

Dynamische Wechselwirkungen zwischen festkörperunterstützten kationischen Lipidbilayern und oligo-DNA

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von

Michael Junglas
aus Erlenbach am Main

Würzburg im Dezember 2004

Eingereicht am: 29.12.2004

bei der Fakultät für Physik und Astronomie

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas M. Bayerl
2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler

der Dissertation.

1. Prüfer: Prof. Dr. Thomas M. Bayerl
2. Prüfer: Prof. Dr. Georg Reents

der mündlichen Prüfung.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. März 2005

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Das Aufbringen eines Lipidbilayers, den man als artifizielle Zellmembran ansehen kann, auf eine Festkörperoberfläche ist eine häufig genutzte Methode, um ihn mit physikalischen Messmethoden, wie zum Beispiel ATR-FTIR, FRAP, Neutronenstreuung oder wie in der vorliegenden Arbeit NMR, einfacher untersuchen zu können. Darüber hinaus ist die so präparierte Oberfläche, in Kombination mit vorhandener Halbleitertechnik, ein idealer Sensor, um das Verhalten von Biomolekülen in Wechselwirkung mit dem Lipidbilayer zu untersuchen. Das Fernziel dieser Entwicklung ist die Herstellung eines biokompatiblen Chips mit dem sich bisher sehr aufwendige Messungen stark vereinfachen und schneller durchführen lassen (Stichwort: lab on a chip). Für die zuverlässige Interpretation der durch einen solchen Sensor gewonnenen Informationen ist es allerdings unerlässlich vorher zum einen die Wechselwirkungen zwischen der Festkörperoberfläche und dem ihn bedeckenden Lipidbilayer und zum anderen die Wechselwirkung zwischen Biomolekülen und dem Lipidbilayer genauer zu untersuchen.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Silicakugeln (Durchmesser im Submikrometerbereich) als Festkörpersubstrat verwendet und mit verschiedenen Lipidbilayern beschichtet. Um die Wechselwirkung dieses Systems mit Biomolekülen zu erforschen wurden DNA-Moleküle eingesetzt. Als Messmethode kam Festkörper-Deuterium-NMR zum Einsatz.

Zunächst wurde der Einfluss der Festkörperoberfläche auf die Verteilung geladener Lipide in den beiden Hälften eines Bilayers, der aus geladenen und ungeladenen Lipiden zusammengesetzt war, ermittelt. Es zeigte sich, dass das negativ geladene Silica-Substrat eine Anreicherung der positiv geladenen Lipide in der dem Substrat zugewandten Seite des Bilayers bewirkte. Darüber hinaus reichert sich während des Aufbringes des Bilayers der Anteil der positiv geladenen Lipide in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu einer höheren Gesamtkonzentration als der Ausgangskonzentration an. Ein vor der Präparation eingestelltes Konzentrationsverhältnis aus verschiedenen Lipiden muss also nicht im festkörperunterstützten Bilayer vorliegen und die jeweiligen Lipidarten müssen nicht zwischen beiden Monolayern gleich verteilt sein.

In weiteren Messungen wurden die Auswirkungen auf einen festkörperunterstützten Bilayer aus positiv geladenen Lipiden beim Ankoppeln von kurzen DNA-Strängen untersucht. Die DNA ist im Gegensatz zu den kationischen Lipiden unter Standardbedingungen negativ geladen. Es wurde nicht nur das Ankoppelverhalten einer DNA-Doppelhelix sondern auch das von einzelsträngig vorliegender DNA untersucht. Während die als Einzelstrang vorliegende DNA den molekularen Ordnungsparameter der Lipidfettsäureketten deutlich erhöhte, war die Erhöhung für die DNA-Doppelhelix geringer. Ein Vergleich der Eigen-diffusionskoeffizienten der kationischen Lipide in Wechselwirkung mit den beiden

DNA-Formen ergab keine Änderung der Diffusion, wenn die DNA-Doppelhelix an den Bilayer koppelte. Die als Einzelstrang vorliegende DNA erniedrigt dagegen die Diffusion der Lipide. Die gemessenen Unterschiede der beiden DNA-Formen, sowohl bezüglich ihrer Auswirkung auf die molekulare Ordnung der Lipidketten, als auch auf die Eigendiffusion der Lipidmoleküle legen ein unterschiedliches Ankopplungsverhalten der beiden Formen nahe.

Bei Experimenten, die versuchten das Ankoppeln der DNA für ein System aus zwei Lipidkomponenten genauer zu analysieren, zeigte sich der starke Einfluss des Substrats, der es unmöglich machte die Ergebnisse mit einem rein kationischen Lipidbilayer zu vergleichen.

Die Ergebnisse der Messungen tragen zum besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Lipidbilayer und Festkörpersubstrat und zwischen Lipidbilayer und ankoppelnden Biomolekülen bei.

Abstract

The coating of a solid surface with a lipid bilayer, which can be regarded as an artificial cell membrane, is a widely used method to simplify the examination of the bilayer with physical measurement methods (e.g. ATR-FTIR, FRAP, neutron scattering or as in this thesis NMR). In addition, such a prepared surface in combination with present semiconductor technology, is an ideal sensor to examine the interaction of a lipid bilayer with biomolecules. The long-term objective of this development is the production of a biocompatible chip (also referred to as a lab on a chip) which simplifies and accelerates present day extensive measurements. For the reliable interpretation of the information gathered from such a chip, it is essential to closely examine on one hand the interaction between the solid surface and the coated lipid bilayer and on the other hand the interaction between the biomolecules and the lipid bilayer.

To address this subject, silica beads with a diameter in the submicrometer range were used as a solid substrate and coated with various lipid bilayers. DNA molecules were used to examine the interaction of this system with biomolecules. Solid-state deuterium NMR was used as the measurement method.

The effect of the solid surface on the distribution of charged lipids in the two monolayers of a lipid bilayer, which was composed of charged and neutral lipids, was examined first. It was shown that the negatively charged silica substrate caused an enrichment of positively charged lipids in the monolayer facing the substrate. In addition, the total concentration of positively charged lipids rose with respect to the initial concentration, depending on the incubation time. A concentration percentage adjusted prior to the preparation therefore does not necessarily exist in the solid supported bilayer and is not necessarily distributed equally between the two monolayers.

Further experiments were made to study the influence of the coupling of short DNA strands to a solid supported bilayer composed of positively charged lipids. DNA has a negative charge in standard conditions, as opposed to the cationic lipids. The coupling behavior was not only studied for a DNA double helix but also for a single stranded DNA. The single stranded DNA gave a distinctive rise to the molecular order parameter of the lipids fatty acid chains. The increase for the DNA double helix was less distinct. Comparison of the self diffusion coefficients of the cationic lipids interacting with both forms of DNA showed no change for the diffusion when the DNA double helix coupled to the bilayer. In contrast the single stranded DNA decreased the diffusion of the lipids. The different effects of the two DNA forms both for their effect on the molecular order parameter of the lipid chains and for the self diffusion of the lipid molecules, suggests a different coupling behavior.

Experiments to further analyze the coupling of DNA to a system containing two lipid components showed the strong influence of the substrate, which made it impossible to compare the results with respect to a pure cationic lipid bilayer.

The results of the experiments contribute to a better comprehension of the interaction between lipid bilayers and solid substrates and between lipid bilayers and coupling biomolecules.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Die Zellmembran	10
1.2	Zielsetzungen	12
2	Materialien	14
2.1	Probenzusammensetzung und Präparation	14
2.1.1	Lipide	14
2.1.2	DNA	15
2.1.3	Verwendete Chemikalien	16
2.1.4	Silicakugeln	17
2.1.5	Präparation der sphärisch unterstützten Lipidbilayer	17
2.2	NMR-Hardware	18
3	Theoretische Grundlagen und Methoden	20
3.1	Deuterium-NMR	20
3.1.1	Hamilton-Operator und Resonanzfrequenz	20
3.1.2	Orientierungsabhängigkeit der Resonanzfrequenz	22
3.1.3	Linienform	22
3.1.4	Momente	24
3.1.5	Relaxationsprozesse	24
3.1.6	Laterale Diffusion auf gekrümmten Oberflächen	27
3.1.7	De-Pake-Ing und Ordnungsparameterprofil	27
3.1.8	CPMG-Pulssequenz als Tiefpassfilter zur Bestimmung der Diffusionskonstanten	30
4	Ergebnisse	33
4.1	Einfluss des Festkörpersubstrats auf binäre Lipidbilayer	33
4.1.1	Konzentrationsunterschiede im Lipidbilayer	34
4.2	Lipidbilayer aus kationischen Lipiden	37
4.2.1	Molekulare Ordnung	38
4.2.2	Diffusionsverhalten	39

4.3	Wechselwirkung zwischen kationischen Lipiden und ss-DNA	41
4.3.1	Molekulare Ordnung	41
4.3.2	Diffusionsverhalten	43
4.4	Wechselwirkung zwischen kationischen Lipiden und ds-DNA	44
4.4.1	Molekulare Ordnung	44
4.4.2	Diffusionsverhalten	46
4.5	Binäre Lipidsysteme in Wechselwirkung mit DNA	46
4.5.1	Molekulare Ordnung	46
4.5.2	Diffusionsverhalten	48
4.6	Lipidbilayer auf polymerbeschichteten Silicakugeln	48
4.6.1	Molekulare Ordnung	48
4.6.2	Diffusionsverhalten	49
5	Schlussfolgerungen	51
	Literaturverzeichnis	52

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Zellmembran

Die Zellmembran (vgl. Abbildung 1.1) ist der Bestandteil der Zelle durch den der gesamte Energie- und Informationsaustausch mit der Außenwelt stattfindet. Sie setzt sich aus einer großen Anzahl verschiedenster Moleküle (z.B. Proteine, Steroide, Lipide etc.) zusammen, die unterschiedliche Aufgaben (z.B. als Ionenkanäle oder Rezeptoren) erfüllen.

Als strukturgebende Einheit für die Membran dienen die sogenannten Phospholipide. Es sind längliche amphiphile Moleküle mit einer hydrophilen Kopfgruppe und hydrophoben Fettsäureketten (vgl. Abbildung 1.2). In Wasser gelöst formen sie unter anderem spontan Lipiddoppelschichten, sogenannte Lipidbilayer oder auch einfach Bilayer, bei denen die Fettsäureketten aufeinander zu und die Kopfgruppen in Richtung des Wassers gerichtet sind.

In der Natur kommen ungefähr zwanzig verschiedene Arten von Phospholipiden, die eine mittlere Länge von ungefähr 5 nm besitzen, vor. Die Kopfgruppen natürlicher Lipide sind entweder negativ geladen oder neutral bzw. zwitterionisch. In der aus verschiedenen Lipidarten zusammengesetzten Lipidmembran einer Zelle *schwimmen* die grösseren Zellmembranbestandteile wie z.B. die Proteine. Sie sind die funktionalen Bestandteile der Zellmembran und steuern den Ionen-, Energie- und Informationsaustausch der Zelle. Bei den Proteinen unterscheidet man die integralen (das heisst in die Membran eingebauten) und die peripheren (an die Membranoberfläche gekoppelten) Membranproteine.

Zur Untersuchung der Eigenschaften der Zellmembran greift man auf einfach aufgebaute System aus wenigen verschiedenen Phospholipiden zurück. Im einfachsten Fall hat man eine einzige Lipidart die einen Lipidbilayer bildet. Dieses System kann man als artifizielles Modell der Zellmembran ansehen.

In seinen physikalischen Eigenschaften ähnelt der Lipidbilayer einem Flüssigkristall [Singer (1972)]. Bei beiden können je nach Temperatur feste oder flüssigkristalline Phasenzustände unterschieden werden. Allerdings existiert im Gegen-

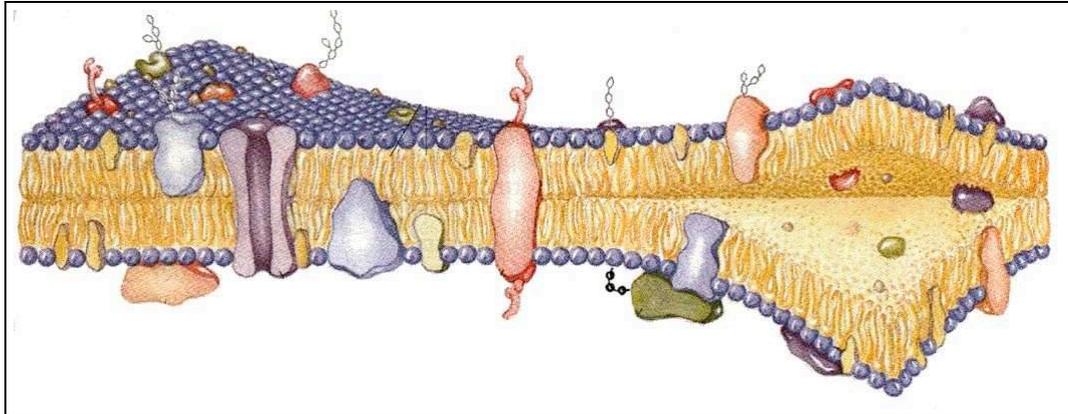


Abbildung 1.1: Die Zellmembran. In einer flüssigen Matrix aus Phospholipidmolekülen schwimmen die Proteine [Lehninger (1998)].

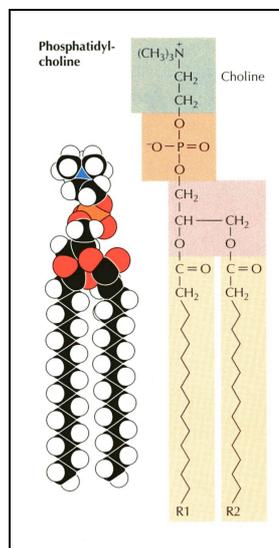


Abbildung 1.2: Aufbau eines Phospholipids [Cooper (2000)].

satz zu künstlich aus definierten Lipidarten zusammengesetzten Bilayern bei einer natürlichen Membran kein thermischer Phasenübergang. Das heisst die biologische Membran ist immer in einer fluiden Phase, was zu einer extrem hohen Dynamik der Bestandteile führt, die immer frei in der Zellmembranebene diffundieren können.

Sogar ein reiner Phospholipidbilayer aus einer Lipidart, den man als einfachstes Modell einer biologischen Membran ansehen kann, zeigt bereits eine hohe Komplexität, sowohl was sein thermisches Phasenverhalten, als auch was seine Eigendynamik angeht [Sackmann (1983)]. Der dynamische Bereich, den diese Bewegungen abdecken erstreckt sich von ungefähr 10^{14} Hz bis 10^{-6} Hz. Keine bis heute bekannte Messmethode ist in der Lage einen so breiten Dynamikbereich vollständig zu erfassen. Man muss unterschiedlichste physikalische Methoden (z.B. Neutronenstreuung, NMR, Dynamische Lichtstreuung, Infrarotspektroskopie, etc.) kombinieren, um einen möglichst vollständigen Einblick in das System Lipidbilayer zu erhalten.

1.2 Zielsetzungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden mittels Deuterium-NMR durchgeführt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich die Bewegungen der Fettsäureketten der Lipide innerhalb des Bilayers zu untersuchen. Man erhält dadurch einen Einblick in das Innere des Bilayers und kann dessen Dynamik untersuchen.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen einen Lipidbilayer auf einem kugelförmigen Festkörpersupport aufzubringen (Spherical Supported Vesicles SSV). Dadurch kann man die Verformung der Vesikel in starken Magnetfeldern vermeiden [Brumm (1992)]. Ausserdem ist es (bei definiertem Radius des Festkörpersupports) zusätzlich möglich die Eigendiffusion der Lipide zu messen [Köchy (1993)].

Insbesondere sollte in dieser Arbeit festgestellt werden, welchen Einfluss das Festkörpersubstrat auf Lipidbilayer aus geladenen und ungeladenen Lipiden hat. Dazu wurden positiv geladene (kationische) Lipide verwendet. Wie bereits erwähnt kommen solche Lipide in der Natur nicht vor. Allerdings können sie chemisch synthetisiert werden. Sie werden zum Beispiel zur Funktionalisierung von Oberflächen [Rädler (1992)] oder als Vektor in der Gentransfektion [Monk (1997)] eingesetzt. Da das verwendete Silica-Substrat in Wasser eine negative Nettoladung aufweist kann man davon ausgehen das die positiv geladenen Lipide in Wechselwirkung mit ihm treten werden.

In weiteren Experimenten wurde ausserdem das Ankoppeln von DNA an einen kationischen festkörperunterstützten Lipidbilayer untersucht. Unter Standardbedingungen ist die DNA negativ geladen, was das Ankoppeln an den positiv geladenen Bilayer erleichtert. Sowohl in ihrer Form als Doppelhelix, als auch als Einzelstrang wurde der Einfluss der DNA auf die Dynamik der Lipidfettsäureketten und auf die Eigendiffusion der Lipide gemessen.

Das Ziel dieser Untersuchungen war es die Wechselwirkungen zwischen Substrat, Lipidbilayer und Biomolekülen besser zu verstehen. Insbesondere ist als Fernziel die Entwicklung eines biokompatiblen Chips zu nennen. Dabei würde ein mit konventioneller Halbleitertechnik erzeugter Chip mit einem Lipidbilayer überzogen. Die Schaltkreise des Chips würden dann Bindungsereignisse von Biomolekülen auswerten (lab on a chip). Um zuverlässige Messungen mit einem solchen Biochip durchführen zu können, muss man daher die oben erwähnten Wechselwirkungen genauer untersuchen.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Probenzusammensetzung und Präparation

2.1.1 Lipide

Alle verwendeten Phospholipide, bis auf DHDAB, das von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) stammt, wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) bezogen. Im einzelnen waren dies (siehe auch Abbildung 2.1):

1,2-dipalmitoyl(7.8- $^2\text{H}_4$)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine	(DPPC- d_8)
1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine	(DPPC)
1,2-dipalmitoyl- d_{62} -trimethylammonium-propane	(DPTAP- d_{62})
dihexadecyl-dimethyl-ammonium-bromide	(DHDAB)

Bei DPTAP- d_{62} und DHDAB handelt es sich um Lipide mit einer positiven Nettoladung der Kopfgruppe, also kationische Lipide. Die Lipidarten DPPC bzw. DPPC- d_8 haben im Gegensatz dazu eine neutrale (zwitterionische) Nettoladung der Kopfgruppe.

Sowohl bei DPTAP- d_{62} , als auch bei DPPC- d_8 handelt es sich um Spezialsynthesen, die speziell für die durchgeführten Messungen synthetisiert wurden. Bei DPTAP- d_{62} wurden sämtliche Wasserstoffatome beider Fettsäureketten durch Deuteriumatome substituiert. Im Gegensatz dazu wurden bei DPPC- d_8 nur an zwei definierten Positionen beider Ketten die Wasserstoffatome durch Deuteriumatome ersetzt. Die beiden substituierten Positionen wurden außerdem so ausgewählt, dass ihre jeweiligen Ordnungsparameter im sogenannten Plateaubereich des Ordnungsparameterprofils liegen (vgl. Kapitel 3.1.7, [Lafleur (1989)])

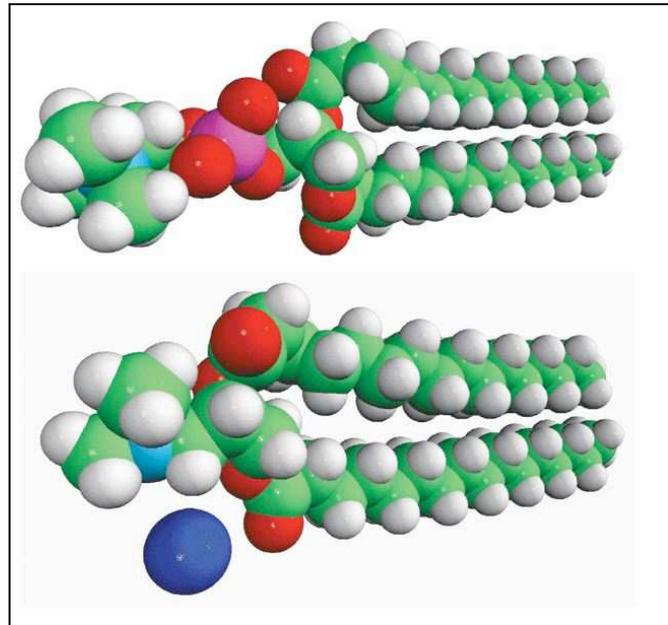


Abbildung 2.1: *Kalottenmodell der Lipide DPPC (oben) und DPTAP (unten). Abbildungen von der Webseite der Firma Avanti Polar Lipids (www.avantilipids.com).*

und [Seelig (1980)]). Im Rahmen der Messgenauigkeit einer Deuterium-NMR-Messung sind sie damit praktisch identisch und resultieren in einem einzigen Pake-Duplett im NMR-Spektrum (vgl. Kapitel 3.1.3). DPPC-d₈ kann daher als eine sehr empfindliche Sonde für Änderungen der molekularen Dynamik der Fettsäureketten innerhalb eines Lipidbilayers eingesetzt werden (beispielsweise zur Detektion von Domänenbildung in einem Bilayer).

Alle Lipide wurden ohne weitere Reinigungsgänge wie im folgenden beschrieben weiterverwendet.

2.1.2 DNA

Oligo-DNA (damit werden kurze DNA-Stücke mit einer Länge von bis zu 200 Basenpaaren bezeichnet) mit einer Basenpaarängen von 25bp (bp Basenpaare) und 50bp wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Nucleotidsequenz wurde für jede oligo-DNA zufällig gewählt. Dazu wurde ein selbstgeschriebenes C-Programm verwendet. Die DNA wurde ohne weitere Reinigung direkt verwendet, da sie von der Lieferfirma vorher schon HPLC gereinigt war, um kürzere Bruchstücke des Syntheseprozesses auszufiltern.

In der gelieferten Form handelt es sich bei der oligo-DNA um Einzelstränge (single stranded DNA (ss-DNA)). Doppelstrang-DNA (double stranded DNA (ds-

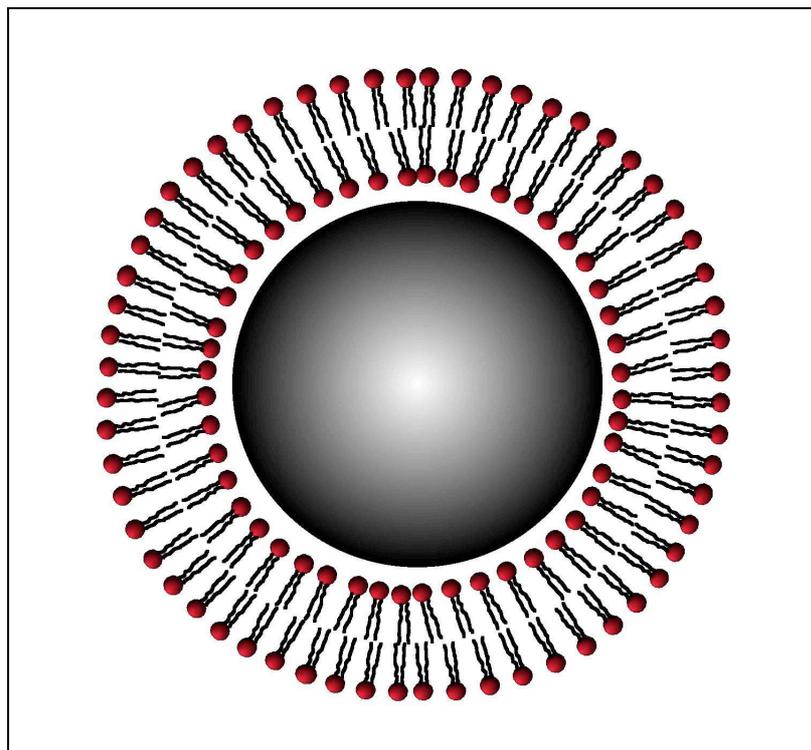


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer mit einem Phospholipidbilayer beschichteten Silicakugel: Spherical Supported Vesicle (SSV).

DNA)) wurde aus komplementären Basenpaarsequenzen hergestellt.

Die verwendete lambda-DNA mit einer Länge von über 50000 Basenpaaren wurde von der Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Natriumchlorid (NaCl), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfon-säure (HEPES) und Natriumhydroxid (NaOH) wurden von der Firma Fluka (Mühlheim, Deutschland) geliefert.

Standardchemikalien, wie z.B. Methanol, für die Reinigung der Silicakugeln und der verwendeten Probengefäße wurden über die Chemikalienausgabe des Chemischen Instituts der Universität Würzburg bezogen. Sofern nicht anders angegeben, war der Reinheitsgrad der Chemikalien mindestens 99,9%.

Zum Ansetzen aller Präparationspuffer und als Reinigungsmittel kam mehrfach entionisiertes Wasser (Millipore) aus einem Milli-Q-System der Firma Millipore Cooperation (Bedford, USA) zum Einsatz.

Für die eigentlichen Deuterium-NMR-Messungen war es unerlässlich dafür zu sorgen, dass der natürliche Deuterium-Anteil im Wasser so niedrig wie möglich

war, da er sonst im Messsignal dominiert hätte. Deshalb kamen in den eigentlichen Messungen immer Puffer zum Einsatz, die mit entdeutertem Wasser der Firma Isotec Inc. (Miamisburg, USA) angesetzt wurden.

2.1.4 Silicakugeln

Bei den verwendeten Silicakugeln mit einem Durchmesser von $d = 400$ nm beziehungsweise $d = 640$ nm handelt es sich um eine Spezialsynthese von der Abteilung für Anorganische Chemie der Degussa AG (Hanau, Deutschland). Die Kugeln mit Polymersupport wurden von der Firma Nimbus (Leipzig, Deutschland) beschichtet. Alle Kugeln wurden vor ihrer Verwendung gründlich mit Methanol und Millipore-Wasser gereinigt. Dazu wurden 500 mg Kugeln zunächst in 10 ml reines Methanol gegeben. Diese Mischung wurde zehn Minuten gevortext und anschliessend mit einer High-Speed Zentrifuge der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland) wieder getrennt. Der Überstand an Methanol wurde vorsichtig abpipettiert. Anschliessend wurde erneut mit Methanol aufgefüllt. Ingesamt wurde die oben beschriebene Prozedur jeweils zweimal mit reinem Methanol, viermal mit einer Methanol/Millipore Mischung und viermal mit reinem Millipore durchgeführt. Anschliessend wurden die Kugeln vor ihrer Weiterverwendung in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von $T = 70^{\circ}\text{C}$ getrocknet.

2.1.5 Präparation der sphärisch unterstützten Lipidbilayer

Die Präparation der binären (aus zwei Lipidarten zusammengesetzten) festkörperunterstützten Lipidbilayer wird gesondert im Kapitel 4.1 behandelt.

Zur Herstellung der SSV-Proben (spherical supported vesicles; siehe auch Abbildung 2.2) wurde das folgenden Verfahren angewendet: 40 mg trockenes Lipid wurde in 2 ml Standardpuffer gelöst. Der Standardpuffer wurde aus Millipore-Wasser angesetzt. Er enthielt 20 mM HEPES und 20 mM NaCl. Sein mittels NaOH eingestellter pH-Wert war 7,0.

Die Menge von 40 mg Lipid ergab sich aus einer Berechnung der Gesamtoberfläche der verwendeten Silicakugeln und der Fläche die ein einzelnes Lipid einnimmt. Bei einer Menge von 500 mg Silicakugeln ist bei Zugabe von 40 mg Lipid ein dreifacher Lipidflächenüberschuss gegenüber der Gesamtkugeloberfläche gewährleistet. Dieses Verhältnis hat sich als ideal für die Beschichtung erwiesen [Käsbauer (1999/2)].

Die Lösung wurde anschliessend mittels eines Stabbeschallers (rod sonifier) der Firma Branson (Danbury, Kanada) bei einer Temperatur von $T = 60^{\circ}\text{C}$ ungefähr 15 Minuten lang beschallt. Die Temperatur von $T = 60^{\circ}\text{C}$ wurde gewählt, um sicherzustellen, dass sich die DPTAP- d_{62} Vesikel in ihrer fluiden Phase befanden.

Ob sich nach der Beschallung SUVs (small unilamellar vesicles) mit Durchmessern unter $d = 100$ nm gebildet hatten, wurde durch eine Sichtprüfung ermittelt. Erschienen die Proben direkt gegen das Licht betrachtet opaleszent und unter einem Winkel von 90° gelblich, konnte man davon ausgehen, dass sich SUVs mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm gebildet hatten.

Zu der SUV-Lösung wurden 500 mg Silicakugeln gegeben. Anschliessend wurde diese Mischung zwei Stunden bei einer Temperatur von $T = 60^\circ\text{C}$ in einem Wärmeschrank langsam gedreht, um die Fusion der SUVs mit der Silicaoberfläche zu unterstützen. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Probe fünfmal mit Puffer aufgefüllt und wie oben beschrieben zentrifugiert um das überschüssige Lipid auszuwaschen.

Für die Proben mit DNA wurde im Standardpuffer gelöste DNA bei einer Temperatur von $T = 60^\circ\text{C}$ zu den SUVs gegeben. Die Menge der DNA wurde so gewählt, dass die gesamte Kugeloberfläche (sofern elektrostatisch möglich) mit DNA bedeckt werden konnte. Nach zwei Stunden, in denen die Probe zwischenzeitlich immer wieder leicht gevortext wurde, wurde sie wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

In einem letzten Schritt wurde mit Puffer aus entdeuterten Wasser noch einmal abzentrifugiert, anschliessend mit 1 ml entdeutertem Puffer aufgefüllt und die Probe in ein NMR-Probenröhrchen überführt.

2.2 NMR-Hardware

Alle Messungen wurden an einem Bruker AMX 500 Spektrometer (Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Rheinstetten) durchgeführt. Die B_0 Feldstärke betrug 11,7 T entsprechend einer Protonenresonanzfrequenz von 500 MHz bzw. 76,7 MHz für die hier durchgeführten Deuterium-NMR Messungen. Das Magnetfeld wurde von einem supraleitenden Magneten von Oxford/Spectrospin erzeugt. Als Probenkopf wurde ein Bruker Breitlinienprobenkopf für Festkörper-NMR verwendet. Ein High-Power-Verstärker (M3200 ATM Inc.) mit einer Pulsleistung von 1 kW diente zur Einstrahlung der Anregungspulse. Die Spule im Probenkopf wurde mittels Tune- und Matchimpedanzen auf minimale Reflektion eingestellt und bei der Messung als Sende- und Empfangsspule (single coil Betrieb) genutzt. Sie stand genau senkrecht zum B_0 -Feld des supraleitenden Magneten, d.h. es wurden die Komponenten der Magnetisierung in der x-y-Ebene erfaßt.

Da die eingestrahlten Pulse eine endliche Länge (in diesen Messungen zwischen $5,5 \mu\text{s}$ und $6,7 \mu\text{s}$) haben, und die Spule nach dem Puls erst Abklingen muß, ist es nicht möglich das Signal sofort nach einem Puls aufzunehmen. Daher wurde für alle Messungen die sogenannte Quadrupolechösequenz [Bloom et al. (1992)] verwendet. Diese besteht aus einem 90_y° Anregungspuls, einer Wartezeit τ (in den Messungen $20 \mu\text{s}$) und einem anschließenden Refokussierungspuls 90_x° .

Die Acquisition der Daten erfolgte mittels Quadraturdetektion. Hierbei wird

zunächst das Signal in Phase mit der Trägerfrequenz und dann mit einer Phasenverschiebung von 90° acquiriert. Man erhält also ein cosinusmoduliertes und ein sinusmoduliertes Signal, das Real- und Imaginärteil des komplexen FID (free induction decay) entspricht. Um Phasenfehler bei der Quadraturdetektion zu beheben, wurde außerdem mit einem CYCLOPS Phasenzyklus [Rance (1983)] gemessen.

Ein 12 Bit-AD-Wandler mit einer minimalen Dwell-time von $0.4\mu\text{s}$ wurde zur Digitalisierung der Daten verwendet. Das Einstellen der Proben temperatur erfolgte mittels eines beheizten Luftstroms. Zur Temperaturüberwachung wurde die in die Magnetkonsole integrierte Euroterm VTU Temperatureinheit benutzt.

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen und Methoden

3.1 Deuterium-NMR

Da eine Vielzahl von Veröffentlichungen existiert, die sich ausführlich mit der NMR im allgemeinen [Abragam (1961), Farrar (1971)] und mit der Deuterium-NMR [Seelig (1977), Davis (1983), Bloom et al. (1992)] im speziellen beschäftigen, wird im folgenden nur kurz auf die hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten Methoden eingegangen. Für eine ausführlichere Darstellung der theoretischen und methodischen Grundlagen wird auf die entsprechenden Arbeiten verwiesen.

3.1.1 Hamilton-Operator und Resonanzfrequenz

In einem starken Magnetfeld wird die Kopplung zwischen Kern- und Elektronenspin aufgehoben. Die Wechselwirkung zwischen angelegtem Magnetfeld \vec{B}_0 und magnetischem Moment $\vec{\mu}$ läßt sich durch den Zeeman-Hamiltonoperator beschreiben :

$$H_Z = -g_K \mu_K \vec{I} \vec{B}_0 \quad (3.1)$$

wobei g_K der g-Faktor, μ_K das Kernmagneton und \vec{I} der Spinoperator des Kerns sind. Die sich aus dem Hamiltonoperator ergebenden Energiezustände sind :

$$E_m = -g_K \mu_K B_0 m \quad (3.2)$$

m kann die Werte zwischen $-I$ und $+I$ annehmen. Für Deuterium mit Spin $I = 1$ ergeben sich daraus drei äquidistante Energieniveaus. Die Resonanzfrequenz für einen Übergang ist folglich :

$$\nu_0 = \frac{g_K \mu_K}{h} B_0 \quad (3.3)$$

Einen weiteren Beitrag zum Hamiltonoperator erhält man aufgrund des Quadrupolmoments Q_{ik} , das mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort $\nabla \vec{E} =$

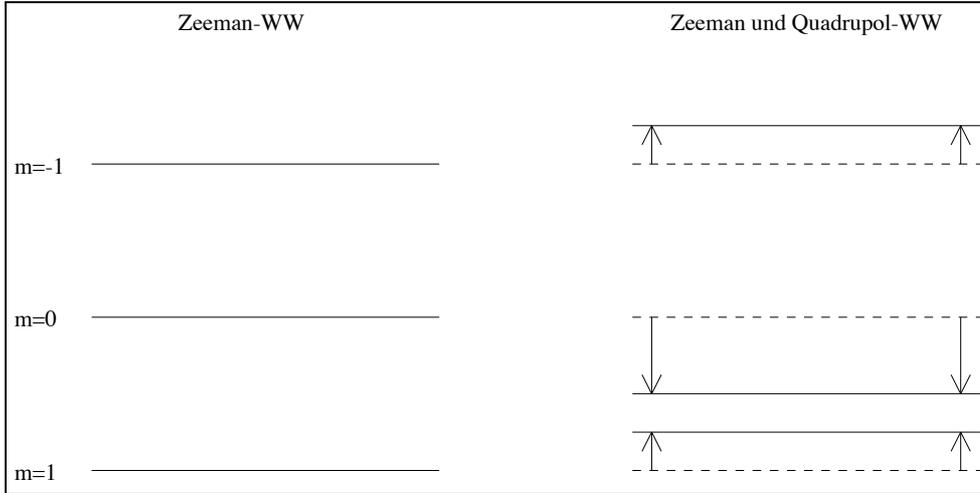


Abbildung 3.1: Auswirkung der Quadrupolwechselwirkung auf die Energieniveaus.

(V_{ik}) wechselwirkt. Dieser wird im Hauptachsensystem des Feldgradiententensors ausgedrückt durch :

$$H_Q = \sum_{i,k} V_{ik} Q_{ik} = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} (3I_z^2 - I(I+1) + \frac{1}{2} \eta (I_+^2 - I_-^2)) \quad (3.4)$$

wobei $eq = V_{zz}$ der Feldgradient in z-Richtung, $\eta = \frac{V_{xx}V_{yy}}{V_{zz}}$ der Asymmetrieparameter, $I_{\pm} = I_x \pm iI_y$ und Q das skalare Quadrupolmoment sind.

Nach der Transformation in das Laborsystem und mit der Vereinfachung $\eta = 0$, was für die bei den Lipiden bestehende $C - D$ Bindung ($\eta \leq 0,05$) näherungsweise zutrifft, erhält man :

$$H_Q = \frac{e^2 q Q}{4} P_2(\cos \theta) (3I_z^2 - 2) \quad (3.5)$$

$P_2(x) = \frac{3x^2-1}{2}$ ist das zweite Legendre-Polynom und θ der Winkel zwischen angelegtem Magnetfeld B_0 und der Membrannormalen.

Andere Beiträge wie z.B. die chemische Verschiebung oder die Dipol-Dipol Wechselwirkung können vernachlässigt werden, da ihr Beitrag zur Energieaufspaltung in diesem System sehr klein ist.

Kombiniert man nun die Anteile aus Zeeman- und Quadrupolwechselwirkung, erkennt man, dass die ursprünglich drei äquidistanten Energieniveaus nun wie in Abbildung 3.1 zu sehen verändert werden. Die Energieniveaus mit $I_z = m = \pm 1$ werden um einen Betrag $\frac{e^2 q Q}{4} P_2(\cos \theta)$ angehoben und für $m = 0$ wird es um den Betrag $-2 \frac{e^2 q Q}{4} P_2(\cos \theta)$ abgesenkt. Für die Resonanzfrequenz bedeutet dies eine Abhängigkeit von :

$$\nu = \nu_0 \pm \Delta\nu \quad (3.6)$$

wobei :

$$\Delta\nu = \frac{3e^2qQ}{4h}P_2(\cos\theta) \quad (3.7)$$

ist. Das heißt die Aufspaltung ist unabhängig von der Stärke des angelegten Magnetfeldes, aber abhängig von dessen Orientierung.

3.1.2 Orientierungsabhängigkeit der Resonanzfrequenz

Aufgrund der Vielzahl von Bewegungen in den unterschiedlichsten Zeitskalen, die das untersuchte Membransystem ausführt, muss die Orientierungsabhängigkeit, die im vorangegangenen Kapitel hergeleitet wurde, noch einmal korrigiert werden. Bewegungen, die schnell auf der NMR Zeitskala sind ($\tau_c\omega_0 \ll 1$), z.B. Rotationen um die Lipidlängsachse, führen dazu, dass man in der NMR einen zeitlichen Mittelwert der Quadrupolaufspaltung mißt :

$$\Delta\nu = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{h} \left\langle \frac{3 \cos^2(\Theta) - 1}{2} \right\rangle \frac{3 \cos^2(\theta) - 1}{2}. \quad (3.8)$$

Der Grad der Bewegungsausmittlung wird durch den sogenannten Ordnungsparameter $S_{CD} = \langle P_2(\cos \Theta) \rangle$ beschrieben. Er ist, unter anderem, von der Position des Deuteriumatoms an der Lipidkette abhängig. Dabei gilt, dass Atome am Ende der Kette durch ihre größere Bewegungsfreiheit einen kleineren Ordnungsparameter haben, als solche, die sich näher an der Kopfgruppe des Lipids befinden. Aber auch Temperatur, Domänenbildung oder das Ankoppeln oder Eindringen von Biomolekülen in den Bilayer haben einen Einfluss auf die Kettendynamik und damit direkt auf den Ordnungsparameter S_{CD} .

Insgesamt hängt $\Delta\nu$ nur vom Winkel θ zwischen dem Magnetfeld B_0 und der Membrannormalen ab :

$$\Delta\nu = \nu_Q \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} S_{CD} \quad (3.9)$$

mit $\nu_Q = \frac{3e^2qQ}{2h}$, der sogenannten Quadrupolaufspaltung.

3.1.3 Linienform

Für die Linienform ist natürlich auch die Häufigkeitsverteilung des Winkels θ von Bedeutung, da durch diese die Intensität an der entsprechenden Frequenz bestimmt ist. Bei einer isotropen Verteilung der Lipidmoleküle (z.B. in einem Pulver) ergibt sich für das Auftreten des Winkels θ im Bereich $d\theta$ die Wahrscheinlichkeitsverteilung :

$$P(\theta)d\theta = \frac{1}{2} \sin \theta d\theta \quad (3.10)$$

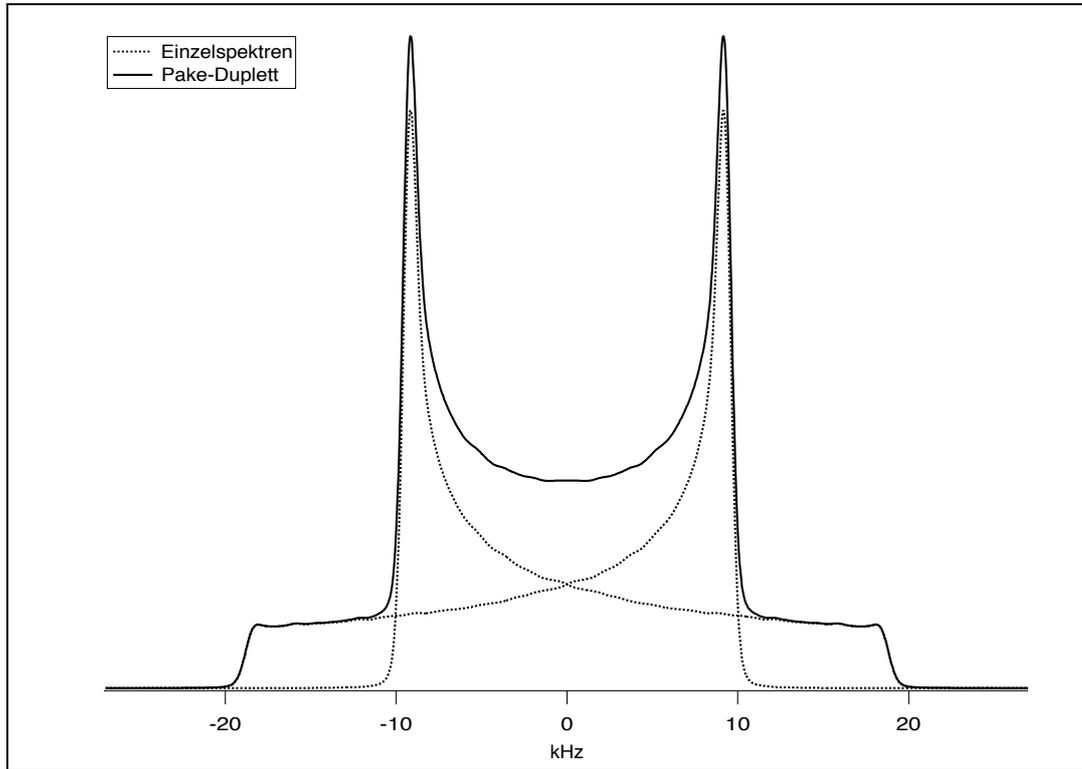


Abbildung 3.2: *Linienform für ein Pulverspektrum. Das sogenannte Pake-Duplett.*

Kombiniert man diese mit Formel (3.9) ergibt sich die Linienform für ein Pulverspektrum das sogenannte Pake-Duplett :

$$S(\nu) = \frac{1}{\sqrt{6}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\Delta\nu}{\nu_Q}}} + \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{\Delta\nu}{\nu_Q}}} \quad (3.11)$$

Da es durch Relaxationsprozesse immer zu einer Linienverbreiterung kommt, muß man Formel (3.11) noch mit einer Lorentz- oder Gaußfunktion falten, um schließlich die reale Spektrenform wie in Abbildung (3.2) gezeigt zu erhalten. Die höchsten Intensitäten in Abbildung (3.2) entsprechen der Orientierung $\theta = 90^\circ$ und die äußersten Bereiche, die sogenannten „*Schultern*“, $\theta = 0^\circ$. Der Abstand zwischen den beiden Maxima entspricht der Quadrupolaufspaltung ν_Q .

Mißt man ein Lipid mit mehreren deuterierten Kettenpositionen, überlagern sich natürlich die verschiedenen Pake-Dupletts für unterschiedliche Ordnungsparameter. Es ist aber möglich mittels eines mathematischen Algorithmus, dem sogenannten De-Pake-Ing, das gemessene Pulver-Spektrum auf ein orientiertes Spektrum zurückzurechnen [Bloom (1981), Sternin et al. (1983)]. Dadurch werden die verschiedenen Peaks besser getrennt und sind damit auch besser auswertbar (siehe auch Kapitel 3.1.7).

3.1.4 Momente

Um die Form eines Spektrums zu charakterisieren, benutzt man normalerweise die Methode der Momente. Das n-te Moment eines Spektrums $F(\omega)$ berechnet sich zu :

$$M_0 = \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) d\omega \quad (3.12)$$

$$M_n = \frac{1}{M_0} \int_{-\infty}^{\infty} |(\omega - \omega_0)|^n F(\omega) d\omega. \quad (3.13)$$

$$(3.14)$$

Durch das nullte Moment M_0 erhält man die Intensität eines Spektrums. Das erste Moment M_1 entspricht dem mittleren Ordnungsparameter aller Kettenpositionen des Spektrums. Das zweite Moment M_2 ist ein Maß für die Breite eines Spektrums und gibt die NMR-Zeitskala vor, auf die später noch eingegangen wird.

3.1.5 Relaxationsprozesse

Der klassische Ansatz, um das Verhalten eines Spinsystems zu beschreiben, erfolgt über die phänomenologischen Bloch-Gleichungen :

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (3.15)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (3.16)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_z - \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (3.17)$$

$$(3.18)$$

Jedes System, das aus seinem Gleichgewichtszustand ausgelenkt worden ist, hier durch einen Hochfrequenz-Puls, versucht wieder in seinen ursprünglichen Zustand zurückzugelangen. Anhand von Formel (3.17) erkennt man, dass die Zeitkonstante T_1 hier die entscheidende Rolle spielt, da sie die Entwicklung der parallel zu B_0 ausgerichteten Magnetisierung M_z , also die Rückkehr in den Ursprungszustand, beschreibt. Durch diesen Vorgang wird Energie an die Umgebung, hier das Gitter, abgegeben. Man bezeichnet T_1 als die longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit. Für das Abklingen der Magnetisierung senkrecht zu B_0 , M_x und M_y , ist die Konstante T_2 verantwortlich. Es handelt sich hierbei um den Verlust an Kohärenz der präzedierenden Spins, der durch ihre Wechselwirkung untereinander verursacht wird. Daher wird T_2 die Spin-Spin-Relaxationszeit genannt.

Durch die Bewegung der Moleküle, z.B. durch Brownsche Bewegung, werden, da sie ja ein magnetisches Moment besitzen, ständig zufällig fluktuierende Magnetfelder \vec{h} induziert. Diese wechselwirken nun mit ihrer Umgebung, also mit anderen magnetischen Momenten, die sich in der Nähe befinden. Man kann

den Einfluss dieser mikroskopischen Felder am deutlichsten erkennen, indem man sich ihre Wirkung auf die Magnetisierung klarmacht. In einem Koordinatensystem, das mit der Resonanzfrequenz der Probe mitrotiert, üben sie einfach ein Drehmoment auf den Magnetisierungsvektor aus :

$$\left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)_{rot} = \gamma(\vec{h} \times \vec{M})_{rot} \quad (3.19)$$

Auflösen nach den einzelnen Komponenten ergibt damit :

$$\left(\frac{dM_x}{dt}\right)_{rot} = \gamma(h_y M_z - h_z M_y)_{rot} \quad (3.20)$$

$$\left(\frac{dM_y}{dt}\right)_{rot} = \gamma(h_z M_x - h_x M_z)_{rot} \quad (3.21)$$

$$\left(\frac{dM_z}{dt}\right)_{rot} = \gamma(h_x M_y - h_y M_x)_{rot} \quad (3.22)$$

$$(3.23)$$

Man kann erkennen, dass die Komponente h_z^{rot} sich nur auf die senkrecht zum B_0 -Feld stehenden Magnetisierungsvektoren M_x^{rot} und M_y^{rot} auswirkt, während sich h_x^{rot} und h_y^{rot} auf alle drei Vektoren auswirken. Daraus folgt, die z -Komponente der fluktuierenden Magnetfelder beeinflusst nur die Zeitkonstante T_2 , während die anderen beiden Komponenten sowohl T_2 als auch T_1 beeinflussen.

Die vorangegangenen Schlußfolgerungen gingen davon aus, dass man \vec{h} im rotierenden Koordinatensystem als stationär annehmen konnte. Geht man nun zurück ins Laborsystem, ist klar, dass sich für h_z nichts ändert. Allerdings rotieren nun die beiden anderen Komponenten h_x und h_y mit der Frequenz ω_0 . Man kann also sagen, dass Molekülbewegungen mit Frequenzen in der Nähe von 0 und ω_0 die stärksten Auswirkungen auf das Spinsystem haben. Für die Relaxationszeiten folgt daraus, dass T_1 nur von „schnellen“ Bewegungen abhängig ist, während T_2 von „schnellen“ und „langsamen“ Bewegungen beeinflusst wird. Zur quantitativen Festlegung, wann eine Bewegung als „schnell“ oder „langsam“ anzusehen ist, bedient man sich der Autokorrelationsfunktion :

$$K_i(\tau) = \overline{Y_i(t)Y_i^*(t+\tau)} \quad , \quad i = x, y, z \quad (3.24)$$

Sie beschreibt, wie stark der Zustand zur Zeit $(t + \tau)$ noch mit dem zur Zeit t korreliert ist. Die Y_i sind die Sphärischen Harmonischen, und es wird über ein Ensemble gemittelt.

Um die Autokorrelationsfunktion zu bestimmen, kann ein exponentieller Ansatz verwendet werden :

$$K_i(\tau) = K_i(0)e^{-\frac{\tau}{T_c}} \quad (3.25)$$

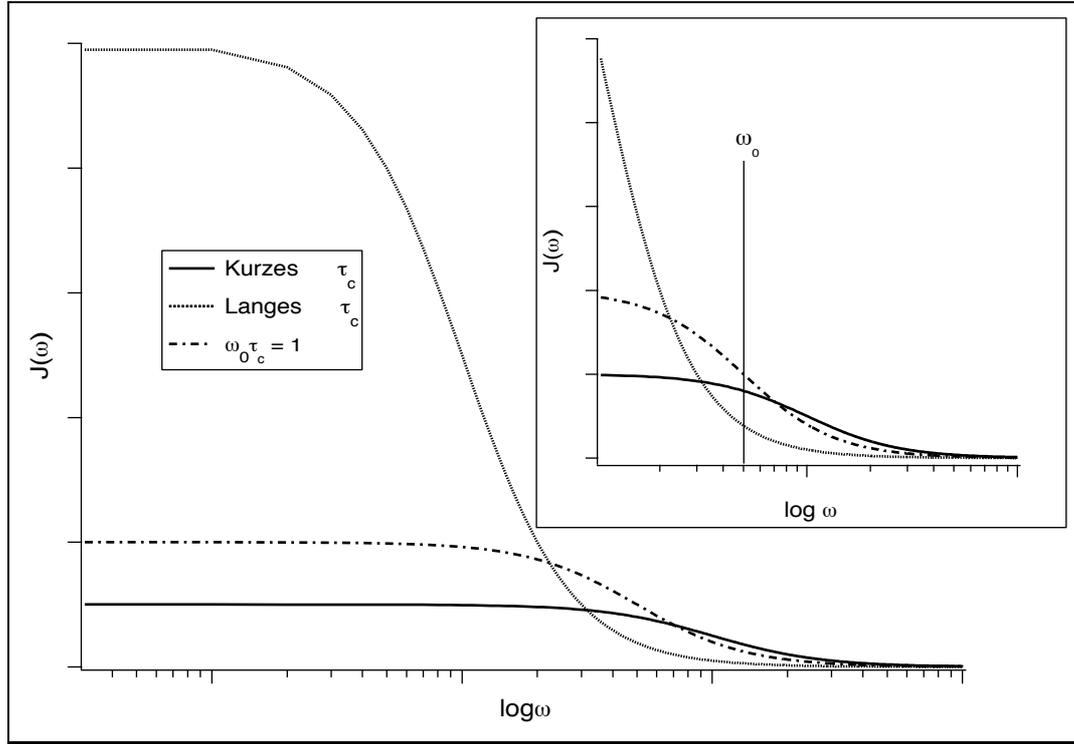


Abbildung 3.3: $J(\omega)$ für verschiedene Korrelationszeiten τ_c .
 Vergrößerung : Für eine vorgegebene Frequenz ω_0 wird $J(\omega)$ für $\omega_0\tau_c = 1$ maximal.

Die Konstante τ_c , die sogenannte Korrelationszeit, ist also ein Maß für die Geschwindigkeit einer Bewegung, da durch sie bestimmt ist, wie „ähnlich“ ein Zustand nach $t + \tau$ noch dem ursprünglichen Zustand zur Zeit t ist.

Aus der Fouriertransformierten der Autokorrelationsfunktion $J_i(\omega)$ erhält man eine Verteilung für die Frequenzen, die an der Bewegung beteiligt sind. Mit dem exponentiellen Ansatz für die Autokorrelationsfunktion ergibt sich $J_i(\omega)$ zu :

$$J_i(\omega) = 2K_i(0) \frac{\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (3.26)$$

Dies ist eine Lorentzfunktion wie in Abbildung (3.3) zu sehen. Berechnet man die genaue Abhängigkeit der Relaxationszeiten von $J_i(\omega)$ erhält man :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{8} \left(\frac{eQ}{\hbar} \right)^2 (J_1(\omega_0) + 4J_2(2\omega_0)) \quad (3.27)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{8} \left(\frac{eQ}{\hbar} \right)^2 (J_0(0) + J_1(\omega_0) + \frac{2}{3}J_2(2\omega_0)) \quad (3.28)$$

$$(3.29)$$

Das Ergebnis deckt sich mit den vorherigen Überlegungen zu den Abhängigkeiten der Relaxationszeiten mit der Frequenz der Bewegung. Allerdings erkennt man, dass beide nicht nur von Bewegungen mit der Resonanzfrequenz $\nu = \omega_0$ beeinflusst werden, sondern auch die doppelte Frequenz $\nu = 2\omega_0$ die Relaxationszeiten beeinflusst.

3.1.6 Laterale Diffusion auf gekrümmten Oberflächen

Bei der Diffusion der Moleküle über die, im allgemeinen gekrümmte, Oberfläche der Membran ändert sich die Orientierung der Lipide zum Magnetfeld B_0 . Damit ändert sich aber gleichzeitig die Resonanzfrequenz, wie in Formel (3.11) beschrieben. Diese wird also zu einer zeitlich fluktuierenden Funktion. Für eine Kugel mit dem Radius R und bei einer Diffusionskonstante D resultiert für die Diffusion eine Korrelationszeit von :

$$\tau_D = \frac{R^2}{6D} \quad (3.30)$$

Bei typischen Werten von $R = 250\text{nm}$ und $D = 12 \times 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ ergibt sich $\tau_D < 1\text{ms}$. Für so langsame Bewegungen spielt der Effekt der Bewegungsausmittelung (motional averaging) noch keine Rolle. Aber hat man z.B. sehr viel kleinere Radien ($R \simeq 10\text{nm}$), ändert sich bei einem Diffusionssprung die Orientierung so stark ($\Delta\theta \geq 90^\circ$), dass der anisotrope Teil der Tensorwechselwirkung völlig weggemittelt wird. Das bedeutet, dass Prozesse mit sehr kleinen Korrelationszeiten im Spektrum in der Form eines isotropen Peaks bei der Resonanzfrequenz erkennbar sind.

Eine andere Möglichkeit für die Ausmittelung anstelle der Diffusion ist eine sehr schnelle Eigenrotation eines kleinen ($R < 50\text{nm}$) Vesikels. Dadurch wird ebenfalls der anisotrope Teil der Tensorwechselwirkung ausgemittelt. Auch dies führt zur Ausbildung eines isotropen Peaks im Spektrum.

3.1.7 De-Pake-Ing und Ordnungsparameterprofil

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben überlagern sich im Fall der Deuterierung mehrerer Kettenpositionen mit unterschiedlichen Ordnungsparametern die jeweiligen Pake-Dupletts. In Abbildung 3.4 ist ein aus verschiedenen überlagerten Pake-Dupletts resultierendes Gesamtspektrum dargestellt. Dieses Spektrum wurde allerdings durch direkte numerische Berechnung gewonnen. In einem realen Spektrum ist durch das unvermeidliche Rauschen während der Messung keine klare Trennung der einzelnen Pake-Dupletts mehr möglich. Auch kann eine hohe transversale Relaxationszeit T_2 , die die Linienbreite bestimmt, das Unterscheiden der Aufspaltungen erschweren. Als Vorlage für die Aufspaltungen des simulierten Gesamtspektrum diente eine Messung an dem Lipid DPPC-d₆₂.

Um dennoch die Aufspaltung $\Delta\nu_Q$ einzelner Peaks, und damit direkt nach Formel 3.9 deren Ordnungsparameter zu erhalten, bedient man sich des sogenannten

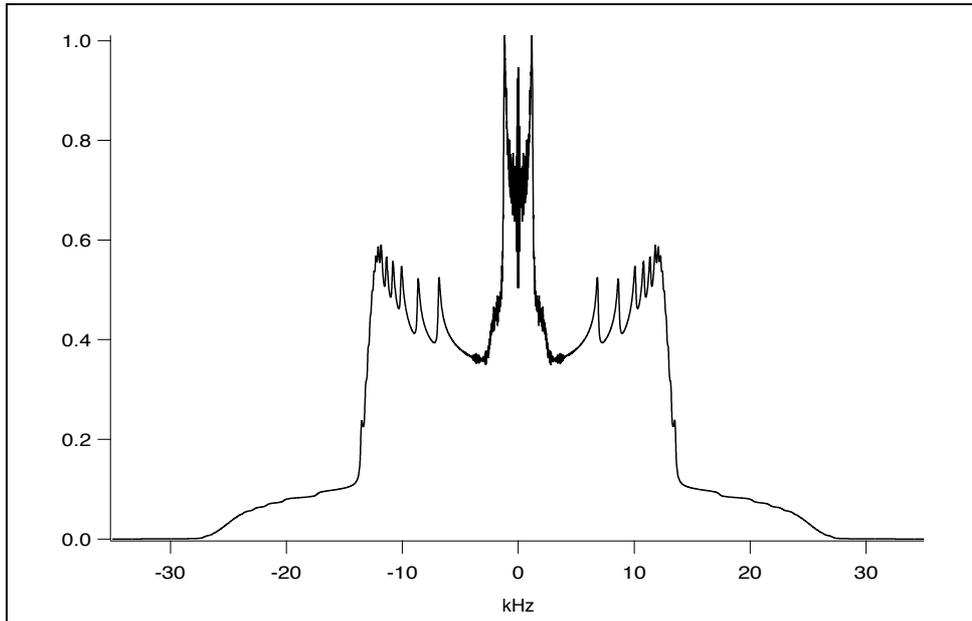


Abbildung 3.4: Überlagerung mehrerer Pake-Dupletts zum resultierenden Gesamtspektrum.

De-Pake-Ing [Sternin et al. (1983)]. Es rechnet numerisch die isotrope Linienform des Gesamtspektrums auf eine orientierte Linienform zurück. In Abbildung 3.5 ist das sich aus dem De-Pake-Ing des isotropen Gesamtspektrums aus Abbildung 3.4 ergebende orientierte Spektrum dargestellt. Es ist sofort zu erkennen, dass sich die Abspaltung $\Delta\nu_Q$ der einzelnen Peaks jetzt direkt aus dem Spektrum ablesen lässt. Die um 50% höhere Intensität der beiden nahe $\omega = 0$ kHz liegenden Peaks ergibt sich einfach daraus, dass die zugehörige Methylgruppe drei Deuterium Atome anstatt der an den anderen Positionen gelegene zwei Atome aufweist. Für eine ausführliche Besprechung des De-Pake-Ing wird auf [Sternin et al. (1983)] verwiesen.

Aus dem orientierten Spektrum kann man nun direkt die verschiedenen Ordnungsparameter S_{CD} bestimmen. Üblicherweise werden nun die einzelnen Ordnungsparameter über ihre Position entlang der Fettsäurekette aufgetragen. Man erhält damit, wie in Abbildung 3.6 dargestellt, das sogenannte Ordnungsparameterprofil. Die Kettenposition Nummer 15 aus Abbildung 3.6 ist die terminale CH_3 -Gruppe der Fettsäurekette und die Kettenposition Nummer 2 ist in unmittelbarer Nähe der Kopfgruppe gelegen.

Abbildung 3.6 zeigt das typische Verhalten des Ordnungsparameterprofils der Lipidfettsäureketten in einem Bilayer. Die Kettenpositionen 2 bis 10 formen einen Plateau-Bereich, in dem sich der Ordnungsparameter nur leicht verändert. Danach fällt die molekulare Ordnung schließlich bis zur terminalen Methylgruppe steil ab.

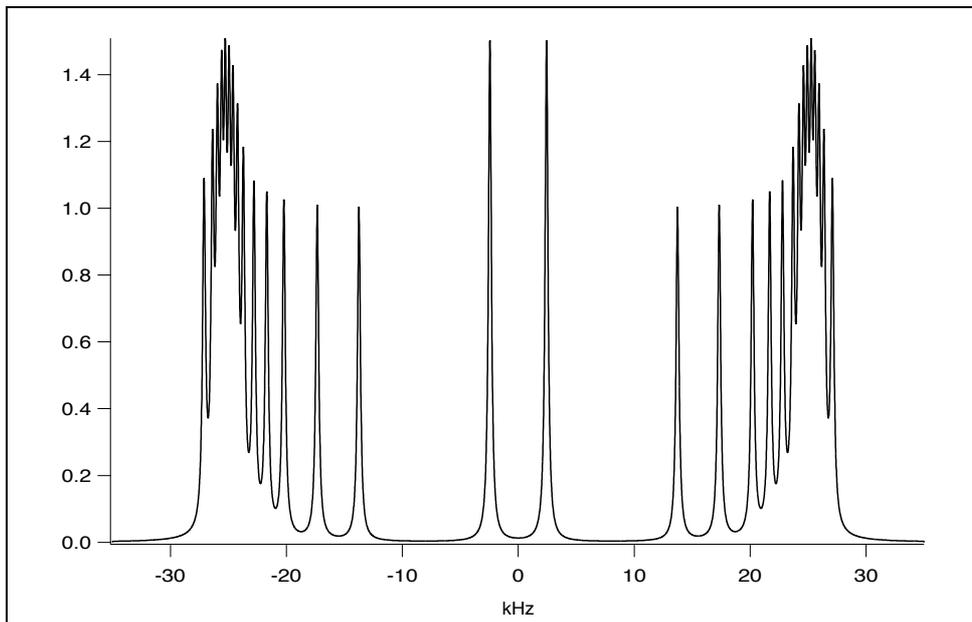


Abbildung 3.5: Das Spektrum aus Abbildung 3.4 nach dem De-Pake-Ing. Die einzelnen Peaks und damit die molekulare Dynamik der entsprechenden Kettenposition sind deutlich zu unterscheiden.

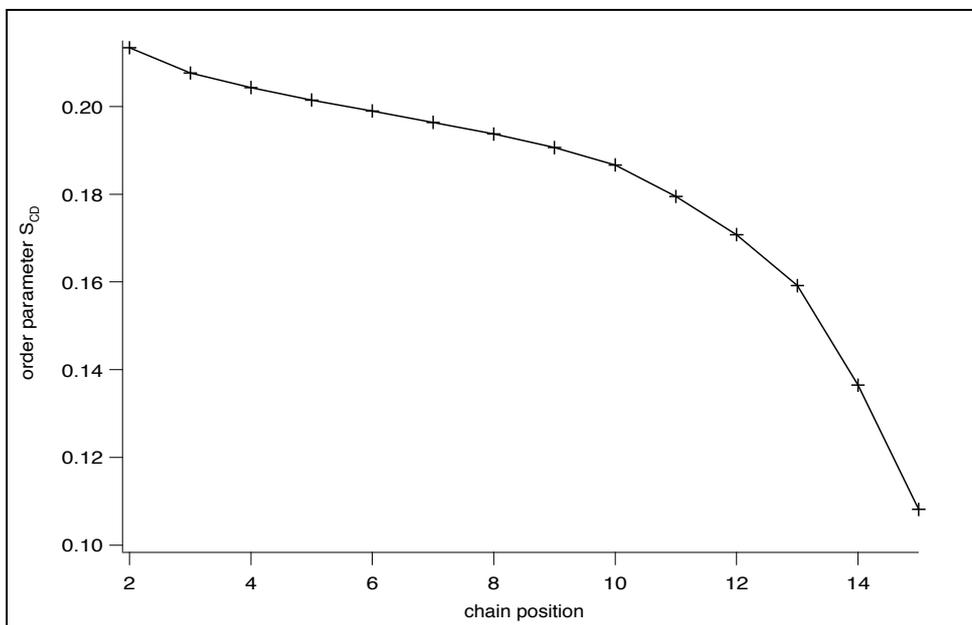


Abbildung 3.6: Das aus dem Spektrum der Abbildung 3.5 gewonnene Ordnungsparameterprofil.

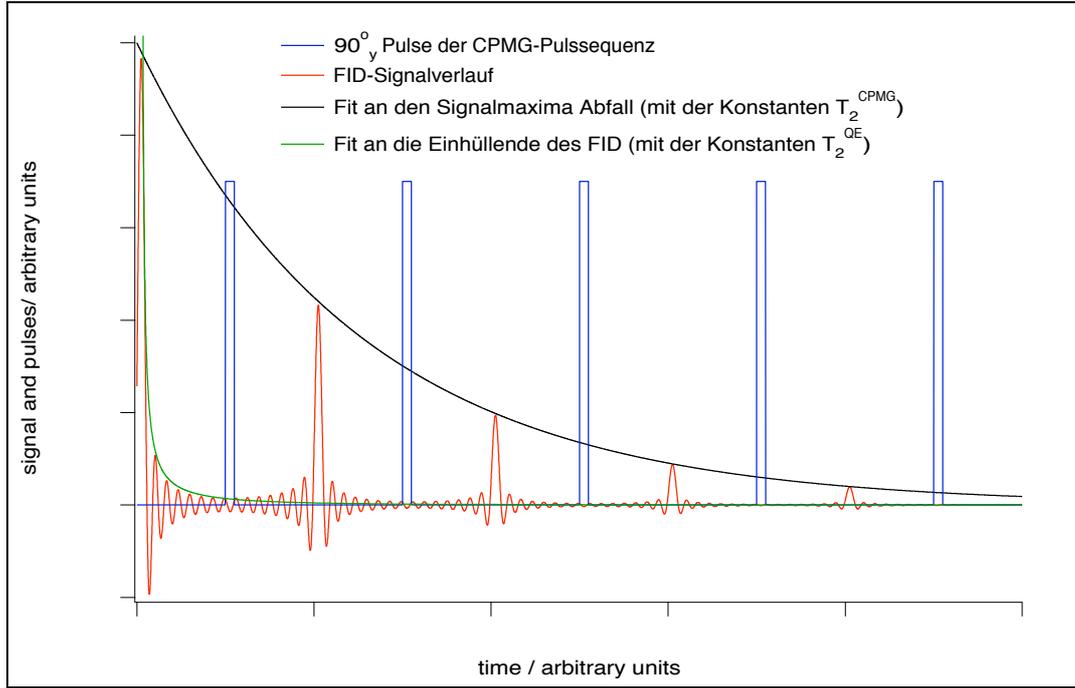


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des CPMG-Experiments und dessen Echowverlaufs.

3.1.8 CPMG-Pulssequenz als Tiefpassfilter zur Bestimmung der Diffusionskonstanten

Ein besondere Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten feskörperunterstützten Lipidsystems ist die Möglichkeit durch den definierten Radius der SSV mittels einer NMR-Pulssequenz auch die laterale Diffusionskonstante der Lipide messen zu können.

In den vorangegangenen Abschnitten (speziell 3.1.5) wurde gezeigt, dass die transversale Relaxationszeit T_2 (bzw. bei der hier verwendeten Quadrupolechoresequenz: T_2^{QE}) stark von Bewegungen abhängig ist, deren Korrelationszeiten *langsam* ($\tau_K \gg \tau_{NMR}$) auf der Deuterium-NMR-Zeitskala sind. Unter der Voraussetzung das die laterale Diffusion der Lipide der dominierende Prozess für diese *langsamen* Bewegungen ist kann man mittels einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Pulssequenz (CPMG)[Meiboom (1958)], die wie ein Tiefpassfilter wirkt, die hochfrequenten Beiträge zur T_2 Relaxation ausfiltern [Köchy (1993)].

Die CPMG-Pulssequenz für ein Spin-1 System kann dargestellt werden als:

$$90^\circ_x - (\tau - 90^\circ_y - \tau)_N. \quad (3.31)$$

Die Signalamplitude des n -ten Echos, mit $n = 1, 2, \dots, N$, ist dabei durch

$$S(2n\tau) = S(0)e^{\frac{-2n\tau}{T_2^{CPMG}}} \quad (3.32)$$

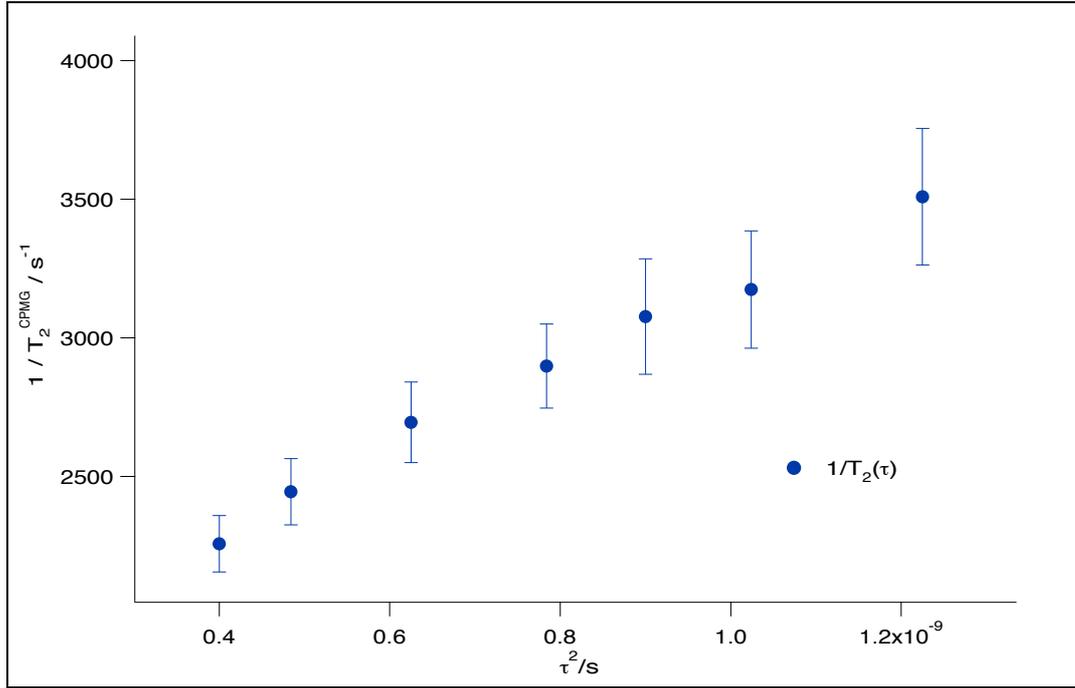


Abbildung 3.8: Bestimmung der Diffusionskonstanten mittels der CPMG-Pulssequenz.

gegeben.

Abbildung 3.7 zeigt schematisch den Puls- und Signalverlauf der CPMG-Pulssequenz. Es ist ebenfalls eine Fitfunktion an den Verlauf der Echomaxima und an den Verlauf des FID (Free Induction Decay) nach dem ersten Refokussierungspuls dargestellt. Der Verlauf der Fitfunktionen lässt erkennen, dass die Relaxationszeit T_2^{CPMG} wesentlich grösser als T_2^{QE} ist.

Für eine CPMG Sequenz berechnet sich T_2^{CPMG} zu:

$$\frac{1}{T_2^{\text{CPMG}}} = M_2 \tau_K \left(1 - \frac{\tau_K}{\tau} \tanh\left(\frac{\tau}{\tau_K}\right)\right). \quad (3.33)$$

Eine Näherung, unter der Voraussetzung das $\tau_K \gg \tau_{\text{NMR}}$ ist, ergibt schließlich für T_2^{CPMG} :

$$\frac{1}{T_2^{\text{CPMG}}} = \frac{2M_2 D}{R^2} \tau^2 + \frac{1}{T_2'}. \quad (3.34)$$

M_2 ist, wie in Formel 3.12 definiert, das zweite Moment des Spektrums, D die Diffusionskonstante der Lipide und R der Kugelradius auf dem die Diffusion stattfindet. T_2' ist der Anteil der durch Prozesse mit Korrelationszeiten τ_K' die relativ zur NMR-Zeitskala *schnell* verlaufen verursacht wird ($\tau_K' \ll \tau_{\text{NMR}}$). Mit Hilfe von Formel 3.34 ist es also möglich bei bekanntem Kugelradius R und nach dem Ermitteln des zweiten Moments M_2 die Lipiddiffusionskonstante D zu bestimmen.

Dazu wurde die CPMG-Pulssequenz mehrmals für verschiedene Pulsabstände τ durchgeführt. Zu den jeweiligen Werten für τ wurde dann das korrespondierende $T_2^{CPMG}(\tau)$ ermittelt. Durch Auftragen von $(T_2^{CPMG}(\tau))^{-1}$ über τ^2 (wie in Abbildung 3.8 dargestellt) und Fitten der Messwerte mit einer Geraden der Steigung b erhält man nach Formel 3.34:

$$b = \frac{2M_2D}{R^2}. \quad (3.35)$$

Nach der Ermittlung von M_2 und bei bekanntem Kugelradius erhält man aus Gleichung 3.35 direkt die gesuchte Diffusionskonstante der Lipide D .

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Einfluss des Festkörpersubstrats auf binäre Lipidbilayer

Durch das Überziehen einer Festkörperoberfläche mit einer Lipidmembran kann man diese in eine biokompatible Oberfläche verwandeln [Bayerl (1990), Tamm (1985)]. Dadurch wird es Biomolekülen (z.B. Proteinen oder DNA) ermöglicht, ohne zu denaturieren an die Festkörperoberfläche anzukoppeln. Enthält die Lipidmembran darüber hinaus noch einen Anteil an geladenem Lipid wird durch die Coulomb-Wechselwirkung zwischen den Biomolekülen und den geladenen Lipiden das Ankoppeln zusätzlich erleichtert. Da die Festkörperoberfläche im Allgemeinen aber negativ geladenen ist, stellt sich die Frage, ob bei einem definierten Mischungsverhältnis zwischen zwitterionischem und geladenem Lipid dieses Verhältnis gleichmäßig über die beiden Hälften des Bilayers verteilt ist. Schließlich wäre es beispielsweise möglich, dass sich aufgrund der negativen Ladung der Festkörperoberfläche durch Coulomb-Wechselwirkung ein größerer Anteil an positiv geladenem Lipid an der dem Festkörper zugewandten Hälfte des Bilayers anreichert. Darüber hinaus wird beim Beschichten der Festkörperoberfläche mittels der Vesikel-Fusions-Methode mit einem Überschuss an Lipidmischung gearbeitet. Daher ist eine Anreicherung des Gesamtanteils an positiv geladenem Lipid im Bilayer auf Kosten des zwitterionischen Lipids ebenfalls denkbar. Durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Lipid und negativ geladener Festkörperoberfläche könnten sich bevorzugt positiv geladene Lipide an den Festkörper anlagern und die neutral geladenen Lipide in der Lösung verbleiben.

Mit Hilfe der Deuterium-NMR wurden im Folgenden diese Fragestellungen untersucht.

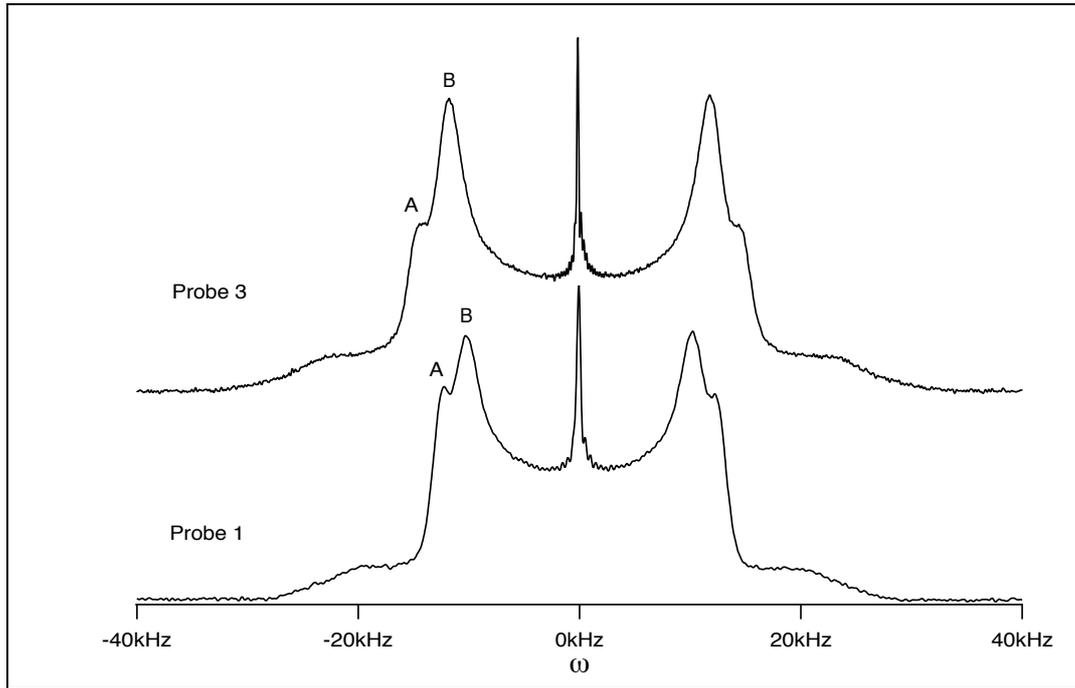


Abbildung 4.1: Deuterium-NMR-Spektren der Proben 1 und 3. Die beiden dem inneren (A) und äußeren (B) Monolayer zugeordneten Peaks sind gekennzeichnet.

4.1.1 Konzentrationsunterschiede im Lipidbilayer

Die verwendeten Silicakugeln (bei diesen Messungen Kugeln mit einem Durchmesser von $d = 640$ nm) wurden wie in Kapitel 2.1.4 erläutert gereinigt. Als Lipide kamen selektiv deuteriertes DPPC- d_8 und das positiv geladene DHDAB zum Einsatz. Diese wurden im vorgegebenen Mischungsverhältnis (80% DPPC- d_8 zu 20% DHDAB) zunächst in Chloroform gelöst und anschließend über Nacht mittels einer Vakuumpumpe in einem Exicator getrocknet. Das Aufbringen des Bilayers auf die Silicaoberfläche erfolgte anschließend wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben.

Zunächst wurde als Referenzprobe (Probe 1) ein reiner DPPC- d_8 Lipidbilayer auf einer Silicakugel bei einer Temperatur von $T = 60^\circ$ C untersucht. Eine Quadrupolechösequenz [Bloom et al. (1992)] mit Pulslängen von $5,5 \mu\text{s}$, einem Pulsabstand von $\tau = 35 \mu\text{s}$ und einer Repetitionszeit von 150 ms wurde benutzt, um das Spektrum zu messen. Aufgrund des relativ schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses wurden 250000 Scans (entsprechend einer Messzeit von über 12 Stunden) akkumuliert. In Abbildung 4.1 wird das Spektrum einer Deuterium-NMR-Messung für Probe 1 gezeigt. Man kann sehr gut erkennen, dass sich zwei klar auflösbare Peaks (Peak A mit einer Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 26.0$ kHz und Peak B mit einer Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 22.0$ kHz) im Spektrum zeigen. Vergleicht man dies mit einer DPPC- d_8 Probe aus Multilamellaren Vesikeln (MLV),

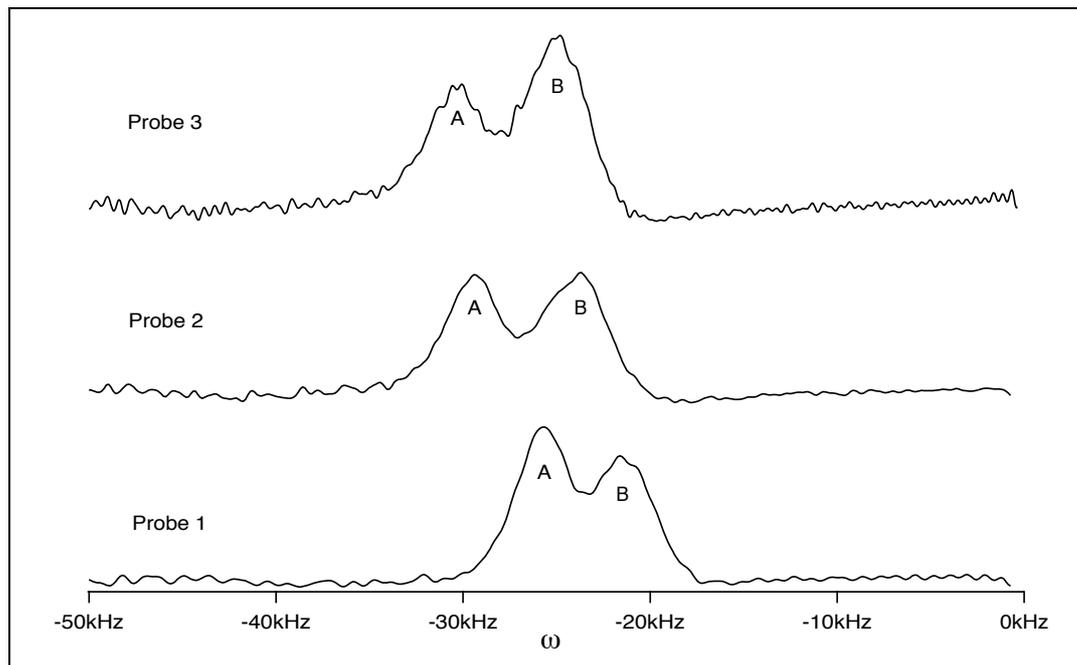


Abbildung 4.2: Die orientierten Spektren der Proben 1 bis 3 nach dem De-Pake-Ing. Da die Spektren achsensymmetrisch sind ist nur die linke Hälfte dargestellt.

zeigt sich im Gegensatz dazu nur ein ausgezeichneter Peak. Zurückzuführen ist diese Aufspaltung im Spektrum auf den Einfluss der Festkörperoberfläche. In der dem Festkörper zugewandten Hälfte des Bilayers herrscht eine höhere molekulare Ordnung als in der abgewandten Hälfte [Hetzer et al. (1998)]. Durch die unterschiedlichen Ordnungsparameter S_{CD} erhält man daher im Spektrum zwei getrennte Peaks. Peak A mit seiner höheren Aufspaltung, also auch höherem Ordnungsparameter, korreliert daher mit der dem Festkörper zugewandten Hälfte des Bilayers, während Peak B mit seiner geringeren Aufspaltung, also auch niedrigerem Ordnungsparameter, mit der abgewandten Seite korreliert. Es ist also möglich die Eigenschaften der beiden Bilayerhälften getrennt zu untersuchen. Beispielsweise konnten die unterschiedlichen Diffusionskonstanten der Lipide für die beiden Bilayerhälften dadurch separat bestimmt werden [Hetzer et al. (1998)].

Zwei weitere Proben (Probe 2 und Probe 3) wurden mit einem Mischungsverhältnis DHDAB zu DPPC- d_8 von eins zu vier erstellt. Die beiden Proben unterschieden sich in der Inkubationszeit, die den SUVs zur Verfügung stand, um den Bilayer auf der Silicaoberfläche zu formen. Für Probe 2 wurde eine Inkubationszeit von 10 Minuten und für Probe 3 von 12 Stunden gewählt. Die Deuterium-NMR-Messungen erfolgten auch bei diesen beiden Proben mit den identischen Parametern der Quadrupolechosequenz wie zuvor bei Probe 1 und ebenfalls bei einer Temperatur von $T = 60^\circ\text{C}$.

Probennummer	1	2	3
DPPC Konzentration in %	100	80	80
Inkubationszeit der SUVs	-	10 min	12 h
Verhältnis $V_{A/B}$	1,3	1,0	0,7
Korrigiertes Verhältnis $V_{A/B,korr}$	1,0	0,8	0,5

Tabelle 4.1: *Relative Verhältnisse der Peaks A und B für die untersuchten Proben aus einer binären Lipidmischung.*

In Abbildung 4.1 ist das NMR-Spektrum für Probe 3 gezeigt. Im Vergleich zu dem Spektrum von Probe 1 in derselben Abbildung, kann man einen deutlichen Unterschied der Intensitäten der Peaks A und B erkennen. Da die Intensität der Peaks direkt mit der Konzentration an DPPC-d₈ zusammenhängt, hat sich offensichtlich die relative Konzentration zwischen innerem und äußerem Monolayer verändert. Aus dem Verhältnis von Peak A relativ zu Peak B kann man schließen, dass der Anteil an DPPC-d₈ in der der Silicaoberfläche zugewandten Seite des Lipidbilayers zugenommen hat.

Um einen quantitativen Vergleich der Peakintensitäten zwischen allen drei Proben und damit deren DPPC-d₈ Konzentration zu erhalten, wurden die NMR-Spektren mittels der De-Pake-ing-Methode von ihrer isotropen Verteilung auf eine orientierte Verteilung numerisch umgerechnet.

Abbildung 4.2 zeigt den linken Teil des (achsensymmetrischen) entfalteten Spektrums. Bildet man für jede Probe das Verhältnis $V_{A/B}$ aus den Peakintensitäten A und B (also aus den Signalanteilen des inneren und äußeren Layers) erhält man $V_{A/B} = 1,3$ für die reine DPPC-d₈-Probe, $V_{A/B} = 1,0$ für Probe 2 und $V_{A/B} = 0,7$ für Probe 3. Diese Verhältnisse müssen allerdings noch mit den zwischen beiden Layern unterschiedlichen transversalen Relaxationszeiten T_2 korrigiert werden. Aus [Hetzer et al. (1998)] ist bekannt, dass der innere Monolayer eine transversale Relaxationszeit von $T_2 = 310 \mu s$ und der äußere Layer von $T_2 = 260 \mu s$ besitzt. Korrigiert man die gebildeten Koeffizienten $V_{A/B}$ damit erhält man die in Tabelle 4.1 gezeigten Werte.

Anhand der korrigierten Verhältnisse $V_{A/B,korr}$ kann man sofort sehen, dass nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden (Probe 3) nur noch 50% der Menge an DPPC-d₈ im inneren Monolayer im Verhältnis zum äußeren Monolayer vorhanden ist. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (Probe 2) ist dagegen im inneren Monolayer immer noch 80% DPPC-d₈ im Vergleich zum äußeren Monolayer vorhanden. Diese Diskrepanz in den Verhältnissen $V_{A/B,korr}$ der Proben 2 und 3 lässt sich durch das Verdrängen des DPPC-d₈ durch das positiv geladene DHDAB im inneren Monolayer erklären. Bei einer Inkubationszeit der SUVs von 12 Stunden ist ein größerer Anteil an DPPC-d₈ aus dem inneren Monolayer verdrängt worden als nach nur 10 Minuten Inkubationszeit.

Unter der Voraussetzung, dass im äußeren Monolayer das ursprüngliche Lipid-

Probennummer	2	3
DPPC Konzentration des inneren Monolayers in %	64-72	40-45
Gesamtkonzentration an DPPC in %	72-76	60-63

Tabelle 4.2: Die DPPC-d₈-Konzentrationen die sich nach der Präparation einstellen.

verhältnis der SUVs (80% DPPC-d₈) unverändert vorliegt, kann man zusätzlich die DPPC-d₈ Konzentration des inneren Monolayers und den Gesamtanteil an DPPC-d₈ bestimmen. Allerdings ist diese Voraussetzung nur während der Inkubationszeit erfüllt. Nur dann liegt ein Reservoir an SUVs vor, dass durch Lipid-austausch den äußeren Monolayer wieder auf sein ursprüngliches Konzentrationsverhältnis auffüllt. Nach dem Abzentrifugieren der SUVs wird sich ein neues Lipidverhältnis durch Austausch der Lipide (z.B. Flip-Flop-Diffusion) zwischen innerem und äußerem Monolayer einstellen. Daher wurde für die weitere Berechnung angenommen, dass die DPPC-d₈ Konzentration im äußeren Monolayer zwischen 80% und 90% liegt. Die berechneten Konzentrationen werden in Tabelle 4.2 gezeigt. Ein Vergleich der ermittelten Gesamtkonzentrationen für DPPC durch ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ergab innerhalb des Messfehlers eine gute Übereinstimmung mit den hier gemessenen Daten [Käsbauer (1999/2)].

4.2 Lipidbilayer aus kationischen Lipiden

Nach der Analyse der Effekte, die sich für eine binäre Lipidmischung aus geladenen und ungeladenen Lipiden in Wechselwirkung mit einer Festkörperoberfläche ergaben, beschäftigt sich dieses Kapitel mit einem System, das nur noch aus einer Lipidkomponente besteht. Wie in den Messungen im vorangegangenen Abschnitt (DHDAB) handelt es sich um ein kationisches (also positiv geladenes) Lipid (DPTAP-d₆₂). Das kationische Lipid ist direkt mit Deuterium gelabelt. Es ist kein selektives Labeling ausgewählter Kettenpositionen mehr, sondern an jeder Kettenposition sind alle Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt worden. Auch hier ist der reine Bilayer, wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben, auf eine Silicakugel aufgebracht und anschließend mittels Deuterium-NMR untersucht worden. Mit einer Differential-Scanning-Calorimetry-Messung (DSC) wurde die Phasenübergangstemperatur des Lipidbilayers zu $T = 52^{\circ}\text{C}$ bestimmt. Alle nachfolgenden Messungen wurden daher, sofern nicht anders vermerkt, bei einer Temperatur von $T = 60^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, um sicherzustellen, dass man sich in der fluiden Phase des Lipidbilayers befand.

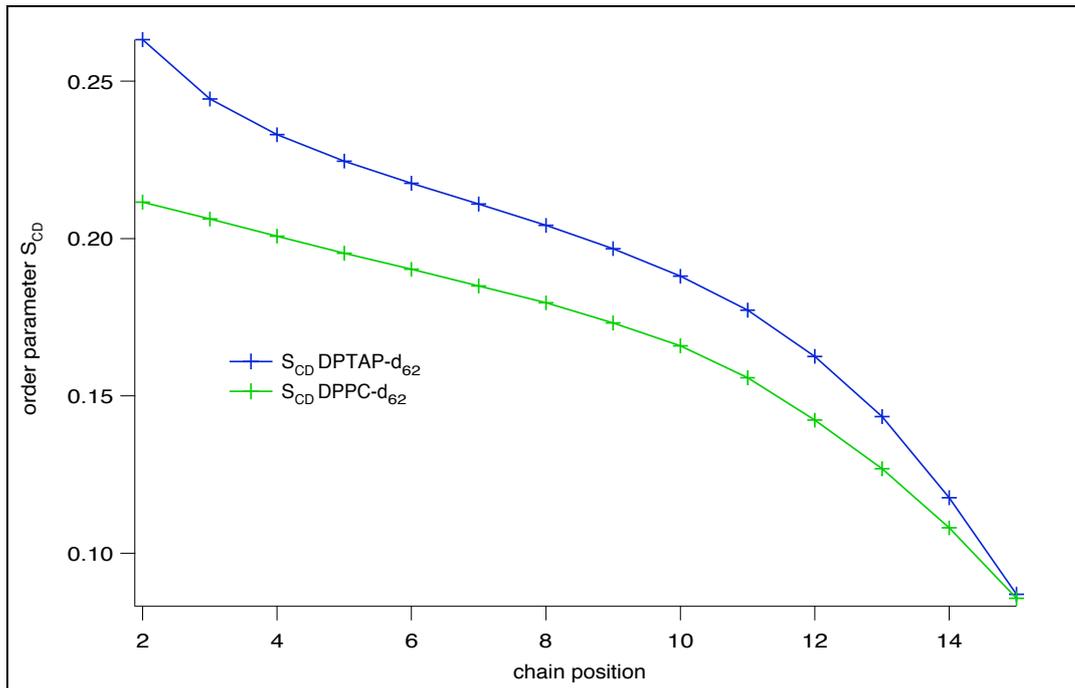


Abbildung 4.3: *Ordnungsparameterprofil für DPTAP- d_{62} im Vergleich mit DPPC- d_{62} .*

4.2.1 Molekulare Ordnung

Zunächst wollen wir uns mit der molekularen Ordnung entlang der Lipidkette beschäftigen und damit einen Einblick in das Innere des Lipidbilayers gewinnen. Wie schon in Kapitel 3.1.7 dargelegt, bedient man sich hierzu des sogenannten Ordnungsparameterprofils, das mittels De-Pake-ing aus den isotropen Deuterium-NMR-Spektren der Silicakugeln gewonnen wird. Mit einer Quadrupolechoresequenz mit Pulslängen von $6,7\mu s$, einem Pulsabstand von $\tau = 20\mu s$ und einer Repetitionszeit von 300ms wurde das Deuterium-NMR-Spektrum gemessen. Anschließend wurde mittels De-Pake-Ing das orientierte Spektrum erzeugt und daraus das Ordnungsparameterprofil ermittelt.

In Abbildung 4.3 ist der molekulare Ordnungsparameter von DPTAP- d_{62} über die Kettenposition aufgetragen. Zum Vergleich ist in der Abbildung zusätzlich das Ordnungsparameterprofil für eine DPPC- d_{62} -Probe abgebildet. DPPC- d_{62} ist ein standardmäßig sehr häufig verwendetes Lipid und eignet sich daher hervorragend als Vergleich bzw. Referenz.

Auf den ersten Blick fällt die höhere molekulare Ordnung von DPTAP- d_{62} auf. Vor allem in der Region nahe der Lipidkopfgruppen ist die Ordnung von DPTAP- d_{62} wesentlich höher als für DPPC- d_{62} . Zur Zentralregion des Bilayers fällt sie dann langsam ab, um in der Mitte des Bilayers, also an der terminalen

Methylgruppe (Position 15), dann identisch mit der von DPPC-d₆₂ zu sein.

Für dieses Verhalten kann es mehrere Gründe geben: Zum einen ist die Kopfgruppe von DPTAP-d₆₂ wesentlich kleiner als bei DPPC-d₆₂. Sie könnte dazu führen, dass sich die Lipide wesentlich dichter zusammenpacken können als es bei DPPC-d₆₂ der Fall ist. Durch eine engere Packungsdichte der Lipide wird die Dynamik der Fettsäureketten eingeschränkt und die gemessene molekulare Ordnung erhöht. Allerdings kann man einwenden, dass sich die identisch geladenen Köpfe von DPTAP-d₆₂ eigentlich gegenseitig abstoßen sollten. Man muss aber bedenken, dass sich auch Salz in der Lösung befindet, das bei entsprechender sterischer Anordnung die Abstoßung der positiven Kopfgruppen zumindest abschwächen kann.

Zum anderen darf hier, wie im Fall der binären Lipidsysteme des vorherigen Abschnitts, der Einfluss des Festkörpersubstrats nicht vernachlässigt werden. Die positiv geladenen Kopfgruppen, die in Richtung der negativ geladenen Silica-Oberfläche zeigen werden sicherlich, wie im Fall der binären Lipidsysteme, in einem geordneteren Zustand vorliegen als ihre Pendants, die in Richtung Bulk-Wasser gerichtet sind. Im Gegensatz zu den Messungen des vorangegangenen Kapitels, wo man durch die selektive Markierung relativ einfach zwischen innerem und äußerem Layer unterscheiden konnte, ist es aufgrund der Volldeuterierung in diesem Fall nicht mehr möglich zwischen ihnen zu unterscheiden. Gemessen wurde hier also ein mittleres Ordnungsparameterprofil, das sich aus den molekularen Ordnungen der beiden Monolayer zusammensetzt.

In einem späteren Abschnitt über Lipidsysteme auf einem Polymersupport wird auf diese Fragestellung noch einmal eingegangen.

4.2.2 Diffusionsverhalten

Mit Hilfe der in Abschnitt 3.1.8 vorgestellten CPMG-Methode wurde für den rein kationischen Lipidbilayer der Diffusionskoeffizient von DPTAP-d₆₂ ermittelt. Unmittelbar im Anschluss an die Messungen zur Bestimmung des Ordnungsparameterprofils wurden diese Messungen durchgeführt. Die Parameter aus der Quadrupolechosequenz wurden, bis auf die Pulsabstände τ , die für die jeweiligen Messreihen 20, 22, 25, 28, 30, 32 und 35 μs betragen, übernommen. Die Auswertung der CPMG-Messreihen wurde wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben durchgeführt. Die ermittelte Ausgleichsgerade für die über τ^2 aufgetragenen Relaxationszeiten $(T_2^{\text{CPMG}}(\tau))^{-1}$ ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Aus der Steigung der Geraden b und dem aus dem Quadrupolechospektrum ermittelten zweiten Moment M_2 ergab sich ein Lipiddiffusionskoeffizient von $D = (7,50 \pm 1,13) \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Vergleicht man dies mit dem Diffusionskoeffizienten für ein neutrales Lipid, z.B. DPPC-d₆₂, das eine Diffusionskonstante von $D = (14.2 \pm 1,2) \mu\text{m}^2/\text{s}$ besitzt [Junglas et al. (2003)], erkennt man das DPTAP-d₆₂ eine wesentlich geringere Diffusionskonstante aufweist. Da bei diesen beiden Lipiden die Fettsäureketten identisch sind, muss die Kopfgruppe der entscheidende Grund für die langsamere

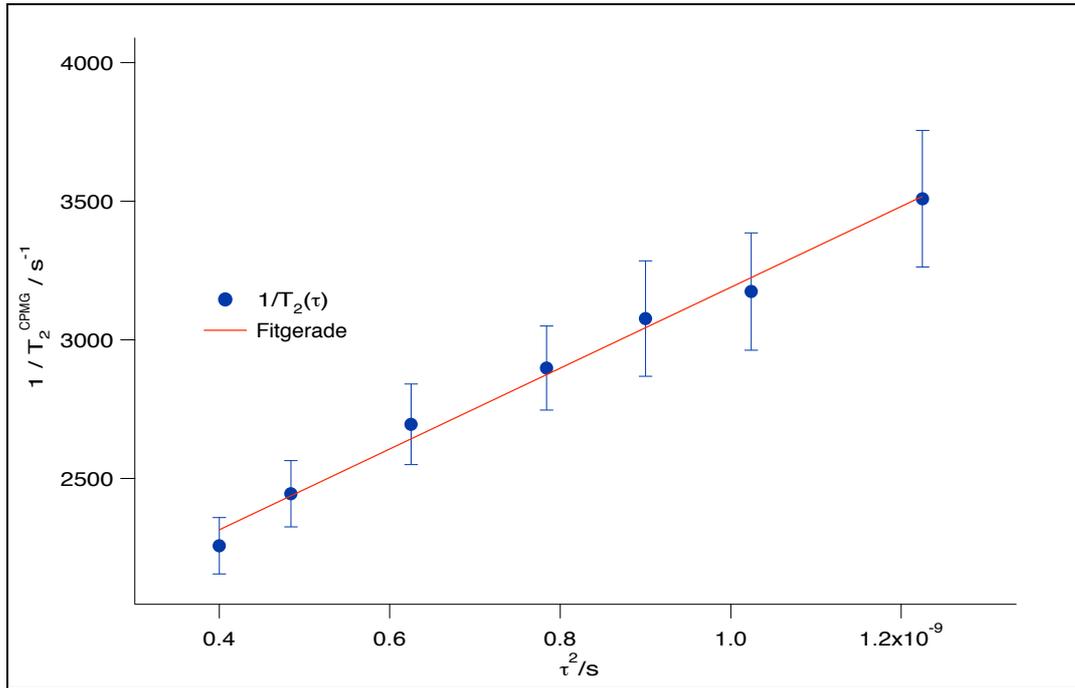


Abbildung 4.4: Bestimmung der Diffusionskonstante für die SSVs aus reinem DPTAP- d_{62} .

Diffusion sein. Anhand des Ordnungsparameterprofils konnte man bereits erkennen, dass sich kationische Lipide an einer negativ geladenen Festkörperoberfläche in einem geordneteren Zustand als ihre neutralen Pendants befinden. Betrachtet man das *free volume model of diffusion*[Galla et al. (1979), Vaz et al. (1985)], bedingt ein dichteres Zusammenpacken der Lipide ein reduziertes freies Volumen für einen Diffusionssprung, und daher ebenfalls eine Reduzierung der Diffusionskonstanten. Sowohl die gemessene erhöhte molekulare Kettenordnung, als auch die reduzierte Diffusionskonstante sind daher einfach erklärbar und schliessen sich keinesfalls gegenseitig aus.

Man muss außerdem bedenken, dass man hier ebenso wie bei dem Ordnungsparameterprofil über zwei Monolayer mit unterschiedlichen Eigenschaften mittelt. Die gemessene Diffusionskonstante ist also nur als Mittelwert der beiden Monolayer zu betrachten. Da nur der innere Monolayer mit seinen Kopfgruppen direkten Kontakt zur Festkörperoberfläche hat, müsste er ein anderes Diffusionsverhalten zeigen als der dem Wasser zugewandte Layer. Wie sich im Kapitel 4.6 anhand von polymerbeschichteten Kugeln zeigen wird, ist das auch tatsächlich der Fall.

4.3 Wechselwirkung zwischen kationischen Lipiden und ss-DNA

Zu den Wechselwirkungen zwischen DNA und kationischen Lipiden gibt es zahlreiche Untersuchungen z.B. [Rädler et al. (1997)]. In ihr wurde die regelmäßige Anordnung von DNA-Doppelhelizes zwischen Lipidbilayern untersucht.

Im Gegensatz zu dieser Untersuchung wird hier ein festkörperunterstütztes System, wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, verwendet. Zu den mit einem kationischen Lipidbilayer beschichteten Silicakugeln wurde die DNA zugegeben und es wurde ihr zwei Stunden Zeit gegeben, um mit den Kugeln zu wechselwirken. Dies ist ein Unterschied zu den Experimenten von [Mitrakos (1996)], wo die Lipide und die DNA zusammen in Chloroform gelöst wurden, um anschließend gemeinsam zu quellen. Der Zweite Vorteil der hier verwendeten Methode ist, dass die Oberfläche der Kugeln mit DNA abgesättigt wird. Es koppelt genau so viel DNA an wie elektrostatisch gerade noch möglich.

Verwendet wurden zwei ss-DNA Stücke unterschiedlicher Länge. Eine Sequenz mit 25 Basenpaaren (25bp) und eine Sequenz mit 50 Basenpaaren (50bp). Es sollte nicht nur untersucht werden welchen Einfluss die ss-DNA auf das Ordnungsparameterprofil bzw. den Diffusionskoeffizienten der Lipide ausübt, sondern auch, ob dieser Einfluss von der Länge der DNA abhängt.

4.3.1 Molekulare Ordnung

Zwei Proben mit festkörperunterstützten Lipidbilayern, denen erlaubt wurde mit ss-DNA von 25 bp und 50 bp Länge zu wechselwirken wurden wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben präpariert. Die Lipidbilayer bestanden wieder zu 100% aus DPTAP-d₆₂. Anschliessend wurde analog zu Kapitel 4.2.1 für beide Proben aus den NMR-Spektren das Ordnungsparameterprofil gewonnen. In Abbildung 4.5 ist das Ergebnis dargestellt. Zum Vergleich sind außerdem die Ordnungsparameterprofile für DPTAP-d₆₂ und DPPC-d₆₂ ebenfalls abgebildet.

Es ist gut zu erkennen, dass die ss-DNA den Ordnungsparameter über alle Kettenpositionen erhöht. Eine Korrelation zwischen der Länge der ss-DNA und der molekularen Ordnung lässt sich allerdings nicht feststellen.

Die ss-DNA übt also einen starken Einfluss auf die molekulare Ordnung des Lipidbilayers aus. Die Erhöhung der Ordnungsparameter lässt sich auf verschiedene Weise erklären. Das Phosphat- und Glycerolbackbone der DNA ist negativ geladen. Es kann daher eine Coulomb-Wechselwirkung mit den positiv geladenen Kopfgruppen des DPTAP-d₆₂ stattfinden. Kommt die DNA dem Bilayer dabei sehr nahe, binden Lipid-Moleküle elektrostatisch an die ss-DNA. Das heisst, dass sich um einen ss-DNA Strang ein Cluster aus Lipidmolekülen bildet. Diese haben im Mittel einen kleineren Abstand als die nicht an die DNA gebundenen Bulk-Lipidmoleküle. Dadurch ist die Bewegungsfreiheit ihrer Ketten eingeschränkt, was

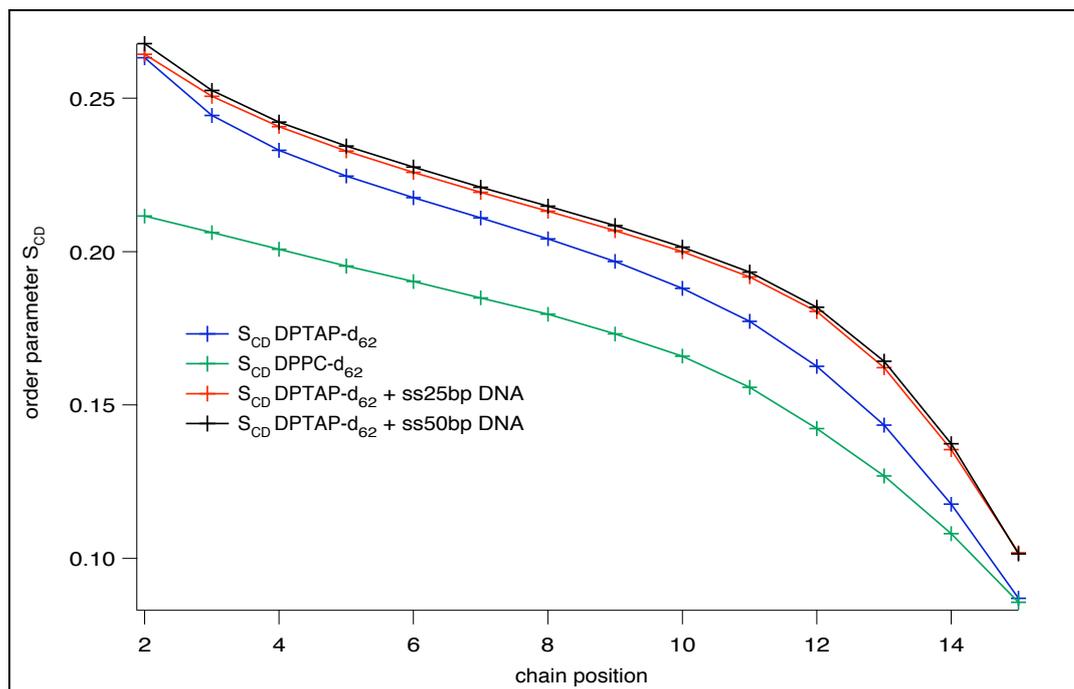


Abbildung 4.5: *Ordnungsparameterprofil der DPTAP-d₆₂-Proben mit angekoppelter ss-DNA im Vergleich mit reinen Lipidproben.*

sich in den Messungen durch eine Erhöhung des Ordnungsparameters bemerkbar macht. Eine Bildung von Lipid-Clustern aus kationischen Lipiden in Anwesenheit von DNA wurde für binäre Lipidsysteme bereits beobachtet [Mitrakos (1997)].

Darüberhinaus ist denkbar, dass die ss-DNA ein Stück weit in den Bilayer eintaucht. Im Vergleich mit zum Beispiel DPPC hat DPTAP eine relativ kleine Kopfgruppe. Es ist also durchaus möglich, dass das geladene Backbone der DNA sich zwischen die Lipidkopfgruppen schiebt. Ausserdem sind die DNA-Basen wie die Fettsäureketten der Lipide hydrophob. Das heisst es wäre den DNA-Basen möglich in die Kettenregion des Lipidbilayers einzudringen. Die Bewegung der Lipidketten ist dann aus sterischen Gründen eingeschränkt und macht sich ebenfalls als Ordnungsparametererhöhung bemerkbar. Infrarotspektroskopiemessungen [Cocora] an einem orientierten kationischen Lipidbilayer in Wechselwirkung mit ss-DNA deuten darauf hin, dass die DNA-Basen tatsächlich ein Stück weit in die Kettenregion des Bilayers eindringen.

Natürlich schließen diese beiden Erklärungen einander nicht aus. Es ist am wahrscheinlichsten, dass die beobachtete Erhöhung der molekularen Ordnung ein Mischung aus den beiden oben beschriebenen Modellen darstellt. Eine Abhängigkeit der Ordnungsparametererhöhung von der ss-DNA-Länge ergibt sich aus den Erklärungen ebenfalls nicht, was mit den Ergebnissen der Messungen übereinstimmt.

Probe	Diffusionskoeffizient D in $\mu\text{m}^2/\text{s}$
DPTAP-d ₆₂	$7,50 \pm 1,13$
DPTAP-d ₆₂ , ss-DNA 25bp	$5,73 \pm 0,86$
DPTAP-d ₆₂ , ss-DNA 50bp	$4,96 \pm 0,74$

Tabelle 4.3: *Diffusionskoeffizienten der DPTAP-d₆₂-Proben in Wechselwirkung mit ss-DNA unterschiedlicher Länge.*

4.3.2 Diffusionsverhalten

Nach der Aufnahme der NMR-Spektren wurde erneut mittels der CPMG-Pulssequenz die Diffusionskonstante der Lipide für beide Proben gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Zum Vergleich wurden auch noch einmal der Diffusionskoeffizient der reinen DPTAP-d₆₂-Probe aufgeführt.

Wie man erkennen kann ist leider aufgrund des Fehlerbereichs keine eindeutige Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Anzahl an Basenpaaren der ss-DNA sichtbar. Allerdings kann man für eine Länge der ss-DNA von 50bp sicher sagen, dass die Diffusion der Lipide abgenommen hat. Bei einer Länge von 25bp überlappt der Fehlerbereich sowohl mit dem Diffusionskoeffizienten der reinen DPTAP-d₆₂-Probe, als auch mit dem der 50bp ss-DNA-Probe.

Die für das Verhalten des Ordnungsparameters entwickelten Modelle würden beide eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl an Basenpaaren der ss-DNA und der Lipiddiffusion nahelegen. Die beschriebene Clusterbildung in Anwesenheit von ss-DNA bindet zwar bei angenommenem gleich hohem Bedeckungsgrad der ss-DNA-Stücke auch die gleiche Anzahl an kationischen Lipiden in den Clustern. Allerdings ist die Größe der Cluster von der Länge der DNA-Stücke abhängig. Da diese Lipid-DNA-Cluster nicht immobil sind sondern in dem Meer aus Bulk-Lipiden diffundieren liefern auch sie einen Beitrag zur gemessenen Diffusionskonstante. Allerdings sinkt ihre Eigendiffusion mit steigender Größe bzw. mit der Länge der ss-DNA-Stücke [Rädler (1999), Maier (2000)], die die Größe der Cluster bestimmt. Also sinkt mit steigender Basenpaarlänge der ss-DNA der gemessene Diffusionskoeffizient der kationischen Lipide.

Das Eindringen der ss-DNA in den Lipidbilayer beeinflusst ebenfalls die Eigendiffusion der Lipide. Für die verwendeten Basenpaarlängen kann man die ss-DNA-Stücke näherungsweise als starre Stäbe betrachten, die zwischen den Lipiden angeordnet sind. Es ist sofort einsichtig, dass ein solcher Stab für ein Lipid das einen Diffusionssprung in Richtung des Stabes durchführt als Barriere wirkt. Während viele kleine isotrop verteilte Stäbe die Diffusion der Lipide zunächst nur wenig beeinflussen können wird ihr Einfluss mit steigender Länge ansteigen und damit die Diffusionskonstante der Lipide effektiv erniedrigen.

Auch für diese beiden Erklärungen gilt, dass sie sich nicht gegenseitig aus-

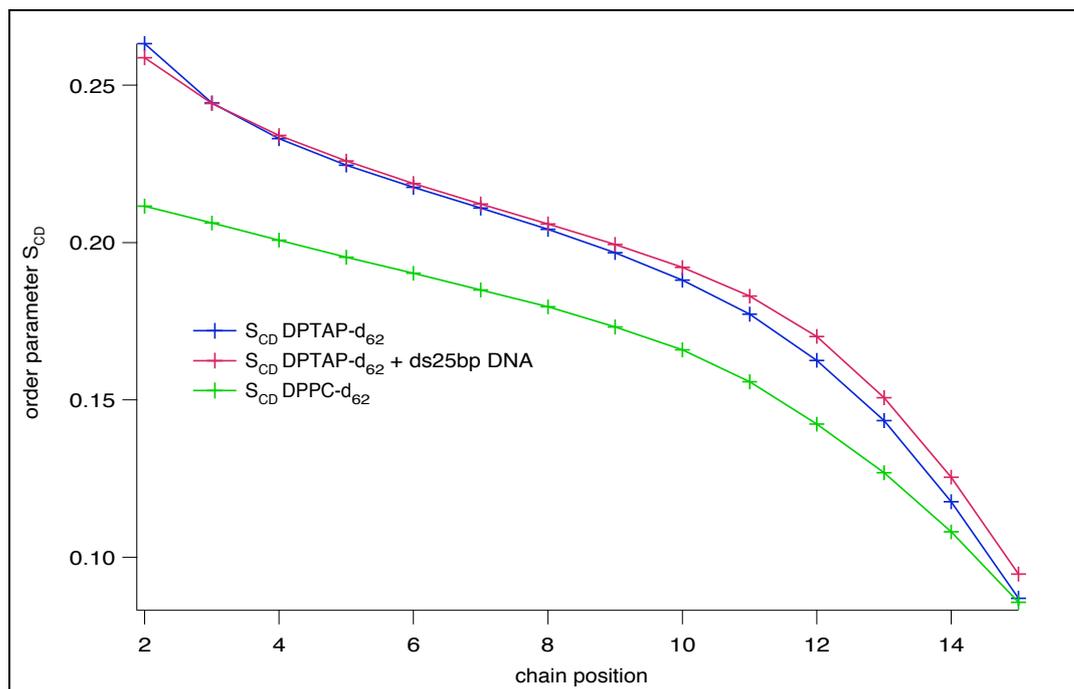


Abbildung 4.6: *Ordnungsparameterprofil der DPTAP-d₆₂-Probe mit angekoppelter ds-DNA im Vergleich mit reinen Lipidproben.*

schliessen sondern kombiniert gelten können. Aufgrund des bereits erwähnten Fehlerbereichs der Messungen ist keine eindeutige Überprüfung der oben dargelegten Modelle möglich. Allerdings schließen die Ergebnisse die Modelle nicht aus und erklären die Erniedrigung der gemessenen Diffusion für festkörperunterstützte Lipidbilayer in Wechselwirkung mit 50bp ss-DNA.

4.4 Wechselwirkung zwischen kationischen Lipiden und ds-DNA

Eine weitere Messung an einer Probe mit ds-DNA (Doppelhelixform) sollte Aufschluss darüber geben, ob die beiden DNA-Formen (ds-DNA bzw. ss-DNA) den Lipidbilayer unterschiedlich beeinflussen. Verwendet wurde wiederum ein Lipidbilayer aus 100% DPTAP-d₆₂. Die Länge der verwendeten ds-DNA betrug 25 Basenpaare.

4.4.1 Molekulare Ordnung

Die Deuterium-NMR-Messungen wurden analog zu den vorangegangenen Kapiteln durchgeführt. In Abbildung 4.6 ist das molekulare Ordnungsparameterprofil

Probe	Erstes Moment des Spektrums M_1 in $1/s$ (äquivalent zum mittleren Ordnungsparameter) normiert auf das reine DPTAP- d_{62} -Spektrum
DPTAP- d_{62}	1,000
DPTAP- d_{62} , ss-DNA 25bp	1,076
DPTAP- d_{62} , ss-DNA 50bp	1,083
DPTAP- d_{62} , ds-DNA 25bp	1,053

Tabelle 4.4: *Mittlerer Ordnungsparameter (normiert auf DPTAP- d_{62}) der Proben.*

für die Probe zu sehen, an der ds-DNA angekoppelt hat. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass die ds-DNA einen kleineren Einfluss auf die kationischen Lipide ausübt als die ss-DNA. Die molekulare Ordnung ist, wie man sehen kann, nur leicht erhöht worden.

Um den Einfluss von ds-DNA im Vergleich mit ss-DNA in quantitativer Form erfassen zu können, wurde für die Messungen der mittlere Ordnungsparameter über alle Kettenpositionen bestimmt. Er ist identisch mit dem ersten Moment des Spektrums (Kapitel 3.1.4). In Tabelle 4.4 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowohl für ss-DNA als auch für ds-DNA dargestellt. Die Ergebnisse der mittleren Ordnungsparameter legen nahe, dass der Einfluss der ds-DNA auf den Lipidbilayer tatsächlich geringer als der der ss-DNA ist. Allerdings ist doch eine leichte Erhöhung des mittleren Ordnungsparameter auch für ds-DNA feststellbar.

Erklärbar ist dieser Unterschied am besten mit einem anderen Ankopplungsverhalten der Doppelhelix im Gegensatz zum Einzelstrang. Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass ein DNA-Einzelstrang leicht in den flüssigen Lipidbilayer eindringt und dadurch sowohl den Ordnungsparameter, als auch das Diffusionsverhalten der Lipide beeinflusst. Für eine Doppelhelix wäre es schon aufgrund ihrer Größe wesentlich schwerer in den Bilayer einzudringen. Auch zeigen die Messungen von [Rädler et al. (1997)], dass sich in Multischichtsystemen die ds-DNA regelmäßig zwischen Bilayerschichten anordnet, und keinerlei Tendenz zeigt in den Bilayer einzudringen. Auch ATR-FTIR Messungen [Cocora] an einem orientierten kationischen Lipidbilayer in Wechselwirkung mit ds-DNA zeigen im Gegensatz zu ss-DNA nur eine geringe Tendenz in den Bilayer einzudringen. Man kann also davon ausgehen, dass die Doppelhelix im Gegensatz zum Einzelstrang nur locker gebunden über die Oberfläche des Bilayers *gleitet*. Diese Modellvorstellung würde den geringen Einfluss auf die molekulare Ordnung der Lipide erklären. Trifft sie zu, kann man ausgehen, dass das Diffusionsverhalten der Lipide von der ds-DNA, im Gegensatz zur ss-DNA, nur geringfügig beeinflusst wird.

Probe	Diffusionskoeffizient D in $\mu\text{m}^2/\text{s}$
DPTAP-d ₆₂	$7,50 \pm 1,13$
DPTAP-d ₆₂ , ss-DNA 25bp	$5,73 \pm 0,86$
DPTAP-d ₆₂ , ss-DNA 50bp	$4,96 \pm 0,74$
DPTAP-d ₆₂ , ds-DNA 25bp	$7,77 \pm 1,17$

Tabelle 4.5: Vergleich der Diffusionskoeffizienten der Proben mit einem Lipidbilayer aus 100% DPTAP-d₆₂.

4.4.2 Diffusionsverhalten

Eine CPMG-Pulssequenz wurde analog zu den vorangegangenen Messungen verwendet, um die Diffusionskonstante der Lipide zu bestimmen. Die Messungen für die DPTAP-d₆₂-Probe in Wechselwirkung mit ds-DNA ergaben innerhalb des Messfehlers keinen messbaren Unterschied für das Diffusionsverhaltens der Lipide im Vergleich mit der reinen DPTAP-d₆₂-Probe (siehe Tabelle 4.5). Auch dieses Resultat weist darauf hin, dass die ds-DNA, im Gegensatz zur ss-DNA, nur relativ locker an den Lipidbilayer gebunden ist.

4.5 Binäre Lipidsysteme in Wechselwirkung mit DNA

In einer weiteren Messreihe wurde versucht festzustellen, ob sich die beobachteten Effekte für eine Wechselwirkung mit DNA auch bei einem binären Lipidgemisch zeigen, das auf eine Silicakugel aufgebracht wurde. Verwendet wurde dazu wiederum DPTAP-d₆₂ als kationisches und zusätzlich DPPC als neutrales Lipid. Im Gegensatz zu den Messungen im Kapitel 4.1 ist hier das kationische Lipid mit Deuterium gelabelt. Das Mischungsverhältnis lag bei 70% DPTAP-d₆₂ zu 30% DPPC. Die Präparation erfolgte analog zu Kapitel 4.1. Um Effekte aufgrund von unterschiedlichen Inkubationszeiten der SUVs auszuschliessen, wurde für beide Proben eine Inkubationszeit von zwei Stunden gewählt.

Das Ankoppeln von DNA wurde diesmal mit sogenannter lambda-DNA untersucht. Es handelt sich dabei um die natürliche DNA eines Bakteriophagen mit einer Basenpaarlänge von über 50000bp. Als natürliche DNA lag sie in ihrer Doppelhelix-Form vor, ist also vergleichbar mit den ds-DNA Messungen im Kapitel 4.4.

4.5.1 Molekulare Ordnung

In Abbildung 4.7 ist das Ordnungsparameterprofil von DPTAP-d₆₂ für die binären festkörperunterstützten SSVs sowohl in Wechselwirkung mit lambda-DNA, als

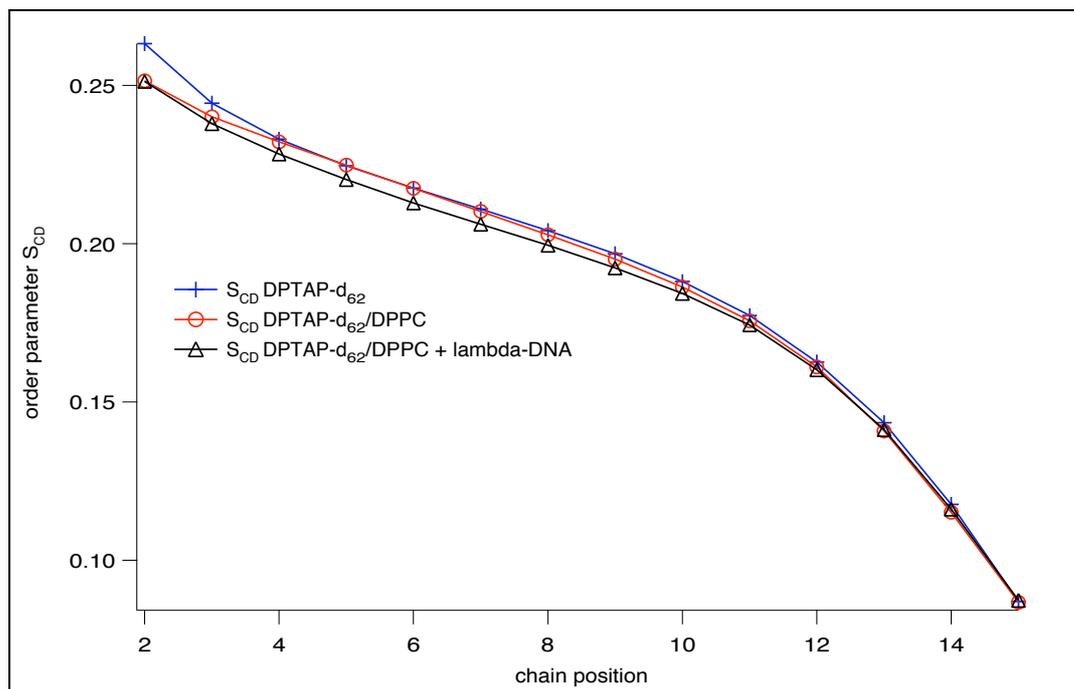


Abbildung 4.7: Ordnungsparameterprofil der DPTAP- d_{62} /DPPC-Mischung mit und ohne lambda-DNA im Vergleich mit der reinen DPTAP- d_{62} -Probe

auch in reiner Form dargestellt. Im direkten Vergleich gibt es beinahe keinen Unterschied zwischen einer Probe aus reinem DPTAP- d_{62} und der binären DPTAP- d_{62} / DPPC-Probe. Erstaunlicherweise scheint es aber, als würde die Zugabe von lambda-DNA die molekulare Ordnung diesmal leicht erniedrigen. Auf den ersten Blick steht dieses Resultat im direkten Widerspruch zu den an reinen kationischen SSVs beobachteten Ergebnissen.

Allerdings ist dieser Effekt einfach zu erklären, wenn man sich die Ergebnisse aus Kapitel 4.1 in Erinnerung ruft. Durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Festkörperoberfläche und den kationischen Lipiden ändert sich die Konzentration an kationischen Lipiden im inneren und äußeren Monolayer. Durch die Zugabe der negativ geladenen lambda-DNA entsteht auf der Oberfläche des äußeren Monolayers eine DNA-Schicht mit einer negativen Gesamtladung. Durch diese wird das Verhältnis an kationischen Lipiden zwischen innerem und äußerem Layer so verändert, dass sich ein höherer Anteil an positiv geladenem Lipid, im Vergleich zur binären Probe ohne DNA, im äußeren Monolayer ausbildet. Da die molekulare Ordnung im äußeren Layer kleiner ist als im inneren Layer sinkt das gemessene, über beide Monolayer gemittelte, Ordnungsparameterprofil. Die im Kapitel 4.4.1 gemessene Erhöhung der molekularen Ordnung durch ds-DNA reicht nicht aus, um diesen Effekt zu kompensieren und es wird eine effektive Erniedrigung des Ordnungsparameterprofils gemessen.

Ein Vergleich mit den Messungen an reinen kationischen Bilayern ist daher nicht direkt möglich. Durch die unterschiedliche Verteilung des mit Hilfe der Deuterium-NMR *sichtbaren* Lipids und die Mittelung über beide Monolayer ist keine sinnvolle Interpretation von weiterführenden Messungen mit Hilfe eines volldeuterten Lipids (DPTAP-d₆₂) möglich. Allerdings könnten zukünftige NMR-Messungen mit einem selektiv deuterierten kationischen Lipid interessante Ergebnisse über die tatsächlichen Lipidkonzentrationsunterschiede zwischen beiden Monolayern in Wechselwirkung mit DNA zugänglich machen.

4.5.2 Diffusionsverhalten

Für beide Proben wurde wiederum die Diffusionskonstante mit Hilfe der CPMG-Pulssequenz ermittelt. Für die binäre Lipidprobe ohne DNA ergab sich ein Diffusionskoeffizient $D = (5,80 \pm 0,80) \mu\text{m}^2/\text{s}$. Für die Probe in Wechselwirkung mit lambda-DNA wurde eine Diffusionskonstante $D = (7,42 \pm 1,10) \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt. Dies steht ebenfalls im direkten Widerspruch zu den an reinen kationischen Lipidbilayern gemessenen Ergebnissen.

Auch dieses Resultat erklärt sich durch die von der lambda-DNA veränderte DPTAP-d₆₂-Konzentration in den beiden Monolayern. Aus [Hetzer et al. (1998)] ist bekannt, dass die Diffusionskonstante im inneren Monolayer niedriger als im äußeren ist. Wenn sich, wie oben erläutert, die DPTAP-d₆₂-Konzentration im äußeren Layer erhöht, erhöht sich die gemessene Diffusionskonstante ebenfalls.

Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls die Schwierigkeit, Messungen an binären Lipidsystemen mit den Messungen an den reinen kationischen Bilayern zu vergleichen.

4.6 Lipidbilayer auf polymerbeschichteten Silicakugeln

Aus [Danner (2001)] ist bekannt das Silica-Kugeln mit einem Polymersupport den Einfluss des Festkörpersubstrats aufheben können. Es ist damit möglich einen vom verwendeten Substrat ungestörten Bilayer zu vermessen. Daher wurden in der folgenden Messungen polymerbeschichtete Silica-Kugeln mit einem Lipidbilayer aus 100% DPTAP-d₆₂ verwendet.

4.6.1 Molekulare Ordnung

Abbildung 4.8 zeigt das Ordnungsparameterprofil eines Bilayers aus 100% DPTAP-d₆₂ auf polymerbeschichteten Silicakugeln im Vergleich mit einer Messung ohne den Polymersupport. Es ist zu erkennen, dass der Ordnungsparameter über alle Kettenpositionen stark gesenkt wird. Dadurch wird erneut der starke Einfluss der Festkörperoberfläche auf den Lipidbilayer erkennbar.

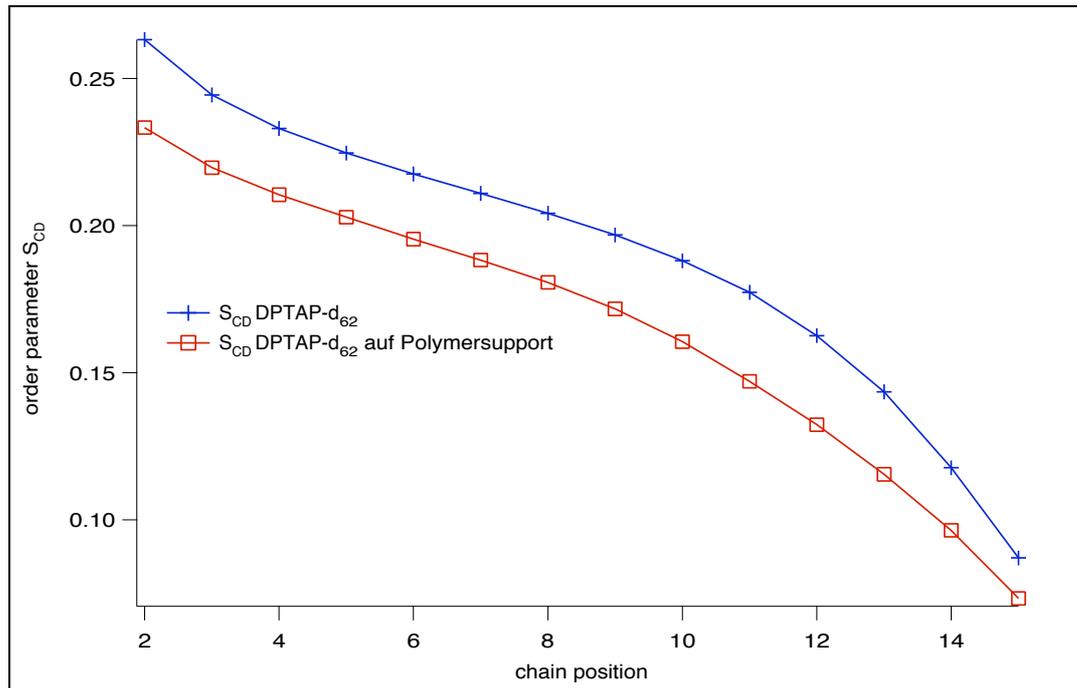


Abbildung 4.8: Ordnungsparameterprofil für DPTAP- d_{62} auf einer polymerbeschichteten Kugel.

Bei den polymerbeschichteten Kugeln kann man davon ausgehen, dass beide Monolayer eine identische molekulare Ordnung aufweisen [Danner (2001)]. In der Probe ohne Polymersupport wird der äußere Monolayer, da er von der Festkörperoberfläche ungestört ist, dieselbe molekulare Ordnung der Lipidketten aufweisen. Das erhöhte Ordnungsparameterprofil der Probe ohne Polymersupport ist also allein auf den Einfluss der Silicakugeln auf den inneren Monolayer zurückzuführen.

Beim Vergleich mit den Messungen zum Ankoppeln von DNA an den Lipidbilayer wird klar, dass das verwendete Silica-Substrat einen wesentlich höheren Einfluss auf die gemessenen Ordnungsparameter hat als die DNA. Für zukünftige Messungen wäre also eine Kombination aus selektiv deuteriertem kationischen Lipid und polymerbeschichteten Silicakugeln wünschenswert.

4.6.2 Diffusionsverhalten

Mit der CPMG-Pulssequenz ergab sich für die Diffusionskonstante der Lipide auf einer polymerbeschichteten Kugeln $D = (15,1 \pm 2,3) \mu m^2/s$. Im Vergleich mit der Diffusionskonstante, die ohne Polymersupport ermittelt wurde, hat sich die gemessene Eigendiffusion der Lipide verdoppelt. Auch hier zeigt sich, dass bei den Messungen ohne Polymersupport der innere Monolayer das Messergebnis für

die Eigendiffusion dominiert hat.

Dies ändert allerdings nichts an den gemessenen Unterschieden der Diffusion in Wechselwirkung mit oligo-DNA. Man kann allerdings davon ausgehen das bei Messungen mit Polymersupport und ankoppelnder DNA die Resultate noch eindeutiger ausfallen würden als hier gemessen. Insbesondere die Überprüfung der Abhängigkeit der Lipiddiffusion von der Länge der ss-DNA bietet sich mit polymerbeschichteten Kugeln an.

Kapitel 5

Schlussfolgerungen

Durch Verwendung eines selektiv gelabelten neutralen Lipids, gemischt mit einem kationischen Lipid, gelang es Konzentrationsunterschiede der beiden Lipidarten in den zwei Monolayern eines festkörperunterstützten Lipidbilayers zu messen. Diese Unterschiede ließen sich auf die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Silica-Substrat und dem positiv geladenen Lipid zurückführen. Wie die Messungen zeigten erhöhte sich die Konzentration des kationischen Lipides in der der Silicakugel zugewandten Hälfte des Bilayers um bis zu 200% gegenüber der verwendeten Ausgangskonzentration. Ausserdem wurde auch die Gesamtkonzentration im Lipidbilayer zugunsten des kationischen Lipids erhöht. Abhängig von der Länge der Inkubationszeit ergab sich eine Gesamtzunahme an kationischem Lipid von bis zu 100% gegenüber der Ausgangskonzentration. Das heisst, dass ein vor der Präparation eingestelltes Verhältnis zwischen neutralen und positiv geladenen Lipiden in dem festkörperunterstützten Lipidbilayer nicht mehr vorliegen muss.

Bei jedem Vergleich von Messungen, aus unterschiedlichen Quellen, ist daher genau auf die Parameter der verwendeten Präparation zu achten. Außerdem muss auf die Unzulänglichkeiten der verschiedenen Messmethoden geachtet werden, zum Beispiel wie in dieser Arbeit die Mittelung über beide Monolayer eines Bilayers, sofern kein selektiv deuteriertes Lipid eingesetzt wurde, um sie zu unterscheiden.

Mit Hilfe von vollständig kettendeutierten kationischen Lipiden, die auf Silicakugeln aufgebracht wurden, war es zum ersten Mal mit Hilfe von Deuterium-NMR möglich die molekulare Ordnung der Lipidketten eines kationischen Lipidbilayers zu messen. Durch die starke Wechselwirkung der positiv geladenen Lipide mit der Festkörperoberfläche erhöhte sich das Ordnungsparameterprofil im Vergleich zu dem neutraler Lipide. Durch Verwendung eines Polymersupports konnte gezeigt werden, dass diese Erhöhung auf den Beitrag des inneren Monolayer zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde die Eigendiffusion des kationischen Lipids ermittelt (vgl. Abbildung 5.1). Auch hier ergab sich eine starke Diskrepanz der gemessenen Werte je nachdem, ob man Silicakugeln mit oder ohne Polymer-

Probe	Erstes Moment des Spektrums M_1 in $1/s$ (äquivalent zum mittleren Ordnungsparameter) normiert auf das reine DPTAP- d_{62} -Spektrum
DPTAP- d_{62}	1,000
DPTAP- d_{62} , ss-DNA 25bp	1,076
DPTAP- d_{62} , ss-DNA 50bp	1,083
DPTAP- d_{62} , ds-DNA 25bp	1,053

Tabelle 5.1: *Mittlerer Ordnungsparameter der Proben aus reinem DPTAP- d_{62} .*

support verwendete. Der innere Monolayer mit seiner stark erniedrigten Diffusion übte auch dabei den entscheidenden Einfluss aus.

Bei der Untersuchung des Ankoppelns kurzer DNA-Stücke an den positiv geladenen Lipidbilayer zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten je nachdem, ob die DNA als Doppel- oder Einzelstrang vorlag. Während die relativ starke Erhöhung des Ordnungsparameterprofils beim Ankoppeln von ss-DNA auf eine starke Wechselwirkung mit dem Bilayer hinwies, war der Einfluss von ds-DNA auf den Lipidbilayer geringer (siehe Tabelle 5.1). Bezüglich ihres Einflusses auf die Eigendiffusion der Lipide zeigte die ss-DNA eine Erniedrigung der Lipiddiffusion (siehe Abbildung 5.1). Aufgrund des Fehlerbereichs der Messungen konnte die postulierte Abhängigkeit der Lipiddiffusion von der ss-DNA-Länge nicht verifiziert werden. Allerdings erscheint sie wahrscheinlich. Dagegen wurde die Vermutung, dass ss-DNA in den äußeren Lipidmonolayer eindringt durch ATR-FTIR Messungen bestätigt [Cocora]. Im Gegensatz dazu zeigt die ds-DNA nur eine geringe Tendenz in den Bilayer einzudringen [Cocora]. Diese Messungen bestätigen die postulierten Modelle, die aus dem Verhalten des Ordnungsparameterprofils und der Lipideigendiffusion entwickelt wurden.

Messungen an Lipidsystemen aus mehreren unterschiedlich geladenen Komponenten und deren Wechselwirkung mit DNA zeigten ein unterschiedliches Verhalten im Gegensatz zu dem bestehendem System aus einer positiv geladenen Lipidkomponente. Diese Abweichungen lassen sich durch den Einfluss des Substrats auf die Lipidverteilung zwischen den beiden Monolayern erklären. Sie zeigen außerdem die Schwierigkeiten beim Vergleichen von Messungen aus mehrkomponentigen Lipidsystemen die nicht nur mit Biomolekülen wechselwirken, sondern auch mit ihrem Substrat.

Um die Wechselwirkungen zwischen Substrat, Lipidbilayer und DNA in Zukunft genauer zu untersuchen bietet sich ein System mit Polymersupport und selektiv deuterierten kationischen Lipiden an. Damit könnte man beide Monolayer einzeln untersuchen und deren Ordnungsparameter und Eigendiffusion ermitteln. Diese Messungen könnten helfen die dynamischen Prozesse beim Ankoppeln von Biomolekülen an einen Bilayer besser zu verstehen.

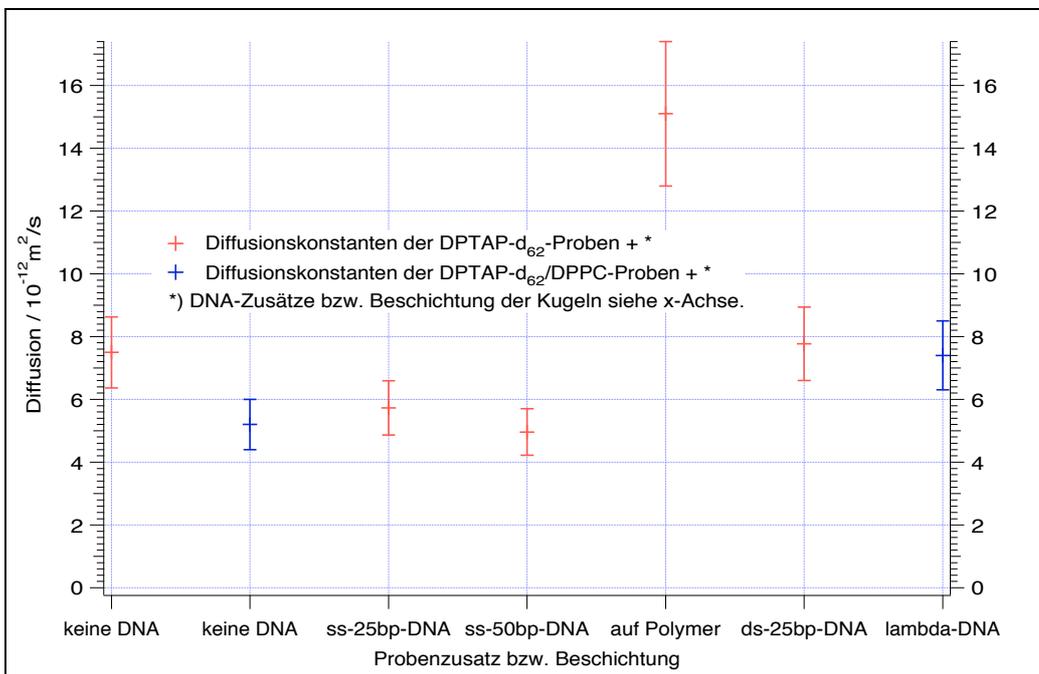


Abbildung 5.1: Übersicht der gemessenen Diffusionskonstanten.

Literaturverzeichnis

- [Abragam (1961)] Abragam, A. 1961. The Principles of Nuclear Magnetism. Oxford University Press, Oxford.
- [Bayerl (1990)] Bayerl, T.M. and M.Bloom 1990. Physical Properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads. *Biophysical Journal*, 1990. 58: p. 257-262.
- [Bloom (1981)] Bloom, M., J. Davis and A. Mackay 1981. Direct Determination Of The Oriented Sample NMR Spectrum From The Powder Spectrum For Systems With Local Axial Symmetry. *Chemical Physics Letters* 80:198-202.
- [Bloom (1987)] Bloom, M., E. Sternin. 1987 Transverse Nuclear Spin Relaxation in Phospholipid Bilayer Membranes. *Biochemistry* 26:2101-2105.
- [Bloom et al. (1992)] Bloom, M., C. Morrison, E. Sternin and J. L. Thewalt. 1992. Pulsed Magnetic Resonance: NMR, ESR and Optics, chapter 13: Spin Echoes and the Dynamic Properties of Membranes, pp. 274–316. Clarendon Press, Oxford.
- [Brumm (1992)] Brumm, T., A. Möps, C. Dolainsky, S. Brückner and T.Bayerl 1992. Macroscopic orientation effects in broadline NMR-Spectra of model membranes at high magnetic field strength. *Biophysical Journal* Vol 61: 1018-1024.
- [Cocora] Cocora, G.D. and T.M. Bayerl An ATR-FTIR spectroscopic study of the interaction between DNA and supported membranes of cationic lipids. *In preparation for publishing*.
- [Cooper (2000)] Cooper, G.M. 2000. The Cell: A molecular approach. Sianuer Associates Inc. Sunderland MA.
- [Danner (2001)] Danner, B., Schnitt, J. and T.M. Bayerl 2001. Polymer cushions in supported phospholipid bilayers reduce significantly the frictional drag between bilayers and solid surface. *Langmuir*, 2001. 17(1), 244-246.
- [Davis (1983)] Davis, J. H. 1983. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H -NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 737:117–171.

- [Dolainsky (1992)] Dolainsky, C., A. Möps and T. Bayerl. 1992. Transverse relaxation in supported and nonsupported phospholipid model membranes and the influence of ultraslow motions: A ^{31}P -NMR study *J. Chem. Phys.* 98(2):1712-1720.
- [Farrar (1971)] Farrar, T. and E. Becker. 1971. Pulse and Fourier Transform NMR. Academic Press, New York.
- [Galla et al. (1979)] Galla, H.J., et al. 1979. On two-dimensional passive random walk in lipid bilayers and fluid pathways in biomembranes. *Journal of Membrane Biology*, 1979. 48: p. 215-236.
- [Hemminga (1982)] Hemminga, M. and P. Cullis 1982. ^{31}P NMR Studies of Oriented Phospholipid Multilayers *Journal of Magnetic Resonance* 47:307-323.
- [Hetzer et al. (1998)] Hetzer, M., Heinz S., Grage S. and T.M. Bayerl 1998. Asymmetric molecular friction in supported phospholipid bilayers revealed by NMR measurements of lipid diffusion. *Langmuir*, 1998. 14: p. 982-984.
- [Junglas et al. (2003)] Junglas, M., B. Danner, and T.M. Bayerl 2003. Molecular Order Parameter Profiles and Diffusion Coefficients of Cationic Lipid Bilayers on a Solid Support. *Langmuir*, 2003. 19: p. 1914-1917.
- [Käsbauer (1999/1)] Käsbauer, M. 1999. Physikalische Eigenschaften von biokompatiblen Festkörperoberflächen und deren Wechselwirkung mit Proteinen und DNA. Dissertation Universität Würzburg. 1999.
- [Käsbauer (1999/2)] Käsbauer, M., Junglas, M. and T.M. Bayerl 1999. Effect of Cationic Lipids in the Formation of Asymmetries in Supported Bilayers. *Biophysical Journal*, 1999. 76: p. 2600-2605.
- [Köchy (1993)] Köchy, K., T. Bayerl 1993. Lateral diffusion coefficients of phospholipids in spherical bilayers on a solid support measured by ^2H -nuclear-magnetic resonance relaxation. *Physical Review E* Vol. 47 No. 3: 2109-2116.
- [Lafleur (1989)] Lafleur, M., et al. 1989. Smoothed Orientational Order Profile of Lipid Bilayers by ^2H -NMR. *Biophysical Journal*, 1989. 56: p. 1037-1046.
- [Lehninger (1998)] Lehninger 1998. Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [Maier (2000)] Maier, B. and J.O. Rädler 2000. DNA on fluid membranes: A model polymer in two dimensions. *Macromolecules*, 2000. 33(19): p. 7185-7194.
- [Meiboom (1958)] Meiboom, S. and D. Gill 1958. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments*, 1958. 29(8): p. 688-691.

- [Mitrakos (1996)] Mitrakos, P. and P.M. Macdonald 1996. DNA-induced lateral segregation of cationic amphiphiles in lipid bilayer membranes as detected via ^2H NMR. *Biochemistry*, 1996. 35(51): p. 16714-22.
- [Mitrakos (1997)] Mitrakos, P. and P.M. Macdonald 1997. Domains In Cationic Lipid Plus Polyelectrolyte Bilayer Membranes: Detection and Characterization Via ^2H Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*, 1997. 36 (44): p. 13646-13656.
- [Monk (1997)] Monk, K.W.C. and P.R. Cullis 1997. Structural and Fusogenic Properties Of Cationic Liposomes In the Presence Of Plasmid DNA. *Biophysical Journal*, 1997. 73 (5): p. 2534-2545.
- [Nezil (1991)] Nezil, F., C. Morrison, K. Whittall and M. Bloom 1991. Relaxation Spectra in Model Membranes by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Magnetic Resonance* 93:279-290.
- [Pott (1995)] Pott, T. and E. Dufourc 1995 Action of Melittin on the DPPC-Cholesterol Liquid-Ordered Phase: A Solid State ^2H - and ^{31}P -NMR Study. *Biophysical Journal* Vol. 68: 965-977.
- [Rance (1983)] Rance, M. and A. Byrd 1983. Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: phase-cycled Hahn echo Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 1983. 52: p. 221-240.
- [Rädler (1992)] Rädler, J. and E. Sackmann 1992. On the measurement of weak repulsive and frictional colloidal forces by reflection interference contrast microscopy. *Langmuir*, 1992. 8: p. 848-853.
- [Rädler et al. (1997)] Rädler, J.O., et al. 1997. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 1997. 275: p. 810-814.
- [Rädler (1999)] Rädler, O. and B. Maier 1999. Conformation and Self-Diffusion of Single DNA Molecules Confined to Two Dimensions. *Physical Review Letters*, 1999. 82(9), 1911-1914.
- [Sackmann (1983)] Sackmann, E. 1983 Biophysics Chapter 12. Springer Verlag, Heidelberg.
- [Seelig (1977)] Seelig, J. 1977. Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quart. Rev. Biophys.* 10:353-418.
- [Seelig (1980)] Seelig, J. and A. Seelig 1980. Lipid conformation in model membranes and biological membranes. *Quart.Rev.Biophys.*, 1980. 13: p. 19-61.

- [Schäfer (1998)] Schäfer, H., B. Mädler and E. Sternin 1998. Determination of Oriental Order Parameters from ^2H NMR Spectra of Magnetically Partially Oriented Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 74:1007-1014.
- [Slichter (1989)] Slichter, C.P. 1989. Principles of Magnetic Resonance. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- [Singer (1972)] Singer, S.L. and Nicholson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes *Science* 175:720-722.
- [Sternin et al. (1983)] Sternin, E., M. Bloom and A. L. MacKay. 1983. De-packing of NMR spectra. *J. Magn. Reson.* 55:274-282.
- [Tamm (1985)] Tamm, L.K. and H.M. McConnell 1985. Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, 1985. 47: p. 105-113.
- [Vaz et al. (1985)] Vaz, W.L.C., R.M. Clegg, and D. Hallman 1985. Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phases phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory. *Biochemistry*, 1985. 24: p. 781-786.

Publikationen:

Käsbauer M, **Junglas M**, Bayerl TM

Effect of cationic lipids in the formation of asymmetries in supported bilayers

BIOPHYS J 76 (5): 2600-2605 MAY 1999

Junglas M, Danner B, Bayerl T.M.

Molecular order parameter profiles and diffusion coefficients of cationic lipid bilayers on a solid support

LANGMUIR 19 (5): 1914-1917 MARCH 4 2003

Junglas M, Bayerl T.M.

DNA interaction with supported bilayers of cationic lipids: A Deuterium-solid state NMR study

In preparation for submission

Lebenslauf

Zur Person	Michael Junglas geboren am 14. August 1971 in Erlenbach am Main
Familienstand	ledig
Abschluss	Diplom-Physiker (Univ.)
Schulbildung	
9/77 – 8/81	Grundschule/Hauptschule Elsenfeld
9/81 – 8/82	Hermann-Staudinger Gymnasium Erlenbach am Main
9/82 – 6/91	Steigerwald Landschulheim Wiesentheid
6/91	Abitur
Grundwehrdienst	
10/91 – 9/92	Stabskompanie 12. Panzerdivision Veitshöchheim
Hochschulbildung	
11/92 – 10/98	Studium der Physik an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg
02/99	Diplom-Physiker (Univ.)

Ehrenwörtliche Erklärung

Gemäß § 5 Abs. 2 Ziff. 2, 3 und 5
der Promotionsordnung vom 22. September 2003 der
Fakultät für Physik und Astronomie der
Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation selbständig und ohne Hilfe eines Promotionsberaters angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde bisher weder vollständig noch teilweise einer anderen Hochschule mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Am 8. Februar 1999 wurde mir von der Universität Würzburg der akademische Grad „Diplom-Physiker (Univ.)“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch versucht zu erwerben.

Würzburg den 29.12.2004

Michael Junglas