smoluchowski-Koagulations-Gleichung zeigen für große Werte von n und \tilde{t} ein dynamisches Skalenverhalten. Das bedeutet im konkreten Fall, daß die zeitabhängige normierte Größenverteilung der Komplexe $X_n(\tilde{t})$ in eine zeitinvariante Skalenfunktion transformiert werden kann. Für die beiden Prozesse DLA und

⁴³ Im Englischen auch als *critical coagulation concentration* bezeichnet.

⁴⁴ Im Unterschied dazu existieren auch noch andere Prozesse der Aggregation. So können z. B. bei der (engl.) *particle-cluster aggregation* nur einzelne Partikel in der kolloidalen Lösung diffundieren und mit den größeren quasistationären Komplexen aggregieren.

⁴⁵ Im Englischen auch als *kernel* bezeichnet.

RLA ist die dynamische Skalierung näherungsweise durch die folgende Formel gegeben (Broide, 1990):

$$X_n(\tilde{t}) = \frac{\Phi(n/s)}{s^2} \quad (\text{Gl. 5.12})$$

Es sind $X_n(\tilde{t})$ die normierte Größenverteilung der Komplexe als Funktion der Zeit und $\Phi(x)$ die Skalenfunktion mit dem Argument $x = n/s$. Des weiteren ist die Variable s von der mittleren Zahl der Monomere pro Komplex $\langle n \rangle$ abhängig. Im allgemeinen lassen sich aus der Form der Skalenfunktion prinzipielle Aussagen über das Aggregationsverhalten des kolloidalen Systems machen. Die Kinetik der Aggregation folgt aus der zeitlichen Entwicklung der mittleren Zahl von Monomeren pro Komplex $\langle n \rangle$.

Im Fall von DLA hat die Skalenfunktion $\Phi(x)$ in der log-log-Darstellung die Form einer Glockenkurve mit einem Maximum bei $x \approx 0.1$. Außerdem existiert für $\tilde{t} \gg 1$ zwischen den folgenden Größen eine direkte Proportionalität: $s \propto \langle n \rangle \propto \tilde{t}$. Die charakteristische Zeit des kolloidalen Systems ist für DLA durch die Formel $t_{\text{agg}} = 3\eta/4kTc_0$ definiert, wobei η die Viskosität der Suspension, k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und c_0 die gesamte Konzentration von Monomeren in der Lösung bedeuten. Des weiteren kann die Skalenfunktion für $x \gg 1$ in erster Näherung durch die Funktion $\Phi(x) \propto e^{-c \cdot x}$ mit dem Parameter c beschrieben werden. Für die RLA gelten im Unterschied dazu die Beziehungen $\langle n \rangle \propto \tilde{t}$ und $s \propto \langle n \rangle^2$. Die Skalenfunktion ist in diesem Fall für $x \ll 1$ durch die Formel $\Phi(x) \propto x^{-\tau}$ mit $\tau \approx 1.5$ gegeben. Diese algebraische Funktion entspricht in der log-log-Darstellung einer Geraden mit der Steigung des Exponenten $-\tau$ (Broide, 1990).

5.6 Resultate

5.6.1 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie

Mit der Methode können die fluoreszenzmarkierten Partikel eines verdünnten kolloidalen Systems mit hoher Auflösung abgebildet und die Intensitätsverteilung des aufgezeichneten Bildes analysiert werden (Abb. 5.9). Voraussetzung für die optische Abbildung ist jedoch die Immobilisierung der Partikel auf einer Glasoberfläche. Dazu wurde ein definiertes Volumen der Suspension mit einer Konzentration im pikomolaren Bereich in eine Kammer mit dünnem Glasboden gegeben. Die kolloidalen Partikel in unmittelbarer Nähe zum Glasboden können durch Diffusion auf der Oberfläche adhäreren. Mit der Intensitätsanalyse dieser Bilder lassen sich Aussagen über das Aggregationsverhalten, die Größenverteilung und die Stabilität von verdünnten kolloidalen Systemen unter physiologischen Bedingungen machen.

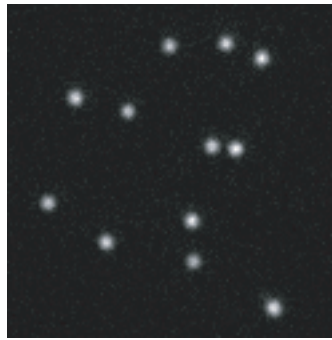


Abb. 5.9: Abbildung von fluoreszenzmarkierten Plasmiden auf einer Glasoberfläche unter physiologischen Bedingungen.

Nach den Erläuterungen von Kap. 5.2.1 ist die Quantenausbeute eines Fluorophors von vielen Faktoren abhängig. So können Änderungen in der Umgebung eines Fluorophors drastische Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität haben. Dies gilt im besonderen für die Kondensation von fluoreszenzmarkierter DNA mit kationischen Substanzen. In diesem Fall kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung α des gebundenen Fluorophors. Dabei ist die Definition dieses Parameters durch die folgende Formel gegeben:

$$\text{Fluoreszenzlöschung} = \frac{I_{\text{DNA}}}{I_{\text{Komplex}}} \quad (5.13)$$

Hierbei bezeichnen I_{DNA} die Intensität der fluoreszenzmarkierten ungebundenen DNA und I_{Komplex} die Intensität der kondensierten DNA. Die Fluoreszenzlöschung ist für die Berechnung der Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex von entscheidender Bedeutung. Sie wurde für DNA/Polylysin-Komplexe ($n_+ = 2 n_-$) mit dem Spektrometer in 100 mM NaCl,

10 mM HEPES und 2 mM Ascorbinsäure bestimmt. In Abb. 5.10A ist das Emissionsspektrum von TOTO-markierter DNA mit dem Verhältnis bp/TOTO von 10:1 vor und nach der Kondensation mit Polylysin dargestellt. Die Emissionsspektren wurden unter den gleichen Pufferbedingungen mit und ohne Alveofact ($c = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) aufgenommen. Für die entsprechende Fluoreszenzlöschung ergaben sich Werte von $\alpha = 3.38$ bzw. $\alpha = 4.81$.

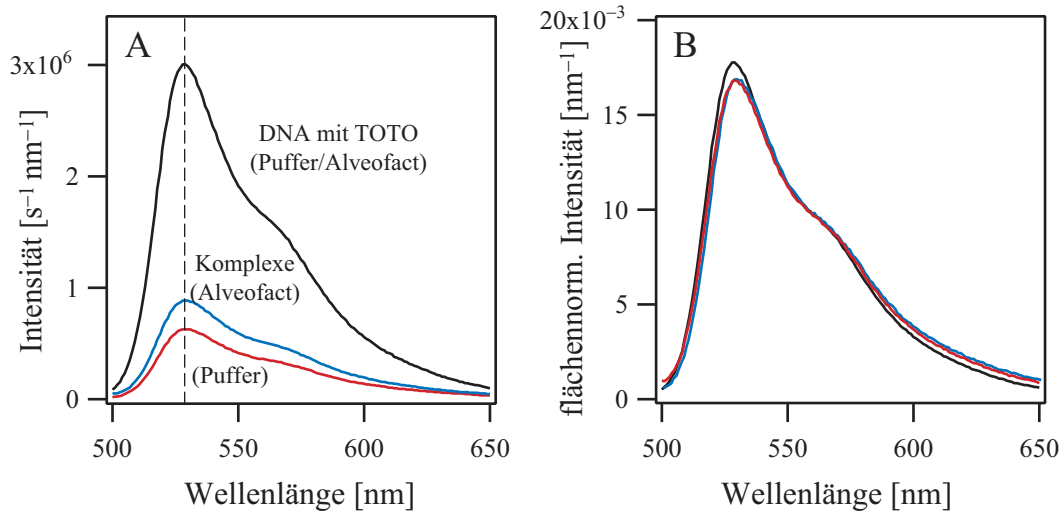


Abb. 5.10: (A) Emissionskurven von TOTO-markierter DNA vor und nach der Kondensation mit Polylysin ($n_+ = 2 n_-$). In (B) sind die korrespondierenden flächennormierten Emissionsspektren aus (A) dargestellt.

Das Kondensieren von fluoreszenzmarkierter DNA ist mit einer Abnahme der emittierten Intensität verbunden, was aber keinen großen Einfluß auf die Form des Spektrums hat (Abb. 5.10B). Um das Aggregationsverhalten von DNA/Polylysin-Komplexen quantitativ untersuchen zu können, muß eine Verdrängung des interkalierten Fluorophors bei der Kondensation der DNA ausgeschlossen werden. Hätte nun das kationische Polymer eine deutlich höhere Affinität zur DNA als der Fluorophor, dann wäre eine Interkalation nach der Kondensation kaum mehr möglich. Um diese Frage beantworten zu können, wurden die folgenden Experimente am Spektrometer durchgeführt. Im ersten Fall wurde die DNA mit BOBO im Verhältnis bp/BOBO von 20:1 markiert und dann mit Polylysin zu isoelektrischen Komplexen kondensiert. Das Fluoreszenzsignal von BOBO konnte während der Formation der Komplexe als Funktion der Zeit gemessen werden (Abb. 5.11). Die Intensität nahm auf Grund der Kondensation kontinuierlich ab und erreichte nach ca. 30 min ein Plateau. Beim zweiten Experiment wurde die unmarkierte DNA zuerst kondensiert und für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Fluorophors in die Küvette. Das Fluoreszenzsignal stieg kontinuierlich auf das gleiche Niveau wie im ersten Experiment an. Die ersten Sekunden der Messungen konnten auf Grund des Pipettiervorganges nicht aufgenommen werden. Obwohl die Suspension mit

einem Magnetrührer permanent gemischt wurde, stellte sich erst kurze Zeit nach dem Pipettiervorgang eine homogene Konzentration in der Küvette ein.

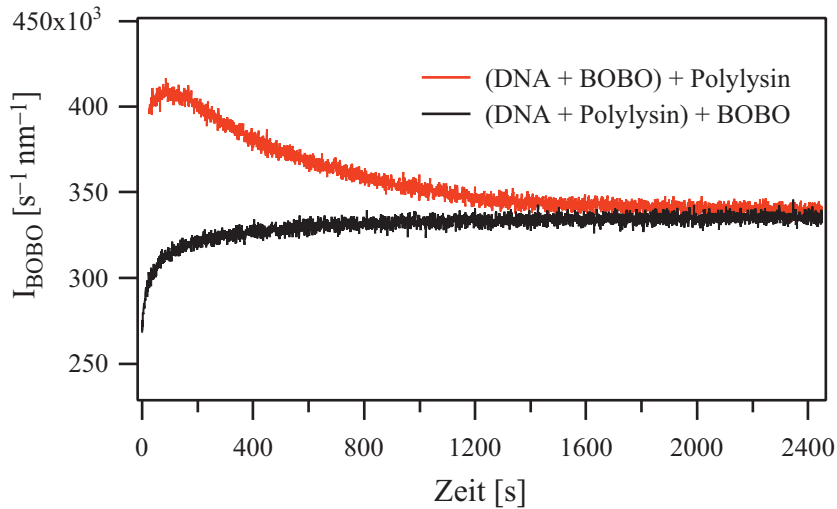


Abb. 5.11: Fluoreszenzsignal von BOBO als Funktion der Zeit. Der Fluorophor wurde vor und nach der Kondensation der DNA mit Polylysin zugegeben.

Der Fluorophor kann also auch nach der Kondensation in die DNA interkalieren. Ein weiteres Experiment soll demonstrieren, daß es zu keiner bedeutenden Verdrängung aus dem Komplex gekommen ist. Hätte eine Verdrängung aus den DNA/Polylysin-Komplexen stattgefunden, dann würde ungebundenes BOBO in der Lösung diffundieren. Die Komplexe lassen sich jedoch im Unterschied zum ungebundenen BOBO-Molekül durch Ultrazentrifugation von der Lösung abtrennen. Aus diesem Grund wurde im Spektrometer die Fluoreszenz des Überstandes bestimmt. Der gemessene Wert lag ca. 300-fach unterhalb der Intensität von fluoreszenzmarkierter freier DNA. Für den Fall, daß es sich bei dem gemessenen Fluoreszenzsignal um ungebundenes BOBO handelt, hätte sich bei der Zugabe von unmarkierter DNA die Intensität hundertfach erhöhen müssen. Das Fluoreszenzsignal hatte jedoch nur um den Faktor 1.9 zugenommen. Dies würde einer Verdrängung von nur ca. 0.7% des interkalierten Fluorophors bei der Kondensation entsprechen.

Fluoreszenzkugeln:

Die Fluoreszenzkugeln wurden als ein Referenzstandard eingesetzt, um alle Experimente über einen längeren Zeitraum miteinander vergleichen zu können. Darüber hinaus sind sie zur Optimierung der Einstellungen des Mikroskops und der CCD-Kamera hilfreich. Die Fluoreszenzkugeln bestehen in der Regel aus Latex und sind mit einer definierten Zahl von Fluorophoren versetzt. Außerdem zeichnen sie sich dadurch aus, daß sie bei intensiver Beleuchtung des Präparates durch die Quecksilber-Dampflampe kaum ausbleichen. Die Fluoreszenzkugeln sind kommerziell in unterschiedlichen Größen und Intensitäten für verschiedene Spektralbereiche erhältlich (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Im konkreten Fall wurden carboxylierte Latex-Kugeln mit einem Emissionsmaximum bei 515 nm, einem Durchmesser von 500 nm und einem Fluoreszenz-Äquivalent von $2 \cdot 10^6$ FITC-Einheiten verwendet (Abb. 5.12).

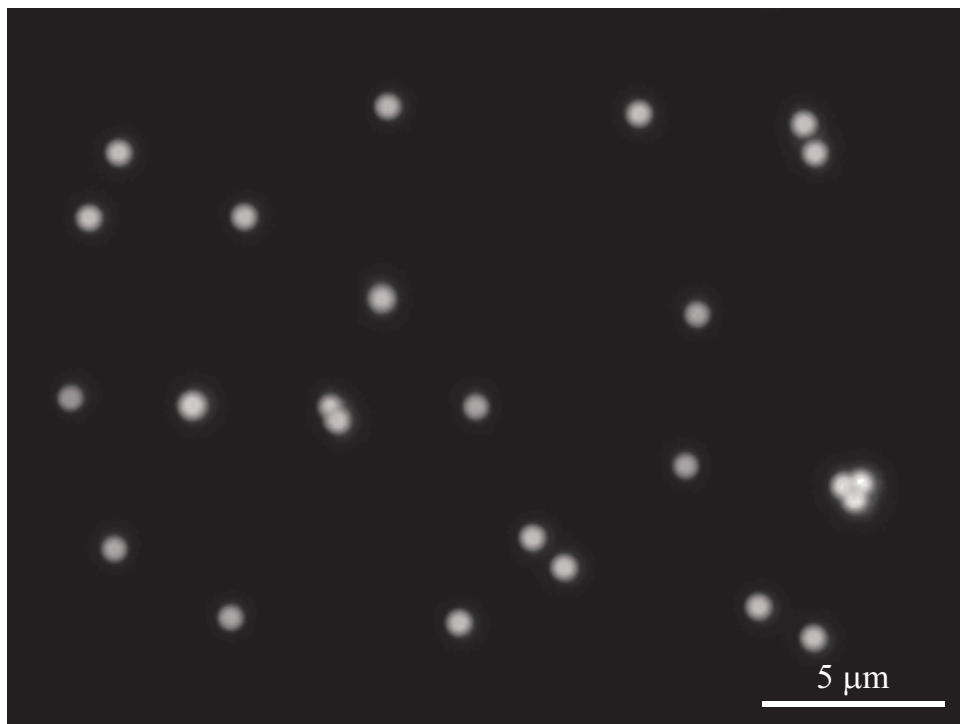


Abb. 5.12: Fluoreszenzkugeln aus Latex mit einem Durchmesser von 500 nm und einem Fluoreszenz-Äquivalent von $2 \cdot 10^6$ FITC-Einheiten auf einer Glasoberfläche. Sie dienen als Referenzstandard, um verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können.

Im folgenden wurden bei der Analyse der Bildsequenzen die gesamte Fluoreszenzintensität für jedes Segment $\sum_{\text{Segment}} I(x, y)$ bestimmt. Es werden dabei alle Fluoreszenzkugeln, die einen zu geringeren Abstand voneinander haben, von der digitalen Bildverarbeitung als ein Objekt angesehen. Das Balkendiagramm in Abb. 5.13 gibt die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Intensität pro Segment wieder.

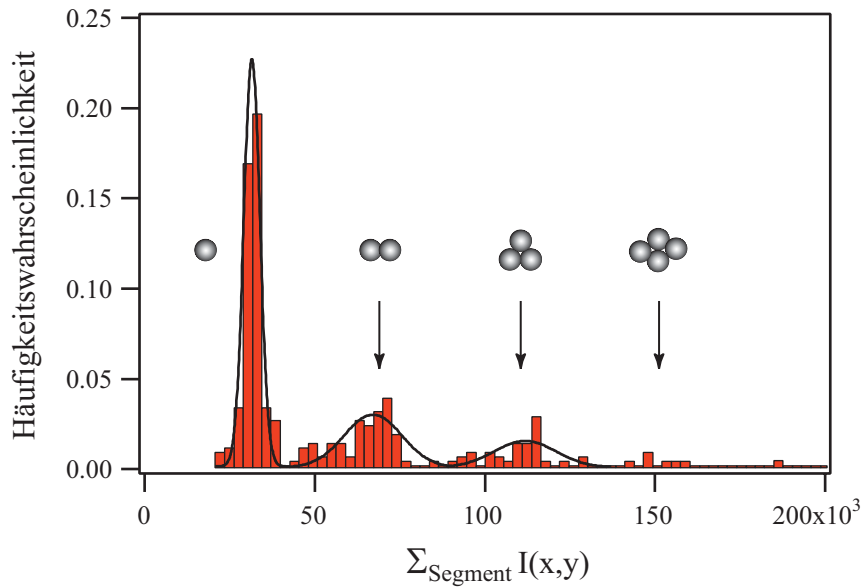


Abb. 5.13: Intensitätsverteilung von Fluoreszenzkugeln. Es ist die normierte Häufigkeitsverteilung als Funktion der Intensität pro Segment dargestellt. Die Maxima entsprechen der Intensität von einzelnen Fluoreszenzkugeln und Konglomeraten aus mehreren Kugeln.

Das höchste Maximum im Diagramm von Abb. 5.13 korrespondiert mit der mittleren Intensität einzelner Fluoreszenzkugeln. Die weiteren Maxima repräsentieren Konglomerate aus zwei, drei und mehr Kugeln, da die mittlere Intensität der entsprechenden Segmente ganzzahlige Vielfache voneinander sind.

Plasmide:

Ein wichtiges Ziel in dieser Arbeit war die Bestimmung der Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität von TOTO-markierten Plasmiden (pEGFP) mit einem Verhältnis bp/TOTO von 10:1 gemessen. Zur Abbildung der Plasmide mit dem Mikroskop war ihre Adhäsion auf einer negativen geladenen Glasoberfläche notwendig. Dies konnte durch eine Beschichtung der gereinigten Deckgläser⁴⁶ mit BSA⁴⁷ oder anderen Substanzen erreicht werden. Im folgenden wurde die Lösung mit den fluoreszenzmarkierten Plasmiden zugegeben und für 5 min inkubiert. Nach der Adhäsion erfolgte das Spülen (5×) der Kammer, um nicht gebundene Plasmide zu entfernen, die einen negativen Effekt auf die Qualität der Fluoreszenzbilder haben können. Abb. 5.14 zeigt ein Fluoreszenzbild von Plasmiden auf einer Glasoberfläche.

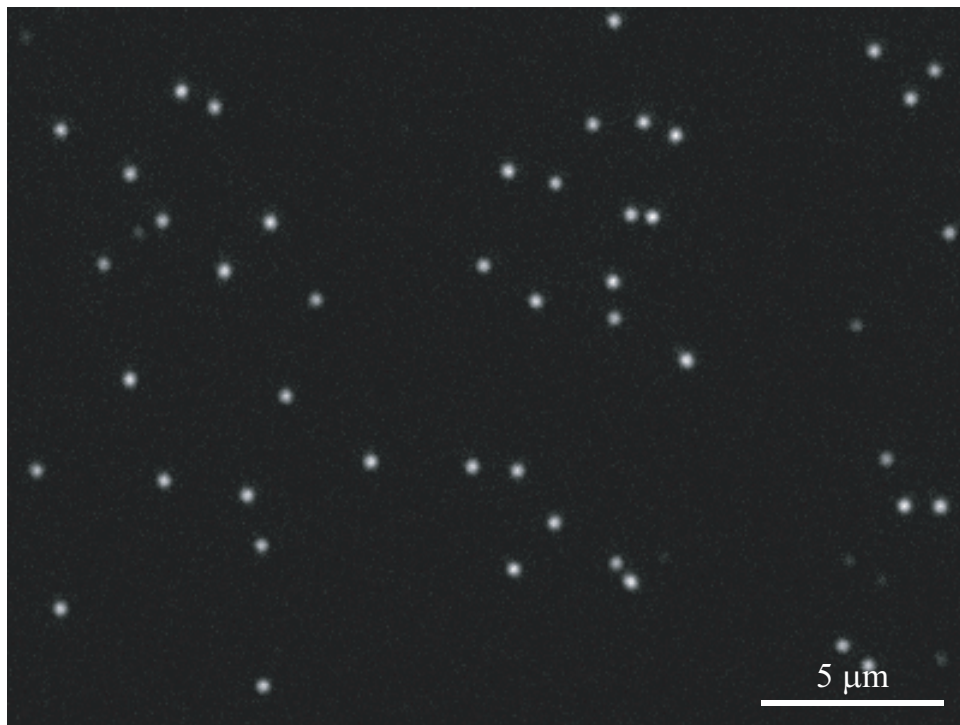


Abb. 5.14: Fluoreszenzmarkierte Plasmide mit dem Verhältnis bp/TOTO von 10:1 auf einer BSA-beschichteten Glasoberfläche.

In Abb. 5.14 ist zu erkennen, daß die einzelnen Plasmide eine annähernd konstante Fluoreszenzintensität haben. Mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung war es möglich, eine große Zahl von Segmenten (>5000) auszuwerten. Die Analyse der Intensitätsverteilung

⁴⁶ Die Deckgläser werden in 2%-Hellmanex-Lösung (Hellma, Mühlheim) für 20 min in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend gründlich (10×) mit deionisiertem Wasser gespült. Nach mindestens einer Wiederholung dieser Prozedur können die Deckgläser in den Trockenschrank gestellt werden.

⁴⁷ BSA (engl.): *bovine serum albumine*. Im Deutschen auch als Rinderserum bezeichnet.

von umfangreichen Bildsequenzen ist ein entscheidendes Kriterium für eine zuverlässige Statistik. In Abb. 5.15 ist die normierte Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität pro Segment mit der numerischen Anpassung von zwei Gaußschen Funktionen an die beiden Maxima dargestellt.

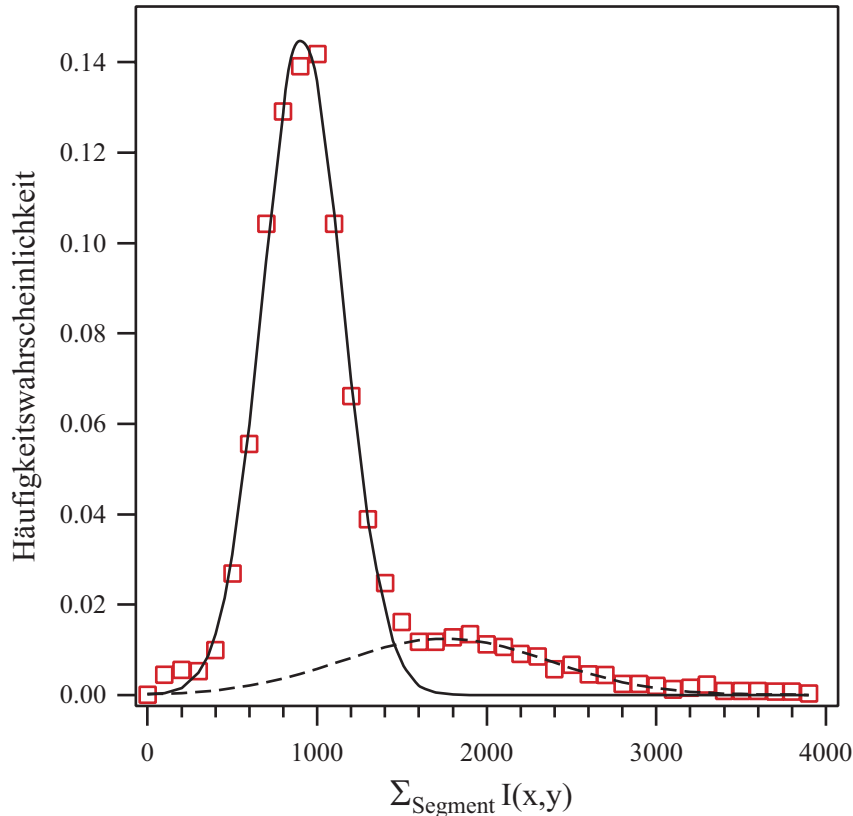


Abb. 5.15: Intensitätsverteilung von TOTO-markierten Plasmiden. Es ist die normierte Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität pro Segment dargestellt. Die beiden Maxima entsprechen der mittleren Intensität eines einzelnen Plasmides bzw. eines Konglomerates aus zwei Plasmiden.

Die beiden Maxima korrespondieren zur mittleren Fluoreszenzintensität eines einzelnen Plasmides bzw. eines Konglomerates aus zwei Plasmiden, die von der digitalen Bildverarbeitung nicht als separate Objekte unterschieden werden können. Für die mittlere Fluoreszenzintensität eines einzelnen Plasmids $\langle \sum_{\text{Plasmid}} I(x,y) \rangle$ konnte aus der numerischen Anpassung einer Gaußschen Funktion ein Zahlenwert von ca. 912 [a. u.] ermittelt werden. Des weiteren ergab sich für zwei Plasmide eine mittlere Intensität von ca. 1809 [a. u.], was in erster Näherung dem doppelten Wert entspricht. In diesem Fall ist die Häufigkeitswahrscheinlichkeit jedoch zehnfach kleiner als die von einzelnen Plasmiden. Konglomerate mit einer größeren Zahl von Plasmiden sind prinzipiell möglich, kommen aber nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit vor. Aus der Abb. 5.15 folgt, daß mit der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie die Intensität von einzelnen Plasmiden bestimmt werden kann.

DNA/Polylysin-Komplexe:

Die Kondensation der fluoreszenzmarkierten DNA (bp/TOTO = 10:1) mit Polylysin erfolgte immer in deionisierten wässrigen Lösungen bei hohen Verdünnungen. Nach 20 min wurden dann die experimentellen Pufferbedingungen (100 mM NaCl, 10 mM HEPES und 2 mM Ascorbinsäure) eingestellt und nach einer weiteren Inkubation von 10 min mit der Messung begonnen. Die Abbildung der DNA/Polylysin-Komplexe mit dem Fluoreszenzmikroskop erforderte dabei eine mindestens 10000-fache Verdünnung der Suspension. In den folgenden Experimenten wurden DNA/Polylysin-Komplexe mit zweifacher positiver Überschlußladung ($n_+ = 2 n_-$) untersucht. Auf Grund der elektrostatischen Anziehung zwischen den Komplexen und der Glasoberfläche war eine Beschichtung des Deckglases in diesem Fall nicht erforderlich. Die ungebundenen DNA/Polylysin-Komplexe ließen sich durch wiederholtes Spülen der Kammer entfernen. Abb. 5.16 zeigt ein Fluoreszenzbild von DNA/Polylysin-Komplexen auf einer Glasoberfläche. Die Messungen erfolgten mit den gleichen Einstellungen am Mikroskop und der CCD-Kamera wie im Fall der Plasmide.

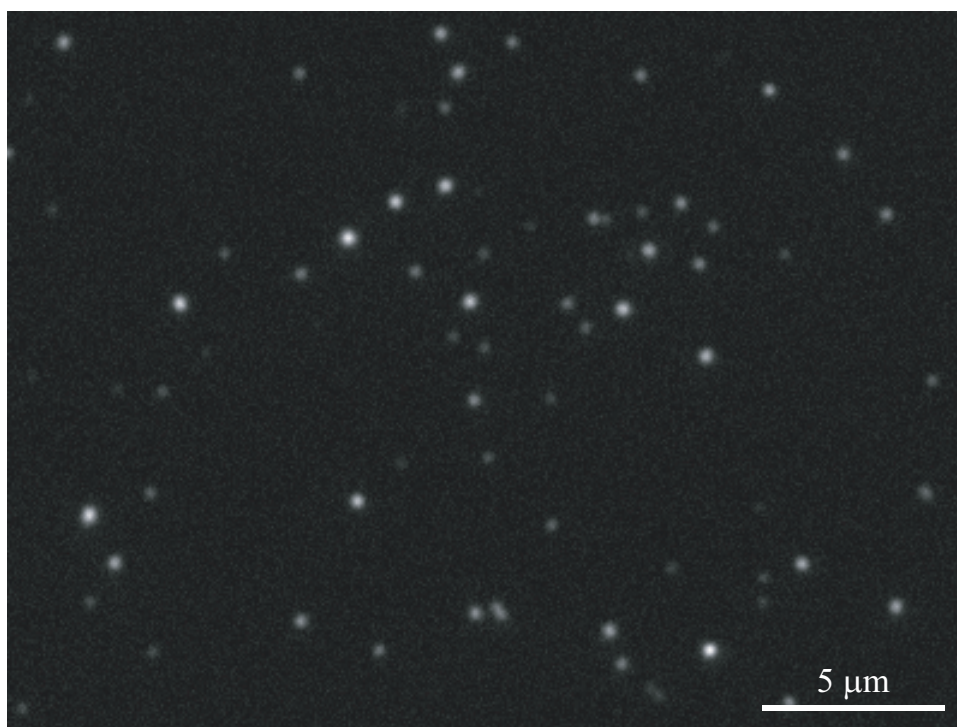


Abb. 5.16: Fluoreszenzmarkierte DNA/Polylysin-Komplexe mit dem Ladungsverhältnis $n_+ = 2 n_-$ auf einer Glasoberfläche.

In Abb. 5.16 sind deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der DNA/Polylysin-Komplexe zu erkennen, was auf eine hohe Polydispersität des kolloidalen Systems hindeutet. Die Fluoreszenzbilder lassen sich jedoch nicht direkt mit denen der Plasmide vergleichen, da die Intensität von der Fluoreszenzlöschung bei der Kondensation und der

Skalierung bei der Darstellung des Bildes abhängt. Der Begriff der Skalierung beschreibt dabei die Tatsache, daß die DNA/Polylysin-Komplexe von der CCD-Kamera mit einer Auflösung von 12 Bit (4096 Graustufen) abgebildet werden, bei der Darstellung auf dem Monitor bzw. beim Druck auf Papier nur 8 Bit (256 Graustufen) zur Verfügung stehen. Die Intensitätsanalyse der Daten mit dem Computer erfolgte jedoch ausschließlich mit dem gesamten dynamischen Bereich der CCD-Kamera.

Des weiteren wurde der Effekt von Lungen-Surfactant (Alveofact) auf die Größenverteilung von DNA/Polylysin-Komplexen untersucht. Dazu wurde den Komplexen nach der kolloidalen Aggregation in deionisiertem Wasser eine beschallte Suspension aus Alveofact der Konzentration $c = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und 2 mM Ascorbinsäure zugegeben. Nach dem Einwirken des Surfactants für 10 min erfolgte eine ca. 10000-fache Verdünnung der Suspension mit dem im Experiment verwendeten Puffer. In Abb. 5.17 ist ein Fluoreszenzbild von DNA/Polylysin-Komplexen auf der Oberfläche nach der Inkubation mit Alveofact dargestellt.

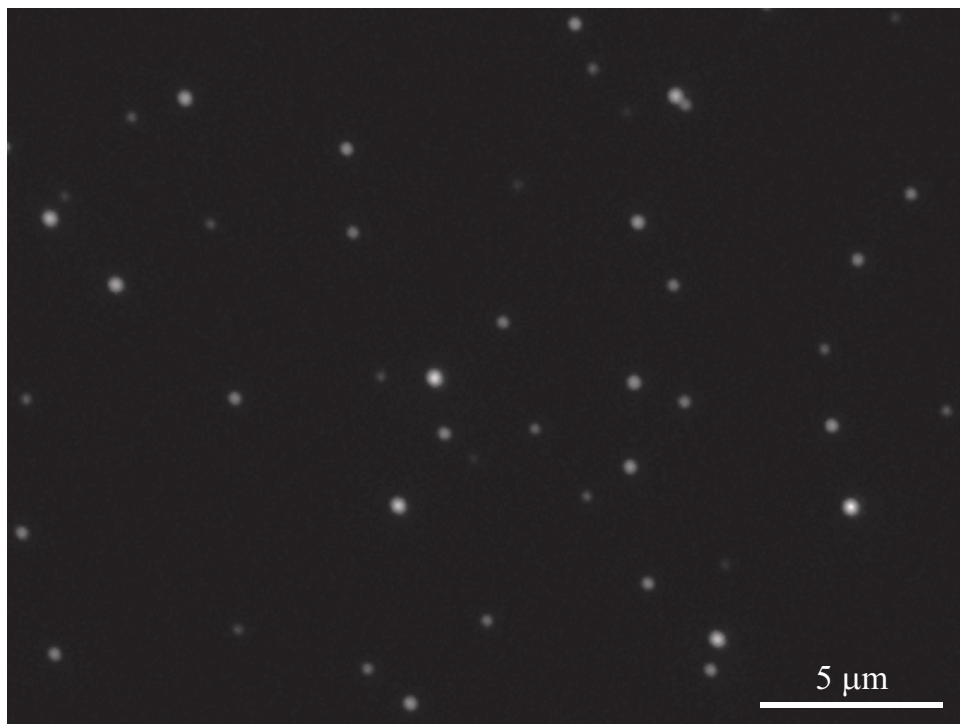


Abb. 5.17: Fluoreszenzmarkierte DNA/Polylysin-Komplexe ($n_+ = 2 n_-$) auf einer Glasoberfläche nach der Einwirkung von Alveofact mit der Konzentration $c = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Im Unterschied zu Abb. 5.16 ist die Zahl der adhärenierten DNA/Polylysin-Komplexe auf der Oberfläche deutlich geringer, obwohl in beiden Fällen die Präparation bis auf die Zugabe von Alveofact identisch war. Diese Tatsache konnte bei vielen Bildsequenzen beobachtet werden. Das Lungen-Surfactant hat vermutlich die Oberflächenbeschaffenheit und damit das Adhäsionsverhalten der DNA/Polylysin-Komplexe verändert. Des weiteren

ist zu erkennen, daß sich die Größenverteilung durch eine geringere Polydispersität auszeichnet. Eine genauere Analyse der Intensitätsverteilung auf den Fluoreszenzbildern mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung bestätigte diese ersten Vermutungen. Dazu wurde aus der Fluoreszenzintensität der Segmente die entsprechende Zahl der Plasmide pro Komplex mit der folgenden Formel berechnet:

$$n = \frac{\alpha \cdot \sum_{\text{Komplex}} I(x, y)}{\langle \sum_{\text{Plasmid}} I(x, y) \rangle} \quad (5.13)$$

Hierbei bezeichnen α die Fluoreszenzlöschung durch die Kondensation, $\langle \sum_{\text{Plasmid}} I(x, y) \rangle$ die mittlere Intensität eines Plasmids und $\sum_{\text{Komplex}} I(x, y)$ die Fluoreszenzintensität eines Komplexes. Für die mittlere Intensität eines Plasmids konnte nach Abb. 5.15 ein Wert von 912 [a. u.] bestimmt werden. Die ermittelten Werte für die Variable n wurden in Form eines Histogramms mit einer Häufigkeitsverteilung $h(n)$ dargestellt und die Wahrscheinlichkeitsdichte mit der Formel $\rho(n) = h(n)/N$ berechnet. Der Parameter N bezeichnet dabei die gesamte Zahl der analysierten Segmente und war in den Experimenten immer größer als 5000. In Abb. 5.18 ist die Größenverteilung der DNA/Polylysin-Komplexe mit und ohne die Einwirkung von Alveofact dargestellt.

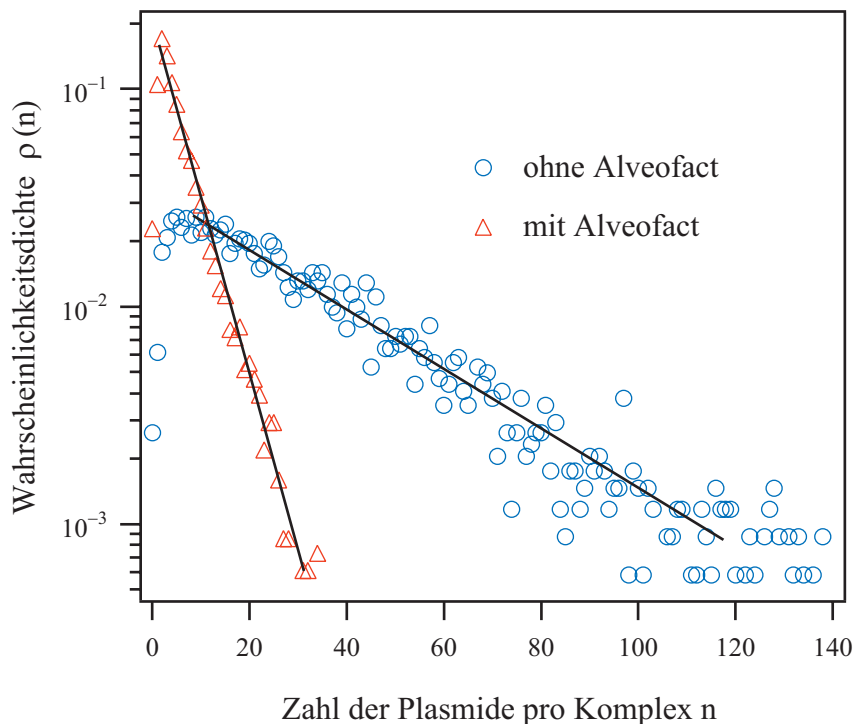


Abb. 5.18: Größenverteilung der DNA/Polylysin-Komplexe mit und ohne die Einwirkung von Alveofact. Es ist die Wahrscheinlichkeitsdichte $\rho(n)$ als Funktion der Zahl der Plasmide pro Komplex dargestellt.

Nach Abb. 5.18 hat Alveofact einen bedeutenden Einfluß auf die Größenverteilung von DNA/Polylysin-Komplexen, die nach der Inkubation mit Surfactant eine deutlich kleinere Polydispersität besitzen. Für die mittlere Größe der Gentransfer-Komplexe mit und ohne die Einwirkung von Alveofact ergaben sich Werte von $\langle n \rangle_{\text{Alveo}} = 6.3$ bzw. $\langle n \rangle = 35.3$. Die beiden Größenverteilungen beschreiben Exponentialfunktionen, die in der logarithmischen Darstellung den Geraden mit der Steigung $m_{\text{Alveo}} = -0.232$ und $m = -0.027$ entsprechen. Im folgenden wurde die Skalenfunktion der Größenverteilungen nach Gl. 5.12 berechnet. Die Variable X_n ist durch den Quotienten aus der Häufigkeitsverteilung der Komplexe $h(n)$ und der gesamten Zahl aller Plasmide $n_0 = \sum_{n=1}^{\infty} n \cdot h(n)$ gegeben. In Abb. 5.19 sind die Skalenfunktionen $\Phi_A(x)$ und $\Phi(x)$ der kolloidalen Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen mit bzw. ohne die Einwirkung von Alveofact dargestellt.

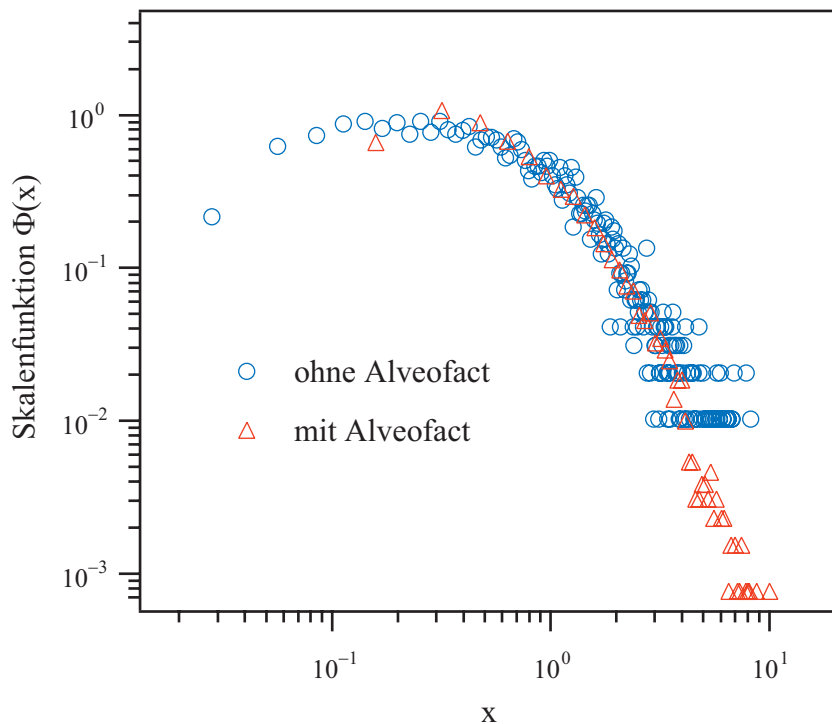


Abb. 5.19: Skalenfunktion der kolloidalen Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen mit und ohne die Einwirkung von Alveofact. Die beiden Funktionen sind koinzident und haben die Form einer Glockenkurve mit einem Maximum bei $x \approx 0.2$.

Die beiden Skalenfunktionen haben in der log-log-Darstellung die Form einer Glockenkurve mit einem Maximum bei $x \approx 0.2$ und zeigen dynamisches Skalenverhalten. Nach den Erläuterungen von Kap. 5.5 folgt daraus, daß es sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen bei der kolloidalen Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen um einen diffusionslimitierten Prozeß (DLA) handelt. Die Koinzidenz der Skalenfunktionen $\Phi_A(x)$ und $\Phi(x)$ deutet darauf hin, daß die beiden Größenverteilungen in Abb. 5.18 zwei verschiedene Entwicklungsstadien der kolloidalen Aggregation darstellen. Im vorliegenden Fall wurden die Größenverteilungen jedoch zu einem definierten Zeitpunkt nach Beginn

der Aggregation bestimmt. Aus diesem Grund hat vermutlich das Surfactant einen verlangsamenden Effekt auf die kolloidale Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen. Eine Erklärung für dieses Verhalten wäre eine Beschichtung der Komplexe mit Surfactant. Die anionische Lipidmembran und die speziellen Surfactant-Proteine könnten auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen oder sterischen Effekten die kolloidale Aggregation zwischen den Komplexen verhindern.

Darüber hinaus wurde das Aggregationsverhalten der DNA/Polylysin-Komplexe mit einem sogenannten *ZETASIZER* (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) untersucht. Mit dem kommerziellen Apparat sind Messungen zur statischen und dynamischen Lichtstreuung an kolloidalen Systemen möglich. Im folgenden wurde die mittlere Größe der DNA/Polylysin-Komplexe während der kolloidalen Aggregation als Funktion der Zeit in deionisiertem Wasser und in 100 mM NaCl-Lösung⁴⁸ gemessen (Abb. 5.20). Die Kondensation der DNA mit Polylysin erfolgte dabei 20 min vor dem Experiment in deionisiertem Wasser. Der mittlere Durchmesser der Komplexe $\langle d_{\text{Komplex}} \rangle$ hat bei der Ionen-Konzentration von 100 mM schon nach 10 min deutlich zugenommen, während er im zweiten Fall annähernd konstant geblieben ist. Die kolloidale Aggregation der DNA/Polylysin-Komplexe wird also durch die Erhöhung der Ionen-Konzentration in der Lösung induziert.

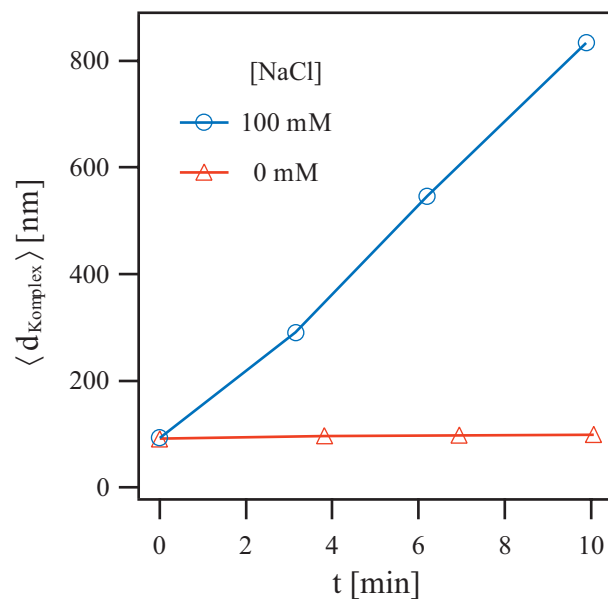


Abb. 5.20: Die Erhöhung der Ionen-Konzentration in der Lösung induziert die kolloidale Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen. Es ist der mittlere Durchmesser der Komplexe $\langle d_{\text{Komplex}} \rangle$ als Funktion der Zeit dargestellt.

Der Effekt von Surfactant auf die kolloidale Aggregation konnte mit dem *ZETASIZER* nicht untersucht werden, da bei den Experimenten eine starke Streuung der einfallenden

⁴⁸ Des weiteren wurde auch noch 10 mM HEPES zur Stabilisierung des pH-Wertes von 7.0 zugegeben.

Laserstrahlung an der Alveofact-Suspension aufgetreten ist. Es hat sich auch gezeigt, daß die statische Lichtstreuung keine geeignete Methode darstellt, um die Größenverteilung einer Suspension von Gentransfer-Komplexen mit hoher Polydispersität zu bestimmen. Ein weiterer Nachteil sind die hohen Konzentrationen der verwendeten Substanzen, die bei den Experimenten zur statischen Lichtstreuung eingesetzt werden müssen, um ein vernünftiges Meßsignal zu bekommen.

5.6.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer wurde zur Untersuchung der Packungsdichte und der inneren Stabilität von Gentransfer-Komplexen eingesetzt. Die Anwendung dieser Methode erfordert aber die Markierung der beiden Komponenten mit einem Donor bzw. einem Akzeptor. Im Fall der untersuchten DNA/Polylysin-Komplexe wurde die DNA mit dem interkalierenden Fluorophor BOBO und Polylysin durch die kovalente Bindung von FITC an die Seitenketten des Polymers markiert. Bei der Kondensation der DNA mit den kationischen Polymeren kommt es zu einer Annäherung von Donor und Akzeptor. Die Effizienz des Energietransfers nimmt bei der Kondensation drastisch zu, da die intermolekularen Abstände zwischen den Fluorophoren im Komplex unterhalb des Försterradius liegen. Alle Messungen zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 25 °C in einer wässrigen Lösung mit 10 mM HEPES (pH = 7.4). Es wurde in den Experimenten eine Quarzküvette (Hellma, Mühlheim) mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet.

Bestimmung des Försterradius:

Im folgenden wurde der Försterradius des Donor-Akzeptor-Paars FITC/BOBO mit Gl. 5.6 berechnet. Dies erforderte jedoch die experimentelle Bestimmung der Quantenausbeute des Donors und des Überlappungsintegrals der beiden Fluorophore. Nach der Kalibration des Spektrometers konnte die Quantenausbeute Φ_D von FITC-markiertem Polylysin relativ zu einem definierten Fluoreszenzstandard gemessen werden (Cantor, 1980). Es ergab sich für die Quantenausbeute ein Resultat von $\Phi_D = 0.34$, was mit den aus der Literatur bekannten Werten in erster Näherung übereinstimmt. Des weiteren wurde zur Berechnung des Überlappungsintegrals J mit Gl. 5.7 das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors gemessen. In Abb. 5.21 ist das normierte Emissionsspektrum $f_D(\lambda)$ von FITC und der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_A(\lambda)$ von BOBO multipliziert mit der vierten Potenz der Wellenlänge dargestellt. Die Integration über das Produkt der beiden Funktionen lieferte dabei einen Wert von $J = 4.26 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$. Der geometrische Orien-

tierungsfaktor der Dipolmomente folgt dagegen aus theoretischen Überlegungen⁴⁹. Sind die Richtungen der Dipolmomente von Donor und Akzeptor in den Komplexen statistisch verteilt, dann kann für den Orientierungsfaktor ein Wert von $\kappa^2 = 2/3$ angenommen werden. Die Berechnung des Försterradius mit der Formel $R_F = 9.79 \cdot 10^3 (J \kappa^2 \Phi_D n^{-4})^{1/6}$ (Fung, 1978) ergab ein Resultat von $R_F = 54 \text{ \AA}$. Für den Brechungsindex der verdünnten wässrigen Lösung mit den Gentransfer-Komplexen wurde ein Zahlenwert von $n = 1.33$ eingesetzt.

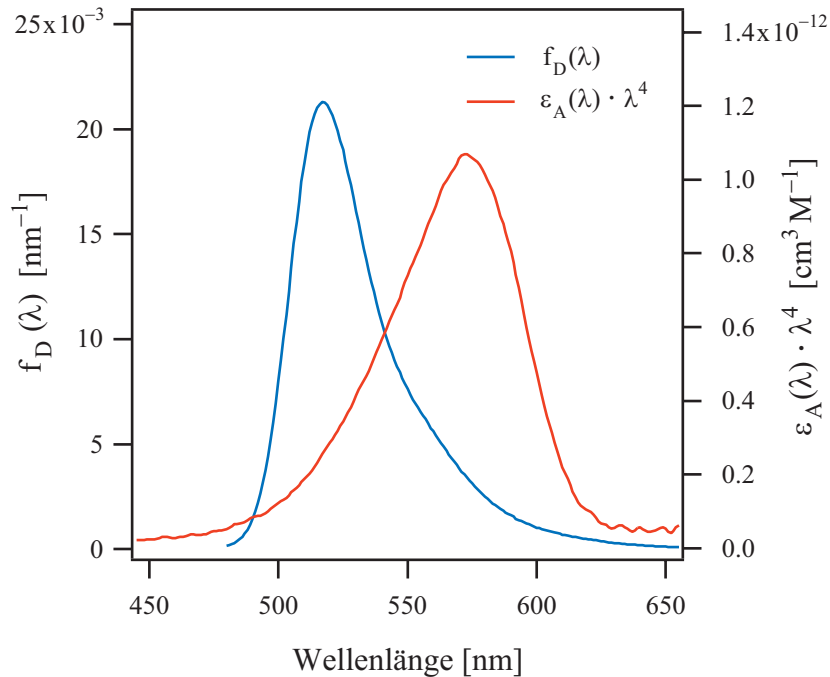


Abb. 5.21: Bestimmung des Überlappungsintegrals J für das Donor-Akzeptor-Paar von FITC und BOBO. Der Integrand ist durch das Produkt aus dem normierten Emissionsspektrum des Donors $f_D(\lambda)$ und dem Extinktionskoeffizienten des Akzeptors $\varepsilon_A(\lambda)$ multipliziert mit der vierten Potenz der Wellenlänge λ^4 gegeben.

⁴⁹ Die möglichen Werte für κ^2 liegen in einem Intervall von $[0, 4]$.

Formation von Komplexen:

Zur Untersuchung der Formation von DNA/Polylysin-Komplexen wurde Kalbs-Thymus-DNA sukzessive in eine FITC-markierte Polylysin-Lösung titriert und nach einer Wartezeit von 5 min ein Emissionsspektrum aufgenommen. Die Anregung des Donors erfolgte mit monochromatischer Strahlung der Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm. Während der Messung wurde die Lösung permanent mit einem Magnetrührer gemischt, um Konzentrationsgradienten in der Küvette bei der Titration der DNA zu verhindern. In Abb. 5.22 sind die Emissionskurven von FITC und BOBO als Funktion des Ladungsverhältnisses dargestellt. Die Emissionsmaxima von FITC und BOBO liegen bei einer Wellenlänge von 515 nm bzw. 605 nm. Im allgemeinen stellen die gemessenen Kurven eine Linearkombination aus dem Emissionsspektrum des Donors $I_D(\lambda)$ und Akzeptors $I_A(\lambda)$ dar. Für die Messungen zum Energietransfer wurde die DNA mit einem Verhältnis bp/BOBO von 20:1 markiert.

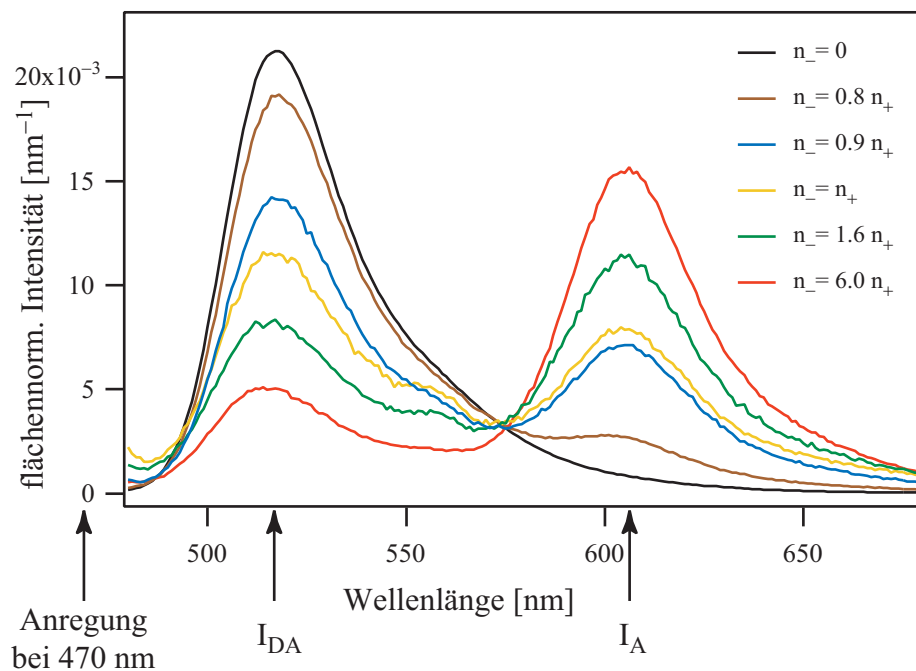


Abb. 5.22: Energietransfer bei der Formation von DNA/Polylysin-Komplexen. Es sind die flächennormierten Emissionskurven von FITC und BOBO für verschiedene Ladungsverhältnisse von DNA zu Polylysin (n_-/n_+) dargestellt.

Der Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren ist daran zu erkennen, daß mit der Titration von fluoreszenzmarkierter DNA die Donoremission I_{DA} abnimmt, während die Akzeptoremission I_A ansteigt. Alle Kurven wurden auf die entstehende Verdünnung der Lösung durch die Titration eines definierten Volumens korrigiert. In Abb. 5.23 sind die Emissionsmaxima von Donor und Akzeptor als Funktion des Ladungsverhältnisses wieder-

gegeben. Es bezeichnen I_{DA} bzw. I_D die emittierte Fluoreszenzintensität von FITC in An- und Abwesenheit von BOBO-markierter DNA.

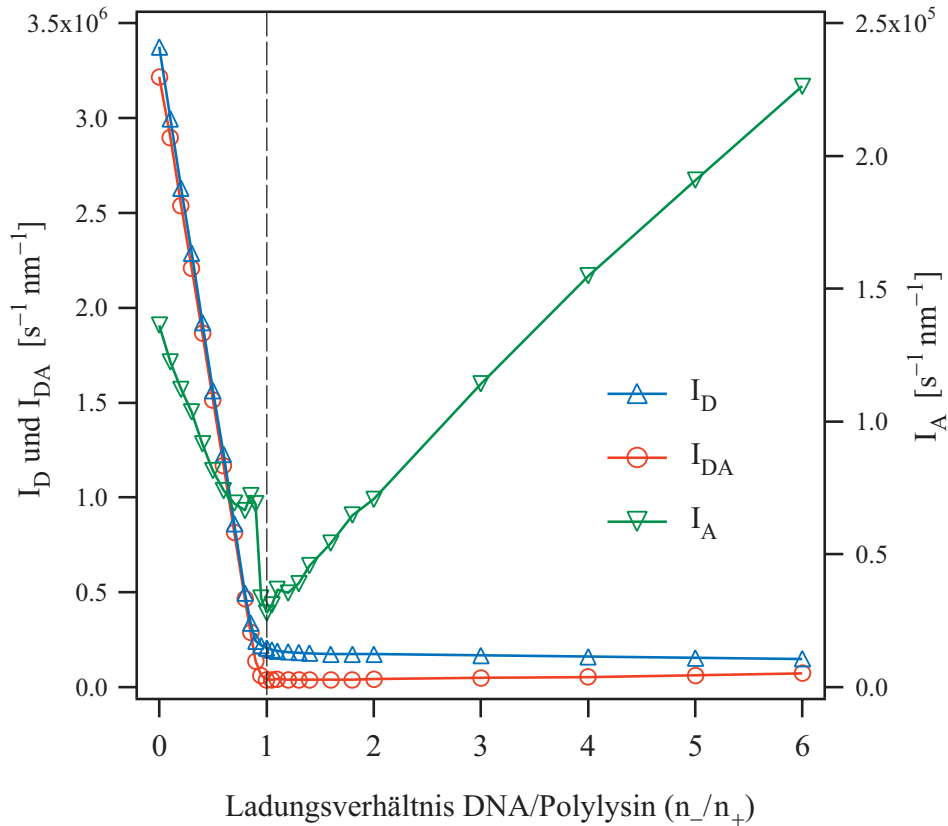


Abb. 5.23: Maximum der Emission von Donor und Akzeptor bei der Formation von DNA/Polylysin-Komplexen als Funktion des Ladungsverhältnisses.

Die Donoremission nimmt mit und ohne Akzeptor bis zum isoelektrischen Punkt linear ab und bleibt dann auch für hohe DNA-Konzentrationen annähernd konstant. Daraus folgt, daß die Formation der Komplexe am isoelektrischen Punkt nahezu abgeschlossen ist und bei einer weiteren Zugabe nur die Konzentration der ungebundenen DNA in der Lösung ansteigt. Unter diesen Bedingungen liegen in der Suspension neben den Komplexen auch ungebundene DNA vor (Koexistenz). Im Unterschied dazu ist die Fluoreszenzlöschung des Akzeptors durch die Kondensation weniger drastisch, zeigt jedoch vor dem isoelektrischen Punkt ein sprunghaftes Verhalten, das vermutlich auf Konformationsänderungen bei der Komplexbildung zurückzuführen ist. Bei einer weiteren Erhöhung des Ladungsverhältnisses steigt die emittierte Fluoreszenzintensität des Akzeptors linear an. Für die Zunahme von I_A nach dem isoelektrischen Punkt ist die direkte Anregung von ungebundener DNA bei 470 nm verantwortlich, da die Emission der DNA-Konzentration direkt proportional ist. Dies konnte durch unabhängige Messungen bestätigt werden. Wie in Kap. 5.3.1 beschrieben, kann aus der Donoremission I_D und I_{DA} der Energietransfer der DNA/Polylysin-Komplexe berechnet werden (Abb. 5.24).

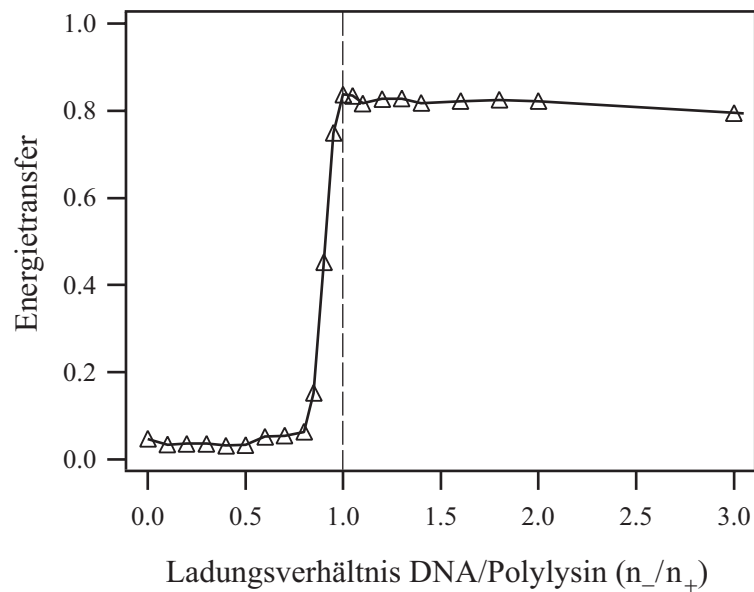


Abb. 5.24: Energietransfer bei der Formation von DNA/Polylysin-Komplexen als eine Funktion des Ladungsverhältnisses.

Der Energietransfer nimmt zu Beginn der Titration nur leicht zu und steigt am isoelektrischen Punkt sprunghaft an, bevor er für hohe Ladungsverhältnisse annähernd konstant bleibt. Es wurde jedoch ein linearer Anstieg des Energietransfers bis zum ladungsneutralen Punkt erwartet. Das Plateau am Beginn der Formation könnte dadurch erklärt werden, daß zuerst einzelne DNA-Stränge mit Polylysin kondensieren und sie erst am isoelektrischen Punkt zu größeren Komplexen aggregieren. Der Energietransfer würde dann hauptsächlich zwischen den kondensierten DNA-Strängen eines Komplexes stattfinden.

Natriumchlorid:

Im folgenden wurde die Stabilität von DNA/Polylysin-Komplexen unter dem Einfluß von NaCl-Ionen untersucht. Es wird eine Dissoziation der Komplexe durch die Abschirmung der Ladungen von DNA und Polylysin mit zunehmender Konzentration der monovalenten Ionen in der Lösung erwartet. In Abb. 5.25 ist die emittierte Fluoreszenz des Donors I_D von isoelektrischen DNA/Polylysin-Komplexen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration gezeigt.

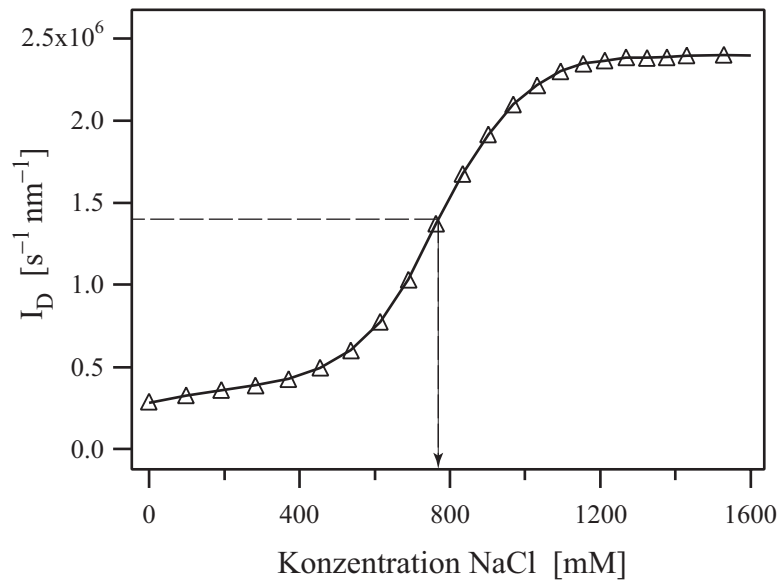


Abb. 5.25: Dekomposition von isoelektrischen DNA/Polylysin-Komplexen als Funktion der NaCl-Konzentration. Als Ordinate ist die Emission des Donors I_D bei Abwesenheit des Akzeptors aufgetragen.

Die Fluoreszenzlöschung des Donors ist bis zu physiologischen Ionen-Konzentrationen annähernd konstant, was einer hohen Packungsdichte der DNA/Polylysin-Komplexe entspricht. Erst bei Konzentrationen von 500 mM ist ein deutlicher Anstieg und bei 1000 mM der Übergang in ein Plateau zu erkennen. Die Erholung der Fluoreszenzintensität läßt auf die Dekomposition der Komplexe schließen. Für den Energietransfer wurde das gleiche Verhalten festgestellt (Abb. 5.26).

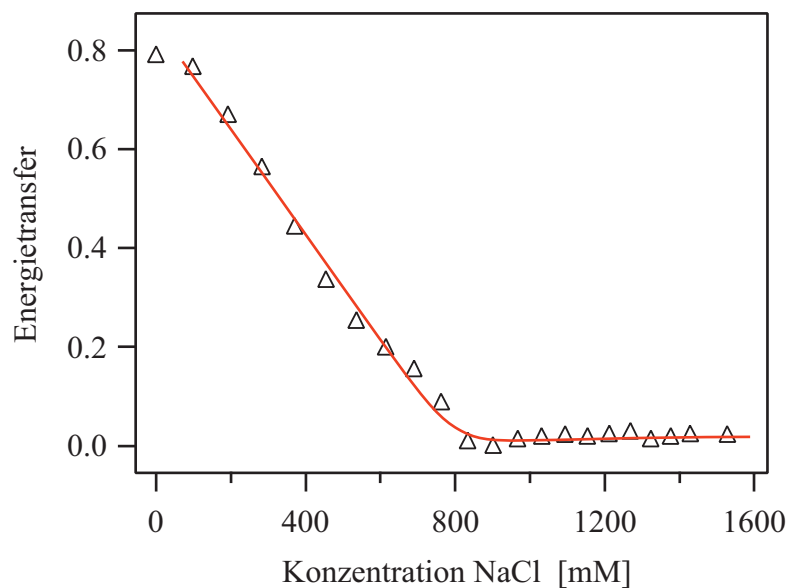


Abb. 5.26: Energietransfer von isoelektrischen DNA/Polylysin-Komplexen als Funktion der NaCl-Konzentration. Die Komplexe sind bei einer Konzentration von ca. 800 mM vollkommen dissoziiert.

Alveofact:

Die Messungen der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie haben ergeben, daß Surfactant eine große Rolle bei der kolloidalen Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen spielt. Im folgenden stellt sich die Frage, ob das Surfactant die Packungsdichte und damit die innere Struktur der Komplexe ändert. Aus diesem Grund wurde der Energietransfer von isoelektrischen DNA/Polylysin-Komplexen in Abhängigkeit von der Alveofact-Konzentration bestimmt. Es zeigte sich, daß der Energietransfer bis zu einer Konzentrationen von $c_{\text{Alveo}} = 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in erster Näherung konstant war (auf eine Darstellung dieser Kurve wird verzichtet). Die Messungen zur Bestimmung der Größenverteilung von DNA/Polylysin-Komplexen erfolgten mit einer 4-fach kleineren Konzentration von $c_{\text{Alveo}} = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Das Surfactant hat also keinen signifikanten Effekt auf die Packungsdichte der DNA/Polylysin-Komplexe.

Anionische Polymere:

Im folgenden wurden Messungen mit anionischen Polymeren durchgeführt, die eine hohe Affinität zur DNA haben und Komplexe dissoziieren können. Dies ist auch für die Gentherapie relevant, da die Gentransfer-Komplexe auf ihrem Weg zu den betroffenen Zellen dem Komplementsystem im Blutstrom und den extrazellulären Matrixproteinen ausgesetzt sind, die sie deaktivieren können. Von besonderem Interesse ist dabei die Substanz Heparin, die als negativ geladenes Polysaccharid für seine Eigenschaften als Antikoagulant bekannt ist und den blutgerinnungshemmenden Faktor Antithrombin III stimuliert (Mulloy, 1996).

In Abb. 5.27 ist die Dekomposition von isoelektrischen DNA/Polylysin-Komplexen als Funktion der Heparin-Konzentration dargestellt. Der Energietransfer nimmt zunächst kontinuierlich ab und erreicht für mittlere Konzentrationen ein erstes Plateau, bevor er schnell auf einen Wert von ca. 0.1 abfällt. Bei einer Konzentration von $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ waren die Komplexe größtenteils dissoziiert. Der stufenförmige Verlauf der Funktion wurde nicht weiter untersucht, ist aber vermutlich auf Konformationsänderungen in den DNA/Polylysin-Komplexen zurückzuführen.

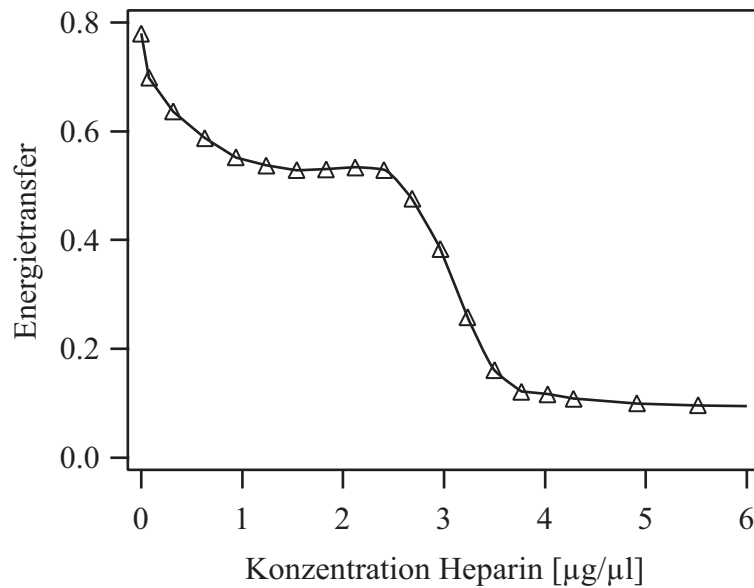


Abb. 5.27: Dekomposition von isoelektrischen DNA/Polylysine-Komplexen als eine Funktion der Heparin-Konzentration.

Dextran-Sulfat ist ein weiteres interessantes Beispiel für ein anionisches Polymer, da es sich um ein Polysaccharid handelt, das eine höhere negative lineare Ladungsdichte als die DNA besitzt. In Abb. 5.28 ist der Energietransfer von isoelektrischen DNA/Polylysine-Komplexen in Abhängigkeit von der Dextran-Sulfat-Konzentration gezeigt.

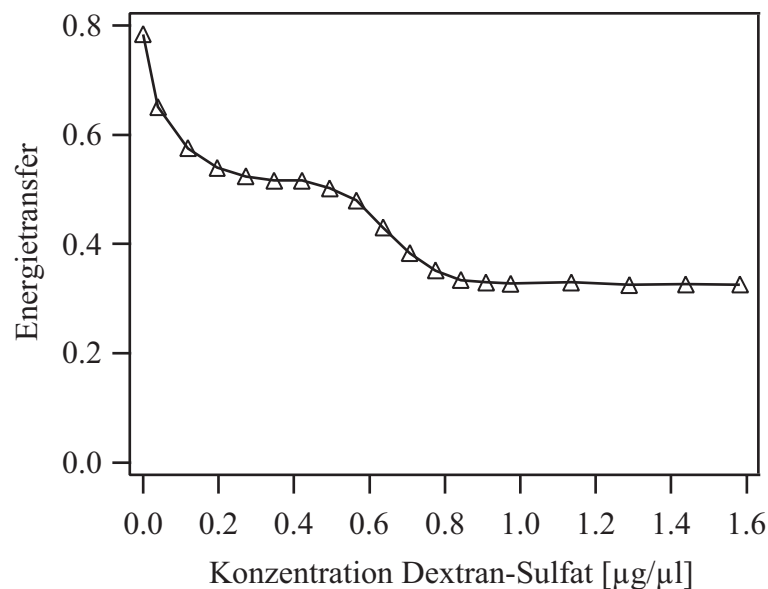


Abb. 5.28: Energietransfer von isoelektrischen DNA/Polylysine-Komplexen in Abhängigkeit von der Dextran-Sulfat-Konzentration.

Es sind deutliche Parallelen zum Verhalten von Heparin in Abb. 5.27 zu erkennen, jedoch dissoziiert Dextran-Sulfat die DNA/Polylysine-Komplexe nicht vollständig.

5.7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Effekt von Alveofact auf die Größenverteilung von DNA/Polylysin-Komplexen beobachtet. So hatte die Größenverteilung nach der Inkubation mit Surfactant im Vergleich zur Referenz eine deutlich kleinere Polydispersität. Eine Dissoziation der Komplexe durch Alveofact konnte mit den Messungen zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer jedoch ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten Transfektionsexperimente an pulmonalen Epithelzellen, daß Alveofact den Gentransfer mit polymerbasierten Komplexen nicht inhibiert (Ernst, 1999). Es wurde auch bei Filmwaagemessungen keine Fusion von DNA/Polylysin-Komplexen mit einer anionischen Monoschicht beobachtet (Rusu, 1999).

Aus den Untersuchungen des Aggregationsverhaltens folgte, daß die Größenverteilung der Komplexe mit und ohne Einwirkung von Alveofact zwei verschiedenen Entwicklungsstadien der kolloidalen Aggregation entsprechen. Im vorliegenden Fall wurden die Größenverteilungen jedoch zu einem definierten Zeitpunkt nach Beginn der Aggregation bestimmt. Aus diesem Grund hat vermutlich das Surfactant einen verlangsamenden Effekt auf die Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen. Erste Experimente mit der Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie⁵⁰ bestätigten diese Annahme. Darüber hinaus zeigten sie, daß die Einwirkung von Alveofact zu einer drastischen Verlangsamung der Aggregation führt und deshalb von einer zeitlich stabilen kolloidalen Suspension gesprochen werden kann (persönliche Mitteilung von L. Rusu, MPI für Polymerforschung, Mainz). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist die Beschichtung der Komplexe mit Lungen-Surfactant. Die anionische Lipidmembran mit den speziellen Surfactant-Proteinen könnte auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen oder sterischen Effekten die kolloidale Aggregation zwischen den Komplexen hemmen. Der Vorteil einer Beschichtung der Gentransfer-Komplexe mit einem natürlichen Surfactant würde eine Inaktivierung durch das Immunsystem des Organismus verhindern, also die Zytotoxizität reduzieren und vor einer Dissoziation durch extrazelluläre Matrix-Proteine schützen. Des weiteren stellen die beschichteten Komplexe eine zeitlich stabile monodisperse Suspension dar, was für eine klinische Anwendung relevant ist. Gentransfer-Komplexe mit einer anionischen Lipidmembranbeschichtung zeichnen sich im allgemeinen durch eine höhere Transfektionseffizienz und Biokompatibilität aus (Lee, 1996).

Anhand dieser Resultate wurde folgendes Modell der kolloidalen Aggregation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen entwickelt:

⁵⁰ Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist detailliert beschrieben in (Elson, 1974) und (Rigler, 1979).

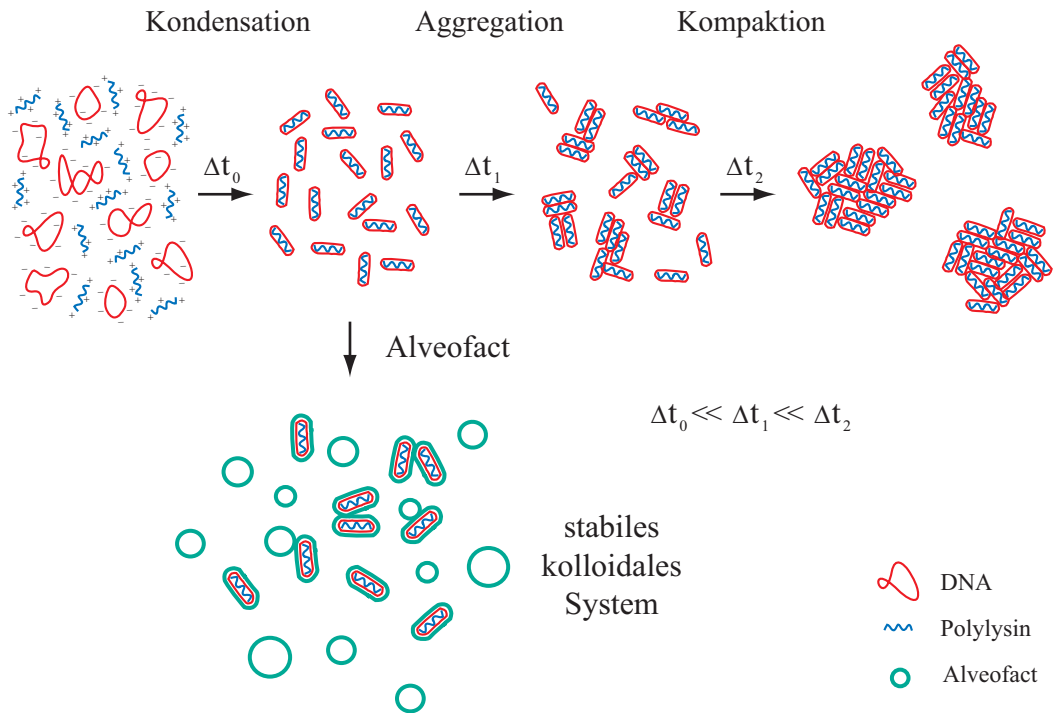


Abb. 5.29: Modell der kolloidalen Aggregation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen.

In diesem Modell wird die Formation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen als ein mehrstufiger Prozeß interpretiert, der auf Kondensation, Aggregation und Kompaktion basiert. Es bilden sich in einem Zeitintervall Δt_0 durch Kondensation der DNA mit kationischen Polymeren kleine monodisperse Einheiten. Auf Grund der elektrostatischen Anziehung der verschiedenen Komponenten läuft die Kondensation sehr schnell ab. Die kolloidale Aggregation beginnt in der Regel mit einer Suspension aus monodispersen Teilchen. Die Kinetik der Aggregation ist hauptsächlich durch die Ionen-Konzentration in der Lösung und das Oberflächenpotential der Komplexe bestimmt (Israelachvili, 1985). Dabei induziert eine Erhöhung der Ionen-Konzentration die kolloidale Aggregation. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen handelte es sich bei der Aggregation von DNA/Polylysin-Komplexen um einen diffusionslimitierten Prozeß (DLA). Es entstehen mit der Zeit (Δt_1) kleinere Komplexe, die durch Brownsche Bewegung in der Lösung diffundieren und bei Kollision größere Komplexe bilden. Über einen längeren Zeitraum (Δt_2) fusionieren die Aggregate zu noch größeren Komplexen. Dieser Prozeß wird als Kompaktion bezeichnet und ist erst dann abgeschlossen, wenn ein sogenanntes "Superaggregat" entstanden ist. Die Zugabe von Alveofact führt zu einer Beschichtung der polymerbasierten Gentransfer-Komplexe und beendet praktisch die kolloidale Aggregation.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, daß die quantitative Fluoreszenzmikroskopie und der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer eine systematische Untersuchung der physikalischen Aspekte der Aggregation, der Größenverteilung und der Packungsdichte von Gentransfer-Komplexen ermöglichen. Die quantitative Fluoreszenzmikroskopie ist dabei eine geeignete Methode, um Größen- und Intensitätsverteilungen zu bestimmen und

daraus die Zahl der Plasmide pro Komplex zu berechnen. Es lassen sich im allgemeinen Suspensionen im pikomolaren Bereich unter physiologischen Bedingungen untersuchen. Mit dem Energietransfer können Informationen über die Packungsdichte und die innere Stabilität von Gentransfer-Komplexen gewonnen werden.

Im Rahmen dieses Projektes sollen auch noch andere Gentransfer-Vektoren (z. B. PEI und Dendrimere) mit den beiden beschriebenen Methoden charakterisiert werden. Des weiteren muß jedoch noch der Frage nachgegangen werden, wie intakt die Beschichtung der Komplexe ist. Dies stellt einen wichtigen Faktor dar, um eine Inaktivierung durch verschiedene Substanzen zu verhindern. Im nächsten Schritt sollen Rezeptoren in die anionische Membran integriert werden, die selektiv auf spezielle Zellen ansprechen (Spezifität). Die Genvektoren werden über den Prozeß der Endozytose von Zellen aufgenommen und vom Endosom ins Zytosol freigesetzt. Die Zugabe von endosomolytischen Proteinen bei der Kondensation der Komplexe stimuliert dabei die Freisetzung in das Zytosol. Eine weitere Barriere der Transfektion ist der Transport der freien DNA vom Zytosol in den Nukleus der Zelle. Um diesen Prozeß effizienter zu gestalten, kann dem DNA-Komplex auch noch ein sogenannter NLS⁵¹-Faktor zugegeben werden. Mit diesen modifizierten synthetischen Gentransfer-Vektoren sollte sich die Transfektionseffizienz deutlich erhöhen lassen.

Die quantitative Fluoreszenzmikroskopie kann auch zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von Gentransfer-Vektoren eingesetzt werden. Dazu wird die Reporter-gen-Expression an individuellen Zellen als Funktion der Zeit abgebildet und die Fluoreszenzintensität mit digitaler Bildverarbeitung analysiert. In diesem Zusammenhang wurden schon die ersten Transfektionsexperimente mit einem GFP⁵²-kodierenden Plasmid an humanen bronchialen Epithelzellen (16HBE) durchgeführt und verschiedene Raten der GFP-Expression gemessen. Es stellt sich im folgenden die Frage, welche Parameter die Transfektion beeinflussen, ob also die eingesetzte Menge an Gentransfer-Komplexen oder der Zustand der Zelle entscheidend für die Expression ist. Auf diese Punkte soll im Rahmen dieses Projektes noch näher eingegangen werden.

⁵¹ NLS (engl.): Nucleus Localisation Signal.

⁵² GFP (engl.): Green Fluorescent Protein.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen und Akronyme

ATP	Adenosin 5'- triphosphat
BSA	Rinderserum
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4- Dithio-DL-threit
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FFT	Fast-Fourier-Transformation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
HEPES	4-(2- Hydroxyethyl)- piperazin-1-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IP ₄	Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat
NBD-C ₁₂ -HPC	2-(12-(7- Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodecanoyl-1- hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PI-3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PH	Pleckstrin Homologie Domäne
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
POPC	1- Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
POPS	1- Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serin]
SH	Src Homologie Domäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

6.2 Referenzen

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1994. Molecular biology of the cell. Garland Publishing.

Allersma, M. W., Gittes, F., deCastro, J. M., Stewart, R. J., Schmidt, C. F. 1998. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys. J.* 74:1074-1085.

Ashkin, A., Dziedzic, J. M. 1971. Optical levitation by radiation pressure. *Applied Physics Letters.* 19:283-285.

Ashkin, A. 1980. Applications of laser radiation pressure. *Science.* 210:1081-1088.

Ashkin, A. 1992. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.* 61:569-582.

Bai, C., Wang, C., Xie, X. S., Wolynes, P. G. 1999. Single molecule physics and chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:11075-11076.

Bangham, A. D., Flemans, R., Heard, D. H., Seaman, G. V. F. 1958. An apparatus for microelectrophoresis of small particles. *Nature.* 182:642-644.

Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B. J., Goll, J., Thompson, T. E., Carlson, F. D. 1977. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 16:2806-2810.

Bayerl, T. M., Bloom, M. 1990. Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads. A new vesicular model system studied by ²H-nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* 58:357-362.

Berg, H. C. 1993. Random walks in biology. Princeton University Press.

Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-325.

Berridge, M. J., Lipp, P., Bootman, M. 1999. Calcium signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9.

Block, S. M. 1992. Making light work with optical tweezers. *Nature.* 360: 493-495.

Boehringer. 1998. Alveofact: Das natürliche Surfactant. Boehringer Ingelheim Pharma KG.

Boguslavsky, V., Rebecchi, M., Morris, A. J., John, D. Y., Rhee, S. G., McLaughlin, S. 1994. Effect of monolayer surface pressure on the activities of phosphoinositide-specific phospholipase C- β 1, - γ 1, and - δ 1. *Biochemistry*. 33:3032-3037.

Brian, A. A., McConnell, H. M. 1984. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:6159-6163.

Broide, M. L., Cohen, R. J. 1990. Experimental evidence of dynamic scaling in colloidal aggregation. *Phys. Rev. Lett.* 64:2026-2029.

Bromann, P. A., Boetticher, E. E., Lomasney, J. W. 1997. A single amino acid substitution in the pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ 1 enhances the rate of substrate hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 272:16240-16246.

Burns, M. M., Fournier, J. M., Golovchenko, J. A. 1989. Optical binding. *Phys. Rev. Lett.* 63:1233-1236.

Cantor, C. R., Schimmel, P. R. 1980. Biophysical chemistry. W. H. Freeman and Company, New York.

Caplen, N. J., Gao, X., Hayes, P., Elaswarapu, R., Fisher, G., Kinrade, E., Chakera, A., Schorr, J., Hughes, B., Dorin, J. R., Porteous, D. J., Alton, E. W. F. W., Geddes, D. M., Coutelle, C., Williamson, R., Huang, L., Gilchrist, C. 1994. Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposome-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process. *Gene Therapy*. 1:139-147.

Cifuentes, M. E., Honkanen, L., Rebecchi, M. J. 1993. Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C- δ 1. Catalytic and membrane binding properties. *J. Biol. Chem.* 268:11586-11593.

Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80:259-268.

Dietrich, C., Merkel, R., Tampé, R. 1997. Diffusion measurement of fluorescence-labeled amphiphilic molecules with a standard fluorescence microscope. *Biophys. J.* 72:1701-1710.

Elson, E. L., Magde, D. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*. 13:1-28.

- Ernst, N., Ulrichskötter, S., Schmalix, W. A., Rädler, J. O., Galneder, R., Mayer, E., Gersting, S., Plank, C., Reinhardt, D., Rosenecker, J. 1999. Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J. Gene Med.* 1:331-340.
- Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., Williams, R. L. 1996. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C- δ . *Nature.* 380:595-602.
- Essen, L. O., Perisic, O., Katan, M., Wu, Y., Roberts, M. F., Williams, R. L. 1997. Structural mapping of the catalytic mechanism for a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochemistry.* 36:1704-1718.
- Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. N., Tsai, Y. J., Broder, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P. L. 1994. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Bio. Chem.* 269:2550-2561.
- Felgner, P. L. 1997. Gentherapie: nicht-virale Strategien. *Spektrum der Wissenschaft.* November:50-55.
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., Sigler, P. B. 1996. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell.* 83:1037-1046.
- Florin, E. L., Pralle, A., Stelzer, E. H. K., Hörber, J. K. H. 1998. Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis. *Appl. Phys. A.* 66:75-78.
- Förster, T. 1946. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften.* 6: 166-175.
- Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik.* 2:55-75.
- Fung, B. K., Stryer, L. 1978. Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer. *Biochemistry.* 17:5241-5248.
- Gelbart, W. M., Bruinsma, R. F., Pincus, P. A., Parsegian, V. A. 2000. DNA-inspired electrostatics. *Physics Today.* 9:38-44.
- Gittes, F., Schmidt, C. F. 1998a. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters.* 23:7-9.
- Gittes, F., Schmidt, C. F. 1998b. Signals and noise in micromechanical measurements. *In Methods in cell biology.* M. P. Sheetz, editor. Academic Press. 129-156.

- Groves, J. T., Boxer, S. B., McConnell, H. M. 1997. Electric field induced reorganisation of two-component supported bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:13390-13395.
- Groves, J. T., Ulman, N., Cremer, P. S., Boxer, S. G. 1998. Substrate-membrane interactions: mechanisms for imposing patterns on a fluid bilayer membrane. *Langmuir*. 14:3347-3350.
- Hecht, E. 1991. *Optik*. Addison-Wesley, München.
- Hondal, R. J., Zhao, Z., Kravchuk, A. V., Liao, H., Riddle, S. R., Yue, X., Bruzik, K. S., Tsai, M. D. 1998. Mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C: a unified view of the mechanism of catalysis. *Biochemistry*. 37:4568-4580.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. 1982. *Biophysik*. Springer-Verlag.
- Huang, C. 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*. 8:344-352.
- Hunter, R. J. 1981. *Zeta potential in colloid science*. Academic Press, New York.
- Hurley, J. M., Grobler, J. A. 1997. Protein kinase C and phospholipase C: bilayer interactions and regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:557-565.
- Israelachvili, J. N. 1985. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London.
- Kapitza, H. G. 1994. *Mikroskopieren von Anfang an*. Carl Zeiss, Jena.
- Katan, M., Williams, R. L. 1997. Phosphoinositide-specific phospholipase C: structural basis for catalysis and regulatory interactions. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 8:287-296.
- Katayose, S., Kataoka, K. 1997. Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjugate Chem.* 8: 702-707.
- Köchy, T., Bayerl, T. M. 1993. Lateral diffusion coefficients of phospholipids in spherical bilayers on a solid support measured by ²H-nuclear-magnetic-resonance relaxation. *Phys. Rev. E*. 47:2109-2116.
- Kuo, S. C. 1998. A simple assay for local heating by optical tweezers. *In Methods in cell biology*. M. P. Sheetz, editor. Academic Press. 43-45.

- Laemmli, U. K. 1975. Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72:4288-4292.
- Lakowicz, J. R. 1983. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Landau, L. D., Lifschitz, E. H. 1991. Hydrodynamik. Akademie Verlag, Berlin.
- Lange, W. 1994. Einführung in die Laserphysik. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- Lee, R. J., Huang, L. 1996. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped Polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *Journal of Biological Chemistry*. 271:8481-8487.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R., Sigler, P. B., Schlessinger, J. 1995. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:10472-10476.
- Lin, M. Y., Lindsay, H. M., Weitz, D. A., Ball, R. C., Klein, R., Meakin, P. 1989. Universality of fractal aggregates as probed by light scattering. *Proc. R. Soc. Lond. A*. 423:71-87.
- Lomasney, J. W., Cheng, H. F., Roffler, S. R., King, K. 1999. Activation of phospholipase C- δ 1 through C2 domain by Ca^{2+} -enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J. Biol. Chem.* 274:21995-22001.
- Martin, T. F. J. 1998. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 14:231-264.
- McLaughlin, S. 1977. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *In Current topics in membranes and transport*. Academic Press, New York. 71-144.
- Mehta, A. D., Finer, J. T., Spudich, J. A. 1998. Reflections of a lucid dreamer: optical trap design considerations. *In Methods in cell biology*. M. P. Sheetz, editor. Academic Press.
- Mulloy, B., Crane, D. T., Drake, A. F., Davies, D. B. 1996. The interaction between heparin and polylysine: a circular dichroism and molecular modelling study. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:721-729.
- Newton, A. C. 2000. Protein kinase C. *In Principles of molecular regulation*. P. M. Conn, Means, A. R., editor. Humana Press, New York. 207-220.

- Nissen, J., Gritsch, S., Wiegand, G., Rädler, J. O. 1999. Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - concepts towards self-healing membranes. *Eur. Phys. J. B.* 10:335-344.
- O'Brien, R. W., White, L. R. 1978. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *Journal of Chemical Society Faraday II.* 74:1607-1626.
- Overbeek, J. T., Wiersema, P. H. 1967. The interpretation of electrophoretic mobilities. In *Electrophoresis. theory, methods, and applications.* M. Bier, editor. Academic Press, New York, London. 1-50.
- Palberg, T., Evers, M., Garbow, N., Hessinger, D. 1999. Electrophoretic mobility of charged spheres. In *Transport versus structure in biophysics and chemistry.* S. C. Mueller, Parisi, J., Zimmermann, W., editor. Springer, Heidelberg. 191-213.
- Pluta, M. 1988. *Advanced light microscopy.* Elsevier, Amsterdam.
- Pohl, P., Saparov, S. M., Antonenko, Y. N. 1998. The size of unstirred layer as a function of solute diffusion coefficient. *Biophys. J.* 75:1403-1409.
- Pralle, A., Prummer, M., Florin, E. L., Stelzer, E. H. K., Hörber, J. K. H. 1999. Three dimensional high resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microscopy Research and Technique.* 44:378-386.
- Press, H. W. 1992. *Numerical recipes in C: the art of scientific computing.* Cambridge University Press.
- Rameh, L. E., Cantley, L. C. 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274:8347-8350.
- Rebecchi, M., Peterson, A., McLaughlin, S. 1992. Phosphoinositide-specific phospholipase C- δ 1 binds with high affinity to phospholipid vesicles containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry.* 31:12742-12747.
- Reif, F. 1987. *Statistische Physik und Theorie der Wärme.* de Gruyter, Berlin.
- Rhee, S. G., Poulin, B., Lee, S. B., Sekiya, F. 2000. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. In *Biology of phosphoinositides.* S. Cockcroft, editor. Oxford University Press, Oxford. 1-31.
- Rigler, R., Grasselli, P., Ehrenberg, M. 1979. Fluorescence correlation spectroscopy and application to the study of brownian motion of biopolymers. *Physica Scripta.* 19:486-490.

- Rosenecker, J., Schmalix, W. A., Schindelbauer, D., Plank, C., Reinhardt, D. 1998. Towards gene therapy of cystic fibrosis. *Eur. J. Med. Res.* 3:149-156.
- Russel, W. B., Saville, D. A., Schowalter, W. R. 1989. Colloidal dispersions. Cambridge University Press, New York.
- Rusu, L. 1999. Aggregationsverhalten und Oberflächenaktivität von lipid- und polymerbasierten Gentransfer-Komplexen. Diplomarbeit. Technische Universität, München.
- Sciorra, V. A., Frohman, M. A., Morris, A. J. 2000. Regulation of phospholipase D signalling by phosphoinositides. *In* Biology of phosphoinositides. S. Cockcroft, editor. Oxford University Press, Oxford. 268-297.
- Singer, W. D., Brown, H. A., Sternweis, P. C. 1997. Regulation of eucariotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* 66:475-509.
- Spielmann, H. P., Wemmer, D. E., Jacobson, J. P. 1995. Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 34:8542-8553.
- Stephens, L., McGregor, A., Hawkins, P. 2000. Phosphoinositide 3-kinases: regulation by cell surface receptors and function of 3-phosphorylated lipids. *In* Biology of phosphoinositides. S. Cockcroft, editor. Oxford University Press, Oxford. 32-108.
- Sterba, R. E., Sheetz, M. P. 1998. Basic laser tweezers. *In* Methods in cell biology. M. P. Sheetz, editor. Academic Press. 29-41.
- Stout, A. L., Webb, W. W. 1998. Optical force microscopy. *In* Methods in cell biology. M. P. Sheetz, editor. Academic Press. 99-116.
- Stryer, L. 1995. Biochemistry. W. H. Freeman and Company.
- Svoboda, K., Block, S. M. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 23:247-285.
- Tall, E., Dorman, G., Garcia, P., Runnels, L., Shah, S., Chen, J., Profit, A., Chaudhary, A., Prestwich, G. D., Rebecchi, M. J. 1997. Phosphoinositide binding specificity among phospholipase C isozymes as determined by photo-cross-linking to novel substrate and product analogs. *Biochemistry.* 36:7239-7248.

- Tang, M. X., Szoka, F. C. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy*. 4: 823-832.
- Toner, M., Vaio, G., McLaughlin, A., McLaughlin, S. 1988. Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*. 27:7435-7443.
- Visscher, K., Schnitzer, M. J., Block, S. M. 1999. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*. 400:184-189.
- Voet, D., Voet, J. G. 1995. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Wagner, E., Cotten, M., Foisner, R., Birnstiel, M. L. 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:4255-4259.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Birnstiel, M. L. 1992. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:7934-7938.
- Wang, L. P., Lim, C., Kuan, Y., Chen, C. L., Chen, H. F., King, K. 1996. Positive charge at position 549 is essential for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-hydrolyzing but not phosphatidylinositol-hydrolyzing activities of human phospholipase C- δ 1. *J. Biol. Chem.* 271:24505-24516.
- Wang, M. C., Uhlenbeck, G. E. 1945. On the theory of the Brownian motion II. *Reviews of Modern Physics*. 17:323-342.
- Wright, W. H., Sonek, G. J., Berns, M. W. 1993. Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers. *Applied Physics Letters*. 63:715-717.
- Yagisawa, H., Sakuma, K., Paterson, H. F., Cheung, R., Allen, V., Hirata, H., Watanabe, Y., Hirata, M., Williams, R. L., Katan, M. 1998. Replacements of single basic amino acids in the pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ 1 alter the ligand binding, phospholipase activity, and interaction with the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273:417-424.
- Yamamoto, T., Takeuchi, H., Kanematsu, T., Allen, V., Yagisawa, H., Kikkawa, U., Watanabe, Y., Nakasima, A., Katan, M., Hirata, M. 1999. Involvement of EF hand motifs in the Ca²⁺-dependent binding of the pleckstrin homology domain to phosphoinositides. *Eur. J. Biochem.* 165:481-490.

Ziemann, F. 1997. Untersuchung der lokalen viskoelastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mit einem Magnetkugel-Mikrorheometer. Technische Universität München.

6.3 Publikationen

Goldmann, W. H., Galneder, R. J., Ludwig, M., Xu, W., Adamson, E. D., Wang, N., Ezzell, R. M. 1998. Differences in elasticity of vinculin-deficient F9 cells measured by magnetometry and atomic force microscopy. *Experimental Cell Research*. 239:235-242.

Goldmann, W. H., Galneder, R. J., Ludwig, M., Kromm, A., Ezzell, R. M. 1998. Differences in F9 and 5.51 cell elasticity determined by cell poking and atomic force microscopy. *FEBS Letters*. 424:139-142.

Ernst, N., Ulrichskötter, S., Schmalix, W. A., Rädler, J. O., Galneder, R. J., Mayer, E., Gersting, S., Plank, C., Reinhardt, D., Rosenecker, J. 1999. Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J Gene Med*. 1:331-340.

Galneder, R. J., Kahl, V., Arbusova, A., Rebecchi, M., Rädler, J. O., McLaughlin, S. 2001. Microelectrophoresis of a bilayer-coated silica bead in an optical trap: application to enzymology. *Biophys. J*. 80:2298-2309.

Galneder, R. J., Rusu, L., Hohner, A., Maier, B., Sprenger, I., Rädler, J. O. Self-assembly of cationic lipid-DNA gene transfer complexes measured by fluorescence resonance energy transfer. In preparation.

Galneder, R. J., Rusu, L., Gersting, S., Rosenecker, J., Rädler, J. O. Size distribution of lipid and polymer based gene delivery complexes determined by quantitative fluorescence microscopy. In preparation.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- ... allen voran bei Prof. Erich Sackmann, der in mir das Interesse an der Biophysik weckte und mir die Möglichkeit gab, mit einem interessanten Thema an seinem Lehrstuhl zu promovieren, den er mit großem persönlichen Engagement führt und der sich durch sein gutes Arbeitsklima auszeichnet.
- ... außerdem bei Prof. Joachim Rädler für die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit. Die vielen Ideen und Anregungen haben mir nach fehlgeschlagenen Experimenten immer wieder neuen Mut gemacht.
- ... des weiteren bei Prof. Stuart McLaughlin (Stony Brook, New York) für die erfolgreiche Kollaboration bei den Experimenten zur Enzymkinetik von PLC. Die Messungen bis in die frühen Morgenstunden wären ohne seine Hilfe nicht möglich gewesen.
- ... Laura Rusu für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Experimenten zum Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen. Erst ihre Messungen zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie konnten die Resultate der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie bestätigen.
- ... Valentin Kahl für sein Engagement beim Aufbau des Experiments und der Unterstützung bei den gemeinsamen Messungen mit der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese.
- ... Thomas Wiesenthal und Bernhard Hinner für die gute Nachbarschaft am Arbeitsplatz sowie den vielen netten Unterhaltungen zu später Stunde.
- ... Karl Eberle, der viele Komponenten für den Aufbau der Laserfallen-kontrollierten Mikroelektrophorese mit großer Präzision hergestellt hat.
- ... allen Mitarbeitern von E22 für die offene Atmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen.
- ... den Kollegen des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung in Mainz für die freundliche Aufnahme in die neue Arbeitsgruppe, im besonderen bei Charlotte Münch, die uns zu Beginn bei vielen organisatorischen Problemen geholfen hat.
- ... der Arbeitsgruppe von Dr. Josef Rosenecker an der Kinderpoliklinik in München für die zur Verfügung gestellten Materialien sowie den detaillierten Informationen und Anregungen zur Transfektion von Zellen. Im besonderen bei Sören Gersting und Dr. Nikola Ernst für die Kollaboration bei den Messungen zum Energietransfer und der Adhäsion von Gentransfer-Komplexen auf der Oberfläche von Zellen.
- ... außerdem bei Dr. Christian Plank vom Klinikum Rechts der Isar in München für das FITC-markierte Polylysin, das für die entscheidenden Experimente zum Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen eingesetzt wurde.
- ... meinen Eltern, die mir während meiner Abwesenheit alle organisatorischen Aufgaben in der Landwirtschaft abgenommen und mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.
- ... meiner Freundin Laura.