

Stefan Rolf Huebner

STRUKTUR UND ENTSTEHUNG
VON KOMPLEXEN AUS
KATIONISCHEN LIPIDEN UND DNS

© 2000 Stefan Rolf Huebner
Herstellung durch Libri Books on Demand
ISBN 3-8311-0867-6



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Medizinische Biophysik
Klinikum rechts der Isar

STRUKTUR UND ENTSTEHUNG VON KOMPLEXEN AUS KATIONISCHEN LIPIDEN UND DNS

Stefan Rolf Huebner

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. S. Fischer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Ceve
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

Die Dissertation wurde am 24. Januar 2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 29. Juni 2000 angenommen.

Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Entstehungsmechanismus von Komplexen aus kationischen Lipidschichten und DNS (CL/DNS-Komplexen): wird DNS mit einer kationischen Lipidmembran zusammengebracht, setzt dies einen Prozess der Selbstorganisation in Gang, der zu der Entstehung von CL/DNS-Komplexen führt. Oft sind diese Komplexe multilamellar. Dabei spielen die elektrostatische Anziehung zwischen den entgegengesetzt geladenen Komponenten und der Entropiegewinn, der durch die Freisetzung von Gegenionen bei der Komplexbildung und die DNS Restrukturierung entsteht, eine Rolle. Frühere Kleinwinkel-Röntgenstreuexperimente sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Autoren deuteten darauf hin, dass viele Lipidformulierungen mit der DNS multilamellare Strukturen aus alternierenden DNS- und Lipiddoppelschichten bilden. Ziel dieser Arbeit war es daher, Abläufe und Mechanismen aufzudecken, die zu der Entstehung solcher Multischichtstrukturen führen.

CL/DNS-Komplexe besser zu verstehen ist auch von praktischem Interesse, da sie sich für die Transfektion eukaryontischer Zellen eignen. Gegenüber den zu diesem Zweck bisher bevorzugten viralen Transfektionssystemen besitzen sie wichtige intrinsische Vorzüge, wie das Fehlen viraler DNS und die wesentlich reduzierte Immunogenität. CL/DNS-Komplexe sind daher ein vielversprechender Ausgangspunkt für die Entwicklung von effektiven und sicheren synthetischen Gentherapeutika. Einem solchen Einsatz im Wege steht zur Zeit noch die vergleichsweise geringe Transfektionseffizienz der bisher bekannten CL/DNS-Komplexe.

In der Vergangenheit konzentrierte sich die Mehrzahl der Untersuchungen auf die Genexpression und nicht so sehr auf die Struktur und die Charakteristika der CL/DNS-Komplexe. Eine große Zahl neuer Lipid wurde synthetisiert und ihre Transfektionseffizienz bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen untersucht. Die Ergebnisse dieser breit angelegten Suche waren nicht nur in Bezug auf die Steigerung der

Genexpression gemessen an den Erwartungen ernüchternd, sie brachten vor allem auch erstaunlich wenig Einblick in die Komplexstruktur und den der Komplexbildung zugrundeliegenden Wechselwirkungen. Dies ist bedauerlich, könnte ein solches tiefergehendes Verständnis doch der Ausgangspunkt für die zielgerichtete Entwicklung besserer Transfektionssysteme sein.

Zusammenfassung

Um einen Einblick in die Struktur und den Entstehungsprozess der Komplexe aus kationischen Lipiden und DNS zu gewinnen wurden die Cryo-Transmissions-elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) und die energiedispersive Röntgenreflektometrie eingesetzt. Weil diese zwei Techniken sich komplementär ergänzen, lassen die zusammengefassten Ergebnisse weitreichende Schlussfolgerungen zu. Die Cryo-TEM bietet als destruktives Untersuchungsverfahren grundsätzlich nur eine Momentaufnahme des Vorgangs. Jedoch ermöglichte der Detailreichtum der Abbildungen es, durch sorgfältige Auswertung eine Reihe von Rückschlüssen auf den Mechanismus zu ziehen. Die Röntgenreflektometrie hingegen eröffnete die Möglichkeit, die Entstehung eines Komplexes direkt zu verfolgen.

Die Cryo-TEM zeigte neben großen Komplexen mit oft 10 oder sogar mehr geschlossenen Lamellen, die zwiebelschalenförmig um ein zentrales Lipidvesikel angeordnet sind, auch kleinere Komplexe mit zum Teil offenen Lamellen und unilamellare DNS-bedeckte Vesikel. Dabei konnten sogar einzelne, die Vesikel umspinnende DNS-Fäden, und die Muster, welche durch die Überlagerung geordneter Schichten solcher Fäden entstehen, abgebildet werden. Durch eine detaillierte Auswertung einer großen Zahl elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden mehrere Schritte der Komplexbildung zum ersten Mal identifiziert. Hierzu gehören die Adsorption und Fusion von Vesikeln und ein Vorgang, bei dem ein adsorbiertes Vesikel aufbricht und seine Lipidschicht auf der Substratoberfläche abrollt. Als Schlussfolgerung aus den Cryo-TEM-Untersuchungen wird ein aus diesen Schritten zusammengesetzter Mechanismus vorgeschlagen, demzufolge die Komplexbildung zwei miteinander verknüpften Pfaden folgt. Die Entstehung des multilamellaren Komplexes ist nach diesem Mechanismus ein sequenzieller Prozess, bei dem ausgehend von einem einzelnen Substratvesikel eine Schicht nach der anderen adsorbiert.

Die röntgenreflektometrischen Messungen bestätigen und ergänzen die Schlussfolgerungen aus den Cryo-TEM-Untersuchungen. Die Multilamellen entstehen in drei Schritten: ein Vesikel kommt durch Kollision in Kontakt mit dem Substrat. Das Vesikel adsorbiert und verformt sich dabei. Es bricht auf und rollt seine Lipiddoppelschicht über das Substrat. Weitere Schichten adsorbieren auf die gleiche Weise. Die DNS übernimmt bei dem Vorgang die Rolle eines molekularen Klebstoffs. Die DNS-Adsorption konnte mit einem Diffusionsmodell, die Lamellenbildung mit einem irreversiblen Multischicht-Adsorptionsmodell (einem sogenannten Regenmodell) beschrieben werden. Schließlich wurde auch die Rolle der Ionen im Medium betrachtet. Überraschenderweise wurde gefunden, dass die EDTA-Konzentration einen wesentlichen Einfluss auf die Komplexbildung hat. Mittels Ionenkontrastierung konnte außerdem die Verteilung univalenter Gegenionen untersucht werden.

Diese Arbeit ist in drei Teile gegliedert. Der erste Teil erläutert was über DNS, kationische Lipidschichten und CL/DNS-Komplexe bereits bekannt und für die Interpretation der in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsergebnisse wichtig ist. Besonders eingegangen wird auf die Struktur und die Elektrostatik der Komponenten, sowie auf die verwendeten Präparationsmethoden. Teil zwei legt dar, wie die Techniken der Cryo-TEM und der Röntgenreflektometrie in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Der dritte und größte Teil schließlich befasst sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen neuen Ergebnissen bezüglich der Struktur der CL/DNS-Komplexe, des Entstehungsmechanismus und der Kinetik.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
Zusammenfassung	7
Inhaltsverzeichnis	11
Abkürzungen	15
Variablenbezeichnungen	17

TEIL 1

DNS	21
Struktur der DNS	23
Präparation der DNS	27
Elektronendichteprofil der DNS	30
Elektrostatik der DNS	34
Kationische Lipidschichten	37
Struktur der Lipide	39
Präparation kationischer Lipidvesikel und Langmuirfilme	42
Elektronendichteprofil der Lipidschicht	43
Elektrostatik der Lipidschichten	45
Komplexe aus kationischen Lipidvesikeln und DNS	49
Eigenschaften der CL/DNS-Komplexe	50
Multilamellare Lipid/DNS-Komplexe	53

Gentherapie	55
Transfektionsvektoren	56
Gentherapie <i>in vivo</i>	57

TEIL 2

Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie.....	61
Streukontrast und Phasenkontrast.....	62
Energiefilter	62
Röntgenreflektometrie	67
Reflektometer	68
Reflexion an einer Oberfläche: Fresnelreflektivität	70
Reflexion an einem Elektronendichteprofil: Parrattverfahren	72
Kohärente vs. inkohärente Superposition	76
Anpassung an Modelle	77
Interpretation der Reflektivität mit dem Frei-Form-Boxmodell.....	78
Interpretation der Reflektivität mit dem Molekülmodell.....	81

TEIL 3

Struktur der Komplexe.....	85
Richtungskorrelationen zwischen DNS-Schichten	86
Zahl der Lamellen nimmt bei Lipidüberschuss zu	93
DNS spult sich auf unilamellare Vesikel	95
DNS induziert Fusion von Vesikeln.....	98
Offene Doppelschichten	100
Trauben unilamellarer Vesikel	100
Asymmetrie in der Lipid/DNS-Wechselwirkung.....	102
Mechanismus der Komplexbildung	103
Welcher Adsorptionsmodus?.....	103
Randenergie vs. Komplexbildungsenergie.....	105

Pfade der Komplexbildung	108
Zusammenfassung der Ergebnisse aus Cryo-TEM.....	110
DNS-Adsorption	111
DNS-Adsorption ist diffusionskontrolliert	113
DNS-Belegung nimmt mit der Membranladung zu	121
Adsorption der Lamellen.....	125
EDTA induziert Multischichtadsorption	126
Multischichtkomplexe an der Elektrolyt/Luft-Grenzfläche	128
Kinetik der Multischichtenbildung	132
Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration.....	138
Unterscheide im Wiederholabstand.....	143
Ionenkontrastmessungen	147
Messungen mit unterschiedlichen Ionen	148
Bestimmung der Ionenverteilung.....	153
Gouy-Chapman-Modell	157
Modifiziertes Gouy-Chapman-Modell	160
Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Röntgenreflektometrie	169
Ausblick.....	171
Literaturverzeichnis.....	173
Dank.....	183

Abkürzungen

A	Adenin
AFM	Atom-Kraftmikroskopie (atomic force microscopy)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CFTR	Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Regulator
CL	kationisches Lipid (cationic lipid)
Cryo-TEM	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie
DC-Chol	3 β [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-Carbamoyl]-Cholesterol
DMPC	1,2 Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOGS	Diocetadecyl-Aminoglycyl-Spermin
DOSPA	2,3 Dioleoyloxy- <i>N</i> -(Spermincarboxaminoethyl)- <i>N,N</i> -Dimethyl- <i>l</i> -Propanaminium
DOTAP	Dioleoyloxy-3-(Trimethylammonio)-Propan
DOTMA	[2,3 Bis(Oleoyl)-Propyl]-Trimethyl-Ammoniumchlorid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
G	Guanin
OD	optische Dichte
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Poly(Ethylenglycol)
RNS	Ribonukleinsäure
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung (small angle X-ray scattering)
T	Thymin
U	Uracil

Variablenbezeichnungen

a	Abstand zwischen den Ladungen eines Polyelektrolyts
\bar{a}	Parametersatz zur Beschreibung eines Modell-Elektronendichteprofiles
α	Einfalls- und Ausfallswinkel des reflektierten Röntgenstrahls
α_c	kritischer Winkel. Für $\alpha < \alpha_c$ tritt Totalreflexion auf
η	Viskosität des Lösungsmittels
c	Konzentration eines Elektrolyts
$c_{DNS}(z,t)$	Konzentration der DNS
$c_{0\,DNS}$	Anfangskonzentration der DNS
$c_{vesikel}$	Vesikelkonzentration
$\chi(\bar{a})^2$	Abweichung des Modells mit dem Parametersatz \bar{a} von den Messdaten
D_{DNS}	Diffusionskonstante der DNS
$D_{DNS\,lateral}$	Diffusionskonstante der DNS auf einer Lipidmembran
$D_{vesikel}$	Diffusionskonstante der Vesikel
d	Vesikeldurchmesser
d_0	Schichtdicken im Multischichtsystem
d_{DNS}	Interaxialabstand der DNS-Helices in der adsorbierten DNS-Monoschicht
e_0	Einheitsladung ($1.6022 \cdot 10^{-19}$ C)
ε	Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels (= 78)
$\varepsilon(z)$	tiefenabhängige Dielektrizitätskonstante in der Grenzschicht
ΔF_K	Änderung der freien Energie durch Komplexbildung
ΔF_R	Änderung der freien Energie durch Randbildung
ΔF_ρ	Änderung des elektrostatischen Anteils an der freien Energie eines Ions
ΔF_s	Änderung des entropischen Anteils an der freien Energie eines Ions
k	Wellenvektor des Röntgenlichts
k_B	Boltzmann-Konstante ($1.380658 \cdot 10^{-23}$ J/K)
k_R	Ratenkonstante der Multischichtenbildung
κ	Debyelänge
L	Tiefe des Langmuirtrogs
Λ	Abfalllänge der Hydratationswechselwirkung

λ	Wellenlänge des Röntgenlichts
m	Anzahl der Basen in einem DNS-Fragment
N_A	Zahl von Avogadro ($6.022 \cdot 10^{23}$ /Mol)
n	Brechungsindex des Mediums
ν_i	Koeffizienten der Diffusionsgleichung
$p(m)$	Massenverteilung der DNS-Fragmente
Ψ	Elektrostatistisches Potential
Ψ_{hyd}	Hydratationspotential
q	Wellenvektorübertrag bei der Reflexion des Röntgenlichts
q_c	kritischer Wellenvektorübertrag. Für $q > q_c$ tritt Totalreflexion auf
R	allgemeine Gaskonstante (8.31451 J/KMol)
$R(q)$	Reflektivität des Röntgenlichts in Abhängigkeit des Wellenvektorübertrags
$R_F(q)$	Fresnelreflektivität einer ideal glatten Grenzschicht
r_{hyd}	Radius des hydratierten Ions
r_{ion}	Ionenradius
$\rho(z)$	Elektronendichteprofil der Grenzschicht als Funktion der Tiefe
$\Delta\sigma_{DNS}$	zusätzliche Flächenelektronendichte verursacht durch eine DNS-Schicht
T	Temperatur
θ_{DNS}	Anteil der Lipidschicht, die mit DNS belegt ist ($0 \leq \theta_{DNS} \leq 1$)
θ_i	Anteil der Fläche, die mit einer adsorbierten Lamelle i belegt ist ($0 \leq \theta_i \leq 1$)
W_{el}	elektrostatische Wechselwirkungsenergie
W_{hy}	Hydratationswechselwirkungsenergie
W_{vdW}	van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie
ξ	Strukturparameter nach Manning
z	Abstand senkrecht zur Membranoberfläche

TEIL 1

DNS

Unter den Makromolekülen in der Natur nimmt die Desoxyribonukleinsäure (DNS) eine herausragende Stellung ein, weil sie in ihrer Struktur die Erbinformation trägt, die den Aufbau aller Proteine eines Organismus bestimmt (Watson et al, 1983). Die genetische Information wird durch Replikation der DNS weitergegeben und durch Transkription und Translation, welche vermittelt RNS zur Proteinsynthese führt. Die Größe des Genoms variiert beträchtlich zwischen den Spezies: während virale DNS typischerweise nur einige tausend Basenpaare (bp) umfasst, sind es beim Menschen ca. 3 Milliarden bp, untergebracht auf 46 Chromosomen.

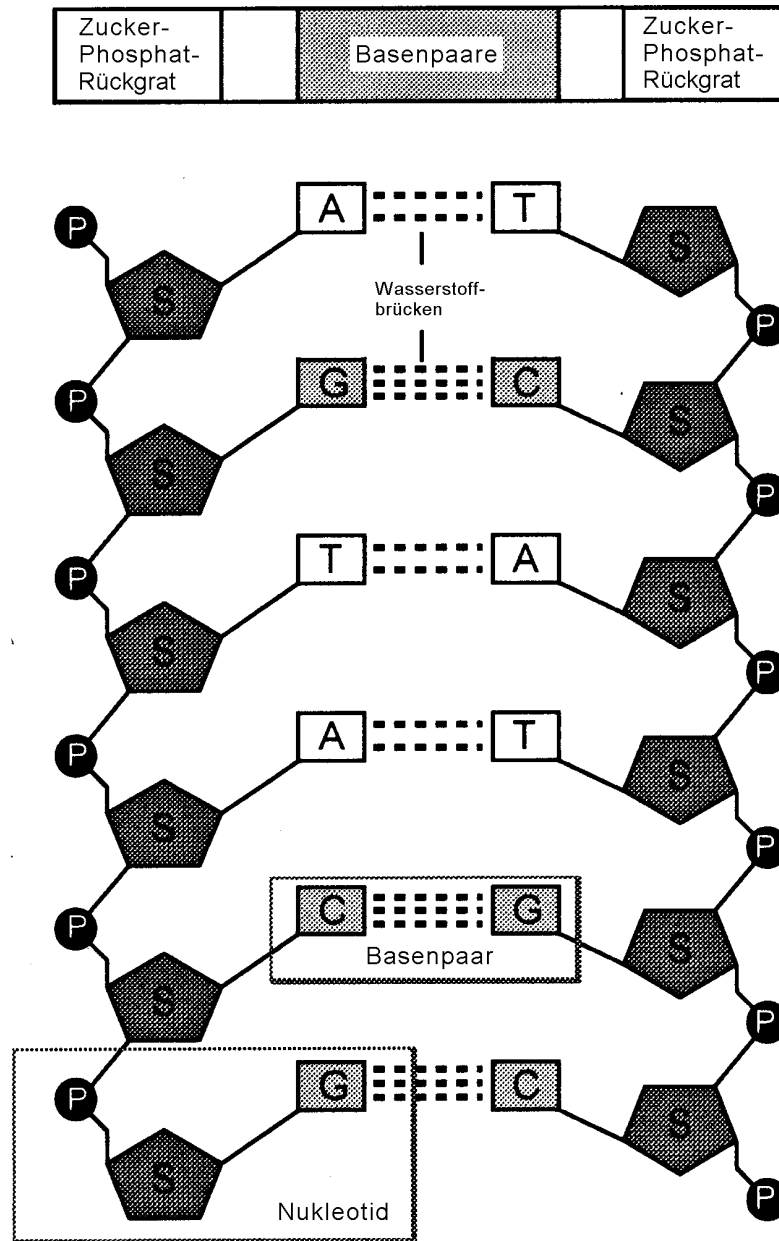


Abbildung 1: der chemische Aufbau der DNS. Eine Gerüststruktur aus Zucker und Phosphorsäuregruppen trägt Paare aus jeweils zwei komplementären Basen. Die Phosphodiesterbindungen verknüpfen die Deoxyribose-Ringe jeweils an ihren 3' und 5' Positionen. Ein einzelnes Nukleotid ist hervorgehoben.

Struktur der DNS

Die genetische Information wird durch Aneinanderreihung von vier Stickstoffbasen kodiert, die als Seitengruppen an das DNS-Rückgrat, eine Stützstruktur aus mit Phosphorsäuren verknüpften Zuckern (Deoxyribosen), angeheftet sind (siehe Abbildung 1). Die monomeren Bausteine der DNS, die aus je einer Stickstoffbase, einem Zucker, und einer Phosphorsäure bestehen, bezeichnet man als Nukleotide.

Die chemische Struktur der vier Basen sind in Abbildung 2 dargestellt: Adenin (A) und Guanin (G) gehören zur Gruppe der Purine, Cytosin (C) und Thymin (T) sind Pyrimidine. Entscheidend für die Struktur und Funktion der DNS ist das Vermögen dieser Basen, intermolekulare Wasserstoffbrücken auszubilden. Zwischen Adenin und Thymin können zwei, zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Adenin ist zu Thymin auch sterisch komplementär, genauso wie Guanin zu Cytosin. Entsprechend bilden je zwei komplementäre, durch Wasserstoffbrücken verbundene Basen (A und T bzw. C und G) sogenannte Basenpaare. Sie stellen die Sprossen einer Doppelhelix dar, wie sie in Abbildung 3 skizziert ist. Die Basenpaarung ermöglicht die exakte Replikation der DNS, denn wenn die beiden Stränge getrennt werden, kann jeder der Stränge eindeutig durch einen neuen komplementären Strang ergänzt werden.

Neben DNS existiert in der Natur noch eine zweite Nukleinsäure, die Ribonukleinsäure (RNS). Anders als DNS, die hauptsächlich im Zellkern vorkommt, ist RNS sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma reichlich vorhanden. Die Hauptaufgabe der RNS besteht darin, die genetische Information der DNS zur Proteinsynthese ins Zytoplasma zu transportieren (Boten-RNS). Weiterhin ist RNS in Form von r-RNS (ribosomaler RNS) am Translationsprozess wesentlich beteiligt. Auch tragen einige Viren ihre Erbinformation nicht in Form von DNS, sondern RNS. Im Aufbau unterscheiden sich DNS und RNS nur darin, dass der Zucker des Grundgerüsts bei DNS Deoxyribose und bei RNS Ribose ist. Außerdem paart sich Cytosin bei RNS mit Uracil statt Thymin, welches in RNS nicht vorkommt.

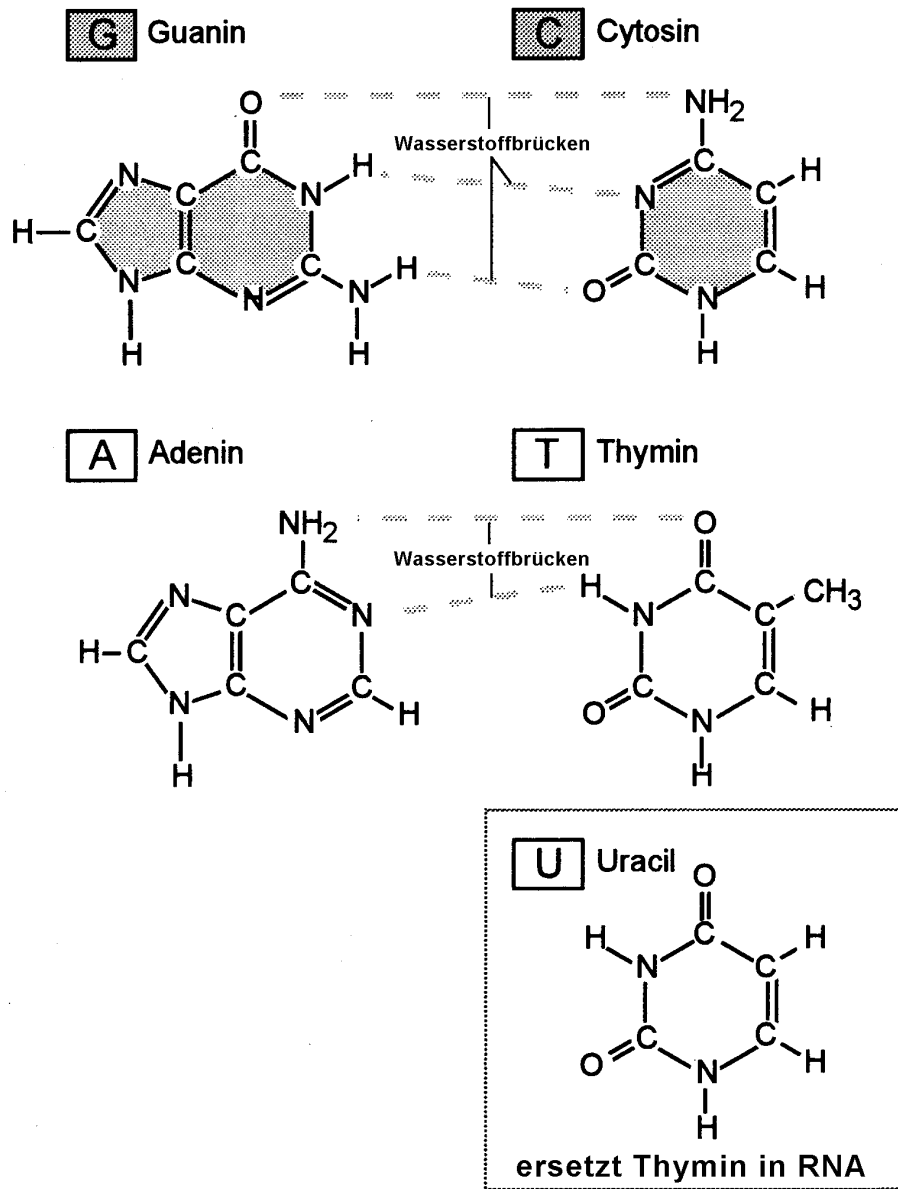


Abbildung 2: chemische Struktur der Stickstoffbasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T). Ebenfalls dargestellt ist Uracil (U), das in der RNS den Platz des Thymin einnimmt. Guanin und Cytosin, sowie Adenin und Thymin sind jeweils sterisch zueinander komplementär und bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus.

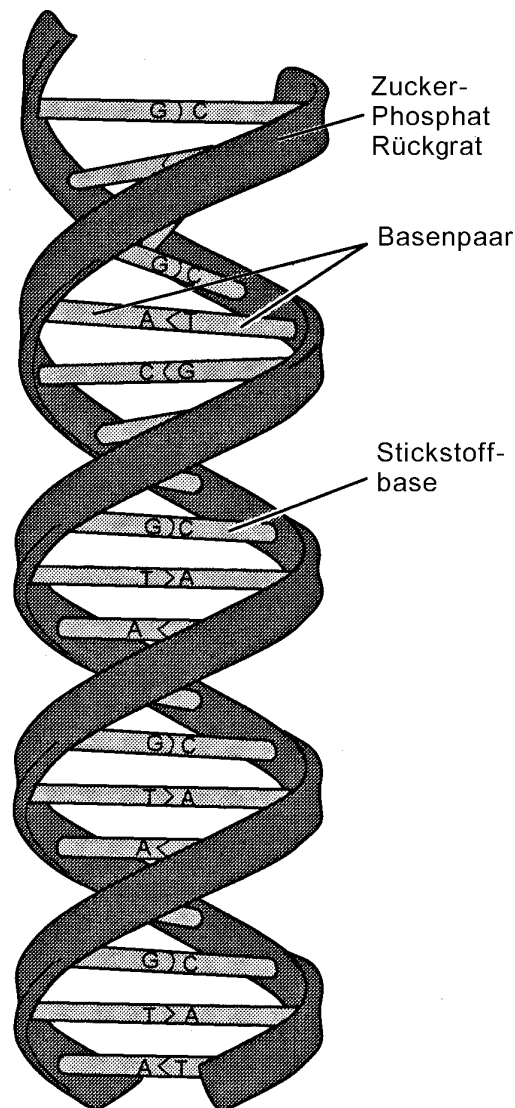


Abbildung 3: schematische Darstellung der DNS Doppelhelix und der durch Wasserstoffbrücken gepaarten Basen.

Es ist hilfreich, die Struktur der DNS auf drei verschiedenen Ebenen zu betrachten. Als primäre Struktur bezeichnet man die Abfolge der Basen. Drei aufeinanderfolgende Basen kodieren gemeinsam eine Aminosäure. Die sekundäre Struktur ist die Struktur des gesamten Moleküls. Die planaren Basenpaare sind im inneren der Helix angeordnet. Auf der Außenseite entstehen eine breite und eine schmale Furche, wie man in der raumfüllenden Darstellung in Abbildung 4 sehr gut erkennen kann. Die Phosphate liegen

auf der Außenseite der Helix und sind für Ionen leicht zugänglich. Die exakte Struktur der Helix kann je nach äußeren Bedingungen variieren. In normalen Lösungen und auch *in vivo* liegen die Basen mehr oder weniger rechtwinklig zum Rückgrat, das eine rechtshändige Schraube bildet. Eine Umdrehung umfasst ca. 10 bp. Die Ganghöhe beträgt 3.4 nm (0.34 nm pro Basenpaar). Die Doppelhelix hat einen Durchmesser von ca. 2 nm. Man bezeichnet diese Konformation als B-Struktur der DNS. Bei höheren Ionenstärken oder im dehydrierten Zustand kann die DNS auch in den ebenfalls rechtshändigen A- oder C-Strukturen vorliegen in denen die Helix breiter und dafür die Ganghöhe kleiner ist und eine Umdrehung 11 Basenpaare umfasst. Darüber hinaus ist auch noch eine linkshändige, die sogenannte Z-Struktur, bekannt, die jedoch nur bei bestimmten Basenfolgen und sehr hoher Salzkonzentration vorkommt.

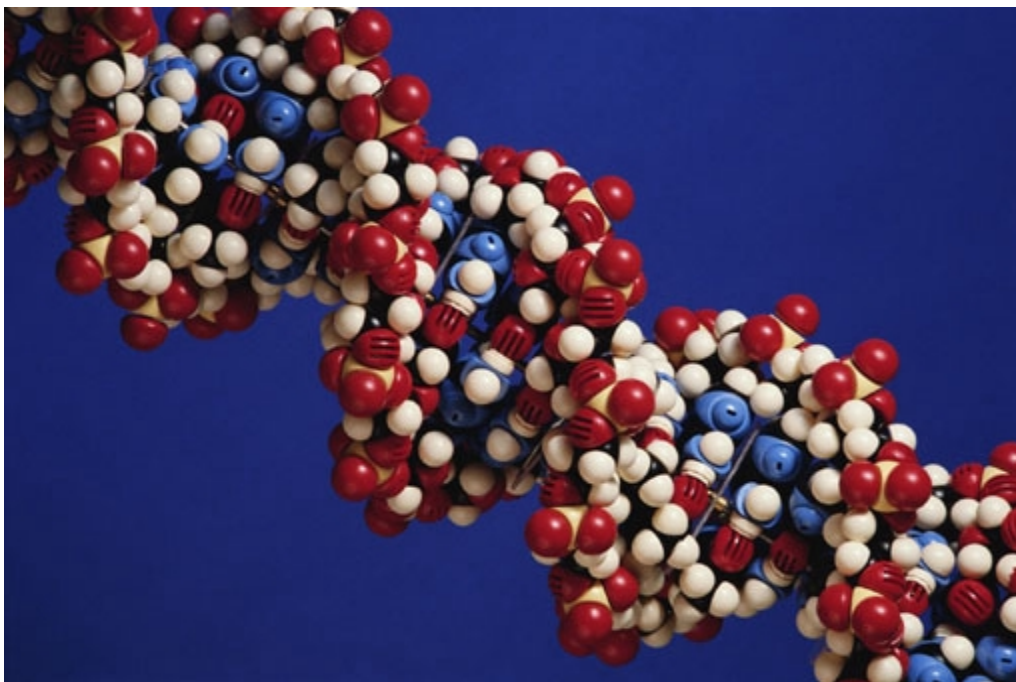


Abbildung 4: raumfüllendes Karottenmodell eines Abschnittes der DNS Doppelhelix. Deutlich sind die breite und die schmale Furche zu erkennen.

Auf der Ebene der tertiären Struktur unterscheidet man zwischen zirkulärer (= ringförmig geschlossener) und linearer DNS (DNS-Stücke mit offenen Enden). Hier spielt die Persistenzlänge eine wichtige Rolle, die Länge, auf der ein Polymer bei einer Energie von $1 k_B T$ um 180° gebogen werden kann (k_B ist die Boltzmannkonstante, T die Temperatur von 25°C). Die Persistenzlänge von DNS liegt bei ca. 60 nm, bei hoher Ionenstärke bei ca.

35 nm. Entsprechend kann man Moleküle, die kürzer als ca. 1000 bp sind, noch als biegsamen Stab betrachten, längere DNS-Stücke ähneln eher einem flexiblen Knäuel. In der vorliegenden Arbeit wurde lineare DNS mit einer durchschnittlichen Länge von 6000 bp verwendet.

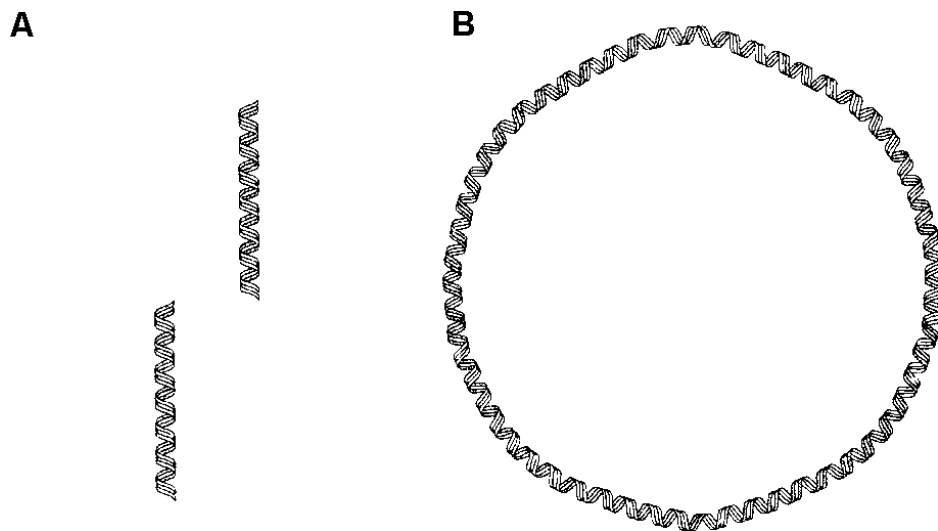


Abbildung 5: lineare (A) und zirkulare (B) DNS.

Präparation der DNS

Um für die Experimente DNS-Fragmente reproduzierbarer, einheitlicher Längenverteilung zu erhalten, wurde Kalbsthymus-DNS (Sigma Chemical, USA) mit dem Restriktionsenzym *EcoR V* (Stratagene, USA) verdaut. Restriktionsenzyme zerschneiden den DNS-Faden überall dort, wo eine, für das jeweilige Enzym spezifische, Basenfolge vorkommt. Die für *EcoR V* spezifische Sequenz (Tabelle 2) tritt statistisch ca. alle 6 000 Basenpaare auf. Es entstehen also DNS-Fragmente mit einer breiten Massenverteilung um 6 000 bp (entspricht ca. 2 000 nm). Die Verteilung, die sich bei vereinfachten Voraussetzungen theoretisch ergibt, ist in Abbildung 7 dargestellt. Sie wird später bei der Auswertung der DNS-Adsorptionsexperimente benutzt.

Abbildung 6: das aus *E. Coli* gewonnene Restriktionsenzym *EcoRV* zerschneidet die DNS, wenn es auf die angegebene, punktsymmetrische Basensequenz trifft. Die Bezeichnungen 5' und 3' geben die Orientierung der Teilstränge an.

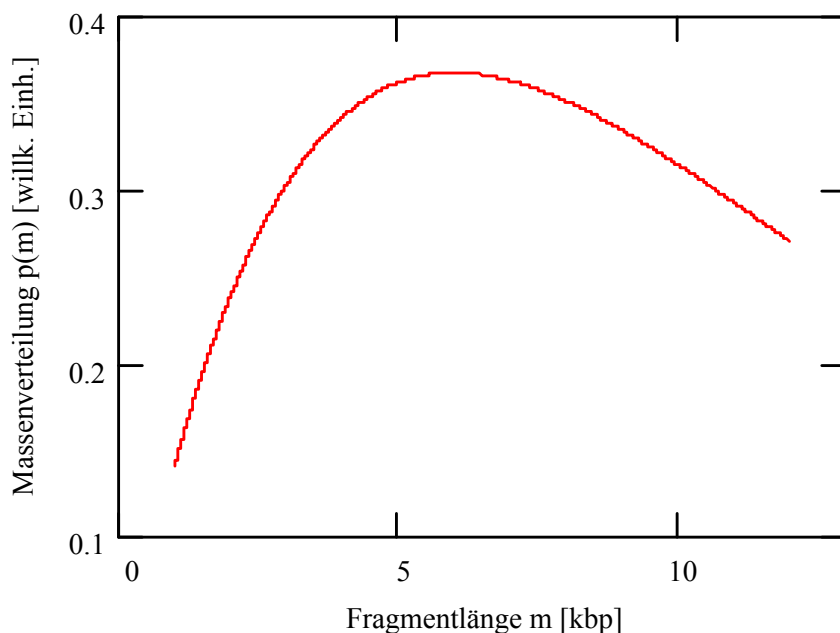
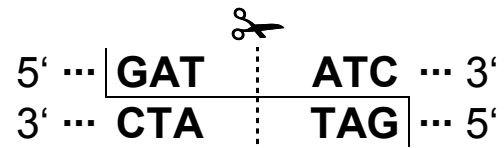


Abbildung 7: erwartete Massenverteilung $p(m)$ der DNS-Fragmente. Sind die Orte, an denen charakteristische Basenfolge auftritt, vollkommen zufällig verteilt, so ist Längenverteilung der resultierenden DNS-Fragmente exponentiell. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fragment eine Länge von m Basenpaaren aufweist, ist in

sehr guter Näherung $\propto e^{-\frac{m}{6000 \text{ bp}}}$. Entsprechend ist die mit der Masse

gewichtete Verteilung der DNS-Fragmente $p(m) \propto m \cdot e^{-\frac{m}{6000 \text{ bp}}}$.

Diese Verteilung hat ihr Maximum und ihr arithmetisches Mittel bei einer Fragmentlänge von $m = 6000 \text{ bp}$.

Vor, während und nach dem Verdau wurde die Längenverteilung durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Abbildung 8). Durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung (nach dem Protokoll von Maniatis et al., 1989) wurde das Protein anschließend wieder entfernt und die DNS durch mehrfache Dialyse gegen Triethanolamin-Puffer weiter gereinigt. Die Konzentration der fertigen DNS-Probe wurde aus der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Methode beruht auf der UV-Absorption der Aromate der DNS-Basen (Maniatis et al., 1989; Abbildung 9).

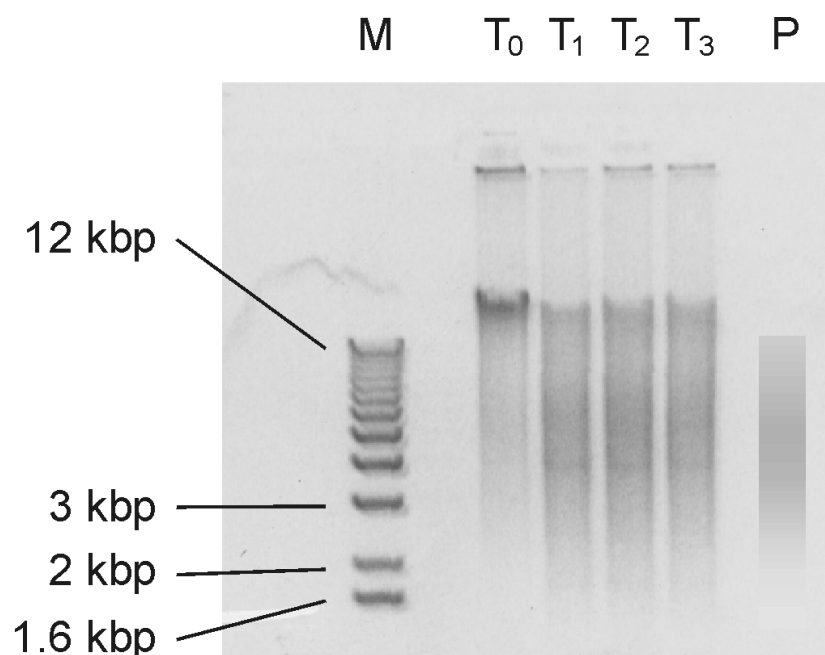


Abbildung 8: analytisches Gel zur Bestimmung der Längenverteilung der DNS Fragmente. Der Marker in der ersten Spur geben die Skala an (in tausend Basenpaaren). Probe T_0 wurde vor, die Proben T_1 und T_2 16 bzw. 18½ Stunden nach der Zugabe des Restriktionsenzymys genommen. Anschließend wurde noch einmal frisches Enzym zugegeben, um sicher zu gehen, dass der Verdau vollständig ist. Nach 19½ Stunden wurde die letzte Probe, T_3 , genommen und der Verdau durch Phenol/Chloroform-Zugabe gestoppt. Man erkennt eine breite Verteilung der DNS-Fragmente mit einem Maximum bei einer Fragmentlänge von ca. 6000 bp. Zum Vergleich ist die aus der Verteilung aus Abbildung 7 abgeleitete Grauwertverteilung P gegenübergestellt.

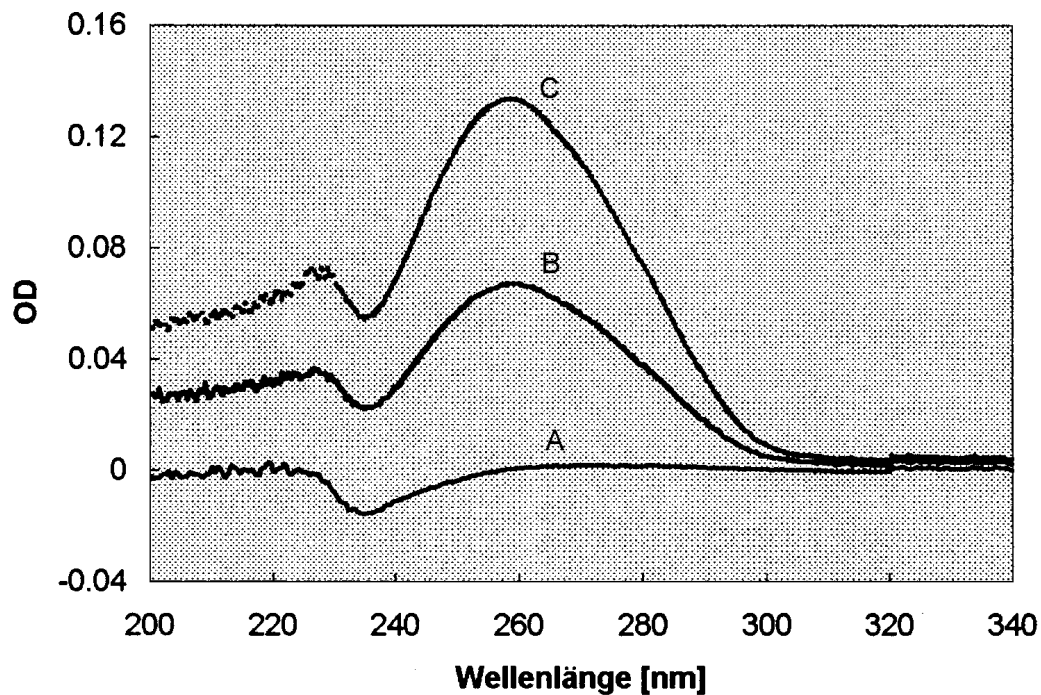


Abbildung 9: optische Dichte (OD) einer Probe von DNS-Fragmenten zur Bestimmung der DNS-Konzentration. Die aromatischen Ringe der DNS-Basen ergeben ein charakteristisches Adsorptionsmaximum bei 260 nm. In einer 1 cm Küvette mit 800 μL Puffer (A) wurden zweimal 5 μL DNS-Lösung zugegeben (B und C). Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 mg/mL. Demnach hat die hier untersuchte DNS eine Konzentration von 0.58 mg/mL.

Elektronendichteprofil der DNS

Für die Interpretation der röntgenreflektometrischen Experimente, die einen wichtigen Teil der vorliegenden Arbeit ausmachen, ist es wichtig, ein gutes Bild der Elektronendichte- und Volumenverteilung der DNS zu haben. Sie lässt sich aus der genauen dreidimensionalen Struktur der DNS abschätzen, welche aus röntgenkristallographischen Untersuchungen bekannt und in der Brookhaven-Strukturdatenbank zugänglich ist. Diese Röntgenstruktur ist die Basis der folgenden Betrachtung.

In Abbildung 10 ist zunächst die durchschnittliche Querschnittsverteilung von B-DNS im Vakuum, gemittelt über die Längsrichtung des Moleküls, wiedergegeben. Dabei ist z die Richtung senkrecht zur Längsachse. Es wurde angenommen, dass alle Basen gleich häufig vorkommen. Das Profil unterscheidet sich deutlich von dem eines Zylinders mit einem Durchmesser von 2 nm. Die Fläche unter der Kurve, welche die über die Längsachse gemittelte Querschnittsfläche des Moleküls wiedergibt, ist wesentlich kleiner als die eines Vollzylinders. Ursache für diese Diskrepanz sind die breite und die schmale Furche. Abbildung 11 zeigt das aus Querschnitts- und Elektronenverteilung errechnete Elektronendichteprofil des DNS-Moleküls. Die über den Querschnitt und die Längsachse gemittelte Elektronendichte liegt überall über dem entsprechenden Wert für Wasser. Besonders am Rand wirkt sich das Rückgrat mit seinen elektronenreichen Phosphoratomen aus.

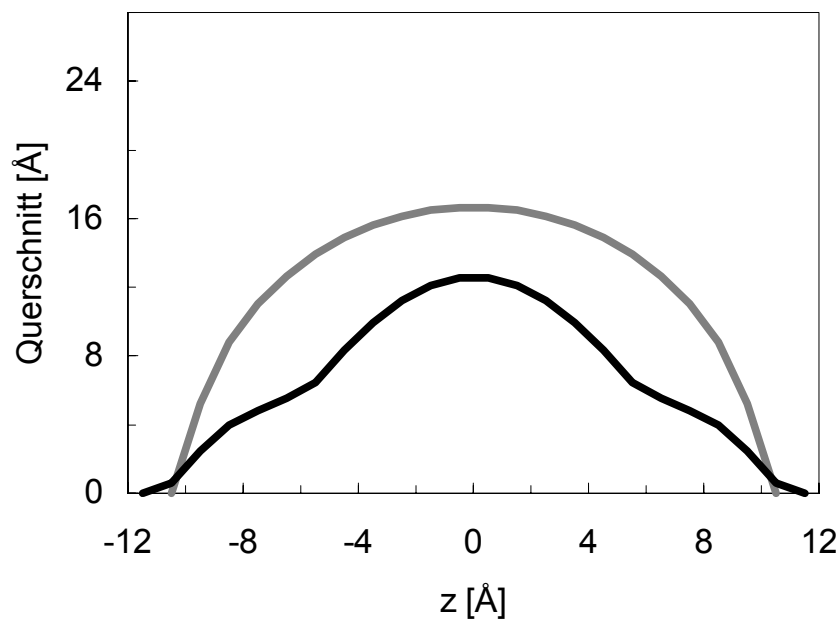


Abbildung 10: über die Längsrichtung des B-DNS-Moleküls gemittelt Querschnittsprofil des DNS-Moleküls (—) im Vergleich zum Querschnittsprofil eines Zylinders (—). Die z -Achse verläuft senkrecht zur Längsrichtung des Moleküls.

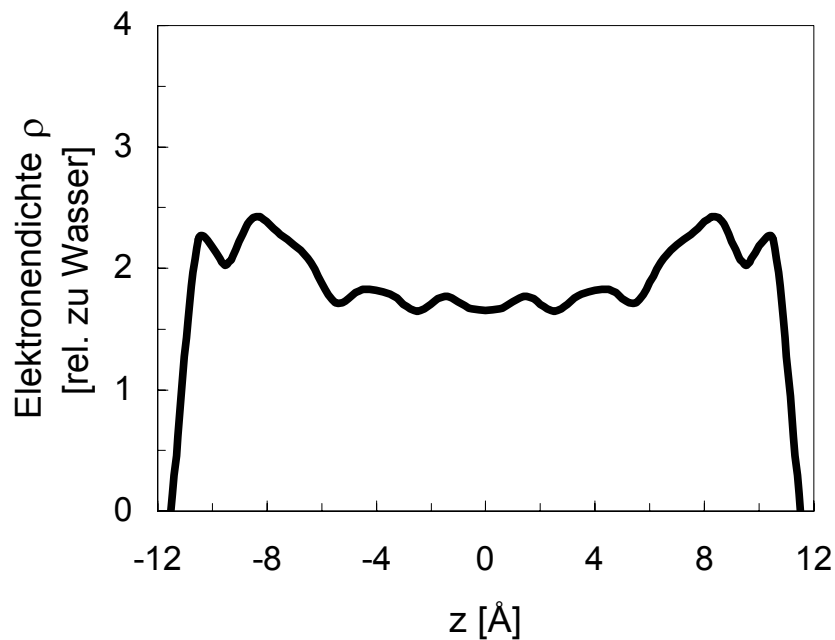


Abbildung 11. über den Querschnitt und die Längsrichtung gemittelt Elektronendichteprofil von B-DNS im Vakuum. Die z-Achse verläuft senkrecht zur Längsachse der DNS.

Aus der Querschnittsverteilung und der Elektronendichteverteilung des nackten DNS Moleküls lässt sich leicht die Elektronendichte der in Wasser gelösten, ausgestreckten DNS errechnen. In den multilamellaren Lipid/DNS-Komplexen, wie sie in dieser Arbeit untersucht werden, bildet DNS Monoschichten aus mehr oder weniger parallel angeordneten DNS-Moleküle. Im experimentellen Teil der Arbeit werden die Elektronendichten dieser Schichten durch Röntgenreflektometrie bestimmt. Vergleicht man die so gemessenen Elektronendichten mit den hier aus dem Brookhaven-Modell errechneten, kann man auf die DNS-Dichte in diesen Schichten schließen. Die durchgezogene Kurve in Abbildung 12 zeigt z.B. das aus dem Brookhaven-Modell errechnete Elektronendichteprofil des Querschnitts durch eine Monoschicht aus exakt parallelen DNS-Fäden, deren Interaxialabstand $d_{DNS} = 4$ nm beträgt. Die tatsächlich gemessene Elektronendichteverteilung ist immer wesentlich weniger detailreich, weil die intrinsische Rauigkeit der Schicht und andere Faktoren das Profil verschmieren. Realistischer ist daher die Gestrichelte Kurve, die das mit einer Gaußfunktion der Breite von 0.3 nm verschmierte Profil wiedergibt. die Von einer solchen Verschmierung

unabhängig ist jedoch der über den Querschnitt der Schicht integrierte Teil der Elektronendichte, der auf die DNS zurückzuführen ist. Er beträgt

$$(1) \quad \Delta\sigma_{DNS} = \int (\rho(z) - \rho_{H_2O}) dz = 13.1 \text{ nm}^2 \cdot \rho_{H_2O} \cdot \frac{1}{d_{DNS}}.$$

Hierbei ist d_{DNS} der Interaxialabstand der DNS-Fäden in der Schicht. Dieser Zusammenhang wird später bei der Analyse der röntgenreflektometrischen Messungen zur Ermittlung von d_{DNS} aus $\Delta\sigma_{DNS}$ verwendet.

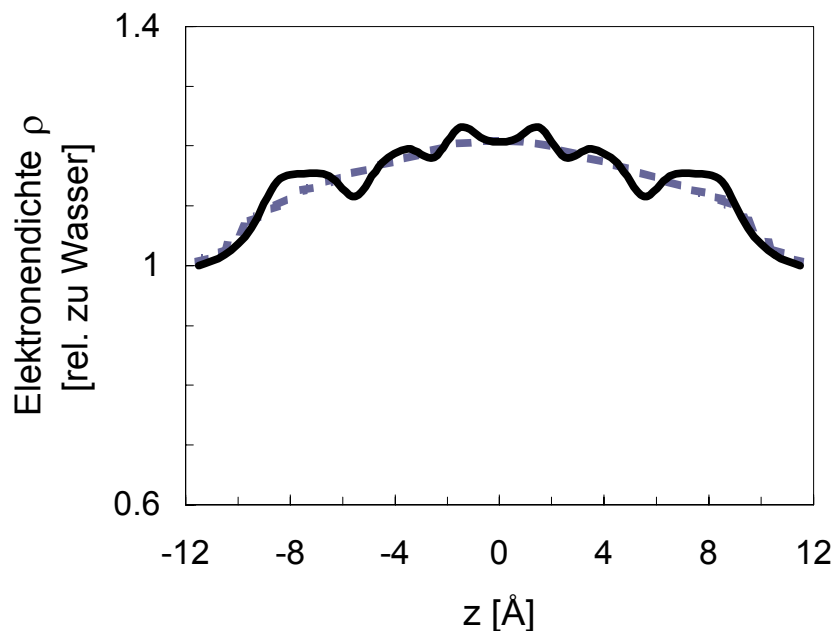


Abbildung 12: Elektronendichteprofil senkrecht durch eine Monoschicht paralleler DNS-Fäden in wässriger Lösung (—), sowie das mit einer 0.3 nm breiten Gaußkurve verschmierte Profil(---). Für den Interaxialabstand der Moleküle sind $d_{DNS} = 4 \text{ nm}$ angenommen.

Elektrostatik der DNS

DNS ist ein Polyelektrolyt. Pro Nukleotid trägt sie im physiologischen pH-Bereich eine negative Ladung. Trotz ihres komplizierten Aufbaus lassen sich viele Eigenschaften der in Wasser gelösten DNS recht gut mit einem elektrostatischen Modell beschreiben, in dem das DNS-Molekül einfach als Kette äquidistanter negativer Ladungen angesehen wird (Manning 1978). Dabei wird vorausgesetzt, dass die Persistenzlänge des Polymers wesentlich größer als die Debye-Länge ist, so dass man die Kette abschnittsweise als steif betrachten kann.

Um das Verhalten der Gegenionen um das Polyelektrolyt zu beschreiben, muss deren freie Energie untersucht werden. Wird das Zylindervolumen, das einem betrachteten Gegenion zur Verfügung steht, z. B. von r_1 auf r_2 erhöht, so ändert sich der elektrostatische Beitrag zur freien Energie um

$$\Delta F_\rho \propto \frac{e^2}{a\epsilon} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)$$

und der entropische Beitrag um

$$\Delta F_S \propto k_B T \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)$$

(e = Einheitsladung, a = Ladungsabstand, ϵ = Dielektrizitätskonstante, k_B = Boltzmannkonstante, T = Temperatur). Überwiegt der elektrostatische Anteil, kondensiert das Ion auf der Kette. Überwiegt hingegen der entropische Anteil, kann sich das Gegenion frei bewegen.

Manning definiert einen Strukturparameter ξ , der das Verhältnis der Beiträge angibt:

$$\xi = \frac{e^2}{a\epsilon k_B T}$$

Eine Kondensation von Gegenionen findet nur statt, wenn $\xi > 1$ ist. Bei B-DNS ist $a = 0.34 \text{ nm}/2 = 0.17 \text{ nm}$, woraus $\xi = 4.2$ folgt. Es kondensieren folglich gerade so viele Gegenionen, dass bei der verbleibende Ladung des Polyions der elektrostatische und der entropische Beitrag gleich sind. Im Falle der vollständig ionisierten DNS ist der Anteil der kondensierten Gegenionen $1 - 1/\xi = 0.76$, das heißt, drei Viertel der Gegenionen kondensieren.

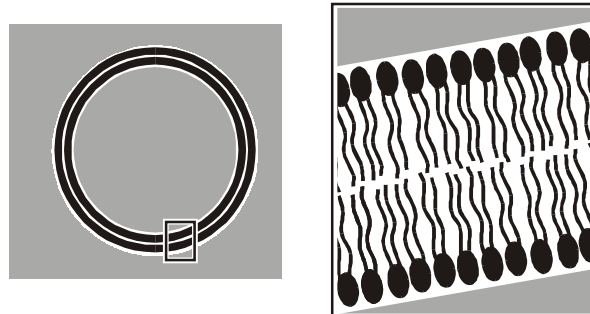
In wässriger Lösung bilden ca. 9 Wassermoleküle pro Nukleotid eine Hydrathülle um die DNS. Es wird in der Literatur angenommen, dass die Hydrathülle der DNS und auch die Hydrathüllen um die Köpfe von Phospholipiden eine abstoßende Wechselwirkung vermitteln. Außerdem dürfte die Hydrathülle eine wichtige Rolle bei ortsspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen (z.B. mit Proteinen, aber auch mit kationischen Lipiden) spielen, indem die Dehydratationsenergie der negative Enthalpie, die mit diesen Wechselwirkungen verbunden ist, entgegenwirkt.

Man kann relativ hoch konzentrierte DNS-Lösungen herstellen, da praktisch keine van-der-Waals-Anziehung zwischen DNS Molekülen existiert. In verdünntem bilden längere DNS-Fragmenten (z.B. die hier verwendeten) erst ab Konzentrationen oberhalb von ca. $15 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ eine cholesterisch flüssigkristaline Phase. Steigt die Salzkonzentration im System, so wird die DNS-Löslichkeit geringer.

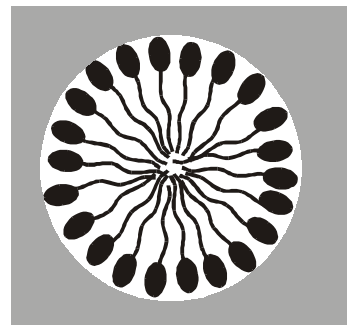
Kationische Lipidschichten

Wie DNS, so sind auch Lipide in der Natur allgegenwärtig, insbesondere als wesentlicher Bestandteil biologischer Membrane. Der Grund dafür liegt in der aliphatischen Natur der meisten Lipide, die sie dazu veranlasst in wässriger Lösung spontan supramolekulare Strukturen zu bilden. Beispiele sind Mizellen sowie Lipiddoppelschichten, die in biologischen Membranen vorkommen. Die Moleküle organisieren sich so, dass ihre hydrophoben Teile (apolare Fettsäurereste) nicht mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen. Der daraus resultierende Entropiegewinn übersteigt den Entropieverlust durch die Strukturbildung. An der Wasser/Luft-Grenzfläche können Lipide darüber hinaus sogenannte Langmuirfilme in denen sich die Moleküle in einer Monoschicht so anordnen, dass die hydrophilen Teile dem Wasser und die hydrophoben Teile der Luft zugewandt sind. In der vorliegenden Arbeit wird die Adsorption von DNS sowohl an kationische Lipiddoppelschichten als auch an Langmuirfilme untersucht.

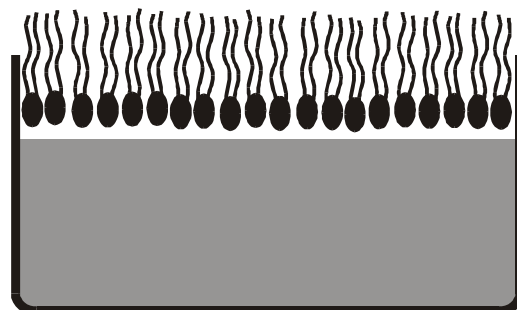
Abbildung 13: (A) schematische Darstellung der Struktur eines Lipidvesikels bestehend aus einer geschlossenen Lipiddoppelschicht. Die hydrophoben Teile der Lipide sind zur Mitte der Doppelschicht gewandt, die hydrophilen Köpfe zeigen zum Wasser (grau).



(B) die Mizelle ist ein weiteres Beispiel für selbstorganisierte Lipidstrukturen. Die apolaren Fettsäureketten sind im inneren der Mizelle vom umgebenden Lösungsmittel (grau) geschützt. Diese stark gekrümmte Struktur wird besonders von einkettigen Lipiden, wie z.B. DC-Chol, bevorzugt.



(C) ein Langmuirfilm an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Die in dieser Arbeit verwendeten Langmuirfilme wurden erzeugt, indem in Chloroform gelöstes Lipid auf die Wasseroberfläche (grau) gespreitet wurde. Das Chloroform verdampfte. Zurück bleibt ein Lipidfilm.



Struktur der Lipide

In Abbildung 14 ist die chemische Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Lipids 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) wiedergegeben. Es gehört zu den Glycerophospholipiden, die in der Natur am häufigsten vorkommen. An ein Glycerin schließen sich einerseits eine phosphathaltige Kopfgruppe, andererseits zwei Fettsäurereste an. Eine andere häufige Lipidgruppe sind die Steroide, die sich durch eine ihnen gemeine Ringstruktur auszeichnen. Das Cholesterol, dessen Struktur Abbildung 15 zeigt, ist der Hauptvertreter dieser Gruppe.

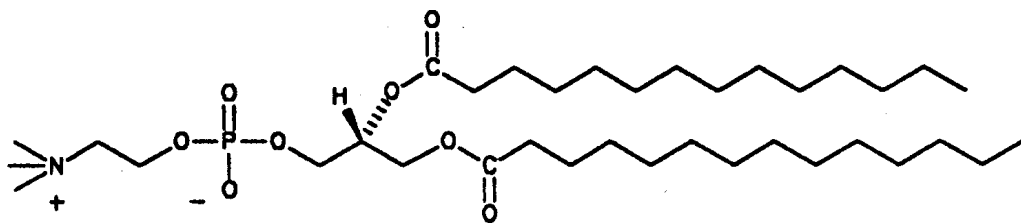


Abbildung 14: die chemische Struktur von DMPC. Die Kopfgruppe besteht aus Cholin, einem Phosphat und einem Glycerol, an das sich zwei gesättigte Fettsäureketten anschließen.

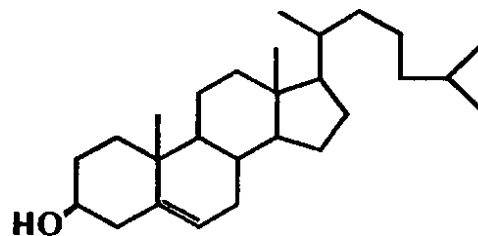


Abbildung 15: die chemische Struktur von Cholesterol mit der für Steroide typischen Ringstruktur und der sich daran anschließenden kurzen Fettsäurekette.

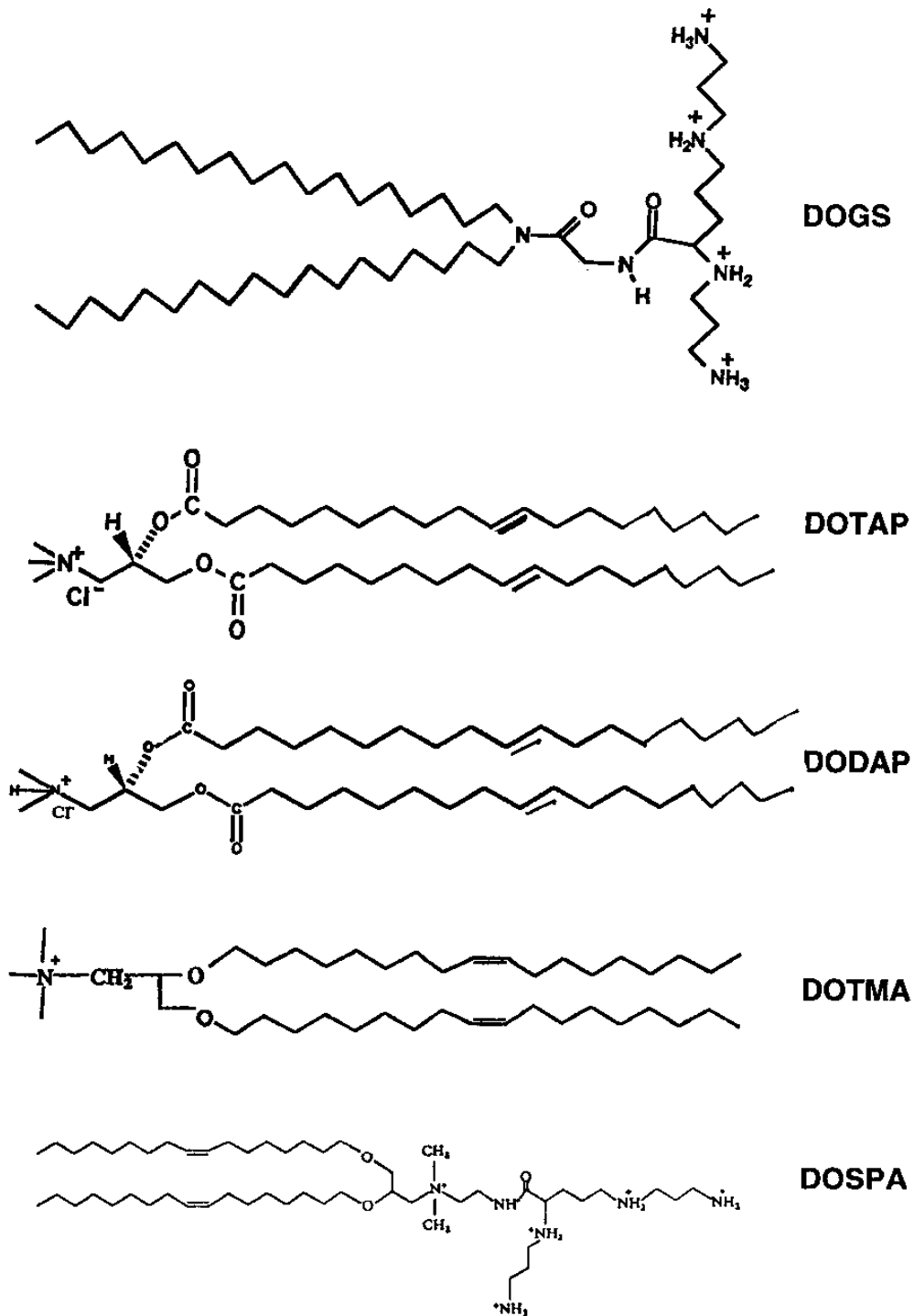


Abbildung 16: Beispiele für synthetische kationische Lipide, die in Transfektionsexperimenten oft benutzt wurden. Die Abbildungen sind entnommen aus (Lasic, 1997).

Die in der Natur vorkommenden Lipide sind bis auf wenige Ausnahmen bei physiologischem pH-Wert (um 7.4) entweder zwitterionisch (wie DMPC) oder negativ geladen. Entsprechend trägt auch die Zellmembran eine negative Ladung. Synthetisch lassen sich jedoch auch positiv geladenen Lipide herstellen. Lipidvesikel, die solche kationische Lipide in ihrer Membran enthalten, neigen dazu, mit der negativ geladenen DNS Komplexe zu bilden (Behr 1986). Nachdem man erkannt hatte, dass diese Komplexe fremde DNS in Zellen transportieren können (Felgner et al., 1987), wurden eine kaum überschaubare Zahl von neuen kationischen Lipiden synthetisiert. Ziel war es, die Transfektionseffizienz zu steigern und gleichzeitig die Toxizität zu senken. In Abbildung 16 sind die gängigsten kationische Lipide zu sehen.

Auch Cholesterol kann mit einer positiven Ladung versehen werden. Das bekannteste Beispiel hierfür ist 3 β [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-Carbamoyl]-Cholesterol (DC-Chol), dessen chemische Struktur in Abbildung 17 wiedergegeben ist (Gao and Huang, 1991), und das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, um kationische Lipidschichten herzustellen. Der Ladungszustand aller ionisierten Lipide ist abhängig von pH-Wert der Umgebung. Bei DC-Chol haben Zuidam et al. gefunden, dass unter physiologischen Bedingungen ca. 50 % der Moleküle geladen sind (Zuidam et al., 1997). Das entspricht einem pK-Wert von 7.4.

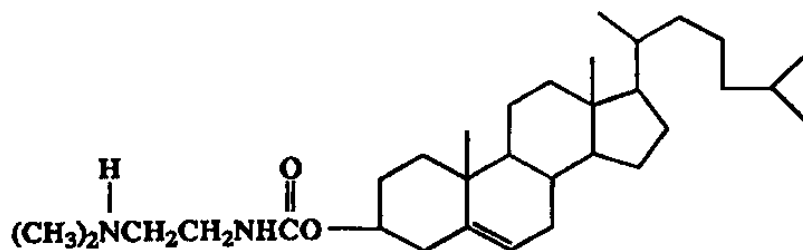


Abbildung 17: die chemische Struktur des kationischen Lipids DC-Chol, bei dem eine positiv geladene Kopfgruppe an eine Sterolstruktur gebunden ist .

Präparation kationischer Lipidvesikel und Langmuirfilme

Kationische Lipide, die zur Transfektion eingesetzt werden, sind normalerweise mit einem zwitterionischen Lipid (dem sogenannten Helferlipid) gemischt. Es hat sich gezeigt, dass dies die Transfektionseffizienz deutlich steigert, wenn auch der Grund dafür noch im Dunkeln liegt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mischung aus dem kationischen DC-Chol (Bachem Biochemica, Heidelberg) und dem Helferlipid DMPC (Avanti Polar Lipids, USA) verwendet.

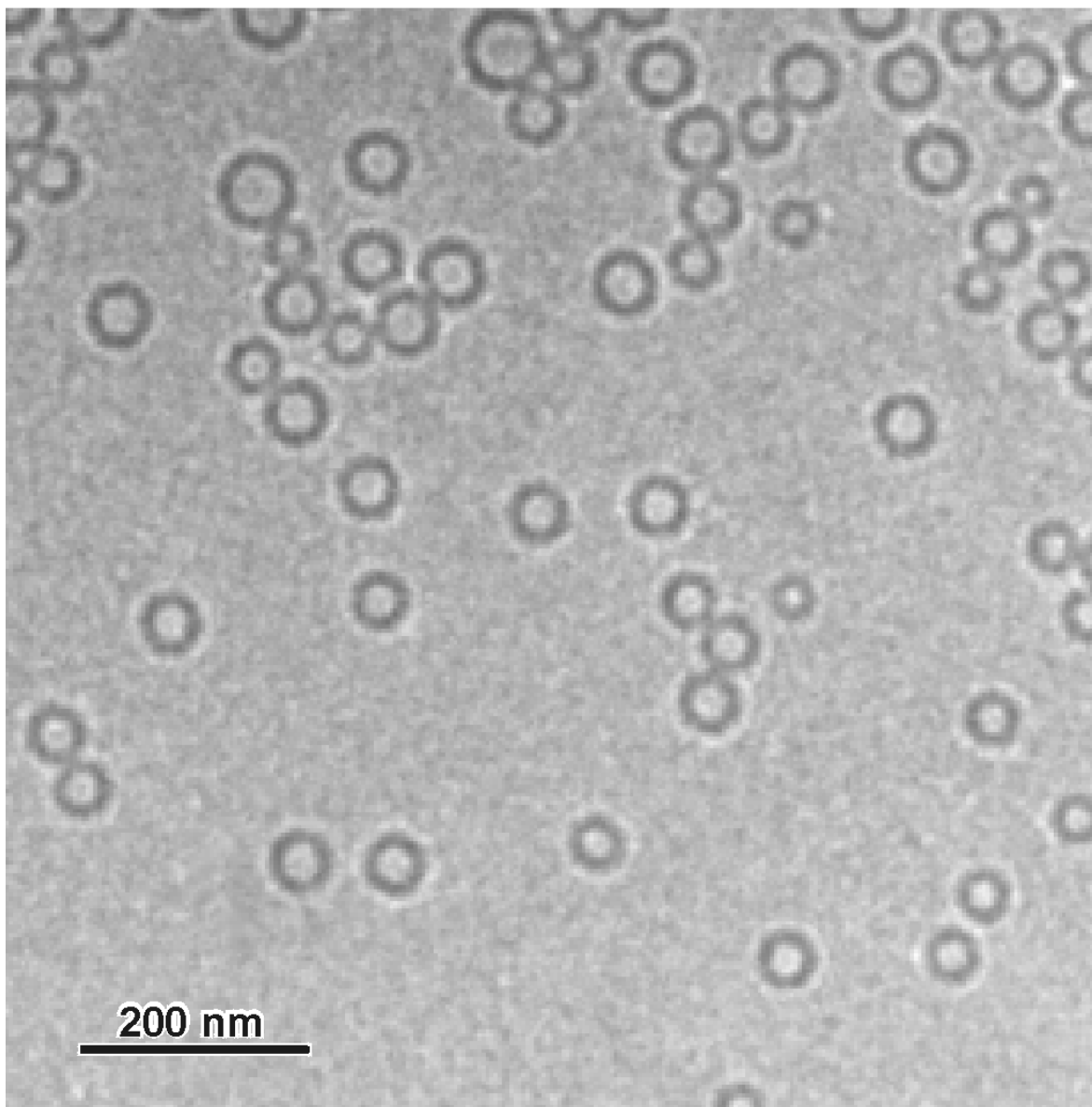


Abbildung 18: Die extrudierten DMPC/DC-Chol Vesikel haben eine sehr enge Größenverteilung um ca. 65 nm, wie diese cryo-transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme (Vergrößerungsfaktor 12 000) zeigt.

Um kationische Lipidvesikel wohldefinierter Größe herzustellen, wurden die Lipide im Molverhältnis 2:3 (DC-Chol:DMPC) in einer 2:1 Mischung aus Chloroform und Methanol aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung unter Vakuum eingetrocknet. Am Boden des Behälters bildete sich dabei ein dünner Lipidfilm. Nach der Zugabe von Puffer (50 mM Triethanolamin) entstand durch osmotisches Quellen eine Suspension von Riesenvesikeln. Diese wurde schrittweise durch Polycarbonfilter mit Porengrößen von 400, 200, 100 und 50 nm extrudiert, um schließlich zu einer Suspension von Lipidvesikeln einheitlicher Größe (Radius um ca. 65 nm) zu gelangen.

Zur Herstellung von Langmuirfilmen für die Röntgenreflektometrie-Experimente wurden die Lipide im gleichen Molverhältnis (2:3 der Komponenten DC-Chol:DMPC) in Chloroform gelöst. Die Konzentration betrug $1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Jeweils ca. 15 μL dieser Lösung wurden auf die Oberfläche der in einem Teflontrog befindlichen Pufferlösung gegeben. Während das Chloroform verdunstete breitete sich ein Lipidfilm auf der Oberfläche aus.

Elektronendichteprofil der Lipidschicht

Bei Phospholipiden sind zwei Bereiche deutlich verschiedenere Elektronendichte zu unterscheiden. Der Lipidkopf besitzt aufgrund seiner Phosphatgruppe mit dem elektronenreichen Phosphor und vier Sauerstoffatomen eine relativ hohe Elektronendichte. Die Fettsäureketten hingegen weisen eine deutlich niedrigere Elektronendichte auf, die über die Länge der Kette praktisch konstant ist. Folglich ist die einfachste Beschreibung des Elektronendichteprofils von Lipidschichten ein sogenanntes Zwei-Boxen-Modell, wobei eine Box vereinfachend als homogen angenommene Kopfgruppe, die andere den Ketten zugeordnet ist (Als-Nielsen und Möhwald 1988; Lösche, 1994; Vierl 1998). Es hat sich gezeigt, dass diese einfache Beschreibung für die Interpretation röntgen- und neutronenreflektometrischer Untersuchungen an Phospholipidmonoschichten gute Ergebnisse liefert.

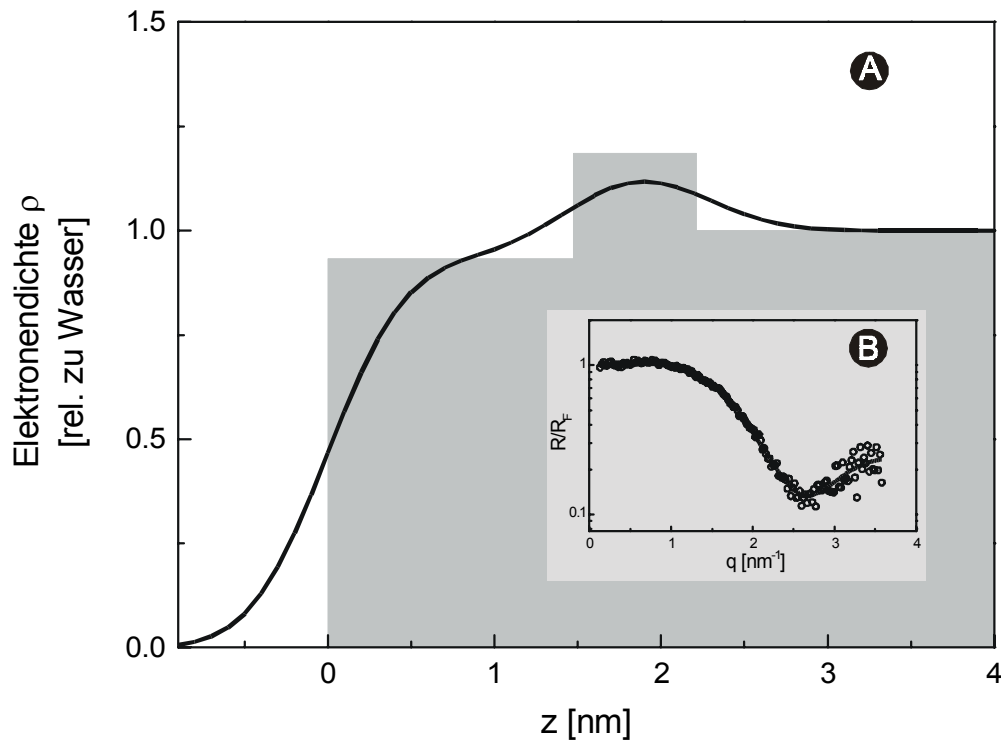


Abbildung 19: (A) das Elektronendichteprofil einer DMPC Monoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche lässt sich gut durch ein Zwei-Box-Modell beschreiben. Je eine Box (grau) beschreibt die Elektronendichte der Ketten- und der hydrierten Kopfschicht. Die Boxen sind durch Konvolution mit einer Gaußfunktion verschmiert (—). (B) Die Reflektivität einer DMPC Monoschicht (○) und Modellreflektivität berechnet aus dem Modellprofil (—) in A.

Tabelle 1 gibt die verwendeten Modellparameter an. Sie gehen auf röntgen- und neutronenreflektometrische Experimente, sowie auf Computersimulationen von Armen und Lösche zurück (Armen et al., 1998; Lösche, 1999). Für DC-Chol liegen leider keine so detaillierten Daten vor. Deshalb wurden die Modellparameter auf der Grundlage der chemischen Struktur abgeschätzt. Das Molekül wurde dazu in drei Segmente unterteilt: eine Kopfsegment, ein Segment für die Ringstruktur und ein Fettsäuresegment.

Molekül	Segment	Länge [Å]	Volumen [Å ³]	Elektronen
DMPC	KOPF	7.3	264.5	164
	CHX	16.6		242
DC-Chol	DC	8.1	338.1	71
	STER	9.5	389.9	148
	CHX	7.3	225.2	58

Tabelle 1: Parameter der Modelle für die Strukturen der Lipide DMPC und DC-Chol.

Elektrostatik der Lipidschichten

In der Nähe einer geladenen Lipidschichten fällt das elektrostatische Potential mit zunehmendem Abstand ab. Der Potentialverlauf an einer Ebene mit dem Oberflächenpotential Ψ_0 in einem Elektrolyt einwertiger Ionen der Konzentration c kann durch die Gouy-Chapman-Näherung (Cevc, 1993) der Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung bestimmt werden:

$$\Psi(z) = \frac{4k_B T}{e} \tanh^{-1} \left(e^{-\kappa z} \tanh \left(\frac{e\Psi_0}{4k_B T} \right) \right)$$

oder, bei niedrigen Oberflächenpotentialen (d.h. $\frac{e\Psi_0}{k_B T} \ll 1$)

$$(2) \quad \Psi(z) = \Psi_0 e^{-\kappa z}$$

mit der inversen Debyelänge

$$\kappa = e \sqrt{\frac{8\pi c}{\epsilon k_B T}} .$$

Für die elektrostatische Wechselwirkungsenergie zwischen zwei geladenen Ebenen folgt mit Gleichung 2 das Potenzgesetz (Cevc, 1987)

$$W_{el}(z) \propto e^{-\kappa z}. \quad \text{elektrostatische Wechselwirkungsenergie}$$

Darüber hinaus ist bei geladenen wie ungeladenen Lipidschichten die van-der-Waals-Wechselwirkung zu berücksichtigen. Den Hauptbeitrag zu dieser Kraft liefern die Fettsäureketten der Lipide. Die van-der-Waals-Wechselwirkung ist zwischen Lipidschichten attraktiv und langreichweitig. Das macht sie zu einem wichtigen Faktor bei Kolloiden, zu denen auch Vesikelsuspensionen zählen.

Das Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Modell (DLVO-Modell) erklärt die Stabilität kolloidaler Systeme quantitativ, indem es davon ausgeht, dass ein Kolloid stabil ist, wenn die elektrostatische Abstoßung größer sind als die van-der-Waals-Anziehung. Für kleine Abstände folgt die van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie dem Potenzgesetz (Cevc, 1987)

$$W_{vdW}(z) \propto z^{-2}. \quad \text{van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie}$$

Es überwiegt somit bei ausreichend kleinen Abständen (primäres Minimum) immer die schneller (weil mit einem Potenzgesetz) ansteigende van-der-Waals-Anziehung. Somit sind Vesikelsuspensionen inhärent instabil. Bei größeren Abständen kann jedoch die elektrostatische Abstoßung überwiegen, wobei eine Energiebarriere zwischen dem primären Minimum und großen Abständen auftritt. Ist diese Barriere hoch, kann sich für lange Zeit ein metastabiler Zustand einstellen. In Abbildung 20 ist der besonders interessante Fall dargestellt, dass ein sekundäres Energieminimum auftritt. Solche Suspensionen zeigen Anzeichen von Präzipitation, können aber leicht wieder resuspendiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten kationischen Vesikel zeigen ein solches Verhalten.

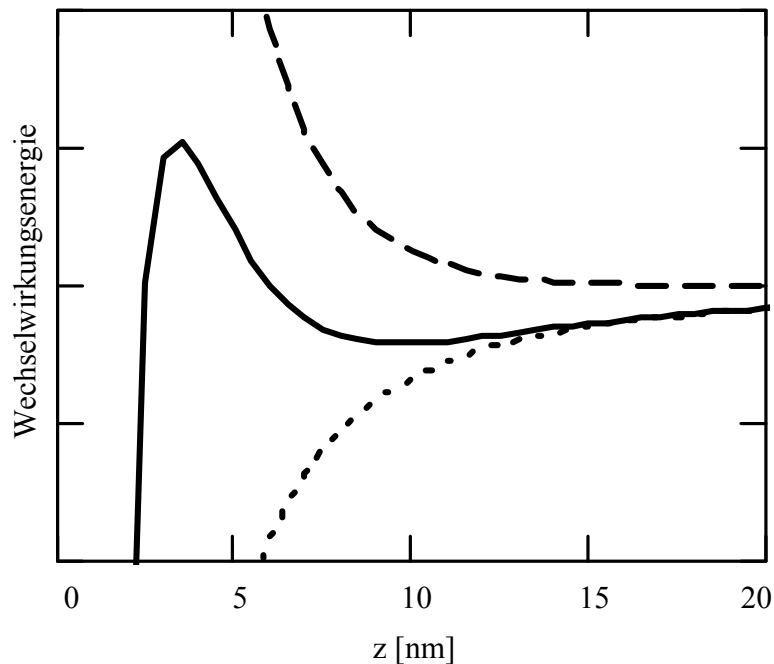


Abbildung 20: mögliches Wechselwirkungspotential zwischen Lipidvesikeln in einer Suspension in der Annäherung des DLVO-Modells. Die Gesamtwechselwirkungsenergie (—) setzt sich aus der elektrostatische Abstoßung (---) und der van-der-Waals-Anziehung (····) zusammen. In dem hier dargestellten Fall trennt eine Energiebarriere das primäre (links) von dem sekundären Minimum (rechts).

Zusätzlich zu der elektrostatischen und der van-der-Waals-Wechselwirkung wurden noch weitere Wechselwirkungen an Lipidschichten vorgeschlagen, um das Verhalten von Vesikelsuspensionen zu erklären. Neben attraktiven Korrelationskräften, repulsiven Protrusionskräften und einer thermisch induzierten Fluktuationsabstoßung der Membran gehört hierzu insbesondere die Hydratationskraft. Die Hydratationswechselwirkung wird durch das Lösungsmittel Wasser übertragen, ist kurzreichweitig und wirkt abstoßend. Es wurde ein exponentielles Gesetz postuliert:

$$W_{hy} \propto e^{-\frac{z}{\Lambda}}. \quad \text{Hydratationswechselwirkungsenergie}$$

Hierbei liegt Λ gewöhnlich unter 0.3 nm. Die Hydratationswechselwirkung spielt also nur bei sehr kleinen Abständen eine wichtige Rolle.

Komplexe aus kationischen Lipidvesikeln und DNS

Lipidvesikel werden aufgrund ihrer Biokompatibilität, ihrer biologischen Abbaubarkeit und ihrer geringen Immunogenität vielfach als Trägersysteme für therapeutisch aktive Wirkstoffe eingesetzt. Nachdem Experimente gezeigt hatten, dass solche Vesikel in der Lage sind, den Transport von Wirkstoffen durch die Zellmembran zu verbessern, gab es schon in den 70er Jahren Versuche mit ihrer Hilfe DNS und RNS in Zellen einzuschleusen (Fraley und Papahadjopoulos, 1982). Jedoch war das Verfahren aufwendig und die Effizienz gering, so dass man bald wieder das Interesse verlor. Als jedoch entdeckt wurde, dass kationische Lipidvesikel große Mengen DNS binden können, wurde Lipid/DNS-Komplexen neue Aufmerksamkeit zuteil. Sie stellen heute einen wichtigen Zweig der Entwicklung synthetischer Transfektionssysteme für die Gentherapie und für DNS-Impfstoffe dar. Es ist zu erwarten, dass synthetische Trägersysteme letztendlich in einem Großteil der Anwendungen die gegenwärtig noch bevorzugten viralen Systeme ersetzen werden, weil sie den Hauptschwierigkeiten viraler Träger (Immunogenität und die mögliche Pathogenität) auf grundsätzliche und zugleich unkomplizierte Weise beikommen.

Schon heute werden Komplexe aus kationischen Lipidvesikeln und DNS (CL/DNS-Komplexe) routinemäßig für die Transfektion von Zelllinien *in vitro* eingesetzt. Jedoch steht ihre im Vergleich zu viralen Systemen geringe Transfektionseffizienz einer breiten Anwendung *in vivo* im Weg. Eine Vielzahl von Strategien wurde versucht, um dieses Problem anzugehen, z. B. die Entwicklung verbesserten Genmaterials mit mehrfachen Kopien desselben Gens und geeigneten Promotorsequenzen um die Expression zu verbessern. Zu diesem Ansatz komplementär ist der Ansatz, Fortschritte zu erzielen durch ein tiefergehendes Verständnis der Prozesse, die zur Entstehung der Komplexe führen und sie zusammenhalten.

Eigenschaften der CL/DNS-Komplexe

CL/DNS-Komplexe bilden sich spontan, sobald eine Suspension kationischer Lipidvesikel mit ionisierter DNS zusammengebracht wird. Damit stellen sie auch ein einfach zu handhabendes Modellsystem dar, an dem sich die Selbstorganisation supramolekularer Strukturen untersuchen lässt, die in vielen Aspekten bisher unverstanden ist. Es ist anzunehmen, dass zum einen die elektrostatische Anziehung zwischen der anionischen DNS und den kationischen Lipiden in der Membran der Vesikel und zum anderen der Entropiegewinn aufgrund des Freisetzens von Gegenionen der Motor der Komplexbildung sind (Safinya et al., 1998).

Aus der Vielzahl käuflicher Lipidformulierungen, die heute für die Transfektion *in vitro* eingesetzt werden, ist in Tabelle 2 eine Auswahl aufgeführt.

Name	kationisches Lipid	Hersteller
Lipofectin	DOTMA	Life Technologies, USA
Lipofectamine	DOSPA	Life Technologies, USA
DOTAP	DOTAP	Roche, Schweiz
Transfectam	DOGS	ProMega, USA
DC-Chol	DC-Chol	Avanti, USA

Tabelle 2: einige kationische Lipidpräparationen, die kommerziell erhältlich sind und für die Transfektion *in vitro* eingesetzt werden. DOTMA = [2,3 Bis(Oleoyl)-Propyl]-Trimethyl-Ammoniumchlorid, DOSPA = 2,3 Dioleoyloxy-N-(Spermincarboxaminoethyl)-N,N-Dimethyl-1-Propanaminium, DOTAP = Dioleoyloxy-3-(Trimethylammonio)-Propan, DOGS = Dioctadecyl-Aminoglycyl-Spermin.

Zwar hat sich gezeigt, dass der Anteil des kationischen Lipids in diesen Produkten entscheidend für ihre Transfektionsfähigkeit ist, jedoch ist bis heute weitgehend unklar, wie Lipide und DNS miteinander wechselwirken.

Hingegen scheint inzwischen sicher, dass die Morphologie der Komplexe für die Transfektion wesentlich ist (Koltover et al., 1998; Ross et al., 1998). Das gegenwärtige Wissen über die Morphologie der Komplexe stützt sich weitgehend auf Untersuchungen

der fertig ausgebildeten Komplexe mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (EM), Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) und Atom-Kraftmikroskopie (AFM). Mit diesen und anderen Methoden wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Präparationen mit unterschiedlichen Strukturen untersucht und eine Reihe von Modellen entwickelt.

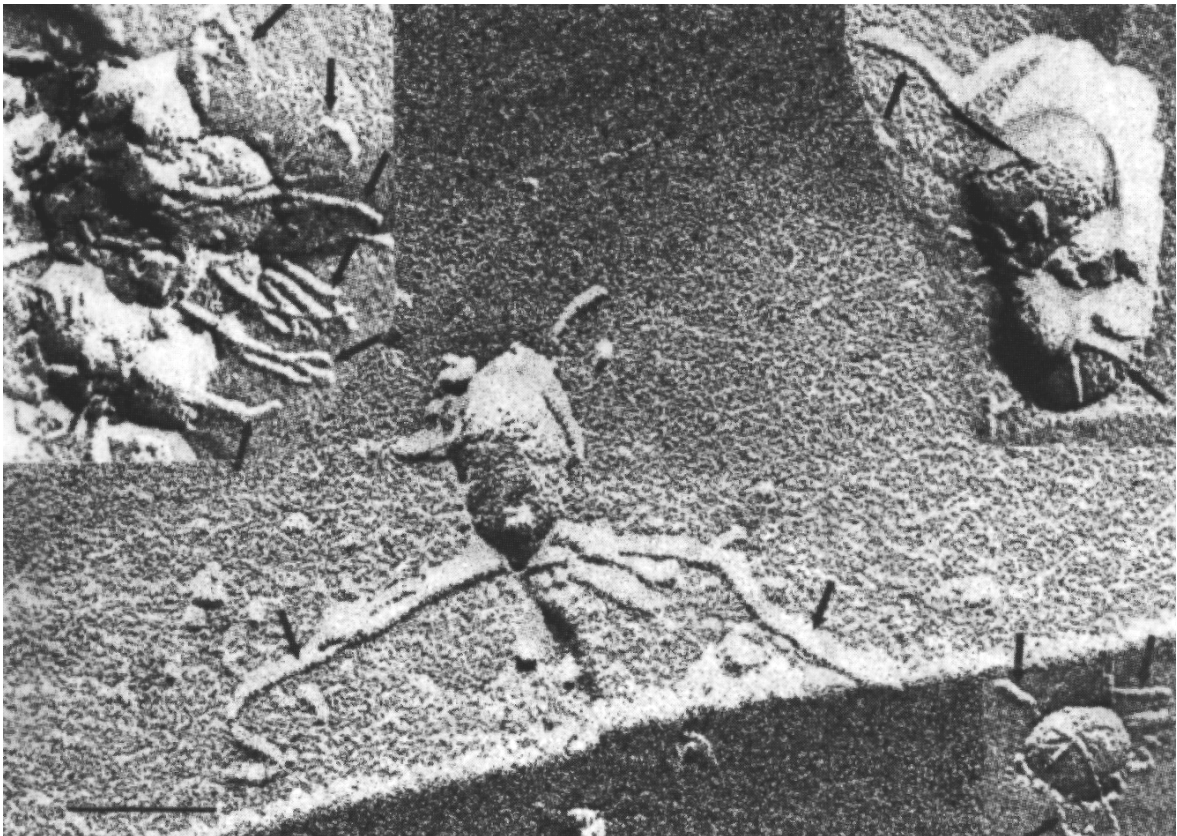


Abbildung 21: Komplexe aus Plasmid-DNS und kationische Lipidvesikel (aus einer Mischung von DC-Chol und DOPE), aufgenommen mit Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie. Der Balken entspricht 100 nm (Sternberg et al., 1994).

Sehr früh Modell vermutete man (Gershon et al., 1993), dass DNS im inneren eines großen, unilamellaren Vesikels eingeschlossen ist, das durch Fusion in der Gegenwart von DNS entstanden ist. Dies schien vor allem deshalb wahrscheinlich, weil sich herausgestellt hatte, dass die DNS nicht mehr mit Restriktionsenzymen oder interkalierenden Stoffen reagierte, sobald sie mit den kationischen Lipiden einen Komplex gebildet hatte.

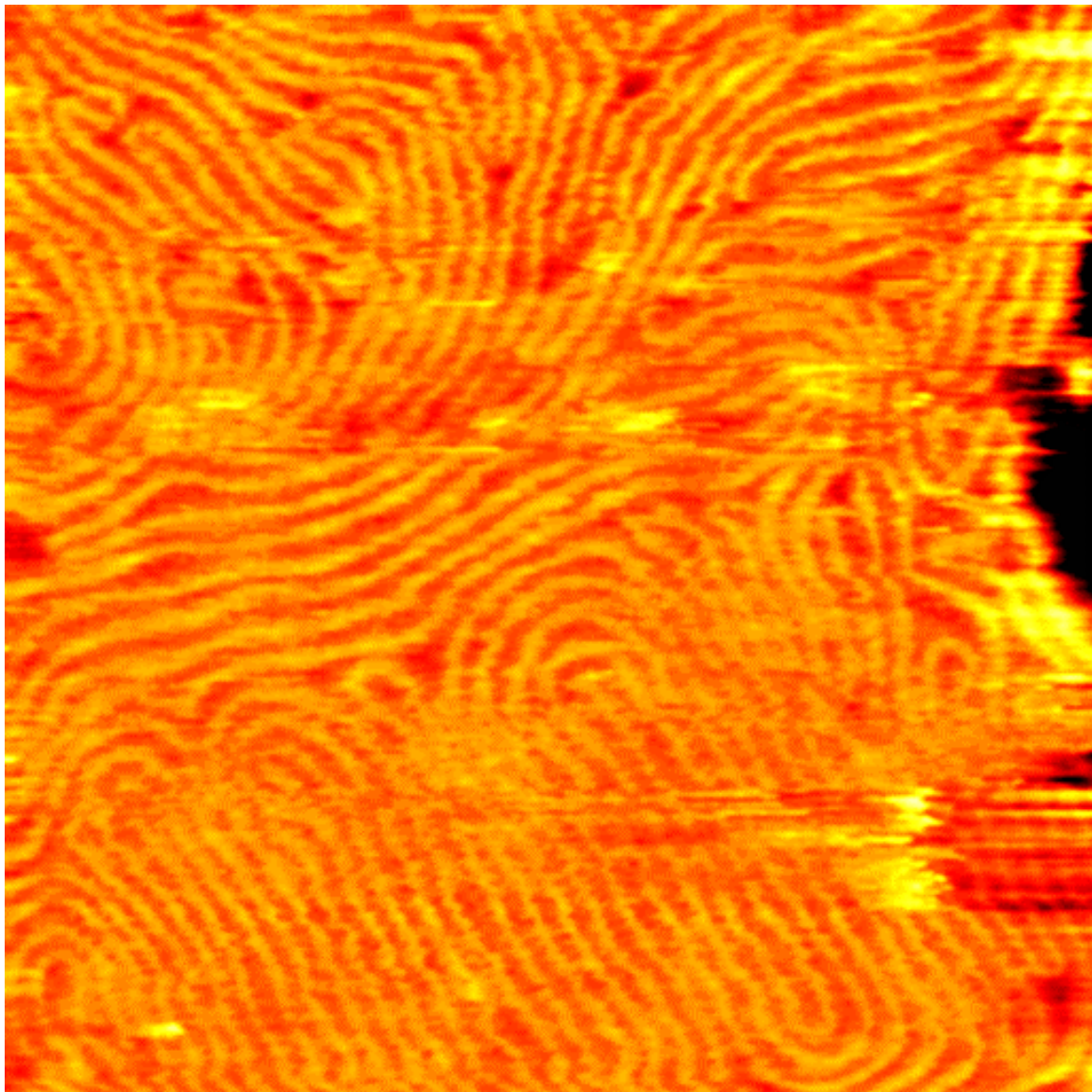


Abbildung 22: DNS, die an eine kationische Lipidschicht adsorbiert sind, bilden eine Einfachschicht nebeneinanderliegender Fäden. Der Puffer enthält 20 mM NaCl. AFM Aufnahme von Fang und Yang (Fang und Yang, 1997).

Kurze Zeit später entstand eine andere Vorstellung aufgrund von neuen gefrierbruch-elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Sternberg et al., 1994). Die Bilder zeigten faserartige Strukturen, die an globuläre Partikel angeheftet schienen (Abbildung 21). Die Partikel hielt man für aggregierte Vesikel, die Fasern für DNS-Fäden, die mit Lipiddoppelschichten umgeben waren. Darüber hinaus wurden mit Hilfe der SAXS hexagonale Lipidphasen entdeckt, bei denen DNS in den Wasserkanälen eingeschlossen war (Koltover et al., 1998).

Untersuchungen mit dem Atom-Kraftmikroskop zeigten, dass DNS auf Mica-unterstützten kationischen Lipiddoppelschichten kondensieren kann. Dabei ordnet sich die DNS auf der Membran in Form einer einfachen Schicht mehr oder weniger paralleler Fäden an (Fang and Yang, 1997). Der Interaxialabstand der Moleküle beträgt ca. 4 nm. Damit war gezeigt, dass DNS in der Gegenwart einer Lipidmatrix wohlgeordnete zweidimensionale Strukturen bilden kann. Bestimmte Lipidpräparationen können mehrschichtige Komplexe bilden, wenn sie mit DNS in Kontakt kommen.

Multilamellare Lipid/DNS-Komplexe

Das in der Literatur am meisten verbreitete Modell beschreibt diese Komplexe als multilamellare Strukturen, bei denen sich Lipiddoppelschichten mit Einfachschichten von parallel angeordneten DNS-Molekülen abwechseln (Rädler et al., 1997; Lasic and Templeton, 1997, Lasic et al. 1997). Diese Modell basiert auf SAXS- und EM-Daten. SAXS an mehreren verschiedenen CL-DNS-Systemen hat eine lange Periodizität zwischen 6 und 7 nm und eine kurze Periodizität zwischen 2.5 und 5.7 nm (Rädler et al., 1997, Lasic et al., 1997). Das legt nahe, dass die lange Periodizität einer Lipiddoppelschicht mit adsorbierter DNS-Monoschicht entspricht. Die kurze Periodizität hingegen stammt von den parallelen DNS-Helices. Rädler et al. fanden heraus, dass der Interaxialabstand der DNS-Fäden (d_{DNS} in Abbildung 27) zum einem mit zunehmen dem Gewichtsanteil von DNS in der ursprünglichen Lipid/DNS-Mischung, zum anderen mit der Vergrößerung des Anteils kationischer Lipide in der Lipidmischung sinkt, wie man anhand elektrostatische Überlegungen auch erwarten würde.

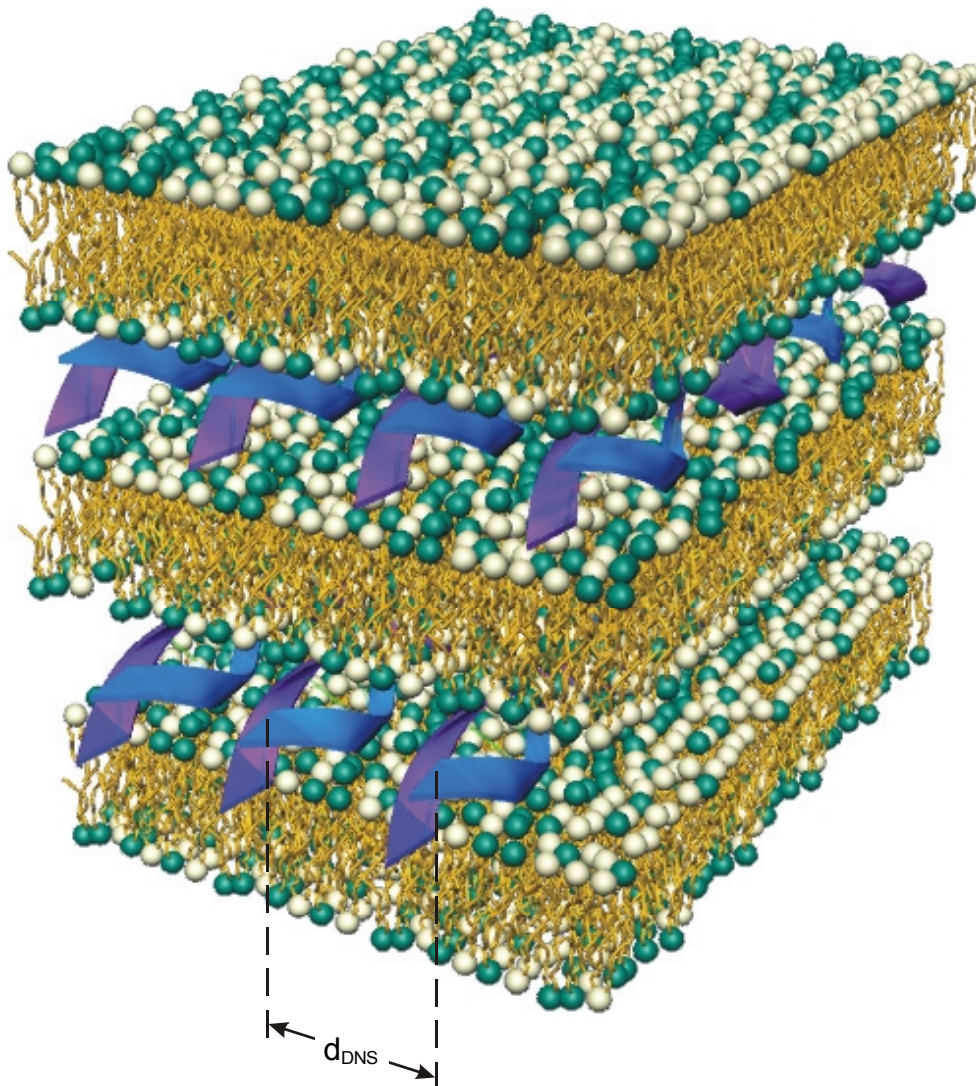


Abbildung 23: schematisches Modell eines multilamellaren CL-DNS-Komplexes. Lipiddoppelschichten wechseln sich mit DNS-Monoschichten ab. d_{DNS} bezeichnet den Interaxialabstand der DNS-Helices (Safinya, 1998).

Gentherapie

Gegenwärtig kennt man knapp 3000 Krankheiten, die durch Defekte eines einzigen Gens hervorgerufen werden. Obwohl jeder Mensch durchschnittlich ca. ein halbes Dutzend defekter Gene trägt, ist oder wird nur jeder zehnte im Verlaufe seines Lebens Opfer einer Erbkrankheit, weil die Mehrzahl der Gene, die Erbkrankheiten verursachen, rezessiv sind.

Mit Hilfe der Gentherapie verspricht man sich, genetisch bedingte Erkrankungen durch das Verpflanzen von Genen behandeln zu können. Bei der sogenannten somatischen Gentherapie soll dies geschehen, indem das korrekte Gen in möglichst viele Zellen des betroffenen Organs transfiziert wird, wo es dann die Synthese des gewünschten Genprodukts (im obigen Beispiel ein funktionsfähiger Ionenkanal) ermöglicht. Darüber hinaus wird auch versucht, die Synthese des defekten Genprodukts durch Einschleusen sogenannter Anti-Sense-DNS zu blockieren. Bei Anti-Sense-DNS handelt es sich um DNS-Einfachstränge, die zum defekten Gen komplementär sind. Dadurch, dass sie sich an das defekte Gen anlagern, behindern sie dessen Transkription. Neben der somatischen Gentherapie ist auch eine im Ansatz elegantere Keimbahntherapie denkbar, bei der nicht die Körperzellen, sondern die Keimbahnzellen (Samen- und Eizellen) transfiziert würden. Eine solche Veränderung beträfe jedoch nicht nur das behandelte Individuum, sondern auch dessen Nachkommen, weswegen diese Art der Behandlung bis auf absehbare Zeit aus ethischen Gründen ausgeschlossen ist.

Transfektionsvektoren

Einen Überblick über die gegenwärtig in der experimentellen Gentherapie eingesetzten Vektoren gibt Tabelle 3. Verglichen mit Lipid/DNS-Komplexen, die Thema dieser Arbeit sind, sind virale Systeme der klinischen Anwendung bereits wesentlich näher. Unter den viralen Vektoren sind Retroviren die am häufigsten verwendeten. Hierbei handelt es sich um RNS-Viren, die den Vorteil haben, dass sie das Gen direkt in ein Chromosom einbauen. Dies weckt jedoch auch Bedenken in Hinblick auf eine mögliche Karzinogenität. Retroviren weisen für gewöhnlich eine Transfektionseffizienz von deutlich weniger als 10 % auf. Die Transfektionseffizienz der Adenoviren, zum Beispiel der Grippevirus gehört, liegt bis zu einem Faktor 10 über der von Retroviren. Jedoch rufen Adenoviren für gewöhnlich bereits bei der zweiten Injektion eine starke Immunreaktion hervor, die in mindestens einem Fall bereits zum Tod geführt hat. Adenoviren sind daher als Vektoren höchst umstritten und zumindest für eine regelmäßig zu wiederholende somatische Gentherapie ungeeignet.

Die Transfektion mit Hilfe von Komplexen aus DNS mit Polypeptiden und kationischen Polyelektrolyte ist ebenfalls machbar. DNS kann außerdem durch den Beschuss der Zellen mit DNS-beschichteten Goldpartikeln eingeschleust werden. Selbst die Injektion hoher Dosen nackter DNS, z. B. in den Muskel, führt zur Transfektion, wenn auch mit sehr geringer Effizienz.

Transfektionsverfahren		Transfektionseffizienz
virale Vektoren	Adenoviren	sehr hoch
	Retroviren	hoch
nichtvirale Vektoren	CL/DNS-Komplexe	niedrig
	Polypeptide	niedrig
	Polyelektrolyte	niedrig
	Partikelbeschuss	niedrig
	Injektion nackter DNS	sehr niedrig

Tabelle 3: Methoden zum Gentransfer *in vivo* und *ex vivo*.

Gentherapie *in vivo*

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Wege der somatischen Gentherapie: *in vivo* und *ex vivo*. Bei der Gentherapie *ex vivo* werden zuerst Zellen aus dem Körper entnommen. Z. B. ist die Leber ein Organ, das für die Gentherapie besonders interessant ist, weil von ihr die meisten Stoffwechselerkrankungen ausgehen. Entnommene Leberzellen werden im Reagenzglas mittels eines Vektors transfiziert, in der Kulturschale vermehrt und über die Blutgefäße an die Leber zurückgegeben. Die Zellen lassen sich in der Leber nieder und stellen das Produkt des transfizierten Gens her, z. B. ein Enzym.

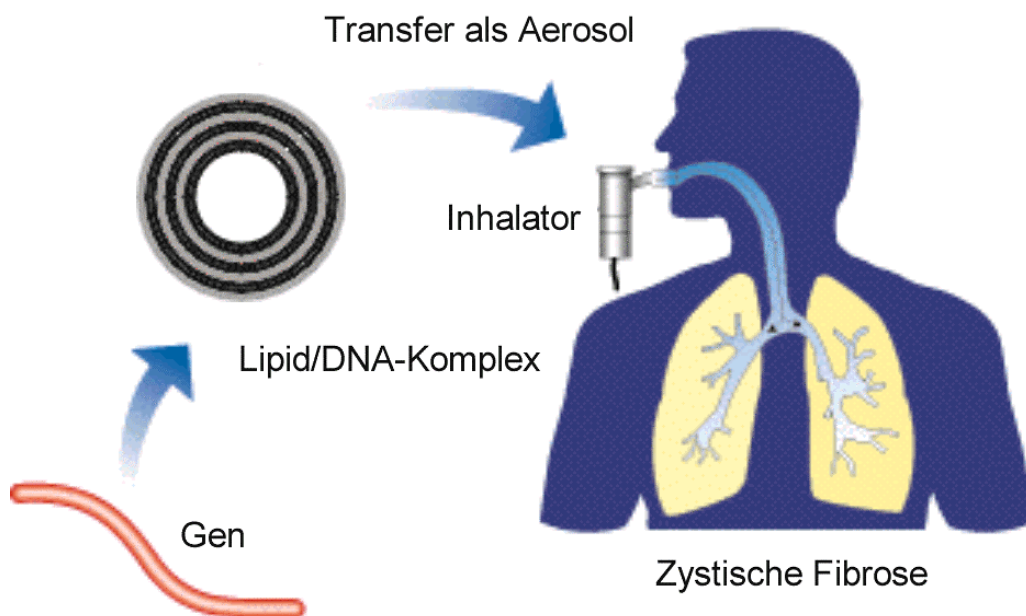


Abbildung 24: Gentherapie *in vivo* an der Lunge. Ein Spray, das den Vektor mit dem korrekten CFTR-Gen trägt wird inhaliert. Über die Atemwege erreicht der Vektor die Lungenzellen, die er mit dem Gen transfiziert. In diesem Beispiel handelt es sich bei dem Vektor um einen kationischen Lipid/DNA-Komplex. Es sind aber auch an anderen, insbesondere auf Adenoviren basierenden Systemen gearbeitet.

Zur Behandlung der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) wird intensiv an einer Therapie *in vivo* gearbeitet. Bei dieser Krankheit ist das Gen defekt, das für das Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Regulator-Protein (CFTR-Protein) eines Ionenkanal der Zellmembran

codiert. Diese Fehlfunktion führt insbesondere in der Lunge zu einer Ansammlung dickflüssigen Schleims.

Da die Schleimhautzellen der Lunge vergleichsweise einfach über die Atemwege zu erreichen sind, wird mit Aerosolen experimentiert, die einen Genvektor enthalten. Bevorzugt werden Adenoviren und CL/DNS-Komplexen verwendet. Adenoviren wären prinzipiell besonders gut für eine Gentherapie an der Lunge geeignet, weil sie auch natürlicherweise Zellen der Lunge infizieren und deshalb eine hohe Transfektionseffizienz aufweisen. Schwierigkeiten machen jedoch die für Adenoviren üblichen schweren Nebenwirkungen, insbesondere Lungenentzündungen.

Die beschriebenen Probleme in Bezug auf Pathogenität und Immunantwort ließen sich umgehen, wenn es gelänge, künstliche Viren herzustellen, anstatt auf veränderte natürliche Viren zurückgreifen zu müssen. CL/DNS-Komplexe stellen einen ersten Schritt in diese Richtung dar. Tatsächlich weisen viele bekannte CL/DNS-Systeme eine sehr geringe Toxizität und Immunogenität auf. Außerdem unterliegt man mit CL/DNS-Komplexen nicht der Beschränkung der natürlichen Vektoren in Bezug auf die Größe des einzuschleusenden DNS-Fragments. All diese Faktoren sind essentiell für eine erfolgreiche medizinische Anwendung. Jedoch ist die Transfektionseffizienz dieser Systeme heute den viralen Systemen noch um Größenordnungen unterlegen. Ein besseres Verständnis der grundlegenden Wechselwirkungen zwischen kationischen Lipiden und der DNS kann Anhaltspunkte für die Entwicklung besserer Systeme geben.

TEIL 2

Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) ist eine Standardmethode zur Untersuchung biologischer Makromoleküle und Molekülkomplexe in beinahe nativem Zustand (Dubochet et al., 1988). Zur Untersuchung der CL/DNS-Komplexe wird eine Suspension der Komplexe in einem dünnen Lösungsfilm in flüssigem Ethan schockgefroren. Dies geschieht so schnell, dass sich keine Eiskristalle bilden, sondern ein amorpher (vitrifizierter) Film mit den eingebetteten CL/DNS-Komplexen entsteht, der hochaufgelöste TEM-Untersuchungen erlaubt.

Streukontrast und Phasenkontrast

Die Bilder in dieser Arbeit wurden mit einem Phillips CM 120 Biofilter Mikroskop aufgenommen, das mit einem Phosphorschirm und einer CCD-Kamera ausgestattet ist (Grimm, 1998). Zur Verbesserung der Bildqualität ist der Kamera ein Energiefilter vorgeschaltet. Das Objekt wird mit 120 kV Elektronen durchstrahlt. Der Bildkontrast ist eine Folge der Streuprozesse, die bei der Wechselwirkung zwischen abbildendem Elektronenstrahl und Objekt auftreten. Man unterscheidet zwischen dem Streu- und dem Phasenkontrast (Reimer, 1989).

Der Streukontrast entsteht dadurch, dass eine Kontrastblende Elektronen, die vom Objektpunkt in den Bereich außerhalb der Blende gestreut werden, ausblendet. Je stärker ein Objektpunkt streut, desto mehr Elektronen werden ausgeblendet. Die Intensität fällt dabei exponentiell mit der Massendichte (dem Produkt aus Elektronendichte und Dicke des Objektbereichs) ab.

Phasenkontrast entsteht durch die Überlagerung der ungestreuten Elektronen mit den elastisch gestreuten Elektronen, welche die Objektivblende passieren. Letztere erfahren in der Probe eine Phasenverschiebung. In Lichtmikroskopen wird zum Sichtbarmachen der Phasenkontraste eine Phasenplatte eingesetzt, die eine weitere Phasenverschiebung von 90° zwischen gebeugtem und ungebeugtem Strahl erzeugt. Beim Transmissions-Elektronenmikroskop haben eine Defokussierung der Objektivlinse und die Phasenverschiebungen, die durch Abbildungsfehler der Elektronenlinsen zustande kommen, eine entsprechende Wirkung. Die hier abgebildeten Cryo-TEM Bilder wurden mit einer Defokussierung von $1 \mu\text{m}$ aufgenommen.

Energiefilter

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen hat man mit zwei wesentlichen Schwierigkeiten zu kämpfen: Erstens ist die Abbildung aufgrund der Ähnlichkeit der Elektronendichten von Lipiden, DNS und Eis recht kontrastarm. Zweitens sind die

Komplexe sehr strahlenempfindlich, weswegen mit einer sehr niedrigen Dosis von weniger als 10 Elektronen pro \AA^2 gearbeitet werden muss. Zur Erhöhung der Abbildungsqualität wurden die Elektronen deshalb energiegefiltert, bevor sie die CCD-Kamera erreichen (de Jong et al., 1996). Die inelastisch, d. h. mit Energieverlust, gestreute Elektronen dabei entfernt, was zu einer Erhöhung des Abbildungscontrastes führt. Zusätzlich wird auch die Auflösung der Abbildung erhöht, da inelastisch gestreute Elektronen aufgrund der chromatischen Aberration eine „Verschmierung“ der Bildpunkte zur Folge haben.

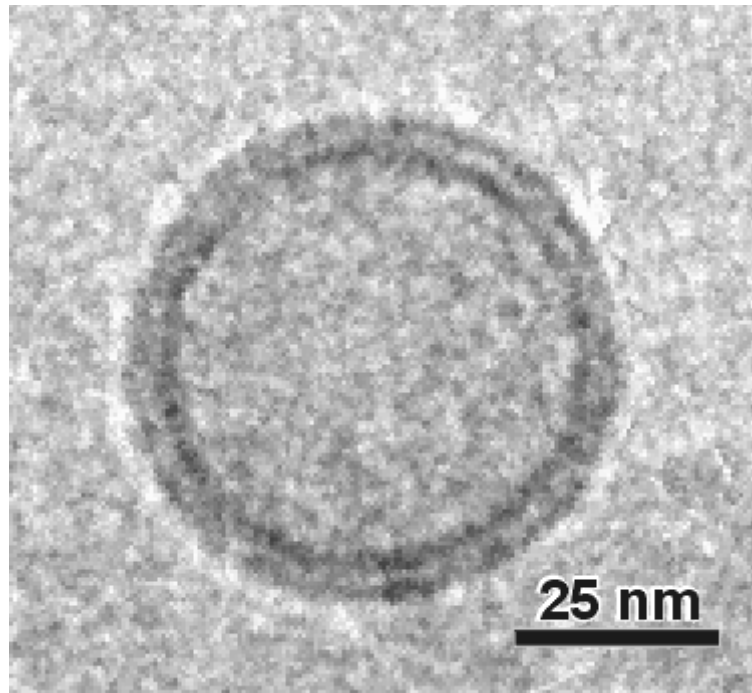


Abbildung 25: Aufnahme eines DMPC/DC-Chol Vesikels mit dem Cryo-Transmissionselektronenmikroskop bei einem Vergrößerungsfaktor von 55 000. Das Vesikel hat einen Durchmesser von ca. 65 nm, die Membrandicke beträgt knapp 8 nm. Die zwei dunklen Ringe im Membranbereich korrespondieren mit den Kopfgruppenbereichen der Lipiddoppelschicht, der hellere Ring dazwischen entspricht dem Bereich der Fettsäureketten.

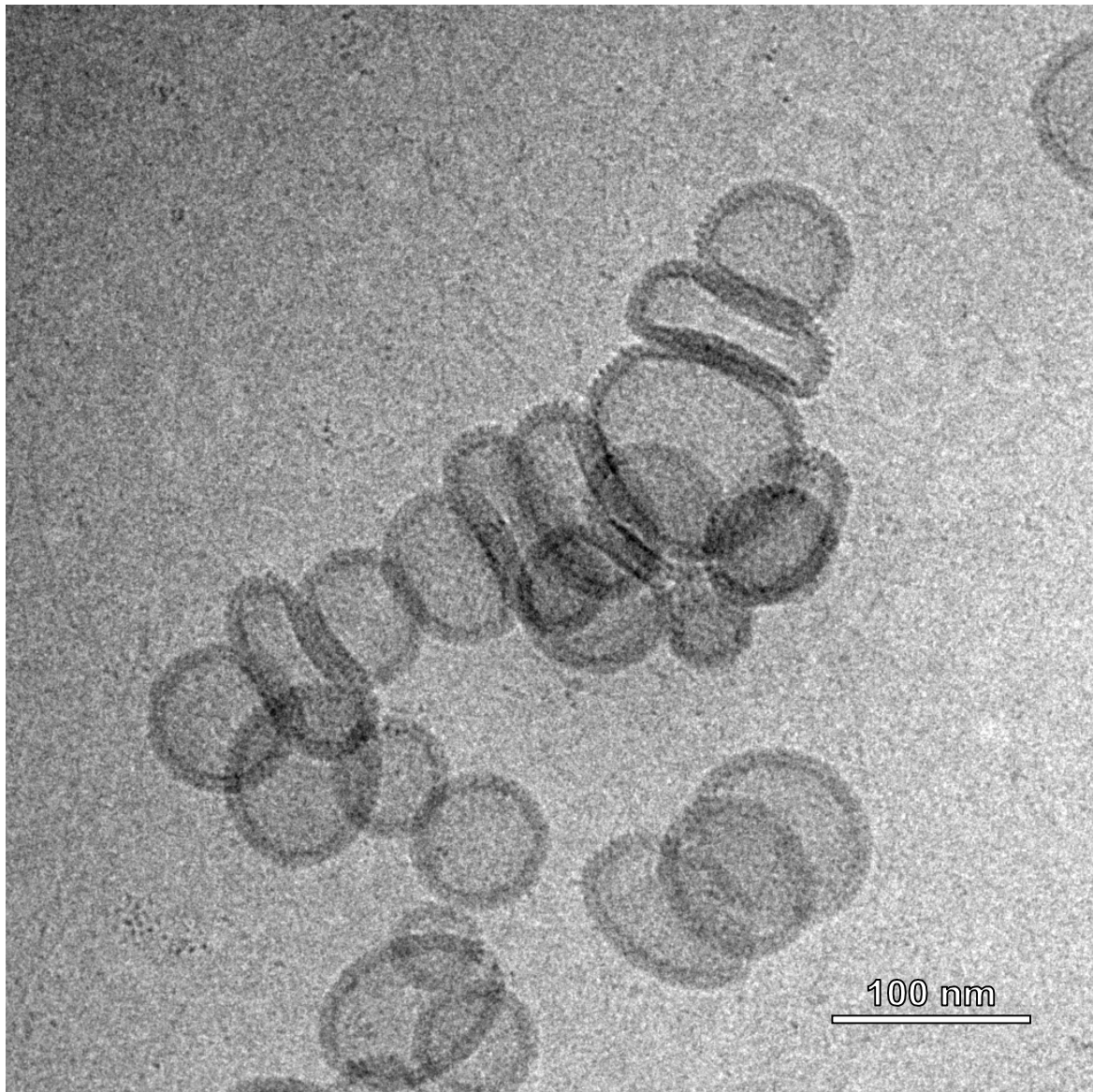


Abbildung 26: cryo-transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerungsfaktor 55 000) einer Traube von DNS umspinnenen DMPC/DC-Chol Vesikeln. Die kleineren Vesikel haben in etwa Durchmesser von 65 nm. Man kann die DNS-Fäden sehr deutlich an den Rändern der Vesikel und als ein die Vesikeln überlagerndes Muster erkennen. Das Liniennetz im umgebenden Eis rührt ebenfalls von DNS-Fäden her.

Als Beispiel zeigt Abbildung 25 ein kationisches Lipidvesikel, das auf die beschriebene Weise aufgenommen wurde. Der Vergrößerungsfaktor betrug 55 000. Deutlich ist die doppelschichtige Struktur der weniger als 8 nm dicken Lipidmembran zu sehen. Dunkle Ringe zeigen die relativ hohe Elektronendichte der Kopfgruppen der Lipide an. Die Tiefenschärfe des Mikroskops ist wesentlich größer als der Durchmesser des Vesikels (ca. 65 nm), so dass das gesamte Vesikel scharf auf die Abbildungsebene projiziert wird.

In Abbildung 26 ist eine Traube von Vesikeln der gleichen Zusammensetzung wie in Abbildung 25 zu sehen, die diesmal mit einer Schicht paralleler DNS-Fäden umspinnen sind. Besonders am Rand der Vesikel sind die einzelnen DNS-Fäden zu erkennen, deren Interaxialabstand von durchschnittlich ca. 4 nm noch deutlich aufgelöst wird.

Röntgenreflektometrie

Die Röntgenreflektometrie ist ein oberflächensensitives Verfahren, bei dem Röntgenstrahlen unter einem kleinen Winkel (in der Größenordnung von mrad) an einer Oberfläche reflektiert werden. Aus der Intensität des reflektierten Strahls (in Abhängigkeit von Energie und Einfallswinkel) zieht man Rückschlüsse über den Schichtaufbau bis zu einer Tiefe von ca. 100 nm senkrecht zur Grenzfläche (Russell, 1990; Als-Nielsen, 1990; Als Nielsen and Möhwald, 1991).

Das Wachstum der CL/DNS-Komplexe findet an der Grenzfläche zwischen dem Komplex und der Suspension statt, die das „Baumaterial“ in Form von DNS und Lipidvesikeln liefert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Langmuirfilm an der Oberfläche der Suspension als Substrat für die Komplexbildung benutzt. Dadurch wurde die Grenzfläche, an der das Wachstum geschieht in die Nähe der Flüssigkeitsoberfläche verlegt, wo sie für die Röntgenreflektometrie zugänglich war. Die Adsorption der DNS und weiterer Lipidschichten konnte so detailliert mit beinahe molekularer Auflösung untersucht werden.

Reflektometer

In Abbildung 27 ist der prinzipielle Aufbau des verwendeten Reflektometers dargestellt. Als Röntgenquelle dient eine versiegelte 3 kW Molybdän-Röhre. Ein Reinstgermaniumdetektor (Silena, Mailand), der sich durch eine hohe Energieauflösung auszeichnet, wird zur Analyse des reflektierten Strahls verwendet. Der Strahl wird durch horizontale (20-100 μm) und vertikale (8 mm) Blenden definiert. Zur Einstellung von Einfalls- und Ausfallswinkel sind Quelle und Detektor sowie die ihnen zugeordneten Blenden auf Gongiometern montiert. Probe und Detektor sind außerdem auf Hubtischen aufgesetzt. Der Langmuirtrog befindet sich in einer luftdichten Probenkammer, um Verdunstung der Flüssigkeit zu verhindern. Mylarfenster in der Probenkammer ermöglichen einen ungehindertes Ein- und Austreten des Röntgenstrahls (Metzger et al, 1994, Vierl et al, 1995).

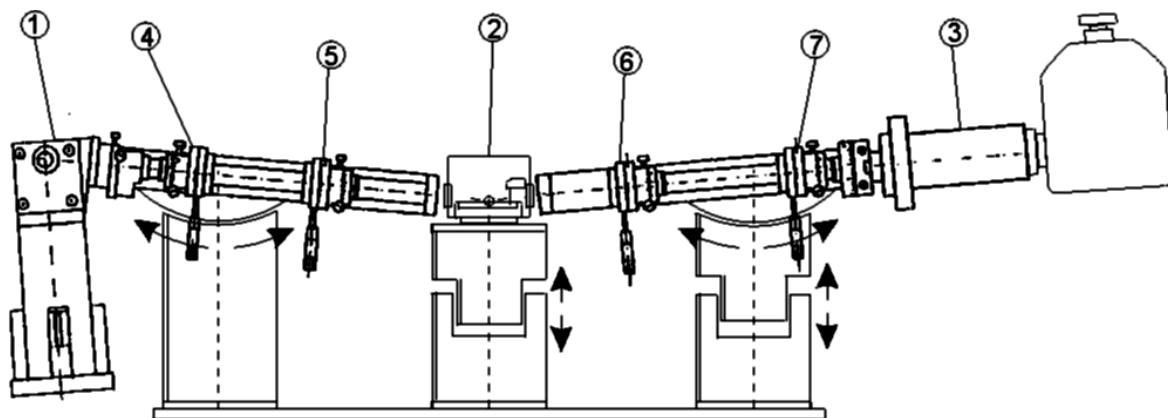


Abbildung 27: Aufbau des Reflektometers. Hauptbaugruppen sind die Röntgenröhre (1), die Probenkammer mit dem Langmuirtrog (2), der stickstoffgekühlte Festkörperdetektor (3) sowie vier Kreuzschlitzblenden (4 bis 7). Quelle und Detektor sind zusammen mit ihren zugeordneten Blenden auf Schienen montiert. Mit Schrittmotoren werden die Schienen gekippt, um Ein- und Ausfallswinkel einzustellen. Probenkammer und Detektorseite können auch in der Höhe positioniert werden.

Als Beispiel für eine Reflektivitätsmessung zeigt Abbildung 28 die Reflektivität eines Langmuirfilms mit adsorbierter DNS-Schicht. Die Reflektivität gibt Aufschluss über den Verlauf der Elektronendichte $\rho(z)$ in Abhängigkeit von der Tiefe z . Da die Elektronendichte wiederum charakteristisch für die molekulare Zusammensetzung der Grenzschicht ist, lernt man so etwas über deren Aufbau.

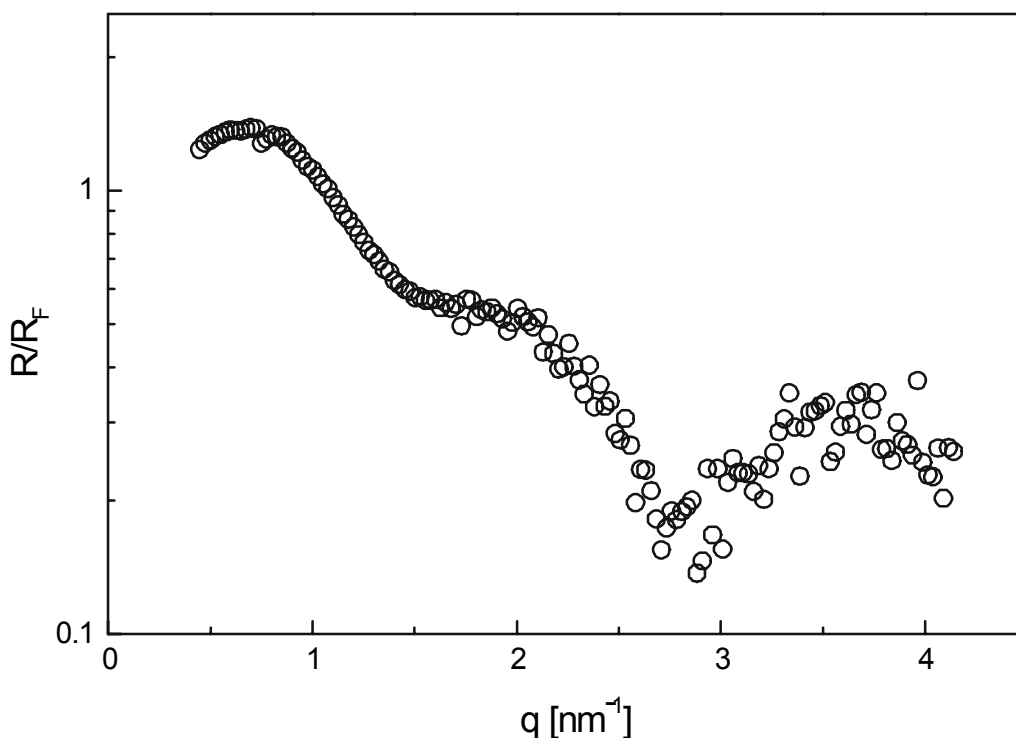


Abbildung 28: gemessene Reflektivität R einer Lipidmonoschicht mit adsorbierter DNS-Schicht. Zur besseren Darstellung der Details ist R durch die Reflektivität einer ideal glatten Wasser/Luft-Grenzfläche (Fresnelreflektivität R_F , Abbildung 29) geteilt. So werden nur die Abweichungen von der Fresnelreflektivität dargestellt. q ist der Wellenvektorübertrag, wie weiter unten in Gleichung 2 definiert.

Zwar lässt sich bei bekanntem Elektronendichteprofil $\rho(z)$ die Reflektivität vorhersagen. Leider ist es jedoch nicht möglich, umgekehrt aus der gemessenen Reflektivität eindeutig das zugrundeliegende Elektronendichteprofil zu berechnen. Der Grund ist, dass zwar die Intensität, nicht jedoch die Phase des gestreuten Röntgenlichts bekannt ist. Eine Rekonstruktion der Streuphasen, etwa durch anomale Dispersion, ist aufwendig und mit experimentellen Einschränkungen verbunden. Zur Lösung des Problems wird daher in der Regel ein anderer Weg verfolgt. Ausgangspunkt ist ein Modell des

Elektronendichteprofil, von dem man annimmt, dass es dem tatsächlichen Profil bereits nahe kommt. Aus dem Modellprofil wird die Modellreflektivität berechnet. In einem iterativen Prozess verändert man die Modellparameter solange, bis die Modellreflektivität sich mit der gemessenen Reflektivität innerhalb der Messgenauigkeit deckt.

In den folgenden zwei Absätzen wird erläutert, wie aus einem gegebenen Modell-Elektronendichteprofil die entsprechende Modellreflektivität berechnet wird.

Reflexion an einer Oberfläche: Fresnelreflektivität

Wird eine ebene Welle im Vakuum

$$\Phi = a \cdot e^{i\vec{k}\vec{r}} \quad \text{mit} \quad |\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad \text{ebener Welle}$$

beim Auftreffen auf die ebene Grenzfläche eines Mediums spekulär reflektiert, ändert sich die Richtung des Wellenvektors \vec{k} und es kommt zu einem Wellenvektorübertrag

$$\vec{q} = \vec{k}_{\text{reflektiert}} - \vec{k}_{\text{einfallend}}$$

$$(2) \quad q \equiv |\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\alpha) . \quad \text{Wellenvektorübertrag}$$

Mit α ist der Ein- und Ausfallswinkel des Strahls, mit λ die Wellenlänge bezeichnet. Bereits hieraus erkennt man, dass diese Art der Röntgenreflektometrie nur Aufschluss über die Struktur *senkrecht* zur Reflexionsebene gibt.

Anders als bei sichtbarem Licht, ist für Röntgenlicht Materie gegenüber dem Vakuum das optisch dünnere Medium, d. h. der Brechungsindex n ist kleiner als 1:

$$n = 1 - \delta = 1 - \frac{\lambda^2 \rho r_0}{2\pi} \quad \text{Brechungsindex}$$

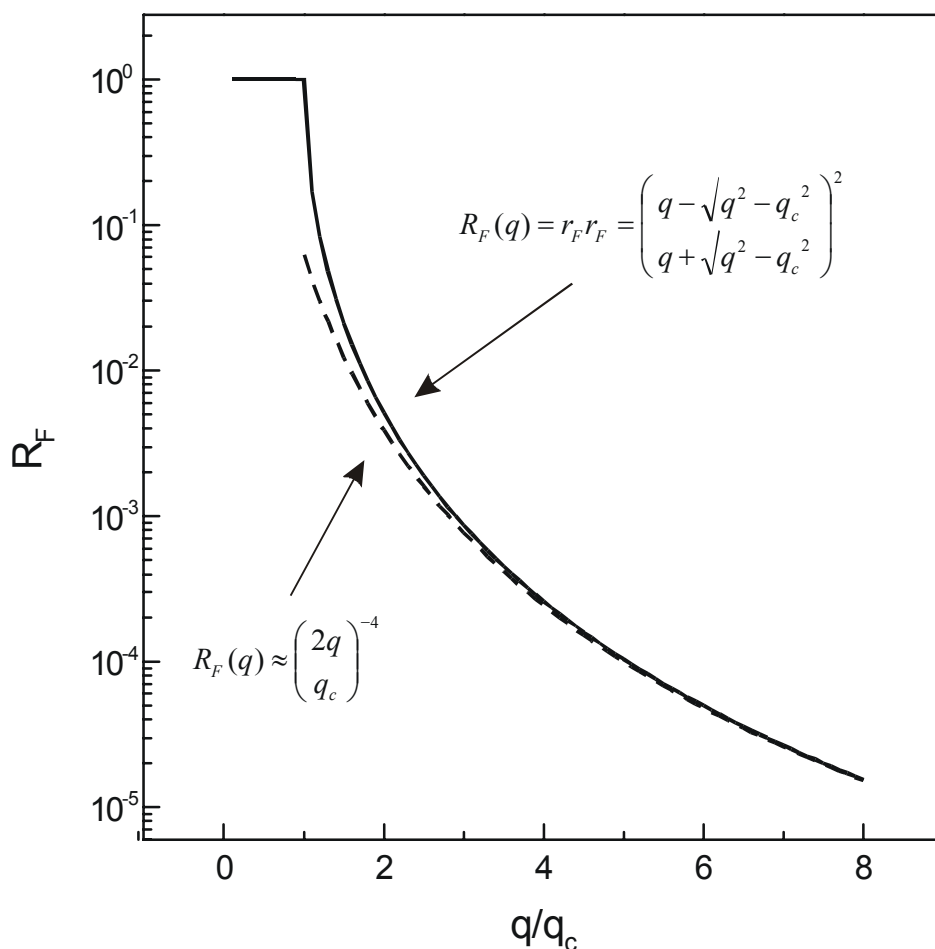


Abbildung 29: Fresnelreflektivität. Der Wellenvektorübertrag ist in Einheiten des kritischen Wellenvektorübertrags q_c aufgetragen. Bei $q < q_c$ liegt Totalreflexion vor, für große q nähert sich die Kurve der Funktion

$$R_F(q) \approx \left(\frac{2q}{q_c} \right)^{-4} .$$

(r_0 ist der klassische Elektronenradius $r_0 = 2.82 \cdot 10^{-15}$ m). Das heißt, die Abweichung des Brechungsindex von 1, δ , hängt sowohl von der Elektronendichte ρ des Mediums, als auch von der Wellenlänge λ des Röntgenlichts ab. Typischerweise liegt δ in der Größenordnung von 10^{-5} . Ein Brechungsindex der kleiner als 1 ist bedeutet, dass Totalreflexion auftreten kann, wenn α kleiner ist als der kritische Totalreflexionswinkel

$$\alpha_c = \sqrt{2\delta} . \quad \text{kritischer Totalreflexionswinkel}$$

Für die k_α -Linie (ca. 17 keV) der in unserem Aufbau verwendeten Molybdän Röntgenröhre liegt α_c bei 1.23 mrad. Eine bequemere (weil bei kleinen α_c von λ unabhängige) Größe ist der kritische Wellenvektorübertrag

$$(3) \quad q_c = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\alpha_c) \cong 4\sqrt{\pi\rho r_0} . \quad \text{kritischer Wellenvektorübertrag}$$

Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Reflektivität einer ideal glatten Oberfläche. Sie folgt jenseits der Totalreflexionskante ($q > q_c$) der Funktion

$$(4) \quad R_F(q) = r_F \bar{r}_F = \left(\frac{q - \sqrt{q^2 - q_c^2}}{q + \sqrt{q^2 - q_c^2}} \right)^2, \quad \text{Fresnelreflektivität}$$

die mit der Näherung $\sin(\alpha) \cong \alpha$ für die hier vorkommenden kleinen Winkel direkt aus dem fresnelschen Gesetz und (3) folgt.

Reflexion an einem Elektronendichteprofil: Parrattverfahren

Bei den Lipidfilmen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, haben wir es nicht, wie im vorherigen Paragraph zunächst angenommen, mit einem homogenen Medium einheitlicher Elektronendichte zu tun. Vielmehr ist die Elektronendichte eine Funktion des Abstands von der Oberfläche $\rho(z)$. In Abbildung 30 ist als Beispiel die Elektronendichteprofil einer Lipidmonoschicht mit einer Schicht adsorbierter DNS-Fäden dargestellt.

Die Reflektivität solcher Systeme lässt sich mit Hilfe des iterativen Verfahrens von Parratt berechnen. Dazu wird das stetige Profil zunächst in eine Abfolge von N Schichten gleicher Dicke aber unterschiedlicher Elektronendichte zerlegt (Abbildung 31). An jeder der so entstandenen Grenzflächen tritt Reflexion auf. Aus der Überlagerung der Reflektivitäten von allen Grenzflächen ergibt sich die Reflektivität am gesamten Elektronendichteprofil.

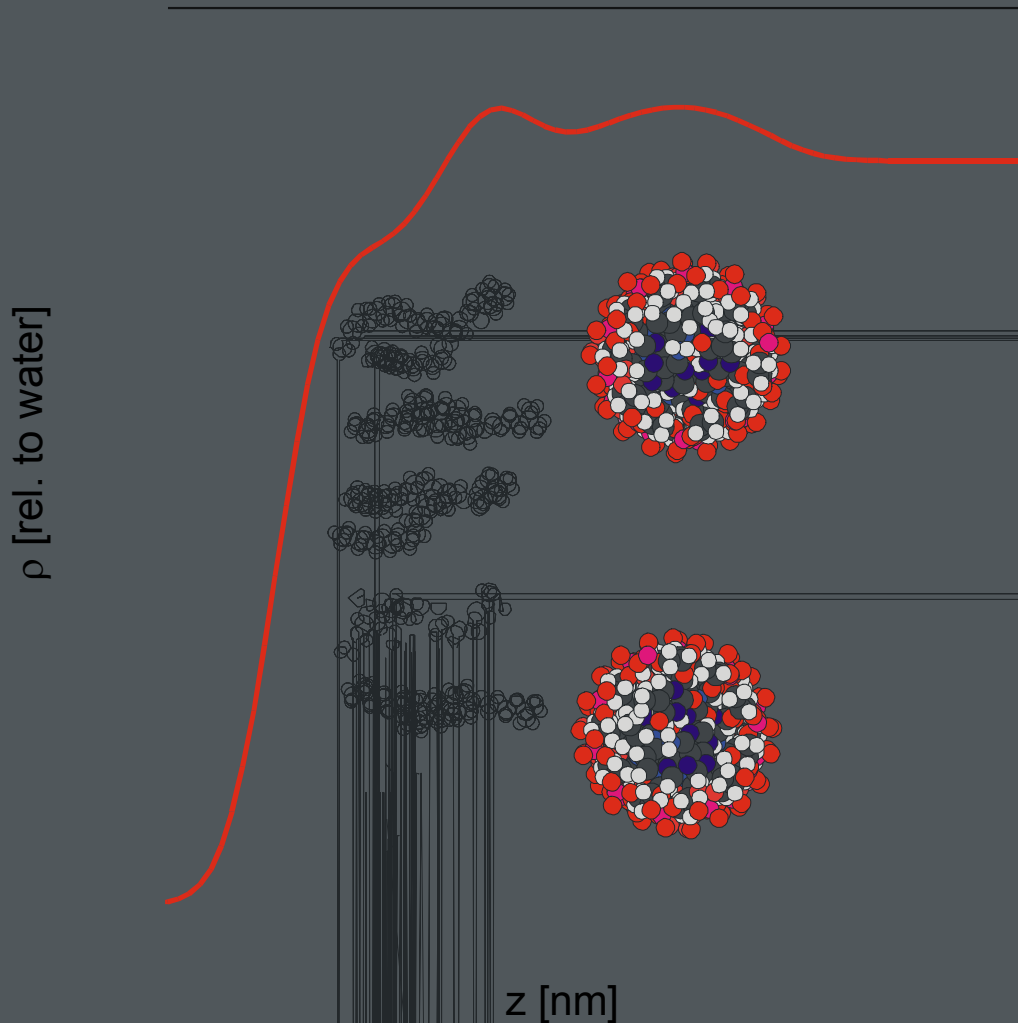


Abbildung 30: das Elektronendichteprofil einer Langmuirschicht aus den Lipiden DMPC und DC-Chol (links) mit adsorbierter DNS-Schicht (rechts zwei DNS-Fäden im Querschnitt) zeigt zwei Maxima: eines im Bereich der Lipidköpfe, und eines bei der angelagerten DNS-Schicht.

Im Folgenden sind die Schichten mit dem Index i nummeriert, wobei $i = N+1$ das Substrat und $i = 0$ das Vakuum bezeichnet, aus dem der Strahl eintritt. Die Komponente des Wellenvektors senkrecht zur Oberfläche k_i^z in der Schicht i mit der Dichte ρ_i ist gegeben durch

$$k_i^z(q) = \frac{1}{2} \sqrt{q^2 - 16\pi\rho_i r_0} \cong \frac{1}{2} \sqrt{q^2 - q_{c,i}^2} . \quad \begin{array}{l} z\text{-Komponente des Wellenvektors in} \\ \text{Schicht } i \end{array}$$

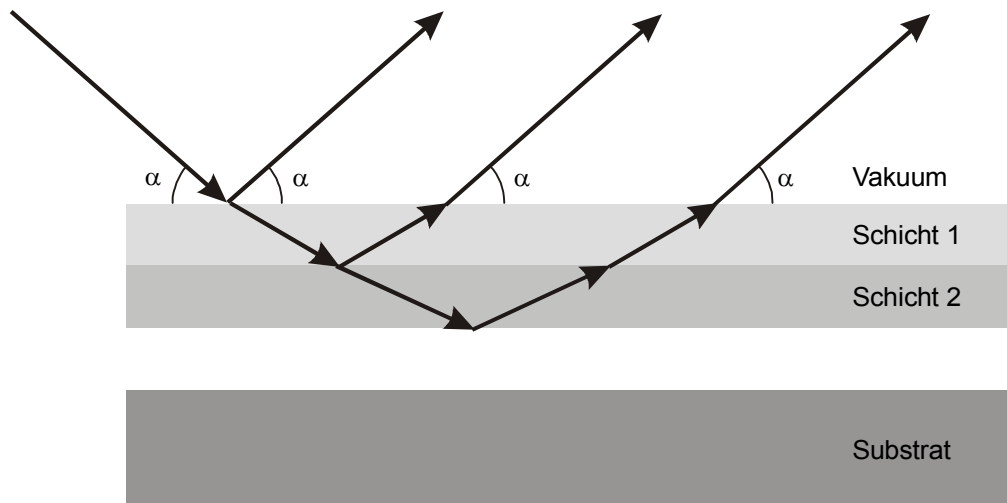


Abbildung 31: ein Röntgenstrahl wird an einem System von N Schichten gleicher Dicke aber unterschiedlicher Elektronendichte reflektiert.

Hier ist q der Wellenvektorübertrag im Vakuum aus (2) und $q_{c,i}$ der für kleine Winkel genäherte kritische Wellenvektorübertrag in der Schicht i :

$$q_{c,i} = \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha_{c,i}) \cong 4\sqrt{\pi\rho_i r_0} \quad \text{kritischer Wellenvektorübertrag in Schicht } i$$

Der Reflexionskoeffizient r_i an der Grenzfläche zwischen Schicht $i-1$ und i ist wiederum durch die Fresnelformel gegeben, die sich, analog zu (4), für kleine Winkel jenseits der Totalreflexionskante liest wie:

$$r_i(q) = \frac{k_{i-1}(q) - k_i(q)}{k_{i-1}(q) + k_i(q)} \quad \text{Fresnelreflexionskoeffizient an Schicht } i$$

Aus den so berechneten Teilreflektivitäten ergibt sich die Gesamtrefektivität durch phasenrichtige Summation der einzelnen Beiträge. Ist d_0 die Dicke der einzelnen Schichten, ergibt sich für den Reflexionskoeffizienten an der Schichten N und darunter:

$$r'_N(q) = \frac{r_N(q) + r_{N+1}(q) \cdot \exp(2id_0 k_N(q))}{1 + r_N(q) \cdot r_{N+1}(q) \cdot \exp(2id_0 k_N(q))} \quad \text{Reflexionskoeffizient ab Schicht } N$$

r'_N schließt interne Reflexionen an den Grenzen zwischen den Schichten $N-1$ und N sowie N und dem Substrat ($N+1$) ein. Rekursiv erhält man hieraus die Reflexion an der Schicht $N-1$ und darunter:

$$r'_{N-1} = \frac{r_{N-1}(q) + r'_N(q) \exp(2idk_{N-1}(q))}{1 + r_{N-1}(q) \cdot r'_N(q) \exp(2idk_{N-1}(q))} \quad \text{Reflexionskoeffizient ab Schicht } N-1$$

Nach N dieser Schritte gelangt man so zum Gesamreflexionskoeffizienten r'_1 und von dort zur Gesamreflektivität

$$R(q) = r'_1(q) \cdot \bar{r}'_1(q). \quad \text{Gesamreflektivität}$$

Abbildung 32 zeigt die Reflektivität, so mittels obiger Gleichungen aus dem Elektronendichteprofil in Abbildung 30 errechnet wurde.

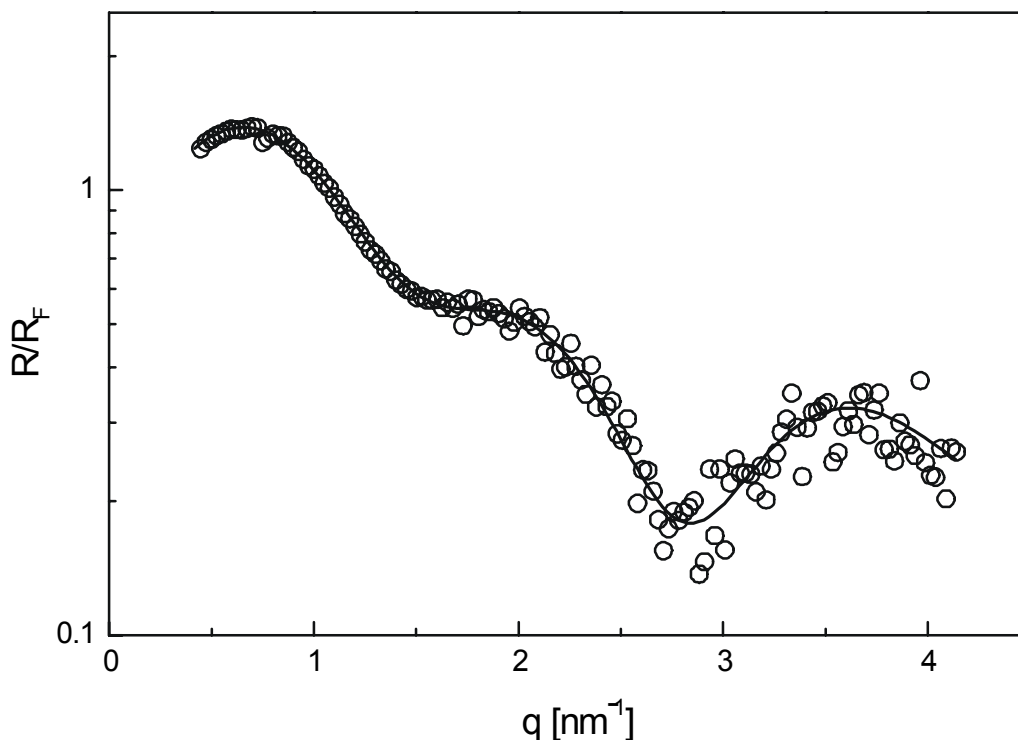


Abbildung 32: Die durchgezogene Kurve zeigt die Modellreflektivität, die mit Hilfe des Parrattverfahrens aus dem Elektronendichteprofil in Abbildung 30 berechnet wurde. Sie stimmt sehr gut mit der experimentellen Reflektivität von Abbildung 28 (O) überein, die an einem realen Langmuirfilm mit adsorbierter DNS-Schicht gemessen wurde.

Kohärente vs. inkohärente Superposition

Bisher wurde stillschweigend davon ausgegangen, dass die Schichtstruktur, durch welche die Reflektivität hervorgerufen wird, innerhalb der einzelnen Schichten (also senkrecht zu z) homogen ist. Das ist im realen System natürlich nicht der Fall. Die Lipidschicht besteht aus einzelnen Lipidmolekülen, die eine zweidimensionale Matrix bilden. Genauso besteht die adsorbierte DNS-Schicht aus einzelnen DNS-Fäden, die auch senkrecht zur z -Achse eine räumliche Ausdehnung haben. Insbesondere werden im experimentellen Teil dieser Arbeit auch multilamellare CL/DNS-Komplexe an der Wasser/Luft-Grenzfläche mit Hilfe des Röntgenreflektometers untersucht. Solche Strukturen bestehen aus vielen benachbarten Domänen mit unterschiedlicher Zahl von Lamellen. Entsprechend hat die gemessene Reflektivität immer Beiträge von den unterschiedlichen Domänen. Abhängig von der lateralen Ausdehnung solcher Domänen ist die Überlagerung der Beiträge entweder kohärent oder inkohärent. Sind die Domänen klein im Vergleich zur Kohärenzlänge des verwendeten Röntgenlichts, so ist die sich ergebende Gesamtreflektivität die der lateral gemittelten Elektronendichte (kohärente Überlagerung). Sind die Domänen hingegen größer als die Kohärenzlänge, kommt es zu inkohärenter Überlagerung. In diesem Fall ist die gemessene Reflektivität die gewichtete Summe der Reflektivitäten der verschiedenen Domänen. Jedoch ergeben kohärente und inkohärente Überlagerung nur dann deutlich unterschiedliche Ergebnisse, wenn die Domänen mindestens zweier Sorten jeweils mehr als ca. 5 % der Oberfläche bedecken.

Die Kohärenzlänge des hier verwendeten Röntgenlichts liegt in der Größenordnung von einigen μm (Salditt et al., 1994). Um die Größe der Domänen abzuschätzen, muss auf ein Ergebnis der folgenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen vorausgegriffen werden. Diese zeigen, dass multilamellare Komplexe im vorliegenden System dadurch entstehen, dass Vesikel aus der Suspension an das Substrat adsorbieren, und dabei ihre Lipidschicht auf dem Substrat ausbreiten. Die ausgebreitete Oberfläche eines 65 nm Vesikel hat eine Ausdehnung von ca. $4.2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$, also mehrere Größenordnung unterhalb des kritischen Wertes. Entsprechend wird im Folgenden immer von einer kohärenten Überlagerung ausgegangen.

Die Elektronenmikroskopbilder zeigen jedoch auch, dass sich geschlossene Stücke adsorbierter Membran bilden können, die Oberflächen größer als die eines einzigen

Vesikels aufweisen. Der hydrophobe Effekt könnte ein Erklärung für dieses Phänomen geben: am Rand jedes adsorbierten Lamellenstückes sind die hydrophoben Kettenregionen der Lipide dem Lösungsmittel ausgesetzt, was energetisch ungünstig ist. Durch die Bildung größerer Flecken kann das Rand/Oberfläche-Verhältnis minimiert werden. Es ist daher denkbar, dass zumindest im fortgeschrittenen Stadium der Multischichtenbildung einige Domänen in ihrer Größe an die Kohärenzlänge heranreichen. Solange der Anteil dieser Domänen jedoch unter 5 % liegt, hat dies keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Analyse. Ist der Anteil größer, wäre auch inkohärente Überlagerung zu berücksichtigen. Für solch eine Analyse müssten in das verwendete Modell jedoch zusätzliche Annahmen aufgenommen werden, wovon hier abgesehen wurde.

Anpassung an Modelle

Zur Bestimmung des Elektronendichteprofiles wird ein Satz von unabhängigen Modellparametern \vec{a} variiert und so die Differenz zwischen den berechneten und gemessenen Reflektivitäten minimiert:

$$\chi(\vec{a})^2 = \frac{1}{N_{\text{Messpunkte}} - N_{\text{Parameter}}} \sum_{j=1}^{N_{\text{Messpunkte}}} \left(\frac{R_j - R(q_j, \vec{a})}{\sigma_j} \right)^2 \rightarrow 0$$

Die R_j sind die bei den Wellenvektorüberträgen q_j gemessenen Reflektivitäten, σ_j deren Fehler und $R(q_j, \vec{a})$ die entsprechenden Modellreflektivitäten.

Die Wahl eines geeigneten Modells ist entscheidend für die erfolgreiche Interpretation der Reflektivitätsdaten. In der vorliegenden Arbeit wurden je nach Aufgabenstellung eines von zwei unterschiedlichen Modelle eingesetzt.

Interpretation der Reflektivität mit dem Frei-Form-Boxmodell

Interpretiert man Reflektivitätsdaten mit Hilfe von Modellen, so ist es unvermeidlich, dass das Ergebnis auch von den Voraussetzungen und Annahmen abhängt, die man dem Modell zugrunde gelegt hat. Je mehr Voraussetzungen das Modell umfasst, desto stärker schränkt es den Raum möglicher Lösungen ein, und desto präziser lassen sich die Modellparameter bestimmen. Jedoch kann ein zu rigides Modell auch zu falschen Strukturen führen. Insbesondere wenn eine neue, in ihrem Aufbau bisher unbekannte Struktur untersucht wird, ist ein unbefangenes Modell daher wichtig. In dieser Arbeit wird hierzu ein Frei-Form-Boxmodell eingesetzt.

Beim Frei-Form-Boxmodell wird lediglich angenommen, dass die Elektronendichte oberhalb der Luft/Wasser-Grenzschicht gleich 0 ist (Luft), und bei großen Tiefen (gewöhnlich ab 40 nm unterhalb der Grenzschicht) den Wert des Lösungsmittels (Wasser) annimmt. Außerdem werden für die Elektronendichte im Lipid/DNS-Komplex sinnvolle Grenzen gesetzt, gewöhnlich zwischen 0 und dem 1.4-fachen der Wasser-Elektronendichte (Der Einfachheit halber sind alle Elektronendichten in Einheiten der Elektronendichte von Wasser angegeben).

Die Elektronendichte wird in eine Reihe von Schichten zerlegt, die sich parallel zur Grenzschicht ausbreiten und jeweils 0.2 nm dick sind. Es wird angenommen, dass die Elektronendichte innerhalb jeder Schicht homogen ist. Um die intrinsische Rauigkeit des Profils und die Rauigkeit aufgrund der thermisch angeregten Kapillarwellen zu berücksichtigen, sind alle Schichten mit einer Gaußkurve der Breite $\sigma = 0.3$ nm verschmiert. Modellparameter sind die Elektronendichten der einzelnen Schichten.

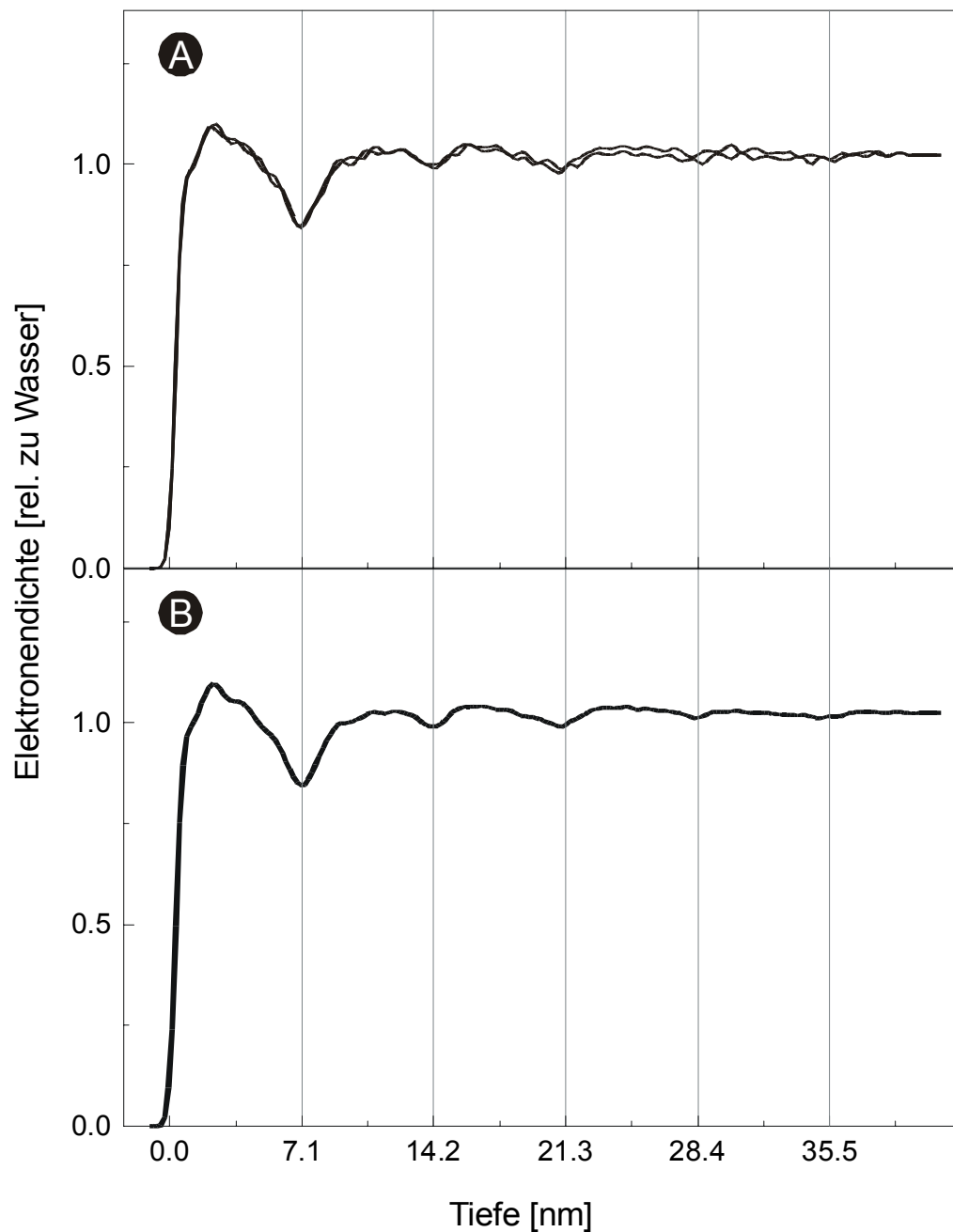


Abbildung 33: (A) zwei typische Elektronendichteprofile, die durch Anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die gemessenen Reflektivitätsdaten der Abbildung 34 B (○) mit Hilfe einer Evolutionsstrategie entstanden sind. (B) Mittelung von 10 unabhängig Durchgängen. Die willkürlichen Oszillationen, welche die Profile in A überlagern, sind stark gedämpft. Dadurch tritt die systematisch in allen Profilen enthaltene multilamellare Struktur des CL/DNS-Komplexes deutlicher zu Tage. Selbst das schwache 4. und 5. Minimum werden erkennbar.

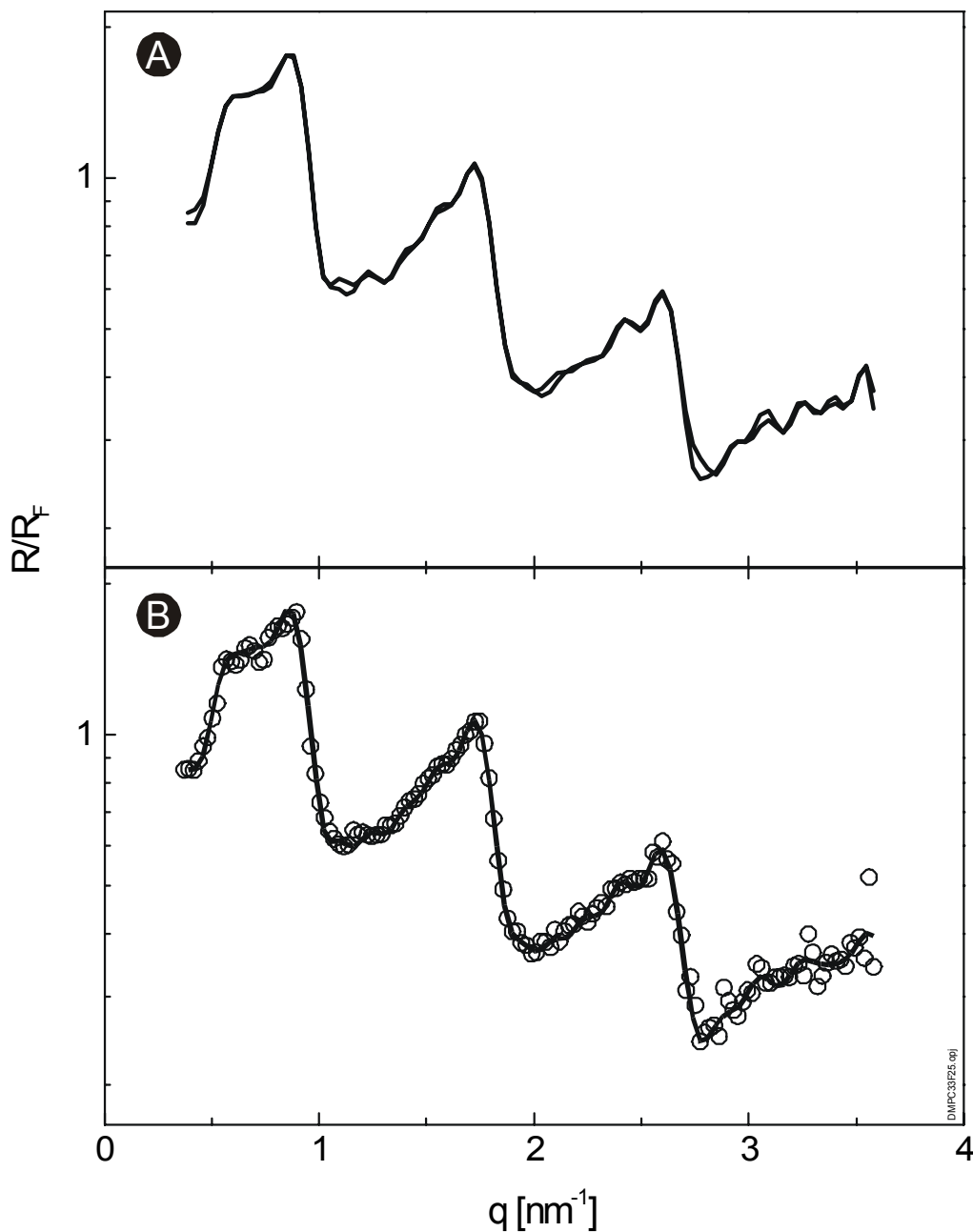


Abbildung 34: (A) die zu den Modellelektronendichteprofilen in Abbildung 33A gehörenden Modellreflektivitäten. (B) Modellreflektivität berechnet aus dem gemittelten Elektronendichteprofil in Abbildung 33B (—) im Vergleich zu der gemessenen Reflexivität von einem CL/DNS-Komplex an der Wasser/Luft-Grenzfläche (O).

Als Anpassungs-Algorithmus kommt eine neue Evolutionsstrategie zum Einsatz (Politsch, 1999). Diese hat gegenüber konventionellen Verfahren (wie z. B. dem weit verbreiteten Levenberg-Marquardt-Algorithmus) den wesentlichen Vorteil, dass sie nicht deterministisch

ist. Sie liefert daher Lösungen, die vorurteilsfrei, zugleich jedoch sehr robust sind, vorausgesetzt die Qualität der Messdaten ist ausreichend hoch. Aufgrund des eingeschränkten Messbereiches des Reflektometers (gewöhnlich ist $q < 4 \text{ nm}^{-1}$), der endlichen Zahl der Messpunkte (169 Punkte) und deren begrenzter Auflösung, sind die Lösungen natürlich nicht eindeutig. Als Folge des nicht-deterministischen Anpassungsverfahrens variieren die berechneten Lösungen entsprechend von Lauf zu Lauf. Insbesondere ist das Profil von zufälligen Oszillationen überlagert, die keine Eigenschaft des tatsächlichen, den Messdaten zugrundeliegenden Elektronendichteprofiles sind. Um diese zufälligen Anteile der Lösungen abzuschwächen, werden Lösungen aus gewöhnlich 10 der 16 unabhängigen Anpassungsläufen gemittelt. In Abbildung 33 wird die Lösung zweier einzelner Läufe (A) mit der Mittelung von 10 Läufen (B) verglichen. Schon in den einzelnen Läufen ist die multilamellare Struktur deutlich erkennbar. Das gemittelte Profil ist jedoch deutlich glatter und zeigt mehr von den in allen Kurven enthaltenen Details. Die zu den einzelnen Profilen aus Abbildung 33 A gehörenden Modellreflektivitäten (Abbildung 34 A) unterscheiden sich kaum voneinander. Die aus dem gemittelten Elektronendichteprofil errechnete Reflektivität (durchgezogene Linie in Abbildung 34 B) passt hervorragend zu der gemessenen Reflektivität (Kreise in Abbildung 34 B).

Interpretation der Reflektivität mit dem Molekülmodell

Trotz seiner offensichtlichen Vorteile stößt das Frei-Form-Boxmodell schnell an seine Grenzen, wenn es um die quantitative Auswertung der Reflektivitätsdaten geht. Ein Problem ist die Überinterpretation der Messdaten, die eine direkte Folge der Überparametrisierung (d. h. der zu großen Zahl freier Parameter) ist. In den Fällen, in denen die Schichtstruktur einfach genug ist, kann man dieses Problem angehen, indem man Bekanntes in das Modell aufnimmt. Dieser Weg wurde bei der vorliegenden Arbeit verfolgt, um die Adsorption von DNS-Einfachschichten an Langmuirfilm quantitativ zu untersuchen. Das Modell basiert auf den Molekülstrukturen der Lipid und der DNS. Lipid- und DNS-Schicht sind wiederum gaußverschmiert, um intrinsische und Kapillarwellenrauhigkeit zu berücksichtigen. Das Modellprofil in Abbildung 30 wurde mit Hilfe des Molekülmodells erzeugt. Anders als das Frei-Form-Boxmodell lässt das

Molekülmodell Aussagen über die relative Positionen der Komponenten (Lipide und DNS)
zu.

TEIL 3

Struktur der Komplexe

In der folgenden Darstellung der Experimente und der Interpretation ihrer Ergebnisse wird zuerst auf die Elektronenmikroskopie eingegangen, sowohl hinsichtlich der Struktur der multilamellaren CL/DNS-Komplexe, wie auch bezüglich der beteiligten Wechselwirkungen. Anschließend wird auf dieser Basis ein Mechanismus für die Komplexbildung vorgeschlagen, der anhand der röntgenreflektometrischen Untersuchungen verifiziert und die Kinetik betreffend ergänzt wird.

Richtungskorrelationen zwischen DNS-Schichten

Die Ergebnisse von Lasic, Rädler, Yang und anderen legen nahe, dass die DNS in multilamellaren Komplexen Einfachschichten bildet. Zusätzlich zu der parallelen Ausrichtung der DNS-Fäden in diesen Schichten wurde schon mehrfach auch eine thermisch induzierte langreichweitige Richtungskorrelation zwischen *verschiedenen* Schichten vorhergesagt (Golubovic und Golubovic, 1998; O'Hern und Lubensky, 1998). Die Theoretiker kamen zu dem Schluss, dass DNS-Helices in verschiedenen Schichten ebenfalls mehr oder weniger parallel ausgerichtet sein können. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass die einzelnen DNS-Helices auch in Bezug auf ihre Positionen korreliert sind, wie es z.B. in der säulenartigen Phase der Fall ist. Die neue Phase, bei der nur eine Orientierungs- aber keine Positions-Korrelation vorliegt, wird als „gleitende säulenartige“ Phase bezeichnet. Bei den ersten cryo-transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen ging es darum, Belege für solche Orientierungskorrelationen zu finden.

Bei allen folgenden Cryo-TEM-Abbildungen betrug der Vergrößerungsfaktor 55 000. Die Lipide DMPC und DC-Chol der Vesikeln hatten ein Molverhältnis von 3:2. Der Puffer enthielt 50 mM Triethanolamin und 0.54 mM EDTA. Die Lipidkonzentration betrug 1.6 mM, das Lipid/DNS Nettoladungsverhältnis betrug 0.2.

Die Bilder wurden innerhalb von 24 Stunden, nachdem DNS und Vesikel zusammengebracht worden waren, aufgenommen. Es zeigte sich, dass die unilamellaren Vesikel der anfänglichen Suspension sich durch Zugabe der DNS in eine Vielzahl großer multilamellarer Komplexe verwandeln, deren Durchmesser typischerweise zwischen 100 und 400 nm liegen. Oft umfassen einzelne Komplexe 7 und mehr Doppelschichten. Die Periodizität dieser Schichtfolge (in diesem Text als „lange Periodizität“ bezeichnet, im Gegensatz zu der „kurzen Periodizität“ der parallelen DNS-Fäden) beträgt 7.8 (± 0.4) nm. Die innerste Lipiddoppelschicht hat häufig Durchmesser zwischen 60 nm und 130 nm, was einem oder im Höchstfall vier der ursprünglichen unilamellaren Vesikel entspricht.

Zumindest in den nicht geschüttelten Proben ist eine deutliche Aggregatbildung zu beobachten, die große Komplexaggregate in der Größenordnung von 1 μm und mehr zur Folge hat. Proben, die mehr als 24 Stunden alt sind, können daher nur mit großen Schwierigkeiten abgebildet werden, weil die Aggregate mit der Zeit extrem groß werden. Diese wiederum verringert wesentlich die Wahrscheinlichkeit Komplexe zu finden, die in ausreichend dünnen Eisschichten eingeschlossen sind um abgebildet zu werden.

Die CL/DNS-Komplexe haben eine mehrschichtige Zwiebelschalenstruktur. Auf den Cryo-TEM-Bildern sind sie mit einem Streifenmuster überlagert, das einem Fingerabdruck gleicht. In Abbildung 36 A ist das deutlich zu erkennen. Auffällig ist die Ähnlichkeit zu dem Muster in Abbildung 22. Weder in Suspensionen normaler multilamellarer Vesikel, noch in den Kontrollen mit DMPC/DC-Chol-Vesikeln vor der Zugaben von DNS oder im vitrifizierten Eis um die Komplexe herum, konnte etwas ähnliches gesehen werden. Obwohl schon frühere cryo-transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen die lange Periodizität der Lipid/DNS-Multischichten gezeigt haben, ist die im Fingerabdruckmuster beobachtete kurze Periodizität bisher noch nie über ganze Komplexe ausgedehnt gesehen worden. Man muss also annehmen, dass dies mit den besonderen Schwierigkeiten zusammenhängt, die strahlenempfindlichen und kontrastarmen Komplexe elektronenmikroskopisch abzubilden. Die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden durch die Kombination von unüblich starker Vergrößerung, Energiefilterung und extrem niedriger Dosis möglich.

Interessant ist, dass es *unilamellare* Vesikel sind, die zusammen mit DNS diese multilamellare Struktur bilden. Das Entstehen solcher Komplexe aus unilamellaren Lipidvesikeln war bisher noch nicht untersucht worden, weil man bei früheren Untersuchungen für gewöhnlich bereits von multilamellaren Vesikeln ausging und daher keiner Rückschlüsse auf den Ursprung der dreidimensionalen Ordnung in der DNS-Verteilung ziehen konnte. Indem hier mit einer Suspension begonnen wurde, die ausschließlich unilamellare Vesikel enthielt, konnte gezeigt werden, dass die multilamellare Struktur eine Folge der Lipid/DNS-Wechselwirkung ist.

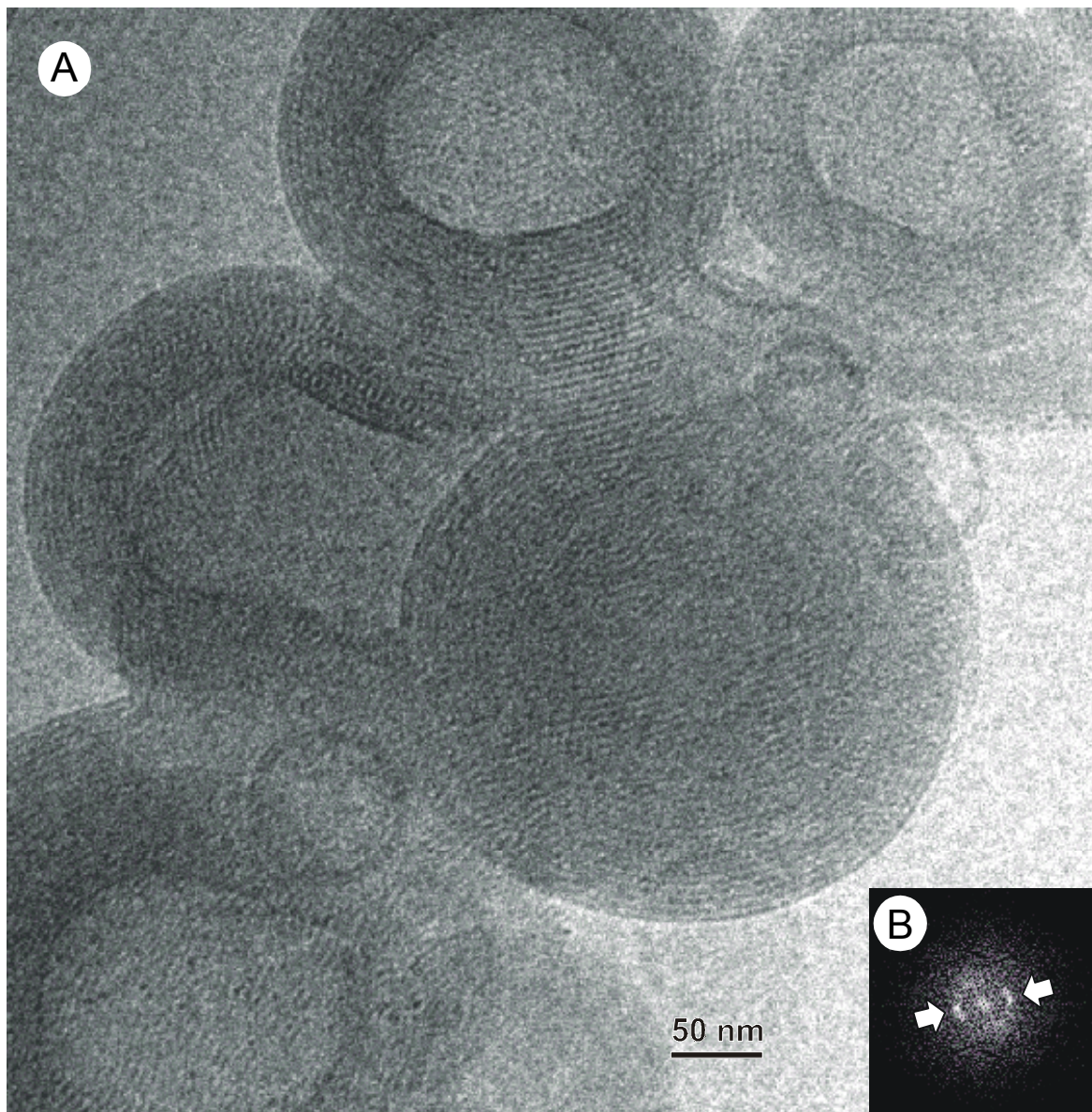


Abbildung 36: (A) cryo-transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines kationischen Lipid/DNS-Komplexes eingebettet in vitrifiziertem Eis. Die Komplexe entstehen dadurch, dass DNS mit unilamellaren kationischen Vesikeln (DMPC/DC-Chol im Molverhältnis von 3:2) zusammengebracht wird. Sie bestehen aus spontan entstandenen, globulären multilamellaren Vesikeln in welche DNS zwischen den Lipiddoppelschichten eingeschlossen ist. Ein fingerabdruckartiges Muster ist dem Komplex überlagert. Es ist anzunehmen, dass es sich bei dem Muster um DNS handelt, die in parallelen Helices organisiert ist. Letzteres deutet auf das Vorhandensein schichtübergreifender Korrelationskräfte zwischen den DNS-Schichten hin.

(B) (vorherige Seite) zweidimensionale Fouriertransformierte des in A markierten Ausschnittes. Die Diffraktionspunkte korrespondieren mit der 3.8 nm Periodizität die den DNS-Fäden zugeschrieben wird.

Abbildung 37 zeigt eine cryo-TEM-Aufnahme einer Probe der hier verwendeten extrudierten Vesikel vor DNS-Zugabe. Die Probe enthielt zu diesem Zeitpunkt noch keine multilamellaren Vesikel. Es ist somit offensichtlich, dass der Übergang der Vesikel von Uni- zu Multilamellarität durch die DNS Zugabe verursacht wurde. Dabei wurde die DNS zwischen den Doppelschichten eingeschlossen. Die Periodizität der Multischichten von 7.8 (± 0.4) nm bietet Platz für die Doppelschicht (ca. 5.1 ± 0.5 nm, gemessen in Abbildung 37) und die DNS (Durchmesser des DNS-Moleküls: ca. 2 nm).

Das fingerabdruckähnliche Streifenmuster wurde sowohl durch direktes Messen als auch mit Hilfe der Fouriertransformation der Cryo-TEM-Bilder genauer untersucht. Die Helligkeit der Diffraktionspunkte Abbildung 36 B ist proportional zur Größe der entsprechenden Fourierkomponente, ihr Abstand vom Ursprung umgekehrt proportional zur Periodizität. Die zwei großen hellen Punkte stammen von dem annähernd horizontalen Streifenmuster des transformierten Ausschnitts von Abbildung 36 A. Der Abstand der Punkte vom Ursprung entspricht einer Periodizität von ca. 3.8 (± 0.3) nm. Dies ist auch dem Ergebnis direkter Messungen in der Aufnahme.

Wie schon oben angesprochen, haben SAXS und AFM Untersuchungen bereits vorher gezeigt, dass DNS auf kationischen Lipidschichten kondensieren, und dabei eine geordnete Struktur paralleler DNS-Fäden formen kann. Dabei hat sich herausgestellt, dass der Abstand zwischen den parallelen DNS-Helices vom Lipid/DNS-Verhältnis in der Suspension und wahrscheinlich auch vom Lipid- und DNS-Typ abhängt. Da letztere Messungen mit anderer DNS, anderen Lipiden und, zumindest im Falle der Untersuchungen von Fang und Yang an unterstützten Doppelschichten (Fang und Yang, 1997), auch unter anderen Bedingungen durchgeführt wurden, ist es hier wenig sinnvoll die Periodizität des überlagerten Musters in Abbildung 36 mit den Periodizitäten aus den SAXS und AFM Daten quantitativ zu vergleichen. Hingegen kann kaum daran gezweifelt werden, dass das fingerabdruckähnliche Streifenmuster von DNS stammt, die zwischen den Lipidschichten eingeschlossen ist.

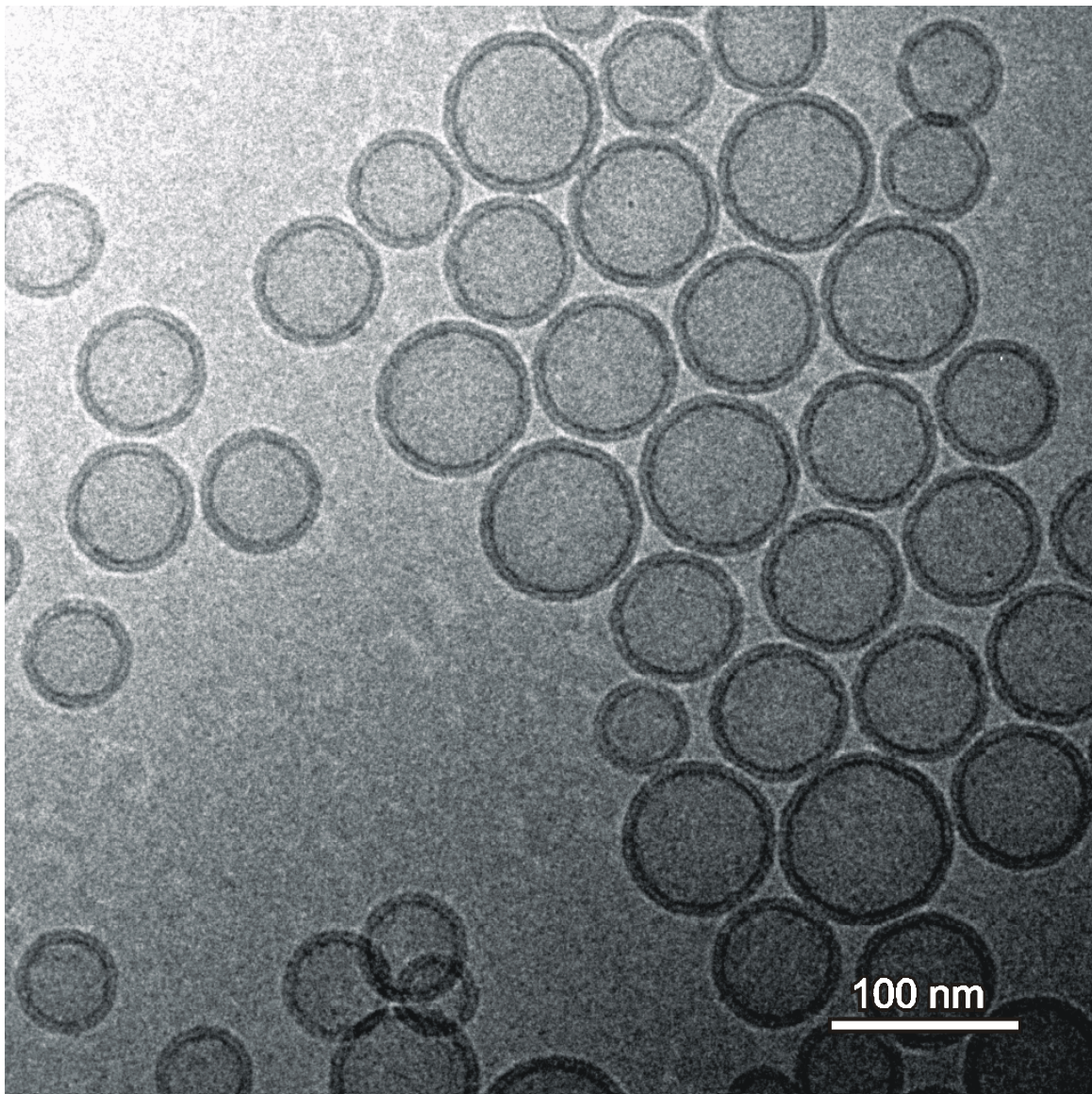


Abbildung 37: die extrudierten DMPC/DC-Chol Vesikel sind vor der Zugabe von DNS alle Vesikel unilamellar, wie diese Cryo-TEM-Aufnahme zeigt. Die Lipidkonzentration beträgt 1.6 mM.

Die Tatsache alleine, dass das Streifenmuster überhaupt über einem mehrschichtigen, globulären Lipid/DNS-Komplex abgebildet werden kann, ist ein Hinweis auf die Existenz langreichweitiger, membranübergreifender Korrelationen. Es ist möglich, dass es sich dabei um die vorhergesagte gleitende säulenartige Phase handelt. Man kann aber auch nicht ausschließen, dass eine positionskorrelierte säulenartige Phase vorliegt. Zwei mögliche Arten der Anordnung sind in Abbildung 38 wiedergegeben.

Neben den thermischen Fluktuationen, die von O'Hern, Lubensky und den Golubovics als Ursache der dreidimensionalen Kopplung angesehen werden, könnte die parallele Orientierung unterschiedlicher Schichten auch auf eine Kopplung zwischen zwei gegenüberliegenden Domänen der die Doppelschicht bildenden Monoschichten zurückzuführen sein. Dann müsste man annehmen, dass diese Monoschichten aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung mit der adsorbierten DNS eine laterale inhomogene Lipidverteilung aufweisen (May und Ben-Shaul, 1997). Dies ist in Abbildung 39 schematisch dargestellt. Darüber hinaus könnten langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den kationischen Lipiden und/oder der DNS ebenfalls einen Beitrag leisten. Diese Erklärung ist jedoch weniger wahrscheinlich.

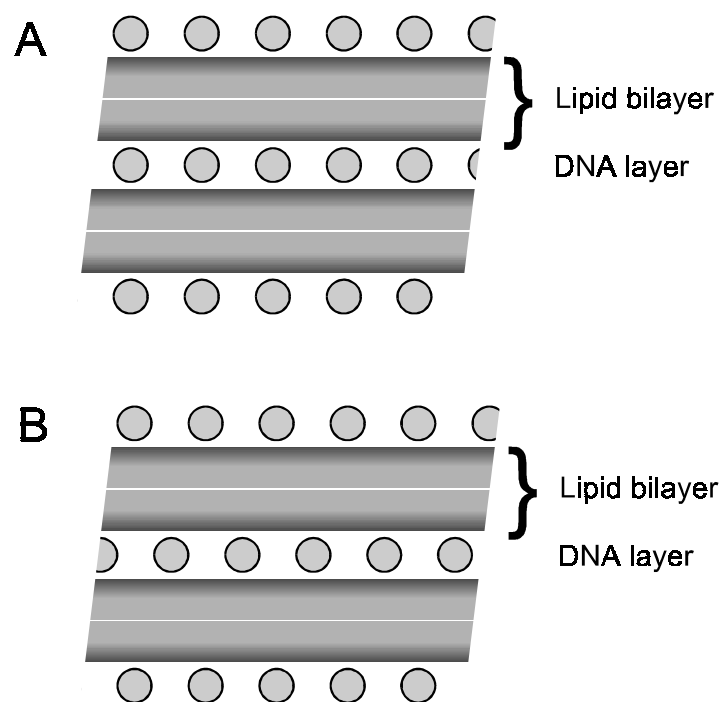


Abbildung 38: zwei mögliche Arten der Ausrichtung der DNS-Helices zwischen DMPC/DC-Chol Lipiddoppelschichten aufgrund einer langreichweitigen schichtübergreifenden Wechselwirkung: **(A)** orthorhombische Packung, **(B)** tetragonale Packung.

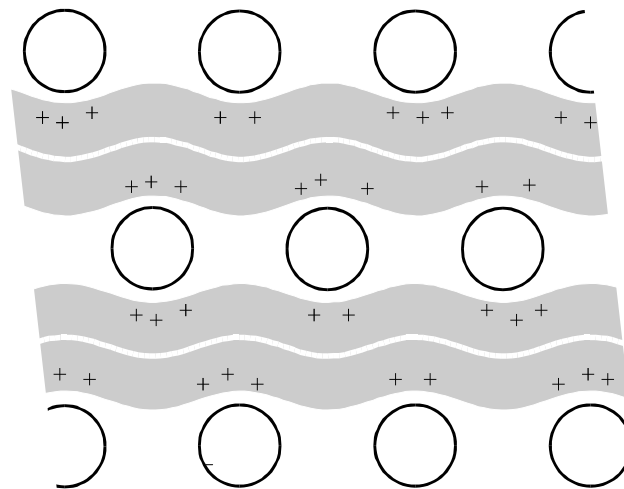


Abbildung 39: die Wechselwirkung kationischer Membranlipide mit der entgegengesetzt geladenen DNS führt zu einer inhomogenen Membranladungsdichte- und damit zu einer Lipidumverteilung innerhalb der Lipidschichten. Die räumliche Modulation der Membranladungsdichte minimiert die elektrostatische Energie des Systems. Ihr gegenüber steht eine Entmischungsentropie als Folge des Abweichens von einer vollständig homogenen Lipidverteilung. Das Ausmaß der Lipidentmischung hängt vom Wechselspiel dieser beiden Anteile der freien Energie ab.

Wenn man mit dem Transmissionselektronenmikroskop die Überlagerung mehrerer parallel ausgerichteter DNS Gitter betrachtet, ergibt sich ein Streifenmuster. Ein solches Muster sollte nicht erkennbar sein, wenn die Gitter nicht zueinander ausgerichtet sind, sondern ihre Richtungen zufällige Winkel einschließen. Denn letzteres würde ausschließlich den Grauwert des Bildes, im Vergleich zum Eis-Hintergrund erhöhen. Gleichzeitig zeigt die Maschenartigkeit des Musters, dass nicht alle DNS-Helices in verschiedenen Schichten zueinander ausgerichtet sind. Die Ursache könnte die Überlagerung von einer Anzahl von Schichten, in denen alle DNS-Fäden in die eine Richtung ausgerichtet sind, mit einer Anzahl weitere Schichten sind, in denen die DNS in eine zweite, von der ersten unterschiedliche Richtung ausgerichtet sind. Es könnte auch einfach die Überlagerung der Vorder- und Rückseite des sphärischen Komplexes sein. Die

Krümmung würde die scheinbare Richtung der DNS Gitter in der jeweiligen Halbkugeln verändern.

Daraus, dass in den cryo-transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen die kationischen Lipid/DNS-Komplexe mit einem fingerabdruckähnlichen Musters überlagert sind, kann man also auf Korrelationswechselwirkungen schließen, die dazu führen, dass die DNS-Fäden in verschiedenen Schichten zueinander ausgerichtet werden. Kürzlich haben Artzner und andere in ihren Röntgenstreuexperimenten mit einem anderen kationischen Lipidsystem Hinweise auf eine positionskorrelierte säulenartige Phase gefunden (Artzner et al., 1998). Es handelte sich dabei um die tetragonale Packung aus Abbildung 38 B.

Zahl der Lamellen nimmt bei Lipidüberschuss zu

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden Komplexe verglichen, die bei unterschiedlichen DNS/Lipid-Verhältnissen entstanden waren. In einer Versuchsreihe betrug das DNS/Lipid-Nettoladungsverhältnis 0.2, in einer weiteren 0.9. In allen Fällen wurde eine Lipidkonzentration von 1.6 mM gewählt. Die Aufnahmen wurden zwischen 24 und 32 Stunden nach dem Zusammenbringen der DNS mit der Lipidsuspension gemacht.

In allen Proben ändert sich die Vesikelmorphologie nach der Zugabe von DNS drastisch. Bei beiden untersuchten DNS-Konzentrationen entstand eine Vielzahl vor allem multilamellarer Strukturen. Alle multilamellaren Komplexe waren von einem deutlichen fingerabdruckähnlichen Muster überlagert, dessen Periodizität 3.8 nm betrug. Es zeigte sich jedoch, dass multilamellare Komplexe in den Proben mit eine DNS/Lipid Ladungsverhältnis von 0.2 wesentlich häufiger sind als in denen mit einem Verhältnis von 0.9. Während die Komplexe mit größerem DNS-Überschuss für gewöhnlich ein sehr große Anzahl von Lamellen besitzen, weisen die Komplexe, die bei einem nahezu ausgeglichenen Lipid/DNS Ladungsverhältnis entstanden sind, oft weniger als fünf Lamellen auf. In jedem Fall aber findet man in ähnlicher Häufigkeit multilamellare Komplexe mit gerader wie ungerader Anzahl von Lamellen. In den meisten Fällen ist die innerste Lipiddoppelschicht vollständig geschlossen und hat einen Durchmesser ähnlich

oder größer dem eines der ursprünglichen 65 nm Vesikel. Bei dem niedrigeren nominalen Ladungsverhältnis (0.2) ist die besondere Form der Aggregatbildung der multilamellaren Komplexe offensichtlich: dabei teilen sich zwei oder mehr Komplexe häufig eine oder mehrere der äußersten Doppelschichten.

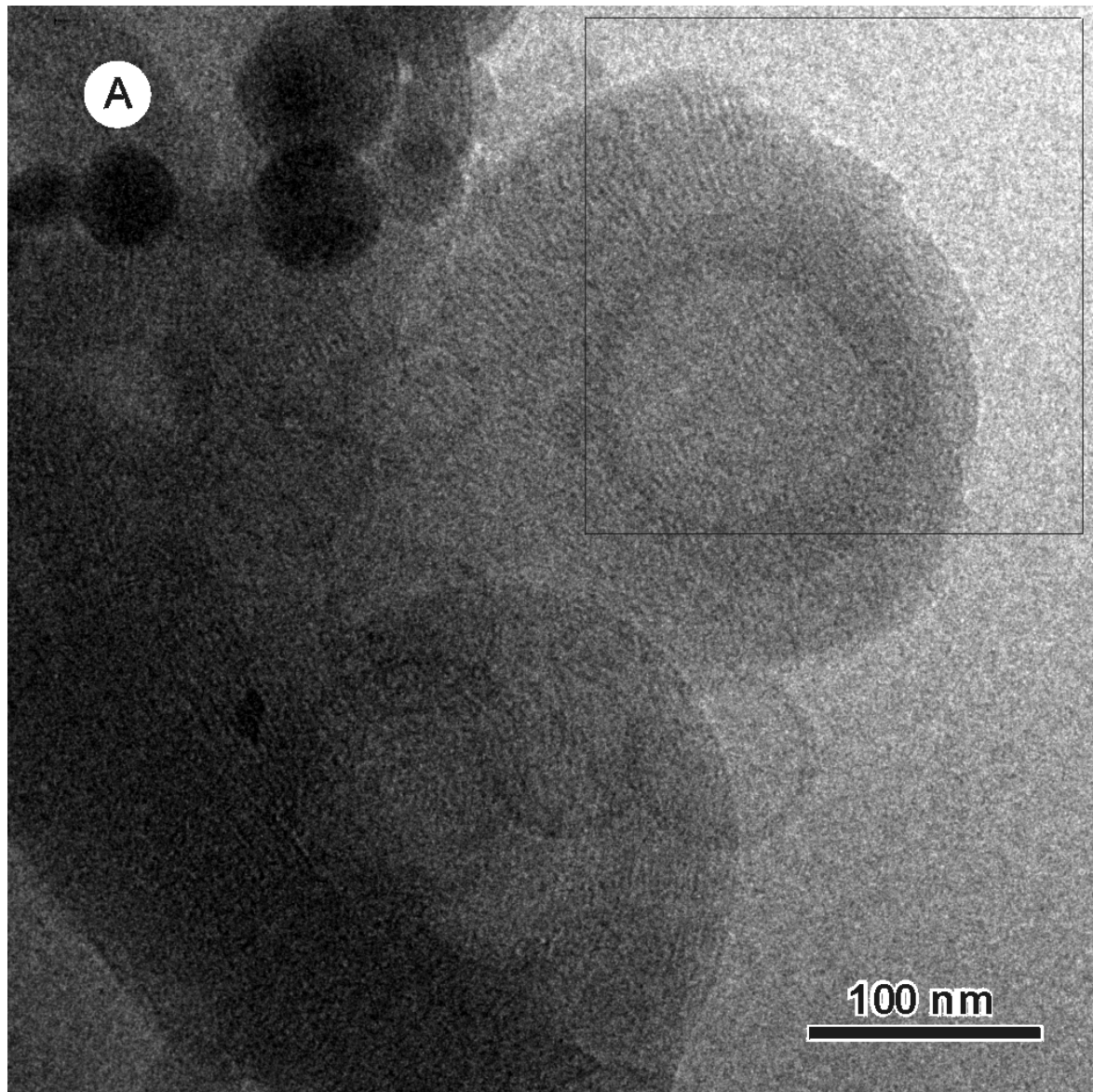
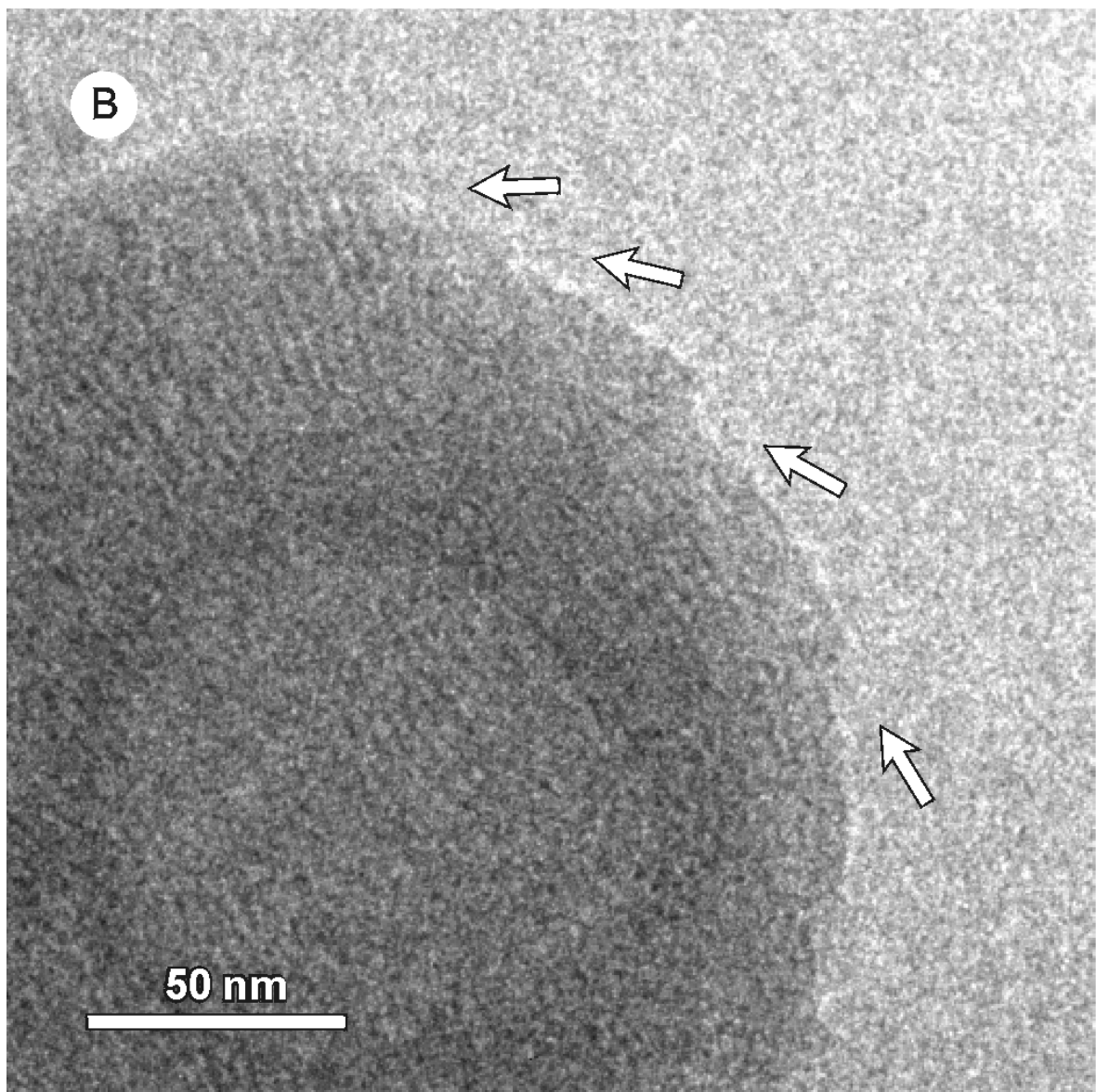


Abbildung 40: (A) Aggregat einiger repräsentativer großer CL/DNS-Komplexe eingebettet in vitrifiziertes Eis und aufgenommen mit Cryo-TEM. Die Komplexe entstehen dadurch, dass DNS mit unilamellaren kationischen Lipidvesikeln (DMPC/DC-Chol Molverhältnis 3:2, nominale DNS/Lipid-Ladungsverhältnis 0.2) zusammengebracht wird. Die spontan entstandenen multilamellaren Komplexe zeigen eine starke Tendenz zur Aggregatbildung.



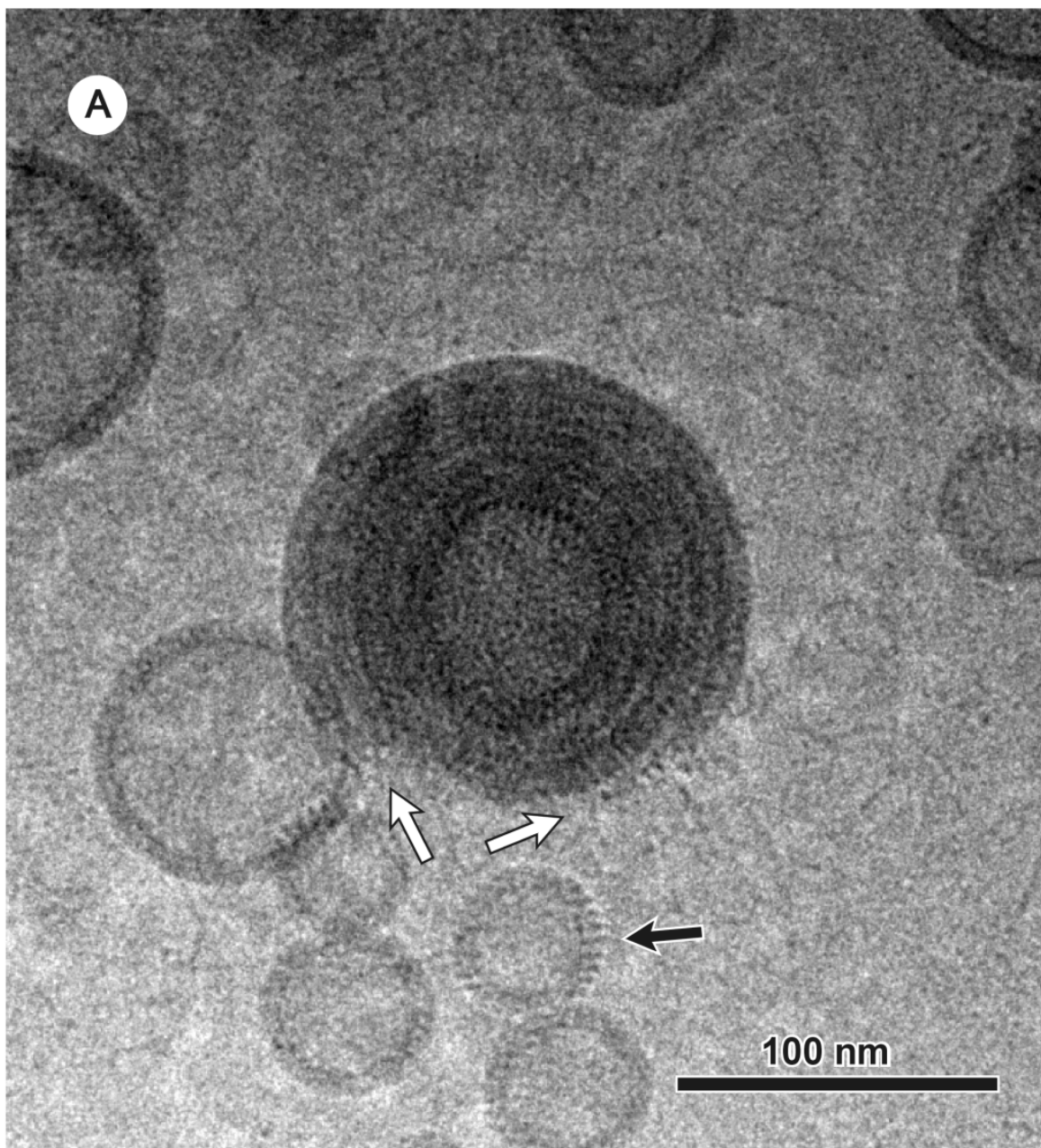
(B) Vergrößerung des markierten Ausschnitts aus A. Die weißen Pfeile an der Außenseite des Komplexes zeigen die Ränder nicht geschlossener Doppelschichten.

DNS spult sich auf unilamellare Vesikel

Während in den Proben mit einem nominalen DNS/Lipid Ladungsverhältnis von 0.2 die Mehrzahl der Lipide in multilamellaren Strukturen gebunden ist, sind bei höherem DNS Anteil unilamellare Vesikel sehr häufig. Auch diese Vesikel zeigen ein fingerabdruckähnliches Muster, das sowohl dem in den multilamellaren Komplexen als auch dem aus den AFM Untersuchungen von DNS auf unterstützten Doppelschichten

bekanntem Muster ähnelt. Die Periodizität des Musters kann man am besten am Rand der Vesikel erkennen. Sie beträgt $4.1 (\pm 2)$ nm.

Die Vesikel scheinen ähnlich einer Spule von der DNS umspunnen zu werden. Vielfach bilden die Vesikel traubenförmige Anhäufungen von 10 bis zu 100 Vesikeln. Die Vesikel in solchen Anhäufungen sind dabei fast immer stark deformiert und in den Bereichen in denen sie benachbarten Vesikeln am nächsten kommen abgeflacht. Die Dicke dieser Kontaktbereiche beträgt $13.5 (\pm 4)$ nm.



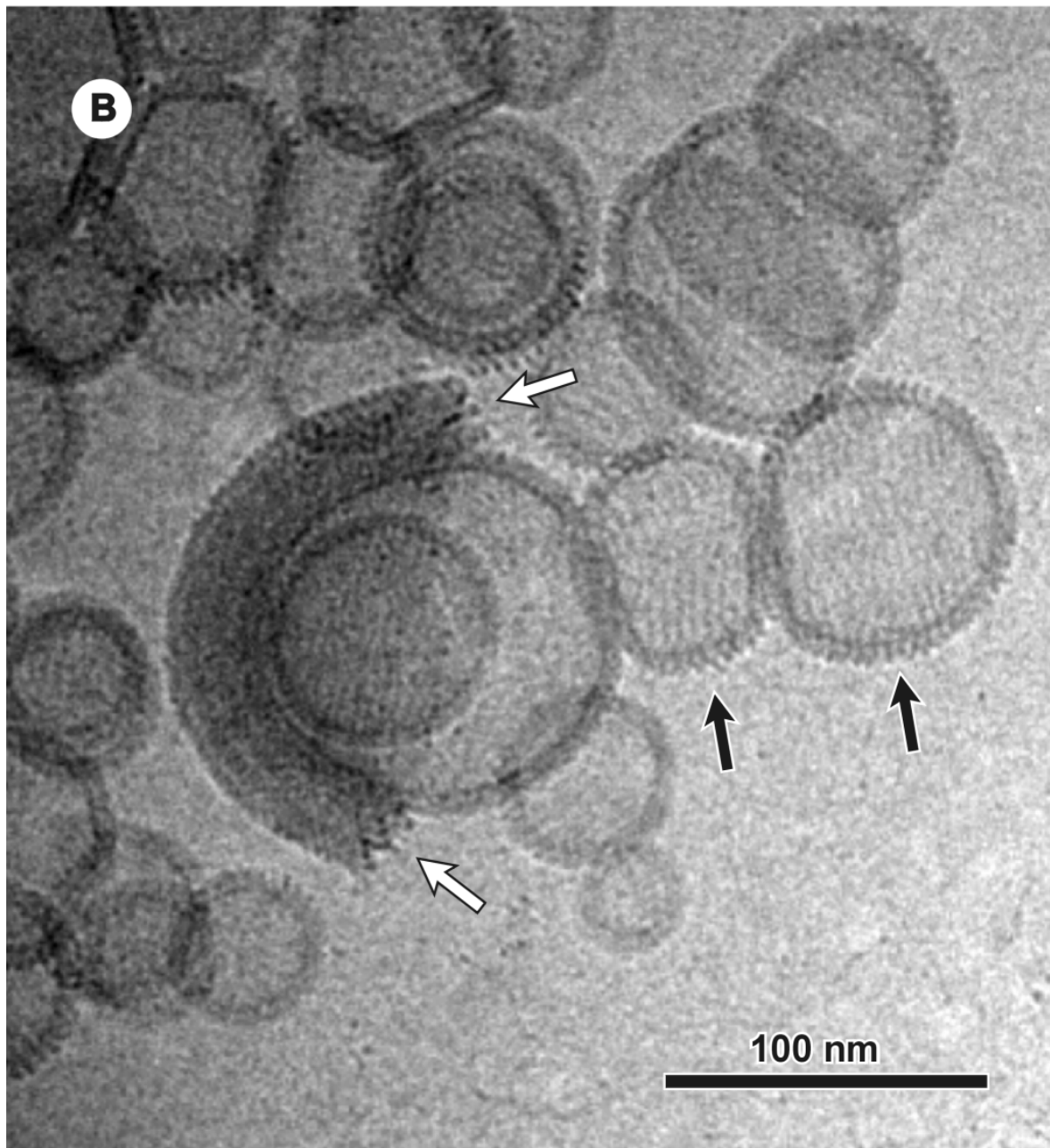


Abbildung 41: in Proben mit höherer DNS/Lipid-Ladungsverhältnis (0.9) ist eine Vielzahl DNS-bedeckter unilamellarer Vesikel zu finden. Multilamellare Komplexe sind wesentlich seltener. Diese Komplexe besitzen häufig Doppelschichten mit offenen Rändern. Die weißen Pfeile zeigen auf die Ränder einiger solcher ungeschlossener Doppelschichten. Es ist anzunehmen, dass die dunklen Stellen nahe der Ränder in **(B)** von DNS herrühren, die sich dort sammelt. Schwarze Pfeile zeigen auf unilamellare Vesikel, bei denen das Muster, das die sie umspinnenden DNS-Helices hervorrufen, besonders gut erkennbar ist.

DNS induziert Fusion von Vesikeln

In allen Proben haben die DNS-bedeckten Vesikel Durchmesser von ca. 65 nm oder mehr. Dies entspricht der Größe eines oder mehrerer der Vesikel in der ursprünglichen Suspension. Da die ursprüngliche Vesikelsuspension keine großen Vesikel enthielt, muss man schließen, dass die Zugabe von DNS die Vergrößerung der Vesikel herbeigeführt hat.

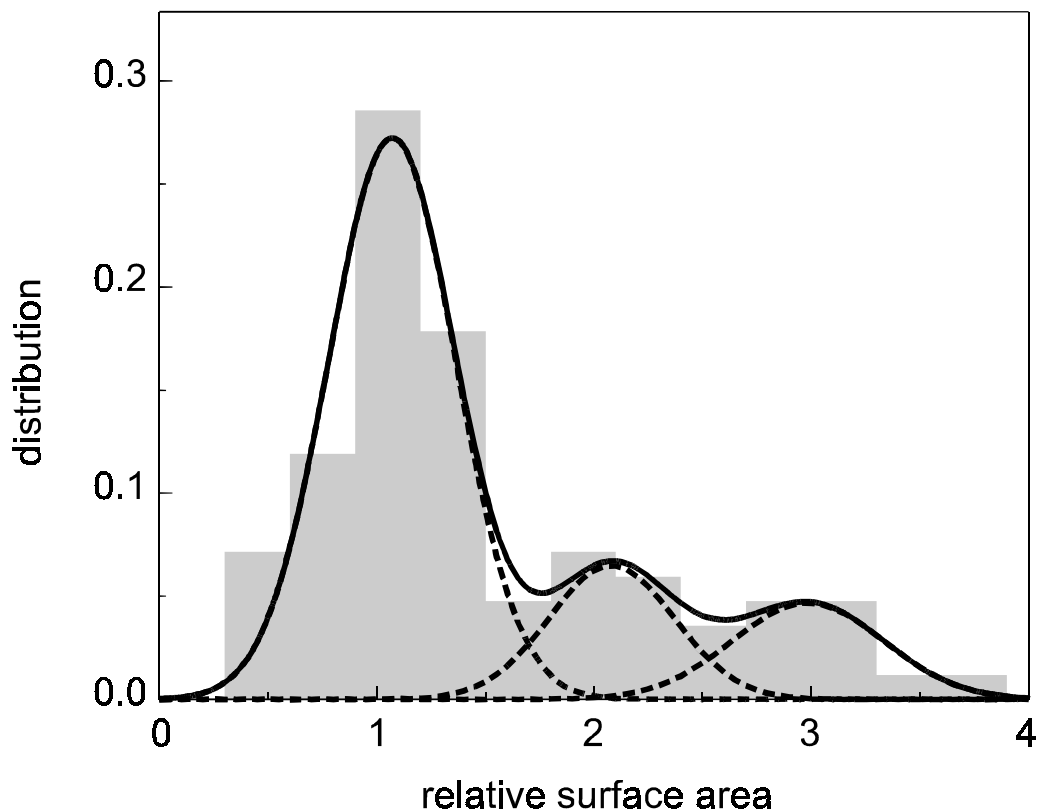
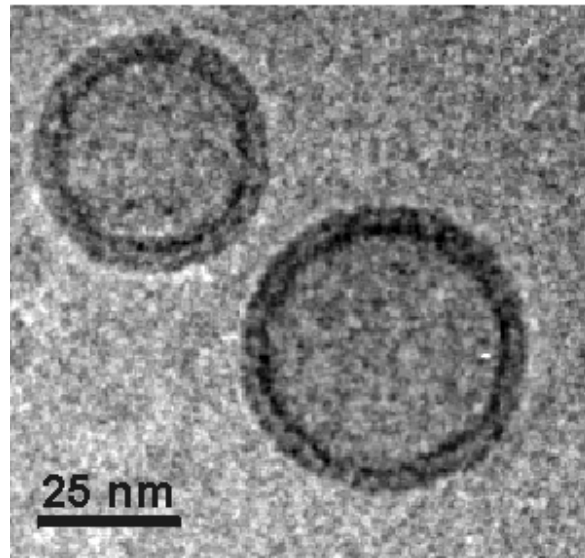
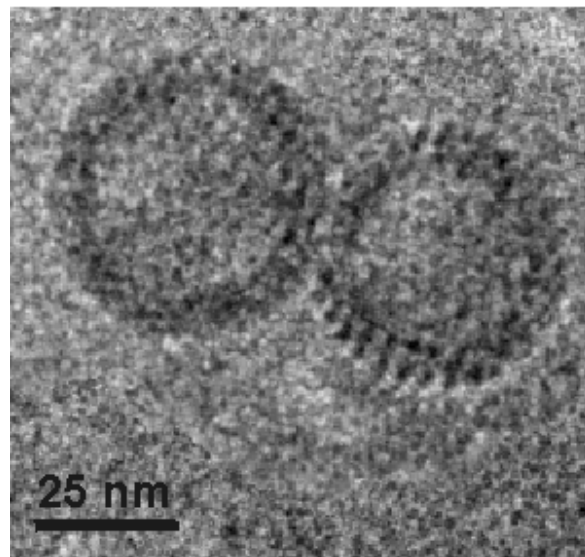


Abbildung 42: DNS induziert die Fusion von Vesikeln. Das Histogramm gibt die Größenverteilung der DNS-bedeckten unilamellaren Vesikel wider. Die Größen sind als Vielfache der ursprünglichen Vesikelgröße angegeben. Es wurden Cryo-TEM-Aufnahmen von 84 annähernd sphärischen Vesikeln ausgewertet. Die Maxima bei der zwei- und dreifachen der Oberfläche der ursprünglichen Vesikel weisen darauf hin, dass die Vesikel durch DNS-induzierte Fusion entstanden sind.

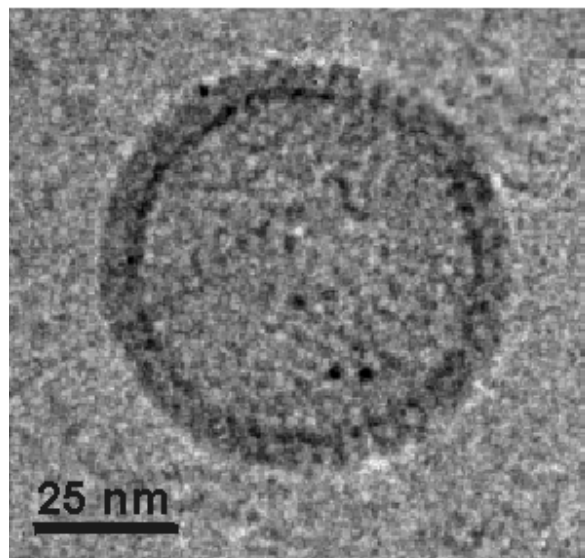
Abbildung 43: DNS-induzierte Fusion von Vesikeln. **(A)** vor der Zugabe von DNS enthält die Vesikelsuspension nur kleine unilamellare Vesikel mit einer schmalen Größenverteilung um 65 nm (± 18 nm). Die Vesikel bestehen aus dem kationischen Lipid DC-Chol und dem zwitterionischen Helferlipid DMPC in einem Molverhältnis von 2:3. Die Vesikel wurden durch wiederholtes Extrudieren hergestellt.



(B) nach der Zugabe von DNS spulen sich DNS-Fäden um das entgegengesetzt geladene Vesikel, was zu dem deutlich sichtbaren Streifenmuster auf den Vesikeln führt. Man erkennt das Muster am besten an den Rändern der Vesikel. Jeder dunkle Streifen korrespondiert mit einem DNS-Faden. Der Interaxialabstand der DNS-Moleküle beträgt 3.8 nm (± 2 nm).



(C) Die DNS-Schicht destabilisiert die Vesikel und induziert so Fusion zwischen Vesikeln. Vermutlich ist die Ursache eine Asymmetrie zwischen dem Lipid-Packungsdruck der äußeren und inneren Monoschicht der Vesikelmembran. Zu dieser Asymmetrie kommt es, weil die effektive Größe der Lipidköpfe sich dadurch verringert, daß ein Teil ihrer Ladung durch die DNS kompensiert wird.



In Abbildung 42 ist die Größenverteilung der unilamellaren Vesikel nach DNS-Zugabe dargestellt. Die Größe wird anhand des Verhältnisses von Vesikeloberfläche zur Oberfläche eines ursprünglichen 65 nm-Vesikels angegeben. Die Vesikel wurden von Hand in den Cryo-TEM Bildern gemessen. Dabei wurden nur solche Vesikel berücksichtigt, die nahezu sphärisch waren, da sich bei solchen die Oberfläche am einfachsten und genauesten bestimmen lässt.

Mit zunehmender Größe nimmt die Population ab. Maxima sind bei zweifacher und dreifacher Fläche der ursprünglichen Vesikel erkennbar. Größere unilamellare DNS-bedeckte Vesikel sind zu stark deformiert um sie bei der Analyse zu berücksichtigen.

Offene Doppelschichten

Die multilamellaren Komplexe weisen häufig Lipiddoppelschichten auf, die nur unvollständig geschlossen sind, und zwar unabhängig davon, bei welchem DNS/Lipid-Ladungsverhältnis sie entstanden sind. Die weißen Pfeile in Abbildung 40 und Abbildung 41 A und B zeigen die Ränder solcher Doppelschichten, denen große Teile fehlen. Die geschätzte Fläche dieser offenen Doppelschichten ist in allen Fällen gleich oder größer als die eines der ursprünglichen 65 nm Vesikel. Häufig sind dunkle Punkte nahe den offenen Rändern der Doppelschichten zu erkennen, welche auf eine hohe Elektronendichte an diesen Stellen hinweisen (in Abbildung 41 B gut zu sehen). Wie im Folgenden erklärt, ist zu vermuten, dass lokal angereicherte DNS die Ursache für die hohe Elektronendichte ist.

Trauben unilamellarer Vesikel

Das Vorhandensein DNS-bedeckter unilamellarer Vesikel in den Proben mit relativ hohem DNS-Anteil (also bei einem nominalen DNS/Lipid-Ladungsverhältnis von 0.9; Abbildung 40 und Abbildung 41) macht deutlich, dass die DNS-Moleküle sich der Form, die von den Lipidschicht vorgegeben wird, anpassen und nicht umgekehrt. Außerdem scheint das Wachstum der Lipid/DNS-Komplexe behindert zu sein, wenn eine ausreichende Menge an DNS in der Suspension vorliegt. Dann bleiben die Vesikel unilamellar und werden von

einer Monoschicht parallel angeordneter DNS-Moleküle bedeckt. Häufig bilden sie Trauben aneinander adsorbierter Vesikel.

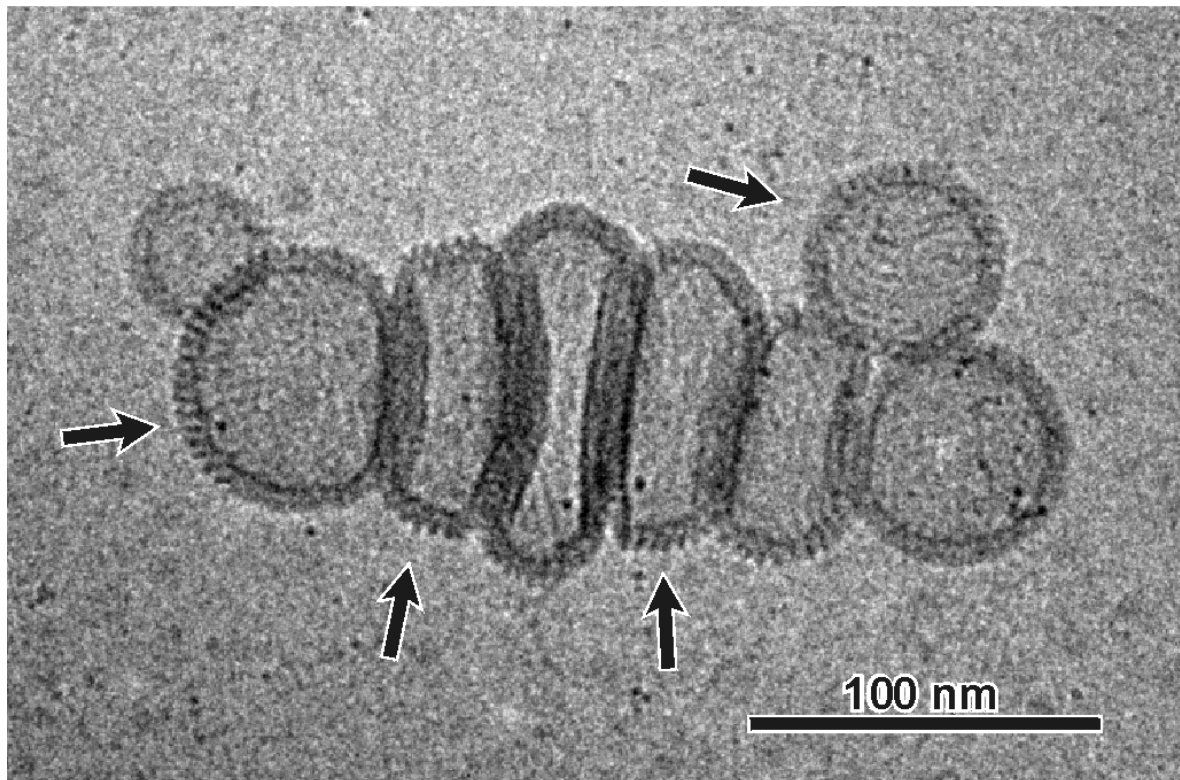


Abbildung 44: Trauben DNS-beschichteter unilamellarer Vesikel bei einem nominalen DNS/Lipid-Ladungsverhältnis von 0.9. Wie schon in Abbildung 41 B zeigen die schwarzen Pfeile Stellen, an denen das Muster, das durch die adsorbierte DNS hervorgerufen wird, am besten zu sehen ist. Deutlich erkennt man das Abflachen der Vesikel an den Kontaktstellen zu benachbarten Vesikeln.

Die Vesikel dieser Trauben sind in den Bereichen, in denen sie benachbarte Vesikel berühren, deformiert, aber nicht aufgebrochen. Es ist anzunehmen, dass diese Strukturen Zwischenschritte auf dem Weg zu multilamellaren Komplexen darstellen. Die Tatsache, dass die Trauben in den Proben mit einem hohen relativen Anteil von DNS überleben, weist darauf hin, dass die überschüssige DNS weitere Schritte verhindert. Wie man in Abbildung 40 sieht, wachsen multilamellare Komplexe ungehindert, wenn ein Überschuss an Lipid vorliegt.

In den abgeflachten Kontaktbereichen der Trauben ist die DNS zwischen den beiden Lipiddoppelschichten der benachbarten Vesikel eingeschlossen. Die Dicke des

Kontaktbereichs (13.5 ± 4 nm) reicht für zwei Lipiddoppelschichten und eine DNS-Einfachschicht aus. Es ist erstaunlich, dass die Vesikel sich zwar deformiert haben, jedoch nicht geborsten sind, obwohl die Probe mehr als einen Tag alt ist.

Asymmetrie in der Lipid/DNS-Wechselwirkung

Die starke Deformation der DNS-bedeckten unilamellaren Vesikel in Abbildung 41 und Abbildung 44 zeigt, dass die Lipid/DNS-Wechselwirkung entweder sehr stark oder sehr asymmetrisch sein muss, oder, dass die Vesikel äußerst flexibel sind. Es ist anzunehmen, dass die ersten zwei Möglichkeiten am wichtigsten sind. Die Asymmetrie hat ihre Ursache darin, dass DNS nur auf einer Seite der Doppelschicht adsorbiert und dadurch ein Ungleichgewicht im Packungsdruck hervorruft. Dies wiederum ist auf eine Verringerung der effektiven Ausdehnung der Kopfgruppen der kationischen Lipide zurückzuführen. Letztere kommt zustande, weil deren Ladung teilweise durch die entgegengesetzt geladene DNS kompensiert und die Hydrophilie der polaren Kopfgruppen durch die Anwesenheit adsorbierte DNS herabgesetzt wird.

Die Spannung, die von der Asymmetrie des Membran-Packungsdrucks herrührt, verursacht nicht nur Formänderungen, sondern sollte auch die Membran destabilisieren und so die Fusion von Vesikeln fördern. Dies entspricht dem, was man bereits von einem anderen hydrophilen Polymer, dem Poly(ethylenglycol) (PEG) kennt.

Von PEG ist schon seit längerem bekannt, dass es Fusion verursacht. Lentz hat argumentiert, dass PEG eine Asymmetrie des Lipidpackungsdrucks zwischen der inneren und der äußeren Lipidschicht, die zusammen die Lipiddoppelschicht ausmachen, hervorruft. Die innere Spannung, die eine solche Asymmetrie bewirkt, ist seiner Meinung nach Auslöser der Fusion (Lentz, 1994).

Mechanismus der Komplexbildung

In diesem Kapitel wird anhand der Strukturdetails der CL/DNS-Komplexe, die im vorangegangenen Kapitel diskutiert wurden, ein Szenario für die Komplexbildung entworfen. Die Entstehung eines multilamellaren CL/DNS-Komplexes scheint mit einem einzigen DNS-bedeckten unilamellaren Vesikel zu beginnen. Dieses ist gleichzeitig Keim und Schablone für die daraus hervorgehenden multilamellare Struktur. Zwei mögliche Mechanismen für die Adsorption weiterer Schichten bieten sich an:

Welcher Adsorptionsmodus?

Beim ersten Mechanismus sind die adsorbierten Schichten Stapel abgeflachter Vesikel, die an das Substratvesikel adsorbiert sind (Abbildung 45 links). Jedes adsorbierte Vesikel sollte in diesem Fall zwei neue Lamellen zum Komplex beitragen und eine Fläche bedecken, die der Hälfte seiner ursprünglichen Oberfläche entspricht. Das Abflachen kann zum Teil von der Adsorption, zum Teil von ins Innere aufgenommene DNS verursacht sein. Es ist denkbar, dass das DNS durch eine vorübergehendes Leck in das Vesikel eindringt, das unter der großen Deformationsspannung bei der Adsorption entsteht.

Beim zweiten Mechanismus entstehen multilamellare CL/DNS-Komplexe dadurch, dass adsorbierende Vesikel aufbrechen, und ihre Fläche über das andere Vesikel bzw. den Komplex rollen, wie es in Abbildung 45 rechts dargestellt ist. In diesem Fall trägt jedes adsorbierte Vesikel nur eine weitere Lamelle zum Komplex bei.

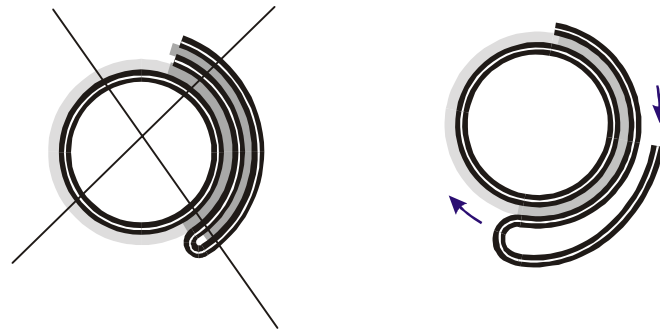


Abbildung 45: zwei denkbare Mechanismen für die Adsorption von weiteren Lipidschichten an ein unilamellares Vesikel. **Links:** ein zweites Vesikel adsorbiert an das erste und flacht sich ab, wobei die Membran an einer Stelle (vorübergehend) aufbricht, so dass DNS ins Innere des zweiten Vesikels eindringen kann. Jedes adsorbierte Vesikel trägt somit gleichzeitig zwei Lipiddoppelschichten zum multilamellaren Komplex bei. **Rechts:** das adsorbierende Vesikel bricht auf und rollt seine Oberfläche über das Substratvesikel. In diesem Fall trägt jedes adsorbierte Vesikel nur eine Lipiddoppelschicht zum Komplex bei.

Wäre der erste Mechanismus für die Bildung der multilamellaren Komplexe verantwortlich, sollte man immer eine ungerade Zahl von Lamellen sehen. Im Gegensatz dazu treten in den Cryo-TEM-Bildern gerade und ungerade Lamellenzahlen in annähernd gleicher Zahl auf. Darüber hinaus konnten nie Lamellen mit einer geschätzten Fläche kleiner als der eines der ursprünglichen 65 nm-Vesikel ($14\,000\text{ nm}^2$) beobachtet werden. Weil aber die abgeflachten Vesikel nur mit einer Hälfte adsorbieren, während die andere Hälfte eine weitere Lamelle bildet, scheint die einfache Vesikel-Adsorptions-Hypothese unhaltbar. Vielmehr scheint die zweite Hypothese für die Entstehung multilamellarer Komplexe richtig zu sein.

Randenergie vs. Komplexbildungsenergie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen also darauf schließen, dass die Vesikel zerreißen und ihre gesamte Lipiddoppelschicht um ein anderes Vesikel oder einen multilamellaren Komplex legen, wie es in Abbildung 47 dargestellt ist (Schritte E bis G). Dabei entsteht zwangsläufig dort, wo die Doppelschicht nicht vollständig geschlossen ist, ein offener Rand. Dies geschieht immer dann, wenn die Zunahme der freien Energie für die Bildung des Randes kleiner ist als die Abnahme freier Energie durch die Komplexbildung. Im folgenden sollen die Energiebeiträge abgeschätzt werden.

Zur Abschätzung der freien Energie der Komplexbildung wird die theoretische Abschätzung nach Harries et al. zugrunde gelegt (Harries et al., 1998), wonach die freie CL/DNS-Komplexbildungsenergie ca. $-9.5 kT$ pro nm^2 Fläche beträgt (bei einem molaren Mischverhältnis von kationischem zu neutralem Lipid von 2:3 und einem Interaxialabstand der DNS-Fäden von 4.2 nm), also $dF_K = -126\,000 k_B T$ für die Fläche einer 65 nm-Vesikels.

Die freie Randenergie wird nach oben abgeschätzt. Ihre Zunahme liegt darin begründet, dass die hydrophoben Anteile der Lipide am offenen Rand dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Die freie Wechselwirkungsenergie pro hydratisierter CH_2 -Gruppe in einer Fettsäurekette eines Phospholipids beträgt ca. $1.45 RT$ (in kJ/Mol, R ist die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, Cevc und Marsh, 1996). DMPC besitzt zwei 14er Ketten, die am Rand jedoch nur auf einer Seite, also zu weniger als der Hälfte exponiert sind. Somit kommt man auf einen Wert von ca. $20 RT$ pro Lipid. In Ermangelung vergleichbarer Zahlen für DC-Chol wird im folgenden angenommen, dass für DC-Chol ein ähnlicher Wert gilt. Die Länge des Randes hängt von der Größe und Krümmung der Fläche ab. Im Extremfall, in dem der Komplex, auf dem ein geborstenes 65 nm-Vesikel seine Doppelschicht abrollt, so groß ist, dass die abgerollte Lipidschicht flach ist, ist der Rand $4\pi \cdot 65 \text{ nm}$ lang, womit sich eine freie Energie von $dF_R = 22\,000 k_B T$ errechnet (Fläche pro Lipid 0.6 nm^2). Die freie Randenergie ist proportional zur Länge des Rands. Ist die vom Rand eingeschlossene Fläche gekrümmt, so ist der Rand bei gleicher Flächenausdehnung

um den Faktor $\sqrt{1 - \left(\frac{65 \text{ nm}}{d_{\text{Komplex}}}\right)^2}$ kürzer und die freie Randenergie entsprechend kleiner.

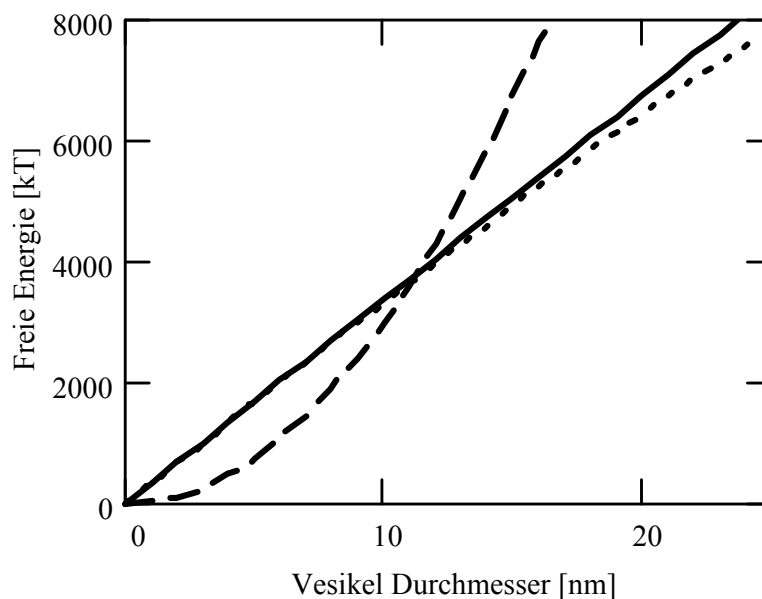


Abbildung 46: Beiträge zur freien Energie, wenn ein Vesikel eine Fläche auf einem Komplex oder einem anderen Vesikel unter Einschluss von DNS abrollt. Die freie Komplexbildungsenergie (---) steigt proportional zur adsorbierten Fläche, also quadratisch mit dem Durchmesser, die freie Randenergie (—) steigt linear mit dem Durchmesser des adsorbierenden Vesikels, wenn man annimmt, dass das Vesikel als planare, kreisrunde Scheibe adsorbiert. Bei gekrümmten Flächen überwiegt die freie Komplexbildungsenergie noch etwas früher, weil der Rand bei gleicher Fläche kürzer ist. Die freie Randenergie für den Fall, dass das adsorbierende Vesikel seine Fläche auf ein 65 nm-Vesikel abrollt, ist punktiert eingezeichnet (····). Ab einem Durchmesser von ca. 12 nm überwiegt die freie Komplexbildungsenergie, so dass der Vorgang für alle real vorkommenden Vesikelgrößen energetisch bevorzugt ist. Es wird angenommen, dass die Fettsäureketten der Lipide am Rand zur Hälfte dem Wasser ausgesetzt sind.

Der Vergleich der freien Energie zeigt, dass die Komplexbildung in ihrer Energiebilanz günstig ist. Das Verhältnis Fläche zu Rand, und damit der Betrag der gewonnenen freien Energie ($dF_R - dF_K$), wird um so größer, je größer die adsorbierende Fläche ist. In

Abbildung 46 ist dargestellt, ab welcher Größe der adsorbierenden Vesikel die Komplexbildung energetisch günstiger ist.

Möglicherweise wird die freie Randbildungsenergie oben noch deutlich überschätzt. Denn Lipidschichten mit offenen Rändern wurden bereits in einem andern Fall, und zwar beide dem durch oberflächenaktive Substanzen hervorgerufenen Vesikel-Mizellen-Übergang beobachtet. Oberflächenaktive Substanzen bevorzugen Geometrien mit hoher Krümmung. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass dies die oberflächenaktiven Substanzen dazu veranlasst, sich an den Rändern der Doppelschicht zu sammeln (Lasic, 1982; Cevc et al., 1996). Dort bilden sie stark gekrümmte Kappen, welche die hydrophoben Regionen der Lipide vor dem Kontakt mit dem Lösungsmittel schützen (Lasic, 1982; Fromherz 1983).

DC-Chol ist ein oberflächenaktives Molekül. Ein deutlicher Hinweis darauf, dass es stark gekrümmte Flächen bevorzugt, ist, dass es ohne eine Helferlipid wie z.B. Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylcholin überhaupt keine Doppelschichten bildet. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass DC-Chol die Ränder in der beschriebenen Weise abdeckt. Dies vermindert den Verlust an freier Energie, der durch die Ränder entsteht, und katalysiert die oben beschriebene Entstehung multilamellarer Komplexe.

Die hohe Ladungsdichte an den Rändern, die eine Folge der Ansammlung von DC-Chol ist, muss zu einer Anhäufung entgegengesetzt geladener DNS in der Nähe der Ränder führen. Und in der Tat erkennt man recht häufig dunkle Punkte an diesen Stellen, die auf eine erhöhte Elektronendichte hinweisen (beispielsweise in Abbildung 41 B). Man kann annehmen, dass es sich um DNS handelt, die an den Doppelschichträndern adsorbiert oder aufgerollt ist. Im Moment ist es nicht sicher, ob die offenen Doppelschichten Gleichgewichtsstrukturen sind, oder lediglich sehr langlebige metastabile Strukturen.

Wie bereits oben beschrieben, deutet das fingerabdruckähnliche Muster über den großen Komplexen auf ein paralleles Ausrichten der DNS über verschiedene Schichten hinweg hin. Es ist anzunehmen, dass diese Korrelation durch eine Strukturierung der benachbarten Lipidmembrane vermittelt wird, die insbesondere eine Neuverteilung der kationischen Lipide in der Doppelschicht und damit auch der Ionen in der Grenzschicht zur Folge hat. Nach einer solchen Strukturierung muss auch die äußerste Doppelschicht eines

multilamellaren Komplexes strukturiert sein, während ursprüngliche, jungfräuliche Vesikel diese Eigenschaft nicht aufweisen. Man könnte somit argumentieren, dass die DNS-Moleküle eine höhere Affinität zu einer vorstrukturierten Doppelschicht haben und daher multilamellare Komplexe schneller Wachsen, indem sie mehr DNS anziehen als unilamellare Vesikel. Neben dieser korrelationsinduzierten Anziehung kann auch die verminderte Membranflexibilität, welche die membrannahe Abstoßung senkt, hierzu beitragen. Ein solcher Mechanismus könnte helfen, zu erklären, weshalb in den untersuchten Suspensionen große multilamellare Komplexe und unilamellare Vesikel in großer Zahl vorkommen, jedoch nur wenige oligolamellare Komplexe zu finden sind.

Pfade der Komplexbildung

In Abbildung 47 sind die möglichen Entwicklungspfade für die Komplexe dargestellt, wie sie von den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen nahegelegt werden. Ausgehend von einem DNS-bedeckten Vesikel (A) entstehen fusionierte Vesikel (D), Vesikeltrauben (F) und/oder multilamellare Komplexe (H). Das relative Verhältnis von DNS und kationischem Lipid wie auch die absoluten Konzentrationen dieser beiden Komponenten entscheiden darüber, welcher Pfad eingeschlagen wird. Man muss annehmen, dass die lokalen Konzentrationen hierbei entscheidend sind. Eine hohe örtliche Lipidkonzentration verschafft den Vesikeln mehr Gelegenheit, miteinander in Kontakt zu kommen und große multilamellare Komplexe zu bilden. Eine hohe örtliche DNS Konzentration dürfte hingegen die kationischen Ladungen auf der äußeren Monoschicht der Vesikel schnell neutralisieren und damit weitere Komplexbildung unterbinden, denn zwei vollständig DNS-bedeckte Membrane sollten nicht mehr fähig sein, aneinander zu adsorbieren (E).

Die Entstehung von Komplexen aus kationischem Lipid und DNS führt zu einer Vielfalt von Vesikel- und Komplexmorphologien. Die Ergebnisse variieren stark mit dem Herstellungsverfahren und den verwendeten Lipiden. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde natürlich nur ein Teil dieser Vielfalt untersucht. Es wurde aber ein wahrscheinlich recht vollständiges Szenario für die Entstehung multilamellarer CL-DNS-Komplexe aufgedeckt, das in solchem Detail vorher nicht bekannt war.

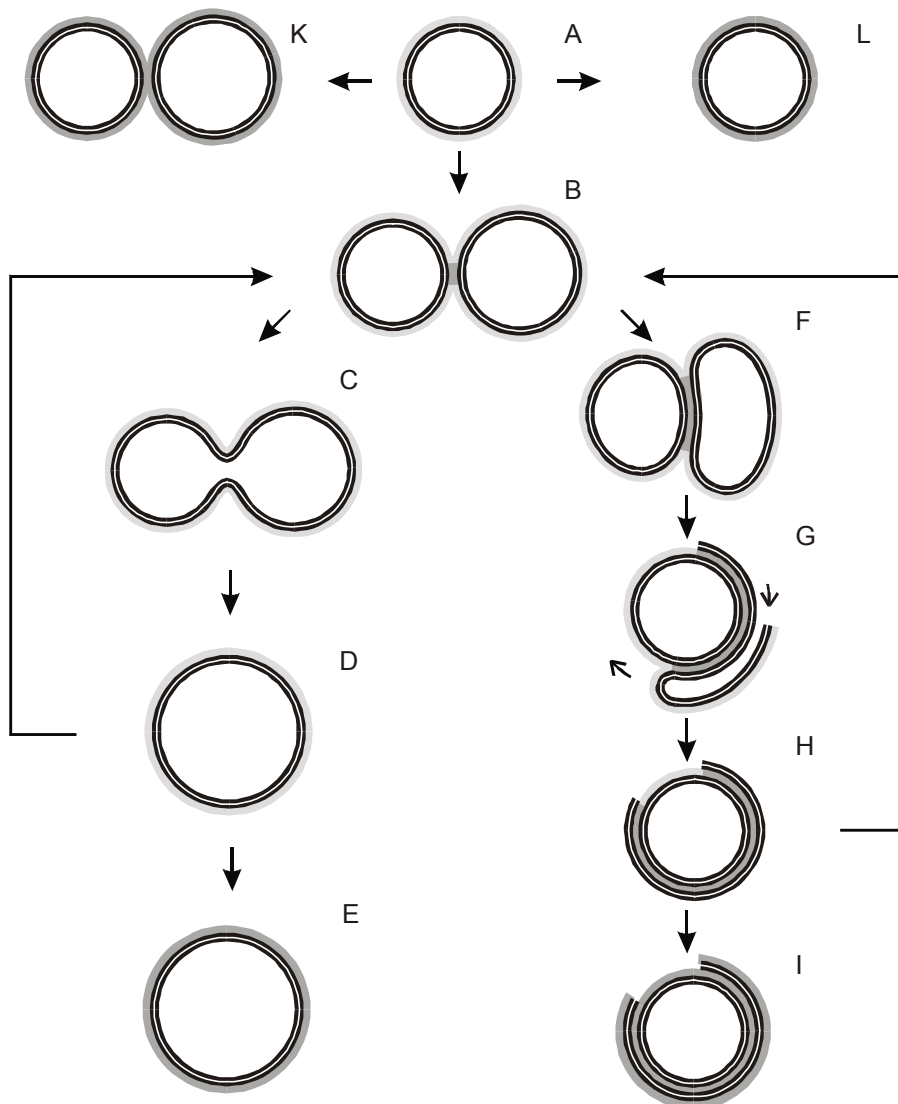


Abbildung 47: vorgeschlagener Mechanismus für die Umorganisation der Lipid-doppelschichten in der Anwesenheit von DNS. DNS (grau) spult sich um ein unilamellares Vesikel (schwarz) und bedeckt es teilweise mit DNS (A). Zwei Vesikel, von denen zumindest eines teilweise mit DNS bedeckt ist, adsorbieren aneinander (B). Es kommt zur Fusion, wenn die Destabilisierung der Membran durch adsorbierte DNS eine Pore erzeugt (C). Anschließend minimiert das Vesikel seine Membranenergie, indem es eine annähernd sphärische Form annimmt (D). Wenn es nicht dicht mit DNS bedeckt ist, kann es an weiteren Fusionschritten teilnehmen oder alternativ an der Entstehung multilamellarer Strukturen: Ausgehend von Schritt (B) entstehen multilamellare Strukturen, wenn ein Vesikel nach der Verformung reißt (F). Solch ein Vesikel rollt seine Doppelschicht über das andere, noch intakte Vesikel (G). Dabei entsteht eine adsorbierte Doppelschicht mit einem offenen Rand (H) und einer DNS-freien Außenseite, an die auf die gleiche Weise weitere Schichten adsorbieren können. Der Vorgang kann nicht stattfinden, wenn die in Kontakt kommenden Vesikel an ihrer Außenseite vollständig belegt sind (E, I, K, L).

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Cryo-TEM

Drei verschiedene Typen von Komplexen, die in Mischungen von DNS mit Vesikeln, die das kationische Lipid DC-Chol und DMPC als Helferlipid enthalten, entstehen wurden untersucht:

- 1) DNS-bedeckte und fusionierte, DNS-bedeckte unilamellare kationische Lipidvesikel;
- 2) Trauben DNS-bedeckter unilamellarer Vesikel, die in den Kontaktbereichen stark deformiert sind;
- 3) äußerst kompakte multilamellare Komplexe, die aus alternierenden DNS- und Lipiddoppelschichten bestehen und sich oft um ein einziges zentrales Vesikel herum bilden.

Immer wieder sind die äußeren Schichten der CL/DNS-Komplexe nicht vollständig geschlossen, sondern haben offene Ränder mit Hinweisen auf erhöhte lokale DNS-Konzentration. Pfade, die zu den verschiedenen Strukturen führen schließen Adsorption, Fusion und einen Prozess, bei dem adsorbierende Vesikel bersten und ihre Doppelschicht auf einem anderen Vesikel oder einem Komplex abrollen, ein. Das Ergebnis und die bevorzugte Komplexbildung in der Suspension hängt von dem gewählten Pfad und den absoluten und relativen Mengen von Lipid und DNS in der Suspension ab. Die Spezifikation der verwendeten Lipide oder des verwendeten Ladungsverhältnisses alleine reicht für eine vollständige Beschreibung der Probe also nicht aus, und genügt für sich genommen nicht für die Vorhersage der endgültige Form der Komplexe. Die an die Lipidvesikel adsorbierte DNS bildet eine Einfachschicht parallel angeordneter Fäden. Bei multilamellaren Komplexen sind die Orientierungen der Helices in verschiedenen Schichten zueinander korreliert.

DNS-Adsorption

Die cryo-transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die multilamellaren CL/DNS-Komplexe für gewöhnlich eine globuläre Zwiebelschalenstruktur annehmen, bei der sich Lipiddoppelschichten mit DNS-Monoschichten abwechseln. Auch der grundsätzliche Ablauf der Komplexbildung konnte aus den Cryo-TEM-Aufnahmen abgeleitet werden. Die Elektronenmikroskopie hat aber den entscheidenden Nachteil, dass sie nur eine Momentaufnahme zulässt, weil die Probe bei der Präparation zerstört wird.

Um die Details der Komplexbildung zu erforschen, wurde deshalb auf ein anderes Verfahren, die zeitaufgelöste, energiedispersive Röntgenreflektometrie zurückgegriffen. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Entstehung der selbstorganisierten Struktur zu verfolgen, und zwar nicht-invasiv und mit relativ hoher räumlicher Auflösung. Da es sich hierbei um ein oberflächensensitives Verfahren handelt, war es nötig, eine neue Geometrie zu finden, bei der die Komplexbildung an einer Oberfläche, und nicht im Volumen stattfindet. Dies gelang dadurch, dass an der Wasser/Luft-Grenzfläche der in einen flachen Trog gefüllten Suspension ein Langmuirfilm gespreitet wurden der als Substrat für die Komplexbildung diente.

Die Röntgenreflektometrie ist ein gut etabliertes Werkzeug zur Charakterisierung von Langmuirfilmen (vgl. Als-Nielsen und Möhwald, 1991 und die darin genannten Referenzen). Die Methode wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um das Binden von Proteinen an Lipidmembrane zu untersuchen (Vaknin et al., 1993; Lösche et al., 1993). Für gewöhnlich werden jedoch monochromatisierte Röntgenstrahlen nacheinander unter verschiedenen Winkeln an der Probe reflektiert. Eine effizientere und daher schnellere Methode besteht darin, den Winkel festzuhalten und dafür die monochromatische durch eine polychromatische Quelle zu ersetzen. Diese Methode nutzt die Tatsache aus, dass der Wellenvektorübertrag q aus Gleichung (2) nicht nur eine Funktion des Einfallswinkels α sondern auch der Wellenlänge λ ist. Durch den Einsatz der energiedispersiven

Röntgenreflektometrie kann also eine vergleichsweise hohe Zeitauflösung erzielt werden (Orita et al., 1997; Plech et al., 1998; Vierl und Cevc, 1997).

Bei der Untersuchung des zeitlichen Ablaufs muss man zwei Vorgänge mit, wie sich zeigt, deutlich unterschiedlicher Kinetik betrachten: die Adsorption der DNS und die Adsorption der Lipidschichten. Als erstes wird die DNS-Adsorption untersucht.

DNS-Adsorption ist diffusionskontrolliert

Die Kinetik des Adsorptionsvorgangs wurde sowohl bei DNS-Mangel als auch bei DNS-Überschuss untersucht. Die gemessenen Kinetiken wurden mit der theoretischen Vorhersage auf der Basis eines Diffusionsmodells verglichen.

Bei den DNS-Mangel-Messungen enthielt der Trog DNS in einer Konzentration von $1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$. Der Langmuirfilm war aus 40 % DC-Chol und 60 % DMPC zusammengesetzt. Wie sich die Reflektivität mit der Zeit verändert, ist in Abbildung 48 anhand einiger ausgewählter Messdaten illustriert.

Die gemessenen Reflektivitäten wurden mit Hilfe des Molekülmodells angepasst. In der Abbildung stellen die durchgezogenen Linien die Modellreflektivitäten dar. Die dazugehörigen Modell-Elektronendichteprofile zeigt Abbildung 49. Man erkennt, dass die DNS-Schicht unterhalb des Langmuirfilms langsam wächst. Die Schicht ist so schmal, dass es sich nur um eine Einzelschicht nebeneinander adsorbierter DNS-Moleküle (Durchmesser ca. 2 nm) handeln kann.

Vergleicht man das Elektronendichteprofil des nackten Langmuirfilms ($t = 0$) mit dem Elektronendichteprofil des Langmuirfilms mit einer adsorbierter DNS-Schicht zu verschiedenen Zeitpunkten, so kann man auf die Menge adsorbierter DNS, also auf die DNS-Belegungsdichte schließen. In Abbildung 50 ist dies schematisch dargestellt. Die graue Fläche der durch die DNS verursachten zusätzlichen Elektronendichte

$$\Delta\sigma_{DNS} = \int (\rho(z) - \rho_{H_2O}) dz$$

ist proportional zur Menge der adsorbierten DNS, also umgekehrt proportional zum Interaxialabstand der DNS-Fäden d_{DNS} :

$$\Delta\sigma_{DNS} = b\rho_{H_2O} \frac{1}{d_{DNS}}$$

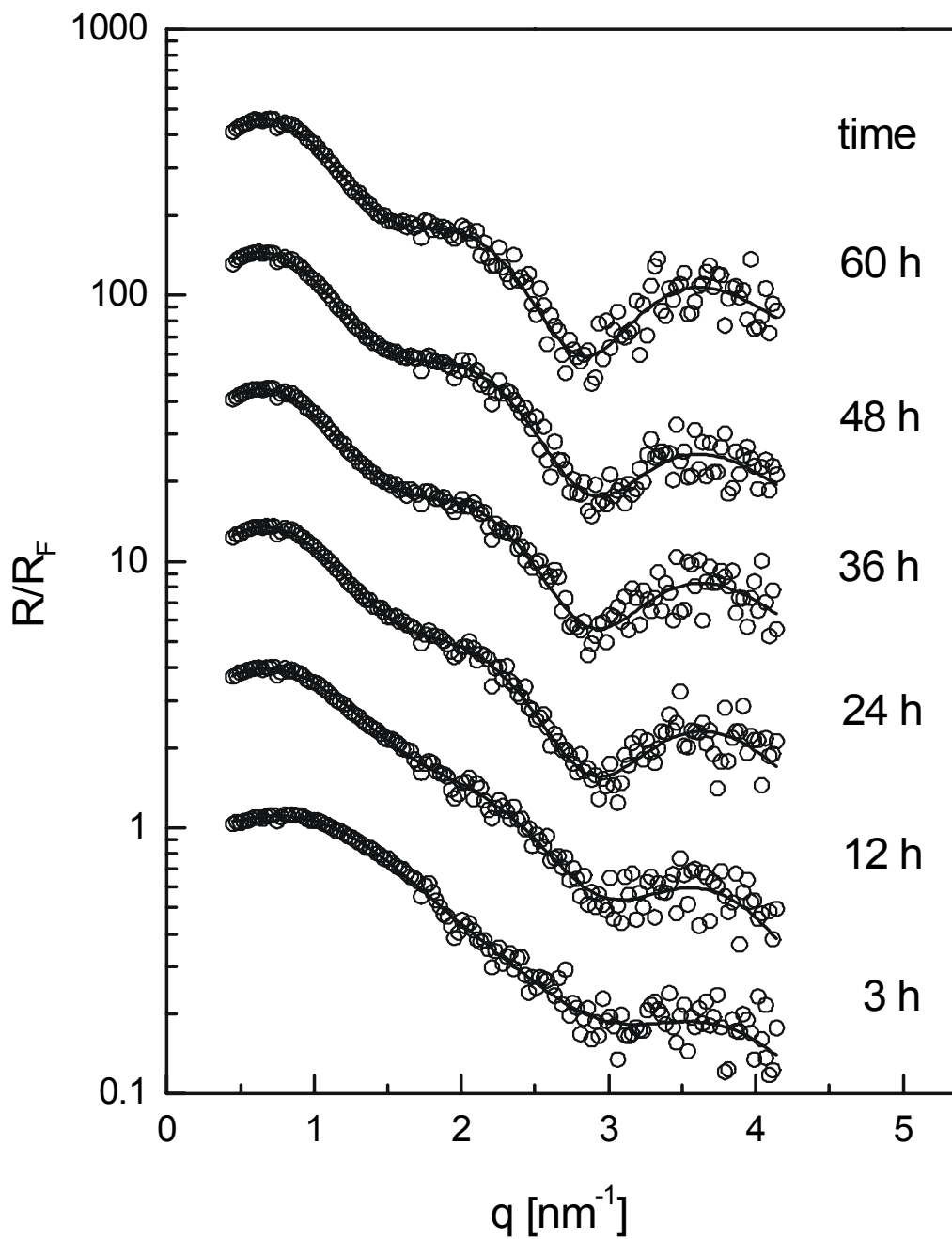


Abbildung 48: die Veränderung der Reflektivität durch die Adsorption von DNS an einen Langmuirfilm an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Die Reflektivitäten sind fresnelnormiert (R/R_F) und um den Faktor $\sqrt{10}$ vertikal zueinander verschoben. q ist der Streuvektor. Die gemessenen Reflektivitätsdaten sind als Punkte dargestellt (\circ), die durchgezogenen Kurven geben das Ergebnis des optimierten Molekülmodells wieder ($—$).

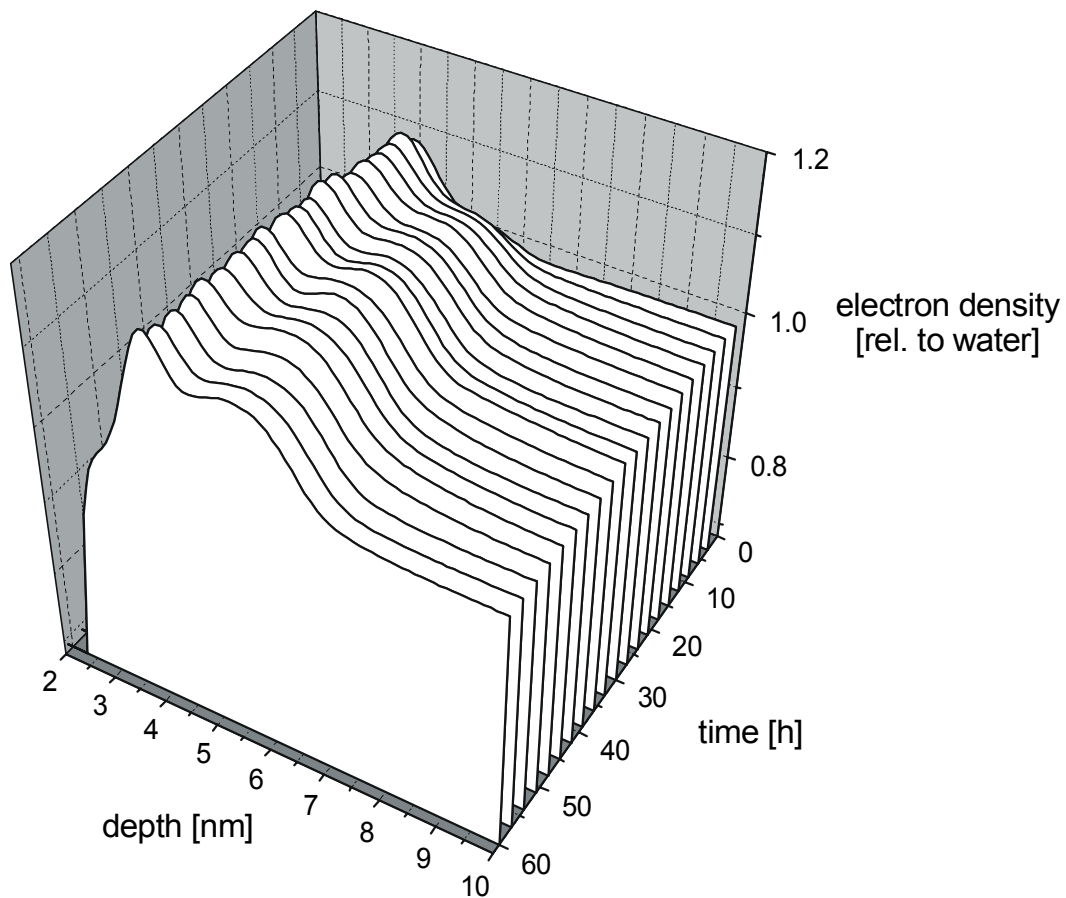


Abbildung 49: Unter dem Langmuirfilm bildet sich langsam eine DNS-Einfachschicht, wie die Zeitentwicklung des Elektronendichteprofiles deutlich macht. Die Modell-Elektronendichteprofile sind durch Anpassen des Molekülmodells an die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen Reflektivitätsdaten aus Abbildung 48 entstanden.

Der Proportionalitätsfaktor b wurde oben aus dem Brookhaven-Modell der DNS zu $b = 13.1 \text{ nm}^2$ bestimmt (siehe Gleichung 1).

Die DNS-Fragmente diffundieren als langes Polymer nur relativ langsam in der Lösung. In der Literatur ist für Fragmente von 6000 bp Länge die Diffusionskonstante $D_{DNS} = 1.4 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ angegeben (Smith et al., 1995). Durch Einsetzen in

$$(5) \quad \overline{x^2} = 3D_{DNS}t \quad \text{Einstein-Smoluchowski-Gleichung}$$

erhält man eine mittleren freien Weglänge von $\sqrt{3D_{DNS} \cdot 1 \text{ s}} = 2 \text{ }\mu\text{m}$ in einer Sekunde. Nun ist aber zu beachten, dass aufgrund der brownischen Zitterbewegung bei der Diffusion die

mittlere frei Weglänge nur der Wurzel der zur Verfügung stehenden Zeit proportional ist. Einer mittleren freien Weglänge in der Größe der Trogtiefe (500 μm) entspricht daher einer Diffusionszeit von über sechs Stunden. Man sollte deshalb vermuten, dass die Diffusion die Kinetik der DNS-Adsorption wesentlich bestimmt.

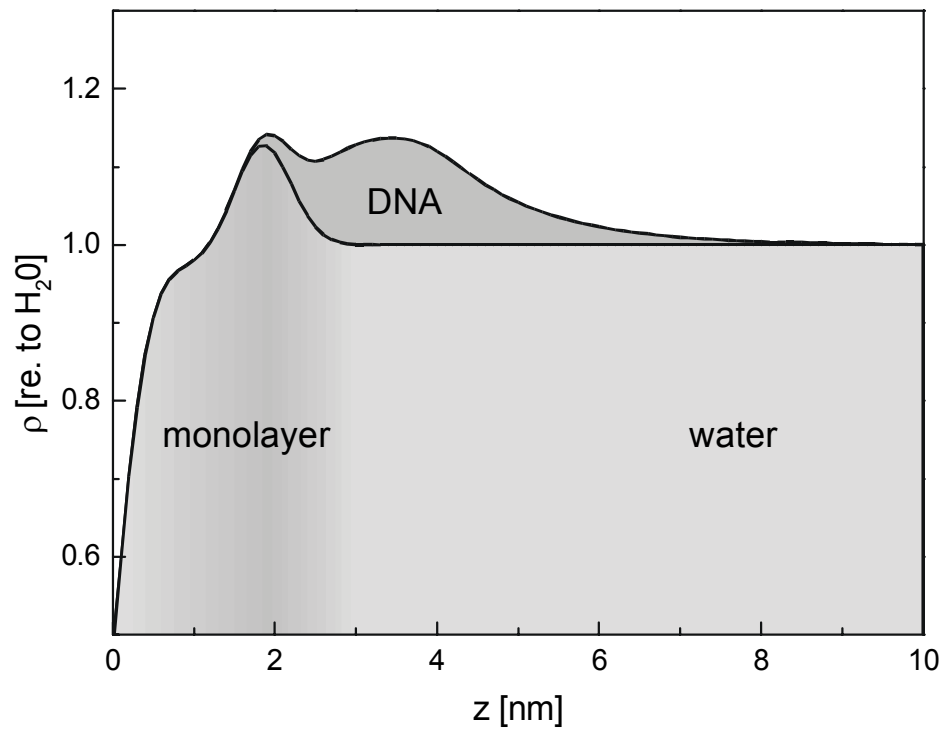


Abbildung 50: Bestimmung der DNS-Belegungsdichte durch Vergleich der Elektronendichten vor und nach der DNS-Adsorption. Die dunkelgraue Fläche gibt die durch die adsorbierte DNS verursachte zusätzliche Elektronendichte an. Sie ist proportional zur Menge adsorbierter DNS.

Bei einem diffusionsgetriebenen Prozess ist die Stromdichte j_{DNS} proportional zum Konzentrationsgefälle:

$$(6) \quad j_{DNS}(z, t) = -D_{DNS} \cdot \frac{\partial}{\partial z} c_{DNS}(z, t). \quad \text{1. Ficksches Gesetz}$$

Der Proportionalitätsfaktor D_{DNS} ist die Diffusionskonstante der DNS. Weil

$$\frac{\partial}{\partial t} c_{DNS}(z, t) = -\frac{\partial}{\partial z} j_{DNS}(z, t)$$

ist (wenn aus einem Volumen mehr Teilchen hinein als hinausfließen, nimmt die Teilchenzahl ab), folgt aus Gleichung 6 die allgemeine Diffusionsgleichung:

$$(7) \quad \frac{\partial}{\partial t} c_{DNS}(z, t) = -D_{DNS} \frac{\partial^2}{\partial z^2} c_{DNS}(z, t) \quad \text{2. Ficksches Gesetz}$$

Diese Differentialgleichung hat die allgemeine Lösung

$$c_{DNS}(z, t) = e^{-\frac{D}{A^2}t} \left(B \cos\left(\frac{z}{A}\right) + C \sin\left(\frac{z}{A}\right) \right)$$

mit beliebigen A . Die Konstanten B und C erhält man aus zwei Randbedingungen: erstens wird angenommen, dass die Lipidschicht eine DNS-Senke darstellt, in dem Sinne, dass die DNS, sobald sie die Lipidschicht erreicht, dort adsorbiert, also nicht mehr zur Verfügung steht. Daraus folgt die erste Randbedingung

$$c_{DNS}(z = 0, t) = 0$$

(Die Lipidschicht befindet sich bei $z = 0$). Außerdem hat der Trog nur eine begrenzte Tiefe $L = 500 \mu\text{m}$, so dass als zweite Randbedingung

$$\frac{\partial}{\partial z} c_{DNS}(z = L, t) = 0$$

folgt. Unter diesen beiden Randbedingungen hat Gleichung 7 als spezielle Lösung die Summe

$$(8) \quad c_{DNS}(z, t) = \sum_i v_i \sin\left(\frac{(i - \frac{1}{2})\pi}{L} x\right) e^{-D_{DNS} \left(\frac{(i - \frac{1}{2})\pi}{L}\right)^2 t}.$$

Die Koeffizienten v_i erhält man aus der Anfangsbedingung. Zu Beginn des Experiments ($t = 0$) ist die DNS-Konzentration innerhalb des gesamten Troges konstant. Daraus folgt die Anfangsbedingung

$$c_{DNS}(z, t = 0) = c_{0DNS} \quad \text{für alle } z \text{ für die gilt } 0 > z > L$$

Hierbei stellt c_{0DNS} die Anfangskonzentration der DNS dar. Dann sind die Koeffizienten gegeben durch

$$v_i = c_{0DNS} \frac{1}{2i-1}.$$

Mit dem 1. Fickschen Gesetz (Gleichung 6) folgt aus der Konzentrationsverteilung (Gleichung 8) die Stromdichte

$$(9) \quad j_{DNS}(z, t) = -D_{DNS} \sum_i v_i \frac{(i-\frac{1}{2})\pi}{L} \cos\left(\frac{(i-\frac{1}{2})\pi}{L} z\right) e^{-D_{DNS} \left(\frac{(i-\frac{1}{2})\pi}{L}\right)^2 t}.$$

Die Belegungsdichte der Lipidschicht mit DNS $\frac{1}{d_{DNS}}$ zu einem Zeitpunkt t ist durch die DNS-Menge bestimmt, die seit Experimentbeginn ($t = 0$) die Lipidschicht ($z = 0$) erreicht hat:

$$(10) \quad \frac{1}{d_{DNS}(t)} = M \cdot 0.34 \text{ nm} \cdot N_A \int_{\tau=0}^t -j_{DNS}(z=0, \tau) d\tau.$$

Der Vorfaktor gibt die Gesamtlänge eins Mols DNS-Fragmente der Länge $M = 6000$ bp an. Darin ist N_A die Avogadrokonstante. Aus Gleichung 10 folgt mit Gleichung 9 die Belegungsdichte

$$(11) \quad \frac{1}{d_{DNS}(t)} = M \cdot 0.34 \text{ nm} \cdot N_A \sum_i v_i \frac{L}{(i-\frac{1}{2})\pi} \left(1 - e^{-D_{DNS} \left(\frac{(i-\frac{1}{2})\pi}{L}\right)^2 t} \right),$$

wenn man beachtet, dass ein Basenpaar bei B-DNS ca. 0.34 nm lang ist. Nun ist noch zu berücksichtigen, dass die DNS keine einheitliche Länge, sondern eine breite Längenverteilung gemäß

$$p(m) = \frac{1}{M} e^{-\frac{m}{M}}$$

besitzt. Setzt man dies in Gleichung 11 an Stelle von M ein und integriert über alle m folgt an Stelle von Gleichung 11 die neue Gleichung

$$(11a) \quad \frac{1}{d_{DNS}}(t) = \frac{1}{M} 0.34 \text{ nm} \cdot N_A \sum_i v_i \frac{L}{\left(i - \frac{1}{2}\right)\pi} \int_0^\infty e^{-\frac{m}{M}} \left(1 - e^{-D_{DNS}(m) \left(\frac{(i-\frac{1}{2})\pi}{L}\right)^2 t} \right) dm.$$

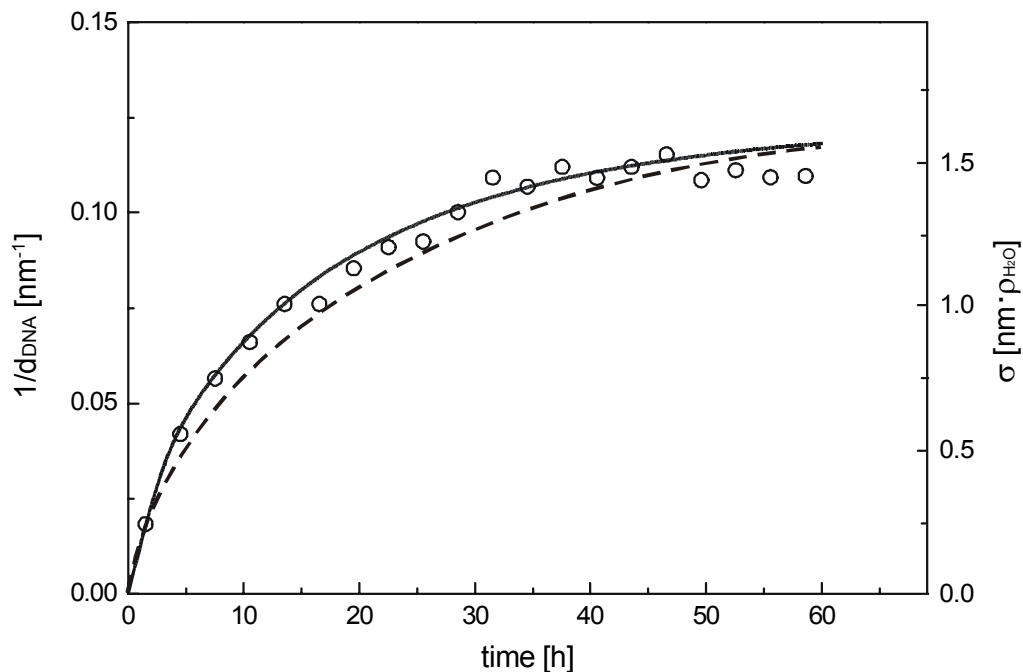


Abbildung 51: die DNS-Adsorption ist diffusionskontrolliert. Dargestellt ist die Zeitentwicklung der zusätzlichen Elektronendichte, die durch adsorbierte DNS verursacht wird, (σ , \circ , abgeleitet durch Anpassen des Molekülmodells an die Reflektivitätsdaten) und die durch das Diffusionsmodell (—) vorhergesagte DNS-Belegungsdichte $\frac{1}{d_{DNS}}$. Auch eingezeichnet ist die Zeitentwicklung nach dem Molekülmodell unter der vereinfachten Annahme, dass die Verteilung der DNS-Fragmente monodispers ist (---), mit einer Fragmentlänge von 6000 bp.

Wie Abbildung 51 zeigt, decken sich die Messdaten erstaunlich gut mit der vom Diffusionsmodell vorhergesagten Kinetik, wenn man die breite Verteilung der

Fragmentlängen berücksichtigt (durchgezogene Kurve). Jedes DNS-Fragment, das die Lipidschicht erreicht, adsorbiert also.

Anders ist die Situation bei einem DNS-Überschuss. Das Ergebnis des gleichen Experiments für diesen Fall ist in Abbildung zu sehen. Diesmal beträgt die DNS-Konzentration $6 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$, bei Zusammensetzung des Langmuirfilms. Ab einer Belegung von ca. 80 % der Maximalbelegung, beginnt die gemessene Belegung stark von der Vorhersage abzuweichen.

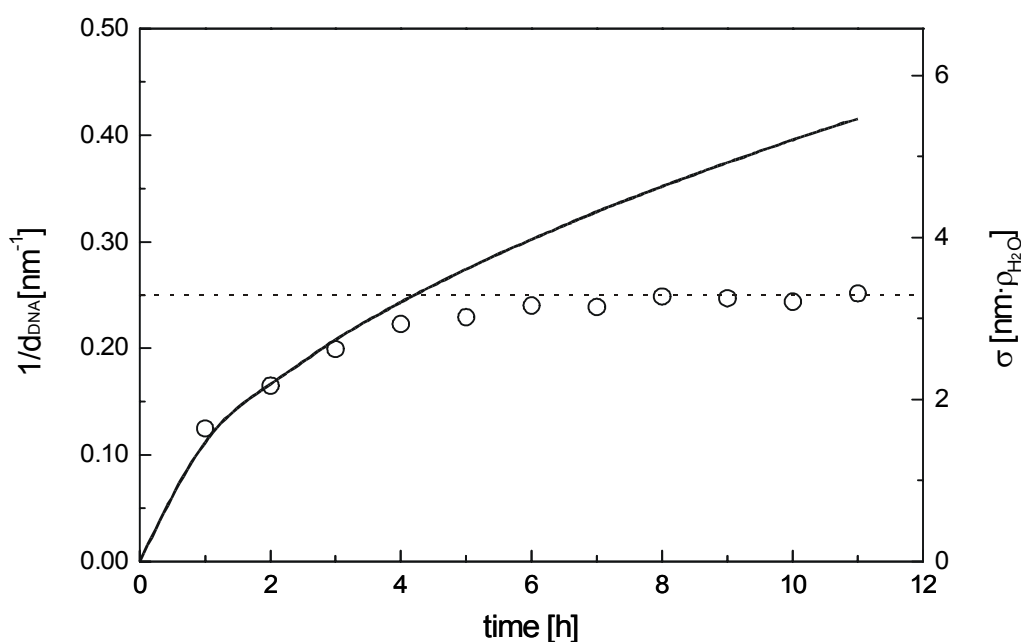


Abbildung 52: Die kationische Lipidschicht hat nur eine begrenzte DNS-Kapazität. Das äußert sich darin, ab einer gewissen DNS-Belegung die Messergebnisse von der Vorhersage des Diffusionsmodells (das von einer unbegrenzten Kapazität ausgeht) abweichen. Die maximal erreichbare DNS-Belegung entspricht einem Interaxialabstand der DNS-Fäden von $d_{DNS} \approx 4 \text{ nm}$ (der DC-Chol Anteil in der Membran beträgt 40%).

Hier macht sich offensichtlich die Tatsache bemerkbar, dass die kationische Lipidschicht nur eine begrenzte Menge DNS aufnehmen kann. Ist bereits der größte Teil der Membran mit DNS belegt, fällt die Adsorptionsrate hinter den Wert eines rein diffusionskontrollierten Vorganges zurück.

Die Sättigungsbelegung entspricht einem mittleren Interaxialabstand von 4 nm. Dieser stimmt hervorragend mit den Ergebnissen der Cryo-TEM überein. Dort wurde bei den DNS-bedeckten unilamellaren Vesikeln ein mittlerer Interaxialabstand von 3.8 nm gemessen.

DNS-Belegung nimmt mit der Membranladung zu

Das letzte Experiment wurde mit unterschiedlich zusammengesetzten Langmuirfilmen wiederholt, um zu sehen, wie die Sättigungsbelegung der Membran mit DNS mit der Membranladung korreliert. Das Ergebnis ist in Abbildung 53 dargestellt. Zumindest für DC-Chol Anteile von 40 % oder weniger ist der Zusammenhang offensichtlich linear. Jedoch scheint es bei einem Interaxialabstand von $d_{DNS} \approx 3.5$ eine Grenze zu geben. Letzteres stimmt quantitativ mit Ergebnissen aus Computersimulationen (Rami Reddy und Berkowitz, 1989) überein, bei denen eine starke hydrationsbedingte Abstoßung zwischen den simulierten DNS-Molekülen festgestellt wurde, wenn der Interaxialabstand auf 35 nm betrug. In linearer Näherung gilt für die DNS-Belegung

$$\frac{1}{d_{DNA}} \propto c_{DNA,0} \propto \Psi_0,$$

wobei '0' den Ort der DNS-Schicht bezeichnet. In der Gouy-Chapman-Näherung gilt außerdem für Ψ_0

$$\Psi_0 \propto \sinh^{-1}(\Sigma),$$

(wobei die Membranladung Σ durch den DC-Chol Anteil der Membran gegeben ist) oder bei kleinen Membranladungen

$$\Psi_0 \propto \Sigma.$$

Hieraus folgt ein \sinh^{-1} bzw. ein linearer Zusammenhang zwischen DNS-Belegung und DC-Chol-Anteil in der Membran.

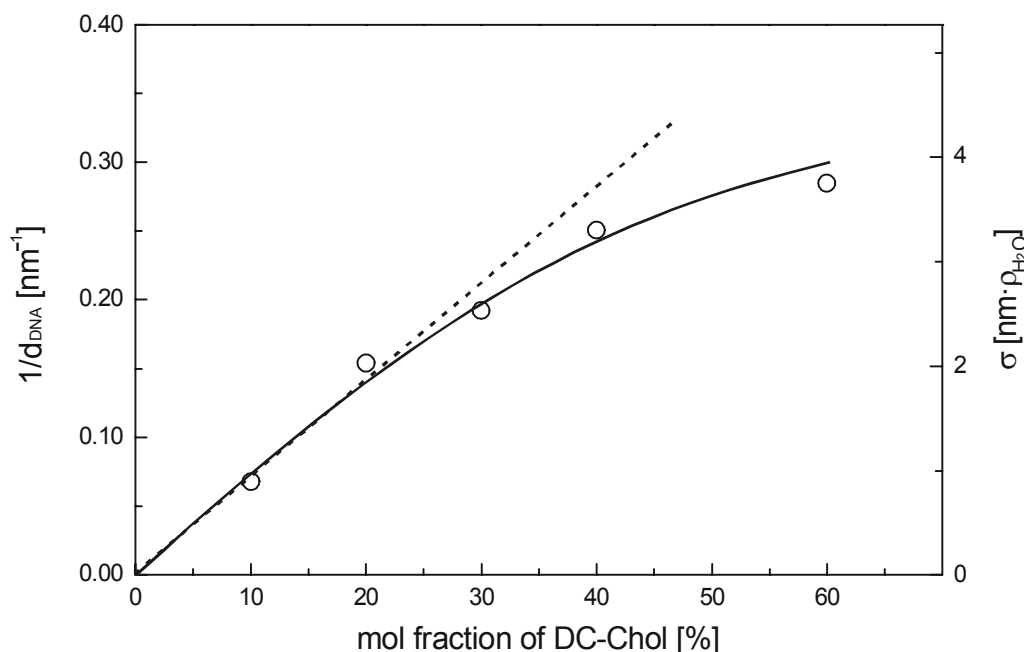


Abbildung 53: Die maximale DNS-Belegung nimmt mit der Membranladung zu. Die eingezeichnete Gerade (····) entspricht einem DNS-Phosphatgruppen/DC-Chol Verhältnis von 1.5. Auch eingezeichnet ist eine angepasste \sinh^{-1} -Funktion, die den Zusammenhang zwischen Membranladung und DNS-Belegung bestimmt, wenn die Adsorption elektrostatisch angetrieben ist.

Geht man davon aus, dass bei den vorher besprochenen Cryo-TEM-Untersuchungen die DNS-Adsorption ebenfalls größtenteils diffusionskontrolliert ist, kann man die Adsorptionsgeschwindigkeit unter den dortigen Bedingungen überschlagen. Die Komplexe wurden bei diesen Experimenten auf die gleiche Weise hergestellt, wie es für die Präparation von Lipid/DNS-Komplexen zur Transfektion üblich ist. Dabei wurde die DNS-Lösung mit einer Suspension von Lipidvesikeln zusammengebracht. Entsprechend adsorbierte DNS nicht an einer ausgedehnten Wasser/Luft-Grenzfläche, sondern an die Oberfläche eines Vesikels in der Suspension.

Die abweichende Geometrie muss in den Gleichungen berücksichtigt werden. Nimmt man an, dass diese Vesikel sphärisch sind, kann man die Diffusionsgleichung unter sphärischen Randbedingungen lösen und kommt zu dem Ergebnis, dass sich, anders als in der planaren Geometrie, ein stationärer Zustand einstellt, bei dem

$$j_{DNA}(r) = -\frac{R}{r^2} (D_{DNA} + D_{vesikel}) c_{0 DNA}$$

(R = Vesikelradius). Wichtig ist, sowohl die Diffusionskonstante der DNS als auch die der Vesikel zu berücksichtigen, die beide in der Suspension brownische Zitterbewegungen ausführen. Wenn man annimmt, dass die Vesikel in erster Näherung kugelschalenförmig sind, so ist der Diffusionskoeffizient $D_{vesikel}$ durch die Stokes-Einstein-Relation gegeben:

$$(12) \quad D_{vesikel} = \frac{k_B T}{6\pi\eta d} \quad \text{Diffusionskonstante eines Vesikels}$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur (298 K), η die Viskosität des Lösungsmittels ($\approx 10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ für Wasser) und d der Vesikeldurchmesser sind. Bei einem Durchmesser von $d = 65 \text{ nm}$ folgt aus Gleichung 12 ein Diffusionskoeffizient von $D_{vesikel} = 3.4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Analog zu dem obigen Vorgehen gelangt man damit zu einer Belegung

$$\theta_{DNA}(t) = k_{DNS} c_{0\,DNA} t ,$$

wobei

$$(13) \quad k_{DNS} = \frac{6000 \cdot 0.34 \text{ nm} \cdot d_{DNS} N_A}{R} (D_{DNS} + D_{vesikel})$$

die Ratenkonstante darstellt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vesikeln mit einem Durchmesser von 65 nm und einem Interaxialabstand von 4 nm ist $k_{DNS} = 0.5 \cdot 10^6 \frac{\text{L}}{\text{Mol}\cdot\text{s}}$. Die DNS-Konzentration in den Cryo-TEM-Experimenten betrug $c_{0\,DNS} = 0.2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 4.8 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{L}}$. Daraus folgt, dass die Vesikel bereits nach wenigen Sekunden zu einem großen Teil mit DNS bedeckt sind. Diese Größenordnung scheint sinnvoll, denn tatsächlich werden bei den üblichen Protokollen zur Präparation von CL/DNS-Komplexen für die Transfektion Inkubationszeiten von nur wenigen Minuten angegeben.

Adsorption der Lamellen

Mittels zeitaufgelöster energiedispersiver Röntgenreflektometrie wurde die Entstehung von Multischichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche untersucht. Dazu wurde im Trog eine Suspension unilamellarer Vesikel (Konzentration: $100 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$) zugesetzt. Das Molverhältnis der Lipide betrug in den Vesikeln wie im Langmuirfilm 3:2 (DMPC:DC-Chol), der mittlere Vesikeldurchmesser 65 nm (± 22 nm). Wie erwartet konnte, war eine Multischichtenbildung am Langmuirfilm zu beobachten, aber überraschenderweise nur, wenn Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) im Puffer vorhanden war. Das bedeutet, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen nicht alleine an der Komplexbildung beteiligt sind, sondern wahrscheinlich von Korrelationseffekten unterstützt werden.

EDTA induziert Multischichtadsorption

EDTA ist ein Chelator für mehrwertige Kationen, der in vielen Pufferformulierungen vorkommt (Abbildung 54). Wie Abbildung 55 zeigt, ist die Gegenwart von EDTA eine Voraussetzung für die Entstehung mehrschichtiger Strukturen aus den kationisch/zwitterionischen Lipidschichten und DNS. Das leitet man aus der Tatsache ab, dass die Reflektivität von Proben, die ohne EDTA hergestellt wurde, sich von der Reflektivität bei denen, die Suspensionen verschiedene Mengen von EDTA enthält, charakteristisch unterscheiden. Während die Reflektogramme, die zu EDTA-haltigen Suspensionen gehören, eine Serie von drei mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Spitzen zeigen, lässt sich in dem entsprechenden Reflektogramm, das ohne EDTA aufgenommen wurde, nichts Vergleichbares erkennen. Spitzen in der Reflektivitätskurve sind typisch für repetitive Strukturen. Man muss daher vermuten, dass EDTA die Entstehung von Mehrschichten auslöst.

Die Ergebnisse eines typischen Kontrollexperiments, bei dem zwar EDTA vorhanden war, aber DNS fehlte, zeigt Abbildung 56. Die Reflektivität ist die einer einfachen Lipidmonoschicht. Weil also Multischichten in der Abwesenheit von DNS nicht vorkommen, müssen sie DNS enthalten.

Um die Schichtstruktur genauer zu verstehen, wurden die Messdaten im folgenden quantitativ analysiert. Das Ergebnis bestätigt, dass bei allen drei untersuchten EDTA-Konzentrationen an die Monoschicht weitere Schichten adsorbiert sind.

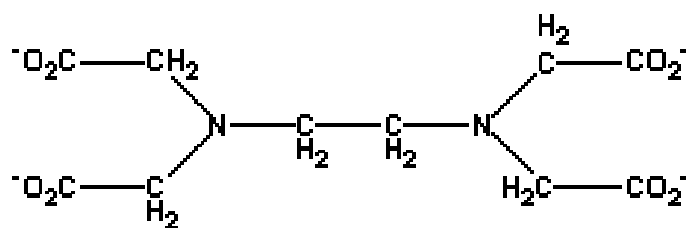


Abbildung 54: chemische Struktur von EDTA.

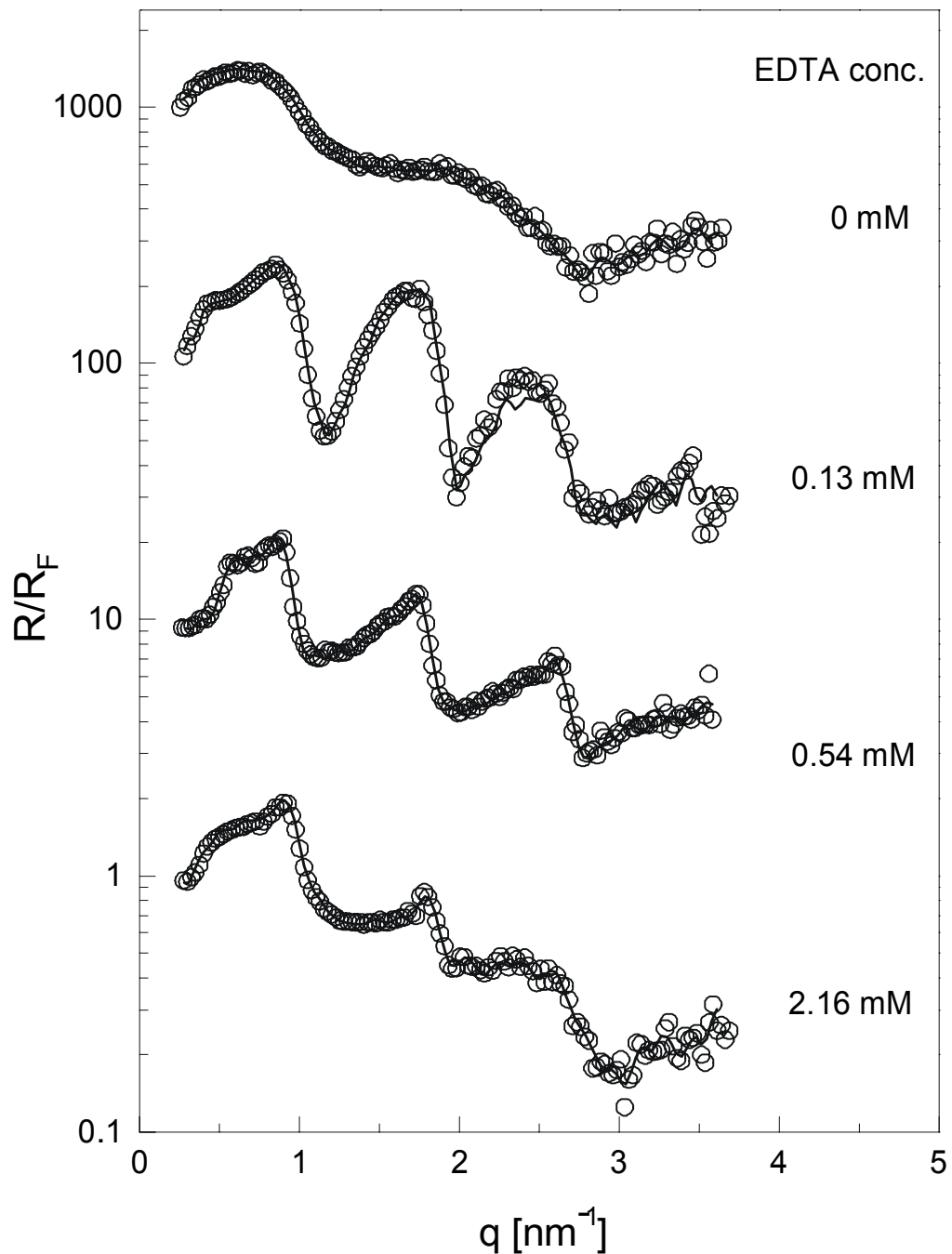


Abbildung 55: fresnelnormierte Reflektivität, R/R_F , der selbstorganisierten Strukturen, die an der Wasser/Luft-Grenzfläche entstehen, in Abwesenheit von EDTA und bei unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen: 0 mM, 0.13 mM, 0.54 mM und 2.16 mM. q ist der Streuvektor. Alle Reflektivitäten wurden nach 100 Stunden aufgenommen. Nur wenn EDTA vorhanden ist, erscheinen scharfe, sägezahnartige Spitzen in der Reflektivitätskurve, die auf das Vorhandensein von Multischichten hindeuten. Die Meßdaten sind als Kreise dargestellt (\circ), die Kurven ($—$) zeigen das Resultat der optimierten Datenanpassung mit einem unvoreingenommenen Frei-Form-Boxmodell.

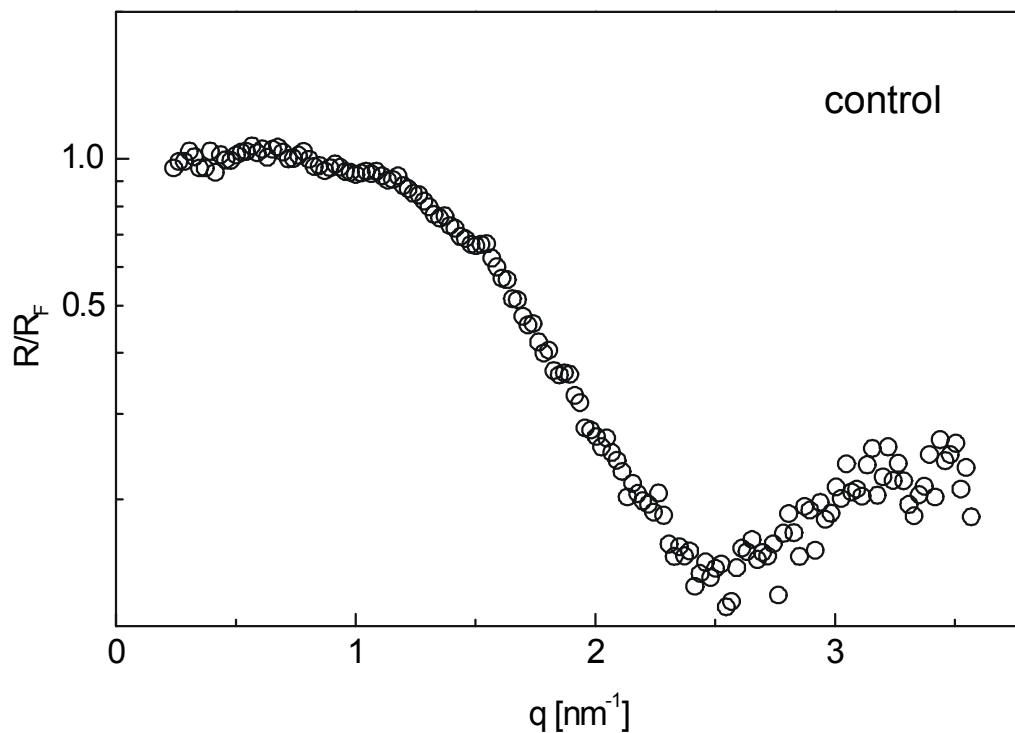


Abbildung 56: fresnelnormierte Reflektivität, die in einem Kontrollexperiment gemessen wurde, in dem die Pufferlösung EDTA, aber keine DNS enthielt. Die Reflektivitätskurve zeigt keine Anzeichen einer multilamellaren Struktur. Vielmehr ist sie deckungsgleich mit der Reflektivitätskurve einer einfachen Lipidmonoschicht.

Multischichtkomplexe an der Elektrolyt/Luft-Grenzfläche

Das Elektronendichteprofil, das nach 100 Stunden in Abwesenheit von EDTA gemessen wurde, ist in Abbildung 57 A dargestellt. Die Elektronendichte ρ ist als Funktion der Tiefe z von der Oberfläche angegeben und wurde mit dem Frei-Form-Boxmodel berechnet. Das von kleinen z aus gesehen erste Maximum in Abbildung 57 A rührt von den elektronendichten Kopfgruppen der Lipidmonoschicht. Links schließt sich eine weniger dichte Region an, was bestätigt dass die polaren Kopfgruppen zum Wasser hin zeigen, während die hydrophoben, alipathischen Lipidketten vom Lösungsmittel ausgeschlossen sind.

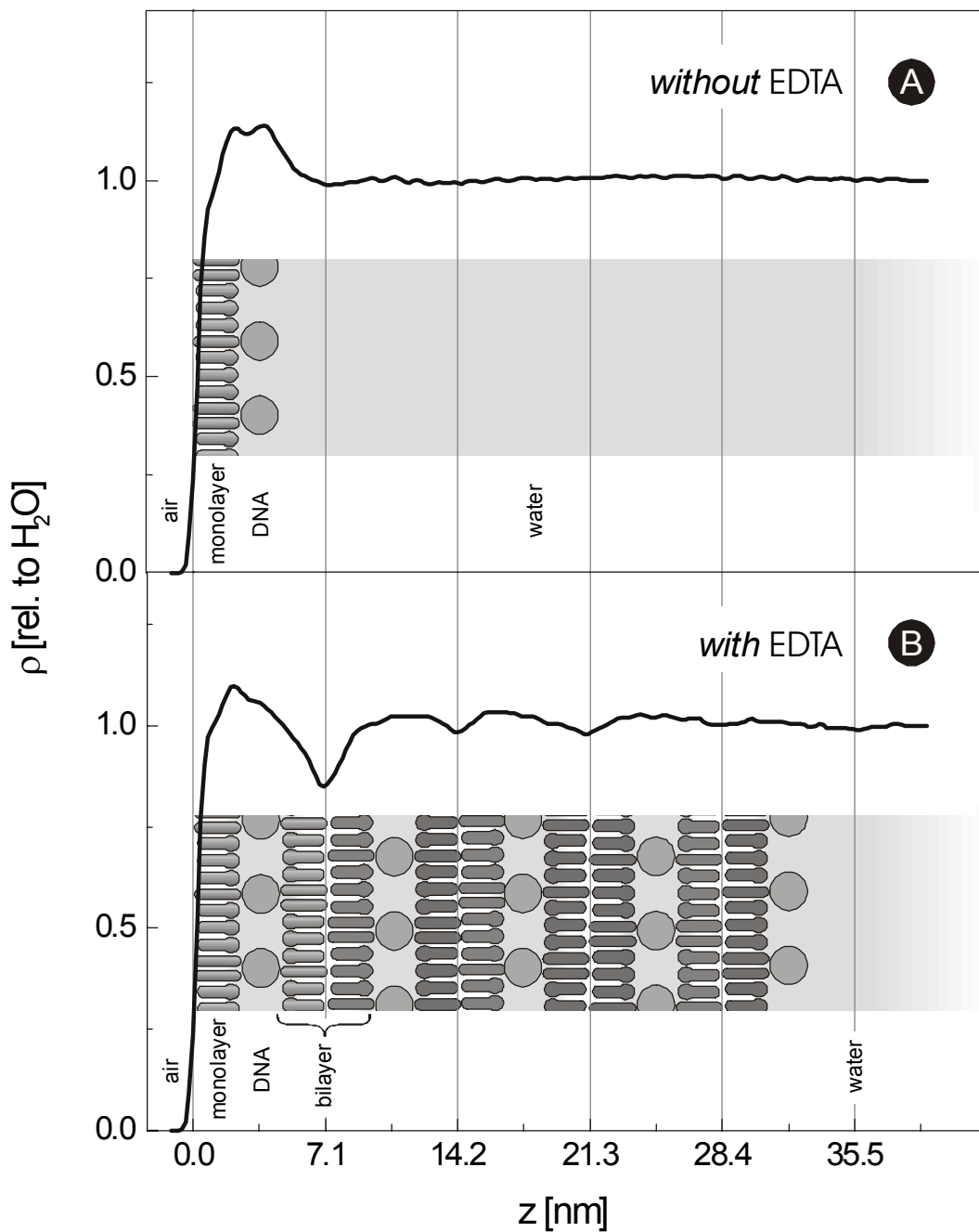


Abbildung 57: EDTA induziert Multischichtbildung. Dargestellt sind die Elektronendichteprofile zu den Reflektivitätskurven in Abbildung 55, ermittelt mit Hilfe eines Frei-Form-Boxmodells. Die Elektronendichte ρ ist als Funktion der Tiefe z wiedergeben. Ist der Puffer frei von EDTA (**A**), ist nur eine Lipidschicht zu sehen, an die eine DNS-Schicht adsorbiert ist. Sind dem Puffer 0.54 mM EDTA zugegeben (**B**), bilden sich Multischichten, bestehend aus Lipiddoppelschichten, die durch DNS-Schichten aneinandergesetzt sind. Die Weite des vertikalen Gitters in den beiden Abbildungen entspricht dem Wiederholabstand der oberflächenadsorbierten CL-DNS Multischichten von 7.1 nm.

Das zweite Maximum, das man bei einfachen Lipidmonoschichten nicht findet, wird von der DNS hervorgerufen, die an die kationischen Lipidschicht adsorbiert ist. Nach der DNS-Schicht fällt die Elektronendichte langsam wieder auf den Wert zurück, der für die wässrige Phase charakteristisch ist (in der Abbildung = 1).

Ein deutlich anderes Bild ergibt sich, wenn dem Puffer EDTA zugegeben ist. Das Elektronendichteprofil, in Abbildung 57 B weist nun bis zu vier adsorbierte Lamellen auf, die aus Lipiddoppelschichten bestehen, zusammengefügt durch zwischen ihnen eingeschlossene DNS-Schichten. Die niedrige Elektronendichte in der Mitte jeder Doppelschicht entspricht den wenig geordneten Ketten der Lipide. Die Bereiche hoher Elektronendichte gehören wieder zu den relativ elektronenreichen Lipid-Kopfgruppen, sowie zu der DNS zwischen den Lipidschichten. Die Periodizität beträgt 7.1 nm.

Warum ändert sich in Gegenwart von EDTA in der Suspension die Morphologie der CL/DNS-Komplexe so drastisch? Wie man nun aus Abbildung 57 sehen kann, ist die Gegenwart von EDTA keine Voraussetzung für die Adsorption von DNS an die Lipidmonoschicht. Vielmehr scheint EDTA auf subtile Weise die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Bausteinen des Komplexes zu beeinflussen und ermöglicht so die Adsorption und das anschließenden Aufbrechen der Vesikel. Dies könnte z.B. auf die Bildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sein. Die Ladungsabschirmung, von der bekannt ist, dass sie mit der Valenz des Salzes zunimmt, kommt nicht in Betracht, da EDTA und DNS gleiche Vorzeichen tragen. Viel wahrscheinlicher spielt eine Umstrukturierung bzw. Umorientierung der Ladungen eine Rolle, die zu Korrelationskräften führen kann und so die intermolekulare Anziehung erhöht (Kornychev, 1997, Kornychev und Leikin, 1998).

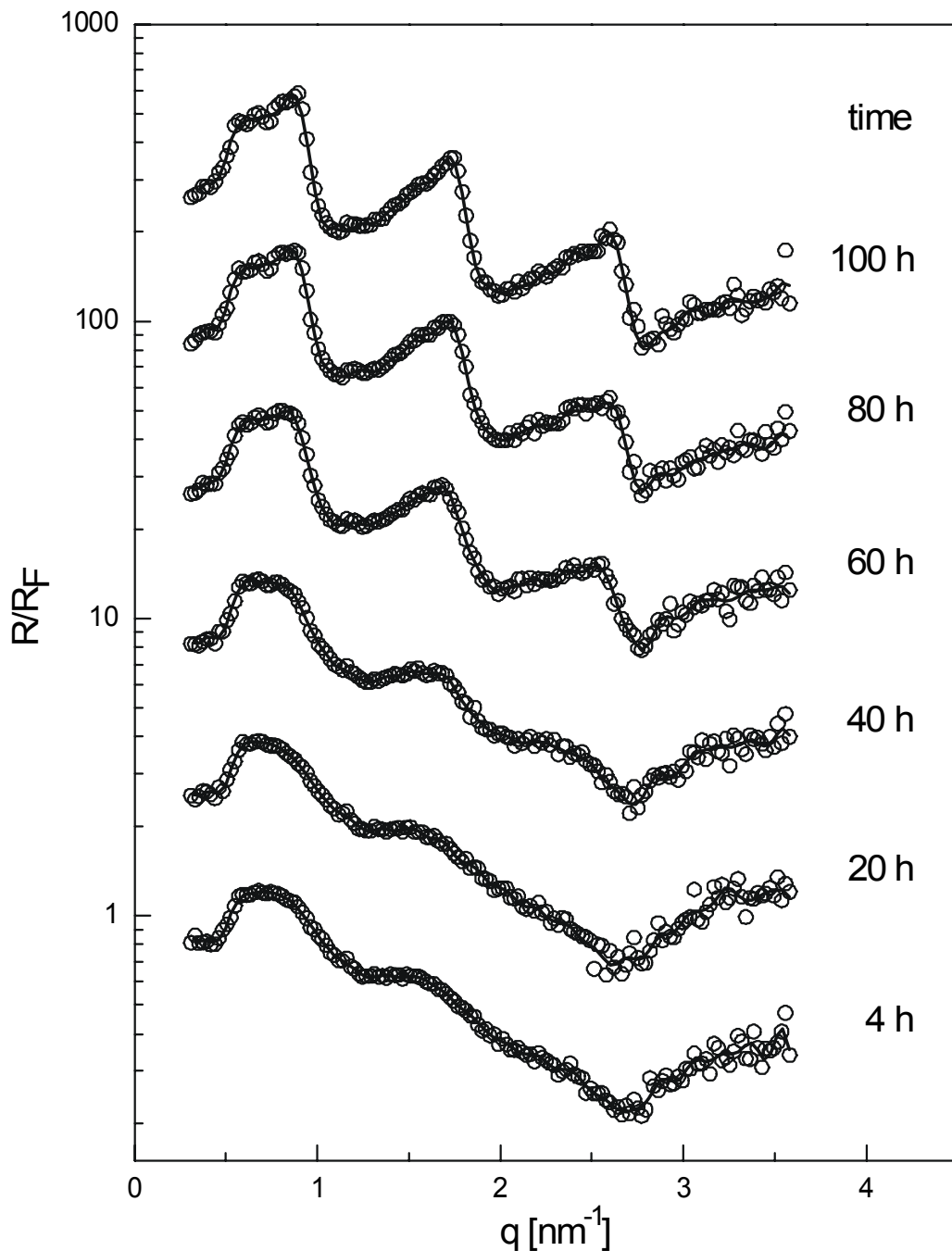


Abbildung 58: die Veränderung der Reflektivität durch die Entstehung von Multischichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Die Reflektivitätskurven sind 4, 20, 40, 60, 80 und 100 Stunden nach dem Spreiten der Monoschicht (○) aufgenommen. Auch die entsprechenden Modellergebnisse (—) sind wiedergegeben. Die EDTA-Konzentration betrug 0.54 mM. Die Reflektivitäten sind fresnelnormiert (R/R_F) und vertikal jeweils um den Faktor $\sqrt{10}$ zueinander verschoben. q ist der Streuvektor. Die ausgeprägten Spitzen ähneln Braggspitzen, die auf eine sich wiederholende Schichtstruktur hinweisen. Die zunehmende Schärfe spricht für wachsende Ordnung oder Dichte im System.

Kinetik der Multischichtenbildung

Die Entstehung multilamellarer Komplexe ist wesentlich komplizierter als die einfache DNS-Adsorption, da nicht nur eine DNS-Schicht, sondern eine Vielzahl von Lipid- und DNS-Schichten adsorbieren. In Abbildung 58 ist die Zeitentwicklung der Reflektivität bei der mittleren EDTA-Konzentration (0.54 mM) über einen Zeitraum von 100 Stunden mit einer Zeitraster von 2 Stunden wiedergegeben. Die Abbildung zeigt einige ausgewählte Kurven. Man erkennt, dass die Änderungen in der Reflektivität im Vergleich zur Messzeit langsam sind. Es bilden sich relativ scharfe Spitzen heraus, die man als Braggspitzen deuten kann, und die charakteristisch für eine wohlgeordnete, repetitive Mehrschichtstruktur sind (vergleiche insbesondere Cevc et al, 1990 und Fenzl et al, 1995).

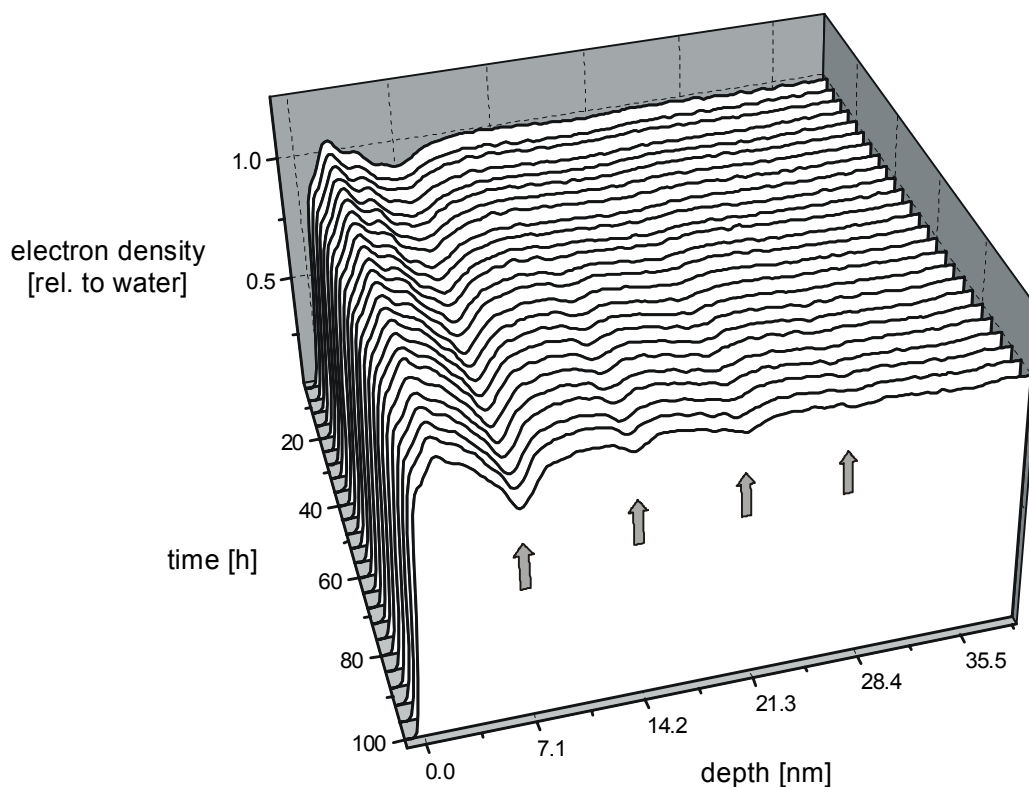


Abbildung 59: Zeitentwicklung der Elektronendichteprofile unterhalb einer Lipidmonoschicht, die auf einer Lipidvesikelsuspension in Anwesenheit von DNS und 0.54 mM EDTA schwimmt. Die Profile wurden mit dem Frei-Form-Boxmodell ermittelt. Die Profile zeigen die Elektronendichte als Funktion der Tiefe und Zeit. Eine multilamellare Struktur mit wenigstens vier äquidistanten Schichten wird sichtbar. Jedes Profil wurde durch Mittelung von zehn Einzelkurven ermittelt.

Die für 25 einzelne Reflektivitäten ermittelten Elektronendichteprofile sind Abbildung 59 wiedergegeben. Deutlich erkennt man, wie sich nach und nach vier Täler bilden, welche die Position der Fettsäureketten der adsorbierenden Lipiddoppelschichten angeben. Die relative Tiefe dieser Täler kann man als Maß für den Anteil der Fläche ansehen, der jeweils belegt ist. Dieser Parameter ist in Abbildung 60 für die ersten vier Lamellen als Funktion der Zeit dargestellt. Am offensichtlichsten ist, dass die Komplexbildung ein sequentieller Prozess ist, bei dem eine Lamelle nach der anderen adsorbiert. Zu Beginn ist nur eine adsorbierte Lamelle zu erkennen. Erst danach adsorbiert eine zweite und dritte Lamelle. Ansatzweise kann man bei den letzten Messungen auch eine vierte Lamelle ausmachen. Diese Art der zeitlichen Entwicklung lässt Rückschlüsse auf den Entstehungsprozess zu. Insbesondere muss in Übereinstimmung mit den Cryo-TEM-Ergebnissen geschlossen werden, dass die adsorbierenden Vesikel zum größten Teil nach der Adsorption aufbrechen. Würden die Vesikel nur adsorbieren und sich abflachen, so trüge jedes adsorbierte Vesikel zwei Schichten bei: die erste und die zweite, die dritte und die vierte etc. In diesem Fall würde man erwarten, dass die Belegungen der adsorbierten Schichten eins und zwei genauso wie drei und vier paarweise gleich wären, im Widerspruch zur Beobachtung. Somit bestätigen die Reflektivitätsmessungen die Schlüsse aus den weniger direkten elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Welcher Faktor aber dominiert die Kinetik? Grundsätzlich wird die Geschwindigkeit des Multischichtenwachstums sowohl von dem Adsorbieren der Lipiddoppelschichten, als auch von der Adsorption der DNS beeinflusst, die, einem Klebstoff ähnlich, die Lipiddoppelschichten aneinanderfügt. Die Entstehung der DNS-Schicht wurde in Bezug auf ihren zeitlichen Verlauf oben bereits untersucht. Bei einer Konzentration von $6 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ DNS beträgt die für den Vorgang charakteristische Zeit bei ca. 3 Stunden. Diese Zeit liegt um mehr als eine Größenordnung kürzer als die charakteristische Zeit für die Vesikeladsorption und Multilamellenbildung. Die DNS-Adsorption ist also offenkundig nicht der die Kinetik begrenzende Faktor.

Man kann den Gesamtprozess der Lamellenadsorption in zwei einfache Teilprozesse zerlegenden: die Kollision (Schritt A in Abbildung 61), die Adsorption (Schritt B in

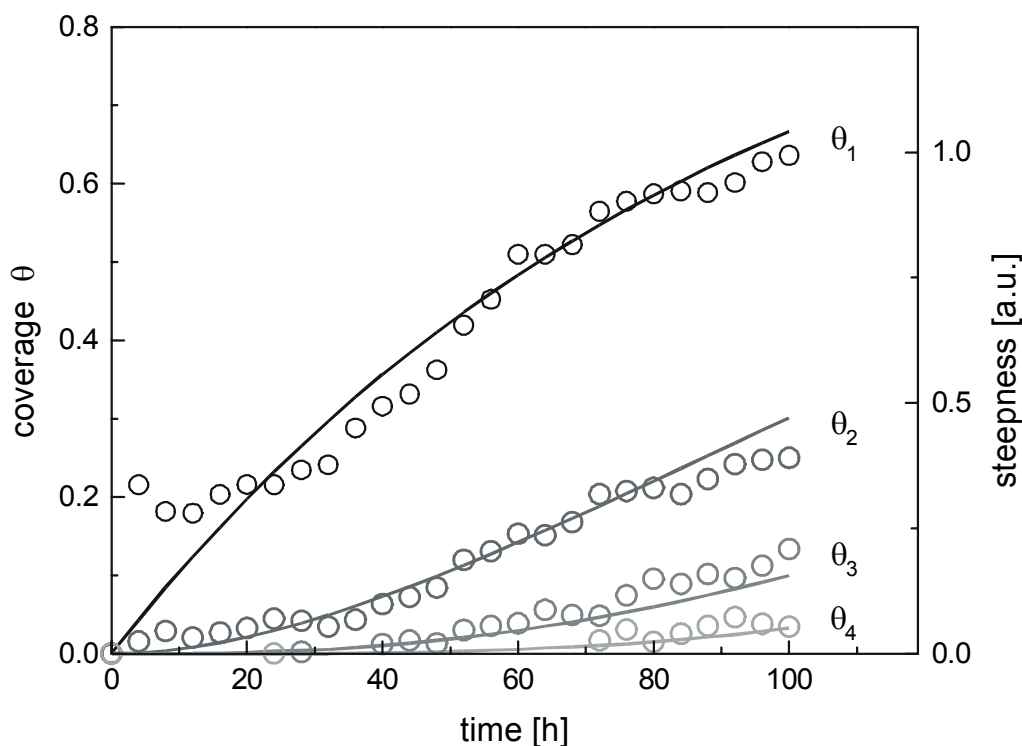
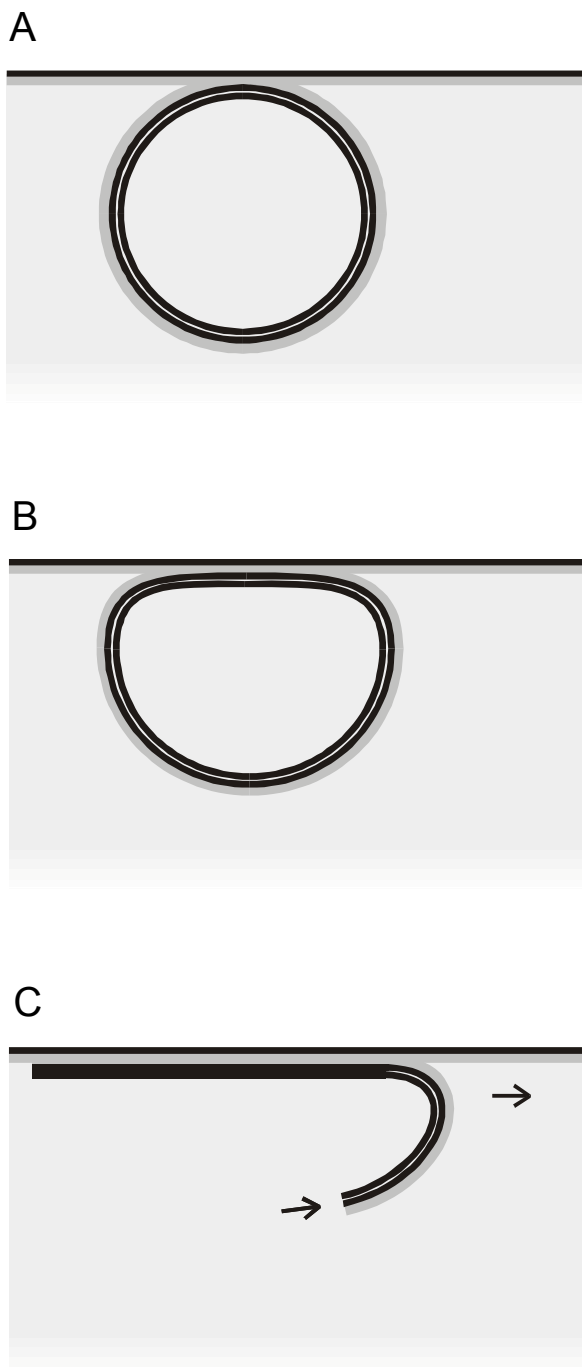


Abbildung 60: Kinetik der Multischichtenbildung lässt sich gut mit einem Regenmodell beschreiben. Die Tiefe der Minima in Abbildung 5 wird als Maß der Belegung θ_i der korrespondierenden Lamelle angenommen. Die Daten werden mit der Kinetik gemäß eines irreversiblen Multischicht-Adsorptionsmodells (Regenmodell) mit einer Ratenkonstante von $k_R = 1.26 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ verglichen (—).

Abbildung 61) und das Aufbrechen und Abrollen (Schritt C in Abbildung 61). Im vorangegangenen Kapitel ist die Diffusionskonstante der Vesikel D_{vesikel} mit Hilfe der Stokes-Einstein-Relation berechnet worden (Gleichung 12). Setzt man den dort ermittelten Wert zusammen mit der Trogtiefe von $500 \mu\text{m}$ in die Einstein-Smoluchowski-Gleichung 5 ein, so sieht man, dass das Vesikel einen mittleren freien Weglänge dieser Größe durch Brownsche Bewegung in nur $(500 \mu\text{m})^2 / 3D_{\text{vesikel}} = 21 \text{ s}$ zurücklegt. Das heißt, dass sich lokale Konzentrationsunterschiede der Vesikel in wenigen Sekunden ausgleichen. Dieser Wert liegt ca. vier Größenordnungen unter der charakteristischen Zeit für die Multischichtenbildung, die man von der Zeitskala in Abbildung 60 abliest. Die Diffusion der Vesikel in der Lösung ist daher offensichtlich ebenfalls nicht der entscheidende Faktor, der die Kinetik der Multischichtenbildung bestimmt.

Abbildung 61: die drei Schritte der Lamellenbildung an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Zunächst gelangt ein unilamellares Vesikel aus der Lösung durch Kollision in Kontakt mit der Lipidmonoschicht, die als Substrat dient **(A)**. Im nächsten Schritt adsorbiert und deformiert sich dieses Vesikel **(B)**. In einem dritten Schritt bricht es auf und rollt seine Lipidschicht über das Substrat **(C)**. Das entspricht den Schritten B, E und F in Abbildung 9. Anders als dort findet der Prozess diesmal jedoch nicht in der Lösung an einer Vesikeloberfläche, sondern an einer Wasser/Luft-Grenzfläche statt.



Damit bleiben nur die Adsorption, das Aufbrechen und das Abrollen als bestimmender Faktor übrig. Um die Ratenkonstante dieser Vorgänge zu erhalten, wird ein einfaches irreversibles Multischicht-Adsorptionsmodell (Regenmodell) an die Daten angepasst (Evans, 1993 und darin enthaltene Referenzen). Hierbei weist „irreversibel“ auf die Modellannahme hin, dass ein einmal adsorbiertes Lamellenstück adsorbiert bleibt, mögliche Desorptionseffekte also vernachlässigt werden. In anbetracht des mit der Komplexbildung

verbundenen hohen Gewinns an freier Energie (vgl. Abbildung 46) ist diese Annahme realistisch. Der Flächenanteil, der von jeder Lamelle bedeckt wird, ist mit θ_i bezeichnet, und kann Werte von 0 (nicht belegt) bis 1 (Lamelle vollständig über die gesamte Fläche ausgebreitet) annehmen kann. Die Lamellen sind von $i = 1$ bis 4 durchnummeriert. Es wird angenommen, dass die Wachstumsrate einer Lamelle proportional zur Vesikelkonzentration $c_{vesikel}$ und der zur Verfügung stehenden Fläche ist, mit der Ratenkonstante k_R als Proportionalitätsfaktor:

$$\frac{d}{dt}\theta_1 = k_R \cdot c_{vesikel} \cdot (1 - \theta_1)$$

$$\frac{d}{dt}\theta_2 = k_R \cdot c_{vesikel} \cdot (\theta_1 - \theta_2)$$

$$\frac{d}{dt}\theta_3 = k_R \cdot c_{vesikel} \cdot (\theta_2 - \theta_3)$$

$$\frac{d}{dt}\theta_4 = k_R \cdot c_{vesikel} \cdot (\theta_3 - \theta_4)$$

Nimmt man an, dass ein 65 nm-Vesikel ca. $5 \cdot 10^4$ Lipidmoleküle umfasst, kommt man auf eine Vesikelkonzentration von $c = 100 \frac{\text{mg}}{\text{L}} / 608 \frac{\text{g}}{\text{Mol}} / 5 \cdot 10^4 = 3.3 \frac{\text{nMol}}{\text{L}}$. Als freie Parameter bleiben dann nur noch die Ratenkonstante k_R und ein Proportionalitätsfaktor, der die Tiefe der Minima mit der Belegung verbindet. Der beste Fit ergibt eine Ratenkonstante von $k_R = 1.26 \cdot 10^3 \frac{\text{L}}{\text{Mol} \cdot \text{s}}$.

Auffällig ist die relativ starke Abweichung der Messdaten (○) vom Modell (—) bei kleinen Zeiten (<10 Stunden). Teile der ersten Lamelle scheinen bereits wesentlich früher zu adsorbieren, als es der Rest der Kinetik erwarten ließe. Wahrscheinlich ist dies auf die Adsorption kationischer Vesikel, die noch nicht aufgebrochen sind (Schritt B in Abbildung 61), zurückzuführen. Daraus folgt, dass die Adsorption wesentlich schneller geschieht, als das anschließenden Aufbrechen und Abrollen (Schritt C in Abbildung 61). Dies ist unmittelbar einsichtig, da das Aufbrechen der Vesikel zunächst energetisch ungünstig ist, also eine Aktivierungsbarriere überwunden werden muss.

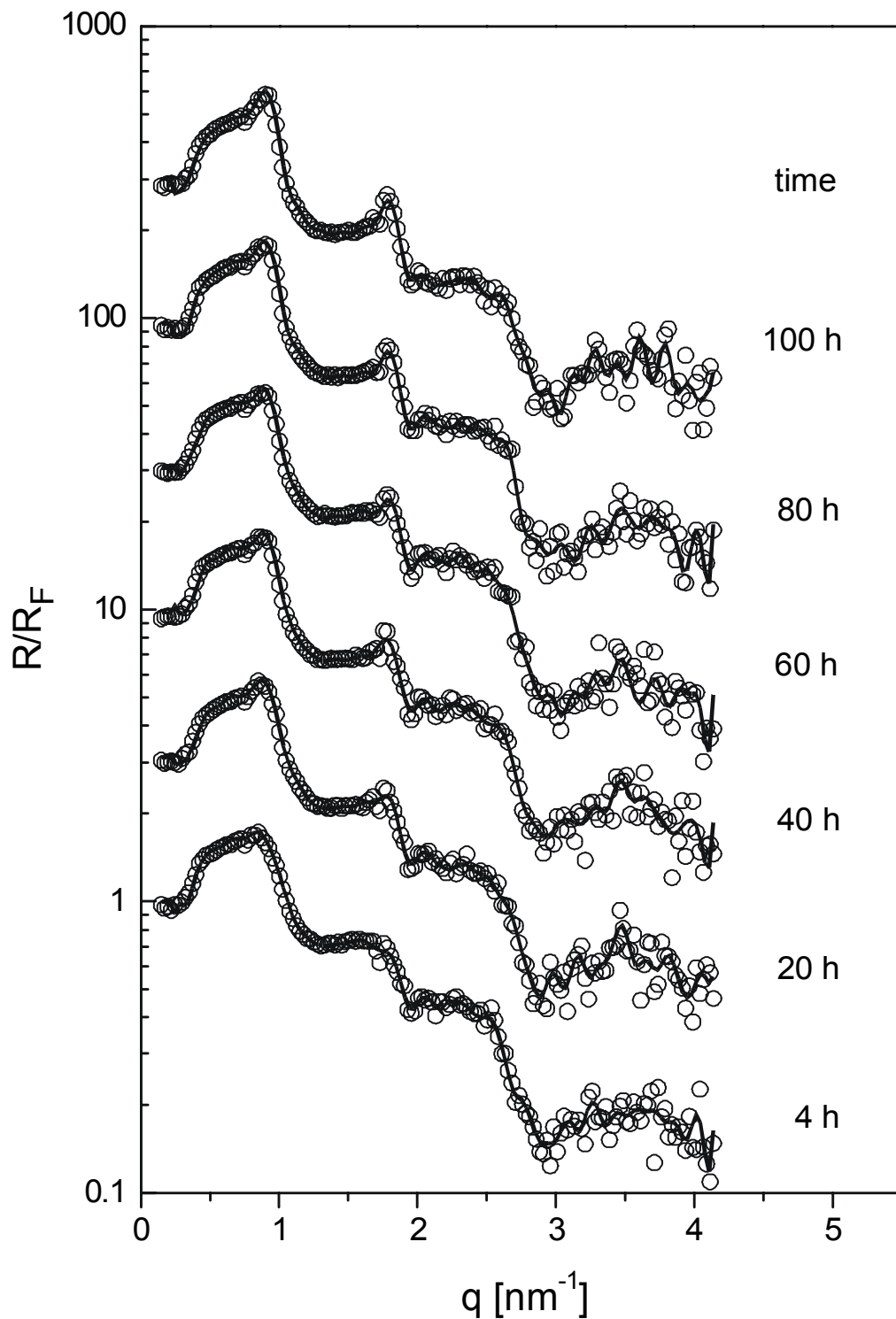


Abbildung 62: Fresnelnormierte Reflektivitätskurven bei vierfacher EDTA-Konzentration (2.16 mM). Die jeweils 4, 20, 40, 60, 80 und 100 Stunden nach dem Spreiten der Monoschicht aufgenommenen Reflektivitäten (O) sind zusammen mit den besten Modellfits (—) wiedergegeben. Nach ca. 20 Stunden ist keine Veränderung mehr zu erkennen. Die Reflektivitäten vertikal jeweils um den Faktor $\sqrt{10}$ zueinander verschoben. q ist der Streuvektor.

Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration

Nachdem sich herausgestellt hat, dass die Gegenwart von EDTA eine Voraussetzung für die Multischichtenbildung ist, drängt sich die Frage auf, ob die DNS-Konzentration einen Einfluss auf die Multischichtenbildung hat. Wie die folgenden Untersuchungen zeigen, ist dies in der Tat der Fall. Schon aus Abbildung 55 lassen sich wesentliche Rückschlüsse ziehen. Man erkennt, dass bei höherer EDTA-Konzentration (2.16 mM) die Spitzen in der gemessenen Reflektivität zwar kleiner, aber noch deutlich schärfer sind, als bei der Probe mit mittlerer EDTA-Konzentration (0.54 mM). Die scharfen Spitzen deuten auf eine repetitive Struktur mit sehr vielen Schichten hin. Hinzu kommt, dass die asymmetrischen Form der Spitzen stark den Braggspitzen ähnelt, die bereits früher bei Lipidmultischichten (ohne DNS) mit einer sehr großen Anzahl von Lamellen gemessen wurden (Cevc, 1990; Fenzl et al., 1996).

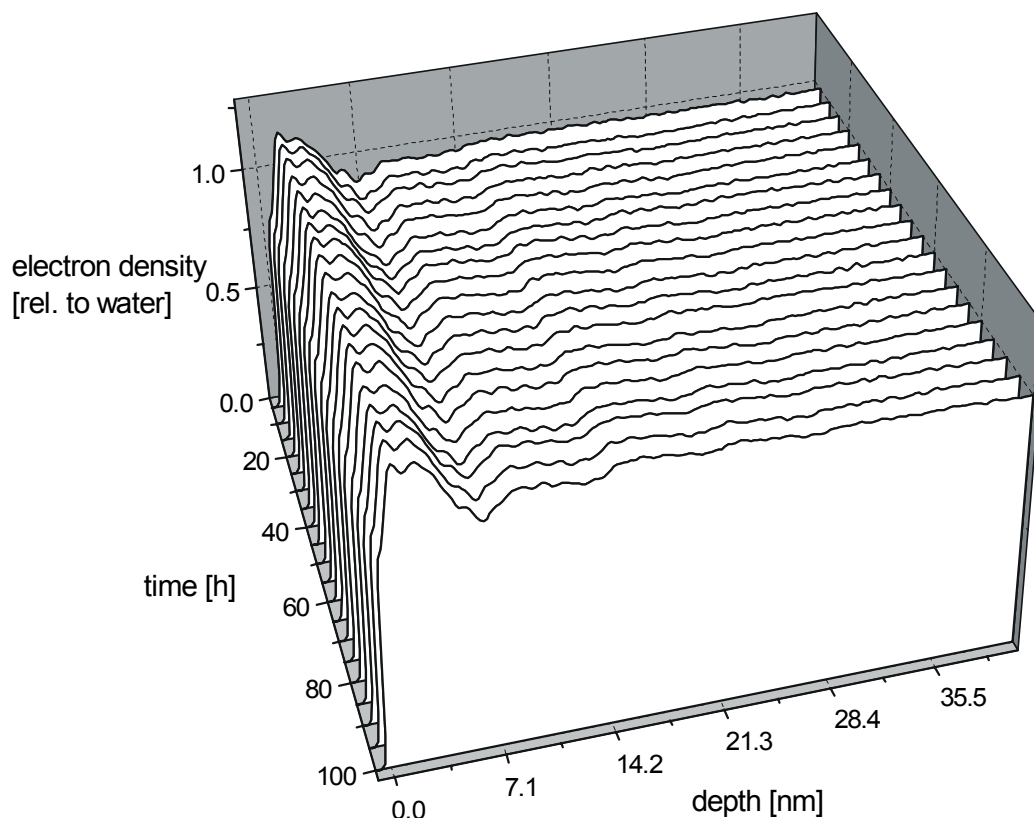


Abbildung 63: bei hoher EDTA-Konzentration (2.16 mM) kommt die Multischichtbildung schon nach ca. 20 Stunden zum Stillstand. Die Elektronendichteprofile sind mit dem Frei-Form-Boxmodell durch Mitteln von zehn Einzelkurven ermittelt.

Ganz anders hingegen das Bild bei niedriger EDTA-Konzentration (0.13 mM). Hier erinnert die Struktur der Reflektivität nicht mehr sehr an Braggspitzen, sondern vielmehr an die bekannten Kiessigfringes, die entstehen, wenn nur eine Einzelschicht an einen Langmuirfilm adsorbiert (Kiessig, 1931). Andererseits nimmt die Größe der Spitzen, und damit die Abweichung der Reflektivität von der einer Monoschicht mit geringer werdender EDTA-Konzentration zu.

Die Untersuchung der Kinetik bestätigt die obigen Aussagen. Abbildung 62 zeigt einige ausgewählte Reflektivitäten, aufgenommen an der Probe mit einer EDTA-Konzentration von 2.16 mM. Die mit Hilfe des Frei-Form-Boxmodells daraus ermittelten Elektronendichteprofile sind in Abbildung 63 zu sehen. Wie bei der mittleren EDTA-Konzentration sind auch bei der hohen Konzentration bis zu vier Minima in der Elektronendichte zu erkennen, und das, obwohl die Tiefe dieser Täler deutlich geringer ist. Aus den Spitzen in der Reflektivität kann man schließen, dass wahrscheinlich noch mehr Lamellen existieren, die von Frei-Form-Boxmodell jedoch nicht mehr aufgelöst werden können. Offensichtlich befördert die hohe EDTA-Konzentration die Bildung von Multischichten.

Andererseits scheint der Prozess bei so hoher EDTA-Konzentration schnell zum Erliegen zu kommen. schon nach 20 Stunden ist kaum noch eine Veränderung in den Reflektivitäten oder den zugehörigen Elektronendichteprofilen auszumachen. Dies ist aus Abbildung 65 gut abzulesen. Dort ist die adsorbierte Membranfläche, abgeleitet aus der Tiefe der Minima und summiert über alle Schichten, als Funktion der Zeit aufgetragen. Bei 2.16 mM EDTA ist der Adsorptionsvorgang nach ca. 20 Stunden beendet. Wahrscheinlich steht kein Material mehr zur Verfügung, weil die Lipidvesikel bereits im Trog mit der DNS abreagiert haben.

Im Vergleich dazu ist der Adsorptionsvorgang bei einer sehr niedrigen EDTA-Konzentration von nur 0.13 mM auch nach 100 Stunden noch nicht zum Ende gekommen. Sie nimmt linear zu, wie vom irreversiblen Multischicht Adsorptionsmodell vorhergesagt. Abbildung 65 zeigt, dass die Ratenkonstante ($k_R = 1.39 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$) sogar etwas über der bei mittlerer EDTA Konzentration liegt.

erreicht wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die Fläche dicht mit geschlossenen Vesikeln besetzt. Die EDTA-Konzentration ist also ein Parameter, von dem die Entstehung multilamellarer Komplexe empfindlich abhängt.

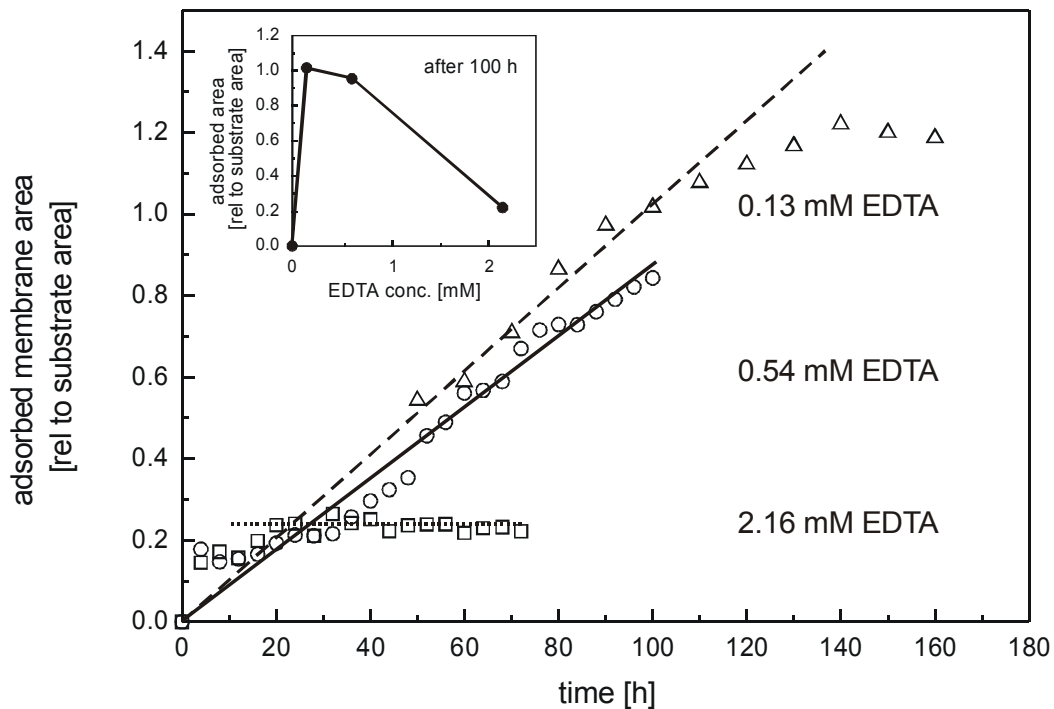


Abbildung 65: die Menge der Adsorbierten Membran hängt von der EDTA-Konzentrationen ab. Für unterschiedliche EDTA-Konzentrationen ist die adsorbierte Membranfläche, summiert über alle Schichten, als Funktion der Zeit dargestellt. Bei niedriger (Δ) und mittlerer (\circ) EDTA-Konzentration nimmt die Membranfläche innerhalb der ersten 100 Stunden beständig zu. Das irreversible Multischicht-Adsorptionsmodell sagt einen linearen Zunahme mit der Steigung $c_{\text{vesikel}} \cdot k_R$ voraus. Bei 0.13 mM ergibt der beste Fit $k_R = 1.39 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ (---), bei 0.54 mM EDTA $k_R = 1.26 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ (—). Dagegen kommt der Adsorptionsvorgang Bei sehr hoher EDTA-Konzentration (\square) schon nach ca. 20 Stunden zum Erliegen (....). Das kleine Bild zeigt die nach 100 Stunden adsorbierte Membranfläche als Funktion der EDTA-Konzentration. Offensichtlich existiert eine optimale EDTA-Konzentration, die größer als 0 und kleiner als 0.54 mM ist.

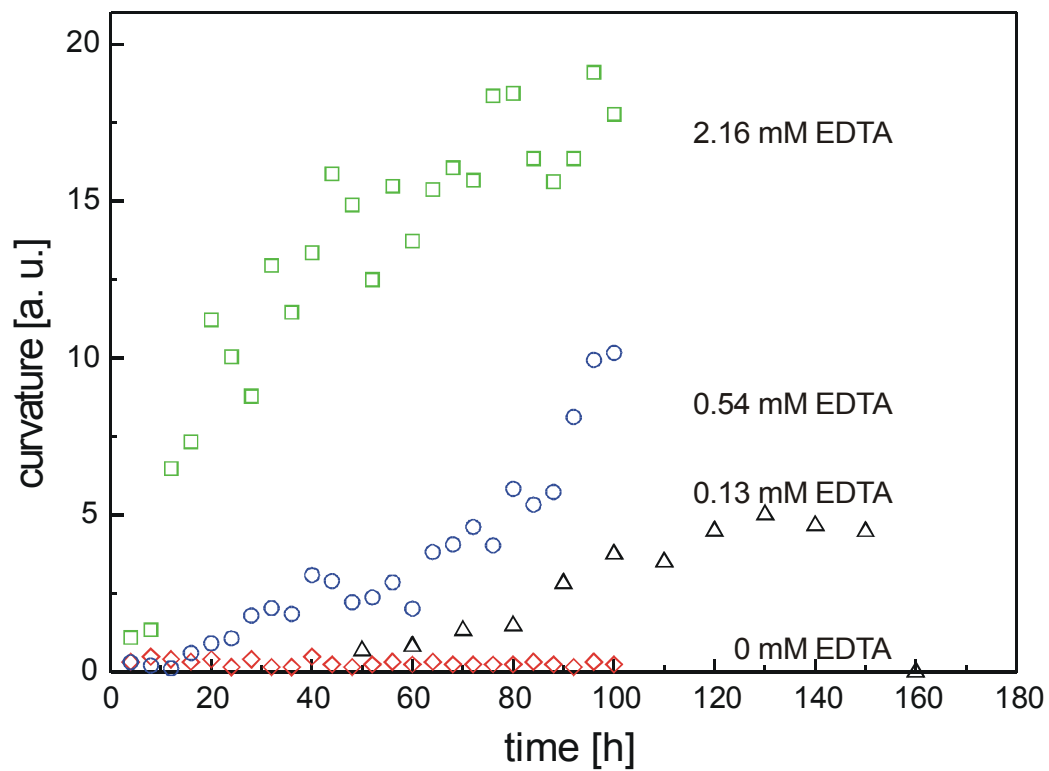


Abbildung 66: Krümmung der Reflektivitätskurve bei $q = 1.8 \text{ nm}^{-1}$ als Funktion der Zeit bei 0 mM EDTA (◇), 0.13 mM EDTA (△), 0.54 mM EDTA (○) und 2.16 mM EDTA (□). Eine größere Krümmung weist auf mehr und/oder besser geordnete Multischichten hin.

Unterscheide im Wiederholabstand

Reflektivitätsmessungen erlauben eine recht präzise Bestimmung des Wiederholabstands in periodischen Strukturen. Aus der Analyse der Reflektivitätsdaten ergibt sich ein Wiederholabstand von 7.1 nm. In den Cryo-TEM-Bildern findet sich jedoch ein Wiederholabstand von 7.8 nm. Zu dieser Diskrepanz beitragen können unter anderem Artefakte bei der Cryo-TEM, wie die Ausdehnung des Wassers in den DNS-Schichten beim Einfrieren oder ein (teilweise) Übergang der Lipidschicht in die kristalline Phase. Dazu kommt, dass in den Reflektivitätsexperimenten als Substrat eine Monoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche an Stelle eines Vesikels in der Lösung verwendet wurde. Daher sind die Lipid in der Schicht wahrscheinlich anders gepackt. Solche Unterschiede können an tiefer liegende Schichten weitergereicht werden, wie im Falle reiner Lipidmehrfachschichten schon einmal gezeigt worden war (Cevc et al., 1990).

Wenn DNS an eine Lipidschicht adsorbiert, muss man davon ausgehen, dass dies zufällig geschieht. Da die Moleküle im Vergleich zu ihrer Persistenzlänge lang sind (im Mittel ca. 2000 nm im Vergleich zu 50 nm Persistenzlänge), sollte dies auch zur Folge haben, dass einige Moleküle mit mehreren Abschnitten gleichzeitig adsorbieren und dabei andere DNS-Moleküle kreuzen. Jedoch wird der hohe Gewinn an elektrostatischer Energie, der sich durch die DNS-Adsorption erzielen lässt, dafür sorgen, dass die Moleküle vollständig adsorbieren, wenn sie die Möglichkeit dazu haben. Wie in Abbildung 67 A illustriert, ist dies möglich, weil die kationischen Lipide, an welche die DNS an den Kontaktstellen auf einer Seite gebunden ist, in den zwei Dimensionen der fluiden Membran beweglich sind. Dadurch sollten sich alle Überkreuzungen auflösen, wenn die DNS an die Lipidschicht lange genug mit nur einer Seite adsorbiert ist. In der Tat fanden Fang und Yang keine Spuren in ihren AFM Bildern von DNS, die auf einer Seite an eine kationische Doppelschicht adsorbiert war (Fang und Yang, 1997).

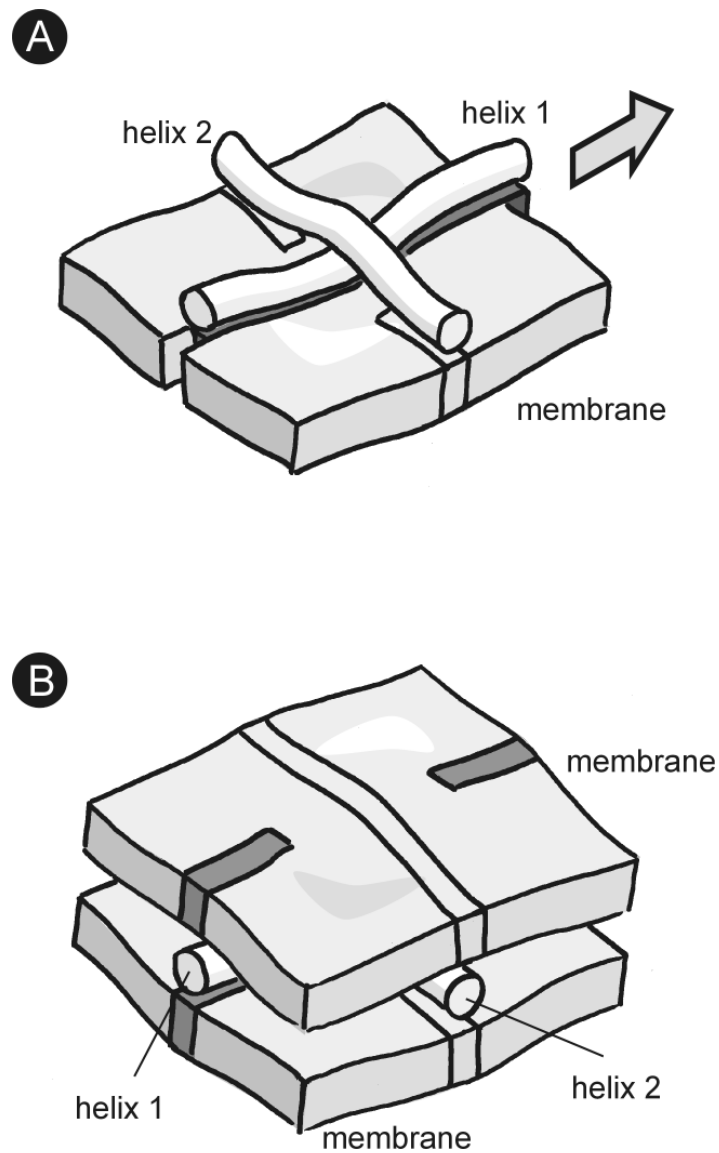


Abbildung 67: (A) zeigt ein Paar überkreuzter DNS-Helices, die auf einer Seite an eine Lipidmembran gebunden sind. Die Überkreuzung kann sich auflösen, indem Helix 1 in Pfeilrichtung reptiert. Das ist möglich, weil die Lipide, an die sie gebunden ist (grau) in der Ebene der Membran beweglich sind. Sobald aber eine weitere Lipidschicht auf der anderen Seite adsorbiert ist (B) ist dies nicht mehr möglich, weil die Lipide, die in der zweiten Membran an Helix 1 gebunden sind, sich nicht an den an Helix 2 gebundenen Lipiden vorbeibewegen können. Die einzige Möglichkeit, die Überkreuzung doch noch aufzulösen bestünde darin, existierende Lipid-DNS-Bindungen wieder aufzubrechen. Dies jedoch ist aufgrund der hohen energetischen Kosten unwahrscheinlich.

Anders ist die Lage, wenn die Komplexbildung so schnell verläuft, dass eine weitere Lipidschicht von der anderen Seite an die DNS-Schicht adsorbiert, bevor sich alle Überkreuzungen aufgelöst haben. Abbildung 67 B zeigt, dass die Topologie ein weiteres Entwirren verhindert, sobald die DNS zwischen zwei Lipidschichten eingeschlossen ist und die einzelnen DNS-Moleküle auf beiden Seiten an DNS gebunden sind. In den Cryo-TEM-Bildern könnten zwei Details auf Defekte in Form von Überkreuzungen in der DNS-Schicht hinweisen: erstens sind die Intervalle zwischen den Schichten relativ unregelmäßig (Sie z.B. Abbildung 40). Zweitens ist der mittlere Wiederholabstand von 7.8 nm größer als notwendig für eine DMPC/DC-Chol Doppelschicht (diese ist ca. 5.1 nm dick) und eine Monoschicht aus DNS (ca. 2 nm dick).

Dies legt nahe, dass auch eine schnellere Komplexbildung zu dem höheren Wiederholabstand in den Cryo-TEM-Experimenten beitragen könnte. Dass die Komplexbildung dort wesentlich schneller vonstatten ging als an der Langmuirschicht wird durch die Abschätzung in Gleichung 13 und die Tatsache, dass mit 10-fach höheren DNS- und 10-fach höherer Vesikelkonzentrationen gearbeitet wurde, nahegelegt. Um einen Eindruck der Zeitskala zu bekommen, auf der die Entwirrung der DNS-Fäden auf der kationischen Lipidschicht stattfindet, wird auf den Diffusionskoeffizienten $D_{DNS\ lateral} \approx 8.3 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ zurückgegriffen, die Maier und Rädler für 6 000 bp lange DNS-Segmente gefunden haben, die an eine kationische Lipidmembran gebunden waren (Maier and Rädler, 1998). Daraus erhält man eine "Reptationszeit" von $\tau = N \cdot l / 2D_{DNS\ lateral} \approx 250 \text{ s}$ (Käs et al., 1994). Betrachtet man diese als untere Grenze für die Zeit, welche die DNS-Schicht zum Entwirren benötigt, folgt daraus, dass man Überkreuzungen, und damit dichtere DNS-Schichten erwarten sollte, wenn ein 10-schichtiger Komplex in weniger als einer Stunde entsteht. In den üblichen Protokollen zur Herstellung von CL-DNS-Komplexen sind Inkubationszeiten von nur wenigen Minuten angegeben.

Ionenkontrastmessungen

Wenn die DNS als anionisches Polyelektrolyt an die kationische Lipidschicht adsorbiert, so kommt es zu einer partiell gegenseitigen Neutralisierung der beiden geladenen Komponenten. Dies setzt einen Teil der Gegenionen um die DNS und die Lipidschicht frei.

Zur experimentellen Bestimmung der Ionenverteilung wurde Röntgenreflektometrie an einem Langmuirfilm in Verbindung mit Ionenkontrastierung eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden parallele Experimente mit unterschiedlichen Salzen durchgeführt: NaCl, CsCl und NaBr (in der Annahme, dass die Kationen Na^+ und Cs^+ sowie die Anionen Cl^- und Br^- sich jeweils gleich verhalten, die Ionenverteilung also bei allen Salzen identisch ist). Da Cs^+ und Br^- eine höhere Elektronendichte aufweisen als Na^+ und Cl^- , kann man von den Unterschieden in den Elektronendichteprofilen bei unterschiedlichen Salzen auf die Ionenverteilung schließen.

Messungen mit unterschiedlichen Ionen

Um das Verfahren der Ionenkontrastierung zu testen, wurden zunächst Reflektivitätsmessungen an einer einfachen kationischen Lipidschicht durchgeführt. Dem Puffer wurden einmal 400 mM NaCl und einmal 400 mM NaBr zugesetzt. Abbildung 68 zeigt die resultierenden Röntgenreflektivitäten, die mit dem Frei-Form-Boxmodell ausgewertet wurden (Abbildung 69). Wie erwartet ist die Elektronendichte im Bereich der Kopfgruppen bei der NaBr-Messung etwas höher als bei der NaCl-Messung, was auf Na- bzw. Br-Gegenionen in diesem Bereich hinweist.

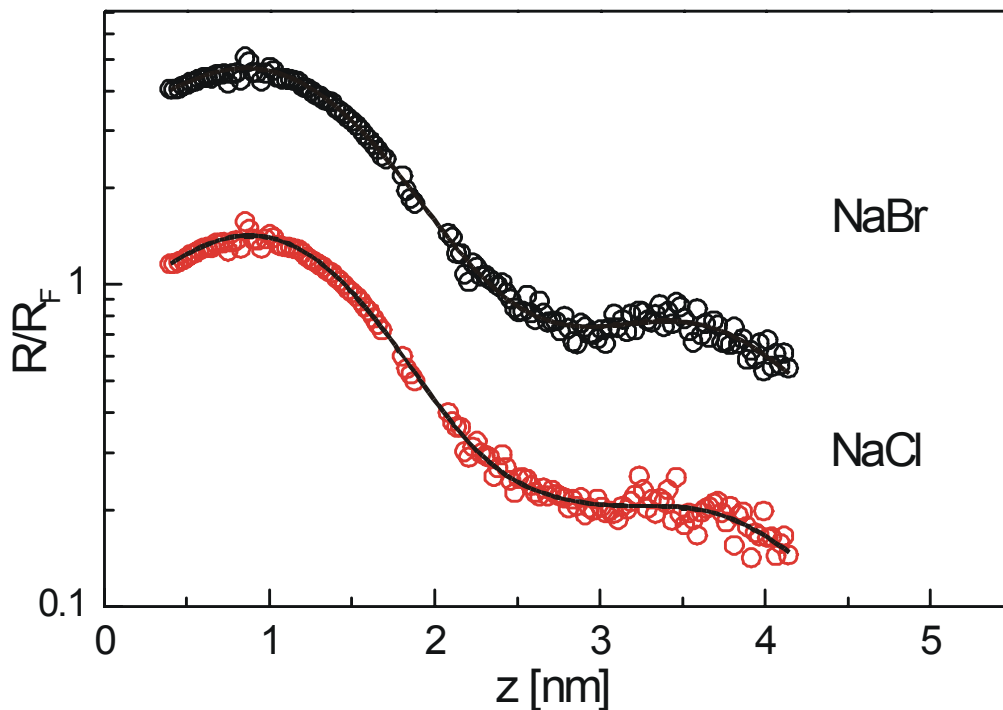


Abbildung 68: Fresnelnormierte Reflektivitäten einer DMPC/DC-Chol-Einfachschicht (Molverhältnis 3:2), gemessen mit 400 mM bzw. NaCl und NaBr (○). Modellreflektivitäten, ermittelt durch anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die jeweiligen Messdaten (—).

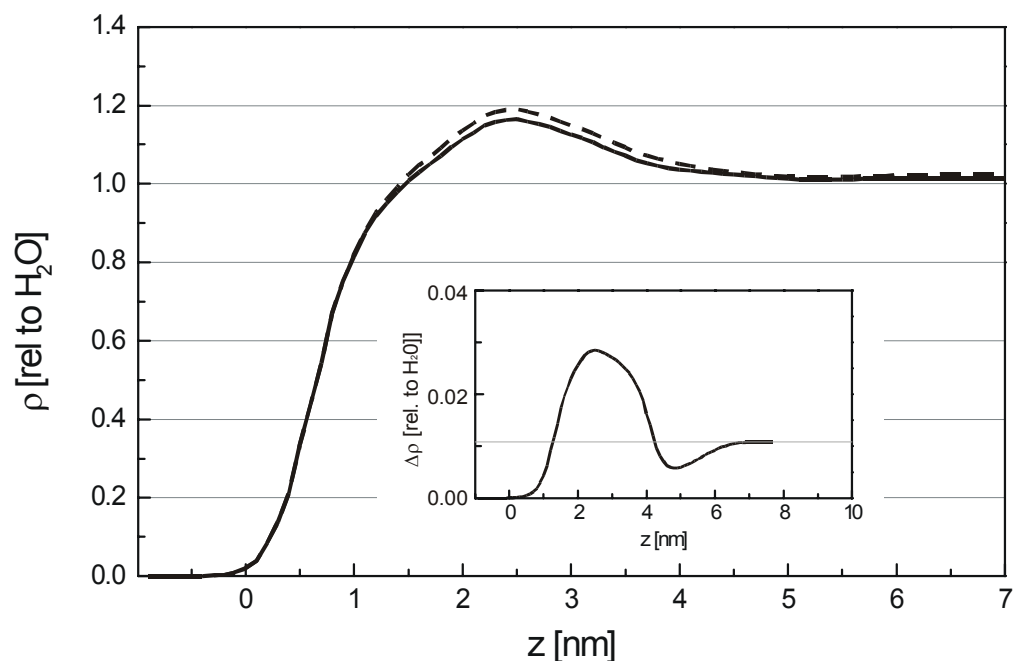


Abbildung 69: Modell-Elektronendichteprofil ermittelt durch Anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die Messungen aus Abbildung 68 mit 400 mM NaCl (—), NaBr (---). Unten dargestellt ist die Differenz der Elektronendichteprofile.

Analoge Messungen wurden auch mit DNS-belegten Membranen durchgeführt. Diesmal wurden neben den Anionen auch die Kationen kontrastiert, und zwar durch CsCl. Messungen wurden bei drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen durchgeführt: 100 mM, 200 mM (Abbildung 71) und 400 mM (Abbildung 70).

Die Kontrastierung der Anionen mit NaBr war aufgrund des geringen Elektronendichteunterschiedes und des folglich geringen Kontrastes nur bei der höchsten Salzkonzentration sinnvoll. Wieder wurden die Reflektivitäten mit Hilfe des Frei-Form-Boxmodells ausgewertet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen Abbildung 72 und Abbildung 73 dargestellt.

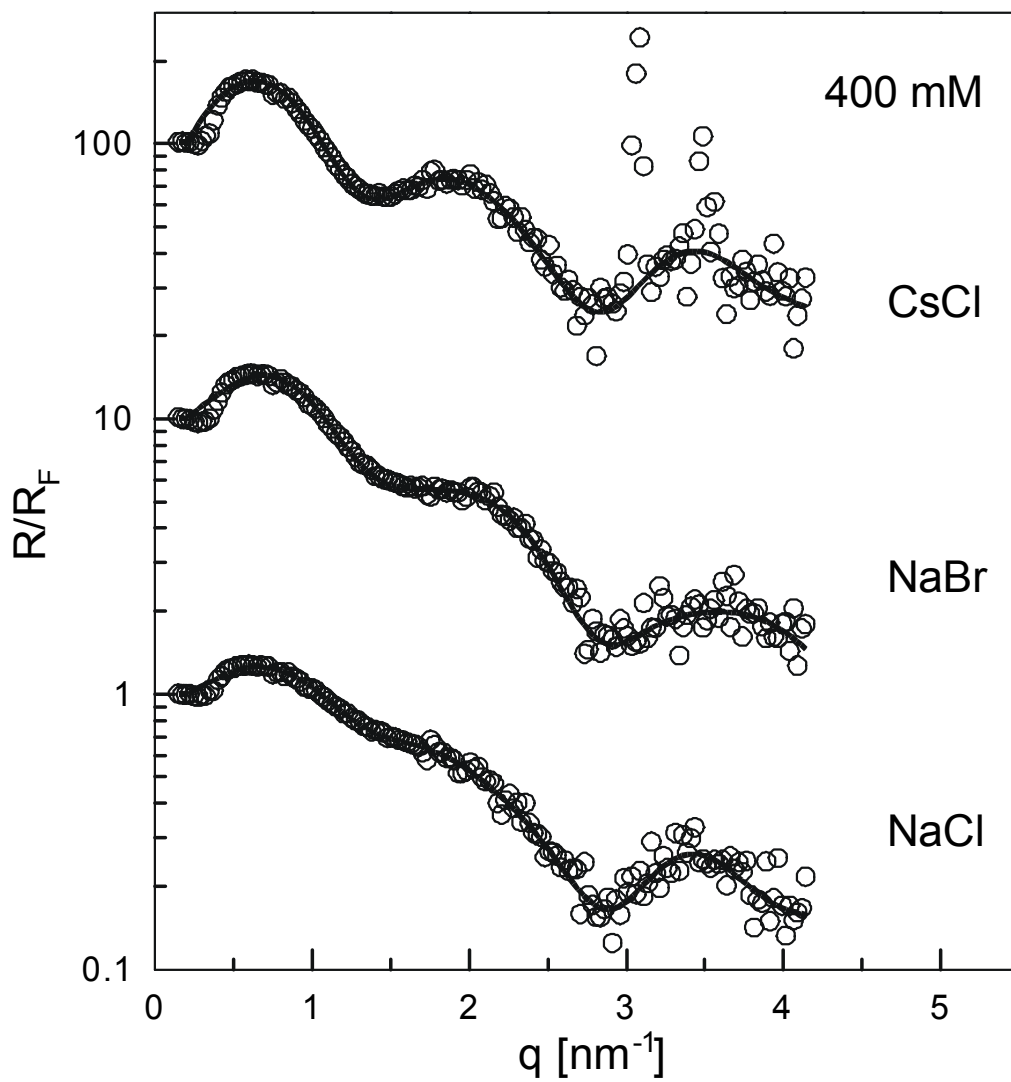


Abbildung 70: Fresnelnormierte Reflektivitäten einer DMPC/DC-Chol-Einfachschicht (Molverhältnis 3:2) mit adsorbierter DNS-Schicht, gemessen in 400 mM NaCl, NaBr und CsCl (O). Die Modellreflektivitäten (—) wurden durch anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die jeweiligen Messdaten ermittelt.

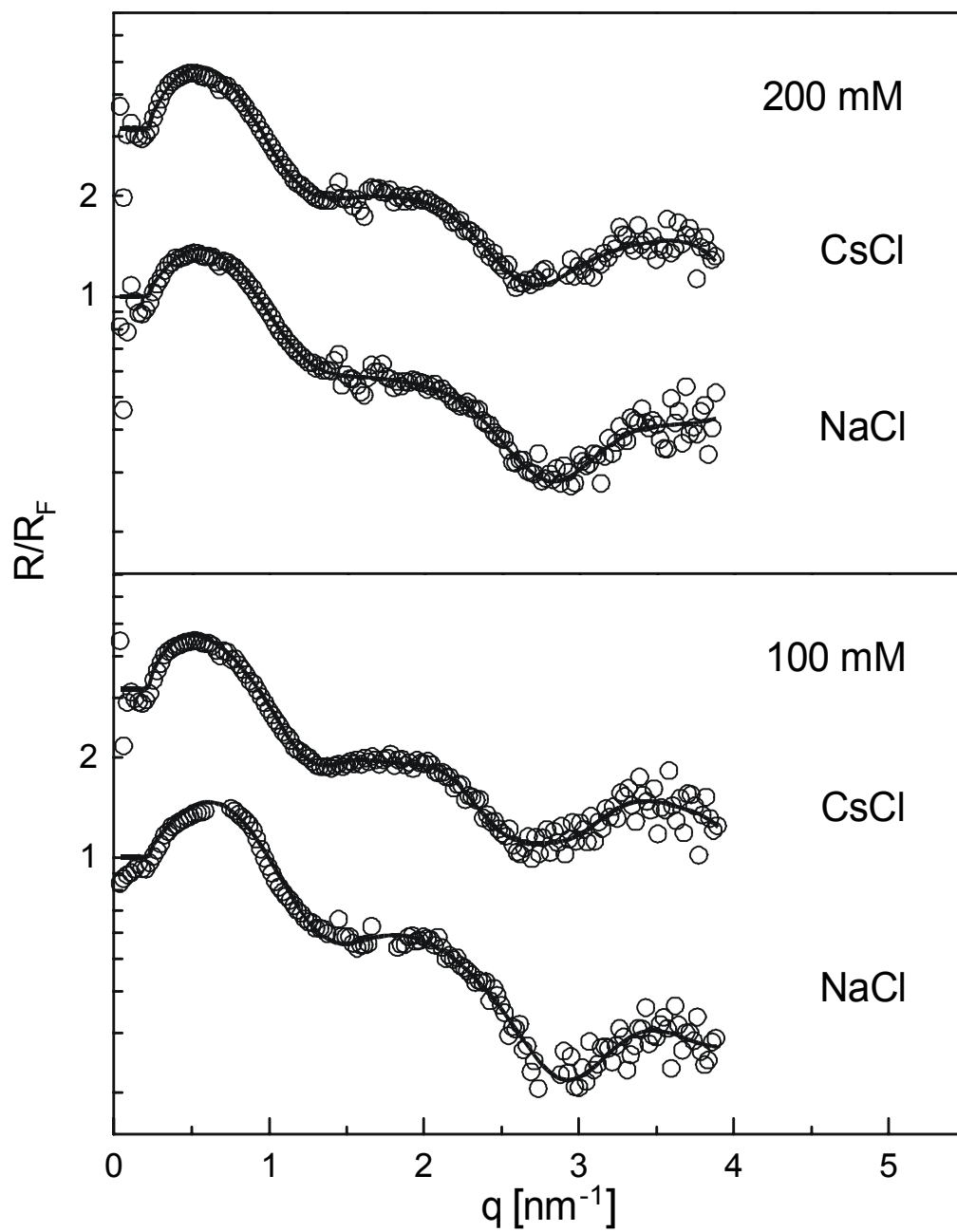


Abbildung 71: Fresnelnormierte Reflektivitäten einer DMPC/DC-Chol-Einfachschicht (Molverhältnis 3:2) mit adsorbierter DNS-Schicht, gemessen bei 100 mM bzw. 200 mM NaCl und CsCl (○). Die Modellreflektivitäten (—) wurden durch anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die jeweiligen Messdaten ermittelt.

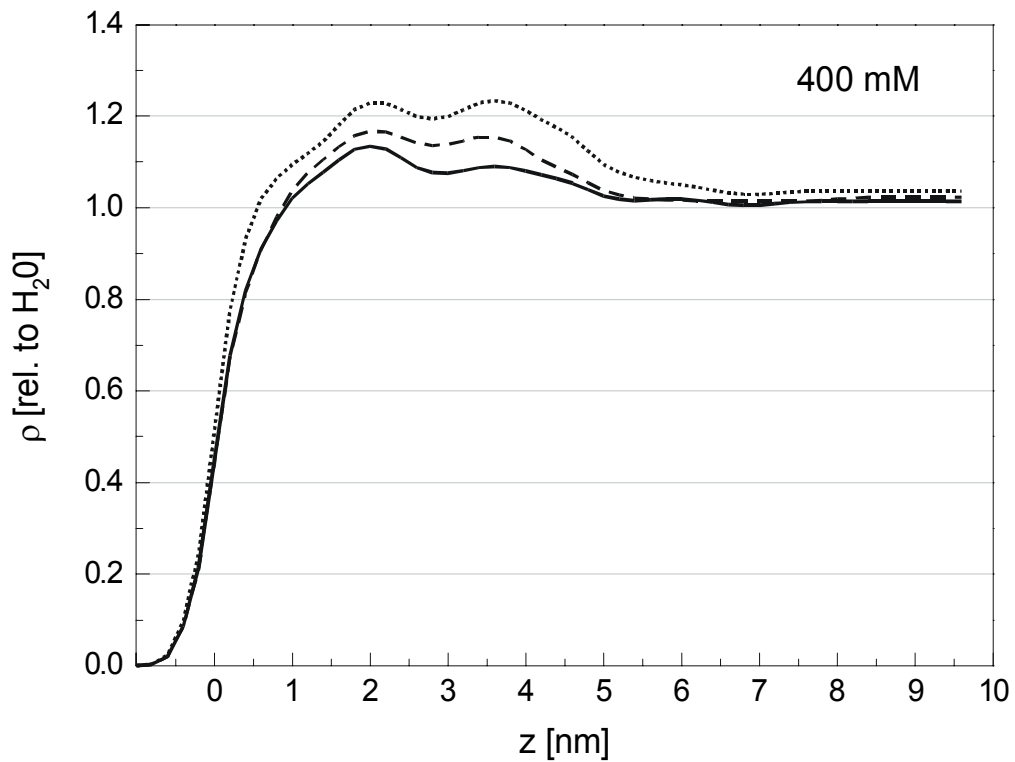


Abbildung 72: Modell-Elektronendichteprofil ermittelt durch Anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die Messungen aus Abbildung 70 für 400 mM NaCl (—), NaBr (---) und CsCl (.....).

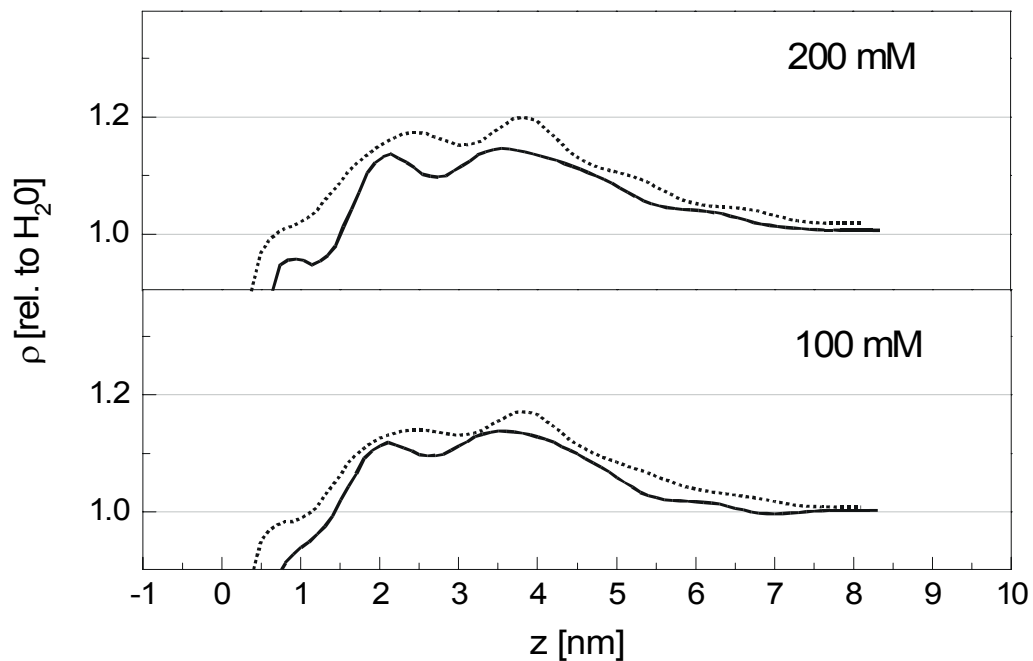


Abbildung 73: Modell-Elektronendichteprofil ermittelt durch Anpassen des Frei-Form-Boxmodells an die Messungen aus Abbildung 71 mit 100 mM bzw. 200 mM NaCl (—) und CsCl (.....).

Bestimmung der Ionenverteilung

Nimmt man an, dass alle Komponenten (DNS, Lipide und Ionen) unabhängig von dem gewählten Salz auf gleiche Weise in der Grenzschicht verteilt sind, ergibt sich die Anionenverteilung aus der Differenz der Elektronendichteprofile der NaBr- (ρ_{NaBr}) und der NaCl-Messung (ρ_{NaCl}) gemäß

$$(14) \quad c^-(z) = \frac{\rho_{NaBr} - \rho_{NaCl}}{\Delta\rho_{Br} - \Delta\rho_{Cl}}.$$

Die Kationenverteilung erfolgt entsprechend aus der Elektronendichtedifferenz der CsCl und der NaCl-Messung. Bei der Analyse gemäß Gleichung 14 wurden für die Elektronendichten der Ionen $\Delta\rho$ die Werte aus Tabelle 3 zugrundegelegt. Sie basieren auf den effektiven partiellen Molvolumina, die Mukerjee bestimmt hat (Mukerjee, 1959).

Ion	N_e	eff. part. Molvol. [cm ³]	$\Delta\rho$ pro Mol [rel. zu H ₂ O]	$\rho(400 \text{ mM Lösung})$ [rel. zu H ₂ O]
Na ⁺	10	-5.7	0.024	1.009
Cs ⁺	54	16.9	0.080	1.032
Cl ⁻	18	22.3	0.010	1.004
Br ⁻	36	29.2	0.036	1.014

Tabelle 3: Elektronendichtezunahmen $\Delta\rho$ pro Mol der genannten Ionen in wässriger Lösung, errechnet aus den effektiven partialen Molvolumina nach Mukerjee (Mukerjee, 1959).

Die aus Gleichung 14 ermittelte Verteilung der Gegenionen in der Nähe der kationischen Lipidmembran ohne DNS ist in Abbildung 74 dargestellt. Wie erwartet erkennt man eine Anhäufung von Gegenionen in der Nähe der geladenen Lipidkopfgruppen. Darüber hinaus ist auch ein Bereich der Verarmung angedeutet, der jedoch nicht signifikant sein muß.

Abbildung 75 zeigt die Verteilung der Anionen und Kationen in der Nähe einer DNS-belegten kationischen Lipidschicht. Die Ionenkontrastierung weist demnach auf eine Anhäufung sowohl von Anionen, als auch von Kationen im Bereich der Lipidköpfe und in

der DNS-Schicht hin. Erst jenseits der DNS-Schicht fallen die Ionenkonzentrationen auf den Volumenwert von 400 mM ab.

Überraschend ist die scheinbare Anhäufung von Kationen in dem hydrophoben Fettsäurekettenbereich der Lipidschicht (um $z = 0.5$ nm). Möglicherweise handelt es sich um einen Artefakt, der durch eine unvollkommene Korrektur der Cs-Absorptionskante bei den energiedispersiven Reflektivitätsmessungen verursacht sein könnte. Der Artefakt könnte aber auch darin seine Ursache haben, dass die Dichte der Lipidschicht bei der CsCl-Messung um ca. 4 % höher ist, als bei der NaCl-Messung. Da der Effekt reproduzierbar ist, und der Druck bei allen Messungen gleich eingestellt war (50 mN), müsste er auf den Einfluss der Cs^+ - bzw. Na^+ -Ionen zurückzuführen sein. Es ist ferner denkbar, dass die Lipidschicht nicht, wie bisher angenommen, vollständig geschlossen ist; möglicherweise enthält sie Löcher, an denen DNS und Gegenionen die Wasser/Luft-Grenzfläche erreichen. In Anbetracht des hohen verwendeten lateralen Drucks ist diese Erklärung jedoch die unwahrscheinlichste.

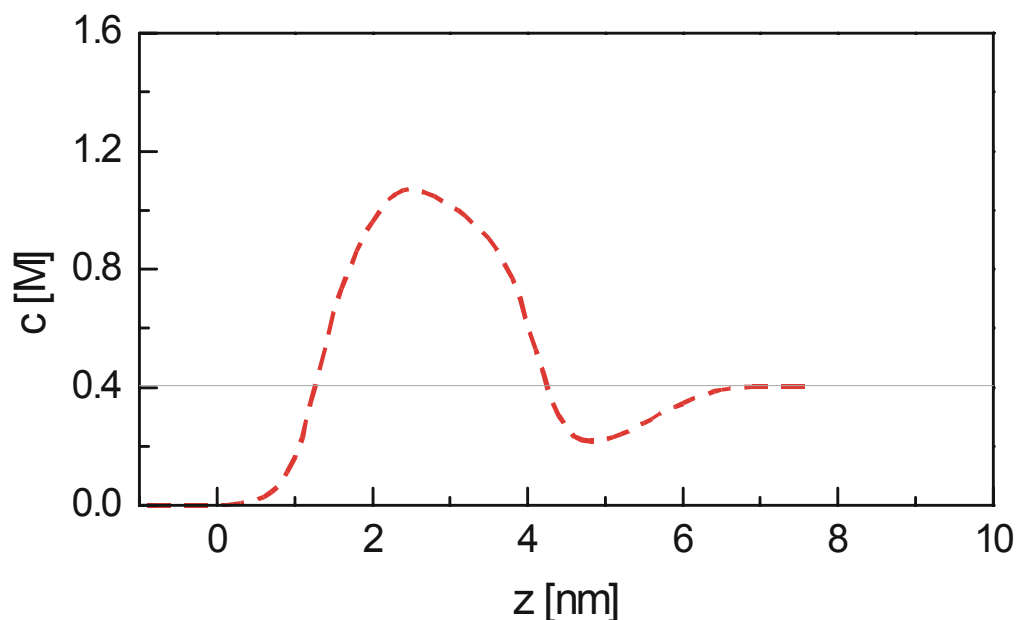


Abbildung 74: Anhäufung von Gegenionen an der der nackten kationischen Lipidmembran. Dargestellt ist der Konzentrationsverlauf der Gegenionen c (---), ermittelt aus den Differenzen der Elektronendichteprofile von NaCl und NaBr bei 400 mM (Abbildung 69) unter Verwendung der Werte für $\Delta\rho$ aus Tabelle 3.

Zieht man die Elektronendichte der Ionen von der Gesamtelektronendichte in Abbildung 72 (Lipidschicht plus adsorbierte DNS) ab, erhält man die Elektronendichte, die allein durch Lipid, DNS und Wasser verursacht ist. Das Ergebnis dieser Betrachtung zeigt Abbildung 76. Dargestellt ist das Elektronendichteprofil, das sich durch FFF aus den Messungen bei 400 mM NaCl ergibt, sowie die Anteile der jeweiligen Ionen an dieser Elektronendichte, ermittelt aus den Differenzen der Profile aus Messungen mit unterschiedlichen Salzen aus Abbildung 72.

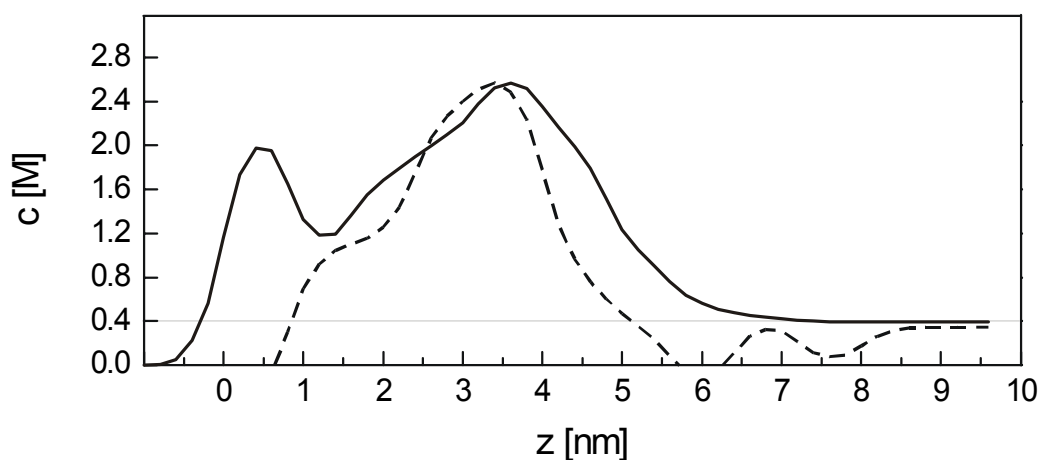


Abbildung 75: Verlauf der Ionenkonzentrationen c der Anionen (---) und Kationen (—), ermittelt aus den Differenzen der Elektronendichteprofile von NaCl, NaBr und CsBr bei 400 mM (Abbildung 72) unter Verwendung der Werte für $\Delta\rho$ aus Tabelle 3.

Hier zeigt sich eine wesentliche Inkonsistenz. Denn zieht man die Anteile der Ionen von der Elektronendichte ab (strichpunktierte Kurve), so verschwindet das DNS-Maximum völlig. DNS muss aber vorhanden sein, denn was ist sonst die Ursache der Anhäufung von Gegenionen? Anscheinend werden die Ionenkonzentrationen von der Ionenkontrastierung überschätzt. Dies weist darauf hin, dass die Grundannahme des Verfahrens, nämlich dass die Komponenten, einschließlich der Ionen, unabhängig vom verwendeten Salz immer auf die gleiche Weise verteilt sind, nicht genau zutrifft. Vielmehr scheinen die Ionenkonzentrationen bei der CsCl und/oder NaBr-Messung höher zu sein als bei der NaCl-Messung.

Was kommt als Ursache für das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Ionensorten in Frage? Sättigungseffekte scheiden aus, denn die Sättigungskonzentrationen von NaBr

(11.2 Mol), NaCl (5.8 Mol) und CsCl (9.6 Mol) liegen oberhalb der verwendeten Konzentrationen. Jedoch werden kleine Ionen schwerer dehydriert als große (vergleiche dazu Tabelle 4). Folglich können die Na^+ und Cl^- etwas schlechter in die Grenzschicht eindringen als die Cs^+ und Br^- . Darüber hinaus ist auch die Wechselwirkung der Gegenionen mit DNS, anders als im Modell von Manning angenommen, vom Ionenradius abhängig (Rau et al., 1984; Podgornik et al., 1989).

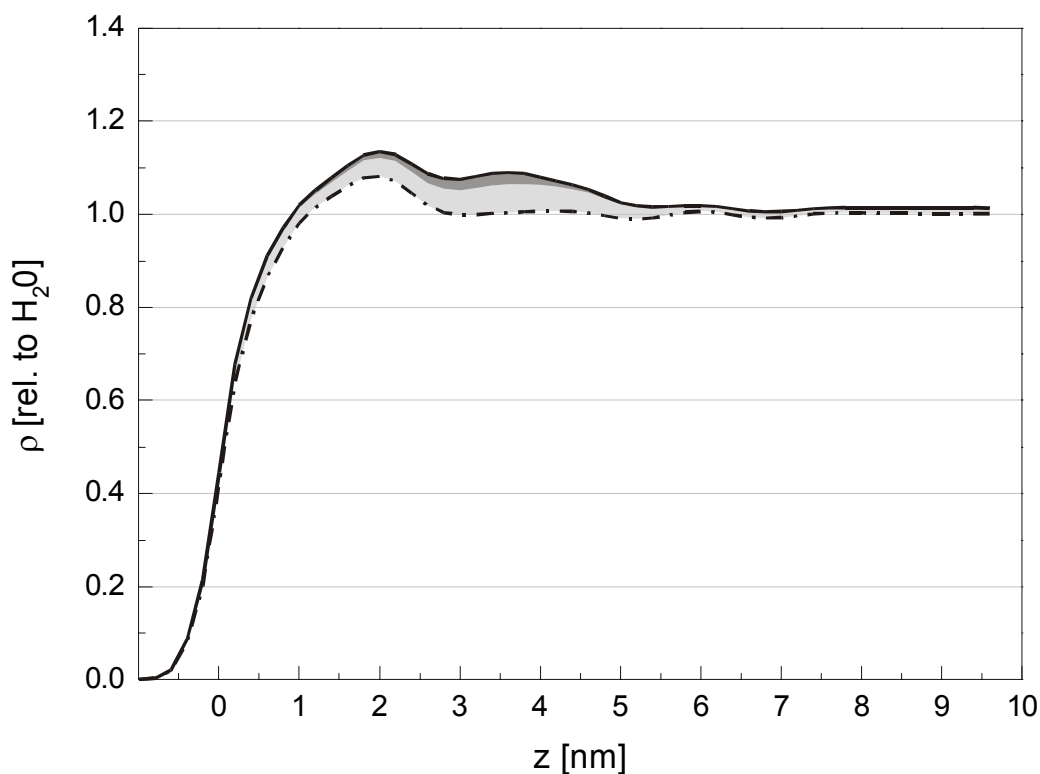


Abbildung 76: Elektronendichteprofil bei 400 mM NaCl (—) und die Anteile der Elektronendichte, die auf Cl^- Ionen (■), Na^+ -Ionen (■) bzw. die Komponenten Lipid, DNS und Wasser (---) entfallen. Die Anteile wurden durch Vergleich der Profile in Abbildung 72 ermittelt.

Ion	r_{ion} [nm]	r_{hyd} [nm]	Hydratationszahl	Hydratationsenergie [kJ/Mol]
Na^+	0.095	0.36	4-5	411
Cs^+	0.169	0.33	1-2	296
Cl^-	0.181	0.33	1-2	316
Br^-	0.195	0.33	1	303

Tabelle 4: Ionenradien (r_{ion}), hydradierte Radien (r_{hyd}) (Israelachvili, 1992) und Hydratationsenergie (Cevc, 1993) der zur Kontrastierung verwendeten Ionen.

Gouy-Chapman-Modell

Das einfachste Modell zur Beschreibung der Ionenverteilung in der Nähe einer Grenzfläche ist das Gouy-Chapman-Modell, in dem die Grenzfläche als eine geladene Ebene betrachtet wird. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass

- 1) die Ladung gleichmäßig mit der Flächenladungsdichte Σ über die Membranfläche verschmiert ist,
- 2) das Wasser ein homogenes Dielektrikum mit der Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 78$ ist und bis zur geladenen Ebene reicht,
- 3) alle Wechselwirkung außer der elektrostatischen vernachlässigt werden können.

Dann erhält man den Potentialverlauf an der Oberfläche durch das Einsetzen des thermodynamischen Mittelwerts der Teilchenkonzentrationen laut Boltzmannstatistik

$$(15) \quad c^{\pm}(z) = c e^{\mp \frac{e_0 \Psi(z)}{k_B T}}, \quad \text{Boltzmannverteilung}$$

in die Poissongleichung für ein 1:1 Elektrolyt

$$\Delta \Psi(z) = \frac{e_0}{\varepsilon \varepsilon_0} (c^+(z) - c^-(z)), \quad \text{Poissongleichung}$$

woraus die Poisson-Boltzmann-Gleichung entsteht:

$$(16) \quad \Delta \Psi(z) = \frac{e_0}{\varepsilon \varepsilon_0} c \left(e^{-\frac{e \Psi(z)}{kT}} - e^{+\frac{e \Psi(z)}{kT}} \right). \quad \text{Poisson-Boltzmann-Gleichung}$$

Die Lösung dieser Gleichung lautet in der Gouy-Chapman-Näherung:

$$(17) \quad \Psi(z) = \frac{4k_B T}{e_0} \tanh^{-1} \left(e^{-\kappa z} \tanh \left(\frac{e_0 \Psi_0}{4k_B T} \right) \right)$$

mit der inversen Debyelänge

$$\kappa = e_0 \sqrt{\frac{2c}{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T}} \propto \sqrt{c}$$

(c = Volumenkonzentration des 1:1 Elektrolyts). Aus der Bedingung, dass die Oberflächenladung Σ durch die Ionen im Volumen kompensiert werden muss, folgt mit Gleichung 16 der Zusammenhang zwischen Σ und dem Oberflächenpotential ψ_0 :

$$(18) \quad \Sigma = \sqrt{8\varepsilon \varepsilon_0 k_B T c} \sinh \left(\frac{e_0 \Psi_0}{2k_B T} \right),$$

oder linearisiert für kleine Exponenten $\frac{e_0 \Psi_0}{2k_B T}$:

$$\Sigma = \varepsilon \varepsilon_0 \kappa \Psi_0.$$

Die Konzentrationsprofile der Gegenionen in der Nähe einer kationischen Grenzschicht ergeben sich aus den Gleichungen 16 und 15 zu

$$c^-(z) = c e^{4 \tanh^{-1} \left(e^{-\kappa z} \tanh \left(\frac{e_0 \Psi_0}{4k_B T} \right) \right)}.$$

Um die Vergleichbarkeit mit dem Experiment sicherzustellen, muß die begrenzte experimentelle Auflösung berücksichtigt werden, die zu einer Verschmierung des tatsächlichen Konzentrationsverlaufs führt. Dies geschieht durch Konvolution mit einer Gaußfunktion:

$$c_v^-(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_0} \int c^-(z') e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{z'-z}{\sigma_0} \right)^2} dz'.$$

Für die Breite σ_0 wird der experimentell ermittelte Wert von 0.3 nm verwendet (Vierl, 1998). Der Potentialverlauf und der Verlauf der Gegenionenkonzentration gemäß des Gouy-Chapman-Modells sind in Abbildung 77 wiedergegeben. Die Lipidmonoschicht wird als geladene Ebene mit der Flächenladungsdichte von $76 \frac{\text{mC}}{\text{m}^2}$ angenommen. Dieser Wert ergibt sich aus der durchschnittlichen Flächen pro Lipid von 0.42 nm^2 und der Annahme, dass 50 % des DC-Chol geladen ist (Zuidam et al., 1997).

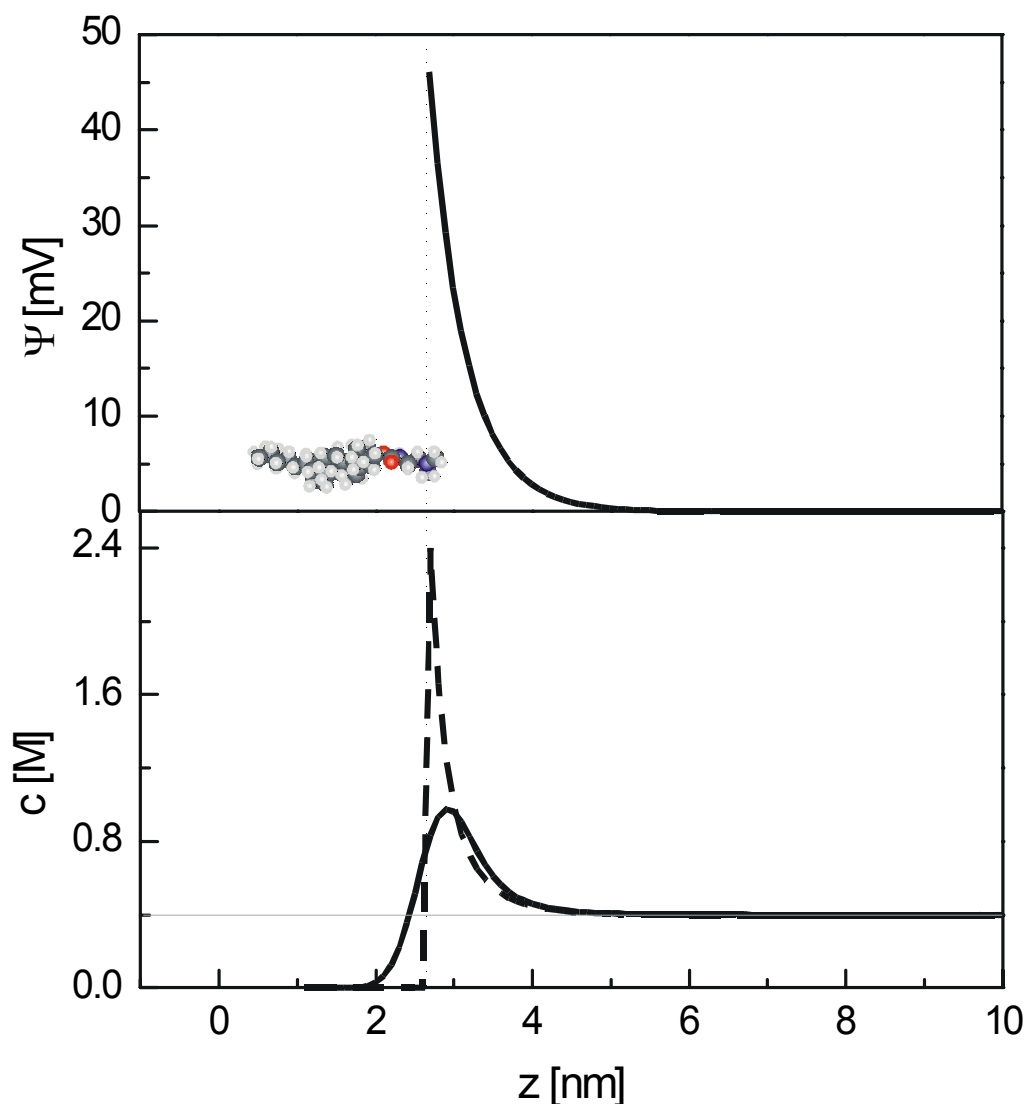


Abbildung 77: elektrostatisches Potential in einer kationischen Grenzschicht als Funktion der Entfernung von der geladenen Ebene z (**oben**) und die daraus resultierende Gegenionenverteilung (**unten**) nach dem Gouy-Chapman-Modell ohne (---) und mit (—) Berücksichtigung der endlichen experimentellen Auflösung. Es wurde eine Volumenkonzentration der Gegenionen von 400 mM angenommen.

Modifiziertes Gouy-Chapman-Modell

Im Gegensatz zu der bisherigen Modellannahme einer ideal flachen Ebene, ist die Ladung in einer realen Grenzschicht aufgrund thermischer Fluktuationen (und gegebenenfalls der Wechselwirkung mit adsorbierter DNS) über einen Bereich in z -Richtung verteilt.

Um dies zu berücksichtigen, muss eine modifizierte Form des Gouy-Chapman-Modells eingesetzt werden. Es wird dabei angenommen, dass die Ladung in der Ebene parallel zur Grenzfläche homogen verteilt ist und nur eine Funktion der Tiefe z ist. Um aus der gegebenen Ladungsverteilung, $P(z)$, der Lipide und der DNS senkrecht zur Oberfläche die Verteilung der Ionen zu bestimmen, wird das elektrostatische Potential $\Psi(z)$ als Funktion der Tiefe mit Hilfe einer linearisierten elektrostatischen Modells gemäß der Debye-Hückel-Näherung bestimmt. Die Poisson-Boltzmann-Gleichung liest sich in dieser Näherung wie

$$(18) \quad \Delta\Psi(z) = \kappa^2\Psi(z) - \frac{1}{\epsilon\epsilon_0}P(z) \quad \text{linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung}$$

(κ = inverse Debyelänge, ϵ = Dielektrizitätskonstante). Voraussetzung für die Gültigkeit der Näherung ist, dass der Exponent $\frac{e_0\Psi(z)}{kT}$ in der (16) klein ist, d.h. $\Psi(z) \ll 25$ mV. Die im folgenden vorkommenden Potentiale sind <20 mV. Vergleiche der Lösungen der linearisierten mit numerischen Lösungen der nichtlinearisierten Poisson-Boltzmann-Gleichung zeigen, dass die Linearisierung bei solchen Potentialen auch noch gute quantitative Ergebnisse liefert.

Die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung (17) wird numerisch ausgewertet, indem die Ladungsverteilung in $1/40$ nm dicke Scheiben mit den Ladungen P_i zerlegt wird. In jeder Scheibe hat Gleichung 17 die Lösung

$$(19) \quad \Psi_i(z) = \frac{1}{\epsilon\epsilon_0\kappa^2} [A_i e^{\kappa z} + B_i e^{-\kappa z} + P_i]$$

Die Koeffizienten A_i und B_i erhält man durch Lösen von Gleichung 18 unter den folgenden Randbedingungen:

$$\Psi_i(z_i) = \Psi_{i+1}(z_i)$$

$$\left. \frac{d\Psi_i(z)}{dz} \right|_{z=z_i} = \left. \frac{d\Psi_{i+1}(z)}{dz} \right|_{z=z_i}$$

$$\Psi_N(\infty) = 0$$

$$\left. \frac{d\Psi}{dz} \right|_{z=0} = 0$$

z_i gibt die Position der Grenze zwischen Scheibe i und $i+1$ an. $x = 0$ bezeichnet die Grenze zwischen dem hydrophoben und dem hydrophilen Bereich der Lipidschicht. Aus dem Potential $\Psi_i(z)$, $z_i < z < z_{i+1}$ in jeder Scheibe kann die Verteilung der monovalenten Ionen mittels Gleichung 15 bestimmt werden.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 78. Es wird angenommen, dass die positive Membranladung über eine Breite von 1 nm um den Schwerpunkt (vertikale Linie) gaußverschmiert ist.

In Abbildung 79 wurde zusätzlich noch eine DNS-Schicht eingeführt. Die DNS wurde als ein homogen geladener Zylinder betrachtet. Der Interaxialabstand der DNS-Moleküle beträgt 4 nm. Für die DNS-Verteilung in z -Richtung wurde aus der Auswertung der DNS-Adsorptionsexperimente bei DNS-Überschuss mit Hilfe des Molekülmodells entnommen (Abbildung 49). Das Ergebnis, welches das modifizierte Gouy-Chapman-Modell in diesem Fall liefert ist in Abbildung 79 dargestellt. Erwartungsgemäß zeigt sich im Bereich der anionischen Polymerschicht eine Verarmung der Anionen und eine Zunahme der Kationenkonzentration. Auch in unmittelbarer Nähe der Grenzschicht nimmt die Anionenkonzentration (gestrichelte Kurve) im Vergleich zum Fall ohne DNS (gepunktete Kurve) aufgrund der Ladungskompensation durch die anionische Polymerschicht ab.

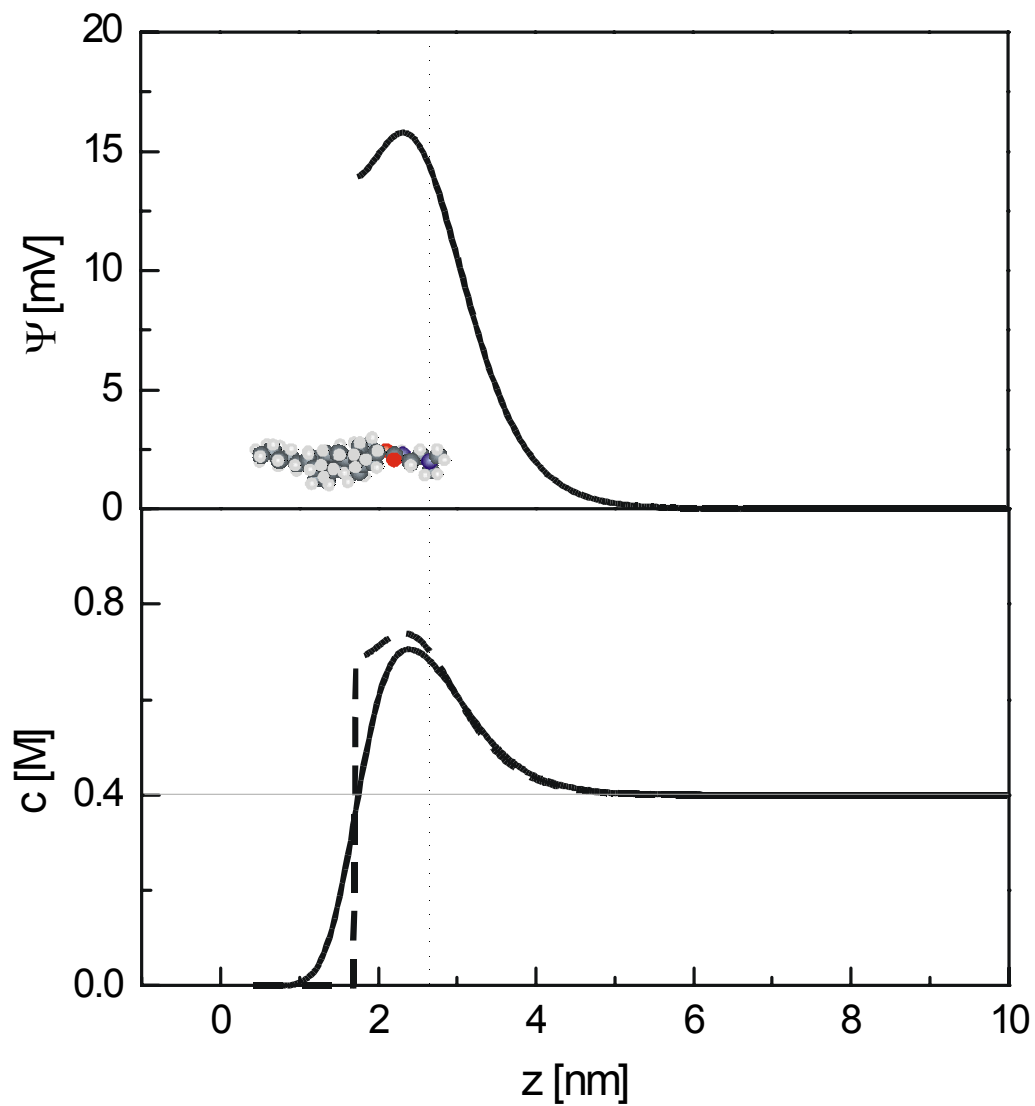


Abbildung 78: **oben:** elektrostatisches Potential Ψ an einer kationischen Schicht als Funktion der Tiefe z nach dem modifizierten Gouy-Chapman-Modell; **unten:** daraus resultierende Gegenionenverteilung c ohne (---) und mit (—) Berücksichtigung der endlichen experimentellen Auflösung. Die Membranladung ist um die vertikale Linie mit einer Breite von 1 nm gaußverteilt.

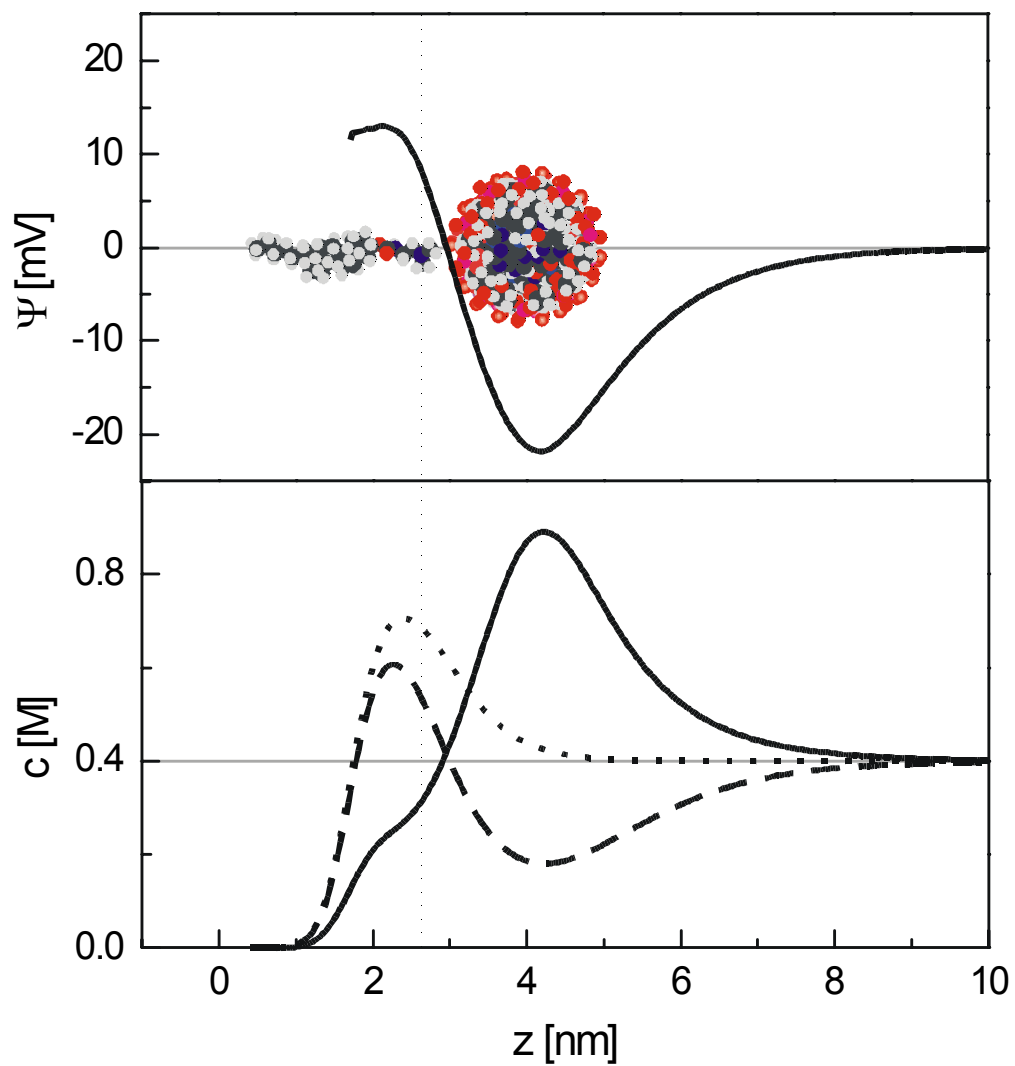


Abbildung 79 oben: Verlauf des elektrostatischen Potentials Ψ an einer kationischen Grenzschicht mit adsorbierter Schicht eines anionischen Polymers als Funktion der Tiefe z , berechnet nach dem modifizierten Gouy-Chapman-Modell; **unten:** die daraus resultierende lokale Ionenkonzentrationen $c(z)$ für Kationen (—) und Anionen in Anwesenheit (---) und Abwesenheit (··) des anionischen Polymers.

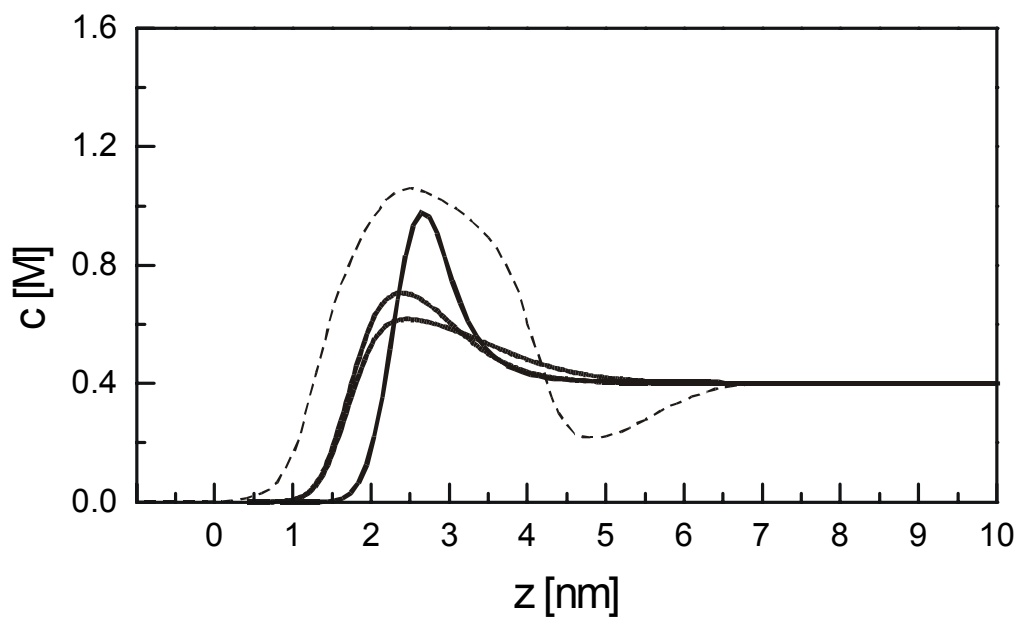


Abbildung 80: Vergleich der gemessenen Ionenverteilung in der Nähe der kationischen Lipidschicht mit den Vorhersagen des modifizierten Gouy-Chapman-Modells. Drei Modellkurven sind eingezeichnet. In der Reihenfolge der Schärfe der Verteilung basieren sie auf einer ideal flachen Grenzschicht, einer um 1 nm, bzw. 2 nm gaußverschmierten Verteilung der Membranladungen.

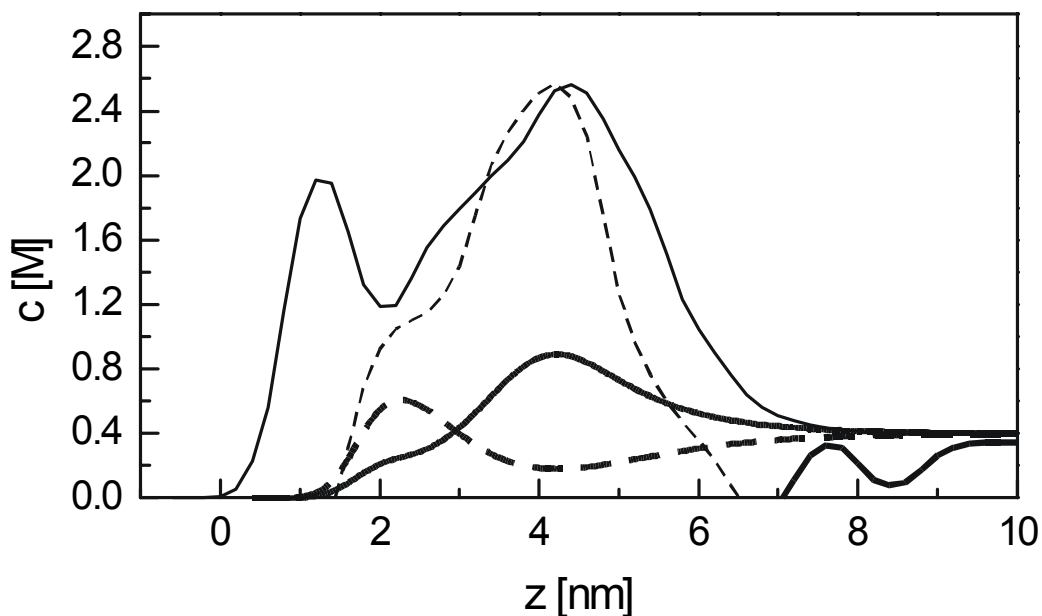


Abbildung 81: durch Ionenkontrastierung gemessene Ionenverteilung an der kationischen Lipidschicht mit adsorbierter DNS (dünne Kurven) und Vorhersagen des modifizierten Gouy-Chapman-Modells. Anionen sind gestrichelt (---), Kationen voll eingezeichnet (—).

In Abbildung werden die Ergebnisse des Gouy-Chapman-Modells bzw. des modifizierten Gouy-Chapman-Modells mit dem Ergebnis der Ionenkontrastierung verglichen. Die angenommene Verschmierung der Membranladungen zwischen 1 und 2 nm wird von den Ergebnissen der Cryo-TEM-Untersuchungen unterstützt. In diesen Bildern erkennt man in der Lipidschicht Kopf-zu-Kopf Entfernungen von 5.1 nm, deutlich mehr, als der für reine DMPC Schichten erwartete Wert von ca. 4.2 nm (Cevc, 1993). Dies deutet auf eine sehr diffuse Grenzschicht hin. Verstärkend wirkt sich wahrscheinlich noch die Gegenwart der DNS aus (vgl. Abbildung 39).

Die Abweichungen zwischen Modell und Messung zeigen, dass die Modellannahmen die tatsächlichen Verhältnisse noch zu stark vereinfachen. So lässt das Modell die Hydratationsabstoßung insgesamt unberücksichtigt. Hierin könnte die Ursache für das Absinken der Ionenkonzentration unter den Volumenwert am Rand der Grenzschicht liegen. Unberücksichtigt bleibt auch der Einfluss der Ionengröße und des Polaritätsprofils in der Grenzschicht.

Die partielle Dehydratation der Ionen innerhalb der Grenzschicht, die zu einer kurzreichweitigen Abstoßung führt, lässt sich berücksichtigen, indem man die dielektrische Konstante in Abhängigkeit der Position variiert (Cevc, 1990). Ein von $\varepsilon(z < 0) = 2$ auf $\varepsilon = 78$ ansteigendes dielektrisches Profil gibt z. B. den gleitenden Übergang vom hydrophoben Teil der Grenzschicht hin zur Lösungsmittel wieder. Der Einfachheit halber wird hier ein gaußförmiger Profilverlauf angenommen (es zeigt sich, dass das Ergebnis von der genauen Form des Profils weitgehend unabhängig ist):

$$\varepsilon(z) = 2 + 76e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{z-d_e}{d_h}\right)^2} \quad \text{für } z < d_e$$

$$\varepsilon(z) = 78 \quad \text{für } z \geq d_e$$

Hieraus resultiert die bornsche Energie, die nötig ist, um ein Ionen von einem Bereich mit $\varepsilon = 78$ in einen bereich niedrigerer Dielektrizitätskonstante $\varepsilon(z)$ zu befördern. Man erhält ein effektives Hydratationspotential

$$\Psi_{hyd}(z) \cong \pm \frac{G_{hyd}}{e_0} \frac{\varepsilon}{\varepsilon - 1} \left(\frac{1}{\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon(z)} \right),$$

wobei G_{hyd} die freie (De-)Hydratationsenergie des betreffenden Ions ist:

$$G_{hyd} = \frac{e_0^2}{2\varepsilon_0(r + \Lambda)} \left(1 - \frac{1}{\varepsilon} \right)$$

(r = Ionenradius, Λ = Korrelationslänge). Man erhält Werte in der Größenordnung von einem eV, die jedoch von der Ionensorte abhängen. Während Cl^- und Br^- sehr ähnliche Werte liefert, sind die Werte für Na^+ und Cs^+ stark unterschiedlich. Wird das Hydratationspotential zusammen mit dem elektrostatischen Potential in die Boltzmannverteilung (Gleichung 15) eingesetzt, folgt für die Ionenverteilung

$$(14a) \quad c^\pm(x) = c \cdot e^{\frac{\mp e_0 \Psi(z) + e_0 \Psi_{hyd}(z)}{k_B T}}$$

nunmehr im Rahmen des elektrostatischen Zwischenphasenmodells (EZM). Die neue EZM-Poisson-Boltzmann-Gleichung lautet:

$$(15a) \quad \Delta \Psi(z) = \frac{e_0}{\varepsilon \varepsilon_0} c \left(e^{\frac{-e_0 \Psi(z) + e_0 \Psi_{hyd}(z)}{kT}} - e^{\frac{e_0 \Psi(z) + e_0 \Psi_{hyd}(z)}{kT}} \right).$$

Bei der Linearisierung fällt das Hydratationspotential wieder heraus, so dass der Verlauf des elektrostatischen Potentials in der linearen Näherung unbeeinträchtigt bleibt, nicht jedoch die Ionenverteilung.

Die jeweils zur Kontrastierung verwendeten zwei Ionensorten sind verschiedenen Gesamtpotentialen ausgeliefert, weil verschiedene Ionensorten verschiedenen Hydratationspotentialen ausgesetzt sind und sie sich außerdem aufgrund der verschiedenen Ionenradien unterschiedlich stark an die Ladungen der Lipidköpfe bzw. der DNS annähern können. Letzterer Effekt wurde bereits experimentell untersucht, und für ein einfacheres Modell als das hier verwendete berechnet (Cevc, 1990b). Er führt zu weiteren Unterschieden in der Ionenverteilung, welche eine Ursache für die Überschätzung der

Ionenkonzentrationen bei der Ionenkontrastierung ist. Um die hier beobachteten Abweichung der Messergebnisse von den Modellvorhersagen bei der nackten Lipidmembran, die bei einem Faktor von ca. 1.6 liegt, alleine hiermit zu erklären, müsste die Br-Ionenkonzentration um den Faktor $(1.6 \cdot 26 + 10) / 36 = 1.43$ über der Cl-Ionenkonzentration liegen.

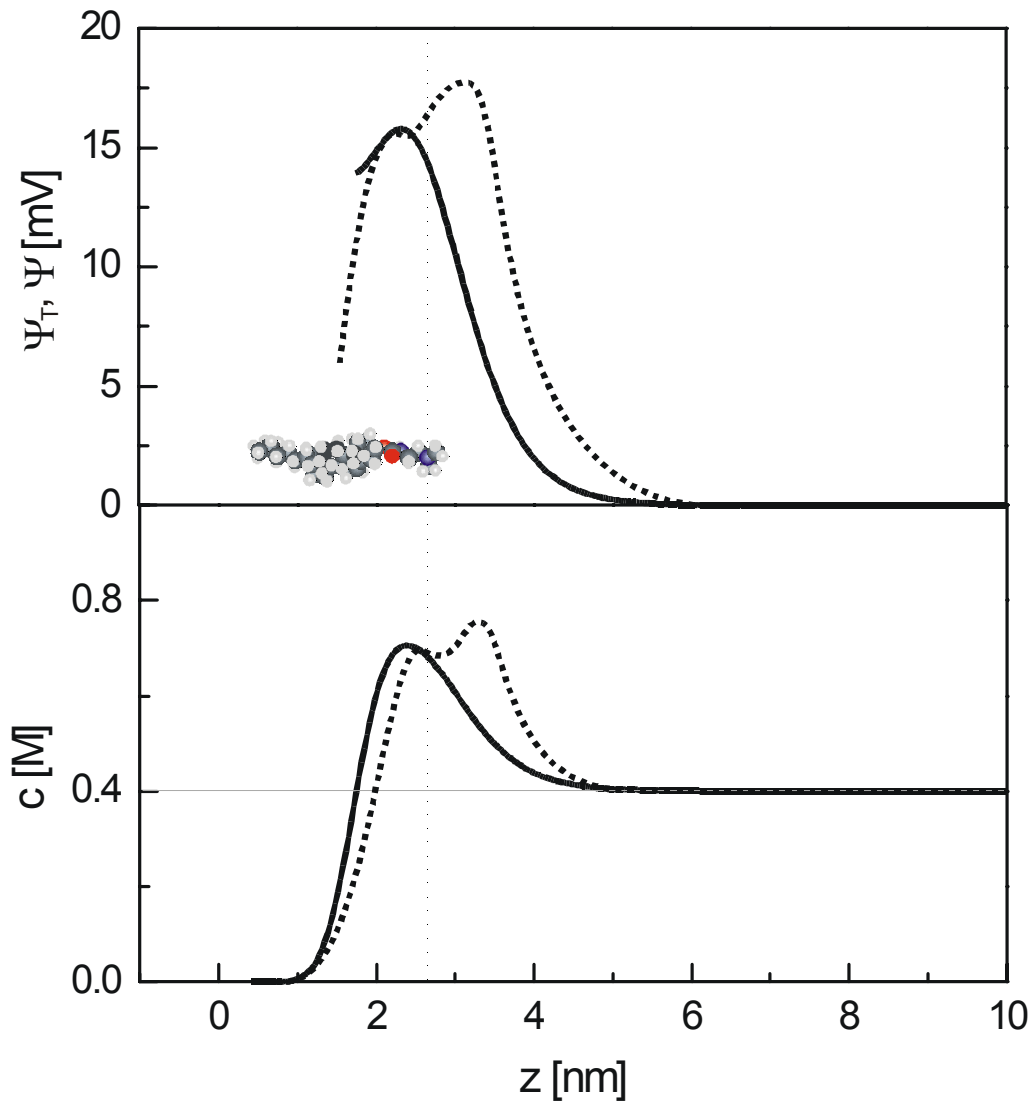


Abbildung 82: elektrostatisches Potential Ψ (—) und Gesamtpotential $\Psi_T = \Psi + \Psi_{hyd}$ (····) als Funktion der Tiefe z (**oben**) und die daraus resultierende Gegenionenverteilung c (**unten**) nach dem modifizierten Gouy-Chapman-Modell ohne (—) und mit (····) Berücksichtigung der Hydratationsabstoßung. Die Membranladung ist um die vertikale Linie mit einer Breite von 10 nm gaußverteilt. Die endlichen Ionenradien bleiben im unteren unberücksichtigt.

Bei den Untersuchungen von Membranen mit adsorbierter DNS-Schicht findet man größere Abweichungen von bis zu einem Faktor 3 zwischen modifiziertem Gouy-Chapman-Modell und Messungen. Nachdem andere Energiebeiträge bereits diskutiert wurden, bleibt die Vermutung übrig, dass die lokale Ladungsverteilung senkrecht zu z oder ein anderer noch nicht identifizierter Energiebeitrag (z.B. spezifische Bindung) im Spiel sind. Für ersteres spricht, dass, im Gegensatz zur Modellannahme, die negativen (DNS) und vermutlich auch die positive Ladung (Abbildungen 23 und 39) inhomogen verteilt sind. Der Interaxialabstand der DNS-Moleküle von 4 nm ist deutlich größer als λ , so dass die Ionen lokale Potentiale spüren, die aus den gemessenen Ionenverteilungen berechnet werden können. Mit Gleichung 18 erhält man daraus die lokale Membranladungsdichte. Der Wert von ca. 1 Ladung pro 132 nm^2 liegt im Rahmen des physikalisch möglichen.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Röntgenreflektometrie

Bei der Komplexbildung finden zwei Prozesse mit deutlich unterschiedlicher Kinetik parallel statt: die DNS-Adsorption und die Adsorption von weiteren Lamellen. Die adsorbierende DNS ordnet sich auf der Membran zu einer Monoschicht. Die DNS-Adsorption ist diffusionsgesteuert. Sie erreicht eine Sättigung, wenn die Belegkapazität der kationischen Lipidschicht erreicht wird. Die Sättigungsbelegung der Lipidschicht skaliert mit dem Anteil kationischen Lipids. In Bezug auf die Entstehung von Multilamellen bestätigt die Röntgenreflektometrie die Vorhersagen aus der Cryo-TEM: Lamellen entstehen dadurch, dass Vesikel adsorbieren und anschließend aufbrechen, wobei sie ihre Membran auf dem Substrat ausbreiten. Die Kinetik dieses Vorgangs lässt sich in guter Näherung mit einem irreversiblen Multischicht-Adsorptionsmodell beschreiben. Die Komplexbildung wird stark von der EDTA-Konzentration beeinflusst. Wesentlich für eine effektive Multischichtenbildung ist, dass die EDTA-Konzentration sich in einem angemessenen Fenster bewegt. Mit Hilfe der Ionenkontrastierung konnte die Verteilung monovalenter Ionen an der Grenzschicht untersucht werden. Ein Vergleich mit verschiedenen Modifikationen des klassischen Gouy-Chapman-Modells offenbart deutliche Abweichungen. Diese werden mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem bedeutenden Teil durch die quantitativen Unterschiede in der Wechselwirkung verschiedener Ionensorten mit Lipiden und DNS hervorgerufen.

Ausblick

CL-DNS Komplexe sind zugleich kompliziert und einfach. Kompliziert, weil viele Parameter einen Einfluss auf das Ergebnis der Komplexbildung haben. Dazu zählen neben dem Mischverhältnis der Lipide auch die Konzentrationen von Lipid und DNS und sogar die Pufferzusammensetzung. Auf der Suche nach effektiveren Transfektionssystemen gilt es den enorm großen Parameterraum zu durchkämmen, den diese Parameter aufspannen. Einfach, weil sich zeigt, dass dieses komplizierte Vielkomponentensystem elementaren Mechanismen und Kinetiken folgt, die einen Weg durch den Parameterraum weisen. Es geht darum, letzteres zu nutzen, um weg von einem simplen Probieren hin zu einer zielgerichteten, rationalen Entwicklung synthetischer Transfektionssysteme zu gelangen.

Als nächstes steht an, auch andere CL/DNS-Systeme zu untersuchen, Parallelen und Unterschiede aufzudecken und diese zu einem größeren Bild zusammenzufügen. Insbesondere erscheint der Vergleich mit Systemen interessant, die PE als Helferlipid enthalten. Es ist bekannt, dass einige von diesen Systemen hexagonale, und nicht multilamellare Phasen bilden. Außerdem haben PE-Systeme oft eine höhere Transfektionseffizienz als die entsprechenden PC-Systeme. Detailliertere Untersuchungen der Unterschiede in der Wechselwirkung der verschiedenen Ionensorten mit Lipiden und DNS dürfte außerdem zur Verbesserung des Ionenkontrastierungsverfahrens beitragen.

Sowohl die Cryo-TEM-Untersuchungen als auch die Röntgenreflektometrie haben sich als hervorragende Grundlage zum Enträtseln dieser Vorgänge erwiesen. Es ist zu hoffen, dass die vorliegende Arbeit dazu ermutigt, diese beiden Methoden auch auf andere CL/DNS-Systeme anzuwenden, und so Abbildung 47 durch neue Pfade zu ergänzen, oder völlig andere Mechanismen aufzudecken.

Literaturverzeichnis

- Als-Nielsen, J., H. Möhwald. 1991. Synchrotron X-Ray Scattering Studies of Langmuir Films in Handbook of Synchrotron Radiation Vol. 4, Chapter 1. Elsevier Science Publishing. 1-51.
- Als-Nielsen, J. 1990. Chapter 5: Solid and Liquid Surface Studies by Synchrotron X-Ray Diffraction in Structure and Dynamics of Surfaces II, Phenomena, Models, and Methods, Volume 43. Springer Verlag. 1881-222.
- Armen, R. S., D. U. Alivia, S. E. Feller. 1998. Phospholipid Component Volumes: Determination and Application to Bilayer Structure Calculations. *Biophysical Journal*. 75: 734-744.
- Artzner, F., R. Zantl, G. Rapp, J. O. Rädler. 1998. Observation of a Rectangular Columnar Phase in Condensed Lamellar Cationic Lipid-DNA Complexes. *Phys. Rev. Letters*. 81: 5015-5018.
- Atkins P. W. 1990. Physical Chemistry. Oxford University Press. Oxford, Großbritannien.
- Baltes, H., M. Schwendler, C. A. Helm, H. Möhwald. 1996. Tail and Head Group Interactions in Phospholipid Monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 178: 135-143.
- Battersby, B. J., R. Grimm, S. Hübner, G. Cevc. 1998. Evidence for Three-Dimensional Interlayer Correlations in Cationic Lipid-DNA Complexes as Observed by Cryo-Electron Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1372(2):379-383.
- Behr, J. P. Synthetic gene transfer vectors. 1993. *Acc. Chem. Res.* 26:274-278
- Behr, J. P. 1986. DNA Strongly Binds to Micells and Vesicles Containing Lipopolyamines or Lipointercalates. *Tetrahedron Lett*. 27: 5861-5864.

- Cevc, G., ed. 1993. Phospholipid Handbook. Marcel Dekker, New York, NY.
- Cevc, G. 1987. Phospholipid Bilayers. Wiley Interscience, New York, NY.
- Cevc, G., D. Gebauer, J. Stieber, A. Schätzlein, G. Blume. 1996. Ultraflexible Vesicles, Transfersomes, Have an Extremely Low Pore Penetration Resistance and Transport Therapeutic Amounts of Insulin Across the Intact Mammalian Skin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1368:201-215.
- Cevc, G. 1993a. Electrostatic Characterization of Liposomes. *Chem. Phys. Lipids*. 64: 163-186.
- Cevc, G., W. Fenzl, L. Sigl. 1990. Surface-Induced X-Ray Reflection Visualization of Membrane Orientation and Fusion into Multilayers. *Science*. 249: 1161-1163.
- Cevc, G. 1990. Membrane Electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta*. 1031: 311-382
- Cevc, G. 1990a. The molecular Mechanism of Interaction between Monovalent Ions and Polar Surfaces, Such as Lipid Bilayer Membranes. *Chem. Phys. Lett*. 170: 283-288
- Cevc, G. 1990b. Theoretical and Experimental Aspects of the Specific Association of Monovalent Ions with Lipid Bilayers Membranes. *in Water Ions in Biomolecular Systems*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Devotta, I., R. A. Mashelkar. 1995. Competitive Diffusion-Adsorption of Polymers of Differing Chain Lengths on Solid Surfaces. *Chemical Engineering Science*. 4: 561-569.
- Douglas, E. S., T. T. Perkins, S. Chu. 1995. Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients. *Macromolecules*. 29:1372-1373.
- Dubochet, J. M. Adrian, J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, P. Schultz. 1988. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Quarterly Reviews in Biophysics*. 21: 129-228.

- Edwards, K., J. Gustafsson, M. Almgren, and G. Karlsson. 1993. Solubilization of Lecithin Vesicles by a Cationic Surfactant: Immediate Structures in the Vesicle-Micelle Transition Observed by Cryo-Transmission Electron Microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* 161:299-309.
- Evans, J. W.. 1993. Random and Cooperative Sequential Adsorption. *Reviews of Modern Physics.* 65 (4): 1281-1329.
- Fang, Y., J. Yang. 1997. Two-Dimensional Condensation of DNA Molecules on Cationic Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B.* 101:441-449.
- Fang, Y., J. Yang. 1997. Effect of Cationic Strength and Species on 2-D Condensation DNA. *Physical Chemistry B.* 101:3454-3456.
- Felgner, P.L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. S. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, M. Ringold, H. Danielsen. 1987. Lipofection: a Highly Efficient Lipid-Mediated DNA Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7413-7417.
- Fenzl, W., L. Sigl, H. Richardsen, G. Cevc. 1995. The Surface-Confined Structures of Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers in Contact with the Vesicle Suspension as Studied by Means of X-ray Reflectivity. *Colloids and Surfaces.* 102: 247-256.
- Fraley-R, D. Papahadjopoulos. 1982. Liposomes: the development of a new carrier system for introducing nucleic acid into plant and animal cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 96: 171-91.
- Fromherz, P. 1983. Lipid-Vesicle Structure: Size Control by Edge-Active Agents. *Chem. Phys. Lett.* 94:259-266.
- Gao, X., L. Huang. 1991. A Novel Cationic Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:280-285.
- Gershon, H., R. Girlando, S. B. Guttman, A. Minsky. 1993. Mode of Formation and Structural Features of DNA-Cationic Liposome Complexes Used for Transfection. *Biochemistry.* 32:7143-7151.

Gerthsen C., H. O. Kneser, H. Vogel. 1989. Physik. Springer-Verlag. Berlin, Deutschland.

Golubovic, L., M. Golubovic. 1988. Fluctuations of Quasi-Two-Dimensional Smectics Intercalated between Membranes in Multilamellar Phases of DNA-Cationic Lipid Complexes. *Phys. Rev. Letters*. 80/19:4341-4344

Grimm, R. 1998. Anwendung von Energiefilterung bei der automatisierten Elektronentomographie von eiseingebetteten biologischen Objekten. Dissertation. Technische Universität München.

Grimm, R., H. Singh, R. Rachel, D. Typke, W. Zillig, W. Baumeister. 1998. Electron Tomography of Ice-Embedded Prokaryotic Cells, *Biophys. J.* 74:1031-1042.

Gustaffson, J., G. Arvidson, G. Karlsson, M. Almgren. 1995. Complexes between Cationic Liposomes and DNA Visualized by Cryo-TEM. *Biochim. Biophys. Acta*. 1235:305-312.

Harries, D., S. May, W. M. Gelbart, A. Ben-Shaul. Structure, Stability and Thermodynamics of Lamellar DNA-Lipid Complexes.

Hoppe, W. W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler. 1982. Biophysik. Springer-Verlag. Berlin, Deutschland.

Huebner, S., J. B. Battersby, R. Grimm, G. Cevc. 1999. Lipid-DNA Complex Formation: Reorganization and Fusion of Lipid Bilayers in the Presence of DNA as Observed by Cryo-Electron Microscopy. *Biophys. J.* 76:3158-3166.

Huebner, S., E. Politsch, U. Vierl, G. Cevc. 1999. EDTA-Induced Self-Assembly of Cationic Lipid-DNA Multilayers Near a Monolayer-Covered Air-Water Interface. *Biochim. Biophys. Acta*. 1421: 1-4

Huebner, S., J. B. Battersby, E. Politsch, G. Cevc. 1999. Monitoring of the Self-Assembly of Multilamellar Cationic Lipid-DNA Complexes Near the Air-Water Interface. *submitted to Biophys. J.*

Israelachvili, J. 1992. Intermolecular & Surface Forces. Academic Press, Boston, N.J.

- Jaaskelainen, I., B. Sternberg, J. Monkkonen, A. Urtti. 1998. Physicochemical and Morphological Properties of Complexes Made of Cationic Liposomes and Oligonucleotides. *Int. J. Pharmaceutics*. 167:191-203.
- de Jong, A. F., J. Rees, W. M. Busing, U. Lücken. 1996. Integrated Energy-Filtering TEM - the CM120-Biofilter. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 65:H116.
- Käs, J., H. Strey, E. Sackmann. 1994. Direct Imaging of Reptation of Semiflexible Actin Filaments. *Nature*. 368:226-229.
- Käs, J. 1993. Formfluktuationen und Reptation einzelner Aktin-Filamente in verdünnten und halbverdünnten Aktinlösungen. Dissertation. Technische Universität München.
- Kiessig, H. 1931. Untersuchungen zur Totalreflexion von Röntgenstrahlen. *Annalen der Physik*. 10: 715-768.
- Koltover, I, T. Salditt, J. O. Rädler, C. R. Safinya. 1998. An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery. *Science*. 281:78-81
- Kornyshev, A. A. 1997. Theory of Interaction between Helical Molecules. *J. Chem. Phys.* 107:3656-3674.
- Kornyshev, A. A. 1998. Electrostatic Zipper Motif for DNA Aggregation. *Phys. Rev. Lett.*
- Kornyshev, A. A. 1998, Leikin, S. 1998. Symmetry Laws for Interaction between Helical Macromolecules.
- Lasic, D. D. 1997. Liposomes in Gene Delivery. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lasic, D. D., H. Strey, M. C. A. Stuart, R. Podgornik, P. M. Frederik. 1997. The Structure of DNA-Liposome Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 119:832-833.
- Lasic, D. D., N. S. Templeton. 1996. Liposomes in Gene Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*. 20:221-266.

- Lasic, D. D. 1982. A Molecular Model for Vesicle Formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 792:501-502.
- Lentz, B. R. 1994. Polymer-Induced Membrane Fusion: Potential Mechanism and Relation to Cell Fusion Events. *Chemistry and Physics of Lipids.* 73:91-106.
- Lösche, M. 1999. Persönliche Mitteilung.
- Lösche, M. 1994. Selbstorganisierende makromolekulare Grenzflächenschichten: Strukturelle Charakterisierung und strukturelle Kontrolle auf molekularer Längenskala. Habilitationsschrift. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- Lösche, M, C. Erdelen, E. Rump, H. Ringsdorf, K. Kjaer, D. Vaknin. 1993. On the Lipid Head Group Hydration of Floating Surface Monolayers Bound to Self Assembled Molecular Protein Layers. *Thin Solid Films.* 242:112-17
- Maier, B, J. Rädler. 1998. Conformation and Self-Diffusion of Single DNA Molecules Confined to Two Dimensions. *Phys. Rev. Letters.* 82 (9): 1911-1914.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. 1989. Molecular Cloning – a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manning, G. S.. 1978. The Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Application to the Electrostatic Properties of Polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* 11: 179-246.
- May, S., A. Ben-Shaul. 1997. DNA-Lipid Complexes: Stability of Honeycomb-Like and Spaghetti-Like Structures. *Biophys. J.* 73:2427-2440.
- Mayer, L. D., M. J. Hope, P. R. Cullis. 1986. Vesicles of Variable Sizes Produced by a Rapid Extrusion Procedure. *Biochim. Biophys. Acta.* 856: 161-168.
- Metzger, T. H., C. Luidl, U. Pietsch, U. Vierl. 1994. Novel Versatile X-ray Reflectometer for Angle and Energy Dispersive Characterization of Liquid and Solid Surfaces and Interfaces. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A.* 350: 398-405.

- Mukerjee, P. 1959. On Ion-Solvent Interactions. Part I. Partial Molal Volumes of Ions in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem.* 65: 740-744.
- O'Hern, C. S., T. C. Lubensky. 1998. Sliding Columnar Phase of DNA-Lipid Complexes. *Phys. Rev. Letters.* 80/19: 4345-4348.
- Orita, K., T. Morimura, T. Horiuchi, K. Matsushige. 1997. In Situ Energy-Dispersive X-ray Reflectivity Measurements of Structural Changes in Thin Films for Organic Electroluminescent Devices. *Synthetic Metals.* 91: 155-158.
- Pitard, B., N. Oudrhiri, J. P. Vigneron, M. Hauchecorne, O. Aguerre, R. Toury, M. Airiau, R. Ramasawmy, D. Scherman, J. Crouzet, J. M. Lehn, P. Lehn. 1999. Structural Characteristics of Supramolecular Assemblies Formed by Guanidinium-Cholesterol Reagents for Gene Transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:2621-2626.
- Pitard, B., O. Aguerre, M. Airiau, A. M. Lachages, T. Boukhnikachvili, g. Byk, C. Dubertret, C. Herviou, D. Scherman, J. F. Mayaux, J. Crouzet. 1997. Virus-Sized Self-Assembling Lamellar Complexes between Plasmid DNA and Cationic Micelles Promote Gene Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:14412-14417.
- Plank, C., K. Mechtler, J. F. C. Szoka. 1996. *Hum. Gene Ther.* 7:1437
- Plech, A., U. Klemradt, H. Metzger, J. Peisl. 1998. In Situ X-ray Reflectivity Study of the Oxidation Kinetics of Liquid Gallium and the Liquid Alloy Ga_{0.93}Hg_{0.07}. *J. Phys.: Condens. Matter.* 10: 971-982.
- Podgornik, R., B. Žekš. 1998. Coupling between Smectic and Twist Modes in Polymer Intercalated Smectics. 1998. *Phys. Rev. Letters.* 80/2:305-308.
- Podgornik, R., Rau, D. C., Parsegian, V. A. 1989. The Action of Interhelical Forces on the Organization of DNA Double Helices: Fluctuation-Enhanced Decay of Electrostatic Double-Layer and Hydration-Forces. *Macromolecules.* 89:1780-1786.
- Rädler, J.O., I. Koltover, T. Salditt, C. R. Safinya. 1997. Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science.* 275: 810-814.

- Reimer, L. 1989. Transmission Electron Microscopy. Springer Verlag, Heidelberg.
- Richardson, H. C. 1998. Biophysikalische Grundlagen der Vesikeladhäsion an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Dissertation. Technische Universität München.
- Rami Reddy, M., M. Berkowitz. 1989. Hydration Forces between Parallel DNA Double Helices: Computer Simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 3165- 3168
- Rau, D. C., B. Lee, V. A. Parsegian. 1984. Measurements of the Repulsive Force between Polyelectrolyte Molecules in Ionic Solutions: Hydration Forces between Parallel DNA Double Helices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2621-2625.
- Ross, P. C., M. L. Hensen, R. Supabphol, S. W. Hui. 1998. Multilamellar Cationic Liposomes are Efficient Vectors for in vitro Gene Transfer in Serum. *J. Liposome. Res.* 8:499-520.
- Russell, T. P. 1990. X-ray and Neutron Reflectivity for the Investigation of Polymers. *Materials Science Reports.* 5: 171-271.
- Safinya, C. R., I. Koltover, J. Raedler. 1998. DNA at Membrane Surfaces: an Experimental Overview. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 3: 69-77.
- Salditt, T., I. Koltover, J. O. Rädler, C. R. Safinya. 1998. Self-assembled DNA-Cationic-Lipid Complexes: Two-Dimensional Smectic Ordering, Correlations, and Interactions. *Physical Review E.* 58: 889-904.
- Salditt, T., H. Rhan, T. H. Metzger, J. Peisl, R. Schuster, J. P. Kotthaus. 1994. X-ray Coherence and Ultra Small Angle Resolution at Grazing Incidence and Exit Angles. *Z. Phys. B.* 96:227-230.
- Smith, D. E., T. P. Perkins, S. Chu. 1996. Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients. *Macromolecules.* 29: 1372-1373.
- Sternberg, B., F. Sorgi, L. Huang. 1994. New Structures in Complex Formation between DNA and Cationic Liposomes Visualized by Freeze-Fracture Electron Microscopy. *FEBS Letters.* 356:361-366.

- Vaknin, D., K. Kjaer, H. Ringsdorf, R. Blankenburg, M. Piepenstock, A. Dietrich, M. Lösche. 1993. X-ray and Neutron Reflectivity Studies of a Protein Monolayer Adsorbed to a Functionalized Aqueous Surface. *Langmuir*. 193, 9:1171-1174.
- Vierl, U. 1998. Adsorptionsvorgänge an der hydrophilen Grenzschicht von Phospholipidmembranen. Dissertation. Technische Universität München.
- Vierl, U., G. Cevc. 1997. Time-Resolved X-Ray Reflectivity Measurements of Protein Binding onto Model Lipid Membranes at the Air-Water Interface. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1325: 165-177.
- Vierl, U., G. Cevc, H. Metzger. 1995. Energy-Dispersive X-Ray Reflectivity Study of the Model Membranes at the Air/Water Interface. *Biochim. Biophys. Acta*. 1234: 139-143.
- Walter, A., P.K. Vinson, A. Kaplun, and Y. Talmon. 1991. Intermediate Structures in the Cholate-Phosphatidylcholine Vesicle-Micelle Transition. *Biophys. J.* 60:1315-1325.
- Watson, J.D., J. Witkowski, M. Gilman, M. Zoller. 1983. Recombinant DNA. Scientific American Books, New York, USA.
- Zuidam, N. J., Y. Barenholz. 1997. Electrostatic Parameters of Cationic Liposomes Commonly Used for Gene Delivery as Determined by 4-Heptadecyl-7-Hydroxycoumarin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1329: 211-222.

Dank

Viele haben durch ihre Mithilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Gregor Cevc, der ein hervorragender Betreuer war, vor Ideen sprühte und sich viel Zeit nahm. Mit ihm arbeiten zu dürfen war für mich eine außerordentliche Bereicherung. Zu großem Dank bin ich auch meinem Lehrer Herrn Professor Erich Sackmann verpflichtet, der in mir die Freude an der Biophysik geweckt und mich gefördert hat.

Ich danke Erich Politsch, Bonnie Battersby, Rudo Grimm und Ulrich Vierl für die engagierte Zusammenarbeit bei den Experimenten und der Auswertung der Daten. Auch Stephan Lambottes Hilfe bei der DNS-Präparation und die vielen Gespräche waren ausgesprochen wertvoll. Nicht zuletzt finden die Ergebnisse der vielen anregenden Diskussionen mit Holger Richardsen, Joachim Raedler, Norbert Nagel, Robert Vogel und vielen anderen in dieser Arbeit ihren Niederschlag.

Ohne die angenehme IBOR-Atmosphäre mit Alex, Anke, Doris, Juliane, Frau Dr. Lehmer, Momo, Sabine und Silke hätte die Arbeit sicher nur halb soviel Spaß gemacht.