

**Wechselwirkung zwischen Lipiden und DNA -  
Auf dem Weg zum künstlichen Virus**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

„*Doctor rerum naturalium*“

(*Dr. rer. nat.*)

im Fach Physikalische Biochemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam



von

**Sandra Gromelski**

geboren am 27.05.1979 in Berlin



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Dr. habil. Gerald Brezesinski am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in der Abteilung *Grenzflächenforschung* angefertigt.



# Wechselwirkung zwischen Lipiden und DNA – Auf dem Weg zum künstlichen Virus

## *Kurzfassung*

Weltweit versuchen Wissenschaftler, künstliche Viren für den Gentransfer zu konstruieren, die nicht reproduktionsfähig sind. Diese sollen die Vorteile der natürlichen Viren besitzen (effizienter Transport von genetischem Material), jedoch keine Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, die Immunreaktionen auslösen.

Ziel dieses Projektes ist es, einen künstlichen Viruspartikel herzustellen, dessen Basis eine Polyelektrolytenhohlkugel bildet, die mit einer Lipiddoppelschicht bedeckt ist. Um intakte Doppelschichten zu erzeugen, muss die Wechselwirkung zwischen Lipid und Polyelektrolyt (z.B. DNA) verstanden und optimiert werden. Dazu ist es notwendig, die strukturelle Grundlage der Interaktion aufzuklären. Positiv geladene Lipide gehen zwar starke Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA ein, sie wirken jedoch toxisch auf biologische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die durch zweiwertige Kationen vermittelte Kopplung von genomischer oder Plasmid-DNA an zwitterionische oder negativ geladene Phospholipide an zwei Modellsystemen untersucht.

### **1. Modellsystem: Lipidmonoschicht an der Wasser/Luft-Grenzfläche**

Methoden: Filmwaagentchnik in Kombination mit IR-Spektroskopie (IRRAS), Röntgenreflexion (XR), Röntgendiffraktion (GIXD), Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM), Röntgenfluoreszenz (XRF) und Oberflächenpotentialmessungen

Resultate:

- Die Anwesenheit der zweiwertigen Kationen  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  in der Subphase hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Struktur der zwitterionischen DMPE- (1,2-Dimyristoyl-phosphatidyl-ethanolamin) Monoschicht.
- In der Subphase gelöste DNA adsorbiert nur in Gegenwart dieser Kationen an der DMPE-Monoschicht.
- Sowohl die Adsorption genomischer Kalbsthymus-DNA als auch der Plasmid-DNA pGL3 bewirkt eine Reduktion des Neigungswinkels der Alkylketten, die auf einen veränderten Platzbedarf der Kopfgruppe zurückzuführen ist. Durch die Umorientierung der Kopfgruppe wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Stickstoffatomen der Lipidkopfgruppen und den negativ geladenen DNA-Phosphaten erhöht.
- Die adsorbierte DNA weist eine geordnete Struktur auf, wenn sie durch Barium-, Magnesium-, Calcium- oder Manganionen komplexiert ist. Der Abstand zwischen parallelen DNA-Strängen hängt dabei von der Größe der DNA-Fragmente sowie von der Art des Kations ab. Die größten Abstände ergeben sich mit Bariumionen, gefolgt von Magnesium- und Calciumionen. Die kleinsten DNA-Abstände werden durch Komplexierung mit Manganionen erhalten. Diese Ionenreihenfolge stellt sich sowohl für genomische DNA als auch für Plasmid-DNA ein.
- Die DNA-Abstände werden durch die Kompression des Lipidfilms nicht beeinflusst. Zwischen der Lipidmonoschicht und der adsorbierten DNA besteht demnach nur eine schwache Wechselwirkung. Offensichtlich befindet sich die durch zweiwertige Kationen komplexierte DNA als weitgehend eigenständige Schicht unter dem Lipidfilm.

## 2. Modellsystem: Lipiddoppelschicht an der fest/flüssig-Grenzfläche

Methoden: Neutronenreflexion (NR) und Quarzmikrowaage (QCM-D)

Resultate:

- Das zwitterionische Phospholipid DMPC (1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin) bildet keine Lipiddoppelschicht auf planaren Polyelektrolytmultischichten aus, deren letzte Lage das positiv geladene PAH (Polyallylamin) ist.
- Hingegen bildet DMPC auf dem negativ geladenen PSS (Polystyrolsulfonat) eine Doppelschicht aus, die jedoch Defekte aufweist.
- Eine Adsorption von genomischer Kalbsthymus-DNA auf dieser Lipidschicht findet nur in Gegenwart von Calciumionen statt. Andere zweiwertige Kationen wurden nicht untersucht.
- Das negativ geladene Phospholipid DLPA (1,2-Dilauryl-phosphatidsäure) bildet auf dem positiv geladenen PAH eine Lipiddoppelschicht aus, die Defekte aufweist.
- DNA adsorbiert ebenfalls erst in Anwesenheit von Calciumionen in der Lösung an die DLPA-Schicht.
- Durch die Zugabe von EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) werden die Calciumionen dem DLPA/DNA-Komplex entzogen, wodurch dieser dissoziiert. Demnach ist die calciuminduzierte Bildung dieser Komplexe reversibel.

# Interaction between lipids and DNA – On the way to the artificial virus

## *Abstract*

All over the world scientists are trying to engineer artificial viruses, which do not replicate, for gene delivery. These artificial viruses should have the advantages of natural viruses such as efficient transport of genetic material, but they should not carry antigens, which cause immune reactions, on their top portion.

The aim of this project is to develop an artificial virus particle that is based on a polyelectrolyte hollow capsule which is covered by a lipid bilayer. To create intact bilayers, it is crucial to understand and optimize the interaction between lipids and polyelectrolytes (e. g. DNA). Therefore the structural basis of that interaction must be elucidated. Positively charged lipids interact strongly with the negatively charged DNA but they cause toxic reactions in biological cells. Hence the present work used two model systems to study the coupling of genomic or plasmid DNA to zwitterionic or negatively charged phospholipids induced by divalent cations.

### **1. Model system: Lipid monolayer at the air/water-interface**

Methods: *Langmuir* filmbalance in combination with IR-spectroscopy (IRRAS), X-ray reflectometry (XR), X-ray diffraction (GIXD), *Brewster* angle microscopy (BAM), X-ray fluorescence (XRF), and surface potential measurements

Results:

- The presence of the divalent cations  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  in the subphase has no traceable influence on the structure of a zwitterionic DMPE (1,2-dimyristoyl-phosphatidyl-ethanolamine) monolayer.
- DNA which is dissolved in the subphase adsorbs to the DMPE-monolayer only if divalent cations are present.
- The adsorption of genomic calf thymus DNA as well as of the plasmid DNA pGL3 causes a reduction of the tilt angle of the lipid alkyl chains. The tilt reduction can be ascribed to a change in the space required by the lipid head group. This change in head group orientation increases the electrostatic interaction between the positively charged nitrogen atoms in the lipid head and the negatively charged DNA phosphates.
- The adsorbed DNA exhibits an ordered structure if it is complexed by barium, magnesium, calcium or manganese ions. The spacing between parallel DNA strands depends on the size of the DNA fragments as well as on the kind of cation. The largest DNA-spacings are observed with barium ions, followed by magnesium and calcium ions. DNA-complexation with manganese ions causes the smallest spacings. This order of ions is observed for both genomic and plasmid DNA.
- Compression of the monolayer does not influence the DNA spacings. Thus the interaction between the lipid monolayer and adsorbed DNA is only weak. The DNA must exist as a more or less separate layer under the lipid film.

## **2. Model system: Lipid bilayer at the solid/fluid-interface**

Methods: Neutron reflectometry (NR), and Quartz crystal microbalance (QCM-D)

Results:

- The zwitterionic phospholipid DMPC (1,2-dimyristoyl phosphatidylcholine) does not form lipid bilayers on top of planar polyelectrolyte multilayers covered with the positively charged PAH (polyallylamine).
- In contrast, DMPC forms a lipid bilayer with defects on top of the negatively charged PSS (polystyrolsulfonate) terminated polyelectrolyte cushion.
- Genomic calf thymus DNA adsorbs only to the DMPC layer in presence of calcium ions. Different ions were not examined.
- The negatively charged phospholipid DLPA (1,2-dilauryl-phosphatidic acid) also forms a lipid bilayer with defects on top of the PAH-terminated cushion.
- The DNA adsorbs also to the DLPA layer only in the presence of calcium ions in the solution.
- By addition of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) the calcium cations are removed from the DLPA/DNA-complex and the complex dissociates. Thus the calcium induced formation of that complex is reversible.

*Meiner Familie*

## Inhalt

<b>Abkürzungen.....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>12</b>
<b>2 Grundlagen.....</b>	<b>14</b>
2.1 Nichtviraler Gentransfer – Wozu? .....	14
2.1.1 Gentransfer mittels viraler Vektoren.....	14
2.1.2 Gentransfer mittels nichtviraler Vektoren.....	15
2.1.3 Barrieren des nichtviralen Gentransfers.....	16
2.1.4 Anforderungen an nichtvirale Vektoren.....	18
2.2 Phospholipide und DNA.....	20
2.2.1 Phospholipide.....	20
2.2.2 DNA.....	23
<b>3 Methoden .....</b>	<b>24</b>
3.1 Filmwaagentechnik.....	24
3.2 Messung des Oberflächenpotentials .....	25
3.3 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM).....	26
3.4 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) .....	27
3.5 Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD) .....	31
3.6 Röntgenreflexion (XR).....	34
3.7 Röntgenfluoreszenz (XRF).....	35
3.8 Neutronenreflexion (NR).....	36
3.9 Quarzmikrowaage (QCM).....	37
3.10 Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	39
<b>4 Präparation.....</b>	<b>41</b>
4.1 Präparation von zirkulärer Plasmid-DNA.....	41
4.2 <i>Layer-by-Layer</i> -Technik.....	42
4.3 Präparation kleiner unilamellarer Lipidvesikel.....	43
<b>5 Ergebnisse Teil I: Untersuchung der Struktur von Komplexen aus DNA, zweiwertigen Kationen und zwitterionischen Lipiden an der Wasser/Luft-Grenzfläche .....</b>	<b>44</b>
5.1 Komplexe mit genomischer DNA .....	45
5.1.1 $\pi/A$ – Isothermen .....	45
5.1.2 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS).....	46
5.1.3 Röntgenreflexion (XR) .....	51
5.1.4 Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD).....	52
5.1.5 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM).....	58
5.1.6 $V/A$ -Isothermen .....	60
5.1.7 Röntgenfluoreszenz (XRF) .....	61
5.2 Komplexe mit Plasmid-DNA.....	63
5.2.1 $\pi/A$ - Isothermen.....	63
5.2.2 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS).....	64
5.2.3 Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD).....	66

5.2.4 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM).....	68
5.3 Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (Teil I).....	70
5.4 Diskussion .....	72
5.4.1 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die DMPE-Monoschicht .....	73
5.4.2 Komplexierung der DNA durch zweiwertige Kationen.....	74
5.4.3 Vergleichende Betrachtung von genomischer DNA und Plasmid-DNA .....	76
5.5 Zusammenfassung und Modell (Teil I).....	82
<b>6 Ergebnisse Teil II: Aufbau von Multischichten aus PAH, PSS, DNA und zwitterionischen oder negativen Lipiden .....</b>	<b>84</b>
6.1 Multischichten mit DMPC.....	85
6.1.1 Neutronenreflexion (NR).....	85
6.1.2 Quarzmikrowaage (QCM-D).....	87
6.2 Multischichten mit negativ geladenen Lipiden.....	89
6.2.1 Neutronenreflexion (NR).....	89
6.2.2 Quarzmikrowaage (QCM-D).....	91
6.3 Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse .....	93
6.4 Diskussion .....	94
6.4.1 Messungen der Neutronenreflexion .....	94
6.4.2 QCM-D-Messungen.....	96
6.5 Zusammenfassung (Teil II).....	100
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>8 Ausblick .....</b>	<b>102</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>103</b>
9.1 XR - Tabellen .....	103
9.2 GIXD – Tabellen .....	104
9.2.1 DMPE auf genomischer DNA .....	104
9.2.2 DMPE/ DMG (7:1) auf genomischer DNA .....	107
9.2.3 DMPE auf pGL3 .....	108
9.3 NR - Tabellen .....	110
9.4 QCM-D - Tabellen.....	111
9.5 Materialien.....	112
<b>10 Literatur.....</b>	<b>113</b>
10.1 Literaturquellen.....	113
10.2 Eigene Veröffentlichungen.....	117
<b>Danksagung.....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungen

### Theorie

$A$	molekulare Fläche	$LC$	flüssig-kondensierte Phase
$A_0$	GIXD: Querschnittsfläche einer Lipidkette	$LE$	flüssig-expandierte Phase
$A_F$	zur Verfügung stehende Fläche	$\lambda$	Wellenlänge
$A_{xy}$	GIXD: projizierte Fläche pro Lipidkette	$m$	Masse
$A_S$	IRRAS: asymmetrisch	$\mu$	Dipolmoment
$\alpha_i$	GIXD: Einfallswinkel	$\mu$	IRRAS: reduzierte Masse der Atome
$\alpha_c$	GIXD: kritischer Winkel der totalen externen Reflexion	$\mu$	QCM: Schermodul
$C$	kondensierte Phase	$n$	Brechungsindex
$C$	Plattenkondensator: Kapazität	$N$	Zahl der gespreiteten Moleküle
$d$	GIXD: Verzerrung der Einheitszelle	$\nu$	IRRAS: Streckschwinkung
$d$	NR: Schichtdicke	$P$	Dipoldichte
$d_{DNA}$	GIXD: interaxialer DNA-Abstand	$\Psi$	GIXD: Neigungsazimut des Moleküls
$d_{hk}$	GIXD: Netzebenenabstände	$\pi$	Kreiskonstante
$d_q$	QCM: Dicke des Quarzes	$\pi$	Oberflächen- oder Lateraldruck
$D$	Diffusionskoeffizient	$\pi_c$	Übergangsdruck der Hauptphasenumwandlung (erste Ordnung)
$\delta$	IRRAS: Deformationsschwingung	$\pi_s$	Übergangsdruck der Phasenumwandlung zweiter Ordnung
$\Delta$	GIXD: intrinsische Halbwertsbreite	$Q$	GIXD: Streuvektor
$E$	elektrisches Feld	$Q_{xy}$	GIXD: horizontale Komponente des Streuvektors $Q$
$\varepsilon$	dielektrische Konstante	$Q_z$	GIXD: vertikale Komponente des Streuvektors $Q$
$\varepsilon_0$	dielektrische Konstante im Vakuum	$r_p$	Reflektivität für p-polarisiertes Licht
$f$	Frequenz	$r_s$	Reflektivität für s-polarisiertes Licht
$FWHM$	GIXD: Halbwertsbreite	$R$	Reflektivität
$\eta$	Viskosität		Radius
$G$	Gasphase	$R_F$	<i>Fresnel</i> -Reflektivität
$\gamma$	Oberflächenspannung	$\rho$	Dichte
$\gamma$	GIXD: Winkel zwischen den Seiten a und b in der Einheitszelle	$\rho$	NR: Streulängendichte
$h$	GIXD: Miller-Index	$s$	IRRAS: symmetrisch
$H$	molekulare Phasenumwandlungsenthalpie	$S$	molekulare Phasenumwandlungsentropie
$I$	Stromstärke	$\sigma$	NR: Rauigkeit zwischen Polyelektrolyt und Lipid
$\varphi_B$	Brewsterwinkel	$t$	GIXD: Neigungswinkel der Lipidketten
$k$	Schwingungskonstante	$T$	Temperatur
$k$	GIXD: Miller-Index		
$k$	DLS: Streuvektor		

$T_m$	Phasenumwandlungstemperatur
$\tau$	DLS: Korrelationszeit
$\Theta$	NR: Einfallswinkel
$\xi$	GIXD: Positionskorrelation
$V$	Oberflächenpotential

**Methoden/Präparation**

AD	Analog/ digital
BAM	Brewsterwinkel-Mikroskopie
DA	Digital/ analog
DLS	Dynamische Lichtstreuung
GIXD	Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskope
<i>LbL</i>	<i>Layer-by-Layer</i>
NR	Neutronenreflexion
QCM	Quarzmikrowaage
XR	Röntgenreflexion

**Substanzen**

DLPA	1,2-Dilauryl-phosphatidsäure
------	------------------------------

DMG	1,2-Dimyristoyl-glycerol
DMPC	1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin
DMPE	1,2-Dimyristoyl-phosphatidyl-ethanolamin
DNA	Deoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PAH	Polyallylamin
PEI	Polyethylenimin
PSS	Polystyrolsulfonat

**Sonstige**

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
Fa.	Firma
$L_\alpha$	flüssig-kristalline Phase
$L_\beta$	Gelphase
PE	Polyelektrolyt
u. ä.	und ähnlich(e)
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Weltweit versuchen Wissenschaftler, effiziente Gentransfersysteme für die Gentherapie zu entwickeln.<sup>1-3</sup> Das Ziel dieser Therapie ist es, Gene zielgerichtet in das Erbgut des Patienten einzubringen und nicht bzw. schlecht funktionierende Gene zu ersetzen. Eine weitere therapeutische Anwendung ist beispielsweise die sequenzspezifische Regulation zur Verringerung von Genexpression und / oder anschließender Proteinbiosynthese. Die Insertion von Genen durch Transportsysteme auf Virenbasis stellt den größten Anteil in den bisher durchgeführten Studien dar.<sup>4</sup> Allerdings steht ihre hohe Effizienz in der Genexpression, den potentiellen Gesundheitsgefahren wie Immunreaktionen oder Toxizität gegenüber. Aus diesem Grund hat sich eine zweite Klasse von Gentransportsystemen entwickelt, die auf der Verwendung von nichtviralen Vektoren beruht.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Volkswagen-Projektes *Biocomposite Capsules as Artificial Viruses* angefertigt. Ziel dieses Projektes ist es, durch supramolekulare Assemblierung ein künstliches Virus herzustellen. Dieses System biologischer Zusammensetzung soll die Vorteile der viralen Vektoren bezüglich des Gentransfers aufweisen, aber die Viruspathogenität nicht mehr besitzen. Dazu wird zuerst eine Polyelektrolytkapsel durch sukzessive Beschichtung eines löslichen Templates mit gegensätzlich geladenen Polyelektrolyten (*Layer-by-Layer assembly*, LbL) gewonnen.<sup>5-7</sup> Diese Kapsel wird anschließend mit einer Lipidschicht belegt, in die virale Membrankomponenten integriert werden. Zu diesem Zweck werden die biophysikalischen Grundlagen der Wechselwirkung der Polyelektrolytmatrix mit der Lipidmembran auf molekularer Ebene untersucht.

Langmuir-Monoschichten von geladenen oder zwitterionischen Lipiden, an denen (entgegengesetzt) geladene Polyelektrolyte koppeln können, stellen ein Modellsystem dar, mit dem man die Grenzfläche zwischen Amphiphil und Polymer untersuchen kann.<sup>8</sup> Bei der sogenannten Filmwaagentechnik können Molekül- und Ladungsdichten beider Komponenten sowie die ionische Umgebung sehr definiert verändert werden (vgl. Abschnitt 3, Methoden). Um strukturelle Informationen über Lipide bzw. Polyelektrolyte zu erhalten, kann diese Technik mit anderen Methoden kombiniert werden. Dazu gehören Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (*grazing incidence X-ray diffraction*, GIXD), Röntgenreflektivität, Brewsterwinkel-Mikroskopie oder Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (*infrared reflection absorption spectroscopy*, IRRAS). Diese Methoden, wurden bei dieser Arbeit verwendet. Neben der Kopplung negativ geladener Phospholipiden an positiv geladene Polyelektrolyte<sup>9</sup> wurde auch die Interaktion positiv geladener Lipiden mit negativ geladenen Polyelektrolyten wie DNA, untersucht<sup>10-13</sup>. Komplexe bestehend aus kationischen Lipiden und DNA (*Lipoplexe*)<sup>14</sup> stellen das in klinischen Studien am zweithäufigsten angewandte nichtvirale Vektorsystem dar.<sup>4</sup> Rädler

*et al.* untersuchten Komplexe aus dem kationischen Lipid DOTAP (1,2-Dioleoyl-trimethylammoniumpropan) und  $\lambda$ -DNA mittels Kleinwinkelstreuung (*small angle X-ray diffraction, SAXS*) und optischer Mikroskopie.<sup>15</sup> Sie fanden alternierende DOTAP/DNA-Schichten. An Monoschichtexperimenten mittels Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall wurde festgestellt, dass genomische Kalbsthymus-DNA in geordneten Strukturen an das kationische Lipid TODAB (Trioctadecyl-methylammoniumbromid) adsorbiert.<sup>10</sup> Die Kompression der Monoschicht bewirkte eine Verringerung des interaxialen DNA-Abstandes von 49 Å auf 32 Å. Diese Experimente zeigen, dass kationische Lipide sehr leicht stabile Komplexe mit der DNA bilden. Es stellte sich allerdings heraus, dass Komplexe dieser Art immunotoxische Reaktionen hervorrufen, die viel stärker sind, als bei Verabreichung der DNA bzw. des kationischen Lipids allein.<sup>16,17</sup>

Komplexe aus neutralen Lipiden und Polyelektrolyten stellen eine Alternative dar. Huster *et al.* zeigten, dass es eine calciumvermittelte Wechselwirkung zwischen dem zwitterionischen Phospholipid DMPC (1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin) und dem negativ geladenen Polyelektrolyt Dextransulfat gibt.<sup>18,19</sup> De Meijere *et al.* untersuchten das zwitterionische Phospholipid DPPE (1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin) und seine calciumvermittelte Wechselwirkung mit Dextransulfat an der Wasser/Luft-Grenzfläche mittels Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall und Ellipsometrie.<sup>20</sup> Die Kopplung hatte eine Kondensation der Monoschicht zur Folge, begleitet von einer Erniedrigung des Neigungswinkels der Alkylketten und des Phasenumwandlungsdrucks. Auch DNA kann mit zwitterionischen Lipiden in Wechselwirkung treten - allerdings nur, wenn diese durch zweiwertige Kationen vermittelt wird.<sup>21,22</sup> McLoughlin *et al.* stellten fest, dass die Wechselwirkung zwischen DNA und neutraler Phospholipidmonoschicht ionenspezifisch ist: die Anwesenheit von Calciumionen führt zu einer stärkeren Wechselwirkung als die von Magnesium- oder Bariumionen.<sup>23</sup> Die flüssig-kondensierten Domänen nehmen eine elongierte Form in Anwesenheit von DNA und Calcium an.

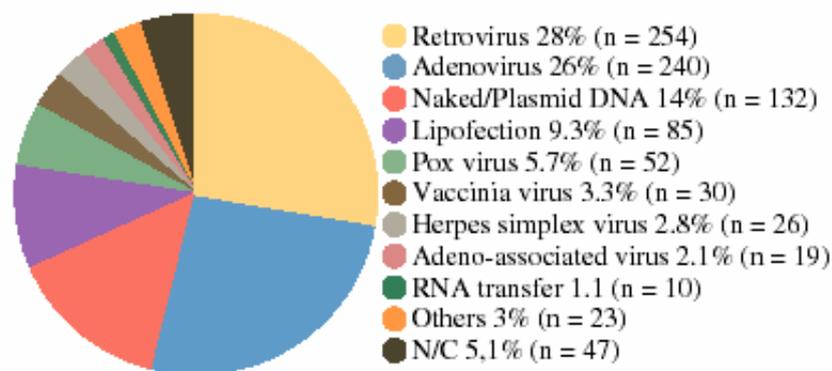
Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die strukturelle Grundlage der Wechselwirkung zwischen zwitterionischen Lipiden (Phosphatidylethanolamin und -cholin) und Polyelektrolyten (v. a. DNA) und den Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Interaktion zu untersuchen. Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Wechselwirkung zwischen DMPE (1,2-Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin) und genomischer Kalbsthymus-DNA bzw. zirkulärer Plasmid-DNA an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Die DNA adsorbiert aus der Subphase an die DMPE-Monoschicht unter Anwesenheit von zweiwertigen Kationen. Mit Hilfe von Druck/Flächen-Isothermen in Kombination mit Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM), Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS), Röntgenreflexion (XR), wie auch Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD) wird die grundlegende Struktur des Lipid/DNA-Komplexes untersucht.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Nichtviraler Gentransfer – Wozu?

#### 2.1.1 Gentransfer mittels viraler Vektoren

Natürliche Viren sind Parasiten. Sie bringen ihre Erbinformationen in Wirtszellen ein und rufen dort deren Genexpression hervor.<sup>1,2,24</sup> Ziel vieler Forschungsprojekte ist es, natürliche Viren so zu verändern, dass sie ihrem normalen Replikationsmechanismus nicht mehr folgen können und somit zum Werkzeug der Wissenschaft gemacht werden. Virale Vektoren mit verändertem genetischem Code haben beispielsweise eine große Bedeutung bei der Vorbeugung oder Behandlung von Infektionskrankheiten, Krebs oder Herzkrankheiten. Adenoviren und Retroviren sind noch immer die bedeutendsten Werkzeuge in Laborversuchen und klinischen Studien<sup>1,3,4</sup>, da sie sehr gut für den Gentransfer geeignet sind. Sie sind darauf spezialisiert, nur spezifische Gewebe zu befallen, dringen in Zellen ein und manipulieren anschließend den Zellapparat so, dass er virale Proteine herstellt. Leider können sie nur ein- bis zweimal in einen Patienten injiziert werden, bevor die Immunantwort, die sie hervorrufen, zur Gefahr wird. Im Jahr 1999 verlor Jesse Gelsinger, ein Jugendlicher, der als Freiwilliger an einer klinischen Gentherapie-Studie an der Universität von Pennsylvania in Philadelphia teilnahm, dadurch sein Leben.<sup>4</sup> Außerdem kann die Immunantwort den viralen Vektor oder die infizierte Zelle zerstören und somit die Produktion des Zielproteins verhindern.



**Abbildung 1:** Vektoren für die Gentherapie in klinischen Studien von 1989 bis 2004 (n = Anzahl der klinischen Versuche).<sup>4</sup>

Abbildung 1 zeigt die prozentuale Verteilung der in klinischen Studien verwendeten viralen und nichtviralen Vektoren im Zeitraum von 1989 bis 2004.<sup>4</sup> In über 70 % aller Studien wurden virale Vektoren verwendet. Retrovirale Vektoren waren die ersten, die in der Gentherapie eingesetzt wurden. Sie sind noch immer die am häufigsten verwendeten Vektoren (28 %). Sie haben eine relativ begrenzte Größkapazität, um therapeutische Gene aufzunehmen. Allerdings infizieren sie sich teilende Zellen mit hoher Effizienz. Da sie sich in das Chromosom der Zielzelle integrieren, ermöglichen Retroviren einen stabilen Gentransfer. Darin liegt aber zugleich ihr großer Nachteil: Es besteht das Risiko einer insertionalen Mutagenese aufgrund von willkürlicher Integration des retroviralen Genoms in das Wirtsgenom.

Adenoviren stellen den zweitstärksten Vertreter der natürlichen Viren dar (26 %). Sie können größere Mengen DNA aufnehmen als Retroviren, allerdings ist ihre Kapazität noch immer zu klein, um den Anforderungen der Gentherapie zu genügen. Der größte Vorteil von adenoviralen Vektoren liegt in ihrer hohen Transduktionseffizienz und dem hohen Grad an Genexpression, obwohl diese transient auftritt und daher relativ schnell abklingt. Außerdem sind Adenoviren in der Lage, sich nicht teilende Zellen zu infizieren. Allerdings gibt es auch hier große Bedenken, da sie eine starke Immunantwort und Entzündungsreaktionen auslösen, was im oben erwähnten Fall von Jesse Gelsinger zu dessen Tod führte.

### 2.1.2 Gentransfer mittels nichtviralen Vektoren

Die Limitierungen viraler Vektoren, insbesondere ihre relativ kleine Kapazität für therapeutische DNA, ihr Hervorrufen starker Immunantworten und ihre signifikante Toxizität führten zur Entwicklung synthetischer Vektoren, die nicht auf viralen Systemen basieren. Ein Viertel der klinischen Studien wurde mit nichtviralen Gentransfermethoden durchgeführt.<sup>4</sup> Diese haben u. a. den Vorteil, dass ihre molekulare Zusammensetzung kontrollierbar ist, dass sie leichter herzustellen und zu analysieren sind und dass sie flexibel in der Größe der zu transportierenden Gene sind.<sup>25,26</sup> Die meisten nichtviralen Vektoren werden vom Immunsystem nicht erkannt. Allerdings sind sie beim Transport von Genen in Zellen bei Weitem nicht so effizient wie künstliche Viren, und die Gene, die eingeschleust werden, bleiben nicht lange aktiv. Immunogenität ist zwar noch immer vorhanden, jedoch wesentlich geringer als bei viralen Vektoren.<sup>27-30</sup>

Abbildung 1 zeigt, dass die Verwendung von „nackter“ DNA die einfachste und am häufigsten verwendete Methode des nichtviralen Gentransfers ist.<sup>4</sup> Die DNA wird direkt ins jeweilige Gewebe, zumeist Muskelgewebe, injiziert und ermöglicht eine starke Genexpression, die jedoch wesentlich geringer ist, als bei viralen Vektoren. Diese Methode ist limitiert durch die schnelle Degradation der DNA durch Nucleasen im

Serum.<sup>31</sup> Die einfache Anwendung dieses Systems hat dennoch dafür gesorgt, dass es mit 14 % das meist benutzte nichtvirale System bei den klinischen Studien ist.<sup>4</sup>

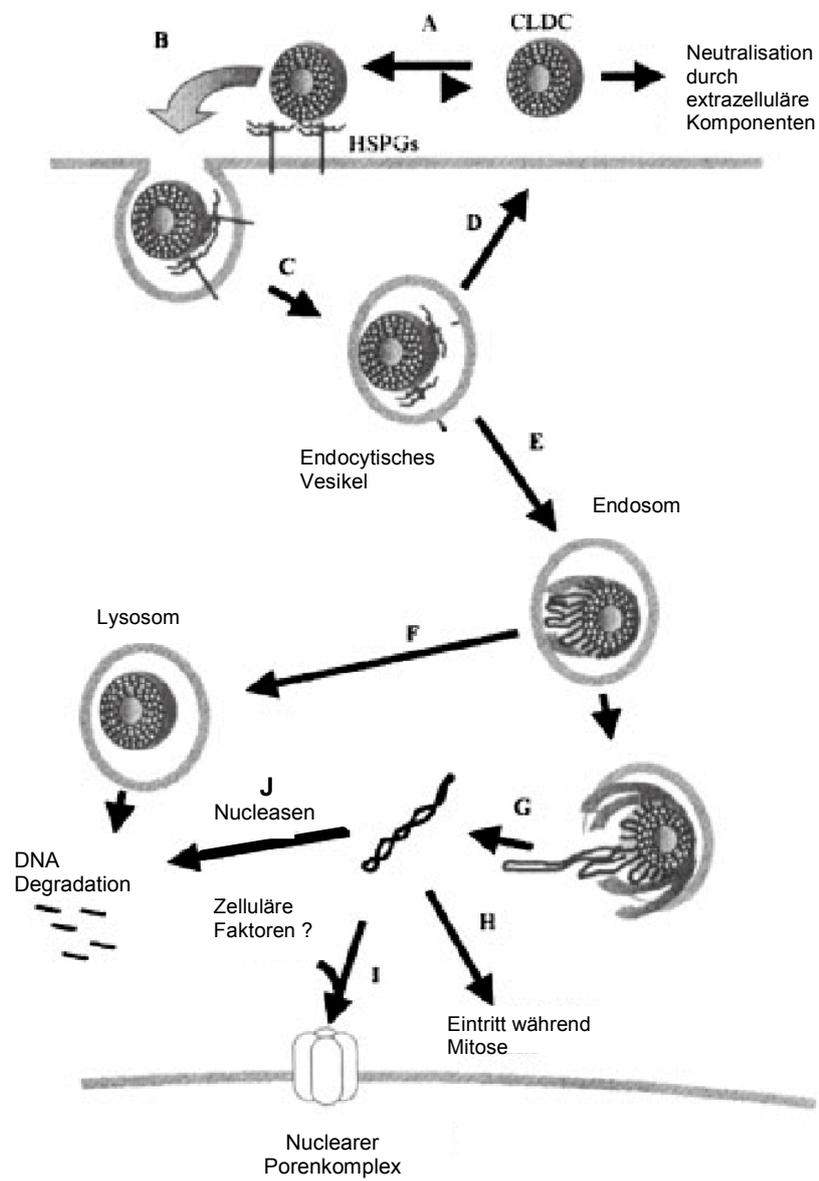
Einen Durchbruch erzielten Felgner *et al.* mit ihrer Methode *Lipofection*.<sup>14</sup> Hierbei verwendeten sie kleine unilamellare Liposomen, die eine 1:1 (mol/mol) Mischung aus DOTMA (Dioleyl-Trimethylammoniumchlorid), einem positiv geladenen Lipid und dem zwitterionischen Helferlipid DOPE (Dioleoyl-phosphatidylethanolamin) enthielten, und mit DNA spontan Lipid/DNA-Komplexe (*Lipoplexe*) formten. Die positive Ladung hilft diesem Konstrukt, mit der Zellmembran zu fusionieren und Gene in die Zellen zu transportieren. *Lipofection* ist mit 9,3 % das am zweithäufigsten angewendete nichtvirale Vektorsystem.<sup>4</sup> Andere Wissenschaftler komplexierten DNA mit verschiedenen Kombinationen aus Polymeren<sup>32-34</sup> oder Lipiden<sup>35-37</sup>, um Gene in bestimmte Gewebe zu schleusen.

Weiterhin wurden physikalische Methoden entwickelt die den Gentransfer unterstützen sollen.<sup>38</sup> Mit Hilfe der Elektroporation soll die Penetration von DNA in die Zellen erleichtert werden.<sup>39</sup> Dafür werden mit Hilfe von elektrischen Impulsen kleine Poren in der Membran erzeugt, durch die die DNA in die Zelle eindringen kann. Bei der *gene gun*-Methode werden kleine Goldpartikel, mit DNA beschichtet und unter hohem Druck mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellen geschossen.<sup>40</sup> Jedoch ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass solche schroffen physikalischen Methoden für klinische Studien in großem Umfang akzeptabel sind.<sup>3</sup>

Viele Krankheiten können bisher noch nicht durch nichtviralen Gentransfer behandelt werden, da die meisten dieser Methoden nur einen geringen Prozentsatz aktiver Gene übertragen und ihre Wirkung nur für kurze Zeit anhält.<sup>1</sup> Daher wird versucht, die Vektoren so zu optimieren, dass sie in mehr Zellen des Zielgewebes eindringen können und einen längeren Aufenthalt der Gene in den Zellen ermöglichen. Diese Maßnahmen sollen zu einer höheren Proteinproduktion über einen längeren Zeitraum beitragen.

### 2.1.3 Barrieren des nichtviralen Gentransfers

Die Ineffizienz von nichtviralen Gentransfersystemen ist in erster Linie das Ergebnis der Vielzahl an Barrieren, welche die Vektoren auf dem Weg zum Nucleus zu überwinden haben. Hierzu gehören die physikalische und chemische Stabilität der DNA und ihres Transportsystems im extrazellulären Raum, die zelluläre Aufnahme durch Endozytose, das Entkommen der DNA aus dem Endosom vor dem Übergang zum Lysosom, der Transport im Cytosol und das Eindringen des Plasmids in den Zellkern, um die Transkription zu ermöglichen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Barrieren des nichtviralen Gentransfers am Beispiel eines cationic lipid/DNA complex (CLDC).<sup>2</sup>

Abbildung 2 verdeutlicht diese Barrieren schematisch.<sup>2</sup> A) Nach dem Einbringen des Komplexes in die extrazelluläre Umgebung binden die CLDCs (*cationic lipid/DNA complex*) an die Proteoglycane (*heparin sulfate proteoglycan*, HSPG) an der Zelloberfläche. B) Die Neutralisation des Komplexes durch Polyanionen wie Glycosaminoglycane und Proteine in der extrazellulären Umgebung könnten die Bindung an die Zelloberfläche stark beeinflussen. Nach der Adhäsion an der Oberfläche wird der Komplex über Endocytose ins Zellinnere aufgenommen. C) Es bilden sich endocytische Vesikel. D) In diesem Stadium kann der Komplex entweder zurück an die Zelloberfläche transportiert werden oder E) das Vesikel fusioniert mit einem Endosom wobei der pH-Wert von 6 auf 5,5 erniedrigt wird. F) Um einen effektiven Gentransfer zu ermöglichen, muss die DNA aus dem Endosom entkommen. Andernfalls wird der Komplex zum Lysosom transportiert, wo die DNA bei pH 5 durch saure Hydrolasen endgültig degradiert wird. G) Diese Freisetzung der DNA soll möglich werden, indem sich die kationischen Lipide aus dem Lipid/DNA-Komplex mit den anionischen Lipiden der endosomalen Membran vermischen. Auch die Interaktion kationischer Polymere mit der endosomalen Membran könnte diese zerstören. Der genaue Zeitpunkt, zu dem dies geschieht, ist allerdings noch nicht bekannt. Ist die DNA im Cytosol, muß sie sich im perinuclearen Raum aufhalten, um die Auflösung der Kernmembran abzuwarten (H). Sonst wird die DNA aktiv oder passiv durch die Kernporen transportiert (I). J) Verbleibt die DNA allerdings im Cytosol, ist sie der Degradation durch Nucleasen ausgesetzt. Kationische Polymere könnten diesen Schritt unterbinden, da die Assoziation des Polymers mit der DNA im Cytosol den Zugang der Nucleasen zur DNA sterisch behindert. Zu den aufgezählten, physikalischen und chemischen Hindernissen kommen zusätzlich die biologischen Barrieren wie Immunantworten auf den Vektor selbst.<sup>28,41</sup>

#### 2.1.4 Anforderungen an nichtvirale Vektoren

Unter den in den letzten Jahren untersuchten Methoden des nichtviralen Gentransfers haben sich zwei Systeme als besonders interessant herausgestellt: auf Polymeren basierende Systeme<sup>32-34</sup> und auf Lipiden basierende Systeme<sup>35-37,42-55</sup>. Da sich diese Arbeit mit der Wechselwirkung zwischen Lipiden und DNA beschäftigt, werden in den weiteren Ausführungen die Anforderungen an lipidbasierte Transportsysteme in den Mittelpunkt gestellt. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Arten auf Lipiden basierender Systeme untersucht: anionische Liposomen<sup>42,43</sup>; anionische, pH-sensitive Liposomen<sup>42,44</sup>; PEG-stabilisierte, pH sensitive Liposomen<sup>45,46</sup>; kationische, pH-sensitive Liposomen<sup>47,48</sup>; lipidbeschichtete kationische Liposomen<sup>49,50</sup>; stabilisierte Plasmid/Lipid-Partikel<sup>51,52</sup>; DNA enthaltende, mit PEG verknüpfte Immunoliposomen<sup>52,53</sup> oder künstliche virusähnliche Partikel<sup>54,55</sup>.

In Abschnitt 2.1.3 wurde gezeigt, welche Hindernisse nichtvirale Vektorsysteme überwinden müssen, um einen effektiven Gentransfer zu gewährleisten. Daraus kann man allgemeine Anforderungen, die an das ideale Vektorsystem gestellt werden, ableiten: chemische und physikalische Stabilität des Vektors während der Zirkulation im Blut, Vermeidung der Wechselwirkung von Nucleinsäuren mit Blutbestandteilen, um DNA-Degradation sowie Verringerung der Toxizität, Zellspezifität als auch Sicherstellung, dass die DNA ihren Wirkungsort erreichen kann.<sup>3,42</sup> Um letzteres zu erreichen, können Liganden eingesetzt werden, die kovalent an das Liposom gebunden sind. Mögliche Liganden sind beispielsweise derivatisiertes Albumin<sup>56,57</sup>, Folatrezeptoren<sup>58</sup>, Transferrinrezeptoren<sup>52</sup>, Lactoferrin<sup>59,60</sup>, Antikörper<sup>52,61</sup> oder Antikörperfragmente<sup>62</sup> sein.

Wird ein Vektor mittels rezeptorvermittelter Endocytose in die Zelle aufgenommen, gilt es sicherzustellen, dass die DNA aus dem Endosom befreit wird. Es gibt zwei grundlegende Prinzipien, nach denen diese Freisetzung ablaufen könnte:

1) Eine Destabilisierung der endosomalen Membran führt zur Fusion zwischen Lipiden aus dem DNA/Lipid-Komplex und der negativ geladenen endosomalen Membran und damit zum Freisetzen der DNA. Diese Destabilisierung kann beispielsweise durch säurelabile Lipide<sup>63</sup>, Lipide, die hexagonale Strukturen bevorzugen<sup>64</sup> (z. B. Phosphatidylethanolamine) oder kationische Lipide<sup>65</sup> erreicht werden.

2) Die osmotische Zerstörung des Endosoms mit Hilfe von protonenfangenden Polykationen (*proton sponge mechanism*) kann die Freisetzung der DNA aus dem Endosom bewirken<sup>66,67</sup>. Die Aminogruppen der Polykationen werden protoniert, da die ATP-abhängigen Protonenpumpen in der endosomalen Membran Protonen ins Endosom pumpen. Um die Elektroneutralität im endosomalen Kompartiment zu erhalten, wird die Anreicherung mit Protonen vom Einströmen der Chloridionen begleitet. Dies führt zum osmotischen Anschwellen des Endosoms und anschließend zum Platzen der endosomalen Membran.

Bis jetzt ist unklar, ob die freigewordene Plasmid-DNA den Nucleus durch Diffusion oder mit Hilfe eines (Vesikel-) Transportmechanismus erreicht. Vor allem ein Grund spricht dafür, dass nur ein geringer Teil der DNA-Moleküle nach der Dissoziation des Lipidkomplexes in der Nucleus eindringt: Die Nucleasen des Cytoplasmas können die Polynucleotide degradieren.<sup>68,69</sup> Durch Komplexierung der DNA mit Polykationen wie PEI (Polyethylenimin) kann dieser Abbau der DNA verhindert werden.<sup>69</sup>

Andererseits scheint der Transport der DNA vom Cytosol über die nucleare Membran in den Nucleus eines der Haupthindernisse zu sein. Die direkte Injektion von Plasmid-DNA in den Nucleus von sich nicht teilenden Zellen hat Genexpression gezeigt. Für DNA die ins Cytosol injiziert wurde traf das nicht zu.<sup>70</sup> Andere Experimente haben ergeben, dass die Transfektion in proliferierenden Zellen effektiver ist als in nicht proliferierenden Zellen.<sup>71</sup> Um vom Cytoplasma in den Nucleus transportiert zu werden, erfordern Moleküle, die größer als 30 kDa sind (auch Proteine und Plasmid-DNA), einen aktiven Transport durch die Kernporen. Dazu sind sie auf spezifische Signalsequenzen, die Kernlokalisierungssequenzen angewiesen.<sup>72</sup>

Zusammenfassend können folgende Anforderungen an nichtvirale Gentransfersysteme formuliert werden:<sup>3</sup>

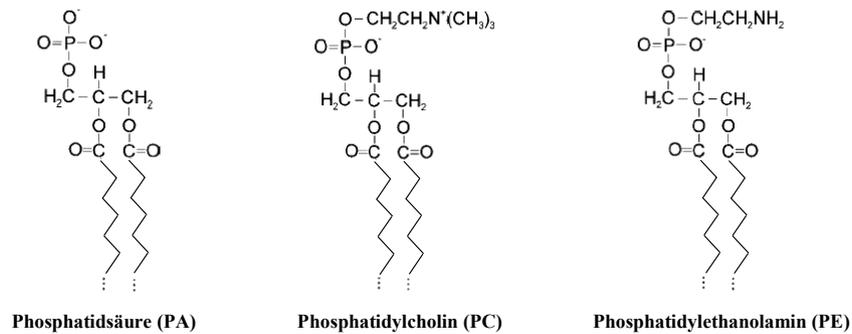
- Kondensation der DNA (Schutz vor Degradation durch Nucleasen)
- Neutrale und kationische Lipide oder kationische Polymere
- Verknüpfung mit PEG für die Serumstabilität und lange Zirkulationszeiten
- Auf die Zielstruktur (Zielzelle) gerichtete Liganden
- Eine destabilisierende Einheit für eine schnelle endosomale DNA-Freisetzung
- Eine Kernlokalisierungssequenz, die an das Polynucleotid gebunden ist

## 2.2 Phospholipide und DNA

### 2.2.1 Phospholipide

Als Lipide bezeichnet man die große Gruppe der Substanzen biologischen Ursprungs, die sich in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton, Chloroform und Benzol gut lösen. In Wasser sind sie nicht oder nur schlecht löslich. In biologischen Membranen finden sich verschiedene Arten von Lipiden: Phospholipide, Cholesterol und Glycolipide. Phospholipide wie Phosphatidylcholin, Phosphatidyl-ethanolamin, Phosphatidylserin als auch Phosphatidylinositol und Sphingophospholipide wie Sphingomyelin bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Ihr gemeinsames Merkmal ist eine Phosphatgruppe, aufgrund derer die Phospholipide bei pH 7 mindestens eine negative Ladung tragen. Glycerophospholipide sind Derivate der Phosphatidsäuren, bei denen Glycerin mit zwei Fettsäuren über eine Esterbindung in *sn1*- und *sn2*-Position und ein polarer Alkohol über eine Phosphodiesterbindung in *sn3*-Position verknüpft sind. Abbildung 3 zeigt die chemische Struktur einiger Phospholipide. Die häufigste natürliche Anordnung dieser Lipide ist die Lipiddoppelschicht. Trotz der relativ starken Ordnung solcher Doppelschichtschichten bilden die Lipide keine starren Strukturen, sondern liegen bei physiologischen Bedingungen in einem flüssig-kristallinen

Zustand vor. Innerhalb der Lipiddoppelschicht können die Lipidmoleküle durch Rotation, Translation oder *flip flop*-Bewegungen ihre Position ändern. Die elektrostatischen, sterischen und polaren Eigenschaften der Phospholipide bedingen die physikalisch-chemischen Parameter einer Membran.



**Abbildung 3:** Chemische Struktur einiger Phospholipide.

Lipidmonoschichten sind stark vereinfachte Modellsysteme für Zellmembranen. Untersuchungen der thermodynamischen Eigenschaften von Lipidmonoschichten geben Aufschluss über das Phasenverhalten quasi-zweidimensionaler Systeme.<sup>73,74</sup> Phasenübergänge in Langmuir-Monoschichten können durch isotherme Messungen des Oberflächendrucks  $\pi$  in Abhängigkeit von der molekularen Fläche  $A$  untersucht werden. Abbildung 4 zeigt eine allgemeine  $\pi/A$ -Isotherme einer Langmuir-Monoschicht eines Lipids. Bei sehr großen Flächen pro Molekül weist die Monoschicht eine sehr geringe Lipiddichte auf und kann als ein zweidimensionales Gas (G) beschrieben werden. Mit abnehmender Fläche pro Molekül steigt der Oberflächendruck und die Monoschicht durchläuft die flüssig-expandierte (*liquid-expanded*, LE) Phase, in der keine Fernordnung der Alkylketten vorliegt. Weitere Kompression der Monoschicht führt zu einer Phasenumwandlung der flüssig-expandierten Phase zur flüssig-kondensierten (*liquid-condensed*, LC) Phase, in der die Alkylketten geordnet und geneigt sind. An die LC-Phase schließt sich die feste (*condensed*, C) Phase an, in der die Ketten ungeneigt sind. Diese Phasen müssen jedoch nicht durchlaufen werden. Die C-Phase kann sich beispielweise direkt an die LE-Phase anschließen ohne ein ausgeprägtes Phasenkoexistenzgebiet zu durchlaufen.

Die G/LE- und LE/LC- Koexistenzgebiete weisen im  $\pi/A$ -Diagramm ein (fast) horizontales Plateau auf, was auf Phasenübergänge erster Ordnung hinweist. Der LE/LC-Übergang wird als Hauptphasenumwandlung bezeichnet. Der entsprechende Übergangsdruck  $\pi_c$  steigt mit Erhöhung der Temperatur, zunehmender Ladung der Kopfgruppe und abnehmender Länge der Alkylketten.

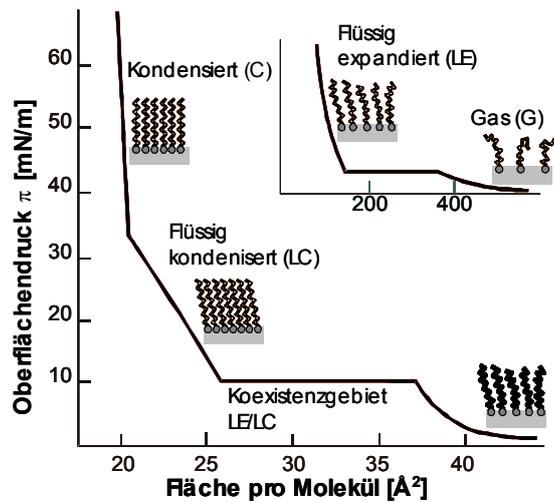


Abbildung 4: Allgemeine  $\pi/A$ -Isotherme eines Phospholipids.

Wie in einem dreidimensionalen System kann man auch aus einem zweidimensionalen System Informationen über thermodynamische Parameter ableiten, die eine Phasenumwandlung erster Ordnung charakterisieren. Die modifizierte *Clausius-Clapeyron*-Gleichung beschreibt die Temperaturabhängigkeit des Phasenumwandlungsdrucks  $\pi_c$ .<sup>74,75</sup> Sie verknüpft die Entropiedifferenz pro Molekül  $\Delta S$  und die Phasenumwandlungsenthalpie  $\Delta H = T \cdot \Delta S$  zwischen zwei koexistierenden Phasen während einer Phasenumwandlung erster Ordnung mit der Flächenänderung pro Molekül  $\Delta A$ :

$$\Delta S = \frac{d\pi_c}{dT} \cdot \Delta A \quad \text{Gleichung 1}$$

Um Änderungen der Entropie und der Enthalpie in Bezug auf die Hauptphasenumwandlung bestimmen zu können, ermittelt man den Phasenumwandlungsdruck  $\pi_c$ , wie auch die Flächenänderung pro Molekül während der Umwandlung als Funktion der Temperatur. Durch Extrapolation von  $\Delta H$  auf  $\Delta H = 0$  kJ/mol kann eine kritische Temperatur berechnet werden. Oberhalb dieser Temperatur kollabiert der Monofilms direkt aus der expandierten Form, d. h., der kondensierte Zustand kann durch Kompression nicht mehr erreicht werden.

Phasenübergänge zwischen verschiedenen LC-Phasen oder von der LC- zur C-Phase sind meist höherer Ordnung ( $\pi_s$ ). Eine weitere Kompression führt zu einem irreversiblen Kollaps der Monoschicht und zur Bildung von Multischichten.

### 2.2.2 DNA

Die Deoxyribonucleinsäure (DNS oder DNA) ist ein sehr langer, fadenförmiger, anionischer Polyelektrolyt, in dem Nucleotide aufeinanderfolgend durch Phosphodiesterbindungen verknüpft sind. Ein Nucleotid besteht aus einer Pentose, einem Phosphatrest sowie einer Stickstoffbase und hat ein Monomergewicht von ca. 335 g/mol. In der DNA kommen die vier Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) vor. Die DNA-Doppelhelix besteht aus zwei Polydeoxynucleotid-Molekülen. Jede Base eines Strangs ist mit einer komplementären Base im anderen Strang über zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft (A=T und G≡C). Die in der Zelle vorherrschende Konformation der DNA ist die B-Form. Die sogenannte B-DNA ist zu einer rechtsgängigen Doppelhelix gewunden. Der Anstieg pro Basenpaar beträgt 0,34 nm, und eine Helixwindung enthält 10,5 Basenpaare (bp). Der Durchmesser der B-DNA misst 2 nm.

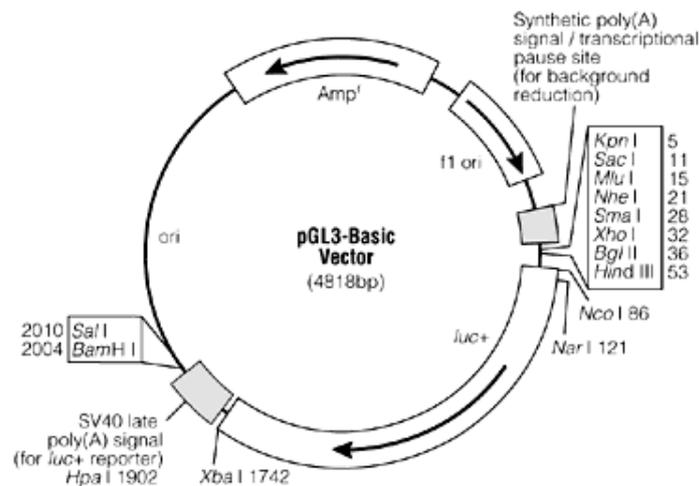


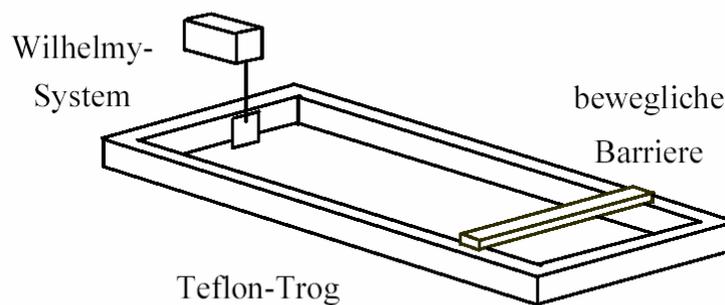
Abbildung 5: Vektorkarte des Plasmids pGL3.

Um die Grundlagen der DNA/Lipid-Wechselwirkung zu verstehen, wurden die Experimente in erster Linie mit genomischer Kalbsthymus-DNA, die in der B-Form vorliegt, durchgeführt. Dazu wurde die kommerziell erworbene DNA und NaCl in Millipore-Wasser gelöst und über Nacht im Kühlschrank gerührt. Für die Anwendung in der Gentherapie spielt allerdings ringförmige Plasmid-DNA die entscheidende Rolle. Zu diesem Zweck wurde das ca. 4,8 kb große Modell-Plasmid pGL3 (vgl. Abbildung 5) präpariert und in seinem ringförmigen Zustand in den Versuchen eingesetzt. Abschnitt 4.1 erläutert die Präparation der Plasmid-DNA aus dem *E. coli* – Stamm TG1.

### 3 Methoden

#### 3.1 Filmwaagentechnik

Die eingesetzten Lipide sind amphiphile, wasserunlösliche Moleküle. An der Wasser/Luft-Grenzfläche setzen sie die Oberflächenspannung des Wassers (72,75 mN/m bei 20 °C) herab, wodurch freie Energie gewonnen wird. Dieser Energiegewinn sowie die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den hydrophilen Kopfgruppen der Lipide und den polaren Wassermolekülen führen dazu, dass Lipide monomolekulare Filme (Monoschichten) an der Wasser/Luft-Grenzfläche bilden. Alle hier verwendeten Methoden zur Untersuchung von Lipidstrukturen an dieser Grenzfläche basieren auf der Verwendung der *Langmuir*-Filmwaage. Abbildung 6 zeigt die schematische Darstellung einer Filmwaage mit dem *Wilhelmy*-Messsystem.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung einer Filmwaage mit Wilhelmy-Messsystem.

Der laterale Oberflächendruck  $\pi$  einer Einzelschicht hängt von der Flächendichte, der Temperatur und den intrinsischen Eigenschaften der filmbildenden Substanz ab. Er ergibt sich aus der Differenz der Oberflächenspannungen  $\gamma$  von reinem Wasser und jener von der Wasser/Lipid-Monoschicht:

$$\pi = \gamma_{\text{Wasser}} - \gamma_{\text{Monoschicht}}$$

**Gleichung 2**

Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgt mit Hilfe der *Wilhelmy*-Methode. Hierbei wird die Kraft gemessen, mit der eine vollständig benetzbare Platte in die Subphase gezogen wird. Das *Wilhelmy*-Plättchen besteht aus Filterpapier und hängt senkrecht in der wässrigen Subphase. Diese befindet sich in einem temperierten Trog, der mit Teflon (hydrophob) überzogen ist. Eine definierte Menge des in organischem

Lösungsmittels (meist ein Gemisch aus Chloroform und Methanol) gelösten Lipids wird mit einer Hamilton-Spritze vorsichtig, Tropfen für Tropfen auf der flüssigen Subphase gespreitet. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels sind die wasserunlöslichen Lipide auf der Subphase verteilt. Hierbei zeigen die hydrophilen Köpfe der Lipide ins Wasser, während die hydrophoben Schwänze das Medium Luft bevorzugen. Der molekulare Flächenbedarf  $A_m$  kann aus der Zahl der gespreiteten Moleküle  $N$  und der zur Verfügung stehenden Fläche  $A_F$  errechnet werden:  $A_m = A_F / N$ . Durch Kompression der Monoschicht mittels beweglicher Teflonbarrieren kann die zur Verfügung stehende Gesamtfläche verringert und damit die Lipiddichte erhöht werden. Eine Verringerung der Fläche führt daher zur Erhöhung des lateralen Oberflächendruckes  $\pi$ . Die resultierende Druck/Fläche- ( $\pi/A$ -) Isotherme gibt Aufschluss über das Phasenverhalten des Lipids und die Fläche, die ein Lipidmolekül bei unter einem bestimmten Druck und gegebener Temperatur beansprucht.

Die elektronische Steuerung der Filmwaage und die Datenaufnahme erfolgen über ein Steuergerät mit AD/DA-Wandlern (Analog/Digital-/Digital/Analog-Wandler), das an einen PC angeschlossen ist. Über die Position der Barriere wird die Fläche pro Molekül und der laterale Druck über den Spannungswert des *Wilhelmy*-Kraftmesssystems ermittelt.

### 3.2 Messung des Oberflächenpotentials

Die Anwesenheit einer Monoschicht ändert das elektrische Potential der Wasser/Luft-Grenzfläche. Die Potentialdifferenz  $\Delta V$  bezogen auf die freie Wasseroberfläche wird auch als Oberflächen- oder Grenzflächenpotential bezeichnet. Das Oberflächenpotential einer ungeladenen Monoschicht ist abhängig von der Dipoldichte  $p$  senkrecht zur Oberfläche und von der relativen dielektrischen Konstante  $\varepsilon$  ( $\varepsilon_0 = 8,9 \cdot 10^{-12} \text{ C Nm}^{-2}$ ):<sup>76</sup>

$$\Delta V = \frac{p}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0} \quad \text{Gleichung 3}$$

Durch Messung von  $\Delta V$  kann man das Dipolmoment  $\mu$  pro Molekül ableiten:

$$\mu = p \cdot A \quad \text{Gleichung 4}$$

Hierbei ist  $A$  die Fläche pro Molekül. Es wird vorausgesetzt, dass  $\varepsilon$  bekannt ist, was allerdings ein Problem darstellt:  $\varepsilon$  verringert sich beim Übergang von Wasser zu Luft von 80 auf 1 und kann daher an der Grenzfläche stark variieren. D. h., das Dipolmoment  $\mu$  hängt stark von der lokalen Umgebung der polaren Gruppen der amphiphilen Moleküle ab. So muss z. B. berücksichtigt werden, dass ihr Einfluss auf Wassermoleküle deren

Beitrag zum Oberflächenpotential verändern kann. Aus diesem Grund ist eine quantitative Auswertung der Oberflächenpotentialmessungen sehr problematisch.

Das Oberflächenpotential wird mit einem Schwingkondensator gemessen.<sup>75</sup> Eine der Elektroden ist eine in der Luft schwingende Platte. Die Gegenelektrode ist die Subphase, deren Potential durch eine Platinplatte fixiert wird. Die mechanische Schwingung verursacht eine periodische Änderung der Kapazität ( $C = C_0 + C_1 \cdot \sin \omega t$ ). Dadurch fließt ein Wechselstrom ( $I = V \cdot dC/dt$ ), der mit Hilfe einer Kompensationsspannung auf Null abgeglichen wird. Aus der benötigten Kompensationsspannung wird das Oberflächenpotential bestimmt, aus dem man ein effektives Dipolmoment errechnen kann.

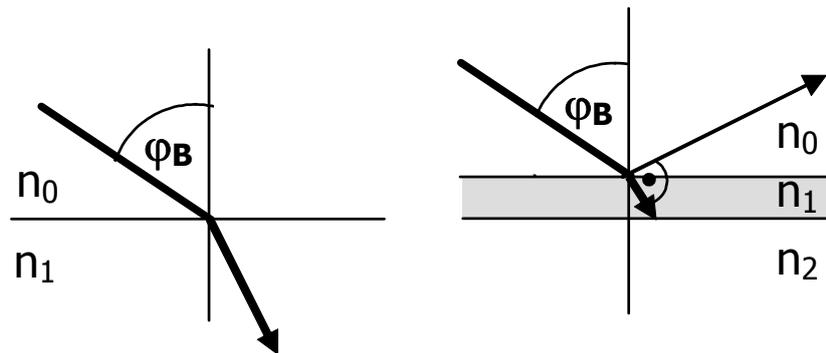
### 3.3 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM)

David Brewster erkannte 1815, dass beim Auftreffen einer Lichtwelle auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices, eine Polarisationsrichtung des Lichts unter einem bestimmten Winkel nicht reflektiert wird.<sup>77</sup> Entsprechend wird dieser Winkel Brewsterwinkel genannt. Untersucht man die Reflektivitäten für s-polarisiertes Licht  $r_s$  (senkrecht zur Einfallsebene) und p-polarisiertes Licht  $r_p$  (parallel zur Einfallsebene) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel  $\varphi$ , stellt man fest, dass  $r_s$  stets verschieden von Null bleibt, während  $r_p$  bei einem bestimmten Winkel eine Nullstelle besitzt. Dieser Brewsterwinkel  $\varphi_B$  ist charakteristisch für das untersuchte System und kann mit Hilfe von Brewsters Gesetz ermittelt werden:

$$\tan \varphi_B = \frac{n_1}{n_0} \quad \text{Gleichung 5}$$

Wie in Abbildung 7 (links) dargestellt, ist  $n_0$  der Brechungsindex des optisch dünneren Mediums (z. B. Luft) und  $n_1$  der des optisch dichteren Mediums (z. B. Wasser). Es gilt:  $n_0 < n_1$ . Der Brewsterwinkel für die Luft/Wasser-Grenzfläche beträgt  $53,1^\circ$ . In Gegenwart eines dünnen Films wie einer Lipidmonoschicht mit dem Brechungsindex  $n_1$  wird Licht reflektiert (vgl. Abbildung 7, rechts). Reflektivitätsunterschiede ergeben sich aus dem gegenüber Wasser verschiedenen Brechungsindex, Unterschieden in der Schichtdicke und durch optische Anisotropie der Monoschicht.

Brewsterwinkel-Mikroskopie (*Brewster angle microscopy*, BAM) wurde an der *Université Henry Poincaré Nancy 1* (Nancy, Frankreich) in der Gruppe von Prof. Ewa Rogalska durchgeführt. Die Morphologie des Lipidfilms wurde mittels einer PC-gesteuerten KSV 2000 Filmwaage in Kombination mit einem Brewsterwinkel-Mikroskop (Optrel BAM 300 von KSV, Helsinki, Finnland) untersucht.



**Abbildung 7 (links):** keine Reflexion von p-polarisiertem Licht an der Wasser/Luft-Grenzfläche beim Brewsterwinkel. **(rechts):** Lipidmonoschicht führt zu einer messbaren Reflexion.

Ein p-polarisierter Lichtstrahl, erzeugt von einem 10 mW HeNe-Laser (633 nm), wird unter dem Brewsterwinkel auf eine reine Wasseroberfläche eingestrahlt, sodass die von der Wasseroberfläche reflektierte Intensität nahezu Null ist. Ein schwarzes Bild erscheint auf dem Monitor.

Nach dem Spreiten des Lipids wird eine  $\pi/A$ -Isotherme aufgenommen und gleichzeitig die Morphologie der Monoschicht untersucht, um die Bilder mit dem jeweiligen Oberflächendruck bzw. der molekularen Fläche korrelieren zu können. Während der Kompression werden erst im Koexistenzgebiet von LE- und LC-Phase helle Domänen sichtbar. Diese kondensierten Bereiche (LC) der Lipidmonoschicht bewirken eine Veränderung des Brechungsindex an der Grenzfläche, wodurch bei dem eingestellten Brewsterwinkel der auftreffende Laserstrahl reflektiert wird. Der reflektierte Strahl wird mit einer CCD-Kamera digital detektiert ( $400 \times 300 \mu\text{m}^2$ ). Die Form, Größe und Anzahl dieser Domänen hängt stark von den individuellen Eigenschaften der Moleküle ab, aber auch von der Geschwindigkeit der Kompression, der Temperatur oder der Anwesenheit weiterer Moleküle an der Grenzfläche wie beispielsweise Cholesterol, Proteine oder DNA.<sup>74</sup>

### 3.4 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

#### *IR-Spektroskopie*

Das Prinzip der Infrarot- (IR) Spektroskopie beruht auf der Bestrahlung von Molekülen mit elektromagnetischen Wellen des mittleren Infrarot-Bereichs ( $\lambda = 2,5 \mu\text{m}$  bis  $50 \mu\text{m}$ ). Charakteristische Frequenzen des infraroten Lichts können bestimmte Teile der Moleküle zu Schwingungen oder Rotationen anregen. Die detektierten Schwingungsfrequenzen sind daher empfindlich für Konformation und Orientierung von Lipiden, Proteinen,

Peptiden oder DNA. Ist die chemische Struktur der untersuchten Moleküle bekannt, können aus kleinen Verschiebungen der Absorptionsbanden Rückschlüsse über intra- und intermolekulare Wechselwirkungen sowie deren Umgebung gezogen werden.

Beim Auftreffen auf die Probe wird aus dem IR-Spektrum die Wellenlänge absorbiert, die die richtige Energie hat, um einen Schwingungsübergang im Molekül anzuregen. Dies ist genau dann der Fall, wenn die Frequenz der infraroten Strahlung  $\nu_{IR}$  gleich der Eigenfrequenz  $\nu_0$  des molekularen Oszillators ist. Die Eigenfrequenz ergibt sich aus

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

**Gleichung 6**

mit der reduzierten Masse der gegeneinander schwingenden Atome  $\mu$  und der Kraftkonstante der Schwingung  $k$ , die die Stärke der beteiligten Bindungen widerspiegelt. Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und einem Molekül kann jedoch nur auftreten, wenn im Molekül bewegte elektrische Ladung zur Verfügung steht. Das ist immer dann der Fall, wenn das Molekül entweder ein veränderbares oder ein induzierbares Dipolmoment aufweist (IR-aktiv). In Molekülen mit Schwingungen, die symmetrisch zum Symmetriezentrum liegen, treten keine Änderungen des Dipolmoments auf (IR-inaktiv). Daher liefern polare Moleküle intensive Rotationsübergänge. Wird linear polarisiertes Licht eingestrahlt, so ist die Absorption maximal, wenn Polarisationsrichtung und Richtung der Dipolmomentänderung übereinstimmen.

Die möglichen Molekülschwingungen werden in verschiedene Klassen unterteilt: die Streckerschwingungen  $\nu$  (*stretching vibration*), bei denen sich die Bindungslängen ändern und die Deformationsschwingungen  $\delta$  (*scissoring*), bei denen sich die Bindungswinkel ändern, wobei die Bindungslängen annähernd konstant bleiben. Je nachdem, ob die Molekülsymmetrie erhalten bleibt, unterscheidet man zwischen symmetrischen (s) und asymmetrischen (as) Schwingungen. In Tabelle 1 sind die charakteristischen IR-Banden von Phospholipiden und DNA aufgelistet.

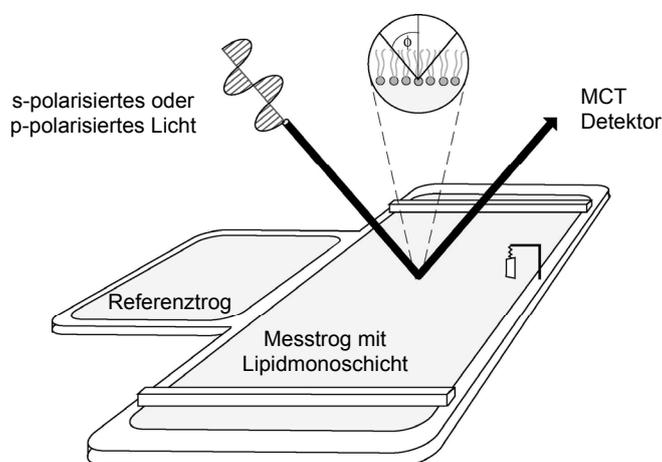
Das aufgenommene Absorptionsspektrum ist sehr spezifisch für die chemische Struktur der Moleküle an der Grenzfläche. Stärkere chemische Bindungen und Atome kleinerer Masse verursachen im IR-Spektrum Absorptionsmaxima bei großen Wellenzahlen (hohe Energie), große Massen hingegen verursachen IR Absorptionsmaxima bei kleinen Wellenzahlen (niedrige Energie). Die Energie ist proportional zum Quadrat des permanenten Dipolmomentes.

Tabelle 1: Frequenzen charakteristischer IR-Banden von Phospholipiden und DNA.<sup>78-82</sup>

Symbol	Wellenzahl (cm <sup>-1</sup> )	Anmerkung	
<b>Frequenzen charakteristischer IR-Banden von Phospholipiden</b>			
<b>Kettenbereich</b>	$\nu_{as}$ (CH <sub>3</sub> )	2956	
	$\nu_s$ (CH <sub>2</sub> )	2854	flüssige Phase ( <i>gauche</i> -Konformation)
	$\nu_s$ (CH <sub>2</sub> )	2849	kondensierte Phase ( <i>all-trans</i> -Konformation)
	$\nu_{as}$ (CH <sub>2</sub> )	2924	flüssige Phase ( <i>gauche</i> -Konformation)
	$\nu_{as}$ (CH <sub>2</sub> )	2919	kondensierte Phase ( <i>all-trans</i> -Konformation)
	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )	1462, 1474	orthorombische Packung (Duplett)
	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )	1468	hexagonale oder trikline Packung
<b>Kopfgruppenbereich</b>	$\nu$ (C=O)	1723-1728	Frequenzen empfindlich für Wasserstoffbrückenbindung und Hydratation
	$\nu$ (C=O)	1740-1742	
	$\delta$ (HOH)	1645	
	$\nu_s$ (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1085-1090	Frequenz empfindlich Hydratation
	$\nu_{as}$ (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1205-1240	Frequenzen empfindlich für Ionenbindung, Hydratation und Wasserstoffbrückenbindung (Dehydratation: Verschiebung zu höheren Wellenzahlen)
	$\nu_{as}$ (PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	1074-1086	
	$\nu_s$ (CO-O-C)	1085	
	$\nu_{as}$ (CO-O-C)	1170	
	$\nu$ (CO-O-PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1070	
	$\nu_{as}$ (C-N <sup>+</sup> -C)	970	
<b>Frequenzen charakteristischer IR-Banden von DNA (B-Form)</b>			
$\nu_{as}$ (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1220-1250		
$\nu$ (DNA)	970	DNA-Rückgrat	
$\nu$ (AT-bp)	938	AT-Basenpaare in B-Form-Helices	

### **IRRAS - IR-Spektroskopie and der Wasser/Luft-Grenzfläche**

Die Kombination von Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (*infrared reflection absorption spectroscopy*, IRRAS) mit der Filmwaagentechnik ermöglicht die direkte Korrelation von molekularen Strukturen mit Phasenumwandlungen oder molekularen Flächen der  $\pi/A$ -Isothermen. So ist z. B. die im Verlauf der Kompression eines Lipidfilms gemessene Frequenzabnahme der konformationsempfindlichen Methylenstretschwingungen direkt mit einer Zunahme der Ordnung in den Kohlenwasserstoffketten der Lipide verbunden.<sup>81</sup> Weiterhin kann die Adsorption von Biomolekülen wie DNA an der Lipidschicht detektiert werden.<sup>83</sup> Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung der IRRAS-Messeinheit.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung einer IRRAS-Messeinheit (Abbildung von K. Wagner).

Die IRRAS-Spektren wurden mit Hilfe eines IFS 66 FT-IR Spektrometers (Bruker, Deutschland) aufgenommen. Der IR-Strahl durchläuft einen Thalliumbromid und -iodid gemischten *crystal wiregrid*-Polarisator (KRS-5 Graseby Specac Ltd., Orpington, Kent, UK) und tritt als s-polarisiertes oder p-polarisiertes Licht unter einem bestimmten Winkel auf die Wasser/Luft-Grenzfläche. Der reflektierte Strahl wird anschließend von einem MCT-Detektor, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird, detektiert. In den durchgeführten Experimenten wurde ein Einfallswinkel von  $40^\circ$  (d.h. kleiner als der Brewsterwinkel für eine Wasser/Luft-Grenzfläche) und s-polarisiertes Licht verwendet. Eine computergesteuerte Technik ermöglicht es, zwischen Referenz- und Messtrog zu wechseln.<sup>84</sup> Der Messtrog enthält die Probe, d.h. die Subphase mit gespreitetem Lipid, während der Referenztrog nur mit der Subphase gefüllt ist. Beide Tröge sind über kleine Kanäle miteinander verbunden. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass der Wasserstand in beiden Trögen gleich hoch ist. Um das Signal des Wasserdampfs zu eliminieren, wird das Referenzspektrum  $R_0$  vom Probenspektrum  $R$  abgezogen und man erhält das Reflexions-Absorptionsspektrum ( $-\lg(R/R_0)$  gegen Wellenzahl). Die

Messanordnung befindet sich in einem geschlossenen Container, der eine konstante Atmosphäre (Wasserdampfgehalt) während der Messung gewährleistet. Fouriertransformierte Infrarot- (FT-IR) Spektren wurden bei einer Auflösung von  $8 \text{ cm}^{-1}$  aufgenommen.

### 3.5 Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD)

Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (*grazing incidence X-ray diffraction*, GIXD) ist eine hochsensitive Methode, mit der nur geordnete Bereiche von Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche hinsichtlich ihrer Struktur untersucht werden können. Sie ermöglicht die Bestimmung von Gitterparametern, von Neigungsrichtung und Neigungswinkeln der Lipidketten wie auch Aussagen über die Positionskorrelation. Da solche Monoschichten nur sehr wenige Streuzentren aufweisen, nutzt man hochenergetische Röntgenstrahlung, die am Synchrotron erzeugt werden kann.

GIXD-Messungen wurden am Diffraktometer der Undulator-Beamline BW1<sup>85-87</sup> des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB, DESY) durchgeführt. Das Diffraktometer ist mit einem thermostatisierten Langmuir-Trog (R&K, Potsdam, Deutschland) ausgestattet. Um die Streuung der Röntgenstrahlung an den Molekülen der Luft so gering wie möglich zu halten, ist der Trog in einer mit Helium gefüllten Box eingeschlossen. Mittels eines Berylliumkristalls (002) wurde der Synchrotronstrahl auf die Wellenlänge  $1,304 \text{ \AA}$  monochromatisiert. Um die Oberflächensensitivität zu maximieren, wird der Strahl so justiert, dass er unter einem Winkel von  $\alpha_i = 0,85 \alpha_c$  auf die Wasseroberfläche trifft.  $\alpha_c$  ist der kritische Winkel der totalen externen Reflexion ( $0,13^\circ$ )<sup>88</sup>. Ist  $\alpha_i$  kleiner oder gleich dem kritischen Winkel, so wird die gebrochene Welle zu einer evaneszenten Welle, die sich entlang der Grenzfläche ausbreitet und im Medium exponentiell gedämpft wird.

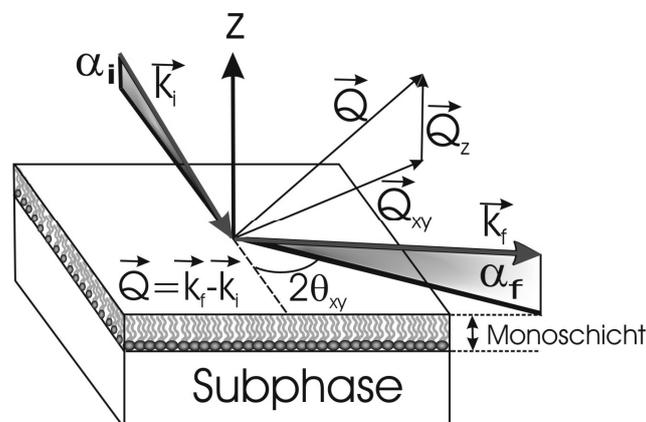


Abbildung 9: Geometrie der Röntgenbeugung unter streifendem Einfall.

Die Intensität des gebeugten Strahls wird mit Hilfe eines positionsempfindlichen Detektors (*position sensitive detector*, PSD) (OED-100-M, Braun, Garching, Deutschland) als Funktion des vertikalen Streuwinkels  $\alpha_f$  detektiert. Die Auflösung des horizontalen Beugungswinkels  $2\theta_{xy}$  wird durch einen Soller-Collimator gegeben, der sich vor dem PSD befindet, wobei  $2\theta_{xy}$  der Winkel zwischen dem einfallenden und dem gebeugten Strahl ist. Die Geometrie der Röntgenbeugung unter streifendem Einfall ist in Abbildung 9 dargestellt.

Durch Scannen von  $2\theta_{xy}$  können die horizontale (*in plane*) Komponente  $Q_{xy}$  und die vertikale (*out of plane*) Komponente  $Q_z$  des Streuvektors  $Q$  gleichzeitig bestimmt werden.

$$Q_{xy} \cong \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{2\theta_{xy}}{2} \quad \text{Gleichung 7}$$

$$Q_z \cong \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \sin \alpha_f \quad \text{Gleichung 8}$$

Bei der Modellierung der Peaks werden die Intensitätsprofile für die horizontale (*Bragg peak*) und die vertikale Komponente (*Bragg rod*) durch eine Lorentz-Funktion bzw. eine Gauss-Funktion beschrieben. Aus der Position des *Bragg peak* können die Netzebenenabstände  $d_{hk}$  ( $h$  und  $k$  sind die Millerschen Indices) über die *Bragg*-Gleichung bestimmt werden:

$$d_{hk} = \frac{2\pi}{Q_{xy}^{hk}} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad \text{Gleichung 9}$$

Daraus können wiederum die Gitterparameter  $a$ ,  $b$ ,  $\gamma$  und die Fläche der Einheitszelle  $A_{xy}$  errechnet werden:

$$A_{xy} = ab \cdot \sin \gamma \quad \text{Gleichung 10}$$

Die Halbwertsbreite der Diffraktionspeaks (*full width at half maximum*, FWHM) gibt Informationen über die Positionskorrelation  $\xi$  und kann über die Scherrer-Formel<sup>85,86,89</sup> bestimmt werden:

$$\xi = \frac{0,88 \cdot 2\pi}{\Delta} \quad \text{Gleichung 11}$$

$\Delta$  ist die intrinsische Halbwertsbreite:

$$\Delta = \sqrt{\Delta_{peak}^2 - \Delta_{det}^2}$$

Gleichung 12

Die gemessene Halbwertsbreite  $\Delta_{peak}$  muss mit der Detektorlinienbreite  $\Delta_{det} = 0,008 \text{ \AA}^{-1}$  korrigiert werden.

Amphiphile Moleküle können nur in einer begrenzten Anzahl von Kristallgittern gepackt sein. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die möglichen Kristallgitter, deren Merkmale und die Berechnungen des Neigungswinkels.

**Tabelle 2:** Merkmale der Kristallgitter von Amphiphilen (contour plot = Höhenliniendiagramm der Intensität als Funktion der horizontalen und der vertikalen Streuvektorkomponenten  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ ,  $n$  = nicht degenerierter Peak,  $d$  = degenerierter Peak, Neigung NN / NNN = Lipidketten neigen sich in Richtung des nächsten, bzw. übernächsten Nachbarn, Verzerrung = Verzerrung der Einheitszelle,  $\Psi_{hk}$  = Neigungsazimuth zwischen Neigungsrichtung und dem korrespondierenden reziproken Gittervektor).

Gitter	Hexagonal	Rechtwinklig (rectangular)	Schiefwinklig (oblique)
Gitterparameter	$a = b, \gamma = 120^\circ$	$a \neq b, \gamma \neq 120^\circ$	$a \neq b \neq c, \alpha \neq \beta \neq \gamma$

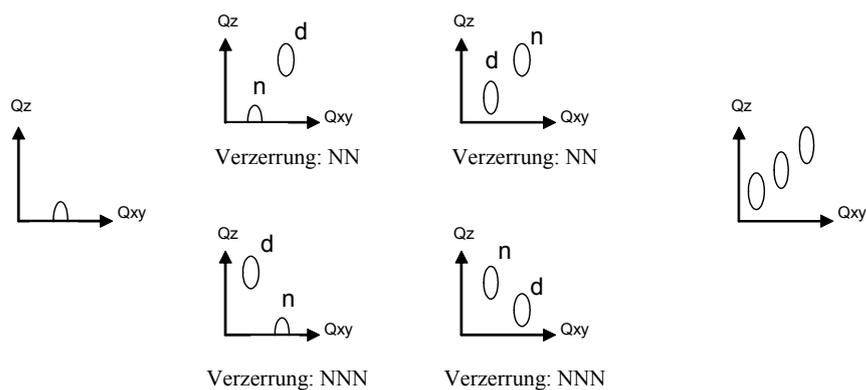
$$Q_z^n = 0$$

$$Q_z^n \neq 0$$

$$Q_z^n : Q_z^d = 2:1$$

Neigungsrichtung: NN    Neigungsrichtung: NNN

contour plots



Berechnung  
des Neigungs-  
winkels

$$t = 0$$

$$\tan t = \frac{Q_z^d}{\sqrt{Q_{xy}^d{}^2 - (Q_{xy}^n / 2)^2}}$$

$$\tan t = \frac{Q_z^n}{Q_{xy}^n}$$

$$Q_z^{\max} = Q_{xy}^{\max} \cdot \cos \Psi_{hk} \cdot \tan(t)$$

### 3.6 Röntgenreflexion (XR)

Biologische Membranen sind im Allgemeinen stark ungeordnete Systeme. Daher sind Diffraktionsmessungen oft nicht geeignet, um biologische Systeme zu charakterisieren. Im Gegensatz zu Diffraktionsmessungen sind Reflexionsmessungen nicht an geordnete Systeme gebunden. Mittels gerichteter Röntgenreflexion (*specular X-ray reflectivity*, XR) erhält man Aussagen über die Elektronendichteverteilung  $\rho$  entlang der Oberflächennormalen  $z$ , Schichtdicken und Rauigkeiten von Grenzflächenfilmen. Die Reflektivität  $R$  kann über folgende Formel errechnet werden:

$$\frac{R(Q_z)}{R_F(Q_z)} = \left| \frac{1}{\rho_w} \int \frac{d\rho}{dz} \exp(iQ_z \cdot z) dz \right|^2 \quad \text{Gleichung 13}$$

Hierbei ist  $\rho_w$  die durchschnittliche Elektronendichte der Subphase,  $R_F(Q_z)$  ist die *Fresnel*-Reflektivität für eine perfekt scharfe Grenzfläche zwischen Luft und der Subphase und  $Q_z$  die vertikale Komponente des Streuvektors  $Q$ :

$$Q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha \quad \text{Gleichung 14}$$

mit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts  $\lambda$  (hier: 1,304 Å), und seinem Einfallswinkel  $\alpha$ .

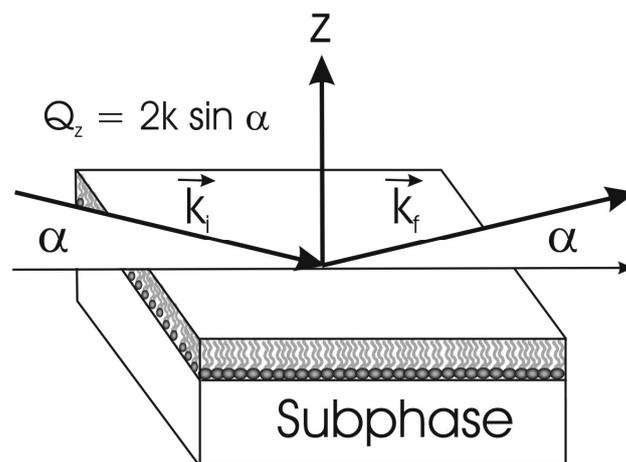


Abbildung 10: Geometrie der Röntgenreflexion.

Wie auch die GIXD-Messungen wurden die XR an der Undulator-Beamline BW1<sup>85-87</sup> des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB, DESY) durchgeführt. Die XR-Messungen wurden in der Geometrie  $\alpha_i = \alpha_f = \alpha$  aufgenommen, wobei  $\alpha_i$  und  $\alpha_f$  der

Einfallswinkel bzw. Ausfallswinkel ist (vgl. Abbildung 10). Die Reflektivität wurde als Funktion des Einfallswinkels  $\alpha_i$  ( $0,05^\circ - 5^\circ$ ) mittels eines NaI-Scintillationszählers detektiert. Die Hintergrundstreuung der Subphase wurde bei  $2\theta_{xy} = 0,7^\circ$  aufgenommen und von dem gemessenen Signal bei  $2\theta_{xy} = 0$  abgezogen. Der *footprint*-Bereich auf der Probe ist indirekt proportional zum Einfallswinkel. Eine direkte Fouriertransformation der Reflektivität in die Elektronendichteverteilung ist nicht möglich, da man das absolute Quadrat einer komplexen Zahl und nicht die Phase misst.

Ausgehend von der Reflektivitätskurve wurde unter Verwendung des Programms *Parratt*<sup>90</sup> mit einer bestimmten Anzahl veränderlicher Parameter und der  $\chi^2$ -Methode ein Elektronendichteprofil modelliert. Für die Interpretation der Daten können zwei Modelle genutzt werden, die von Schalke *et al.*<sup>91</sup> beschrieben wurden. In dieser Arbeit wurde das sogenannte Boxenmodell verwendet, welches die submolekularen Einheiten der Phospholipide als molekular homogene Boxen betrachtet.<sup>92</sup>

### 3.7 Röntgenfluoreszenz (XRF)

Die Röntgenfluoreszenz (*X-ray fluorescence*, XRF) von Atomen ist ein Effekt, welcher zur zerstörungsfreien Untersuchung von Stoffen genutzt wird. Sie ist eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der atomaren bzw. chemischen Zusammensetzung fester und flüssiger Proben.

Die Bestrahlung der Probe mit polychromatischer Röntgenstrahlung führt zur Anregung der Atome, wodurch meist kernnahe Elektronen entfernt werden. Die angeregten Zustände sind sehr kurzlebig (ca.  $10^{-14}$  s) und die Reorganisation der Elektronenhülle führt zur Emission von sekundärer Röntgenstrahlung, der Fluoreszenzstrahlung. Jedes Element in der Probe erzeugt Röntgenstrahlung mit charakteristischer Wellenlänge. Die Intensität einzelner Linien im Fluoreszenzspektrum ist proportional der Anzahl der emittierenden Atome und damit der Konzentration eines bestimmten Elementes in der Probe. Meist wird die Konzentration jedoch aus dem Vergleich mit Referenzmaterialien bekannter Zusammensetzung bestimmt

Die XRF-Messungen an der Wasser/Luft-Grenzfläche wurden an der Undulator-Beamline ID10B Troika II am ESRF in Grenoble, Frankreich von Antje Fischer durchgeführt. Ein Synchrotronstrahl wurde mittels *Bragg*-Reflexion an zwei Diamantkristallen (111) auf 12,5 keV monochromatisiert und traf die (mit der Lipidmonoschicht bedeckte) Wasseroberfläche unter einem Winkel von  $22,9^\circ$ . Senkrecht über der Schnittstelle zwischen Strahl und Grenzfläche wurde die Intensität als Funktion der Energie (in eV) durch einem energiedispersiven Silicium-Drift-Detektor (Röntec) erfasst.

### 3.8 Neutronenreflexion (NR)

Ähnlich wie die Röntgenreflexion ist auch die Neutronenreflexion (*neutron reflectometry*, NR) eine wichtige Technik, um Adsorption an Grenzflächen zu untersuchen. Sie ermöglicht es, Informationen über Struktur, Zusammensetzung, Dicke und Rauigkeit einer bis zu 500 nm dicken adsorbierten Schicht entlang der Oberflächennormalen mit einer Auflösung von bis zu 0,2 nm zu untersuchen.<sup>93,94</sup> Da Neutronen nur schwach mit den meisten Materialien in Wechselwirkung treten, ist die Durchführung von Experimenten *in situ* an der fest/flüssig-Grenzfläche möglich. Vorteilhaft ist, dass die Probe nicht beschädigt wird, selbst wenn sie sehr lange dem Neutronenstrahl ausgesetzt ist. Der Wellencharakter der Neutronen ist Ursache für die Analogie mit der klassischen Optik. Mit geringen Modifikationen folgen Neutronenwellen bei der Reflexion der Beugung und beim Interferieren den physikalischen Regeln der Optik.<sup>95,96</sup>

Analog zur Röntgenreflektivität basiert die gerichtete Neutronenreflexion auf der Änderung der spekularen Reflexion  $R$  an der Grenzfläche zwischen zwei Phasen mit  $Q_z$ , der vertikalen Komponente des Streuvektors  $Q$  (Gleichung 14). Bei der Neutronenreflexion wird der Einfallswinkel meist mit  $\theta$  bezeichnet. Die Änderung der Reflektivität hängt von der Komposition der Grenzfläche in  $z$ -Richtung ab, die durch die Streulängendichte  $\rho_z$  (*scattering length density*, SLD) charakterisiert wird:

$$\rho_z = \sum n_i b_i \quad \text{Gleichung 15}$$

Dabei ist  $n_i$  die Zahlendichte des Elements  $i$  und  $b_i$  seine Streulänge. Unterschiedliche Isotope werden durch verschiedene Werte für  $b_i$  charakterisiert. Die Verwendung von Zusammensetzungen mit unterschiedlichen Isotopen des gleichen chemischen Elements gestattet der NR, bestimmte Regionen von dünnen Filmen zu untersuchen, ohne die gesamte chemische Struktur zu stören. Wichtigste Grundlage der meisten Messungen ist der SLD-Unterschied von  $^1\text{H}$  und  $^2\text{H}$  (oder D) mit  $-0,56 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  bzw.  $+6,37 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ .

In Proben, die aus mehreren Schichten aufgebaut sind, wird der Strahl an jeder Grenzfläche reflektiert und gebrochen. Die einzelnen Reflektivitäten überlagern sich. Erfüllt die Wellenlänge dabei die *Bragg*-Bedingung (Gleichung 9), tritt konstruktive Interferenz auf. Dies führt zu Oszillationen der detektierten Reflektivität entlang von  $Q_z$ . Aus der Reflektivitätskurve kann somit die Schichtdicke  $d$  über den Abstand zwischen zwei Minima  $\Delta Q_z$  bestimmt werden:

$$d = \frac{2\pi}{\Delta Q_z} \quad \text{Gleichung 16}$$

Gleichung 14 zeigt, dass Reflektivitätsmessungen als Funktion von  $Q$  entweder durch Variation von  $\theta$  oder von  $\lambda$  erreicht werden können. An Neutronenstrahlungsquellen, die einen monochromatischen Strahl mit festgelegter Wellenlänge produzieren, wird  $\theta$  variiert. An gepulsten Neutronen-Strahlungsquellen hingegen wird einen Breitbandstrahl (weißer Strahl) von polychromatischem Licht verwendet.  $\lambda$  wird mittels der *time of flight*-Methode (TOF) bei fixiertem  $\theta$  bestimmt.

Für diese Arbeit wurden beide Varianten in einer fest/flüssig-Experimentierzelle und in der  $\theta/2\theta$ -Geometrie angewendet. Als Templat diente ein Siliciumblock, der mit Polyelektrolytmultischichten aus PSS (Polystyrensulfonat), PAH (Polyallylaminhydrochlorid) und DNA (Kalbsthymus-DNA) unter Verwendung der *layer by layer*-Technik (4.2) überzogen war. Die Messungen erfolgten in  $D_2O$ . Am Reflektometer V6<sup>97</sup> des *Hahn-Meitner*-Instituts (Berlin) wurde die Reflektivität bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 0,47$  nm über den ganzen Bereich der Einfallswinkel ( $0^\circ$  bis max.  $2^\circ$ ) gescannt. Da sich der *footprint* auf der Probe für verschiedene  $\theta$  ändert, wurden die gemessenen Reflektivitätsdaten entsprechend korrigiert. Die Messungen am Reflektometer AMOR<sup>98</sup> des *Paul-Scherrer*-Instituts (Villigen, Schweiz) wurden bei drei verschiedenen Einfallswinkeln ( $0,4^\circ$ ;  $0,9^\circ$  und  $1,5^\circ$ ) über den gesamten  $Q$ -Bereich im TOF-Modus durchgeführt. Der Hintergrund wurde direkt vom spekularen Signal abgezogen, um die korrigierte Reflektivität zu ermitteln. Die gemessenen Reflektivitätskurven wurden unter Verwendung des Programms *Parratt*<sup>90</sup> und der  $\chi^2$ -Methode mit dem Boxenmodell<sup>92</sup> gefittet. Auf Grundlage der berechneten Kurven wurde ein Streulängendichteprofil erstellt.

### 3.9 Quarzmikrowaage (QCM)

Die Quarzmikrowaage (*quartz crystal microbalance*, QCM) zählt zu den resonanten Quarzsensoren. Diese analytische Methode macht die Detektion von Grenzflächenprozessen wie z. B. die Massenabscheidung auf Oberflächen, *in situ* möglich. Die Empfindlichkeit der QCM-Technik liegt im unteren Nanogramm-Bereich und ist damit um etwa den Faktor 100 empfindlicher als verfügbare elektromechanische Waagen.

Der inverse piezoelektrische Effekt erlaubt es, Quarzkristalle durch Anlegen einer Wechselspannung mit ihrer Eigenfrequenz in Schwingung zu versetzen. Diese Schwingung breitet sich in Form einer transversalen akustischen Welle senkrecht zur Quarzoberfläche durch den Quarz hindurch aus.

Die Eigenfrequenz  $f_0$  wird durch die Dicke der Quarzscheibe und den Winkel, in dem sie aus dem Kristall herausgeschnitten wird, bestimmt. Sie berechnet sich über:

$$f_0 = \frac{1}{2d_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}}$$

Gleichung 17

Dabei ist  $d_q$  die Dicke des Quarzes,  $\rho_q$  die Dichte des Quarzmaterials ( $2,648 \text{ g/cm}^3$ ) und  $\mu_q$  sein Schermodul ( $2,947 \cdot 10^{11} \text{ g/cm}^2 \text{ s}^2$ ).

Die Methode basiert auf der Änderung der Eigenfrequenz (Resonanzfrequenz) der piezoelektrischen Kristallscheibe, sobald diese mit einer Fremdmasse der Schichtdicke  $\Delta d$  beladen wird. Bereits 1959 stellte Günter Sauerbrey eine lineare Beziehung zwischen Massebeladung  $\Delta m$  und der Änderung der Resonanzfrequenz  $\Delta f$  von Schwingquarzen fest und stellte folgende Formel auf:<sup>99</sup>

$$\Delta f = -\frac{f_0 \cdot \Delta d}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \cdot \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} = -C \cdot \Delta m$$

Gleichung 18

Hierbei ist  $A$  die Elektrodenfläche auf dem Quarz und  $C$  ein Konstante. Für das verwendete 5 MHz-Quarz bedeutet das, dass eine Masseanlagerung von  $17,7 \text{ ng}$  auf einer Fläche von  $1 \text{ cm}^2$  eine Frequenzänderung von  $1 \text{ Hz}$  hervorruft. Die *Sauerbrey*-Gleichung gilt jedoch nur für starre Filme, weshalb die QCM-Technik lange Zeit nur als Massendetektor für Gase eingesetzt wurde. Die Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen erzeugt jedoch elastische Filme.

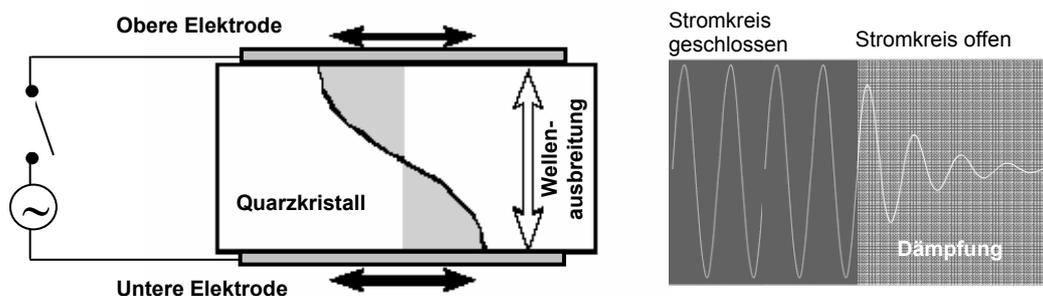


Abbildung 11 (links): Schema eines QCM-D-Systems. (rechts): Verringerung der Amplitude nach dem Öffnen des Stromkreises ermöglicht Ermittlung der Dämpfung.

Wie auch die umgebende Flüssigkeit, erzeugen diese elastischen Filme eine erhebliche Dämpfung (*dissipation*,  $D$ ), die in der QCM-D-Technik zusammen mit der Massenänderung bestimmt wird. Das QCM-D System der Firma Q-Sense, (Göteborg, Schweden) kombiniert diese Prinzipien. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften der adsorbierten Filme gewinnen. Abbildung 11 (links) zeigt den schematischen Aufbau des Systems. Ein Quarzkristall

wird periodisch zur Schwingung in seiner Grundfrequenz sowie im dritten, fünften und siebten Oberton ( $n = 3, 5$  oder  $7$ ) angeregt und anschließend von der antreibenden Spannungsquelle wieder getrennt.

In der spannungslosen Phase, in der der Quarzsensoren ausschwingt, kann die Dämpfung  $D$ , aus dem zeitlichen Abfall der Schwingungsamplitude ermittelt werden (vgl. Abbildung 11, rechts).  $D$  ergibt sich aus dem Quotienten des Energieverlusts pro Schwingung und der Gesamtenergie des Oszilators und hat daher keine Einheit. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sogenannte *AT-cut* Quarze verwendet.<sup>100</sup> Sie zeichnen sich durch eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz aus. Die Kristalle sind auf Ober- und Unterseite mit einer Gold- bzw. Siliciumdioxidelektrode bedampft.

### 3.10 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode zur Messung von Größenverteilungen und mittleren Partikelgrößen im Bereich von 2 nm bis etwa 2  $\mu\text{m}$ . Prinzipiell bestimmt man Diffusionskoeffizienten bzw. Verteilungen von Diffusionskoeffizienten. Mit der *Stokes-Einstein*-Beziehung lassen sich dann unter der Annahme, dass sphärische Teilchen vorliegen, aus den Diffusionskoeffizienten die hydrodynamischen Radien der diffundierenden Teilchen berechnen. Die wesentlichen Komponenten eines DLS-Gerätes sind Laser, Probenhalter und Photomultiplier (PM) zur Detektion der gestreuten Strahlung bei einem festen Winkel.

Das bei der sogenannten Photonenkorrelations-Spektroskopie verwendete Laserlicht ist kohärent, d. h., die Wellenbewegung senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung des Lichts ist in Phase. Durch Interferenz des an den einzelnen Teilchen gestreuten Lichts entstehen Beugungsmuster. Sind die Teilchen stationär, ist ein Beugungsmuster von hellen Flecken zu sehen. In diesem Muster entspricht jeder Fleck einer Kohärenzfläche, also der Fläche auf der die auftreffenden, von unterschiedlichen Streuzentren ausgehenden Streuwellen noch eine feste Phasenbeziehung zueinander aufweisen. Befinden sich die Teilchen jedoch in Bewegung (z. B. in einer kolloidalen Dispersion), wird auch das Punktmuster dynamisch. Die Streuzentren in der Probe bewegen sich und damit ändert sich der Abstand der Streuzentren zueinander. Somit fluktuiert auch die Streulichtintensität eines Flecks. Die Fluktuationen werden durch einen Photonenkorrelator analysiert, der die zeitliche Korrelation in den Fluktuationen der Lichtintensität im Millisekundenbereich bestimmt. Aus der gemessenen Autokorrelationsfunktion erhält man die Autokorrelationsfunktion  $g_e(\tau)$  des elektrischen Feldes  $E$  der Streuwelle, welche die Beziehung zwischen der durchschnittlichen Intensität zu einer Zeit  $(t + \tau)$  und der Intensität zur Zeit  $t$  wiedergibt:

$$g_e(\tau) = 1 + e^{-Dk^2\tau}$$

**Gleichung 19**

Hierbei ist  $\tau$  die Korrelationszeit,  $D$  der Diffusionskoeffizient der Partikel und  $k$  der Streuvektor. Dieser ist gegeben durch:

$$k = \frac{4\pi n_m}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

**Gleichung 20**

$n_m$ , ist der Brechungsindex des Dispersionsmittels,  $\lambda$  ist die Wellenlänge des Laserlichts und  $\theta$  der Streuwinkel. In der Praxis wird  $\tau$  bei verschiedenen Streuwinkeln gemessen. Trägt man  $1/\tau$  gegen  $\theta^2$  auf ( $\tau = 1/D\theta^2$ ), erhält man zunächst den Diffusionskoeffizienten und unter Annahme der *Stokes-Einstein*-Gleichung den hydrodynamischen Radius  $r$  der Teilchen:

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

**Gleichung 21**

$T$  ist die absolute Temperatur,  $k$  die Boltzmann-Konstante und  $\eta$  die Viskosität des Dispersionsmittels.

## 4 Präparation

### 4.1 Präparation von zirkulärer Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde an der *Université Henry Poincaré Nancy 1* (Nancy, Frankreich) in Kooperation mit Prof. Lionel Domenjoud durchgeführt.

#### *Fermentation von E. coli TG1(pGL3)*

Der *E. coli* Stamm TG1 enthält das Plasmid pGL3, welches ein Gen trägt, das für eine Ampicillin-Resistenz codiert. Somit wird sicher gestellt, dass sich in Anwesenheit von Ampicillin nur die Zellen vermehren können, die das Plasmid tragen. Die Fermentation wurde bei 37 °C über Nacht im Schüttelkolben durchgeführt.

#### *Aufreinigung der Plasmid-DNA*

Die Schüttelkultur wird 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert und das Pellet in EDTA-haltigem (10 mM) Puffer in Anwesenheit von RNase A resuspendiert. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die für die Stabilität der Bakterienzellwände wichtig sind und destabilisiert diese somit. Der Zusatz von Lysozym bewirkt eine enzymatische Spaltung des Mureins in den Zellwänden von *E. coli*. Es folgt die alkalische Lyse der Bakterienzellen nach Birnboim und Doly mit Hilfe von 200 mM NaOH und 1 % SDS (Sodiumdodecylsulfat). Die zugefügten Komponenten wurden kurz mit der Zellsuspension gemischt und auf Eis gestellt. SDS lagert sich in die Phospholipidschicht, bewirkt somit deren Auflösung und der Zellinhalt tritt aus. Die alkalischen Bedingungen denaturieren chromosomale und Plasmid-DNA wie auch Proteine. Die Plasmide sind jedoch klein genug, um die lysierten Zellen zu verlassen. Eine optimierte Einwirkzeit der lysierenden Komponenten erlaubt eine maximale Ausbeute an Plasmid-DNA ohne chromosomale DNA, wobei nur wenig Plasmid-DNA denaturiert wird. Werden die Zellen zu lange den lysierenden Bedingungen ausgesetzt, besteht die Gefahr, dass Plasmide irreversibel denaturieren. Diese denaturierte Form der Plasmide läuft im Agarose-Gel schneller, ist Restriktionsenzymen gegenüber resistent und lässt sich schlechter mit Ethidiumbromid anfärben. Das Lysat wird anschließend mit 2,8 M Kaliumacetat-Puffer (pH 5,1) neutralisiert und auf Eis gestellt. Dies bewirkt die Präzipitation von SDS (bei 4 °C), was große Zellbestandteile wie chromosomale DNA, Proteine oder Zellbruchstücke mit ins Pellet reißt, während die Plasmide im Überstand verbleiben. Der Überstand wird abgenommen und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen befreit, die sich an der Phasengrenze sammeln. Das Plasmid verbleibt in der oberen wässrigen Phase und wird anschließend mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt.

Das Pellet wird für 10 min bei 10 000 rpm abzentrifugiert und zwei Mal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salze zu entfernen. Im Anschluss wird das Ethanol entfernt, das Pellet getrocknet, in 500  $\mu$ L Wasser aufgenommen und die Konzentration sowie die Qualität der präparierten DNA überprüft.

Zeigt die Qualitätskontrolle mittels Messung der optischen Dichte (OD) Verunreinigungen mit RNA oder Proteinen, so schließt sich ein Verdau mit RNase A bzw. Proteinase K für jeweils 30 min bei 37 °C an. Darauf folgen erneut Phenol/Chloroform-Extraktion, Präzipitation, Waschen und Trocknen der DNA. Nach dem Lösen der Plasmid-DNA in Wasser werden Konzentration und Qualität der DNA erneut geprüft.

#### ***Analyse der aufgereinigten Plasmid-DNA***

Die Bestimmung der Konzentration und der Qualität der aufgereinigten DNA erfolgte spektroskopisch durch Messungen der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm. Für die Konzentrationsbestimmung gilt: Eine OD von 1 bei 260 nm und 1 cm Weglänge entspricht ca. 50  $\mu$ g Plasmid-DNA pro mL. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Informationen über die Qualität der präparierten DNA. Liegt er zwischen 1,8 und 1,9, handelt es sich um reine DNA. OD-Werte über 1,9 deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, während Werte unter 1,8 auf die Anwesenheit von Proteinen und Phenol schließen lassen. Die Größe der DNA-Fragmente wurde mittels Gelelektrophorese in 0,8 %iger Agarose geprüft. Die DNA wurde dazu mit dem interkallierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid markiert. Als Größen-Marker diente  $\lambda$ /EcoRI + Hind III (Fa. Fermentas).

## **4.2 Layer-by-Layer-Technik**

G. Decher stellte 1997 eine Technologie zur Herstellung ultradünner organischer Filme vor, wobei durch Selbstorganisation schrittweise entgegengesetzt geladene Polyelektrolytmoleküle an geladenen festen Substraten adsorbiert werden.<sup>101</sup> Das Verfahren beruht auf der elektrostatischen Anziehung und Komplexbildung von Polyanionen und -kationen zum Aufbau supramolekularer Polyelektrolytmultischichten. Dabei können Schichtdicken von 5 – 500 nm erreicht werden. Die so erzeugten Filme weisen zwar keine hohe molekulare Ordnung auf, haben aber den Vorteil, dass sie sehr stabil und einfach zu präparieren sind. Mit der *Layer-by-Layer-* (*LbL-*) Technik können verschiedene Moleküle wie Proteine, Nanopartikel oder Polymere schichtweise adsorbiert werden.<sup>6,102,103</sup>

Zu Beginn der Präparation wird das Substrat (hier: mit Siliciumdioxid oder Gold beschichtet) mit Piranha-Lösung gereinigt. Der Adsorptionscyclus beginnt mit dem

Aufbringen von positiv geladenen Polykationen (10 mM Polyethylenimin, PEI) auf das gesäuberte Substrat (Schritt 1). Nach 20-minütiger Adsorption wird das Templat drei Mal für jeweils zwei Minuten in Millipore-Wasser gewaschen. In einem nächsten Schritt adsorbiert das anionische Polyelektrolyt Polystyrolsulfonat (PSS) für 20 Minuten an das Substrat (Schritt 2). Nach erneutem Waschen wird dann das kationische Poly(allylaminohydrochlorid) (PAH) adsorbiert (Schritt 3). Dieser Zyklus setzt sich so lange fort, bis die Polyelektrolyt-Multischicht die gewünschte Dicke erreicht hat. Der Aufbau dieser Sandwichstruktur wird beendet, indem man das beschichtete Substrat unter einem Stickstoffstrom trocknet. Die Struktur der verwendeten Polyelektrolyte wird in Abbildung 12 dargestellt.

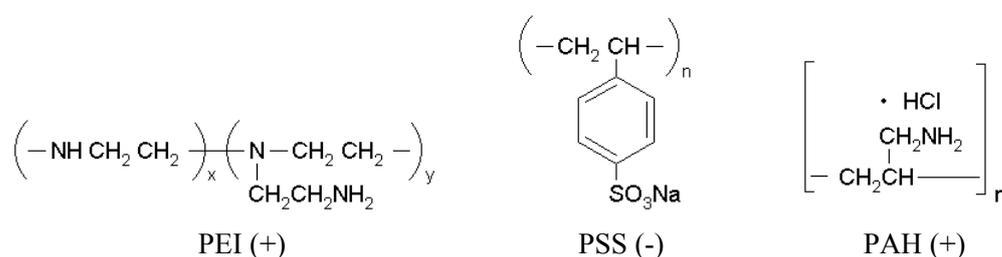


Abbildung 12: Strukturen der Polyelektrolyte PEI, PSS und PAH.

### 4.3 Präparation kleiner unilamellarer Lipidvesikel

Lösungen der entsprechenden Lipide werden mit einer Konzentration von 5 mg/ml in Chloroform hergestellt. Das Lösungsmittel wird anschließend in einem Stickstoffstrom verblasen. Das Lipid schlägt sich dabei in Form eines dünnen Films an der Glaswand des Reagenzglases nieder. Der so erhaltene Lipidfilm kann gekühlt für mehrere Wochen gelagert werden. Der Lipidfilm wird in 2 ml Millipore-Wasser aufgenommen, für 15 Minuten im Wasserbad auf eine Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des Lipids erhitzt, dabei mit Ultraschall behandelt und 30 Sekunden gevortext. Nach 15-minütigem Äquilibrieren bei Raumtemperatur wurde das Lipid erneut erhitzt u.s.w.. Dieser Zyklus wurde 5 – 10 Mal wiederholt.

Die erhaltene Lipidsuspension wurde anschließend oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur des Lipids mittels eines Extruders (Avanti Polar Lipids, USA) durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 400, 200 und 100 nm gedrückt. Die entstandenen Vesikel sind unilamellar. Während der gesamten Präparation sollte die Temperatur der Suspension nicht unter die Phasenumwandlungstemperatur des verwendeten Lipids oder der Lipidmischung fallen.

## 5 Ergebnisse Teil I: Untersuchung der Struktur von Komplexen aus DNA, zweiwertigen Kationen und zwitterionischen Lipiden an der Wasser/Luft-Grenzfläche

Bereits 1980 veröffentlichten Budker *et al.* Experimente, in denen die Ausbildung stabiler Komplexe von DNA und zwitterionischen Lipidvesikeln in Gegenwart von  $MgCl_2$  durch Trübungsmessungen nachgewiesen wurde.<sup>21</sup> Der Zusatz von EDTA bewirkte eine schlagartige Verringerung der Trübung auf den Ausgangswert. In Abwesenheit von Magnesiumionen wurden keine Komplexe gebildet. Komplexe dieser Art stellten sich als ernstzunehmende Alternative zu Komplexen zwischen DNA und kationischen Lipiden für den Gentransfer heraus, weshalb ihre Struktur, ihre physiologischen und physikochemischen Eigenschaften mehr und mehr untersucht wurden.<sup>22,104-106</sup>

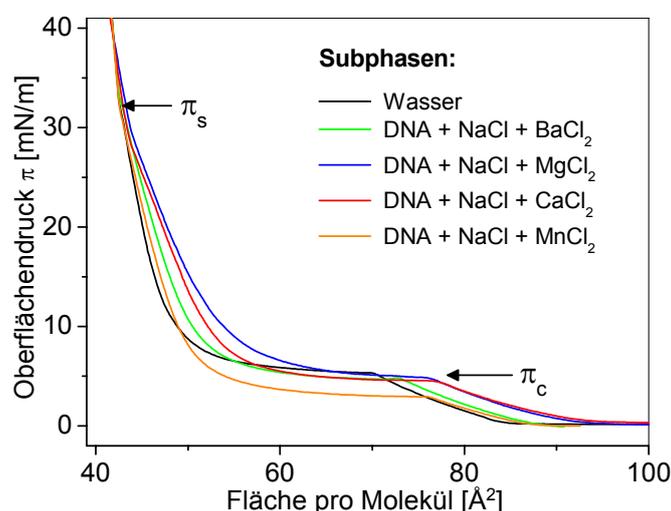
DSC-Messungen (*differential scanning microscopy*) und Elektronenmikroskopie führten zu dem Ergebnis, dass die Bildung von DNA/Calcium/DPPC-Komplexen eine erhebliche Veränderung im Phasenverhalten des Lipids bewirkt, wobei das Lipid trotzdem Doppelschichten bildet.<sup>106</sup> Zudem war die Ausbildung von dichten, wurmartigen DNA-*Clustern* mit sich wiederholenden Abständen von 4-6 nm auf der Membran erkennbar. Kharakoz *et al.* schlussfolgerten nach Untersuchungen des DNA/Calcium/DPPC-Komplexes mittels Ultraschallinterferometrie, dass ein Lipid/DNA-Verhältnis von 5:1 vorliegt.<sup>104</sup> Die Untersuchung der Struktur von Komplexen aus DNA, zweiwertigen Metallionen ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) und Phosphatidylcholinen durch Röntgendiffraktion mit Synchrotronstrahlung ergaben, dass eine geordnete, mehrschichtige Struktur gebildet wird, wobei eine DNA-Schicht in zwei Lipiddoppelschichten in einem bestimmten Lipid/DNA-Verhältnis eingebettet ist.<sup>23,107-110</sup> Als Mechanismus dieser Wechselwirkung, wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: A) Es erfolgt eine Verbrückung der negativen Phosphateinheit der Lipidkopfgruppe mit den Phosphaten der DNA durch zweiwertige Kationen. B) Die zweiwertigen Kationen treten mit dem Phosphat der Kopfgruppe in Wechselwirkung wodurch die Monoschicht effektiv positiv geladen und die DNA elektrostatisch angezogen wird.

Die folgenden Ergebnisse stellen die neusten Erkenntnisse über den Mechanismus der Bildung von Komplexen aus DNA, zwitterionischen Lipiden und zweiwertigen Kationen dar.

## 5.1 Komplexe mit genomischer DNA

### 5.1.1 $\pi/A$ – Isothermen

Die Messung von  $\pi/A$ -Isothermen war die Grundlage für alle Methoden an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Die zuvor präparierte Subphase wurde in den Trog gefüllt und 1 mM Lipidlösung bei 20 °C gespreitet. Bei Messungen mit DNA gab es eine zusätzliche Adsorptionszeit von einer Stunde. DNA (0,1 mM) sowie zweiwertige Kationen (5 mM) wurden immer in Kombination mit NaCl (1 mM) eingesetzt. Die Berechnungen der DNA-Konzentration beziehen sich auf ein Monomergewicht von 370 g/mol unter der Annahme, dass das Monomer zu ca. 10 % hydratisiert ist.<sup>111</sup> Für alle dargestellten Isothermen betrug die Kompressionsgeschwindigkeit 5 Å<sup>2</sup>/Molekül/min.



**Abbildung 13:**  $\pi/A$ -Isothermen von DMPE-Monoschichten auf Wasser (schwarz) sowie auf Kalbsthymus-DNA in Anwesenheit von NaCl und BaCl<sub>2</sub> (grün), MgCl<sub>2</sub> (blau), CaCl<sub>2</sub> (rot) oder MnCl<sub>2</sub> (orange) bei 20 °C.

Abbildung 13 zeigt  $\pi/A$ -Isothermen von DMPE auf Wasser sowie auf wässrigen Lösungen von DNA in Gegenwart von Ba<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- oder Mn<sup>2+</sup>-Ionen. Alle Isothermen zeigen den typischen Verlauf für Monoschichtsysteme, die ein Gebiet der Koexistenz von flüssig-expandierter (LE) und flüssig-kondensierter (LC) Phase durchlaufen (vgl. Abschnitt 2.2.1.). Diese Hauptphasenumwandlung ist ein Phasenübergang erster Ordnung und beginnt für DMPE auf Wasser bei einem Phasenumwandlungsdruck  $\pi_c$  von 5,3 mN/m. Bei weiterer Kompression beschreibt die Isotherme einen Knick bei  $\pi_s = 32$  mN/m, der auf eine Phasenumwandlung zweiter Ordnung vom geneigten zum ungeneigten Zustand der Lipidketten hinweist. Das Kompressionsverhalten von DMPE auf Wasser ist äquivalent zu dem auf wässrigen

Lösungen von NaCl, DNA + NaCl und NaCl + zweiwertige Kationen. Aus diesem Grund werden diese Isothermen durch die von DMPE auf Wasser in Abbildung 13 repräsentiert. Die Anwesenheit von DNA und BaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> in der Subphase bewirkt nur eine sehr kleine Erniedrigung von  $\pi_c$  um bis zu 0,8 mN/m. Allerdings ist die Monoschicht stärker expandiert, was durch eine Verschiebung der Isotherme zu größeren Flächen deutlich wird. Ursache hierfür ist die Penetration der DNA-Moleküle in die Lipidmonoschicht. Auch bei DNA und MnCl<sub>2</sub> in der Subphase ist diese Expansion der Isotherme zu beobachten. Allerdings findet die Hauptphasenumwandlung schon bei  $\pi_c = 3$  mN/m statt. Die Phasenumwandlung zweiter Ordnung  $\pi_s$  findet in den vier Systemen bei 28-30 mN/m statt. Über  $\pi_s$  entspricht die molekulare Fläche der von DMPE auf Wasser, was zeigt, dass die DNA-Moleküle aus der Lipidschicht heraus gedrückt werden.

### 5.1.2 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

Alle IRRA-Spektren wurden mit s-polarisiertem Licht unter einem Einfallswinkel von 40° aufgenommen. Abbildung 14 zeigt ein typisches IR-Spektrum eines Phospholipids wie DMPE und seine charakteristischen Banden (vgl. Tabelle 1).

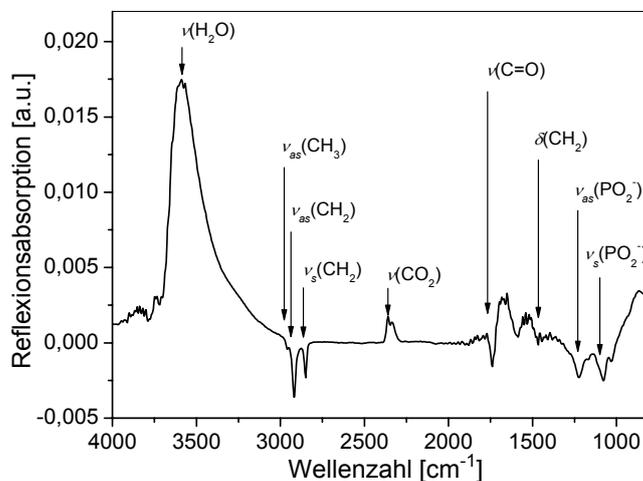
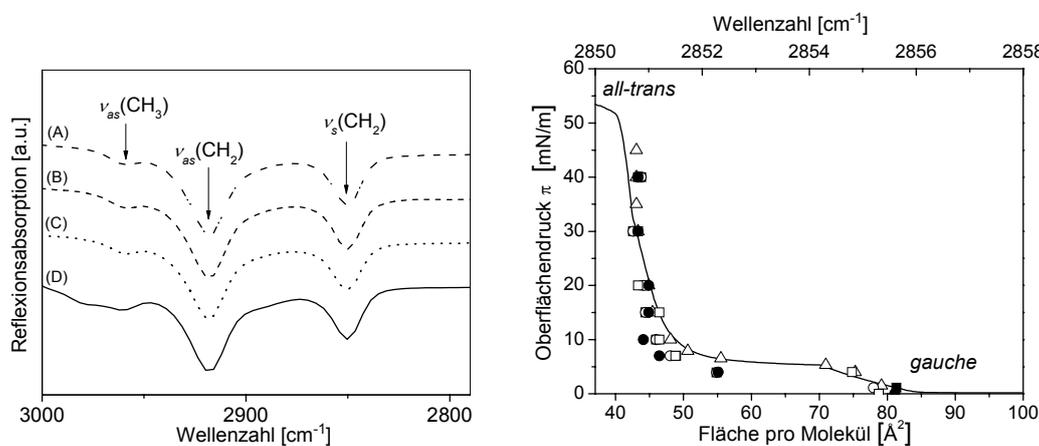


Abbildung 14: Typisches IRRA-Spektrum eines Phospholipids.

#### *CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen*

Die Untersuchung der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen von Lipiden ermöglicht es, Aussagen über den Ordnungszustand der Lipidketten zu treffen. Die CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen treten im spektralen Bereich von 3000 bis 2800 cm<sup>-1</sup> auf. Die asymmetrischen und die symmetrischen Methylenstreckschwingungen befinden sich bei 2924-2918 cm<sup>-1</sup> und

2854-2849  $\text{cm}^{-1}$ . Ihre Frequenz spiegelt das Verhältnis der *all-trans/gauche*-Konformationen in den Lipidketten wieder.



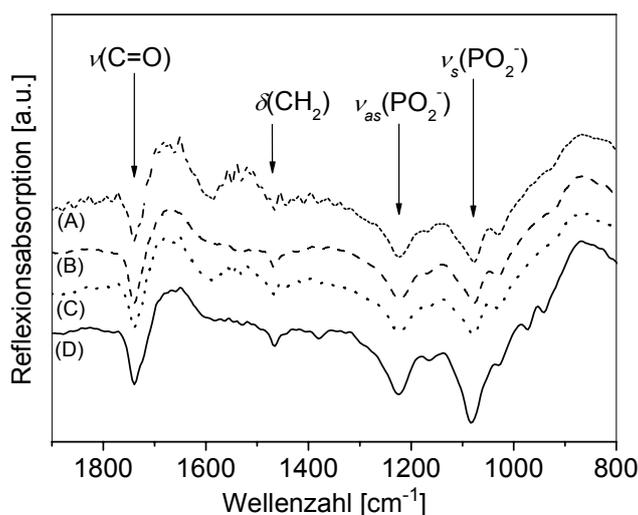
**Abbildung 15 (links):** IRRA-Spektren von DMPE auf Wasser (A), auf NaCl + MgCl<sub>2</sub> (B), auf mM Kalbsthymus-DNA + NaCl (C) sowie auf Kalbsthymus-DNA + mM NaCl + MgCl<sub>2</sub> (D) bei 40 mN/m, aufgenommen unter einem Einfallswinkel von 40° mit s-polarisiertem Licht. Zum besseren Verständnis sind die Kurven verschoben. **(rechts):** Symmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung bei verschiedenen Drücken von DMPE auf Wasser (A), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + BaCl<sub>2</sub> (□), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (■), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (○) sowie auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MnCl<sub>2</sub> (●) und  $\pi/A$ -Isotherme von DMPE auf Wasser bei 20 °C.

In Abbildung 15 (rechts) sind die Positionen der  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande bei verschiedenen Drücken für DMPE auf Wasser sowie auf wässrigen Lösungen von DNA + BaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> oder MnCl<sub>2</sub> aufgetragen. Die sigmoide Form dieses Graphen ähnelt dem Verlauf der  $\pi/A$ -Isotherme, die zum Vergleich auf der unteren Skala dargestellt ist. Die Messungen von DMPE auf den verschiedenen Subphasen zeigen alle das gleiche Verhalten: Bei großen molekularen Flächen tritt die symmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung bei 2854  $\text{cm}^{-1}$  auf. Die Alkylketten sind ungeordnet. Die Methylengruppen befinden sich also in der *gauche*-Konformation. Durch die Kompression des Lipidfilms verschiebt sich die Position der  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande zu kleineren Wellenzahlen. Dabei erhöht sich der Anteil der geordneten Alkylketten und damit auch der Anteil an *all-trans*-Konformeren. Ab ca. 30 mN/m tritt die symmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung bei 2849  $\text{cm}^{-1}$  auf. Die Lipidmonoschicht befindet sich in der kondensierten Phase und die Methylengruppen liegen in der *all-trans*-Konformation vor. Abbildung 15 (links) zeigt repräsentative Spektren von DMPE auf Wasser (A) sowie auf wässrigen Lösungen von 1 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub> (B), 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl (C) und 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub> (D) bei 40 mN/m. Es wird deutlich, dass sich die Positionen der symmetrischen als auch der

asymmetrischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung nicht unterscheiden. Dies zeigt, dass der Ordnungszustand der Alkylketten von DMPE auf allen Subphasen gleich ist.

### $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingungen

Die symmetrischen und asymmetrischen  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingungen  $\nu_s(\text{PO}_2^-)$  und  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$  treten im spektralen Bereich von  $1085 - 1090 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1205 - 1240 \text{ cm}^{-1}$  auf. Die Lage der  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ -Bande ist ein Indikator für den Hydratationsgrad der Lipidkopfgruppe.<sup>112,113</sup> Findet eine Wechselwirkung der zweiwertigen Kationen mit den Phosphaten der Lipidkopfgruppen statt, so ist zu erwarten, dass diese dehydratisiert wird. In diesem Fall würde sich die Position der  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ -Bande zu höheren Wellenzahlen verschieben.<sup>113</sup> IRRAS-Messungen des DMPE auf Wasser sowie auf Subphasen, die zweiwertige Kationen (5 mM) und NaCl (1 mM) enthalten, weisen außerhalb der Fehlergrenzen jedoch die gleichen Positionen der  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ -Bande auf (vgl. Abbildung 16).

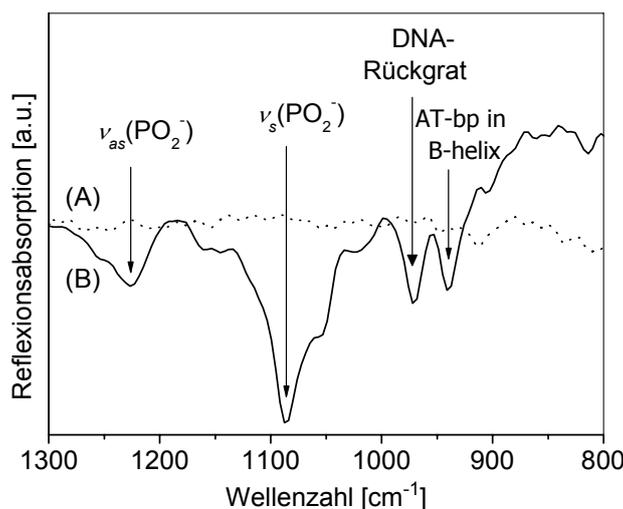


**Abbildung 16:** IRRAS-Spektren von DMPE auf Wasser (A) auf NaCl +  $\text{MgCl}_2$  (B), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl (C) und auf Kalbsthymus-DNA + NaCl +  $\text{MgCl}_2$  (D) bei 40 mN/m, aufgenommen bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  unter einem Einfallswinkel von  $40^\circ$  mit s-polarisiertem Licht.

Folglich haben zweiwertige Kationen keinen signifikanten Einfluss auf die Hydratation der Kopfgruppe. Erst bei Konzentrationen ab 50 mM  $\text{MgCl}_2$  kann eine geringe Verschiebung der  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ -Bande zu höheren Wellenzahlen beobachtet werden.

### DNA-Adsorption

Der spektrale Bereich von  $1800$  bis  $700\text{ cm}^{-1}$  enthält mehr als 30 DNA-Absorptionsbanden.<sup>114</sup> Sie geben wichtige Informationen z. B. über die Basenpaarungen oder die Helixkonformation der DNA. Zwei charakteristische Banden treten bei  $970\text{ cm}^{-1}$  und  $938\text{ cm}^{-1}$  auf. Sie werden von der 2'-Endodeoxyribose-Konformation des DNA-Rückgrats bzw. von der AT-Basenpaarung in B-Helices verursacht.<sup>114</sup>

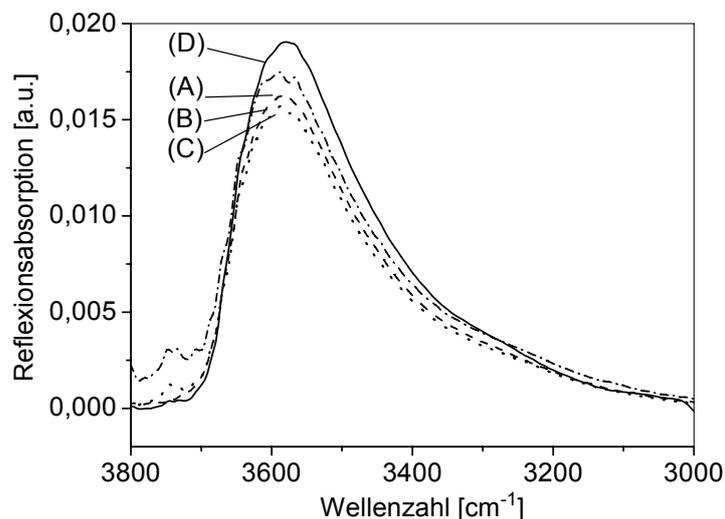


**Abbildung 17:** Differenzspektren von DMPE auf  $\text{NaCl} + \text{MgCl}_2/$  subtrahiert: DMPE auf  $\text{NaCl}$  (A) und DMPE auf Kalbsthymus-DNA +  $\text{NaCl} + \text{MgCl}_2/$  subtrahiert: DMPE auf  $\text{NaCl} + \text{MgCl}_2$  (B) bei  $40\text{ mN/m}$ .

Abbildung 17 zeigt repräsentative Differenzspektren von DMPE auf  $1\text{ mM NaCl} + 5\text{ mM MgCl}_2/$  subtrahiert: DMPE auf  $1\text{ mM NaCl}$  (A) und DMPE auf  $0,1\text{ mM Kalbsthymus-DNA} + 1\text{ mM NaCl} + 5\text{ mM MgCl}_2/$  subtrahiert: DMPE auf  $1\text{ mM NaCl} + 5\text{ mM MgCl}_2$  (B). Nach der Subtraktion der Spektren weist Graph A keine Banden mehr auf, was zeigt, dass die Anwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  in der Subphase keinen Einfluss auf die Struktur der Monoschicht hat. Das Differenzspektrum B zeigt nach der Subtraktion die charakteristischen Signale bei  $970\text{ cm}^{-1}$  und  $938\text{ cm}^{-1}$ , die durch die Adsorption von DNA-Molekülen an der Monoschicht hervorgerufen werden. Sie treten nur in Gegenwart der DNA und des jeweiligen zweiwertigen Kations in der Subphase auf.

Sowohl das Phospholipid als auch die DNA enthalten Phosphatgruppen, die einen Beitrag zu der Intensität der symmetrischen und asymmetrischen  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingung leisten. In Gegenwart der DNA und zweiwertiger Kationen in der Subphase ist daher eine Intensitätserhöhung der  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingungen zu beobachten. Im Differenzspektrum wird der Beitrag der DNA-Phosphate zu den Banden der  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingungen deutlich. Auch eine veränderte Orientierung der DMPE-Kopfgruppe kann zu dieser

Erhöhung der Intensität beisteuern. Die IR-Signale, die durch die Adsorption der DNA an die Monoschicht verursacht werden, treten erst ab Lateraldrücken von ca. 5 mN/m auf. Unterhalb dieses Drucks werden diese Signale nicht detektiert. Offensichtlich ist die Menge an penetrierter DNA zu gering, um detektiert zu werden.



**Abbildung 18:** OH-Streckschwingungen – IRRA-Spektren von DMPE auf Wasser (A), auf NaCl + MgCl<sub>2</sub> (B), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl (C) und auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (D) bei 40 mN/m, aufgenommen bei 20 °C unter einem Einfallswinkel von 40° mit s-polarisiertem Licht.

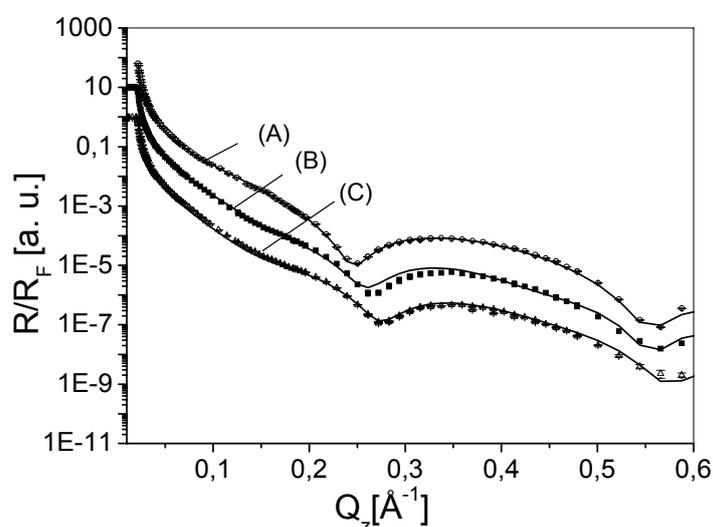
Einen zusätzlichen Nachweis für die Präsenz von DNA an der Grenzfläche gibt die OH-Streckschwingung, die in Abbildung 18 dargestellt ist. Die erhöhte Intensität dieser Bande bei DMPE auf wässrigen Lösungen von DNA und MgCl<sub>2</sub> resultiert aus einer adsorbierten DNA-Schicht, die Wassermoleküle verdrängt. Die  $\nu(\text{H}_2\text{O})$ -Bande im Messtrog ist in Gegenwart einer Monoschicht immer geringer als im Referenztrög ohne die adsorbierte Schicht. Das resultierende Differenzspektrum weist daher eine positive  $\nu(\text{H}_2\text{O})$ -Bande mit noch höherer Intensität auf. Je dicker die Schicht im Messtrog ist, um so höher ist die Reflexionsabsorption. In Gegenwart von DNA und BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> oder MnCl<sub>2</sub> in der Subphase findet diese Intensitätserhöhung der  $\nu(\text{OH})$ -Bande durch DNA-Adsorption in gleichem Maße statt. Eine Quantifizierung dieser Ergebnisse ist schwierig, da es keine Standardmessung gibt, über die die Menge der adsorbierten DNA bestimmen werden kann.

Auch bei Messungen von DMPE auf DNA gelöst in 10 mM Citratpuffer (pH 4) tritt die charakteristische Bande bei 970 cm<sup>-1</sup> (in Abwesenheit zweiwertiger Kationen) auf. Der  $\text{pK}_{\text{app}}$  der Phosphatidylethanolamin beträgt  $\leq 3,5$ .<sup>115</sup> Bei pH 4 ist die DMPE-Kopfgruppe daher überwiegend positiv geladen, was die elektrostatische Anziehung der DNA bewirkt.

Im Adsorptionsexperiment an der Wasser/Luft-Grenzfläche ohne Lipidmonoschicht tritt die DNA-Markerbande bei  $970\text{ cm}^{-1}$  nach ca. 24 h in Anwesenheit von NaCl, DNA und  $\text{CaCl}_2$  in der Subphase auf. In Abwesenheit zweiwertiger Kationen ist dies nicht der Fall.

### 5.1.3 Röntgenreflexion (XR)

Reflexionsdaten von DMPE auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM Kalbsthymus-DNA, 1 mM NaCl in An- und Abwesenheit von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 20 mN/m werden in Abbildung 19 dargestellt.

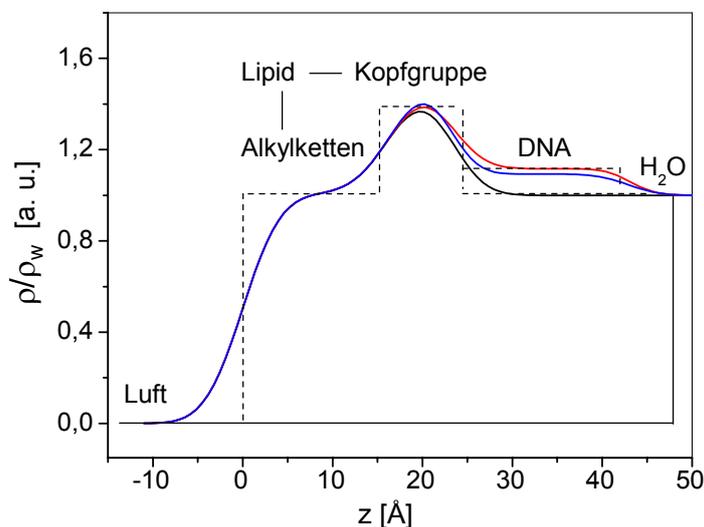


**Abbildung 19 (links):** Reflektivität  $R/R_F$  als Funktion von  $Q_z$  von DMPE auf Kalbsthymus-DNA + NaCl (A), Kalbsthymus-DNA + NaCl +  $\text{MgCl}_2$  (B) und Kalbsthymus-DNA + NaCl +  $\text{CaCl}_2$  (C), bei 20 mN/m. Zum besseren Verständnis sind die Kurven versetzt dargestellt.

Um die Elektronendichteprofile aus diesen Daten zu ermitteln, wurde jede Kurve mit dem Box-Modell gefittet. Dabei wurden Schichtdicke, Rauigkeit und Elektronendichte mit dem *Parratt*-Programm angepasst. Abbildung 20 stellt die Elektronendichteprofile entlang der Oberflächennormalen der DMPE-Monoschicht auf verschiedenen Subphasen dar. Graph A (DMPE auf DNA + NaCl) zeigt eine repräsentative Kurve des Elektronendichteprofiles einer Lipidmonoschicht, die durch zwei Boxen beschrieben wird: den hydrophoben Kettenbereich ( $17,1\text{ \AA}$ ) und den Kopfgruppenbereich ( $6,1\text{ \AA}$ ).

Die Phosphoratome der Lipidkopfgruppe haben eine hohe Elektronendichte. Deshalb weist die Lipidkopfgruppe eine höhere Elektronendichte auf, als der Kettenbereich. Diese Messungen stimmen gut mit den Ergebnissen der Reflexionsmessungen von DMPE auf Wasser überein.<sup>76</sup> Demzufolge adsorbiert die DNA in der alleinigen Gegenwart von NaCl nicht an der Monoschicht. Auf Subphasen, die neben DNA und NaCl auch zweiwertige Kationen enthalten, tritt im Elektronendichteprofil ein zusätzlicher Bereich erhöhter

Elektronendichte auf, der als dritte Box in den Fit eingeht. Dieser Bereich entspricht die Adsorption einer 18 Å bzw. 19 Å dicken DNA-Schicht für das DNA/Ca<sup>2+</sup>- bzw. das DNA/Mg<sup>2+</sup>-System.



**Abbildung 20:** Aus Wasser normierte Elektronendichteverteilung  $\rho/\rho_w$  gegen  $z$  von DMPE auf Kalbsthymus-DNA + NaCl (schwarz), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (blau) und auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (rot) bei 20 mN/m.

#### 5.1.4 Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD)

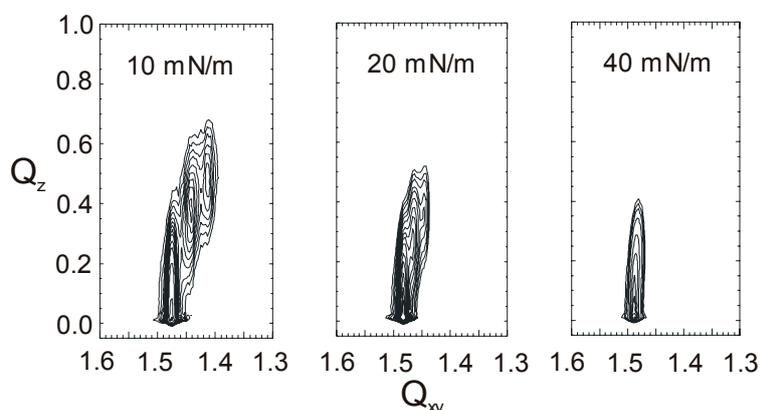
IRRAS-Messungen haben gezeigt, dass DNA-Moleküle in Gegenwart zweiwertiger Kationen an der Monoschicht adsorbieren. Mittels Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall wurde der Einfluss der DNA-Adsorption auf die Packung der Lipidketten untersucht. Diese Methode ermöglicht quantitative Aussagen über die Struktur von geordneten Schichten. GIXD-Messungen geben außerdem Aufschluss über den Ordnungszustand der adsorbierten DNA-Schicht.

In Abschnitt 9.2 sind die berechneten Strukturparameter des DMPE auf den untersuchten Subphasen sowie die der adsorbierten DNA tabellarisch aufgelistet.

##### *Struktur der Lipidmonoschicht*

Abbildung 21 zeigt ausgewählte *contour plots*, also Höhenliniendiagramme der Intensität als Funktion der horizontalen und der vertikalen Streuvektorkomponenten  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ , für DMPE auf wässrigen Lösungen von 1 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei verschiedenen Drücken. Bei 10 mN/m liegt das Lipid in der LC-Phase vor. Es werden drei Diffraktionspeaks beobachtet, die auf eine schiefwinklige Gitterstruktur hindeuten

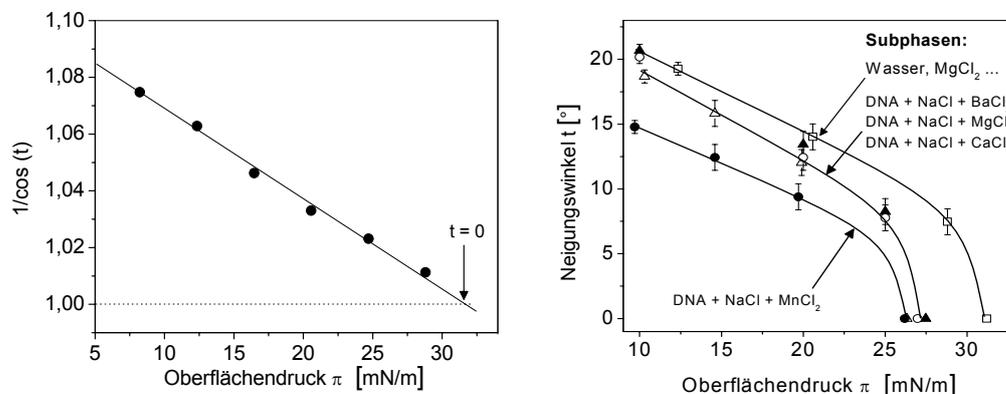
(vgl. Tabelle 2). Mit steigendem Lateraldruck nehmen die  $Q_z$ -Werte und damit auch der Neigungswinkel der Alkylketten ab. Bei 20 mN/m kennzeichnen zwei Diffraktionspeaks bei  $Q_z^n = 0$  und  $Q_z^d > 0$  ( $n$  = nicht degenerierter Peak,  $d$  = degenerierter Peak) ein rechtwinkliges Gitter, in dem die Ketten zum nächsten Nachbarn (NN) geneigt sind. Dies entspricht der sogenannten  $L_2$ -Phase.<sup>73</sup> Die Phasenumwandlung von schiefwinkliger zu rechtwinkliger Gitterstruktur ist in der  $\pi/A$ -Isotherme nicht erkennbar. Bei weiterem Anstieg des Oberflächendrucks tritt bei  $\pi_s$  ein Knick in der Isotherme auf (vgl. Abbildung 13), der durch eine Phasenumwandlung zweiter Ordnung in eine ungeneigte Phase beschrieben wird. Bei Drücken größer als  $\pi_s$  tritt nur noch ein Diffraktionspeak bei  $Q_z = 0$  auf. Die Monoschicht besitzt dann eine hexagonale Packung, die charakteristisch für die LS-Phase ist. Auf allen untersuchten Subphasen weist die Monoschicht das gleiche Phasenverhalten während der Kompression auf.



**Abbildung 21:** Contour plots (Höhenliniendiagramme der Intensität der Diffraktionssignale als Funktion der horizontalen und der vertikalen Streuvektorkomponenten  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ ) von DMPE auf wässrigen Lösungen von NaCl + MgCl<sub>2</sub> bei den angegebenen Drücken.

Für die Phasenumwandlung zweiter Ordnung kann eine lineare Beziehung zwischen dem Lateraldruck  $\pi$  und der molekularen Fläche  $A_{xy}$  angenommen werden.<sup>116</sup> Aus  $\cos(t) = A_0/A_{xy}$  folgt, dass auch zwischen  $\pi$  und  $1/\cos(t)$  ein linearer Zusammenhang besteht. Hierbei ist  $A_0$  die Querschnittsfläche und  $A_{xy}$  der reale Flächenbedarf einer Kette. Abbildung 22 (links) zeigt die Extrapolation der Funktion  $\pi = f(1/\cos(t))$  auf  $t = 0$ , mit der der Druck ermittelt wird, ab dem die Alkylketten senkrecht stehen. Für DMPE auf Wasser, auf wässrigen Lösungen von 1 mM NaCl sowie von 1 mM NaCl + 5 mM zweiwertiger Kationen oder 0,1 mM DNA + 1 mM NaCl beträgt dieser extrapolierte Wert ca. 32 mN/m. Liegen neben DNA auch zweiwertiger Kationen in der Subphase vor, verschiebt sich dieser Wert zu kleineren Drücken: 26,2 mN/m für Ca<sup>2+</sup>-Ionen, 27,5 mN/m für Mg<sup>2+</sup>-Ionen, 26,3 mN/m für Ba<sup>2+</sup>-Ionen und 26,2 mN/m für Mn<sup>2+</sup>-

Ionen. Sie stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit den Drücken des Phasenübergangs zweiter Ordnung  $\pi_s$  der  $\pi/A$ -Isothermen überein.



**Abbildung 22 (links):** Auftragung von  $1/\cos(t)$  gegen  $\pi$  von DMPE auf NaCl zur Ermittlung von  $t = 0$ . **(rechts):** Neigungswinkel der Lipidketten als Funktion des Oberflächendrucks von DMPE auf Wasser (□), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + BaCl<sub>2</sub> (△), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (▲), auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (○) sowie auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MnCl<sub>2</sub> (●) bei 20 °C. Die Linien dienen der Veranschaulichung.

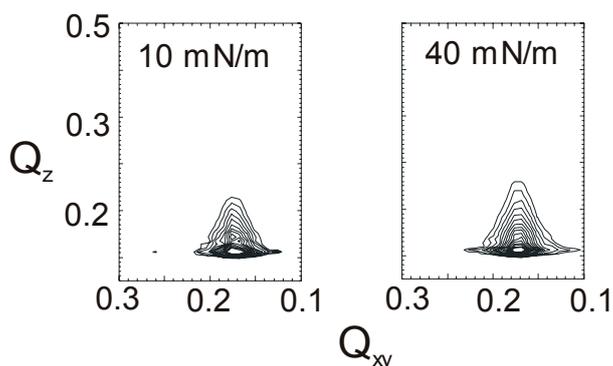
Die Neigungswinkel der untersuchten Systeme sind in Abbildung 22 (rechts) in Abhängigkeit von  $\pi$  aufgetragen. Bei den Drücken für  $t = 0$  handelt es sich um die extrapolierten Werte. Befinden sich zweiwertige Kationen oder DNA allein in der Subphase zeigen sich keine Änderungen der Struktur Monoschicht im Vergleich zu DMPE auf Wasser. Aus diesem Grund sind diese Messungen nicht separat aufgetragen. Bei 10 mN/m neigen sich die Ketten der Lipidmoleküle auf den salinen Subphasen um ca. 21,5° geneigt, während sie auf wässrigen Lösungen von DNA sowie Barium-, Magnesium- oder Calciumionen bei gleichem Druck Neigungswinkel zwischen 18,7° und 20,7° aufweisen. In Gegenwart von Ionen des Übergangsmetalls Mangan und DNA in der Subphase tritt dieser Effekt deutlich verstärkt auf: Bei 10 mN/m sind die Lipidketten in einem rechtwinkligen Gitter gepackt, wobei ihr Neigungswinkel 14,8° beträgt. Befindet sich neben Natriumionen und Ionen der Erdalkalimetalle Barium, Magnesium oder Calcium auch DNA in der Subphase, sind die Alkylketten des Lipids also weniger geneigt als ohne DNA.

D. h., Subphasen, die DNA und zweiwertige Kationen enthalten, haben einen kondensierenden Effekt auf die geordneten Bereiche der DMPE-Monoschicht. Die Messungen der  $\pi/A$ -Isothermen haben hingegen gezeigt, dass Subphasen mit DNA und zweiwertigen Kationen einen expandierenden Effekt auf die DMPE-Monoschicht haben. Diese scheinbare Diskrepanz tritt auf, da mittels GIXD nur geordnete Strukturen in der Lipidschicht detektiert werden. Diese bilden sich im LE/LC-Koexistenzgebiet bei Drücken oberhalb des Phasenumwandlungsdrucks  $\pi_c$  aus. Kompressionsisothermen berücksichtigen dagegen den Platzbedarf aller Moleküle, die in der Monoschicht

existieren. Auch Lipide, die in ungeordnetem Zustand vorliegen, sowie in die Monoschicht penetrierte DNA-Moleküle werden mit dieser Methode detektiert. Die Penetration von DNA in die LE-Phase der Lipidmonoschicht in Anwesenheit zweiwertiger Kationen hat somit schon bei geringen Druckwerten einen expandierenden Effekt auf die gesamte Monoschicht. Auf die geordneten Bereiche wirkt sie jedoch kondensierend.

### Struktur der adsorbierten DNA

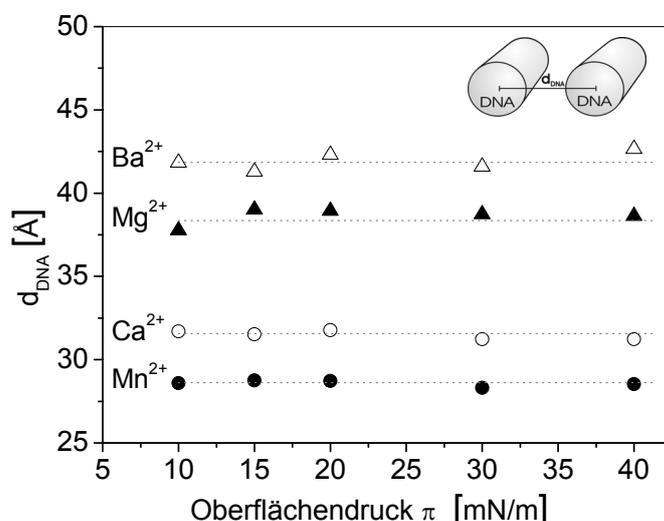
Bei sehr kleinen Werten für  $Q_{xy}$  taucht bei  $Q_z = 0$  ein zusätzlicher *Bragg*-Reflex auf, wenn sich DNA in Gegenwart zweiwertiger Kationen in der Subphase befindet. Diffraktionspeaks bei sehr kleinen  $Q_{xy}$ -Werten werden durch geordnete Strukturen mit großen Netzebenenabständen verursacht. Dieser Peak ist in den *contour plots* in Abbildung 23 dargestellt. Er resultiert aus der parallelen Anordnung von DNA-Strängen, die hier als Zylinder betrachtet werden können. Der Abstand  $d_{DNA}$  zwischen ihren Rotationsachsen kann über  $d_{DNA} = 2\pi/Q_{xy}$  berechnet werden.



**Abbildung 23:** Contour plots bei kleinen  $Q_{xy}$ -Werten von DMPE auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> bei den angegebenen Drücken und 20 °C.

Der in Abbildung 23 dargestellte Bragg-Peak ändert seine Position und damit  $d_{DNA}$  während der Kompression von 10 auf 40 mN/m nicht. Diese Unabhängigkeit vom Druck wird bei Verwendung aller zweiwertigen Kationen beobachtet und lässt darauf schließen, dass die DNA als relativ separate Schicht unter dem Lipid vorliegt.

Untersuchungen mittels Gelelektrophorese haben gezeigt, dass das Rühren der Kalbsthymus-DNA überwiegend zu Fragmenten mit einer Größe von ca. 21 kb führt. Trotzdem enthält die DNA-Lösung auch wesentlich größere Fragmente. Der Anteil von langen und kurzen Bruchstücken variiert bei jeder Subphasenpräparation vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Formen der eingesetzten Rührfische, unterschiedlicher Rührgeschwindigkeit oder -zeit. Da der Einfluss zweiwertiger Kationen auf größere DNA-Stränge stärker ist, variieren die experimentell ermittelten Werte für  $d_{DNA}$ .



**Abbildung 24:** Interaxiale DNA-Abstände als Funktion des Oberflächendrucks von DMPE auf Wasser ( $\square$ ), auf Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + BaCl<sub>2</sub> ( $\triangle$ ), Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> ( $\blacktriangle$ ), Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> ( $\circ$ ) und auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MnCl<sub>2</sub> ( $\bullet$ ).

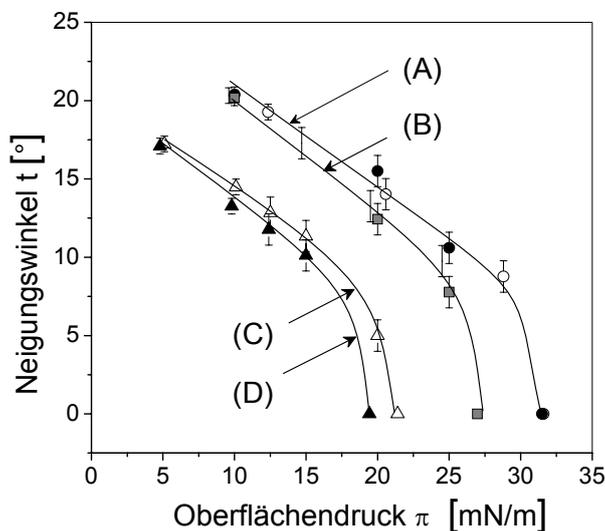
In Abbildung 24 ist  $d_{DNA}$  für die vier untersuchten zweiwertigen Kationen in Abhängigkeit von  $\pi$  dargestellt. Es wird deutlich, dass der DNA-Abstand stark von der Art der Kationen abhängt. Zweiwertige Kationen können DNA komplexieren. Den stärksten Einfluss hat hierbei Mangan, gefolgt von Calcium, Magnesium und Barium. Für Messungen mit der selben DNA-Lösung war diese Reihenfolge ( $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Ba^{2+}$ ) reproduzierbar. Messungen verschiedener zwitterionischer Lipide auf den gleichen Subphasen weisen den selben DNA-Abstand auf.

Allerdings lässt sich  $d_{DNA}$  bei separat angesetzten DNA-Lösungen schlecht reproduzieren. Anscheinend spielt die Präparation der DNA-Lösung eine entscheidende Rolle. Unter Verwendung von Raman-Spektroskopie fanden Duguid et al. heraus, dass durch Calciumionen induzierte strukturelle Veränderung bei genomischer Kalbsthymus-DNA (> 23 kb) wesentlich stärker waren als bei mononucleosomalen DNA-Fragmenten (160 bp).<sup>117</sup>

### ***Einfluss verringerter Ladungsdichte des Lipids auf die Komplexbildung***

Im Gegensatz zu Untersuchungen von Komplexen aus positiv geladenen Lipiden und DNA scheint die Adsorption von DNA an zwitterionischen Lipide in Anwesenheit zweiwertiger Kationen unabhängig von der Ladungsdichte der Lipidkopfgruppen zu sein. Um dies zu bestätigen wurde die DNA-Adsorption an eine Lipidmonoschicht bestehend aus einem Gemisch von DMPE/DMG (7:1) untersucht. DMG (1,2-Dimyristoyl-glycerol)

ist ein ungeladenes Lipid. Seine Kopfgruppe ist sehr klein, weshalb die  $\pi/A$ -Isotherme von DMG auf den verwendeten Subphasen eine rein kondensierte Phase zeigt.



**Abbildung 25:** Neigungswinkel als Funktion des Oberflächendrucks von DMPE auf NaCl + CaCl<sub>2</sub> (A) sowie auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (B) und DMPE/DMG (7:1) auf NaCl + CaCl<sub>2</sub> (C) sowie auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (D) bei 20 °C. Die Linien dienen der Veranschaulichung.

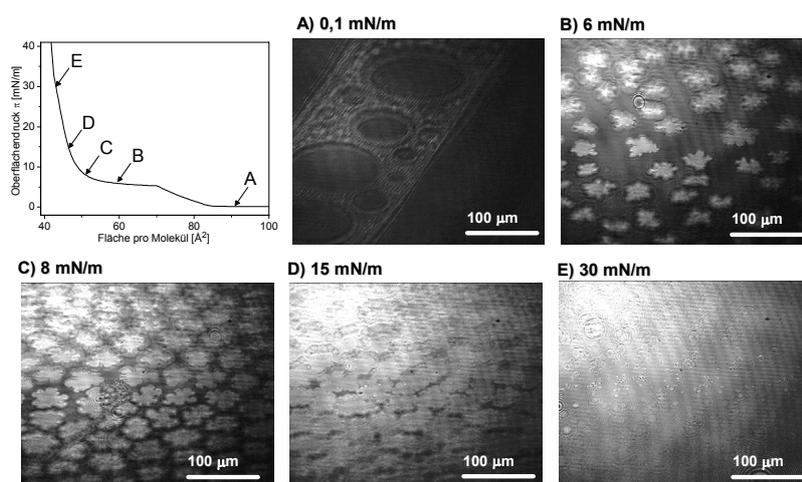
Bei den untersuchten Drücken ist DMG auf Wasser hexagonal gepackt, d. h., im *contour plot* wird nur ein Signal detektiert. Würden sich DMPE und DMG nicht mischen, müssten Diffraktionsreflexe von mindestens zwei Strukturen erkennbar sein. GIXD-Messungen zeigen jedoch, dass in dem Gemisch nur eine Struktur vorliegt. Demzufolge sind die beiden Lipid vollständig mischbar. Das führt zu einer Ladungsverdünnung im Vergleich zur reinen DMPE-Monoschicht. In Abbildung 25 sind die Neigungswinkel für DMPE/DMG auf CaCl<sub>2</sub> mit und ohne DNA dargestellt. Die kleineren Neigungswinkel im Vergleich zu reinem DMPE sind auf den geringen Platzbedarf der DMG-Kopfgruppe zurückzuführen. Dadurch werden die *van-der-Waals*-Wechselwirkungen zwischen den Lipidketten verstärkt. Auch bei diesem System führt die Präsenz von DNA und Calciumionen in der Subphase zu einer weiteren Reduktion des Neigungswinkels. GIXD-Messungen bei kleinen  $Q_{xy}$ -Werten führen zu genau den DNA-Abständen, die bei reinem DMPE oder DPPC auf der selben Subphase erhalten werden.

In der DMPE/DMG-Monoschicht auf wässrigen Lösungen von DNA und CaCl<sub>2</sub> liegt nur eine Gitterstruktur vor. D. h., DNA-Adsorption führt nicht zu einer Phasentrennung, in der DNA nur mit DMPE in Wechselwirkung tritt. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass  $d_{DNA}$  unabhängig von der Ladungsdichte der Lipidmonoschicht ist, jedoch stark von der Art des zweiwertigen Kations und der Präparation der Subphase abhängt.

### 5.1.5 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM)

#### *Morphologie der Lipiddomänen*

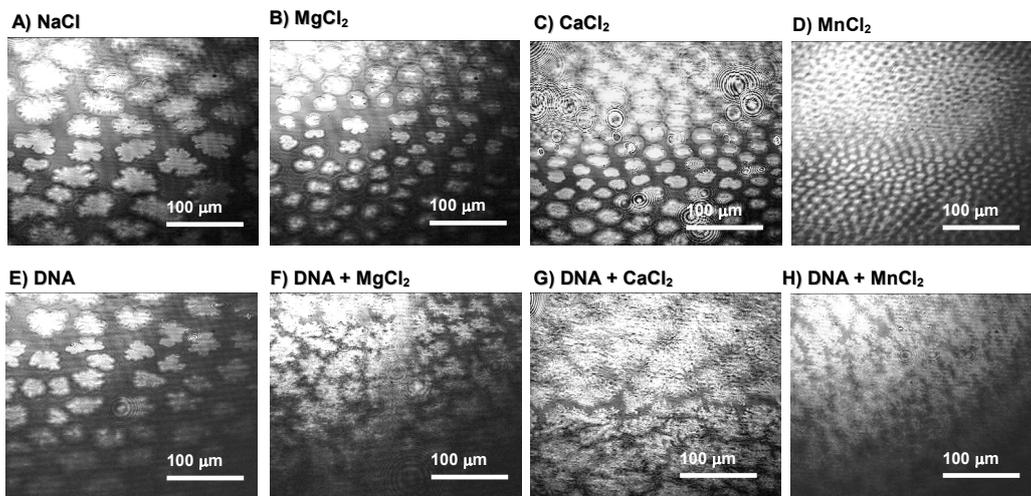
Brewsterwinkel-Mikroskopie wird verwendet, um Form und Größe von Lipiddomänen im LE/LC-Koexistenzgebiet zu untersuchen. Abbildung 26 zeigt die  $\pi/A$ -Isotherme von DMPE auf Lösungen von NaCl als auch die zugehörigen BAM-Aufnahmen bei ausgewählten Drücken.



**Abbildung 26:**  $\pi/A$ -Isotherme und BAM-Aufnahmen bei verschiedenen Drücken von DMPE auf einer NaCl-Lösung bei 20 °C.

Bei sehr kleinem Druck (vgl. Bild A) koexistieren Gebiete sehr niedriger Moleküldichte (Gasphase) mit Gebieten höherer Moleküldichte (flüssige Phase). Dies führt dazu, dass die Monoschicht einem zweidimensionalen Schaum ähnelt. Kurz nach Überschreiten des Hauptphasenumwandlungsdrucks  $\pi_c$  erscheinen helle Domänen (vgl. Bild B). Bei weiterer Kompression wachsen diese Domänen, bis sie sich berühren und verschmelzen (vgl. Bild C bis E). An dieser Stelle ist der nahezu horizontale Bereich der Isotherme beendet. Die Kompressibilität der Monoschicht nimmt stark ab. Die kristalline Natur dieser Domänen wurde mittels GIXD nachgewiesen.

BAM-Aufnahmen von DMPE auf verschiedenen Subphasen bei 7 mN/m werden in Abbildung 27 dargestellt. Der Vergleich der Bilder A, B, C und E zeigt, dass Calciumionen, Magnesiumionen oder DNA in der Subphase zu kleineren Domänen führt als bei DMPE auf NaCl-enthaltenden Lösungen, wobei sich die Form der Domänen in allen Fällen ähnelt. Befinden sich  $MnCl_2$  und NaCl in der Subphase, bilden sich wesentlich mehr Domänen, die viel kleiner und runder sind als auf Lösungen von NaCl. Offensichtlich setzen  $Mn^{2+}$ -Ionen die freie Energie, die für die Keimbildung notwendig ist, herab, womit die Zahl der Domänen steigt. Die runde Form der Domänen lässt auf eine erhöhte Linienspannung schließen.



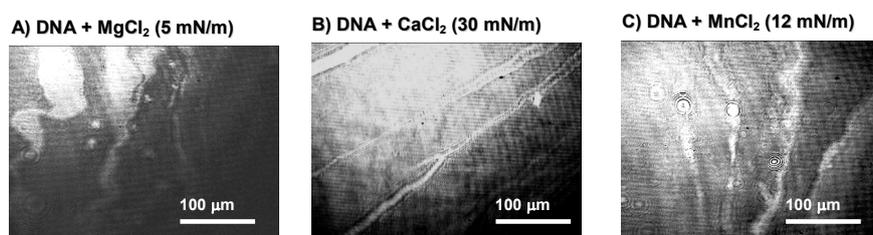
**Abbildung 27:** Ausgewählte BAM-Aufnahmen von DMPE auf NaCl (A), auf NaCl + MgCl<sub>2</sub> (B), NaCl + CaCl<sub>2</sub> (C), NaCl + MnCl<sub>2</sub> (D), Kalbsthymus-DNA + NaCl (E), Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (F), Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (G), Kalbsthymus-DNA + NaCl + MnCl<sub>2</sub> (H) bei 7 mN/m und 20 °C.

Sind zweiwertige Kationen und DNA in der Subphase, verändert sich die Domänenstruktur drastisch: Die Domänen sind stark ausgefranst, unregelmäßiger und die Grenzfläche zwischen den koexistierenden Phasen ist rauer und verschwommen.

Die Messungen der  $\pi/A$ -Isothermen haben gezeigt, dass DNA in die Lipidschicht penetriert. Dadurch stellt sie eine Verunreinigung in der Monoschicht dar, die das Wachstum der Domänen behindert.<sup>76</sup> Durch eine raue Phasengrenze kann diese Verunreinigung schneller entfernt werden. Auf diese Weise findet ein diffusionslimitiertes Wachstum der Domänen statt, das zu fraktalen Strukturen wie in Abbildung 27 F, G und H führt.

### ***Morphologie der DNA-Komplexe***

Die Präsenz der DNA an der Grenzfläche macht sich nicht nur durch die veränderte Morphologie der Lipiddomänen bemerkbar.

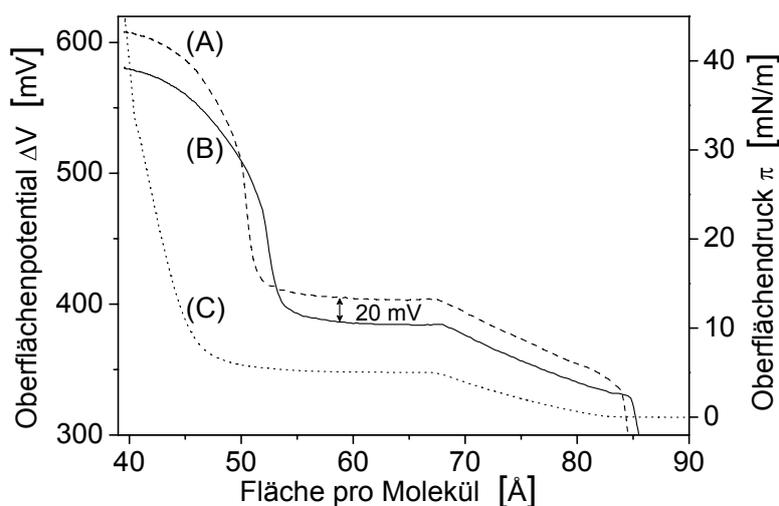


**Abbildung 28:** Visualisierung adsorbierter DNA: Ausgewählte BAM-Aufnahmen von DMPE auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (A), Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (B) sowie auf Kalbsthymus-DNA + NaCl + MnCl<sub>2</sub> (C) bei den angegebenen Drücken.

Bei den hellen Bereichen in Abbildung 28 handelt es sich um DNA-Aggregate, die sowohl bei niedrigen wie auch bei hohen Drücken beobachtet werden. Die drei BAM-Aufnahmen zeigen die Vielfältigkeit der Morphologie dieser Aggregate, wobei längliche Strukturen gehäuft auftreten. Während der Kompression der Lipidschicht kann das Domänenwachstum über den DNA-Aggregaten beobachtet werden. Diese Beobachtung geht konform mit den Ergebnissen der GIXD-Messungen, in denen festgestellt wurde, dass die DNA als separate Schicht unter der Lipidmonoschicht vorliegt.

### 5.1.6 V/A-Isothermen

Die bisher vorgestellten Ergebnisse widersprechen den bisherigen Annahmen, die von einem festen Verhältnis von DNA und zwitterionischem Lipid im Komplex angenommen wurde. GIXD-Messungen haben gezeigt, dass die DNA als eigenständige Schicht unter der Lipidschicht erscheint, jedoch nur, wenn zweiwertige Kationen anwesend sind. Dies ließe vermuten, dass sich die zweiwertigen Kationen zwischen die Phosphate der Kopfgruppen lagern und die zwitterionische Monoschicht so effektiv positiv laden. Das würde die DNA elektrostatisch anziehen. In diesem Fall sollte es auch ohne die Anwesenheit von DNA zu Veränderungen in der Orientierung der Phosphatgruppen durch Wechselwirkung mit zweiwertigen Kationen kommen. IRRAS-Messungen haben jedoch keinen Einfluss von zweiwertigen Kationen auf die DMPE-Monoschicht nachweisen können. Die Untersuchung des Oberflächenpotentials  $\Delta V$  soll Klarheit darüber bringen, ob die Monoschicht durch zweiwertige Kationen effektiv positiv geladen wird.



**Abbildung 29:** Oberflächenpotential als Funktion der molekularen Fläche von DMPE auf  $\text{MgCl}_2$  (A) sowie auf  $\text{NaCl}$  (B) und die  $\pi/A$ -Isotherme beider Subphasen (C) bei 20 °C.

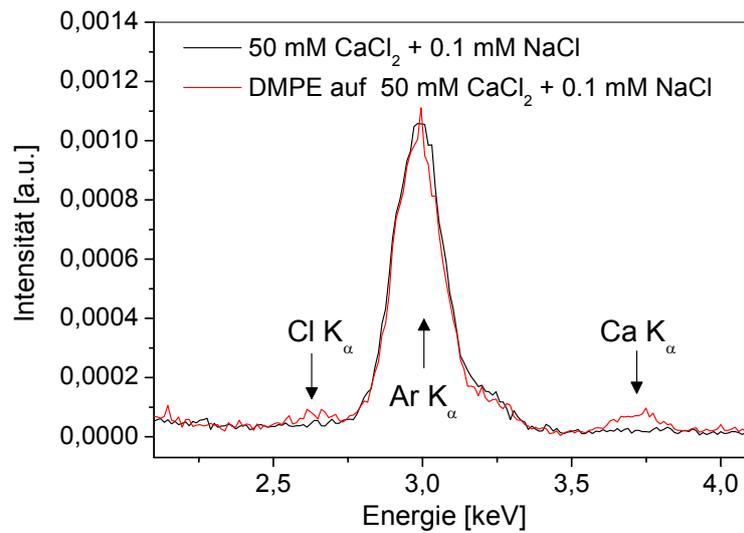
In Abbildung 29 sind die Oberflächenpotentiale wie auch der Lateraldruck von DMPE auf 1 mM NaCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> als Funktion der molekularen Fläche aufgetragen. Messungen von  $\Delta V$  bei  $\pi = 0$  haben keine Aussagekraft, da aufgrund von Heterogenitäten in der Monoschicht starke Fluktuationen zwischen Null und dem Anfangspotential auftreten können. Während der LE-Phase ändert sich  $\Delta V$  umgekehrt proportional zur Fläche. Aus Gleichung 4 (vgl. S. 25) ergibt sich, dass das Dipolmoment  $\mu$  pro Molekül dann konstant ist. D. h., dass sich in dieser Phase der Kompression lediglich die molekulare Dichte und nicht die Anordnung der Moleküle ändert. Nach Erreichen von  $\pi_c$  steigt  $\Delta V$  linear mit einem sehr geringen Anstieg. Dieser Abschnitt der  $V/A$ -Isotherme entspricht dem LE/LC-Koexistenzgebiet, wo sich  $\Delta V$  aus  $\Delta V = x_1 \cdot \Delta V_1 + x_2 \cdot \Delta V_2$  berechnet, mit den relativen Flächenanteilen  $x_1$  und  $x_2$  und den Potentialen der jeweiligen Phase  $\Delta V_1$  und  $\Delta V_2$ .<sup>76</sup> Weitere Kompression führt zu einem starken Anstieg von  $\Delta V$  aufgrund der Veränderung der Kopfgruppenorientierung und dem daraus resultierenden, veränderten Beitrag des Dipolmoments als auch aufgrund der hohen Dipoldichte in LC- und S-Phase.

Aus dem Vergleich der  $V/A$ -Isothermen in Abbildung 29 wird klar, dass das Oberflächenpotential von DMPE auf Subphasen, die MgCl<sub>2</sub> enthalten, nur 20 mV höher ist als das auf NaCl-Lösungen. Würden die Magnesiumionen zu einer effektiv positiven Ladung der Monoschicht beitragen, wäre ein wesentlich positiveres Oberflächenpotential zu erwarten. Eine Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration auf 50 mM führt zu einer geringfügigen (+ 4 mV) Verschiebung der  $V/A$ -Isothermen in Richtung positiver  $\Delta V$ -Werte verglichen mit DMPE auf 5 mM MgCl<sub>2</sub> (nicht dargestellt). Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass zweiwertigen Kationen nur in sehr geringer Zahl im Kopfgruppenbereich der Lipidmonoschicht präsent sind. Folglich wird das Lipid kaum effektiv positiv geladen.

### 5.1.7 Röntgenfluoreszenz (XRF)

Die Röntgenfluoreszenz-Technik ist eine sehr sensitive Methode mit der Ionen an der Wasser/Luft-Grenzfläche detektiert werden können. Auf diese Weise werden detailliertere Informationen über die Menge an zweiwertigen Kationen im Bereich der Kopfgruppe des Lipids gewonnen.

Bei XRF-Messungen von DMPE auf 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> wurde kein Signal detektiert. Erst eine Konzentrationserhöhung auf 50 mM CaCl<sub>2</sub> + 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> führt zu Fluoreszenzsignalen der Cl K <sub>$\alpha$</sub> - und Ca K <sub>$\alpha$</sub> -Strahlung mit extrem geringer Intensität (vgl. Abbildung 30) im Bereich der DMPE-Monoschicht. Das große Signal bei ca. 3 keV wird durch Argon aus der Atmosphäre erzeugt.



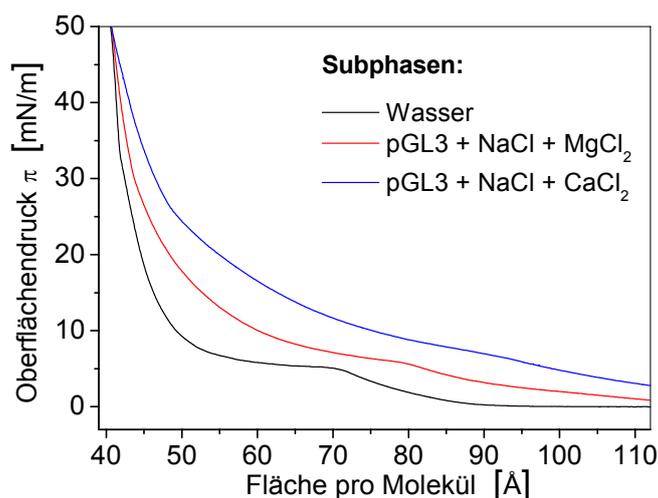
**Abbildung 30:** Röntgenfluoreszenz-Spektren von DMPE auf 50 mM CaCl<sub>2</sub> + 0,1 mM NaCl und von der Subphase ohne Lipid bei 20 mN/m und 20°C.

Dieses Ergebnis unterstützt die Resultate die mittels IRRAS, GIXD und Oberflächenpotentialmessungen erzielt wurden: die Konzentration der zweiwertigen Kationen im Grenzflächenbereich ist zu klein, um strukturelle Veränderungen in der Monoschicht hervorzurufen und diese merklich positiv zu laden.

## 5.2 Komplexe mit Plasmid-DNA

### 5.2.1 $\pi/A$ - Isothermen

Bei allen Experimenten an der Wasser/Luft-Grenzfläche, die mit dem Plasmid pGL3 durchgeführt wurden, sowie für die entsprechenden Referenzexperimente ohne pGL3 wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 10 mM zweiwertige Kationen, 100 mM NaCl und 0,1 mM pGL3. Die Berechnungen der pGL3-Konzentration basieren auf einem Durchschnittsgewicht der Nukleotide von 370 g/mol in der Annahme, dass das Monomer zu ca. 10 % hydratisiert ist. Sowohl das Plasmid als auch die zweiwertigen Kationen wurden immer in Kombination mit NaCl eingesetzt. Bei Verwendung des Plasmids in der Subphase folgte nach dem Spreiten von DMPE (1 mM) eine Adsorptionszeit von einer Stunde. Die Messungen wurden mit einer Kompressionsgeschwindigkeit von  $5 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}/\text{min}$  bei  $20 \text{ °C}$  durchgeführt.



**Abbildung 31:**  $\pi/A$  - Isothermen von DMPE auf Wasser (schwarz), pGL3 + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (rot) sowie auf pGL3 + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (blau) bei  $20 \text{ °C}$ .

In Abbildung 31 sind die  $\pi/A$ -Isothermen von DMPE auf Wasser sowie auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM pGL3 in Anwesenheit von 100 mM NaCl sowie 10 mM MgCl<sub>2</sub> beziehungsweise 10 mM CaCl<sub>2</sub> dargestellt. Die Isothermen auf den salinen Subphasen gleichen denen auf Wasser ( $\pi_c = 5,3 \text{ mN/m}$ ) und sind daher nicht separat aufgetragen. Beim Vergleich mit den Messungen aus Abschnitt 5.1.1 wird deutlich, dass die DMPE-Monoschicht auf Lösungen von Plasmid-DNA mit zweiwertigen Kationen stärker expandiert ist als in Gegenwart der genomischen DNA. Auf Subphasen, die pGL3 + MgCl<sub>2</sub> enthalten, erhöht sich der Hauptphasenumwandlungsdruck  $\pi_c$  des Lipids geringfügig auf ca.  $5,7 \text{ mN/m}$ . Die Phasenumwandlung zweiter Ordnung findet bei

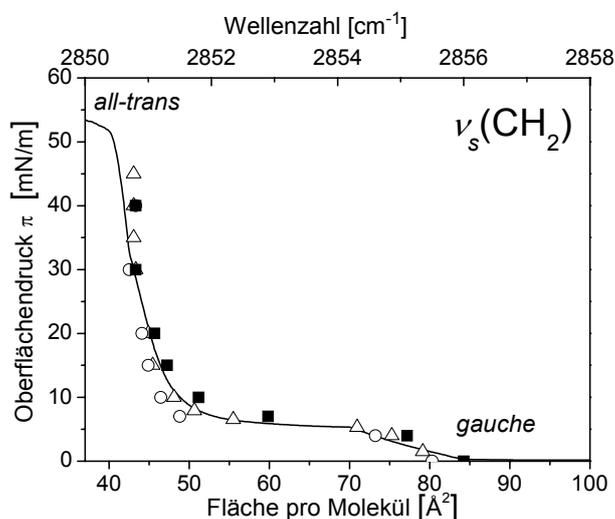
$\pi_s \approx 29$  mN/m statt. Auf wässrigen Lösungen von pGL3 und  $\text{CaCl}_2$  ist die DMPE-Monoschicht so stark expandiert, dass es schwierig ist, genaue Werte für  $\pi_c$  oder  $\pi_s$  zu ermitteln.

### 5.2.2 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

Analog zu den IRRAS-Messungen auf wässrigen Lösungen genomischer DNA (vgl. Abschnitt 5.1.2) wurden die Spektren mit Plasmid-DNA mit s-polarisiertem Licht unter einem Einfallswinkel von  $40^\circ$  aufgenommen. Da die Ergebnisse für die zwei verschiedenen DNA-Typen konform sind, werden in diesem Abschnitt nur die wichtigsten Resultate behandelt.

#### *CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen*

Die symmetrischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen von DMPE auf Wasser sowie auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM pGL3, 100 mM NaCl und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  bzw. 10 mM  $\text{CaCl}_2$  sind in Abbildung 32 gegen den Oberflächendruck aufgetragen.



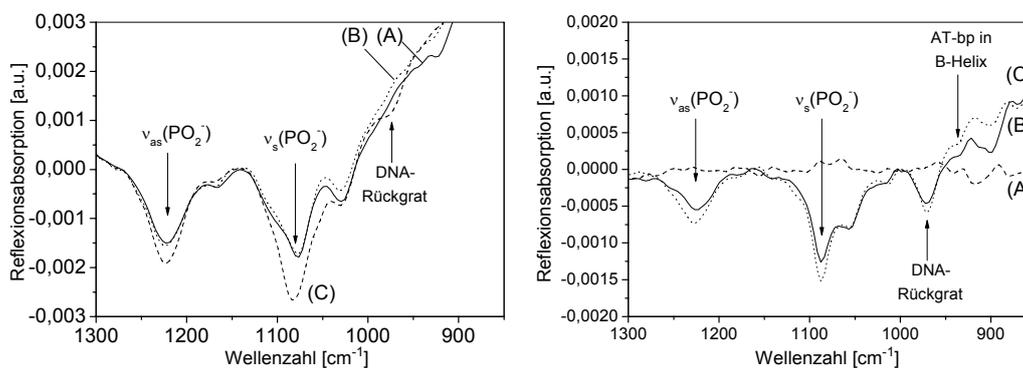
**Abbildung 32:** Symmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung bei verschiedenen Drücken von DMPE auf Wasser ( $\Delta$ ), pGL3 + NaCl +  $\text{MgCl}_2$  ( $\blacksquare$ ) und auf pGL3 + NaCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ( $\circ$ ) und  $\pi/A$ -Isotherme von DMPE auf Wasser bei  $20^\circ\text{C}$ .

Das Verhältnis der *all-trans*- und *gauche*-Konformationen in den Lipidketten unterscheidet sich bei verschiedenen Lateraldrücken nicht für die untersuchten Systeme.

Messungen auf Subphasen, die ausschließlich Salze oder Plasmid enthalten, zeigen keine Abweichungen von diesem Verhalten.

### **$PO_2^-$ -Streckschwingung und DNA-Adsorption**

Weder das Vorhandensein von  $MgCl_2$  bzw.  $CaCl_2$  (10 mM) noch von  $NaCl$  (100 mM) in der Subphase führen zu einer Veränderung der Position der asymmetrischen  $PO_2^-$ -Streckschwingung. Folglich findet keine Beeinflussung der Hydratation der Phosphatgruppe durch diese Ionen statt.



**Abbildung 33 (links):** IR-Spektren von DMPE auf Wasser (A), auf  $NaCl + MgCl_2$  (B) sowie auf  $pGL3 + NaCl + MgCl_2$  (C) bei 40 mN/m und 20 °C, aufgenommen unter einem Einfallswinkel von 40° mit s-polarisiertem Licht. **(rechts):** Differenzspektren von DMPE auf  $NaCl + MgCl_2$ / subtrahiert: DMPE auf  $NaCl$  (A), auf  $pGL3 + NaCl + CaCl_2$ / subtrahiert: DMPE auf  $NaCl + CaCl_2$  (B) und auf  $pGL3 + NaCl + MgCl_2$ / subtrahiert: DMPE auf  $NaCl + MgCl_2$  (C) bei 40 mN/m und 20 °C.

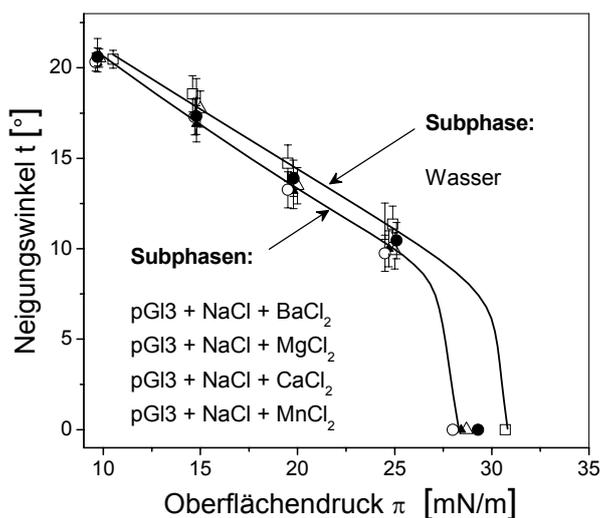
Aus Abbildung 33 (links) wird ersichtlich, dass die Intensität der Phosphatbanden bei Anwesenheit von DNA und zweiwertiger Kationen in der Subphase erhöht ist. Befindet sich DNA allein in der Subphase, erhöht sich die Intensität dieser Bande im Vergleich zu DMPE auf Wasser nicht. Sowohl DMPE als auch DNA enthalten Phosphatgruppen, die beide zu der Intensität der  $PO_2^-$ -Streckschwingungen beitragen. Folglich zeigt die Intensitätserhöhung der Phosphatbanden, dass DNA an der Grenzfläche adsorbiert ist.

Schwingungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat der Plasmid-DNA (B-Form) verursachen ab ca. 5 mN/m die charakteristische IR-Bande bei 970 cm<sup>-1</sup>. Die Differenzspektren in Abbildung 33 (rechts) zeigen durch Anwesenheit dieser Markerbande, dass  $pGL3$  nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen an der zwitterionischen Lipidschicht adsorbiert.

### 5.2.3 Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD)

#### Struktur der Lipidmonoschicht

In Abschnitt 5.1.4 wurde der Einfluss der Adsorption genomischer DNA im Zusammenspiel mit zweiwertigen Kationen auf die Struktur der Lipidschicht beschrieben. Analog zu diesen Ergebnissen weist DMPE auf allen untersuchten Subphasen mit und ohne Plasmid-DNA das gleiche Phasenverhalten während der Kompression auf: In der LC-Phase deuten drei Diffraktionspeaks auf ein schiefwinkliges Gitter hin (vgl. Abbildung 21). Durch Erhöhung des Lateraldrucks wird die  $L_2$ -Phase erreicht, in der zwei Diffraktionssignale bei  $Q_z^n = 0$  und  $Q_z^d > 0$  detektiert werden. Es liegt eine rechtwinklige Gitterstruktur vor, in der die Ketten zum nächsten Nachbarn geneigt sind. Bei hohen Drücken ist nur ein Signal bei  $Q_z = 0$  erkennbar, das auf ein hexagonales Gitter schließen lässt. In dieser LS-Phase stehen die Ketten senkrecht zur Wasseroberfläche ( $t = 0$ ).



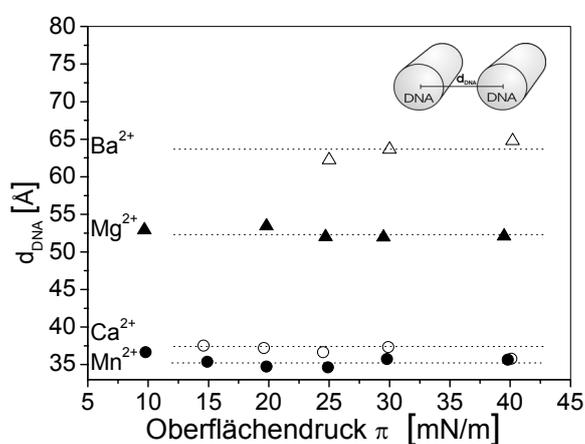
**Abbildung 34:** Neigungswinkel der Lipidketten als Funktion des Oberflächendrucks von DMPE auf Wasser ( $\square$ ), auf  $pGL3 + NaCl + BaCl_2$  ( $\triangle$ ),  $pGL3 + NaCl + MgCl_2$  ( $\blacktriangle$ ),  $pGL3 + NaCl + CaCl_2$  ( $\circ$ ) sowie auf  $pGL3 + NaCl + MnCl_2$  ( $\bullet$ ) bei 20 °C. Die Linien dienen der Veranschaulichung.

Der Neigungswinkel  $t$  der Lipidketten wird über die Position der Diffraktionspeaks berechnet (vgl. Tabelle 2). Abbildung 34 stellt  $t$  in Abhängigkeit von  $\pi$  für DMPE auf Wasser sowie auf wässrigen Lösungen des Plasmids pGL3 und zweiwertiger Kationen dar. Da sich die Neigungswinkel der Alkylketten sowohl auf den salinen Subphasen als auch auf reinen pGL3-Lösungen wie die auf Wasser verhalten, wurde die Darstellung auf die Ergebnisse für die Subphase Wasser beschränkt. Befinden sich pGL3 und zweiwertige Kationen in der Subphase, reduziert sich der Neigungswinkel für alle Arten

der untersuchten Ionen in ähnlichem Maße. Dies zeigt, dass Subphasen dieser Komposition einen kondensierenden Effekt auf die Lipidmonoschicht haben.

### Struktur der adsorbierten DNA

Liegen sowohl pGL3 als auch zweiwertige Kationen in der Subphase vor, treten bei sehr kleinen  $Q_{xy}$ -Werten Diffraktionspeaks auf, die durch geordnete Strukturen mit großen Netzebenenabständen verursacht werden. Folglich sind die adsorbierten pGL3-Moleküle unter diesen Bedingungen geordnet. Über  $d_{DNA} = 2\pi/Q_{xy}$  kann der Abstand zwischen parallelen DNA-Strängen berechnet werden.

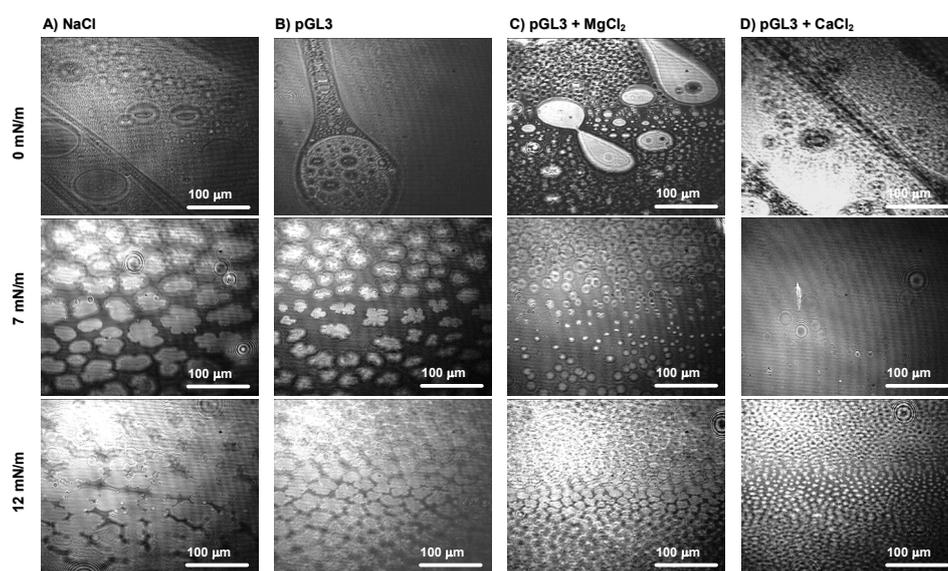


**Abbildung 35:** Interaxiale DNA-Abstände des Plasmids pGL3 als Funktion des Oberflächendrucks von DMPE auf Wasser ( $\square$ ), pGL3 + NaCl + BaCl<sub>2</sub> ( $\triangle$ ), pGL3 + NaCl + MgCl<sub>2</sub> ( $\blacktriangle$ ), pGL3 + NaCl + CaCl<sub>2</sub> ( $\circ$ ) und auf pGL3 + NaCl + MnCl<sub>2</sub> ( $\bullet$ ) bei 20 °C. Die Linien dienen der Veranschaulichung.

Abbildung 35 zeigt  $d_{DNA}$  bei verschiedenen Lateraldrücken der DMPE-Schicht auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM pGL3, 100 mM NaCl und 10 mM BaCl<sub>2</sub> bzw. MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> oder MnCl<sub>2</sub>. Während der Kompression des Lipidfilms ändert sich  $d_{DNA}$  nicht. Dementsprechend kann die adsorbierte Plasmid-DNA als eigenständige Schicht unter dem Lipidfilm betrachtet werden. Im Gegensatz zur Verringerung des Neigungswinkels der Alkylketten im Adsorptionsexperiment, hängen die interaxialen DNA-Abstände anscheinend von der Art des zweiwertigen Kations ab. Diese Beobachtung ist auf die unterschiedlich starke Komplexierung der DNA durch die verschiedenen Kationen zurückzuführen. Ionen, die wie Mn<sup>2+</sup> DNA-Moleküle stärker komplexieren, bewirken damit kleinere DNA-Abstände. Aus Abbildung 35 ergibt sich folgende Reihenfolge für den Grad der DNA-Komplexierung: Ba<sup>2+</sup> < Mg<sup>2+</sup> < Ca<sup>2+</sup> < Mn<sup>2+</sup>.

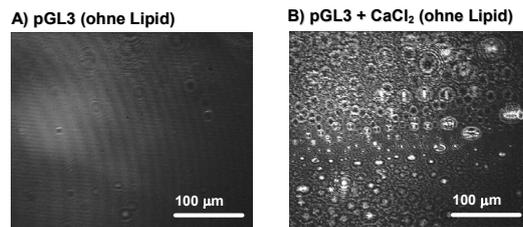
### 5.2.4 Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM)

Abbildung 36 zeigt ausgewählte BAM-Aufnahmen von DMPE auf wässrigen Lösungen von 100 mM NaCl sowie 0,1 mM pGL3 + 100 mM NaCl mit und ohne 10mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 0, 7 und 12 mN/m. Bei 0 mN/m sind auf NaCl- (A) und pGL3-haltigen Subphasen (B) die typischen schaumartigen Erscheinungsformen einer 2D-Gasphase erkennbar. Auf den Subphasen, die zweiwertige Kationen und pGL3 enthalten, finden sich bei diesem Druck sehr helle Bereiche. Diese Beobachtung ist der Penetration von DNA in die Monoschicht zuzuschreiben, die auch in den  $\pi/A$ -Isothermen als Expansion zu sehen ist.



**Abbildung 36:** Ausgewählte BAM-Aufnahmen von DMPE auf NaCl (A), pGL3 + NaCl (B), pGL3 + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (C) und auf pGL3 + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (D) bei 0, 7 bzw. 12 mN/m und 20 °C.

Entsprechend den Ergebnissen mit genomischer DNA führt pGL3 + NaCl in der Subphase bei 7 und 12 mN/m zu etwas kleineren DMPE-Domänen als NaCl allein. Ihre Form bleibt jedoch erhalten. Die zusätzliche Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> bewirkt im Vergleich zur reinen NaCl-Subphase drastische Veränderungen in der Morphologie der Lipiddomänen: Sie treten in größerer Zahl auf und sind wesentlich kleiner und runder. Dieser Effekt ist bei DMPE auf Lösungen von pGL3 und CaCl<sub>2</sub> noch deutlicher zu erkennen als mit MgCl<sub>2</sub>. Offenbar wird die freie Energie, die für die Keimbildung notwendig ist, auf diesen Subphasen herabgesetzt und die Linienspannung der Domänen erhöht.



**Abbildung 37:** BAM-Aufnahmen der Subphasen A ( $pGL3 + NaCl$ ) und B ( $pGL3 + NaCl + MgCl_2$ ) in Abwesenheit einer Lipidmonoschicht bei 20°C.

DNA-Aggregate wie sie in Anwesenheit genomischer DNA und zweiwertiger Kationen in der Subphase auftreten (vgl. Abbildung 28) werden in dieser Form mit Plasmid-DNA nicht beobachtet. Jedoch tauchen auf der Subphase mit pGL3 und zweiwertigen Kationen ohne Lipidmonoschicht kleine weiße Flecken auf (vgl. Abbildung 37). Diese Beobachtung ist reproduzierbar und damit nicht einer verunreinigten Subphase oder Wasseroberfläche zuzuschreiben. Die weißen Flecken sind deshalb der Plasmid-DNA zuzuordnen. Bei Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 37 °C verschwinden diese Flecken. Abkühlung auf 20 °C lässt sie wieder erscheinen.

### 5.3 Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (Teil I)

**Tabelle 3:** Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse des Teil I: Struktur von Komplexen aus DNA, zweiwertigen Kationen ( $Me^{2+}$ ) und zwitterionischem Lipid (DMPE).

Methoden	Resultate
<b>Komplexe aus genomischer DNA und DMPE</b>	
$\pi/A$ -Isothermen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Die Adsorption von DNA in Anwesenheit von <math>Ba^{2+}</math>, <math>Mg^{2+}</math> oder <math>Ca^{2+}</math> bewirkt keine signifikante Änderung von <math>\pi_c</math> verglichen mit DMPE auf Wasser (<math>\pi_c = 5</math> mN/m).</li> <li>Die Gegenwart von DNA und <math>Mn^{2+}</math> in der Subphase verursacht eine Verringerung von <math>\pi_c</math> auf 3 mN/m.</li> <li>Auf wässrigen Lösungen von DNA und den Ionen der Erdalkalimetalle ist die Monoschicht expandiert. → DNA penetriert in die Lipidschicht.</li> </ul>
IRRAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Der Anteil an <i>all-trans</i>- Konformeren des DMPE ist auf Wasser und auf Subphasen mit DNA und <math>Me^{2+}</math> gleich. → Der Ordnungszustand der Lipidketten ist gleich</li> <li><math>Me^{2+}</math> gehen keine messbare Wechselwirkungen mit der Kopfgruppe ein → Es erfolgt keine Dehydratation der Phosphatgruppe durch <math>Me^{2+}</math>.</li> <li>Die Adsorption von DNA an DMPE findet nur in Gegenwart von <math>Me^{2+}</math> in der Subphase statt.</li> <li>Die Konformation der B-DNA wird durch die Anwesenheit von <math>Me^{2+}</math> nicht verändert.</li> <li>Ohne Lipid tritt DNA + <math>CaCl_2</math> nach ca. 24 h an der Grenzfläche auf. (Dies geschieht nicht ohne <math>CaCl_2</math>.)</li> </ul>
XR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Die Dicke der adsorbierten DNA-Schicht beträgt 18 – 19 Å.</li> </ul>
GIXD	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>Me^{2+}</math> allein haben keinen Einfluss auf den Neigungswinkel der Alkylketten.</li> <li><math>Ba^{2+}</math>, <math>Mg^{2+}</math> und <math>Ca^{2+}</math> verringern in Verbindung mit DNA den Neigungswinkel der Ketten. → Subphasen dieser Komposition haben einen kondensierenden Effekt auf die geordneten Bereiche der DMPE-Monoschicht.</li> <li>DNA + <math>Mn^{2+}</math> in der Subphase haben einen noch stärkeren kondensierenden Effekt als DNA + <math>Ba^{2+}</math>, <math>Mg^{2+}</math> oder <math>Ca^{2+}</math>.</li> <li>DNA adsorbiert nur in Anwesenheit von <math>Me^{2+}</math> geordnet.</li> <li>Der Abstand <math>d_{DNA}</math> zwischen den DNA-Strängen ist abhängig von der Größe der DNA-Fragmente sowie von der Art der zweiwertigen Kationen (<math>Ba^{2+} &lt; Mg^{2+} &lt; Ca^{2+} &lt; Mn^{2+}</math>). → Die DNA wird durch <math>Me^{2+}</math> komplexiert.</li> <li>Die Kompression des Lipids führt nicht zur Verringerung von <math>d_{DNA}</math>. → DNA liegt als separate Schicht unter dem Lipid vor.</li> </ul>
BAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durch DNA-Adsorption wird die Morphologie der Lipiddomänen verändert. → Sie sind stark ausgefranst.</li> <li>Bei allen Lateraldrücken sind längliche DNA-Aggregate erkennbar.</li> <li>Domänenwachstum findet über den DNA-Aggregaten statt. → DNA befindet sich als Schicht unter dem Lipid.</li> </ul>
$\Delta V/A$ -Isothermen	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>Me^{2+}</math> laden die Lipidschicht nachweislich nicht positiv auf. → Es erfolgt keine Verbrückung der Phosphate in den Kopfgruppen durch <math>Me^{2+}</math>.</li> </ul>
XRF	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>Me^{2+}</math> sind in Konzentrationen von 5 mM nicht im Bereich der Monoschicht nachweisbar.</li> </ul>

---



---

**Komplexe aus dem Plasmid pGL3 und DMPE**

---

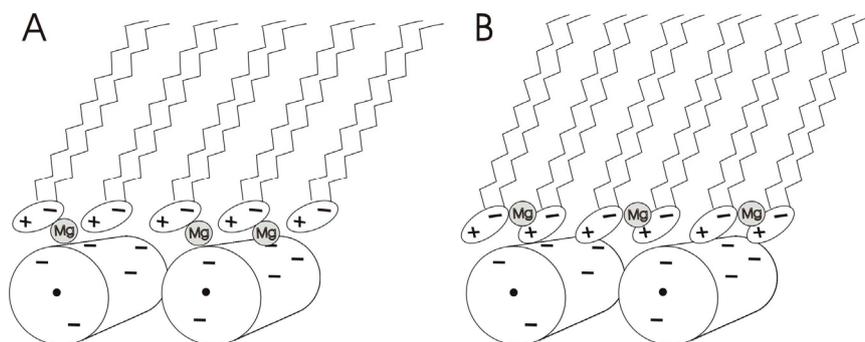
$\pi/A$ - Isothermen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• In Gegenwart von pGL3 und <math>Mg^{2+}</math>- bzw. <math>Ca^{2+}</math>- Ionen in der Subphase ist die Monoschicht expandiert → pGL3 penetriert in die Monoschicht.</li> <li>• Mit <math>Ca^{2+}</math> und pGL3 in der Subphase ist die Expansion der Monoschicht stärker als mit <math>Mg^{2+}</math> und pGL3.</li> </ul>
IRRAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pGL3 + <math>Me^{2+}</math> verändern nicht den Anteil an <i>all-trans</i>- Konformeren verglichen mit DMPE auf Wasser. → Der Ordnungszustand der Alkylketten ist gleich.</li> <li>• <math>Me^{2+}</math> gehen keine messbare Wechselwirkungen mit der Kopfgruppe ein → Es erfolgt keine Dehydratation der Phosphatgruppe durch <math>Me^{2+}</math>.</li> <li>• Die Konformation der B-DNA wird durch <math>Me^{2+}</math> nicht verändert.</li> </ul>
GIXD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der Neigungswinkel der Ketten wird in Verbindung mit pGL3 und <math>Ba^{2+}</math>, <math>Mg^{2+}</math>, <math>Ca^{2+}</math> oder <math>Mn^{2+}</math> in gleichem Maße verringert. → Subphasen dieser Komposition haben einen kondensierenden Effekt auf die geordneten Bereiche der DMPE-Monoschicht.</li> <li>• Die Adsorption von pGL3 an die DMPE-Monoschicht findet nur in Gegenwart von <math>Me^{2+}</math> geordnet statt.</li> <li>• <math>d_{DNA}</math> ist abhängig von der Art der zweiwertigen Kationen (<math>Ba^{2+} &lt; Mg^{2+} &lt; Ca^{2+} &lt; Mn^{2+}</math>). → DNA wird durch <math>Me^{2+}</math> komplexiert.</li> <li>• Die Kompression der Lipidmonoschicht führt nicht zur Verringerung von <math>d_{DNA}</math> → DNA liegt als separate Schicht unter dem Lipid vor.</li> </ul>
BAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Adsorption des Plasmids pGL3 verändert die Morphologie der Lipidnänen. → Sie sind kleiner und runder.</li> <li>• Ohne Lipid tritt pGL3 in Gegenwart von <math>Ca^{2+}</math> als punktförmiges, helles Aggregat an der Grenzfläche auf. (Ohne <math>Ca^{2+}</math> in der Subphase geschieht dies nicht.)</li> </ul>

---

## 5.4 Diskussion

Die vorgestellten Monoschichtexperimente belegen, dass DNA nur beim Vorliegen zweiwertiger Kationen in der Subphase an der zwitterionischen DMPE-Monoschicht adsorbiert. Diese Erkenntnis geht konform mit früheren Arbeiten, in denen Grundlagen dieser Wechselwirkung im Volumensystem untersucht wurden.<sup>23,104,107-110</sup> Aus diesen Experimenten wurde geschlussfolgert, dass in dem gebildeten Komplex ein festes Verhältnis von DNA-Phosphaten, Lipidkopfguppen und zweiwertigen Kationen vorliegen muss. Zwei Mechanismen der Komplexbildung wurden dabei in Betracht gezogen (vgl. Abbildung 38):

- Modell A Die Phosphate der Lipidkopfguppe werden mit denen der DNA durch zweiwertige Kationen verknüpft.
- Modell B Zweiwertige Kationen neutralisieren die Phosphate der Kopfgruppe. Durch die verbleibenden Aminogruppen ist die Monoschicht effektiv positiv geladen. Die DNA wird von dieser insgesamt positiv geladenen Schicht elektrostatisch angezogen.



**Abbildung 38:** Modelle A und B als mögliche Mechanismen für die Kopplung von DNA an zwitterionische Monoschichten durch zweiwertige Kationen.

In der folgenden Diskussion wird gezeigt, dass weder Modell A, noch Modell B die Grundlagen der DNA/Lipid-Wechselwirkung an der Wasser/Luft-Grenzfläche hinreichend beschreibt. Es wird Modell C vorgestellt, dass sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen an der Wasser/Luft-Grenzfläche ergibt.

### 5.4.1 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die DMPE-Monoschicht

In der Annahme, dass Modell B auf die DNA/Lipid-Wechselwirkung zutrifft, kann man davon ausgehen, dass zweiwertige Kationen die Phosphate der Kopfgruppen neutralisieren. Folglich würde die zwitterionische DMPE-Monoschicht allein durch die Gegenwart zweiwertiger Kationen in der Subphase effektiv positiv geladen werden.

Bei der Wechselwirkung zweiwertiger Kationen mit den Phosphatgruppen der Lipidköpfe ist zu erwarten, dass die Phosphatgruppen partiell dehydratisiert werden. In den IR-Messungen würde diese Dehydratation durch eine Verschiebung der Position der  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ -Banden zu höheren Wellenzahlen erkennbar sein. Die IRRA-Spektren von DMPE auf wässrigen Subphasen, die zweiwertige Kationen enthalten, gleichen jedoch denen von DMPE auf Wasser. Eine Wechselwirkung zwischen den Kationen und den Kopfgruppen wurde nicht beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Experimenten von Flach *et al.* sowie von Binder und Zschörnig.<sup>113,118</sup> Sie beobachteten eine Verschiebung der  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ -Banden des zwitterionischen POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin) bzw. DPPC (1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholin) zu höheren Wellenzahlen, wenn Calcium- oder Magnesiumionen in der Subphase präsent waren. Diese Bandenverschiebung deutet auf eine partielle Dehydratation der Phosphatgruppe durch Wechselwirkung mit den Ionen der Erdalkalimetalle. Unter anderem stellte die Arbeitsgruppe fest, dass  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  die Position der asymmetrischen  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingungen zu kleineren Wellenzahlen verschieben. Sie schlussfolgerten daraus, dass bei diesen Ionen eine relativ starke Wechselwirkung mit den nicht veresterten Sauerstoffatomen auftritt.

Über den Grund, warum diese partielle Dehydratation der Phosphatgruppe durch zweiwertige Kationen nicht bei DMPE erkennbar ist, lässt sich nur mutmaßen. Möglicherweise ist die positive Ladung des Stickstoffatoms beim Phosphatidylcholin stärker durch die gebundenen Methylgruppen abgeschirmt. Bei der Aminogruppe des Phosphatidylethanolamins ist dies nicht der Fall, was zu einer stärkeren elektrostatischen Abstoßung der Kationen führen könnte.

Mit keiner der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden wurden zweiwertige Kationen in Konzentrationen von 5 – 10 mM im Grenzflächenbereich detektiert. Die Messung des Oberflächenpotentials  $\Delta V$  zeigt, dass  $\Delta V$  von DMPE auf Lösungen von 5 mM  $\text{MgCl}_2$  um nur 20 mV größer ist als auf Lösungen von 1 mM NaCl. Aus GIXD-Messungen ist bekannt, dass die Strukturen des Lipids auf den beiden Subphasen gleich sind. Damit ist auch ihr Beitrag des Dipolmoments gleich. Änderungen von  $\Delta V$  sind daher nur bei veränderten Ladungsverhältnissen zu erwarten. Bleiben die Ladungsverhältnisse gleich, ändert sich  $\Delta V$  nicht. Die verschwindend geringe Änderung des Oberflächenpotentials reicht nicht aus, um einer effektiv positiven Aufladung der zwitterionischen Monoschicht durch zweiwertige Kationen zu entsprechen. Auch

Röntgenfluoreszenzmessungen zeigen keine Präsenz der untersuchten Kationen im Kopfgruppenbereich der Lipidmonoschicht.

Zusätzlich wäre bei der Umladung der Monoschicht, wie sie in Modell B stattfinden soll, zu erwarten, dass sich der Platzbedarf der Kopfgruppen verändert und damit die Neigungswinkel der Lipidketten variiert werden. GIXD-Messungen von DMPE auf Wasser und auf wässrigen Lösungen zweiwertiger Kationen weisen im Rahmen der Fehlergrenzen jedoch die gleichen Neigungswinkel auf. Demzufolge liefert Modell B keine hinreichende Beschreibung für die DNA/Lipid-Wechselwirkung.

#### 5.4.2 Komplexierung der DNA durch zweiwertige Kationen

IRRAS-Messungen haben gezeigt, dass die Adsorption von DNA in Gegenwart der untersuchten zweiwertigen Kationen ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ ) zu der charakteristischen DNA-Bande bei  $970\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum führt.

Zweiwertige Kationen können DNA komplexieren. Duguid *et al.* stellten mittels Raman-Spektroskopie fest, dass zweiwertige Übergangsmetalle ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ ) die größten strukturellen Veränderungen in der B-DNA hervorrufen.<sup>117</sup> Störungen im Carbonylbereich sind meist Folgen einer metallinduzierten Denaturierung der DNA-Doppelhelix, die sich an entsprechenden spektralen Veränderungen erkennen lässt. Das deutet daraufhin, dass die Metallionen die Basen der denaturierten DNA verknüpfen. Die Wechselwirkungen der Übergangsmetallionen mit den DNA-Phosphaten sind viel schwächer als mit den Basen. Das Raman-Spektrum der B-DNA wird durch  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  und  $\text{Ba}^{2+}$  kaum beeinflusst. Dies lässt auf eine schwächere Wechselwirkung der Erdalkalimetalle mit den Basen als auch den Phosphaten der DNA im Vergleich zu den Übergangsmetallen schließen.

**Tabelle 4:** Ionenradius und hydrodynamischer Radius zweiwertiger Kationen.<sup>119</sup>

Ion	Ionenradius	Hydrodynamischer Radius
$\text{Mg}^{2+}$	0,065 nm	0,431 nm
$\text{Ca}^{2+}$	0,099 nm	0,412 nm
$\text{Ba}^{2+}$	0,135 nm	0,404 nm
$\text{Mn}^{2+}$	0,091 nm	

Wechselwirkungen zwischen DNA und Metallkationen sowie deren Effekte auf die Struktur der DNA wurden mit einer Anzahl verschiedenen Techniken untersucht: Sedimentations-Gleichgewichtsmessungen, UV-Vis-Spektrophotometrie, Circular-Dichroismus, Vibrations-Spektrometrie und NMR-Spektroskopie. Diese Methoden

kommen einstimmig zu dem Ergebnis, dass die Metallionen der folgenden Elemente in der aufgeführten Reihenfolge eher mit den Basen als mit den Phosphatgruppen der DNA wechselwirken: Hg > Cu > Pb > Cd > Zn > **Mn** > Ni > Co > Fe > **Ca** > **Mg** > **Ba**.

Auch die in dieser Arbeit durchgeführten GIXD-Messungen haben gezeigt, dass der Abstand zwischen parallelen DNA-Strängen von der Art der zweiwertigen Kationen abhängig ist. Der größte Abstand wurde in Verbindung mit Ba<sup>2+</sup> in der Subphase gemessen, gefolgt von Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup>. Trotzdem diese Abfolge mehrfach nachgewiesen wurde, ist weiterhin unklar, warum z. B. Bariumionen den geringsten Grad der Komplexbildung mit der DNA aufweisen. Weder die Reihenfolge der Größe der Ionenradien noch die der hydrodynamischen Radien (vgl. Tabelle 4) stimmen mit der experimentell ermittelten Reihenfolge überein. Die ermittelte Reihenfolge lässt sich weder durch die Größe der Ionenradien noch die der hydrodynamischen Radien erklären. Der geringere interaxiale DNA-Abstand in Verbindung mit Calciumionen im Vergleich zu Magnesiumionen könnte auf den kleineren hydrodynamischen Radius der Calciumionen zurückgeführt werden. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der schwächeren Komplexierung der DNA durch Bariumionen im Vergleich zu Calciumionen, obwohl erstere den kleinsten hydrodynamischen Radius aufweisen.

Neben der Art der zweiwertigen Kationen ist der interaxiale DNA-Abstand auch von der Länge der DNA-Fragmente abhängig. GIXD-Messungen haben gezeigt, dass  $d_{DNA}$  beim Vergleich separat präparierter Subphasen der gleichen Konzentrationen unterschiedliche Werte annimmt. Messungen verschiedener zwitterionischer Lipide auf der selben Subphase wiesen gleiche DNA-Abstände auf. Die Ursache für diese Beobachtungen liegt in der Präparation der Subphase. Verschiedene Geometrien der Rührfische, unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten oder Rührzeiten können dazu führen, dass der Anteil von langen und kurzen DNA-Fragmenten bei jeder Präparation variiert. Mittels Raman-Spektroskopie wurde gezeigt, dass durch Calciumionen induzierte strukturelle Veränderung bei genomischer Kalbsthymus-DNA (> 23 kb) wesentlich stärker waren als bei mononucleosomalen DNA-Fragmenten (160 bp).<sup>117</sup> Damit ist der Einfluss zweiwertiger Kationen auf größere DNA-Moleküle stärker als der auf kleinere Fragmente, wodurch sich kleinere Werte für  $d_{DNA}$  ergeben. Metalle mit sehr starker Affinität zu den Basen stören die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren, destabilisieren somit die B-Form der DNA und stabilisieren alternative Strukturen. Umgekehrt stabilisieren Kationen mit starker Affinität zu den Phosphaten die B-DNA, offensichtlich durch Ladungsneutralisation ihres Zuckerphosphatrückgrats.<sup>117</sup> In der Annahme, dass Manganionen die B-DNA destabilisieren, sollten IRRAS-Messungen zu einer Aufspaltung der Markerbande bei 970 cm<sup>-1</sup> führen:<sup>117</sup> Sowohl für A-DNA als auch für Z-DNA würde sich ein Triplet bei 977, 968 und 952 cm<sup>-1</sup> bzw. bei 970, 951 und 925 cm<sup>-1</sup> ergeben.<sup>82</sup> Bei den durchgeführten IR-Experimenten wurde jedoch keine Aufspaltung dieser DNA-Bande beobachtet wenn DNA und Mn<sup>2+</sup> in der Subphase gelöst

sind. Ein Konzentrationseffekt ist auszuschließen, da die eingesetzte Mangankonzentration 50 mal höher ist als die der DNA. Möglicherweise spielt hier die Anwesenheit von 1 mM NaCl eine Rolle. Jedoch haben die GIXD-Messungen gezeigt, dass Manganionen eine besondere Stellung bei der Bildung des DNA/Lipid-Komplexes einnehmen. Diese Beobachtung wird später im Zusammenhang mit der Verringerung der Neigungswinkel diskutiert.

### **5.4.3 Vergleichende Betrachtung von genomischer DNA und Plasmid-DNA**

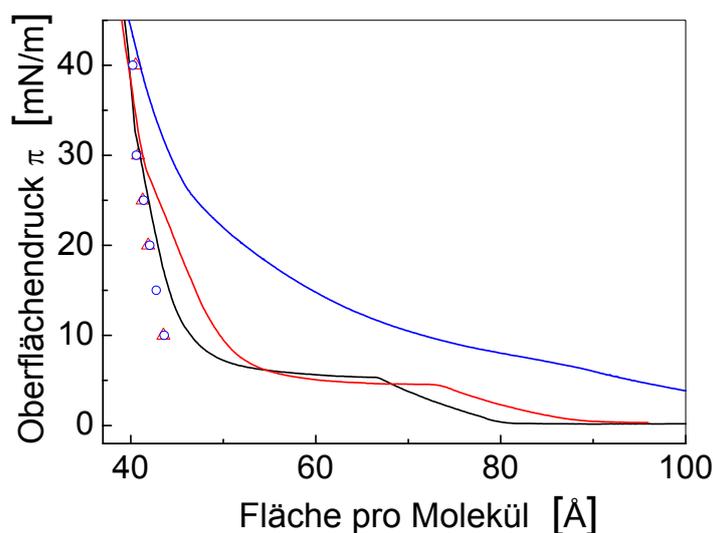
#### ***Adsorption von DNA an der Wasser/Luft-Grenzfläche***

In Gegenwart der zwitterionischen DMPE-Monoschicht in der Gasphase wird die durch zweiwertige Kationen komplexierte, genomische DNA nach ca. 24 h an der Wasser/Luft-Grenzfläche mittels IRRAS detektiert. BAM-Aufnahmen einer Subphase, die pGL3 sowie zweiwertige Kationen enthält, zeigen ohne Lipidmonoschicht schon nach wenigen Minuten weiße Flecken, die anscheinend dem komplexierten Plasmid pGL3 zuzuordnen sind. Sind die zweiwertigen Kationen nicht vorhanden, ist diese Grenzflächenaktivität nicht zu beobachten. Folglich führt die Bildung von Komplexen aus DNA und zweiwertigen Kationen zu Bereichen, die aufgrund der Ladungsneutralisierung der Phosphatgruppen durch die Kationen ungeladen sind. Aufgrund der verstärkten Hydrophobizität der Komplexe werden diese von der Wasser/Luft-Grenzfläche sowie von den Lipidketten angezogen. Da kleinere Strukturen wie Plasmide schneller diffundieren, werden sie auch früher mittels BAM detektiert. Die Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 37 °C führt zum Verschwinden dieser Flecken. Die Temperaturniedrigung auf 20 °C lässt sie wieder erscheinen. Möglicherweise führt die durch Temperaturerhöhung größer gewordene Dissoziationskonstante dazu, dass effektiv weniger zweiwertige Kationen die DNA komplexieren. Dadurch bilden sich weniger ungeladene Bereiche im Komplex. Somit würde die DNA nicht mehr von der Wasser/Luft-Grenzfläche oder den Lipidketten angezogen werden.

#### ***Penetration der DNA in die Lipidmonoschicht***

Die Präsenz der zwitterionischen DMPE-Monoschicht scheint die Adsorption der DNA an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu stimulieren. Offensichtlich werden die negativen Ladungen des DNA-Komplexes von der Monoschicht elektrostatisch angezogen. Auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Lipidketten und den ungeladenen Bereichen der DNA-Komplexe könnten die Ursache für die beschleunigte Adsorption der DNA an der Grenzfläche in Gegenwart der Monoschicht sein.

Im Vergleich zu den  $\pi/A$ -Isothermen von DMPE auf Wasser sind die auf Lösungen mit den Ionen der Erdalkalimetalle und genomischer DNA oder Plasmid-DNA zu größeren molekularen Flächen verschoben. In Abbildung 39 sind sowohl die Kompressionsisothermen als auch die durch Röntgendiffraktion ermittelten Flächen  $A_{xy}$  in Abhängigkeit des Lateraldrucks  $\pi$  aufgetragen. Die molekularen Flächen  $A_{xy}$  für DMPE auf Lösungen der genomischen DNA sowie der Plasmid-DNA in Gegenwart zweiwertiger Kationen sind vergleichbar mit den  $A_{xy}$ -Werten von DMPE auf Wasser: Bei 20 mN/m beträgt die Fläche  $A_{xy}$  eines DMPE-Moleküls mit zwei Lipidketten auf Wasser  $42,4 \text{ \AA}^2$ . Auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM CaCl<sub>2</sub> sowie von 0,1 mM pGL3 + 100 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> nimmt ein Lipidmolekül eine Fläche von  $A_{xy} = 42,0 \text{ \AA}^2$  ein. Dieser  $A_{xy}$ -Wert ist etwas geringer als der von DMPE auf Wasser, da die Lipidketten aufgrund ihres kleineren Neigungswinkels einen geringeren Platzbedarf haben.



**Abbildung 39:**  $\pi/A$ -Isothermen von DMPE auf Wasser (schwarz), auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM CaCl<sub>2</sub> (rot) und auf 0,1 mM pGL3 + 100 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> (blau) sowie die mittels GIXD bestimmten realen molekularen Flächen  $A_{xy}$  von DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM CaCl<sub>2</sub> (O) und auf 0,1 mM pGL3 + 100 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> ( $\Delta$ ).

Dennoch sind die durch GIXD-Messungen ermittelten molekularen Flächen wesentlich kleiner als die, die durch die Messungen der Kompressionsisothermen erhalten werden: Bei 20 mN/m beträgt die in den  $\pi/A$ -Isothermen gemessene molekulare Fläche  $A$  von DMPE auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM CaCl<sub>2</sub>  $45 \text{ \AA}^2$ . Auf Lösungen von 0,1 mM pGL3 + 100 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> ergibt sich bei diesem Druck eine Fläche von  $A = 52,3 \text{ \AA}^2$ . Es besteht also ein Unterschied zwischen den molekularen Flächen, die durch GIXD und  $\pi/A$ -Isothermen ermittelt

werden. Die Ursache für diese scheinbare Diskrepanz liegt darin, dass mittels Röntgendiffraktion nur geordnete Strukturen in der Lipidschicht detektiert werden, während bei der Messung der Kompressionsisothermen der Platzbedarf aller in der Monoschicht vorliegender Moleküle gemessen wird. Damit werden auch Lipide in ungeordnetem Zustand sowie penetrierte DNA-Moleküle detektiert. Die Differenzen der Flächenwerte, die durch die beiden Methoden ermittelt werden deuten daher daraufhin, dass ein heterogenes System vorliegt.

Die  $\pi/A$ -Isotherme von DMPE auf wässrigen Lösungen von 0,1 mM genomischer DNA, 1 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub> weist einen Knick bei ca. 28 mN/m auf, der aus einer Phasenumwandlung zweiter Ordnung resultiert. Ab diesem Druck korrespondiert die Isotherme mit der von DMPE auf Wasser. Das zeigt, dass die penetrierten DNA-Moleküle aus der Monoschicht gedrückt werden. Die Kompressionsisotherme von DMPE auf Lösungen von 0,1 mM pGL3, 100 mM NaCl und 10 mM CaCl<sub>2</sub> ist wesentlich expandierter als die mit genomischer DNA. Offensichtlich ist das Herausdrücken der Plasmid-DNA schwieriger. Durch ihre ringförmigen Struktur, die auch in sich verdreht sein kann (*super coiled*), ist Plasmid-DNA relativ stabil und nicht so flexibel wie genomische DNA. Deshalb könnte sich die Plasmid-DNA auch bei höheren Oberflächendrücken länger an der Grenzfläche/in der Lipidmonoschicht halten. Auch eine höhere Grenzflächenaktivität der Plasmid-DNA kann der starken Penetration in die Lipidschicht zugrunde liegen. Es ist außerdem denkbar, dass die Desorptionskinetik der Plasmid-DNA aufgrund ihrer stabilen Struktur wesentlich langsamer ist, als die der genomischen DNA. Weiterhin formt genomische DNA mit zweiwertigen Kationen Komplexe, die wesentlich größer sind als die mit Plasmid-DNA. Die größeren Komplexe diffundieren nicht nur langsamer, sie lassen sich auch leichter aus der Monoschicht herausdrücken.

Bei geringen Drücken kann die penetrierte DNA weder mit IRRAS noch mit GIXD nachgewiesen werden. Erst ab ca. 5 mN/m, dem Beginn des LE/LC-Koexistenzgebietes, wird die charakteristische DNA-Bande bei 970 cm<sup>-1</sup> im IR-Spektrum sichtbar. Möglicherweise kann im IR-Spektrum erst ein Signal erhalten werden, wenn durch Kompression der Monoschicht eine gewisse Dichte der penetrierten DNA-Moleküle erreicht wird. Um diese Annahme zu bestätigen, ist es sinnvoll, weitere Adsorptionsexperimente durchzuführen. Dazu müsste die konzentriertere DNA-Lösung in Gegenwart zweiwertiger Kationen bei unterschiedlichen Kompressionsstadien der Lipidschicht in die Subphase injiziert werden. Da die DNA-Penetration bei kleineren molekularen Flächen vermutlich eingeschränkt ist, wäre zu erwarten, dass die DNA-Injektion bei höheren Lateraldrücken in der Monoschicht zu einem schwächeren IR-Signal bei 970 cm<sup>-1</sup> führt als bei den Messungen, bei denen die Penetration der DNA bei großen molekularen Flächen stattfindet. Der Anteil adsorbierter DNA sollte bei beiden Versuchen gleich sein.

### ***Einfluss der DNA-Adsorption auf den Neigungswinkel der Lipidketten***

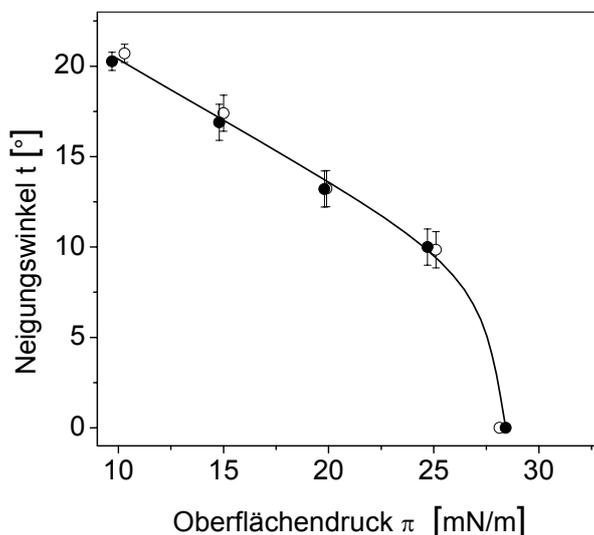
In der Annahme, dass Modell A gilt, würde die Adsorption der DNA an der Lipidmonoschicht bedingen, dass sich die Kopfgruppe stärker horizontal ausrichten. Auf diese Weise würde sich die Abstoßung zwischen den positiv geladenen Stickstoffatomen der Kopfgruppe und den Kationen vermindern. Damit würden die Phosphatgruppen der Lipidköpfe leichter mit denen der DNA über zweiwertige Kationen verknüpft werden. Für diesen Fall ist zu erwarten, dass der Neigungswinkel  $t$  durch die veränderte Orientierung der Kopfgruppe größer wird. Die GIXD-Experimente zeigen jedoch, dass das Gegenteil eintritt: Die Adsorption komplexierter DNA an die zwitterionische DMPE-Monoschicht bewirkt eine Verringerung des Neigungswinkels der Lipidketten.

Die Ursache liegt anscheinend darin, dass es in den Komplexen aus DNA und zweiwertigen Kationen Bereiche gibt, die trotz der partiellen Neutralisation von Phosphatgruppen noch genügend negative Ladungen besitzen, um eine elektrostatische Anziehung zu den Lipidkopfgruppen zu ermöglichen. Um die Interaktion mit diesen negativen Bereichen der Komplexe zu optimieren, muss die Kopfgruppe ihre Orientierung so verändern, dass ihr positiv geladener Teil stärker in die Subphase taucht. Dadurch wird der Platzbedarf der Kopfgruppe verkleinert und der Neigungswinkel  $t$  der Ketten reduziert sich. Gegenüber salinen Subphasen verringert sich der Neigungswinkel  $t$  von DMPE auf allen Subphasen mit Komplexen bestehend aus genomischer DNA und  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie von Komplexen aus Plasmid-DNA und  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  in gleichem Maße. Die Messungen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Kalbsthymus-DNA dienen deshalb als repräsentatives Beispiel: Während die Ketten von DMPE auf wässrigen Lösungen von 1 mM NaCl + 5 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 20 mN/m um  $15,2^\circ$  geneigt sind, beträgt der Neigungswinkel von DMPE auf Lösungen mit 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM  $\text{CaCl}_2$  nur  $12,4^\circ$ . Komplexe aus genomischer DNA und Manganionen führen zu einer deutlich stärkeren Reduktion von  $t$ : Bei 20 mN/m beträgt der Neigungswinkel der Ketten von DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM  $\text{CaCl}_2$  nur  $9,4^\circ$ .

In der Annahme, dass die Interaktion zwischen Mangan und den Basen stärker ist als die mit den Phosphaten der DNA, lässt sich schlussfolgern, dass der DNA/ $\text{Mn}^{2+}$ -Komplex durch die Anwesenheit freier Phosphatgruppen stärker negativ geladen ist als Komplexe mit Erdalkalimetallen. Daher ist die Wechselwirkung der positiv geladenen Stickstoffatome der Lipidkopfgruppe mit dem DNA/ $\text{Mn}^{2+}$ -Komplex stärker. Die Kopfgruppe des Lipids neigt ihren positiven Bereich noch weiter in die Subphase und ist damit stärker senkrecht zur Oberfläche orientiert. Dadurch wird die Fläche verkleinert, die das Molekül beansprucht, und der Neigungswinkel der Alkylketten herabgesetzt.

Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung mit der DNA und der daraus resultierenden Verringerung der molekularen Fläche, erhöht sich die Lipiddichte in den kondensierten Bereichen der Monoschicht. Dies führt zur Reduktion des

Hauptphasenumwandlungsdrucks  $\pi_c$  auf ca. 3 mN/m verglichen mit DMPE auf Wasser ( $\pi_c = 5,3$  mN/m). Dagegen wird  $\pi$  für DMPE auf wässrigen Lösungen von genomischer DNA und Ionen der Erdalkalimetalle im Vergleich zu DMPE auf Wasser, nur um maximal 0,7 mN/m reduziert.



**Abbildung 40:** Neigungswinkel  $t$  in Abhängigkeit von  $\pi$  von DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 100 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> (●) und auf 0,1 mM pGL3 + 100 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> (○). Die Linien dienen der Veranschaulichung.

In Abbildung 40 sind die Neigungswinkel in Abhängigkeit des Oberflächendrucks von DMPE auf Lösungen von 0,1 mM genomischer DNA oder pGL3, 100 mM NaCl und 10 mM CaCl<sub>2</sub> dargestellt. Aus der guten Übereinstimmung von  $t$  kann man schließen, dass die beiden DNA/Ca<sup>2+</sup>-Komplexe in gleichem Maße negativ geladen sind. Die dargestellten Neigungswinkel ergeben sich auch für DMPE auf Subphasen, die pGL3, NaCl sowie eins der anderen untersuchten zweiwertigen Kationen enthalten. Anscheinend ist der Einfluss von Manganionen auf die Ladung des Plasmidkomplexes nicht so stark wie im Komplex mit genomischer DNA. Möglicherweise liegt die Ursache darin, dass die kondensierende Wirkung zweiwertiger Kationen auf kleine DNA-Moleküle geringer ist als auf große. Für diesen Fall sollten jedoch auch die Neigungswinkel in Anwesenheit von pGL3 und Erdalkalimetallen größer sein.

#### ***Einfluss der Kompression des Lipidfilms auf $d_{DNA}$***

In der Annahme, dass Modell A die Lipid/DNA-Wechselwirkung beschreibt, wären die Phosphatgruppen der DNA und der Lipidkopfgruppen über zweiwertige Kationen miteinander verknüpft. Die Kompression der Lipidmonoschicht würde

dadurch den interaxialen DNA-Abstand verringern. Diese Beobachtung machten Symietz *et al.* bei der Kompression eines positiv geladenen Lipids von 10 auf 40 mN/m.<sup>10</sup> Dabei verringerte sich  $d_{DNA}$  um ca. 22%. Dies deutet auf eine starke Wechselwirkung des positiv geladenen Lipids mit der DNA hin.

Die GIXD-Messungen bei kleinen  $Q_{xy}$ -Werten haben zwar gezeigt, dass sowohl genomische als auch Plasmid-DNA adsorbieren, die Kompression der DMPE-Monoschicht ruft in beiden Fällen jedoch keine Veränderungen des interaxialen DNA-Abstands hervor. Die durch zweiwertige Kationen induzierte Wechselwirkung zwischen dem zwitterionischen DMPE und der DNA ist also relativ schwach. Anscheinend liegt DNA als weitgehend eigenständige Schicht unter dem Lipidfilm vor. Modell A beschreibt diese Interaktion also nicht hinreichend.

### ***Einfluss der DNA-Adsorption auf die Morphologie der Lipiddomänen***

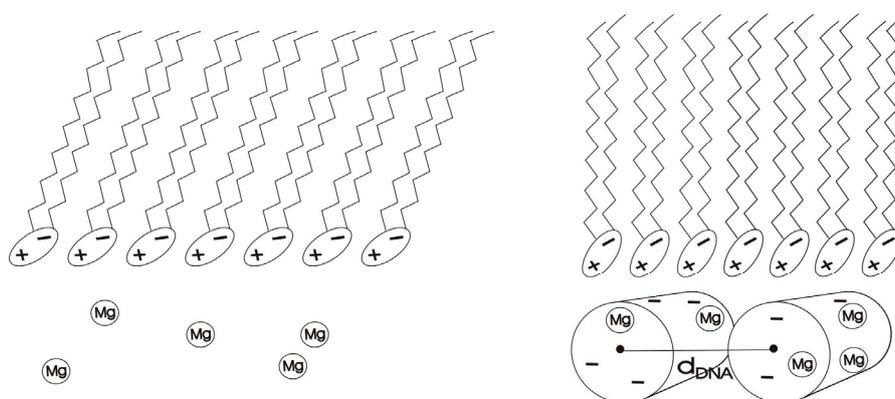
Sowohl die Penetration von komplexierter genomischer DNA als auch von komplexierter Plasmid-DNA führt zur Expansion der Lipidschicht und zu Veränderungen in der Morphologie der Domänen: sie fransen aus und die Phasengrenze wird rauer.

Die penetrierte DNA stellt sie eine Verunreinigung in der Lipidmonoschicht dar, die das Wachstum der Domänen behindert.<sup>76</sup> Durch eine raue Phasengrenze kann diese Verunreinigung schneller entfernt werden. Auf diese Weise findet ein diffusionslimitiertes Wachstum der Domänen statt, das zu fraktalen Strukturen führt. Die Adsorption komplexierter Plasmid-DNA an der Lipidmonoschicht verändert die Morphologie der Domänen in anderem Ausmaß: Verglichen mit den Domänen auf Wasser sind sie kleiner, runder und treten in größerer Zahl auf. Komplexierte Plasmid-DNA hat also einen ähnlichen Einfluss auf Form, Größe und Zahl der DMPE-Domänen wie Mangationen allein. Es ist anzunehmen, dass sie die freie Energie, die für die Keimbildung notwendig ist, herabsetzen. Damit steigt auch die Zahl der Domänen. Die runde Form der Domänen lässt auf eine erhöhte Linienspannung schließen.

Trotz der durch Adsorption der beiden DNA-Typen völlig verschiedenen Erscheinungsformen der Lipiddomänen weisen die Lipidketten gleiche Neigungswinkel auf. Aus welchem Grund diese Unterschiede in der Morphologie der Domänen auftreten bedarf weiterer Erklärung. Anscheinend spielen Größe und Art der komplexierten DNA-Moleküle sowie ihre Grenzflächenaktivität eine große Rolle.

## 5.5 Zusammenfassung und Modell (Teil I)

Weder Modell A noch Modell B konnten die Resultate hinreichend beschreiben (vgl. Abbildung 38). Aus den diskutierten Ergebnissen geht deshalb ein neues Modell C hervor: Zweiwertige Kationen gehen keine merkliche Wechselwirkung mit der Lipidschicht ein. Sie befinden sich nur in äußerst geringen Konzentrationen im Bereich der Grenzfläche. Die Struktur der zwitterionischen DMPE-Monoschicht wird also nicht verändert (vgl. Abbildung 41 links). DNA wird durch zweiwertige Kationen komplexiert. Die Ionen der Erdalkalimetalle Barium, Magnesium und Calcium gehen vorrangig Wechselwirkungen mit den Phosphaten der DNA ein. Die Ionen des Übergangsmetalls Mangan interagieren vorwiegend mit den Basen der DNA, ohne ihre Struktur nachweislich zu verändern. Die DNA-Komplexe adsorbieren an der Wasser/Luft-Grenzfläche auch in Abwesenheit einer Lipidmonoschicht. Dies geschieht bei Plasmid-DNA nach einigen Minuten, während Komplexe mit genomischer DNA, vermutlich aufgrund ihres geringeren Diffusionskoeffizienten erst nach ca. 24 h an der Grenzfläche detektiert werden. Folglich besteht eine attraktive Wechselwirkung zwischen der Wasser/Luft-Grenzfläche und Bereichen in der DNA, die aufgrund der Komplexbildung ungeladen sind.



**Abbildung 41:** Modell C: DMPE auf  $MgCl_2$  (links) und auf mit Magnesiumionen komplexierter DNA (rechts).

In Anwesenheit der DMPE-Monoschicht ist die Adsorption an der Wasser/Luft-Grenzfläche für genomische DNA in Gegenwart zweiwertiger Kationen beschleunigt. Offenbar werden die Komplexe durch Bereiche negativer Ladung von dem positiv geladenen Stickstoff der Lipidkopfgruppen elektrostatisch angezogen. Um diese Wechselwirkung zu optimieren, ändert die Kopfgruppe ihre Orientierung so, dass ihr positiv geladener Bereich stärker in Richtung Subphase geneigt ist (vgl. Abbildung 41 rechts). Diese Änderung verringert den effektiven Flächenbedarf der Kopfgruppe und führt damit zur Reduktion des Neigungswinkels der Alkylketten. Dieser kondensierende

Effekt auf die geordneten Bereiche der Monoschicht wird durch alle Komplexe, bestehend aus genomischer oder Plasmid-DNA und den Ionen der Erdalkalimetalle, in gleichem Maße bewirkt. Auch Manganionen führen in Verbindung mit pGL3 in der Subphase zu diesem Effekt. Komplexe bestehend aus Manganionen und genomischer DNA in der Subphase bewirken jedoch eine wesentlich stärkere Reduktion des Neigungswinkels. Da die Ionen des Übergangsmetalls Mangan hauptsächlich mit den Basen der DNA in Wechselwirkung treten, sind mehr Phosphatgruppen in dem Komplex negativ geladen als in Komplexen mit den Ionen der Erdalkalimetalle. Dadurch ist die elektrostatische Anziehung zu den Stickstoffatomen der Kopfgruppe größer, und führt einer stärkeren Verringerung des Neigungswinkels. Kurze DNA-Moleküle werden weniger stark komplexiert als lange. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass sich die Neigungswinkel der DMPE-Ketten auf wässrigen Lösungen von pGL3 mit Manganionen so verhalten wie auf Lösungen von pGL3 und den Ionen der Erdalkalimetalle.

Die DNA-Komplexe weisen eine geordnete Struktur auf. Der Abstand zwischen parallelen DNA-Strängen  $d_{DNA}$  ist von der Art zweiwertiger Kationen sowie von der Größe der DNA-Fragmente abhängig. DNA-Komplexe mit Bariumionen weisen den größten interaxialen Abstand auf, gefolgt von Magnesium-, Calcium- und Manganionen. Bei langen DNA-Fragmenten ist  $d_{DNA}$  kleiner als bei kurzen Fragmenten. Eine Kompression der Lipidschicht hat keinen Einfluss auf die DNA-Abstände. Demnach liegt die DNA als eigenständige Schicht unter dem Lipid vor.

In Abwesenheit zweiwertiger Kationen findet keine Adsorption der DNA an der Wasser/Luft-Grenzfläche mit oder ohne Lipidmonoschicht statt.

## 6 Ergebnisse Teil II: Aufbau von Multischichten aus PAH, PSS, DNA und zwitterionischen oder negativen Lipiden

Die im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellten Experimente geben wichtige und grundlegende Informationen über den Mechanismus der DNA/Lipid-Wechselwirkung. Allerdings stellen Lipidmonoschichten nur ein stark vereinfachtes Modellsystem für biologische Membranen dar. Praxisrelevanter sind Experimente an Lipiddoppelschichten. Auch sie dienen als vereinfachtes Modellsystem, weisen aber die grundlegende Struktur von biologischen Membranen auf – die Lipiddoppelschicht. Die Informationen, die aus den Versuchen an Monoschichten gewonnen werden, dienen als Basis für die Experimente an den Lipiddoppelschichten.

Von der Idee ausgehend, künstliche Viren auf der Grundlage von mit Lipiddoppelschichten überzogenen Polyelektrolythohlkugeln zu erzeugen, wird im folgenden Ergebnisteil der Aufbau von Multischichten, bestehend aus Polyelektrolyten und zwitterionischen Lipiden, auf flachen Substraten untersucht. Die Polyelektrolytmultischichten werden durch Anwendung der *Layer-by-Layer- (LbL-)* Technik erzeugt.<sup>101</sup> Planare Lipiddoppelschichten können durch spontanes Spreiten von Lipidvesikeln auf einem Substrat gebildet werden.<sup>120</sup>

Untersuchungen dieser Art sind wichtig, um optimale Bedingungen für die Bildung von geschlossenen Lipiddoppelschichten auf dem Polyelektrolytsubstrat zu finden. Intakte Doppelschichten sind die Voraussetzung für eine gute Fusion mit der Zellmembran der Zielzelle. Zudem schützen sie vor unspezifischen Wechselwirkungen der Polyelektrolyte mit Proteinen oder anderen geladenen Biomolekülen des Serums.

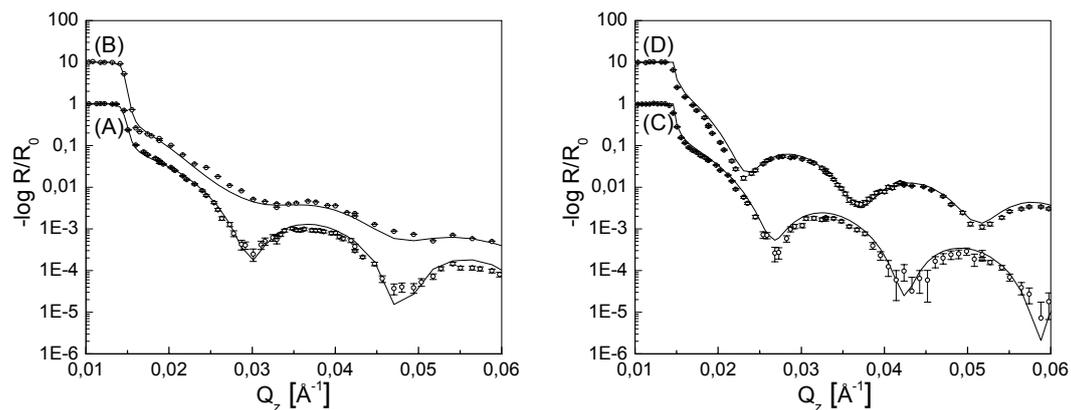
Neben der Untersuchung neutraler Lipide sind auch Experimente mit negativ geladenen Lipiden von großem Interesse. Sie befinden sich hauptsächlich auf der Innenseite von Zellmembranen. Für den Gentransfer mittels künstlicher Viren könnten sie daher einen Beitrag zur endosomalen Freisetzung des Vektors im Inneren der Zelle leisten.

Um die Qualität der Lipidbedeckung auf der Polyelektrolytmultischicht zu verbessern, spielen die Optimierung von Parametern wie Lipidzusammensetzung, Temperatur, die Art der Polyelektrolyte und die eingesetzten Salzkonzentrationen eine entscheidende Rolle. Der folgende Abschnitt stellt erste Versuche dieser Optimierung vor. Es wird geprüft, ob die Ladung des Polyelektrolyts für die Adsorption des neutralen Lipids DMPC (1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin) eine Rolle spielt. Des Weiteren wird der Aufbau von Multischichten aus Polyelektrolyten mit DMPC bzw. mit dem negativ geladenen Phospholipid DLPA (1,2-Dilauroyl-phosphatidsäure) *in situ* beobachtet.

## 6.1 Multischichten mit DMPC

### 6.1.1 Neutronenreflexion (NR)

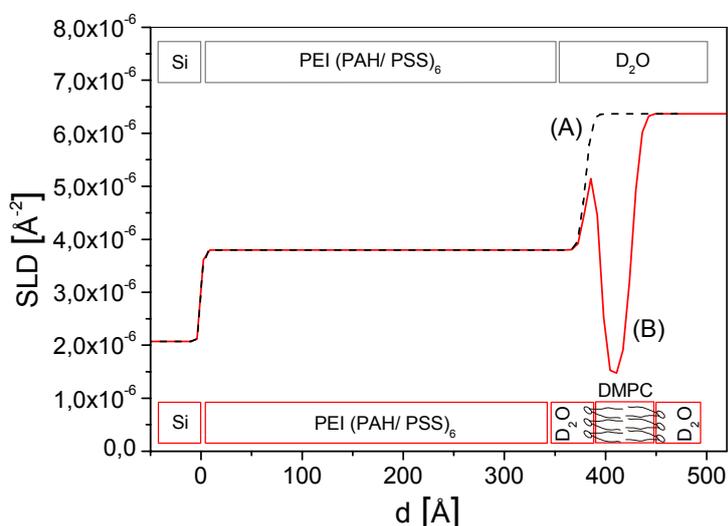
Die Neutronenreflexionsmessungen wurden am Reflektometer V6 des Hahn-Meitner-Instituts (Berlin) durchgeführt. Mittels NR können Schichtdicke, Rauigkeit und Streulängendichte der hergestellten, planaren Polyelektrolytfilme sowie der darauf adsorbierten Lipiddoppelschicht ermittelt werden. Als Substrat für die Adsorption des Lipids dient eine Polyelektrolyt- (PE-) Multischicht. Sie besteht aus alternierenden Lagen des positiv geladenen Polyallylamin (PAH) und des negativ geladenen Polystyrolsulfonat (PSS), die unter Verwendung der *LbL*-Technik (vgl. Abschnitt 4.2) auf ein festes, planares Substrat (Silicium) aufgebracht werden. In Abhängigkeit davon, ob PAH oder PSS die abschließende Schicht bilden soll, werden insgesamt 12 bzw. 13 Adsorptionszyklen durchgeführt. Durch spontanes Spreiten von Vesikel auf dem Polyelektrolytsubstrat soll eine Lipiddoppelschicht gebildet werden. Dazu werden nach der Messung der Reflektivität der Polyelektrolytschicht in D<sub>2</sub>O unilamellare Lipidvesikel (0,5 mg/mL) bei einer Temperatur, die über ihrer Phasenumwandlungstemperatur  $T_c$  des Lipids liegt, in die fest/flüssig-Experimentierzelle injiziert. Für das untersuchte neutrale Phospholipid DMPC liegt  $T_c$  bei 24 °C. Bei tieferen Temperaturen befindet sich das Lipid in geneigtem Zustand in der Gelphase ( $L_{\beta}$ -Phase). Temperaturen über  $T_c$  überführen das Lipid in den flüssig-kristallinen Zustand ( $L_{\alpha}$ -Phase). Der Durchmesser der Vesikel beträgt 100 nm und wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (vgl. Abschnitt 3.10) bestimmt.



**Abbildung 42.** Reflektivitätskurven der PAH-terminierten Polyelektrolytschicht  $[PEI(PSS/PAH)_6]$  (A), von DMPC auf  $PEI(PSS/PAH)_6$  (B), der PSS-terminierten Polyelektrolytschicht  $[PEI(PSS/PAH)_6PSS]$  (C) sowie von DMPC auf  $PEI(PSS/PAH)_6PSS$  (D) in D<sub>2</sub>O bei 26 °C. Zum besseren Verständnis sind die Kurven verschoben.

Die Messungen erfolgten bei 26 °C, also über der Phasenumwandlungstemperatur von DMPC. Bei der Anpassung der Reflektivitätskurven mit dem *Parratt*-Programm wurden die PE-Schicht und der Kettenbereich der Lipiddoppelschicht als jeweils eine Box betrachtet.

Die Reflektivitätskurven der DMPC-Schichten auf den PAH- und PSS-terminierten Polyelektrolytmultischichten sowie die Ergebnisse der Anpassung der Kurven sind in Abbildung 42 dargestellt. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in den Tabellen des Abschnitts 9.3 zu finden. Aus dem Abstand zwischen zwei Minima  $\Delta Q_z$  kann die Schichtdicke  $d$  über Gleichung 16 berechnet werden. Kleine  $\Delta Q_z$ -Werte entsprechen großen Schichtdicken. Beim Vergleich der PAH-terminierten Reflektivitätskurven vor und nach der Inkubation mit den DMPC-Vesikeln (vgl. Abbildung 42, links) wird deutlich, dass sich die Positionen der Minima im Rahmen der Fehlergrenzen nicht unterscheiden. Die Dicke der Polyelektrolytschicht von  $(334 \pm 2)$  Å hat sich demnach nicht verändert. Eine gute Anpassung der Ergebnisse wird jedoch nur erhalten, wenn zwei zusätzliche Boxen mit Streulängendichten von  $6,37 \cdot 10^{-6}$  und  $1,7 \cdot 10^{-6}$  Å<sup>-2</sup> eingebracht werden, deren Dicke  $d = 0$  ist. Die Rauigkeit  $\delta$  dieser Boxen ist mit  $(54 \pm 6)$  Å und  $(98 \pm 9)$  Å sehr hoch (vgl. Tabelle 16). Das deutet daraufhin, dass sehr vereinzelt Bereiche vorliegen in denen DMPC-Vesikel oder –Schichten adsorbiert sind. Eine vollständige Bedeckung des Substrats liegt jedoch nicht vor.



**Abbildung 43:** Streulängendichte- (SLD-) Profile der PSS-terminierten Polyelektrolytmultischicht [PEI(PSS/PAH)<sub>6</sub>PSS] (A) sowie von DMPC auf dieser PSS-terminierten Schicht (B) in D<sub>2</sub>O bei 26 °C.

Hingegen zeigt die Reflektivitätskurve von DMPC auf der mit dem negativem PSS belegten Polyelektrolytmultischicht (vgl. Abbildung 42, rechts) eine klare Positionsverschiebung der Minima zu kleineren  $Q_z$ -Werten gegenüber der Messung der

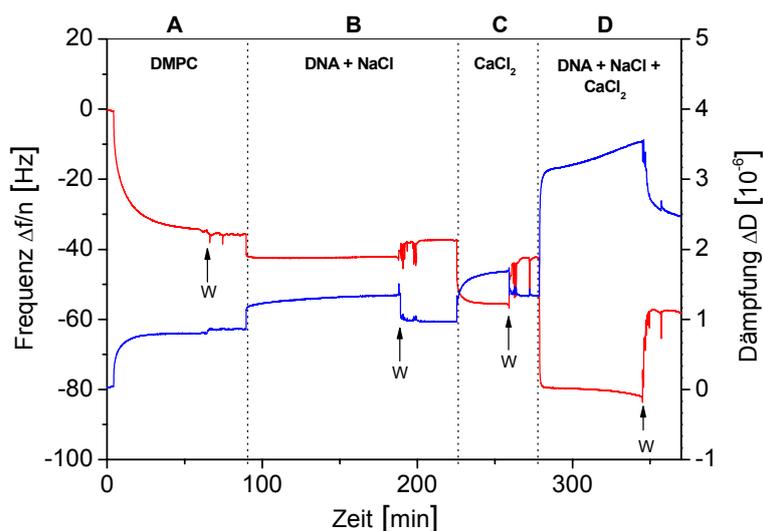
Polyelektrolytschicht ohne Lipid. Die damit einhergehende Reduktion von  $\Delta Q_z$  deutet auf eine Vergrößerung der Schichtdicke  $d$  hin. Daraus lässt sich ableiten, dass auf dem PSS eine DMPC-Schicht adsorbiert hat. Abbildung 43 zeigt die ermittelten Streulängendichteprofile der PSS-terminierten Polyelektrolytschicht vor und nach der Inkubation mit DMPC-Vesikeln. In Abwesenheit von DMPC können die Reflektivitätskurven einem Modell aus drei Boxen – Silicium, Polyelektrolytschicht und Wasser ( $D_2O$ ) – angepasst werden. Hierbei hat die PE-Schicht eine Dicke von  $(380 \pm 3) \text{ \AA}$ , eine Streulängendichte von  $(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  und eine Rauigkeit von  $(2 \pm 0,1) \text{ \AA}$ . Die Inkubation mit DMPC resultiert in einer zusätzlichen Schicht mit einer Dicke von  $\Delta d = (45 \pm 2) \text{ \AA}$ . Der beste Fit ergibt sich für ein Modell, das aus insgesamt fünf Boxen besteht: 1) Silicium, 2) PE-Multischicht, 3)  $D_2O$ /hydratisierte Kopfgruppe, 4) Lipidketten und 5)  $D_2O$ /hydratisierte Kopfgruppe. Zwischen der PE-Multischicht und dem Kettenbereich existiert also ein ca.  $(12 \pm 1) \text{ \AA}$  dicker Bereich, der eine SLD von  $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  hat und sowohl Wassermoleküle als auch DMPC-Kopfgruppen enthält. Dies lässt darauf schließen, dass die PE-Schicht und die Lipiddoppelschicht durch einen dünnen Wasserfilm getrennt werden. Der Kettenbereich der Lipiddoppelschicht hat eine Dicke von  $(30 \pm 1) \text{ \AA}$  sowie eine Streulängendichte von  $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Ein komplexeres Boxenmodell, das die Doppelschicht in zwei Kopfgruppenbereiche und einen Kettenbereich gliedert, ergibt ähnliche  $\chi^2$ -Werte, liefert jedoch keine zusätzlichen Informationen über die Struktur der Doppelschicht.

### 6.1.2 Quarzmikrowaage (QCM-D)

Die Messungen mit der Quarzmikrowaage ermöglichen das Studium molekularer Wechselwirkungen sowie der Kinetik der Adsorption von Lipiden auf Oberflächen wie beispielsweise Polymeren. Dabei wird zum einen die Masse an die Oberfläche gebundener, dünner Filme bestimmt, zum anderen werden Informationen über strukturelle (viskoelastische) Eigenschaften dieser Filme gewonnen. Alle Messungen erfolgen in Echtzeit. Die in den Experimenten eingesetzten DMPC-Vesikel hatten eine Konzentration von 0,5 mg/mL sowie einen Durchmesser von 100 nm. Die Messungen fanden bei 26 °C statt, d. h. 2 °C über der Phasenumwandlungstemperatur des zwitterionischen DMPC ( $T_c = 24^\circ\text{C}$ ). Als Substrat für die Adsorptionsexperimente diente ein mit Siliciumdioxid bedampfter Quarzkristall, der zusätzlich mit einer Polyelektrolytmultischicht [Si/PEI/(PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS] belegt ist. Dabei bildet der negativ geladene Polyelektrolyt PSS die abschließende Lage. Der so präparierte Kristall wurde bei seiner Grundfrequenz (5 MHz) angeregt. Für die Bewertung der Änderung der Frequenz  $\Delta f$  und der Dämpfung  $\Delta D$  wurde der fünfte Oberton ( $n = 5$ ) bei 25 MHz

verwendet. Messungen bei der Grundfrequenz von 5 MHz zeigen den gleichen Verlauf der Kurven, jedoch ist das Signal des Obertons stabiler.

Der zeitliche Verlauf von  $\Delta f$  und  $\Delta D$  während der Injektionsschritte (A) bis (D) wird in Abbildung 44 gezeigt. Dabei ist  $\Delta f$  auf 5 MHz normiert ( $\Delta f/n$ ). Die ermittelten Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind im Anhang in Tabelle 19 dargestellt. Einige Sekunden nach der Injektion der Dispersion der DMPC-Vesikel in Schritt (A) nimmt die Frequenz ab. Dies entspricht einer Erhöhung der Masse auf dem Quarzkristall, die durch Anlagerung der Lipide an die PE-Schicht verursacht wird. Gleichzeitig steigt der Energieverlust pro Schwingung  $\Delta D$ , d. h., die Viskosität des Films nimmt zu. Nach ca. 60 min hat die Dämpfung ihr Maximum bei  $\Delta D \approx 0,9 \cdot 10^{-6}$  und gleichzeitig die Frequenz ihr Minimum bei  $\Delta f \approx -35$  Hz erreicht. Mit dem sich anschließenden Spülen der Zelle mit Wasser werden nicht adsorbierte Vesikel beseitigt. Dies bewirkt keine signifikante Veränderung der Basislinien. Wie in der Diskussion näher erläutert wird, lässt dieses Resultat auf die Adsorption einer DMPC-Doppelschicht schließen.



**Abbildung 44:** QCM-D-Echtzeitmessung der Änderung der auf 5 MHz normierten Frequenz  $\Delta f/n$  (rot) sowie der Dämpfung  $\Delta D$  (blau) des mit einer PSS-terminierten Polyelektrolytmultischicht [Si/PEI/(PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS] bedeckten Quarzkristalls bei 26°C nach folgenden Injektionsschritten: A) DMPC-Vesikel ( $d = 100$  nm), B) Kalbsthymus-DNA + NaCl, C) CaCl<sub>2</sub>, D) Kalbsthymus-DNA + NaCl + CaCl<sub>2</sub>. Jedem Injektionsschritt folgt nach beendeter Adsorptionszeit ein Waschvorgang mit H<sub>2</sub>O (w).

Entsprechend den Monoschichtexperimenten in Abschnitt 5 wird mit dem nächsten Injektionsschritt (B) untersucht, ob DNA in Abwesenheit zweiwertiger Kationen an der DMPC-Doppelschicht adsorbiert. Nach der Injektion von 1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl und anschließendem Waschen wird keine signifikante Änderung von  $f$  oder  $D$  beobachtet. Eine Adsorption von DNA findet unter diesen Bedingungen also nicht statt. In Schritt (C) werden 100 mM CaCl<sub>2</sub> in die Experimentierzelle injiziert. Nach

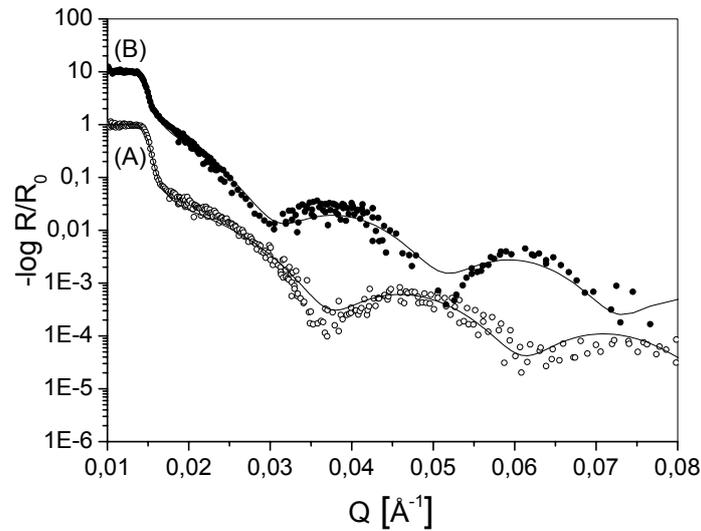
ca. 30 min wird die Zelle mit Wasser gespült. Bezogen auf Schritt (B) führt dies zu einer Reduktion der Frequenz um  $\Delta f \approx -5,5$  Hz, während die Dämpfung um  $\Delta D \approx 0,4 \cdot 10^{-6}$  verstärkt wird. Es ist denkbar, dass die Calciumionen durch eventuell vorhandene kleine Löcher in der Lipidschicht in die Polyelektrolytmultischicht diffundieren. Dort könnten sie mit dem negativ geladenen PSS in Wechselwirkung treten. Durch die zusätzliche Anwesenheit von Calciumionen in der PE-Schicht erhöht sich die Masse des adsorbierten Films. Bei der anschließenden Injektion von 1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl + 100 mM CaCl<sub>2</sub> (D) sinkt die Frequenz schon nach wenigen Sekunden. Folglich erhöht sich die adsorbierte Masse. Nach dem Spülen ergeben sich Änderungen von  $\Delta f \approx -15$  Hz und  $\Delta D \approx 1,1 \cdot 10^{-6}$ . Unter diesen Bedingungen findet also eine Adsorption der DNA an der Lipidschicht statt. Die Differenzen von  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind signifikant aber dennoch relativ gering und lassen daher vermuten, dass die DNA-Schicht nicht die gesamte Fläche bedeckt.

## 6.2 Multischichten mit negativ geladenen Lipiden

### 6.2.1 Neutronenreflexion (NR)

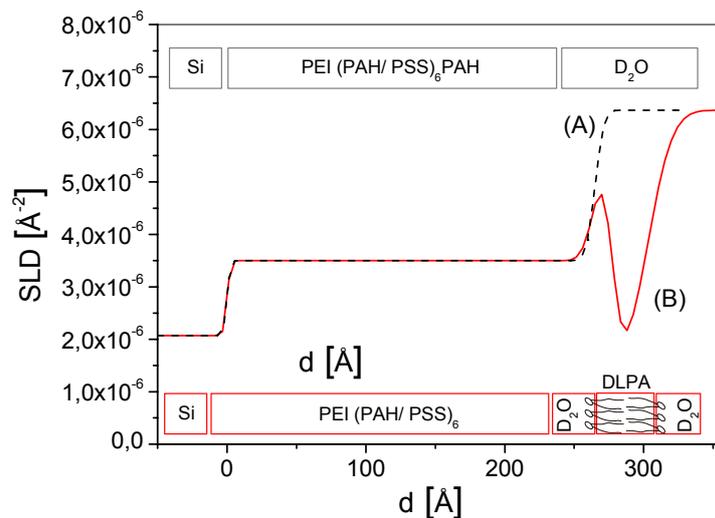
Die Neutronenreflexionsmessungen wurden am Reflektometer AMOR des Paul-Scherrer-Instituts (Villigen, Schweiz) durchgeführt. Der positiv geladene Polyelektrolyt PAH wurde bei der Präparation mittels *LbL*-Technik als letzte PE-Schicht auf das Siliciumtemplat aufgetragen. Negativ geladene DLPA-Vesikel wurden bei 35 °C in die fest/flüssig-Experimentierzelle injiziert. Diese Temperatur liegt über der Phasenumwandlungstemperatur von DLPA ( $T_c = 32$  °C). Der Durchmesser der Vesikel betrug 100 nm und wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Das Lipid befindet sich also in der flüssig-kristallinen  $L_\alpha$ -Phase. Bei der Anpassung der Reflektivitätskurven mit dem *Parratt*-Programm wurden die PE-Schicht und der Kettenbereich der Lipiddoppelschicht als jeweils eine Box betrachtet.

In Abbildung 45 sind die Reflektivitätskurven der PAH-terminierten Polyelektrolytschicht (A) sowie von DLPA auf eben dieser Schicht (B) aufgetragen. Nach der Adsorption von DLPA ist eine Verringerung von  $\Delta Q_z$  zu beobachten, die einer Erhöhung der Gesamtschichtdicke von  $(265 \pm 2)$  Å auf  $(293 \pm 2)$  Å gleichkommt. Die Rauigkeit gegenüber D<sub>2</sub>O erhöht sich dabei auf  $\delta = (14 \pm 0,2)$  Å. Abbildung 46 zeigt die berechneten Streulängendichteprofile der PSS-terminierten PE-Multischicht vor und nach der Inkubation mit DMPC-Vesikeln.



**Abbildung 45:** Reflektivitätskurven der PAH-terminierten Polyelektrolytschicht [PEI(PSS/PAH)<sub>6</sub>] (A) und von DLPA auf PEI(PSS/PAH)<sub>6</sub> (B) in D<sub>2</sub>O bei 35 °C. Zum besseren Verständnis sind die Kurven verschoben.

Der beste Fit ergibt sich für ein aus fünf Boxen bestehendes Modell: 1) Silicium, 2) Polyelektrolytschicht, 3) D<sub>2</sub>O/hydratisierte Kopfgruppe, 4) Lipidketten und 5) D<sub>2</sub>O/hydratisierte Kopfgruppe. Die Boxen 3 und 5 stellen demnach einen Wasserfilm dar, in dem sich auch die Lipidkopfgruppen befinden. Box 3 weist eine SLD von  $(5,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  auf. Dabei beträgt die Dicke von Box drei  $(12 \pm 1) \text{ \AA}$ . Der Kettenbereich der DLPA-Doppelschicht ( $\text{SLD} = (1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) ist  $(26 \pm 1) \text{ \AA}$  dick.

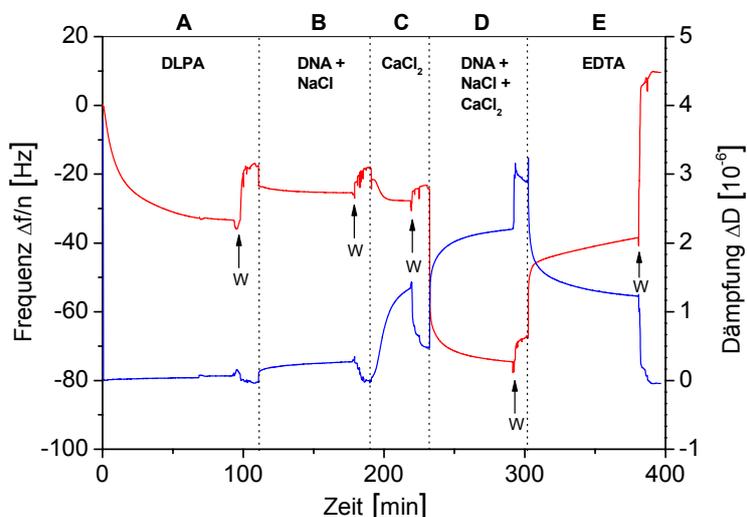


**Abbildung 46:** Streulängendichte- (SLD-) Profile der PAH-terminierten Polyelektrolytmultischicht [PEI(PSS/PAH)<sub>6</sub>] (A) sowie von DLPA auf dieser Schicht (B) in D<sub>2</sub>O bei 35 °C.

Ein komplexeres Boxenmodell, das die Doppelschicht in zwei Kopfgruppenbereiche und einen Kettenbereich gliedert ergibt ähnliche  $\chi^2$ -Werte, liefert jedoch keine zusätzlichen Informationen über die Struktur der Doppelschicht.

### 6.2.2 Quarzmikrowaage (QCM-D)

Ein mit Gold bedampftes Quarzkristall, das zusätzlich mit einer Polyelektrolytmultischicht  $[\text{Au}/\text{PEI}/(\text{PSS}/\text{PAH})_2]$  belegt war, diente in den durchgeführten QCM-Messungen als Substrat. Der positiv geladenen Polyelektrolyt PAH bildete die abschließende Schicht. Das Kristall wurde bei seiner Grundfrequenz (5 MHz) angeregt. Für die Bewertung der Änderung der Frequenz  $\Delta f$  und der Dämpfung  $\Delta D$  wurde der fünfte Oberton ( $n = 5$ ) bei 25 MHz verwendet. Messungen bei der Grundfrequenz von 5 MHz zeigen den gleichen Kurvenverlauf wie bei 25 MHz, jedoch ist das Signal des Obertons stabiler. Die eingesetzten negativ geladenen DLPA-Vesikel hatten eine Größe von 100 nm und wurden in Konzentrationen von 0,5 mg/mL eingesetzt. Während der gesamten Messung wurde die Experimentierzelle auf einer Temperatur von 35 °C gehalten, also 3 °C über der Phasenumwandlungstemperatur des DLPA ( $T_c = 32$  °C).



**Abbildung 47:** QCM-D-Echtzeitmessung der Änderung der auf 5 MHz normierten Frequenz  $\Delta f/n$  (rot) sowie der Dämpfung  $\Delta D$  (blau) des mit einer PAH-terminierten Polyelektrolytmultischicht  $[\text{Au}/\text{PEI}/(\text{PSS}/\text{PAH})_2]$  bedeckten Quarzkristalls bei 35°C nach folgenden Injektionsschritten: A) DLPA-Vesikeldispersion ( $d = 100$  nm), B) Kalbsthymus-DNA + NaCl, C)  $\text{CaCl}_2$ , D) Kalbsthymus-DNA + NaCl +  $\text{CaCl}_2$ , E) EDTA pH 7. Jedem Injektionsschritt folgt nach beendeter Adsorptionszeit ein Waschvorgang mit  $\text{H}_2\text{O}$  (w).

Abbildung 47 zeigt den zeitlichen Verlauf der Änderung der auf 5 MHz normierten Frequenz  $\Delta f/n$  sowie der Änderung des Energieverlustes pro Schwingung  $\Delta D$  während

der Injektionsschritte (A) bis (E). Die Ergebnisse der QCM-D-Messungen sind im Anhang in Tabelle 20 dargestellt. Nach der Injektion der DLPA-Vesikeldisperion in Schritt (A) sinkt die Frequenz, d. h., die Masse des adsorbierten Films erhöht sich. Die Dämpfung steigt dabei nur geringfügig. Nach ca. 1,5 h hat  $\Delta f$  einen Wert von -33 Hz angenommen. Das anschließende Spülen der Zelle mit Wasser (w) führt jedoch zu einer Erhöhung der Frequenz, sodass die Frequenzänderung  $\Delta f$  bezogen auf den Ausgangswert vor Injektion nur um ca. -17,8 Hz gesunken ist. Demzufolge wurde ein Teil der adsorbierten Doppelschicht oder auch der adsorbierten Vesikel durch das Waschen entfernt. Die resultierende Frequenzänderung lässt vermuten, dass nur Teile der Polyelektrolytschicht mit DLPA bedeckt sind. Im Vergleich zu dem Zustand vor der Injektion der DLPA-Vesikel hat sich  $\Delta D$  kaum verändert.

Sowohl die im Ergebnisteil I vorgestellten Monoschichtexperimente mit dem zwitterionischen Phospholipid DMPE als auch die QCM-D-Messungen mit dem zwitterionischen DMPC haben gezeigt, dass DNA nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen mit dem Lipid einen Komplex bildet. Mit den folgenden Injektionsschritten wird untersucht, ob Komplexe dieser Art auch mit dem negativ geladenen DLPA gebildet werden können. In Schritt (B) wird dazu zuerst eine Lösung aus 1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl in die Experimentierzelle injiziert. Schon nach wenigen Sekunden sinkt  $\Delta f$ , während  $\Delta D$  steigt. Nach ca. 30 min erreicht  $\Delta f$  ein Minimum und  $\Delta D$  ein Maximum. Für beide Parameter stellen sich jedoch nach dem Spülen mit Wasser wieder die Ausgangswerte ein, die vor der Injektion der DNA-Lösung geherrscht haben. Unter diesen Bedingungen kann die DNA folglich nicht an der Lipidschicht adsorbieren. In Schritt (C) erfolgt anschließend die Injektion von 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Nach ca. 30 min wird die Zelle gespült. Bezogen auf den Zustand vor der Injektion von  $\text{CaCl}_2$  hat sich die Frequenz um  $\Delta f \approx -5$  Hz reduziert, während  $\Delta D$  um ca.  $0,5 \cdot 10^{-6}$  gestiegen ist. Ähnlich wie bei den DMPC-Messungen ist hier denkbar, dass die Calciumionen in die PE-Muldschicht diffundieren und mit PSS in Wechselwirkung treten. Dadurch würde sich die Masse des adsorbierten Films erhöhen. Im nächsten Schritt (D) wird eine Lösung mit 1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  injiziert. Schon wenige Sekunden später ist eine drastische Verringerung von  $\Delta f$  bzw. Erhöhung von  $\Delta D$  zu beobachten. Nach dem Spülen mit Wasser stellen sich Werte von  $\Delta f \approx -44,3$  Hz und  $\Delta D \approx 2,4 \cdot 10^{-6}$  ein. Dies entspricht einer durch Wechselwirkungen entstandenen Erhöhung der Masse auf dem Quarzplättchen, die mit einer Viskositätserhöhung des adsorbierten Films einhergeht. In Gegenwart zweiwertiger Kationen findet demnach eine Adsorption der DNA an das negativ geladene DLPA statt. Um zu untersuchen, ob diese Komplexbildung in Anwesenheit der zweiwertigen Kationen reversibel ist, wird in Schritt (E) eine 250 mM EDTA- (Ethylendiamintetraessigsäure-) Lösung pH 7 in die Experimentierzelle injiziert. EDTA ist ein starker Komplexbildner, insbesondere für zweiwertige Kationen. Der drastische Anstieg der Frequenzänderung sowie die starke

Verringerung der Dämpfungänderung nach der Injektion zeigen, dass an das Substrat adsorbierte Moleküle durch die Gegenwart von EDTA abgelöst werden. Nach dem Spülvorgang stellen sich annähernd die Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  ein, die vor dem Injektionsschritt (A) vorlagen. Durch die Anwesenheit von EDTA wurde also nicht nur die adsorbierte DNA-Schicht entfernt, sondern auch die darunter liegende DLPA-Schicht. Möglicherweise diffundiert das negativ geladene EDTA in den Wasserbereich zwischen dem DLPA-Film und der PE-Schicht. Durch die Wechselwirkung zwischen EDTA und dem positiv geladenen PAH könnte das Polyelektrolyt neutralisiert werden. Somit würde DLPA nicht mehr elektrostatisch vom PAH angezogen und desorbiert von dem Substrat.

### 6.3 Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

**Table 5:** Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse von Teil II: Aufbau von Multischichten aus PAH, PSS, DNA und zwitterionischen oder negativen Lipiden.

Methoden	Resultate
<i>DMPC auf PAH und PSS</i>	
XR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Das zwitterionische DMPC (in der flüssig-kristallinen Phase) adsorbiert besser auf dem negativ geladenen PSS als auf dem positiv geladenen PAH.</li> <li>• Die DMPC-Doppelschicht bedeckt das PSS-terminierte Substrat nicht vollständig, d. h., sie weist Defekte auf.</li> <li>• Unter der Annahme, dass zwischen der Lipidschicht und der PE-Schicht ein ca. 5 Å dicker Wasserfilm existiert, hat die Kopfgruppe eine Dicke von ca. 7 Å.</li> <li>• Die Gesamtdicke der Doppelschicht beträgt ca. 44 Å.</li> </ul>
QCM-D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durch das Spreiten der DMPC-Vesikel auf der PSS-terminierten PE-Schicht wird eine Lipiddoppelschicht gebildet.</li> <li>• In der Abwesenheit von <math>\text{CaCl}_2</math> findet keine Adsorption der DNA an die DMPC-Doppelschicht statt. → DNA adsorbiert nur in Gegenwart von <math>\text{CaCl}_2</math> an der zwitterionischen Lipidschicht.</li> </ul>
<i>DLPA auf PAH</i>	
XR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die negativ geladene DLPA-Doppelschicht bedeckt das positiv geladene, PAH-terminierte Substrat nicht vollständig, d. h., sie weist Defekte auf.</li> <li>• Unter der Annahme, dass zwischen der Lipidschicht und der PE-Schicht ein ca. 5 Å dicker Wasserfilm existiert, hat die Kopfgruppe eine Dicke von ca. 7 Å.</li> <li>• Die Gesamtdicke der Doppelschicht beträgt ca. 40 Å.</li> </ul>
QCM-D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA adsorbiert nur in Anwesenheit von <math>\text{CaCl}_2</math> an der DLPA-Schicht.</li> <li>• Die DNA/Lipid-Komplexbildung ist durch den Einsatz von EDTA reversibel.</li> </ul>

## 6.4 Diskussion

### 6.4.1 Messungen der Neutronenreflexion

#### *Adsorption von DMPC auf PAH und PSS*

Das Adsorptionsverhalten der zwitterionischen DMPC-Vesikel auf positiv und negativ geladenen, planaren Polyelektrolytmultischichten wurde mittels spekularer Neutronenreflexion untersucht. Nach der Inkubation mit den DMPC-Vesikeln verändert sich die Dicke der PAH-terminierten PE-Schicht nicht. Allerdings ist eine Anpassung der Kurven nur möglich, wenn zwei zusätzliche Boxen eingebracht werden mit (SLD:  $6,37 \cdot 10^{-6}$  und  $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ), deren Dicke  $d = 0$  ist. Außerdem ist die Rauigkeit  $\delta$  dieser Boxen mit  $(54 \pm 6) \text{ \AA}$  und  $(98 \pm 9) \text{ \AA}$  sehr hoch. Es ist daher anzunehmen, dass sehr vereinzelt Bereiche vorliegen in denen DMPC-Vesikel oder –Schichten adsorbiert sind. Demnach bildet sich keine flächenbedeckende DMPC-Doppelschicht auf dem PAH-Substrat aus.

Auf dem negativ geladenen, PSS-terminierten Substrat verschiebt sich  $\Delta Q_z$  zu kleineren Werten nach der Injektion der Vesikel. Das entspricht einer Zunahme der Schichtdicke. Demnach adsorbiert DMPC auf dem PSS-Substrat. Möglicherweise ist die Wechselwirkung des DMPC mit dem negativ geladenen Substrat besser, da die DMPC-Kopfgruppe geringfügig geneigt ist, sodass ihr positiv geladenes Stickstoffatom gut mit dem PSS in Wechselwirkung treten kann. Bei der Anpassung der Reflektivitätskurven von DMPC auf PSS mit dem *Parratt*-Programm ergab sich der beste Fit für ein Modell, in dem der Kettenbereich der Lipiddoppelschicht als eine Box behandelt wird. Die Dicke dieser Box beträgt  $d = (30 \pm 1) \text{ \AA}$ . Frühere Untersuchungen zur Länge von fluiden Alkylketten ergaben, dass eine  $\text{CH}_2$ -Einheit die Kette um ca.  $1 \text{ \AA}$  verlängert.<sup>121</sup> Der Beitrag der terminalen  $\text{CH}_3$ -Gruppe ist um ca.  $0,2 \text{ \AA}$  größer als der der  $\text{CH}_2$ -Gruppen.<sup>119</sup> Daraus kann folgende Berechnung für die Länge einer fluiden Alkylkette abgeleitet werden:

$$l_{(\text{gauche})} \approx (n \cdot 1 \text{ \AA} + 1,2 \text{ \AA}) \quad \text{Gleichung 22}$$

Hierbei ist  $n$  die Anzahl der  $\text{CH}_2$ -Gruppen. Für die Ketten eines DMPC-Moleküls ( $n = 13$ ) in der  $L_\alpha$ -Phase ergibt sich damit eine maximale Länge  $l_{(\text{gauche})}$  von ca.  $14,2 \text{ \AA}$ . Der Kettenbereich einer DMPC-Doppelschicht ist demnach ca.  $28,4 \text{ \AA}$  dick. Da dieser Wert gut mit der ermittelten Dicke der Box übereinstimmt, ist davon auszugehen, dass sich eine Lipiddoppelschicht ausgebildet hat. Die Streulängendichte des Kettenbereichs der Doppelschicht beträgt  $(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Sie ist von der Packungsdichte der Alkylketten abhängig. Beispielsweise ergibt eine Lipiddichte von  $60 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  eine

SLD von  $-0,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ .<sup>122</sup> Die experimentell erhaltene Streulängendichte von  $(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  ist jedoch wesentlich größer. Das lässt vermuten, dass die adsorbierte Doppelschicht Defekte aufweist, in denen  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{SLD} = 6,37 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) vorliegt. Ob das Wasser gleichmäßig in der Schicht verteilt ist oder ob es sich in Löchern der Doppelschicht konzentriert, kann nicht bestimmt werden, da die NR keine strukturellen Informationen über die untersuchten Schichten in horizontaler Richtung liefert. Das berechnete Boxenmodell zeigt, dass zwischen dem Kettenbereich und der Polyelektrolytschicht eine ca.  $(12 \pm 1) \text{ \AA}$  dicke Schicht mit einer erhöhten Streulängendichte von  $(5,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  existiert. Dieser Bereich umfasst sowohl die Lipidkopfgruppen als auch einen dünnen Wasserfilm, der sich zwischen den Kopfgruppen und der PE-Schicht befindet. Frühere Untersuchungen ergaben, dass dieser Wasserfilm eine Dicke von ca.  $5 \text{ \AA}$  hat.<sup>119,123</sup> In der Annahme, dass dieser Film in der durchgeführten Messung die gleiche Dicke aufweist, ergibt sich für den Kopfgruppenbereich eine Dicke von ca.  $(7 \pm 1) \text{ \AA}$ . Die DMPC-Lipiddoppelschicht weist in der  $L_\alpha$ -Phase somit eine Dicke von ca.  $(44 \pm 1) \text{ \AA}$  auf. Dieser Wert stimmt gut mit anderen Literaturdaten überein.<sup>124</sup>

### ***Adsorption von DLPA auf PAH***

Auch bei der Anpassung der Reflektivitätskurven von DLPA auf PAH ergab sich der beste Fit für ein Modell, in dem der Kettenbereich der Lipiddoppelschicht als eine Box behandelt wird. Diese Box hat eine Dicke von  $d = (26 \pm 1) \text{ \AA}$ . Die über Gleichung 22 berechnete Länge einer DLPA-Alkylkette ( $n = 11$ ) in der *gauche*-Konformation beträgt ca.  $12,2 \text{ \AA}$ . Der Kettenbereich der entsprechenden Doppelschicht hat demnach eine maximale Dicke von ca.  $24,4 \text{ \AA}$ , was gut mit der ermittelten Dicke der Box des Kettenbereichs übereinstimmt. Folglich hat eine DLPA-Doppelschicht auf dem Substrat adsorbiert. Die Streulängendichte der Region der Alkylketten beträgt  $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Sie ist also vergleichbar mit der SLD der DMPC-Ketten. Es kann daher ebenso geschlussfolgert werden, dass DLPA keine geschlossene Doppelschicht auf der PAH-terminierten Polyelektrolytmultischicht bildet.

Der Bereich zwischen den Lipidketten und der PE-Schicht hat eine Dicke von  $(12 \pm 1) \text{ \AA}$  und eine Streulängendichten von  $(5,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Er umfasst sowohl die Region der Lipidkopfgruppen als auch einen dünnen Wasserfilm, der sich zwischen den Kopfgruppen und der PE-Schicht befindet. In der Annahme, dass dieser Film eine Dicke von  $5 \text{ \AA}$  besitzt,<sup>119,123</sup> ergibt sich für den Kopfgruppenbereich erneut eine Dicke von ca.  $(7 \pm 1) \text{ \AA}$ . Die DLPA-Doppelschicht hat in der  $L_\alpha$ -Phase somit eine Gesamtdicke von  $40 \text{ \AA}$ . Dieser Wert findet gute Übereinstimmung mit den in der Literatur veröffentlichten Daten.<sup>125</sup>

## 6.4.2 QCM-D-Messungen

### *Injektionsschritt (A): Ausbildung einer Lipiddoppelschicht*

Kasemo *et al.* fanden unter Verwendung der QCM-D-Technik heraus, dass die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht durch das Spreiten von Vesikeln des Phosphatidylcholins (PC) aus Eigelb (von Hühnereiern) auf planaren Substraten des negativ geladenen  $\text{SiO}_2$  in zwei Schritten abläuft:<sup>126</sup> 1) Direkt nach der Zugabe der Vesikeldispersion nimmt die Frequenz stark ab, d. h., die Schichtdicke wird größer. 2) Anschließend durchläuft die Frequenz ein Minimum bei  $\Delta f_{\min} \approx -58$  Hz und nimmt dann wieder zu, bis sie einen konstanten Wert erreicht. Nach dem Spülen ergibt sich eine Frequenzänderung gegenüber der Ausgangsfrequenz von  $\Delta f_{\text{fin}} \approx -24,5$  Hz. Dieser Wert entspricht der Massenbelegung einer etwa 55 Å dicken Lipiddoppelschicht. Kasemo *et al.* schlussfolgerten, dass die Erhöhung der Masse in Schritt 1 durch die Adsorption intakter Vesikel an dem Substrat verursacht wird. Erreichen die Vesikel auf der Oberfläche eine kritische Dichte, bilden sie eine Lipiddoppelschicht aus. Das in den Vesikeln eingeschlossene Wasser wird freigesetzt, wodurch sich die adsorbierte Masse verringert. Gleichzeitig wird ein Frequenzanstieg detektiert (Schritt 2). Auch andere Arbeitsgruppen kamen zu dem Ergebnis, dass die Ausbildung einer intakten Lipiddoppelschicht zu einer Frequenzänderung von  $\Delta f \approx -24$  bis  $-26$  Hz führt.<sup>127,128</sup>

Weiterhin stellten die Kasemo *et al.* fest, dass der Adsorptionsvorgang stark von der Beschaffenheit der Oberfläche abhängt.<sup>126</sup> Auf der hydrophilen Oberfläche von oxidiertem Gold erfolgt die Adsorption der PC-Vesikel in nur einem Schritt: Nach ihrer Injektion in die Experimentierzelle sinkt die Frequenz wesentlich stärker ab als bei der Adsorption auf der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche. Nach dem Spülen ergibt sich ein  $\Delta f$  von ca.  $-90$  Hz. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die intakten Vesikel dicht gepackt auf dem Substrat adsorbiert sind.

Auch in den in dieser Arbeit vorgestellten QCM-D-Experimenten wurde kein Minimum von  $\Delta f$  während der Adsorption der DMPC- oder DLPA-Vesikel an der jeweiligen Polyelektrolytmultischicht detektiert. Anscheinend wird die kritische Vesikeldichte nicht erreicht. Möglicherweise verlieren die Vesikel schon nach kurzem Kontakt mit dem Substrat ihre Integrität und bilden Doppelschichten aus.<sup>127</sup>

Nach der Adsorption der zwitterionischen DMPC-Vesikel auf dem negativ geladenen PSS verringert sich die Frequenz um  $\Delta f \approx -35$  Hz gegenüber der Ausgangsfrequenz. Diese ermittelte Frequenzänderung ist zu gering für die Adsorption dicht gepackter, intakter Vesikel auf dem Substrat. Für die Ausbildung einer intakten Lipiddoppelschicht ist sie jedoch zu hoch. Deshalb muss angenommen werden, dass auf der zur Verfügung stehenden Fläche sowohl Lipiddoppelschichten als auch Vesikel adsorbiert sind. Demnach wird also nur ein Teil der Vesikel nach dem Kontakt mit dem Substrat zerstört.

Diese Annahme wird unterstützt durch die relativ starke Erhöhung der Dämpfung ( $\Delta D \approx 0,9 \cdot 10^{-6}$ ) verglichen mit dem Wert vor der Injektion der Vesikeldispersion. Der Anteil adsorbierter Vesikel erhöht folglich die Viskosität des Films.

Während der Adsorption der negativ geladenen DLPA-Vesikel an das positiv geladenen PAH reduziert sich die Frequenz um  $\Delta f \approx -33$  Hz. Dieses Verhalten ist bis dahin vergleichbar mit der Adsorption von DMPC an PSS. Durch das anschließende Spülen reduziert sich jedoch die adsorbierte Masse. Gegenüber der Ausgangsfrequenz ergibt sich eine effektive Änderung von  $\Delta f \approx -17,8$  Hz. Wahrscheinlich desorbieren die Vesikel beim Spülen, wobei nur die Lipiddoppelschicht auf dem Substrat zurückbleibt. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die resultierende Dämpfung im Vergleich mit dem Ausgangswert keine merkliche Veränderung aufweist. Die Viskosität der adsorbierten DLPA-Doppelschicht ist also gering.

Die Adsorption der DMPC-Vesikel an die PSS-terminierte Polyelektrolytschicht erfolgte in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen und NaCl. Die geschilderte Adsorptionskinetik ähnelt der, die Seantier *et al.* für die Adsorption von DMPC auf SiO<sub>2</sub> in Abwesenheit von NaCl und CaCl<sub>2</sub> beschrieben.<sup>127</sup> Die Geschwindigkeit der Adsorption war in diesem Fall langsamer als bei den gleichen Messungen in Gegenwart der genannten Ionen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass in Abwesenheit von Salzen starke *van-der-Waals*- sowie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Vesikeln und der Oberfläche auftreten. Dadurch bevorzugt das System eine möglichst große Kontaktfläche. Dies führt zur Destabilisierung der Vesikel und damit zu ihrem Zerfall.<sup>129</sup> Es ist außerdem möglich, dass die Ursache für die langsame Bildungsrate der Doppelschichten durch die Abstoßung zwischen den Bereichen bereits adsorbierter Doppelschichten und den Vesikeln in der Dispersion hervorgerufen wird. Mit steigender Ionenstärke ändern sich sowohl die Eigenschaften der Vesikelmembran als auch die der Oberfläche aufgrund der Abschirmung der Ladungen durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Ionen.<sup>129</sup> Als Folge verringert sich die Stärke der Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche und den Lipiden, und die adsorbierten Lipidvesikel werden stabilisiert.

Die Gruppe von Kasemo hat kürzlich gezeigt, dass die Kinetik der Ausbildung der Lipiddoppelschichten auch temperaturabhängig ist.<sup>130,131</sup> An SiO<sub>2</sub>-Oberflächen wurde die kritische Vesikeldichte bei höheren Temperaturen eher erreicht als bei tieferen. Da die Adsorption der DMPC- sowie der DLPA-Vesikel bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgte, ist ein Vergleich der Adsorptionskinetik der beiden Phospholipide demzufolge nicht möglich.

***Injektionsschritt (B): Wechselwirkung zwischen der adsorbierten Lipidschicht und DNA in Abwesenheit zweiwertiger Kationen***

Die Injektion einer Lösung von 1 mM Kalbstyhmus-DNA + 10 mM NaCl in die Experimentierzelle, die den mit einer DMPC-Schicht belegten Quarzkristall enthält, bewirkte keine Veränderungen von  $\Delta f$  bzw.  $\Delta D$  gegenüber dem Ausgangszustand. Demnach findet unter diesen Bedingungen keine DNA-Adsorption an der DMPC-Schicht statt. Diese Beobachtung bestätigt die Resultate der Monoschichtexperimente im Ergebnisteil I: In Abwesenheit zweiwertiger Kationen findet keine DNA-Adsorption an zwitterionischen Lipidschichten statt.

Auch an der negativ geladenen DLPA-Schicht wird keine Adsorption der DNA beobachtet. Da die Phospholipide keine geschlossene Doppelschicht auf dem Substrat ausbilden, wäre eine Wechselwirkung der DNA mit dem unter der Lipidschicht liegenden, positiv geladenen PAH theoretisch möglich. Da aber keine Frequenzänderung nach der DNA-Injektion gemessen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es durch die abstoßende Wirkung zwischen den beiden negativ geladenen Molekülen DLPA und DNA nicht zur Wechselwirkung zwischen PAH und DNA kommt.

***Injektionsschritt (C): Interaktion von  $\text{CaCl}_2$  mit der adsorbierten Lipidschicht***

Durch das Spülen nach Schritt (B) wurde die DNA aus der Experimentierzelle entfernt, da nachweislich keine Adsorption erfolgte. Somit bildet das zwitterionische DMPC noch immer die abschließende Schicht auf dem Polyelektrolytsubstrat. Nach der Injektion der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (100 mM) und anschließendem Spülen der Zelle wird eine Verringerung der Frequenz um  $\Delta f \approx -5,5$  Hz beobachtet. Ähnliche Ergebnisse werden für den Quarzkristall erhalten, dessen abschließende Schicht durch das negativ geladenen DLPA gebildet wird. Nach der Injektion der 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und dem anschließendem Waschen verringert sich die Frequenz um  $\Delta f \approx -5$  Hz. Folglich erhöht die zusätzliche Anwesenheit der Calciumionen die Masse des Films auf dem Quarzkristall. Diese Frequenzänderung kann aber nicht allein durch die Anlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Lipidkopfgruppen erklärt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die zweiwertigen Kationen durch Defekte in den adsorbierten Lipiddoppelschichten auch in die Polyelektrolytmultischicht diffundieren. Dort können sie mit dem negativen PSS in Wechselwirkung treten. Dadurch erhöhen sie die Masse der adsorbierten Schicht, und reduzieren somit  $\Delta f$ .

***Injektionsschritt (D): Wechselwirkung zwischen der adsorbierten Lipidschicht und DNA in Gegenwart zweiwertiger Kationen***

Um die Interaktion der DNA mit der adsorbierten DMPC-Schicht in Gegenwart zweiwertiger Kationen zu untersuchen, wird in Schritt (D) eine Lösung von 1 mM Kalbsthymus-DNA, 10 mM NaCl sowie 100 mM CaCl<sub>2</sub> injiziert. Als Folge sinkt die Frequenz drastisch ab, während die Dämpfung stark steigt. Nach dem Waschen ergeben sich Änderungen von  $\Delta f \approx -15$  Hz und  $\Delta D \approx 1,1 \cdot 10^{-6}$  gegenüber den Ausgangswerten. Demzufolge findet eine Adsorption der DNA an die DMPC-Schicht statt. Sie führt zu einer Erhöhung der Masse des adsorbierten Films und setzt dessen Viskosität herauf.

Auch auf der negativ geladenen DLPA-Schicht adsorbiert die DNA unter diesen Bedingungen. Gegenüber dem Zustand vor der Injektion der DNA/CaCl<sub>2</sub>-Lösung verändert sich die Frequenz um  $\Delta f \approx -44,3$  Hz und die Dämpfung um  $\Delta D \approx 2,4 \cdot 10^{-6}$ . Es adsorbiert also wesentlich mehr DNA an das System mit DLPA als an das mit DMPC. Wahrscheinlich werden DLPA und DNA über Calciumionen verbrückt. Weiterhin ist anzunehmen, dass DNA zusätzlich mit der obersten positiv geladenen PAH-Schicht in Wechselwirkung tritt. Dadurch kann mehr DNA an dem Substrat adsorbiert werden als in dem System, in dem DMPC an dem negativ geladenen PSS adsorbiert ist.

***Injektionsschritt (E): Einfluss von EDTA auf den DNA/DLPA/Ca<sup>2+</sup>-Komplex***

In Schritt (E) wird eine Lösung mit 250 mM EDTA (pH 7) in die Experimentierzelle injiziert, in der der DNA/DLPA/Ca<sup>2+</sup>-Komplex auf dem PE-bedeckten Quarzkristall vorliegt. Nach ca. 1 h wird die Zelle mit Wasser gespült. Dabei erreichen die Frequenz und die Dämpfung annähernd die Werte, die sie vor dem Injektionsschritt (A) aufwiesen. Demnach desorbiert unter Einfluss von EDTA sowohl die DNA als auch die darunter liegende DLPA-Schicht.

EDTA ist ein Chelatbildner, der besonders mit zweiwertigen Kationen stabile Komplexe eingeht. Dadurch werden die Calciumionen dem DLPA/DNA-Komplex entzogen. Dieser Vorgang führt zur Zunahme der elektrostatischen Abstoßung zwischen den beiden negativ geladenen Molekülen, womit die DNA vom Substrat desorbiert. Ähnliche Beobachtung machten auch Budker *et al.* bei Trübungsmessungen von Nucleinsäuren.<sup>21</sup> Die Gegenwart von MgCl<sub>2</sub> führte zur Bildung stabiler Komplexe zwischen DNA und den Vesikeln aus zwitterionischen Phosphatidylcholinen, was durch eine Erhöhung der Trübung detektiert wurde. Der Zusatz von EDTA führte zur Komplexbildung der Mg<sup>2+</sup>-Ionen und bewirkte somit die Verringerung der Trübung auf ihren Ausgangswert. In Abwesenheit von MgCl<sub>2</sub> in der Lösung wurden keine Komplexe mit der DNA gebildet. Die Inkubation mit EDTA in Schritt (E) führt allerdings auch zur Desorption der DLPA-

Schicht. Möglicherweise diffundiert EDTA in den Wasserfilm zwischen Lipid- und PE-Schicht. Durch seine negative Ladung könnte es mit dem positiv geladenen PAH in Wechselwirkung. Durch diese Konkurrenzreaktion würde DLPA desorbieren, was die Erhöhung von  $\Delta f$  erklären würde.

## 6.5 Zusammenfassung (Teil II)

Die Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens von Vesikeln des zwitterionischen DMPC auf positiv und negativ geladenen, planaren Polyelektrolytschichten zeigen, dass das Phospholipid auf dem positiv geladenen PAH keine Doppelschichten ausbildet. Auf dem negativ geladenen PSS spreiten die Vesikel aus und bilden eine Doppelschicht mit einer Dicke von ca. 44 Å ( $L_\alpha$ -Phase). Allerdings bedeckt diese Schicht das Substrat nicht vollständig, d. h., sie weist Defekte auf. Zusätzlich scheinen intakte Vesikel auf dem negativ geladenen PSS zu adsorbieren. In Gegenwart der zweiwertigen Calciumionen adsorbiert DNA an der DMPC-Schicht. In Abwesenheit der Calciumionen findet keine DNA-Adsorption statt.

Vesikel des negativ geladenen Phospholipids DLPA spreiten auf dem positiv geladenen PAH und bilden eine Doppelschicht mit einer Dicke von ca. 40 Å ( $L_\alpha$ -Phase). Auch diese Lipidschicht weist Defekte auf. Dennoch adsorbiert DNA nur in Gegenwart von Calciumionen an dieser Schicht. Die Bildung des DNA/Lipid-Komplexes ist durch das Zufügen von EDTA, das zweiwertige Kationen komplexiert, reversibel.

Diese Resultat zeigen, dass es nicht gelungen ist, intakte Lipiddoppelschichten zu erzeugen. Um die Bedingungen zu ermitteln, unter denen dies möglich wird, sollte eine systematische Studie durchgeführt werden, in denen Parameter wie die Salzkonzentration, die Größe und die Konzentration der Vesikel sowie ihr Präparationsweg untersucht werden. Auch die Mischung mit anderen Lipiden sowie eine Optimierung des pH-Werts kann zur Ausbildung von geschlossenen Doppelschichten beitragen. Sie sind die Voraussetzung für die Erzeugung von Multischichtsystemen, die für den Gentransfer mittels künstlicher Viren eingesetzt werden können.

Basierend auf den Ergebnissen der Monoschichtexperimente konnte auch für die Lipiddoppelschichten gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen zwitterionischen oder negativ geladenen Phospholipiden und DNA nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen stattfindet.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung zwitterionischer und negativ geladener Phospholipide mit genomischer Kalbsthymus-DNA sowie mit Plasmid-DNA anhand zweier Modellsysteme untersucht: 1.) Für die Monoschichtexperimente an der Wasser/Luft-Grenzfläche wurde die Filmwaagentchnik in Kombination mit IR-Spektroskopie, Röntgenreflexion, Röntgendiffraktion, Brewsterwinkel-Mikroskopie, Röntgenfluoreszenz- und Oberflächenpotentialmessungen eingesetzt. 2.) Die Untersuchungen mit Lipiddoppelschichten wurden an der fest/flüssig-Grenzfläche mittels Neutronenreflexion und der Quarzmikrowaage durchgeführt.

Zu 1.) Die Monoschichtexperimente zeigen, dass die Anwesenheit der zweiwertigen Kationen  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  in der Subphase keinen nachweisbaren Einfluss auf die Struktur der zwitterionischen DMPE-Monoschicht hat. In der Subphase gelöste DNA adsorbiert nur in Gegenwart dieser Kationen an der DMPE-Monoschicht. Sowohl die Adsorption genomischer DNA als auch von Plasmid-DNA bewirkt eine Reduktion des Neigungswinkels der Lipidketten, die vermutlich auf eine stärkere Neigung der Kopfgruppe zurückzuführen ist. Durch diese Umorientierung wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Stickstoffatomen der Lipidkopfgruppen und den negativ geladenen DNA-Phosphaten erhöht.

Die adsorbierte DNA weist eine geordnete Struktur auf, wenn sie durch Barium-, Magnesium-, Calcium- oder Manganionen komplexiert ist. Der Abstand zwischen parallelen DNA-Strängen hängt dabei von der Größe der DNA-Fragmente sowie von der Art des Kations ab. Die größten Abstände ergeben sich mit Bariumionen, gefolgt von Magnesium- und Calciumionen. Die kleinsten DNA-Abstände werden durch Komplexierung mit Manganionen erhalten. Diese Ionenreihenfolge stellt sich sowohl für genomische DNA als auch für Plasmid-DNA ein. Die DNA-Abstände werden durch die Kompression des Lipidfilms nicht beeinflusst. Zwischen der Lipidmonoschicht und der adsorbierten DNA besteht demnach nur eine schwache Wechselwirkung. Offensichtlich befindet sich die durch zweiwertige Kationen komplexierte DNA als weitgehend eigenständige Schicht unter dem Lipidfilm.

Zu 2.) Die Untersuchungen an der fest/flüssig-Grenzfläche zeigen, dass das zwitterionische DMPC keine Lipiddoppelschicht auf planaren Polyelektrolytmultischichten ausbildet, deren letzte Lage das positiv geladene PAH ist. Hingegen bildet DMPC auf dem negativ geladenen PSS eine Doppelschicht aus, die jedoch Defekte aufweist. Eine Adsorption von genomischer DNA auf dieser Lipidschicht findet nur in Gegenwart von Calciumionen statt. Andere zweiwertige Kationen wurden nicht untersucht.

Auch das negativ geladene Phospholipid DLPA bildet auf dem positiv geladenen PAH eine Lipiddoppelschicht aus, die Defekte aufweist. DNA allein adsorbiert nicht an dieser Schicht. Erst die Anwesenheit von Calciumionen in der Lösung führt zur DNA-Adsorption. Durch die Zugabe von EDTA werden die Calciumionen dem DLPA/DNA-Komplex entzogen, wodurch dieser dissoziiert. Demnach ist die calciuminduzierte Bildung dieser Komplexe reversibel.

## 8 Ausblick

Es ist von entscheidender Bedeutung, dass auf dem künstlichen Viruspartikel eine geschlossene Lipidschicht vorhanden ist, da diese zwei wichtige Funktionen erfüllen soll: Zum einen bildet diese Schicht die Voraussetzung für eine gute Fusion mit der biologischen Membran zur Aufnahme des Partikels in die Zelle, zum anderen schützt sie vor unspezifischen Wechselwirkungen der Polyelektrolyte mit Proteinen oder anderen geladenen Biomolekülen im Serum. Der Prozess der Ausbildung von intakten Lipiddoppelschichten auf Polyelektrolytsubstraten ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb muss die Grundlage der Lipid/Polyelektrolyt-Wechselwirkung noch besser verstanden und optimiert werden. Weitreichendere Kenntnisse über den Adsorptionsprozess zwitterionischer Vesikel an verschiedene Polyelektrolytsubstrate können durch die Hinzunahme zusätzlicher Messtechniken erlangt werden. So ermöglicht die Kombination von Neutronenreflexion, QCM-Messungen, Kraftmikroskopie und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie Aussagen über Dicke, Rauigkeit, Viskosität, Wassergehalt sowie die Morphologie des adsorbierten Lipidfilms.

Biologische Membranen enthalten neben zwitterionischen Lipiden wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin auch negativ geladene Lipide wie Phosphatidsäure und Phosphatidylserin. Um die Fusion mit diesen Membranen so optimal wie möglich zu gestalten, ist es daher sinnvoll, in zukünftigen Projekten Mischungen dieser Lipide in den Modellsystemen zu untersuchen.

Weiterhin ist es wichtig, die Lipid/DNA-Wechselwirkung unter möglichst physiologischen Bedingungen zu erforschen. Dazu sollten zukünftige Experimente unter Verwendung eines geeigneten Puffersystems durchgeführt werden. Somit kann der Einfluss niedriger pH-Werte, wie sie in den Endosomen vorliegen, auf den DNA/Lipid-Komplex untersucht werden.

## 9 Anhang

### 9.1 XR - Tabellen

**Tabelle 6:** Ergebnis der Modellierung der Röntgenreflexionsmessungen der DMPE-Monoschicht auf Wasser bei 20 °C und 20 mN/m mit der Schichtdicke  $d$ , der Elektronendichte  $\rho$  sowie der Rauigkeit  $\sigma$ .

Box	$d/\text{Å}$	$\rho/\text{Å}^{-3}$	$\sigma/\text{Å}$
Luft			
DMPE (Ketten)	17,1	0,338	3,3
DMPE (Kopfgruppe)	6,1	0,633	2
H <sub>2</sub> O		0,336	1,6

**Tabelle 7:** Ergebnis der Modellierung der Röntgenreflexionsmessungen der DMPE-Monoschicht auf einer wässrigen Lösung von 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei 20 °C und 20 mN/m mit der Schichtdicke  $d$ , der Elektronendichte  $\rho$  sowie der Rauigkeit  $\sigma$ .

Box	$d/\text{Å}$	$\rho/\text{Å}^{-3}$	$\sigma/\text{Å}$
Luft			
DMPE (Ketten)	17,1	0,338	3,3
DMPE (Kopfgruppe)	6,1	0,633	2
DNA + Mg <sup>2+</sup>	19	0,422	2,4
H <sub>2</sub> O		0,336	1,3

**Tabelle 8:** Ergebnis der Modellierung der Röntgenreflexionsmessungen der DMPE-Monoschicht auf einer wässrigen Lösung von 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20 °C und 20 mN/m mit der Schichtdicke  $d$ , der Elektronendichte  $\rho$  sowie der Rauigkeit  $\sigma$ .

Box	$d/\text{Å}$	$\rho/\text{Å}^{-3}$	$\sigma/\text{Å}$
Luft			
DMPE (Ketten)	17,1	0,338	3,3
DMPE (Kopfgruppe)	6,1	0,633	2
DNA + Ca <sup>2+</sup>	18	0,422	2,8
H <sub>2</sub> O		0,336	1,5

## 9.2 GIXD – Tabellen

### 9.2.1 DMPE auf genomischer DNA

**Tabelle 9:** Horizontale und vertikale Streuvektorkomponenten  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ , Verzerrung der Einheitszelle  $d$ , Neigungswinkel  $t$ , Neigungsrichtung, projizierte Fläche pro Lipidkette  $A_{xy}$  und Querschnittsfläche  $A_0$  von DMPE auf verschiedenen Subphasen bei unterschiedlichen Drücken und 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-1}$	$Q_{xy} / \text{Å}^{-1}$			$Q_z / \text{Å}^{-1}$			$d$	$t / ^\circ$	Neigungs- richtung	$A_{xy} / \text{Å}^2$	$A_0 / \text{Å}^2$
<b>DMPE auf Wasser</b>											
12,4	1,418	1,447	1,477	0,467	0,373	0,095	0,04707	19,3	oblique	21,8	20,6
20,6	1,449	1,468	1,484	0,353	0,243	0,110	0,02757	14,0	oblique	21,2	20,6
28,8		1,484	1,491		0,198	0	0,00628	8,8	NN	20,6	20,4
<b>DMPE auf 5 mM BaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl</b>											
9,6	1,408	1,434	1,472	0,523	0,422	0,100	0,05178	21,6	oblique	22,2	20,5
14,5	1,431	1,448	1,476	0,428	0,315	0,113	0,03620	17,3	oblique	21,6	20,6
19,5	1,441	1,462	1,480	0,358	0,264	0,094	0,03085	14,5	oblique	21,4	20,7
24,6	1,460	1,476	1,485	0,287	0,208	0,079	0,01982	11,5	oblique	21,0	20,6
29,5		1,483	1,490		0,191	0	0,00629	8,5	NN	20,7	20,4
39,3			1,497			0	0	0		20,4	20,3
35,2			1,495			0	0	0		20,4	20,4
<b>DMPE auf 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl</b>											
8,2	1,396	1,432	1,472	0,520	0,408	0,112	0,061127	21,5	oblique	22,2	20,7
12,4	1,410	1,442	1,475	0,480	0,376	0,104	0,05203	19,8	oblique	21,9	20,6
16,5	1,429	1,455	1,479	0,420	0,322	0,098	0,03969	17,1	oblique	21,6	20,6
20,6	1,444	1,465	1,482	0,352	0,254	0,098	0,03000	14,2	oblique	21,3	20,6
24,7	1,460	1,475	1,486	0,310	0,210	0,100	0,02044	12,2	oblique	21,0	20,5
28,8		1,482	1,489		0,192	0	0,00629	8,5	NN	20,7	20,5
32,9			1,495			0	0	0		20,4	20,4
<b>DMPE auf 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl</b>											
10,0	1,408	1,441	1,475	0,495	0,390	0,105	0,05350	20,4	oblique	22,0	20,6
20,0	1,447	1,467	1,483	0,380	0,277	0,103	0,02840	15,2	oblique	21,2	20,5
25,0	1,469	1,481	1,489	0,290	0,190	0,100	0,01570	11,4	oblique	20,8	20,4
30,0			1,493			0,834	0	0	NN	20,4	20,4
40,0			1,499			0	0	0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 5 mM MnCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl</b>											
10,0	1,408	1,434	1,473	0,490	0,370	0,120	0,05263	20,0	oblique	22,1	20,7
14,6	1,431	1,454	1,478	0,416	0,306	0,110	0,03732	16,8	oblique	21,6	20,6
19,5	1,445	1,465	1,481	0,361	0,263	0,098	0,02843	14,5	oblique	21,3	20,6
24,6	1,466	1,479	1,486	0,280	0,203	0,077	0,01585	11,2	oblique	20,9	20,5
29,6		1,486	1,490		0,174	0	0,00359	7,7	NN	20,6	20,4
39,6			1,498			0	0	0		20,6	20,5

**Tabelle 10:** Horizontale und vertikale Streuvektorkomponente  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ , Verzerrung der Einheitszelle  $d$ , Neigungswinkel  $t$ , Neigungsrichtung, projizierte Fläche pro Lipidkette  $A_{xy}$  und Querschnittsfläche  $A_0$  von DMPE auf verschiedenen Subphasen bei unterschiedlichen Drücken und 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-1}$	$Q_{xy} / \text{Å}^{-1}$			$Q_z / \text{Å}^{-1}$			$d$	$t / ^\circ$	Neigungs- richtung	$A_{xy} / \text{Å}^2$	$A_0 / \text{Å}^2$
<b>DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl</b>											
10,0	1,413	1,443	1,476	0,527	0,449	0,078	0,05040	21,9	oblique	21,9	20,3
20,0	1,444	1,466	1,483	0,369	0,287	0,082	0,03081	15,0	oblique	21,3	20,5
30,0		1,486	1,493		0,173	0	0,00628	7,7	NN	20,6	20,4
40,0			1,499			0	0	0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM BaCl<sub>2</sub></b>											
10,0	1,424	1,453	1,477	0,464	0,339	0,124	0,04219	18,7	oblique	21,7	20,5
15,0	1,443	1,463	1,480	0,400	0,270	0,130	0,02924	15,8	oblique	21,3	20,5
20,0		1,469	1,485		0,270	0	0,01450	12,0	NN	21,0	20,5
25,0			1,490			0	0	0		20,5	20,5
30,0			1,494			0	0	0		20,4	20,4
40,0			1,499			0	0	0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub></b>											
10,0	1,410	1,440	1,476	0,500	0,400	0,100	0,05296	20,7	oblique	21,9	20,5
20,0	1,452	1,471	1,485	0,332	0,252	0,080	0,02601	13,4	oblique	21,1	20,5
25,0		1,476	1,488		0,185	0	0,01083	8,3	NN	20,8	20,6
30,0			1,494			0	0	0		20,4	20,4
40,0			1,500			0	0	0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM CaCl<sub>2</sub></b>											
10,0	1,416	1,449	1,478	0,500	0,370	0,130	0,04920	20,2	oblique	21,8	20,4
20,0	1,460	1,478	1,487	0,297	0,310	0,230	0,02149	12,4	oblique	21,0	20,5
25,0		1,484	1,491		0,100	0	0,00628	7,8	NN	20,6	20,5
30,0			1,495			0	0	0		20,4	20,4
40,0			1,500			0	0	0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 0,1 mM Kalbsthymus-DNA + 1 mM NaCl + 5 mM MnCl<sub>2</sub></b>											
10,0		1,452	1,475		0,330	0	0,02100	14,8	NN	21,4	20,6
15,0		1,462	1,480		0,280	0	0,01177	12,4	NN	20,9	20,5
20,0		1,471	1,484		0,210	0	0,01177	9,4	NN	20,9	20,6
25,0			1,487			0	0,00000	0		20,6	20,6
30,0			1,494			0	0,00000	0		20,4	20,4
40,0			1,500			0	0,00000	0		20,3	20,3

**Tabelle 11:** Horizontale Streuvektorkomponente  $Q_{xy}$ , Halbwertsbreite des Peaks  $FWHM$  und interaxialer DNA-Abstand  $d_{DNA}$  bei verschiedenen Lateraldrücken  $\pi$  von DMPE auf DNA + zweiwertige Kationen bei 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-2}$	$Q_{xy} / \text{\AA}^{-1}$	$FWHM / \text{\AA}^{-1}$	$d_{DNA} / \text{\AA}$	$Q_{xy} / \text{\AA}^{-1}$	$FWHM / \text{\AA}^{-1}$	$d_{DNA} / \text{\AA}$
	<b>DMPE auf 5 mM BaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl + 0,1 mM Kalbsthymus-DNA</b>			<b>DMPE auf 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl + 0,1 mM Kalbsthymus-DNA</b>		
10	0,150	0,081	41,8	0,166	0,041	37,7
15	0,152	0,070	41,3	0,161	0,032	39,0
20	0,149	0,070	42,3	0,161	0,040	38,9
30	0,151	0,071	41,6	0,162	0,045	38,7
40	0,147	0,074	42,7	0,163	0,039	38,6
	0,150	0,081	41,8	0,166	0,041	37,8
	<b>DMPE auf 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl + 0,1 mM Kalbsthymus-DNA</b>			<b>DMPE auf 5 mM MnCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl + 0,1 mM Kalbsthymus-DNA</b>		
10	0,198	0,022	31,7	0,220	0,016	28,6
15	0,199	0,023	31,5	0,219	0,017	28,8
20	0,198	0,030	31,8	0,219	0,018	28,7
30	0,201	0,022	31,2	0,222	0,015	28,3
40	0,201	0,022	31,2	0,220	0,017	28,5

### 9.2.2 DMPE/ DMG (7:1) auf genomischer DNA

**Table 12:** Horizontale und vertikale Streuvektorkomponente  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ , Verzerrung der Einheitszelle  $d$ , Neigungswinkel  $t$ , Neigungsrichtung, projizierte Fläche pro Lipidkette  $A_{xy}$  und Querschnittsfläche  $A_0$  von DMPE auf verschiedenen Subphasen bei unterschiedlichen Drücken und 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-1}$	$Q_{xy} / \text{\AA}^{-1}$			$Q_z / \text{\AA}^{-1}$			$d$	$t / ^\circ$	Neigungs- richtung .	$A_{xy} / \text{\AA}^2$	$A_0 / \text{\AA}^2$
<b>DMPE/DMG (7:1) auf 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl</b>											
5,0	1,439	1,463	1,479	0,387	0,309	0,078	0,032	17,2	oblique	21,4	20,4
10,0	1,454	1,474	1,482	0,330	0,274	0,056	0,023	14,5	oblique	21,1	20,4
12,5	1,449	1,470	1,483	0,300	0,270	0,030	0,027	12,8	oblique	21,2	20,6
15,0		1,471	1,485		0,255	0	0,013	11,4	NN	20,9	20,5
20,0		1,482	1,493		0,112	0	0,010	5,0	NN	20,7	20,5
25,0			1,494			0	0	0		20,4	20,4
<b>DMPE/DMG (7:1) auf 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl + 0.1 mM Kalbsthymus-DNA</b>											
5,0	1,435	1,459	1,480	0,410	0,350	0,060	0,036	17,2	oblique	21,5	20,5
10,0	1,463	1,475	1,487	0,320	0,270	0,050	0,019	13,3	oblique	21,0	20,4
12,5	1,468	1,481	1,489	0,270	0,260	0,010	0,017	11,8	oblique	20,8	20,4
15,0		1,478	1,489		0,228	0	0,010	10,1	NN	20,8	20,4
20,0			1,494			0	0	0		20,4	20,4

**Table 13:** Horizontale Streuvektorkomponente  $Q_{xy}$ , Halbwertsbreite des Peaks FWHM und interaxialer DNA-Abstand  $d_{DNA}$  bei verschiedenen Lateraldrücken  $\pi$  von DMPE/DMG (7:1) auf DNA + CaCl<sub>2</sub> bei 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-1}$	$Q_{xy} / \text{\AA}^{-1}$	FWHM / $\text{\AA}^{-1}$	$d_{DNA} / \text{\AA}$
<b>DMPE/DMG auf 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 1 mM NaCl + 0.1 mM Kalbsthymus-DNA</b>			
9,8	0,189	0,032	33,3
12,4	0,186	0,039	33,8
15,0	0,190	0,029	33,1
19,9	0,186	0,039	33,8
24,9	0,192	0,029	32,7

### 9.2.3 DMPE auf pGL3

**Tabelle 14:** Horizontale und vertikale Streuvektorkomponente  $Q_{xy}$  und  $Q_z$ , Verzerrung der Einheitszelle  $d$ , Neigungswinkel  $t$ , Neigungsrichtung, projizierte Fläche pro Lipidkette  $A_{xy}$  und Querschnittsfläche  $A_0$  von DMPE auf verschiedenen Subphasen bei unterschiedlichen Drücken und 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-1}$	$Q_{xy} / \text{Å}^{-1}$		$Q_z / \text{Å}^{-1}$		$d$	$t / ^\circ$	Neigungs- richtung	$A_{xy} / \text{Å}^2$	$A_0 / \text{Å}^2$		
<b>DMPE auf 10 mM BaCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>											
0,0	1,407	1,439	1,474	0,493	0,403	0,090	0,05375	20,5	oblique	22,0	20,6
15,0	1,430	1,456	1,479	0,430	0,346	0,084	0,03888	17,7	oblique	21,6	20,5
20,0	1,445	1,466	1,482	0,331	0,253	0,078	0,02924	13,5	oblique	21,3	20,6
25,0	1,468	1,480	1,487	0,224	0,219	0,005	0,01500	9,9	oblique	20,9	20,6
30,0			1,491			0		0		20,5	20,5
40,0			1,497			0		0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>											
10,0	1,405	1,437	1,473	0,498	0,368	0,130	0,05464	20,3	oblique	22,0	20,6
15,0	1,426	1,456	1,478	0,420	0,300	0,120	0,04141	16,9	oblique	21,6	20,6
20,0	1,450	1,470	1,482	0,300	0,290	0,010	0,02541	13,2	oblique	21,2	20,6
25,0	1,467	1,488	1,481	0,228	0,223	0,005	0,01668	10,0	oblique	20,2	20,5
30,0			1,490			0	0	0		20,2	20,5
40,0			1,498			0	0	0		20,3	20,3
<b>DMPE auf 10 mM CaCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>											
10,0	1,416	1,452	1,477	0,496	0,359	0,138	0,04879	19,9	oblique	21,8	20,5
15,0	1,439	1,463	1,482	0,411	0,301	0,110	0,03402	16,5	oblique	21,4	20,5
20,0	1,458	1,475	1,486	0,302	0,249	0,052	0,02209	12,5	oblique	21,0	20,5
25,0		1,482	1,491		0,200	0	0,00809	8,9	NN	20,7	20,4
30,0			1,497			0	0	0		20,3	20,3
40,0			1,503			0	0	0		20,2	20,2
<b>DMPE auf 10 mM MnCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>											
10,0	1,412	1,44	1,48	0,470	0,339	0,1301	0,05475	19,1	oblique	21,9	20,6
15,0	1,432	1,458	1,480	0,423	0,323	0,099	0,03806	17,2	oblique	21,5	20,5
20,0	1,452	1,470	1,484	0,353	0,302	0,051	0,02521	14,7	oblique	21,1	20,4
25,0	1,471	1,484	1,489	0,249	0,218	0,031	0,01447	10,5	oblique	20,8	20,4
30,0			1,490			0	0	0		20,5	20,5
40,0			1,500			0	0	0		20,3	20,3

**Tabelle 15:** Horizontale Streuvektorkomponente  $Q_{xy}$ , Halbwertsbreite des Peaks  $FWHM$  und interaxialer DNA-Abstand  $d_{DNA}$  bei verschiedenen Lateraldrücken  $\pi$  von DMPE auf pGL3 + zweiwertige Kationen bei 20 °C.

$\pi / \text{mN m}^{-1}$	$Q_{xy} / \text{\AA}^{-1}$	$FWHM / \text{\AA}^{-1}$	$d_{DNA} / \text{\AA}$	$Q_{xy} / \text{\AA}^{-1}$	$FWHM / \text{\AA}^{-1}$	$d_{DNA} / \text{\AA}$
	<b>DMPE auf 10 mM BaCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>			<b>DMPE auf 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>		
10,0				0,118	0,058	53,23
15,0				0,123	0,041	51,22
25,0	0,101	0,026	62,23			
30,0	0,099	0,039	63,65			
40,0	0,097	0,047	64,77			
	<b>DMPE auf 10 mM CaCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>			<b>DMPE auf 10 mM MnCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl + 0.1 mM pGL3</b>		
10,0	0,144	0,040	43,63	0,172	0,037	36,63
15,0	0,167	0,030	37,51	0,178	0,036	35,38
20,0	0,169	0,030	37,20	0,181	0,030	34,73
25,0	0,171	0,028	36,65	0,181	0,035	34,64
30,0	0,168	0,034	37,33	0,176	0,030	35,72
40,0	0,176	0,025	35,79	0,176	0,035	35,65

### 9.3 NR - Tabellen

**Tabelle 16:** Ergebnis der Modellierung der Neutronenreflexionsmessungen von  $PEI(PSS/PAH)_6$  (links) sowie nach Adsorption von 0,5 mg/mL DMPC-Vesikel (100 nm) auf  $PEI(PSS/PAH)_6$  (rechts) bei 26 °C mit der Schichtdicke  $d$ , der Streulängendichte  $\rho$  sowie der Rauigkeit  $\delta$ .

Box	$d/\text{Å}$	$\rho/10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma/\text{Å}$	Box	$d/\text{Å}$	$\rho/10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma/\text{Å}$
Silicium		2,38		Silicium		2,38	
PAH	$334 \pm 2$	$3,5 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$	PAH	$334 \pm 2$	$3,5 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$
D <sub>2</sub> O		6,37	$5 \pm 0,2$	D <sub>2</sub> O/DMPC-Kopfgruppe	0	6,37	$38 \pm 5$
				DMPC (Ketten)	0	$1,7 \pm 0,3$	$54 \pm 6$
				D <sub>2</sub> O		6,37	$98 \pm 9$

**Tabelle 17:** Ergebnis der Modellierung der Neutronenreflexionsmessungen von  $PEI(PSS/PAH)_6PSS$  (links) sowie nach Adsorption von 0,5 mg/mL DMPC-Vesikel (100 nm) auf  $PEI(PSS/PAH)_6PSS$  (rechts) bei 26 °C mit der Schichtdicke  $d$ , der Streulängendichte  $\rho$  sowie der Rauigkeit  $\delta$ .

Box	$d/\text{Å}$	$\rho/10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma/\text{Å}$	Box	$d/\text{Å}$	$\rho/10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma/\text{Å}$
Silicium		2,38		Silicium		2,38	
PSS	$380 \pm 3$	$3,8 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$	PSS	$380 \pm 3$	$3,8 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$
D <sub>2</sub> O		6,37	$5 \pm 0,2$	D <sub>2</sub> O/DMPC-Kopfgruppe	$12 \pm 1$	$5,5 \pm 0,1$	$5 \pm 0,2$
				DMPC (Ketten)	$30 \pm 1$	$1,4 \pm 0,1$	$3 \pm 0,1$
				D <sub>2</sub> O		6,37	$7 \pm 0,2$

**Tabelle 18:** Ergebnis der Modellierung der Neutronenreflexionsmessungen von  $PEI(PSS/PAH)_6$  (links) sowie nach Adsorption von 0,5 mg/mL DLPA-Vesikel (100 nm) auf  $PEI(PSS/PAH)_6$  (rechts) bei 35 °C mit der Schichtdicke  $d$ , der Streulängendichte  $\rho$  sowie der Rauigkeit  $\delta$ .

Box	$d/\text{Å}$	$\rho/10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma/\text{Å}$	Box	$d/\text{Å}$	$\rho/10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma/\text{Å}$
Silicium		2,38		Silicium		2,38	
PAH	$265 \pm 2$	$3,5 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$	PAH	$265 \pm 2$	$3,5 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$
D <sub>2</sub> O		6,37	$5 \pm 0,2$	D <sub>2</sub> O/DMPC-Kopfgruppe	$12 \pm 1$	$5,8 \pm 0,1$	$7 \pm 0,2$
				DLPA (Ketten)	$26 \pm 1$	$1,3 \pm 0,1$	$6 \pm 0,2$
				D <sub>2</sub> O		6,37	$14 \pm 0,2$

## 9.4 QCM-D - Tabellen

**Tabelle 19:** Änderungen der auf 5 MHz normierten Frequenz  $\Delta f/n$  ( $n$  = Zahl des Obertons) sowie Änderungen der Dämpfung  $\Delta D$  der QCM-D-Messungen des mit einer PSS-terminierten Polyelektrolytmultischicht [Si/PEI/(PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS] bedeckten Quarzkristalls bei 26 °C nach den Injektionsschritten A bis D.  $\Delta f$  sowie  $\Delta D$  wurden nach dem jeweiligen Waschschrift ermittelt und beziehen sich auf den Zustand vor der Injektion.

Injektionsschritt		$\Delta f/n$ [Hz]	$\Delta D$ [ $10^{-6}$ ]
A	0,5 mg/mL DMPC-Vesikeldispersion	- 35,0	+ 0,9
B	1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl	/	/
C	100 mM CaCl <sub>2</sub>	- 5,5	+ 0,4
D	1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl + 100 mM CaCl <sub>2</sub>	- 15,0	+ 1,1

**Tabelle 20:** Änderungen der auf 5 MHz normierten Frequenz  $\Delta f/n$  ( $n$  = Zahl des Obertons) sowie Änderungen der Dämpfung  $\Delta D$  der QCM-D-Messungen des mit einer PAH-terminierten Polyelektrolytmultischicht [Au/PEI/(PSS/PAH)<sub>2</sub>] bedeckten Quarzkristalls bei 35 °C nach den Injektionsschritten A bis E.  $\Delta f$  sowie  $\Delta D$  wurden nach dem jeweiligen Waschschrift ermittelt und beziehen sich auf den Zustand vor der Injektion.

Injektionsschritt		$\Delta f/n$ [Hz]	$\Delta D$ [ $10^{-6}$ ]
A	0,5 mg/mL DLPA-Vesikeldispersion	- 17,8	/
B	1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl	/	/
C	10 mM CaCl <sub>2</sub>	- 5,0	+ 0,5
D	1 mM Kalbsthymus-DNA + 10 mM NaCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub>	- 44,3	+ 2,4
E	50 mM EDTA pH 7	+ 77,3	- 2,9

## 9.5 Materialien

*Tabelle 21: Verwendete Materialien.*

Substanz	Abkürzung	Hersteller/ Reinheit
<b>Lipide:</b>		
1,2-Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin	DMPE	Avanti Polar Lipids (USA) /99 %
1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin	DMPC	Avanti Polar Lipids (USA) /99 %
1,2-Dilauryl-phosphatidsäure	DLPA	Avanti Polar Lipids (USA) /99 %
1,2-Dimyristoyl-glycerol	DMG	Avanti Polar Lipids (USA) /99 %
<b>Salze:</b>		
Natriumchlorid	NaCl	Merck/ 99,5 %
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Fluka/ 98 %
Bariumchlorid	BaCl <sub>2</sub>	Fluka/ 99 %
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Fluka/ 99 %
Manganchlorid	MnCl <sub>2</sub>	Fluka/ 99 %
<b>Polyelektrolyte:</b>		
Kalbsthymus-DNA		Sigma-Aldrich
Plasmid-DNA pGL3	pGL3	Präpariert im Labor von Prof. L. Domenjoud (Frankreich)
Polyallylamin (50 000 – 60 000 g/mol)	PAH	Sigma-Aldrich
Polystyrensulfonat (70 000 g/mol)	PSS	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (60 000 g/mol)	PEI	Sigma-Aldrich
<b>Lösungsmittel:</b>		
Deuterium	D <sub>2</sub> O	Isotec (Ihio)
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Merck/ 99,4 %
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	Sigma/ 99,8 %

## 10 Literatur

### 10.1 Literaturquellen

- 1 D. Ferber, *Science*, 2001, **294**, 1638.
- 2 C. M. Wiethoff and C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.*, 2003, **92**, 203.
- 3 M. Bartsch, A.H. Weeke-Klump, D.K.F. Meijer, G.L. Scherphof and J.A.A.M. Kamps, *Journal of Liposome Research*, 2005, **15**, 59.
- 4 M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon and M. Edelstein, *J Gene Med*, 2004, **6**, 597.
- 5 G. Decher, F. Essler, J. D. Hong, K. Lowack, J. Schmitt and Y. Lvov, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 1993, **205**, 334.
- 6 Y. Lvov, G. Decher and H. Möhwald, *Langmuir*, 1993, **9**, 481.
- 7 G. B. Sukhorukov, E. Donath, H. Lichtenfeld, E. Knippel, M. Knippel, A. Budde and H. Möhwald, *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, 1998, **137**, 253.
- 8 G. Brezesinski and H. Möhwald, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2003, **100**, 563.
- 9 K. de Meijere, G. Brezesinski and H. Möhwald, *Macromolecules*, 1997, **30**, 2337.
- 10 C. Symietz, M. Schneider, G. Brezesinski and H. Möhwald, *Macromolecules*, 2004, **37**, 3865.
- 11 C. R. Safinya, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, **11**, 440.
- 12 A. V. Gorelov, E. D. Kudryashov, J. C. Jacquier, D. M. McLoughlin and K. A. Dawson, *Physica A*, 1998, **249**, 216.
- 13 R. S. Dias, B. Lindman and M. G. Miguel, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 12600.
- 14 P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 7413.
- 15 J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, *Science*, 1997, **275**, 810.
- 16 J. D. Tousignant, A. L. Gates, L. A. Ingram, C. L. Johnson, J. B. Nietupski, S. H. Cheng, S. J. Eastman and R.K. Scheule, *Hum Gene Ther*, 2000, **11**, 2493.
- 17 M. C. Fillion and N. C. Phillips, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1997, **1329**, 345.
- 18 D. Huster and K. Arnold, *Biophys. J.*, 1998, **75**, 909.
- 19 D. Huster, G. Paasche, U. Dietrich, O. Zschörnig, T. Gutberlet, K. Gawrisch and K. Arnold, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 879.
- 20 K. de Meijere, G. Brezesinski, O. Zschörnig, K. Arnold and H. Möhwald, *Physica B*, 1998, **248**, 269.
- 21 V. G. Budker, A. A. Godovikov, L. P. Naumova and I. A. Slepneva, *Nucleic Acids Res.*, 1980, **8**, 2499.
- 22 A. L. Bailey and S. M. Sullivan, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 2000, **1468**, 239.
- 23 D. McLoughlin, R. Dias, B. Lindman, M. Cardenas, T. Nylander, K. Dawson, M. Miguel and D. Langevin, *Langmuir*, 2005, **21**, 1900.
- 24 R. I. Mahato, L. C. Smith and A. Rolland, *Advances in Genetics, Vol 41*, 1999, **41**, 95.
- 25 P. Kreiss, B. Cameron, R. Rangara, P. Mailhe, O. Aguerre-Charriol, M. Airiau, D. Scherman, J. Crouzet and B. Pitard, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 3792.
- 26 G. de Jong, A. Telenius, S. Vanderbyl, A. Meitz and J. Drayer, *Chromosome Res*, 2001, **9**, 475.
- 27 M.M. Whitmore, S. Li, L. Falo and L. Jr. Huang, *Cancer Immunol Immunother*, 2001, **50**, 503.
- 28 F.E. Ruiz, J.P. Clancy, M.A. Perricone, Z. Bebok, J.S. Hong, S.H. Cheng, D.P. Meeker, K.R. Young, R.A. Schoumacher, M.R. Weatherly, L. Wing, J.E. Morris, L. Sindel, M. Rosenberg, F.W. van Ginkel, J.R. McGhee, D. Kelly, R.K. Lyrene and E.J. Sorscher, *Hum Gene Ther*, 2001, **12**, 751.
- 29 S.W. Dow, L.G. Fradkin, D.H. Liggitt, A.P. Willson, T.D. Heath and T.A. Potter, *J Immunol*, 1999, **163**, 1552.
- 30 M. Whitmore, S. Li and L. Huang, *Gene Therapy*, 1999, **6**, 1867.
- 31 R.M. Hughes, *J. Surg. Oncol.*, 2004, **85**, 28.
- 32 V. Bulmus, M. Woodward, L. Lin, N. Murthy, P. Stayton and A. Hoffman, *J. Control Release*, 2003, **93**, 105.

- 33 T. V. Chirila, P. E. Rakoczy, K. L. Garrett, X. Lou and I. J. Constable, *Biomaterials*, 2002, **23**, 321.
- 34 J. H. Jeong, S. W. Kim and T. G. Park, *J. Control Release*, 2003, **93**, 183.
- 35 T. M. Allen and P. R. Cullis, *Science*, 2004, **303**, 1818.
- 36 M. D. Brown, A. G. Schatzlein and I. F. Uchehgbu, *Int. J. Pharm.*, 2001, **229**, 1.
- 37 C. Garcia-Chaumont, O. Seksek, J. Grzybowska, E. Borowski and J. Bolard, *Pharmacol. Ther.*, 2000, **87**, 255.
- 38 E. Wagner, R. Kircheis and G.F. Walker, *Biomed. Pharmacother.*, 2004, **58**, 152.
- 39 E. Tupin, B. Poirier, M. F. Bureau and et al., *Gene Therapy*, 2003, **10**, 569.
- 40 S. Kuriyama, A. Mitoro, H. Tsujinoue and et al., *Gene Therapy*, 2000, **7**
- 41 N.S. Yew, K.X. Wang, M. Przybylska, R.G. Bagley, M. Stedman, J. Marshall, R.K. Scheule and S.H. Cheng, *Hum Gene Ther*, 1999, **10**, 223.
- 42 E. Fattal, C. Dubernet and P. Couvreur, *STP Pharma. Sci.*, 2001, **11**, 34.
- 43 C. Lavigne, Y. Lunardi-Iskandar, B. Lebleu and A. R. Thierry, *Method Enzymol.*, 2004, **387**, 189.
- 44 E. Fattal, P. Couvreur and C. Dubernet, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 931.
- 45 X. Guo and F. C. Jr. Szoka, *Bioconjug. Chem.*, 2001, **12**, 291.
- 46 X. Guo, Z. Huang and F. C. Szoka, *Method Enzymol.*, 2004, **387**, 147.
- 47 I. M. Hafez, S. Ansell and P. R. Cullis, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 1438.
- 48 S. C. Semple, S. K. Klimuk, T. O. Harasym, JS. N. Dos, S. M. Ansell, K. F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P. R. Cullis, M. J. Hope and P. Scherrer, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2001, **1510**, 152.
- 49 D. D. Stuart and T. M. Allen, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, **1463**, 219.
- 50 F. Pastorino, C. Brignole, D. Marimietri, G. Pagnan, A. Morando, D. Ribatti, S. C. Semple, C. Gambini, T. M. Allen and M. Ponzoni, *Clin. Cancer Res.*, 2003, **9**, 4595.
- 51 S. Li, M. A. Rizzo, S. Bhattacharya and L. Huang, *Gene Therapy*, 1998, **5**, 930.
- 52 N. Shi and W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 7567.
- 53 Y. Zhang, F. Schlachetzki and W. M. Pardridge, *Mol. Ther.*, 2003, **7**, 11.
- 54 K. Muller, T. Nahde, A. Fahr, R. Muller and S. Brusselbach, *Cancer Gene Ther.*, 2001, **8**, 107.
- 55 M. M. Mady, M. M. Ghannam, W. A. Khalil, R. Repp, M. Markus, W. Rascher, R. Muller and A. Fahr, *J. Drug Target*, 2004, **12**, 11.
- 56 S. Simoes, V. Slepishkin, P. Pires, R. Gaspar, M. C. Pedroso de Lima and N. Düzgünes, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, **1463**, 459.
- 57 S. Simoes, P. Pires, M. T. da Cruz, N. Duzgunes and M. C. de Lima, *Method Enzymol.*, 2003, **373**, 369.
- 58 H. E. Hofland, C. Masson, S. Iginla, I. Osetinsky, J. A. Reddy, C. P. Leamon, D. Scherman, M. Bessodes and P. Wils, *Mol. Ther.*, 2002, **5**, 739.
- 59 S. Penco, S. Scarfi, M. Giovine, G. Damonte, E. Millo, B. Villaggio, M. Passalacqua, M. Pozzolini, C. Garre and U. Benatti, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2001, **34**, 151.
- 60 J. He and P. Furmanski, *Nature*, 1995, **373**, 721.
- 61 S. Matzku, H. Krempel, H. P. Weckernmann, V. Schirrmacher, H. Sinn and H. Stricker, *Cancer Immunol Immunother*, 1990, **31**, 285.
- 62 L. Xu, W. Tang, C. C. Huang, W. Alexander, L. M. Xiang, K. F. Pirolo, A. Rait and E. H. Chang, *Mol. Med.*, 2001, **7**, 723.
- 63 V. Budker, V. Gurevich, J. E. Hagstrom, F. Bortzov and J. A. Wolff, *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**, 760.
- 64 I. M. Hafez and P. R. Cullis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **47**, 139.
- 65 O. Zelphati and F. C. Jr. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 11493.
- 66 O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 7297.
- 67 W. T. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, *J. Control Release*, 1999, **60**, 149.
- 68 D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich and G. L. Lukacs, *Gene Therapy*, 1999, **6**, 482.
- 69 H. Pollard, G. Toumaniantz, J. L. Amos, H. Avet-Loiseau, G. Guihard, J. P. Behr and D. Escande, *J. Gene. Med.*, 2001, **3**, 153.

- 70 J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger and M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 18997.
- 71 I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R. W. Graham, E. G. Saravolac and P. B. Joshi, *Gene Therapy*, 1999, **6**, 403.
- 72 D. Gorlich and I. W. Mattaj, *Science*, 1996, **271**, 1513.
- 73 V. M. Kaganer, H. Möhwald and P. Dutta, *Rev. Mod. Phys.*, 1999, **71**, 779.
- 74 H. Möhwald, *Phospholipid Monolayers*. (Elsevier Science B. V., 1995), pp.161.
- 75 G. Brezesinski and H.-J. Mögel, *Grenzflächen und Kolloide*. (Spektrum Akademischer Verlag, 1993).
- 76 H. Möhwald, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1990, **41**, 441.
- 77 D. Brewster, *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, 1815, **105**, 125.
- 78 R. Mendelsohn, J. W. Brauner and A. Gericke, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1995, **46**, 305.
- 79 W. Hübner and A. Blume, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, **96**, 99.
- 80 J.L.R. Arrondo, F.M. Goni and J.M. Macarulla, *Biochemica Et Biophysica Acta*, 1984, **794**, 165.
- 81 R. Mendelsohn and C. R. Flach, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, edited by J.M. Chalmers and P.R. Griffiths (2002), Vol. 2, pp. 1028.
- 82 M. Banyay, M. Sarkar and A. Graslund, *Biophys. Chem.*, 2003, **104**, 477.
- 83 S. Gromelski and G. Brezesinski, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 5551.
- 84 C. R. Flach, J. W. Brauner, J. W. Taylor, R. C. Baldwin and R. Mendelsohn, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 402.
- 85 K. Kjaer, J. Als-Nielsen, C. A. Helm, P. Tippmann-Krayer and H. Möhwald, *J. Phys. Chem.*, 1989, **93**, 3200.
- 86 R. Frahm, J. Weigelt, G. Meyer and G. Materlik, *Rev. Sci. Instrum.*, 1995, **66**, 1677.
- 87 T.R. Jensen, K. Kjaer, D. Moebius and R. Miller, *Elsevier Sciences B.V.*, 2001, **11**, pp. 205
- 88 P. Eisenberger and W. C. Marra, *Phys. Rev. Lett.*, 1981, **46**, 1081.
- 89 K. Kjaer, *Physica B*, 1994, **198**, 100.
- 90 L. G. Parratt, *Physical Review*, 1954, **95**, 359.
- 91 M. Schalke and M. Lösche, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2000, **88**, 243.
- 92 C. A. Helm, H. Möhwald, K. Kjaer and J. Als-Nielsen, *Europhys. Lett.*, 1987, **4**, 697.
- 93 T.P. Russel, *Physica B*, 1996, **221**, 267.
- 94 J. Penfold, *J. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2002, **7**, 139.
- 95 J. Lekner, *Theory of Reflection*. (Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1987).
- 96 J.S. Higgins and H.C. Benoit, *Polymers and Neutron Scattering*. (Clarendon Press, Oxford, 1994).
- 97 [www.hmi.de/bensc/instrumentation/instrumente/v6/v6.html](http://www.hmi.de/bensc/instrumentation/instrumente/v6/v6.html).
- 98 <http://sinq.web.psi.ch/sinq/instr/amor.html>.
- 99 G. Sauerbrey, *J. Phys.*, 1959, **155**, 206.
- 100 A. Janshoff, H.-J. Galla and C. Steinem, *Angew. Chem.*, 2000, **112**, 4164.
- 101 G. Decher, *Science*, 1997, **227**, 1232.
- 102 Y. Lvov, G. Decher and G. Sukhorukov, *Macromolecules*, 1993, **26**, 5396.
- 103 S. Keller, H.-N. Kim and T. Mallouk, *Journal of American Chemical Society*, 1994, **116**, 8817.
- 104 D. P. Kharakoz, R. S. Khusainova, A. V. Gorelova and K. A. Dawson, *FEBS Lett.*, 1999, **446**, 27.
- 105 A. V. Gorelov, M. E. Hayes, A. Wehling and K. A. Dawson, *Il Nuovo Cimento*, 1998, **20**, 2401.
- 106 Y. S. Tarahovsky, A. A. Deev, I. S. Masulis and G. R. Ivanitsky, *Biochemistry (Moscow)*, 1998, **63**, 1126.
- 107 O. Francescangeli, V. Stanic, L. Gobbi, P. Bruni, M. Iacussi, G. Tosi and S. Bernstorff, *Phys. Rev. E*, 2003, **67**
- 108 O. Francescangeli, M. Pisani, V. Stanic, P. Bruni and T. M. Weiss, *Europhys. Lett.*, 2004, **67**, 669.
- 109 J. J. McManus, J. O. Rädler and K. A. Dawson, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 9869.
- 110 J. J. McManus, J. O. Rädler and K. A. Dawson, *Langmuir*, 2003, **19**, 9630.

- 111 T. Schindler and E. Nordmeier, *Macromol. Chem. Phys.*, 1997, **198**, 1943.
- 112 R. A. Dluhy, D. G. Cameron, H. H. Mantsch and R. Mendelsohn, *Biochemistry*, 1983, **22**, 6318.
- 113 C. R. Flach, J. W. Brauner and R. Mendelsohn, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 1994.
- 114 E. Taillandier and J. Liquier, *Method Enzymol.*, 1992, **211**, 307.
- 115 D. Papahadjopoulos, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1968, **163**, 240.
- 116 G. Brezesinski, V. M. Kaganer, H. Möhwald and P. B. Howes, *J. Chem. Phys.*, 1998, **109**, 2006.
- 117 J. Duguid, V. A. Bloomfield, J. Benevides and G. J. Thomas, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 1916.
- 118 H. Binder and O. Zschörnig, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, **115**, 39.
- 119 J. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 2. ed. (California, USA, 1992).
- 120 L.K. Tamm and H. M. McConnell, *Biophys. J.*, 1985, **47**, 103.
- 121 G. Brezesinski, (unpublished results),
- 122 J. Majewski, J. Y. Wong, C. K. Park, M. Seitz, J. N. Israelachvili and G. S. Smith, *Biophys. J.*, 1998, **75**, 2363.
- 123 G. Fragneto, F. Graner, T. Charitat, P. Dubos and E. Bellet-Amalric, *Langmuir*, 2000, **16**, 4581.
- 124 S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D.C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas and E. Sackmann, *Biophys. J.*, 1991, **59**, 289.
- 125 F. d'Acapito, I. Emelianov, A. Relini, P. Cavatorta, A. Gliozzi, V. Minicozzi, S. Morante, P. L. Solari and R. Rolandi, *Langmuir*, 2002, **18**, 5277.
- 126 C. A. Keller and B. Kasemo, *Biophys. J.*, 1998, **75**, 1397.
- 127 B. Seantier, C. Breffa, O. Felix and G. Decher, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 21755.
- 128 R. Richter, A. Mukhopadhyay and A. Brission, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3035.
- 129 S. Sofou and J. L. Thomas, *Biosens. Bioelectron.*, 20003, **18**, 445.
- 130 E. Reimhult, F. Höök and B. Kasemo, *J. Phys. Chem.*, 2002, **117**, 7401.
- 131 E. Reimhult, F. Höök and B. Kasemo, *Langmuir*, 2003, **19**, 1681.

## 10.2 Eigene Veröffentlichungen

S. Gromelski und G. Brezesinski

**„Adsorption of DNA to zwitterionic DMPE monolayers mediated by magnesium ions”**

*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 5551 – 5556

S. Gromelski und G. Brezesinski

**“DNA condensation and interaction with zwitterionic phospholipids mediated by divalent cations”**

eingereicht zur Veröffentlichung, *Langmuir*

S. Gromelski und G. Brezesinski

**“Adsorption of an independent layer of DNA complexed by divalent cations to a zwitterionic monolayer”**

*in Vorbereitung*

S. Gromelski, E. Rogalska und G. Brezesinski

**„Interaction of plasmid-DNA with zwitterionic monolayers”**

*in Vorbereitung*

S. Gromelski und G. Brezesinski

**“DNA adsorption to negatively charged phospholipid monolayers mediated by divalent cations”**

*in Vorbereitung*

S. Gromelski und G. Brezesinski

**“Adsorption of DMPC to PSS and PAH”**

*in Vorbereitung*



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir während meiner Promotionszeit zur Seite standen und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Helmuth Möhwald möchte ich meinen Dank für die stete Unterstützung aussprechen und für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Abteilung anzufertigen. Weiterhin danke ich der *VolkswagenStiftung* für die Finanzierung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Gerald Brezesinski für seinen wissenschaftlichen Beistand, viele wertvolle Diskussionen und seine Geduld. Es hat mir immer viel Spaß gemacht, mit ihm zusammenzuarbeiten und auch mal zu scherzen.

Außerordentlich wichtig war für mich die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Dafür möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanken. Insbesondere war mir die fachliche und private Unterstützung von Kerstin Wagner eine große Hilfe. Dafür danke ich ihr und freue mich, sie als meinen *time bandit* gehabt zu haben. Ein herzliches Dankeschön geht auch an Irina Bernd für ihre Hilfe im Labor aber auch für ihre Fähigkeit, anderen zuzuhören und immer die richtigen Worte zu finden.

Bei Prof. Ewa Rogalska möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir die BAM-Messungen in ihrem Labor an der *Université Henry Poincaré Nancy 1* (Nancy, Frankreich) ermöglichte. Ein Dankeschön geht auch an Yohann Corvis, der mir bei diesen Messungen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Für die Möglichkeit, die Präparation der Plasmid-DNA in seinem Labor durchzuführen, danke ich Prof. Lionel Domenjoud der *Université Henry Poincaré Nancy 1* (Nancy, Frankreich). Danken möchte ich weiterhin Dr. Rumen Krastev für die Hilfestellung bei den Neutronenreflexionsexperimenten.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Familie und meinen Freund Jens, die immer hinter mir standen und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.