Technische Universität München Physik-Department Lehrstuhl für Biophysik E22

FLÜSSIGKRISTALLE AUS DNA UND KATIONISCHEN LIPIDMEMBRANEN

STRUKTUR UND PHASENVERHALTEN

Roman Zantl

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation:

1: Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

2: Univ.-Prof. Dr. W. Petry

Die Dissertation wurde am 18.07.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 27.08.2001 angenommen.

Meinen Eltern Sonja und Dr. med. Hermann Zantl

Inhaltsverzeichnis

In	halts	sverzeichnis	iii				
\mathbf{Z}_{1}	usam	nmenfassung	v				
Ei	Einleitung						
1	Exp	perimentelle Methoden	5				
	1.1	Kleinwinkelstreuung	5				
		1.1.1 Grundlagen	5				
		1.1.2 Das reziproke Gitter	7				
		1.1.3 Diffuse Streuung an gestörten Kristallgittern	8				
		1.1.4 Einfluß von thermischen Fluktuationen auf Kristallgitter in ver-					
		schiedenen Dimensionen	11				
		1.1.5 Längenmessung - Beziehung zwischen realem und reziproken					
		Gitter	14				
		1.1.6 Bestimmung der Elektronendichteprofile	14				
	1.2	Debye-Scherrer: radiale Mittelung	16				
		1.2.1 Intensität der Debye–Scherrer-Reflexe	18				
		1.2.2 Einfluß der radialen Mittelung auf das Linienprofil	19				
	1.3	Experimenteller Aufbau: SAXS und WAXS	21				
		1.3.1 Verwendete Aufbauten	23				
	1.4	DSC	27				
2	Kat	tionische Lipide und DNA	31				
	2.1	Präparation von Lipid–DNA–Komplexen	31				
		2.1.1 Lipide und DNA	31				
		2.1.2 Proben–Präparationen	35				
3	The	ermotropes Phasenverhalten von DMPC-DMTAP-Vesikeln und					
	Lip	id-DNA-Komplexen	38				
	3.1	DSC–Messungen	38				
	3.2	Konstruktion der Phasendiagramme	39				
		3.2.1 Phasendiagramm der DMPC–DMTAP–Vesikel	39				
		3.2.2 Phasendiagramm der Lipid-DNA-Komplexe	41				

	3.3	Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie	42				
	3.4	Weitwinkelröntgenstreuung	44				
	3.5	Diskussion	47				
4	Neutronenstreuung: Ermittlung der Schichtdicken mit Hilfe eines						
	Streifen-Modells						
	4.1	Experiment und Ergebnisse	54				
	4.2	Streifenmodell	58				
	4.3	Wahl der Vorzeichen	59				
	4.4	Diskussion	60				
5	Die mesoskopische Struktur von lamellaren Lipid-DNA-Komplexen 65						
	5.1	Thermotrope strukturelle Veränderungen	65				
		5.1.1 Experimentelle Ergebnisse	65				
		5.1.2 Diskussion	71				
	5.2	Betrachtung der Strukturellen Parameter in Abhängigkeit von der Lipid-	-				
	0	Zusammensetzung und des Lipid-DNA- Ladungsverhältnisses	72				
		5.2.1 Lipid–Zusammensetzung	72				
		5.2.2 Ladungsverhältnis	75				
		5.2.3 Diskussion	78				
	5.3	Überstruktur des DNA-Gitters	83				
	0.0	5.3.1 2D–Messungen an orientierten Proben	84				
		5.3.2 Korrelationslängenänderung	91				
		5.3.3 2-Dimensionale Elektronendichteprofile	94				
		5.3.4 Einfluß der Ordnung im DNA-Gitter auf die Peakform	97				
		5.3.5 Diskussion	100				
6		ndensierte Phasen aus kationischen Lipiden und anionischen Po	- 107				
	•	eren	107				
	6.1	Struktur von kationischen Lipid-Komplexen mit Hyaluronsäure und	107				
	6.0	Dextransulfat					
	6.2	Mischungen konkurrierender Polyelektrolyte	109				
	6.3	Thermotropes Verhalten der DS–DNA–Lipid–Komplexe	112				
	6.4	Kinetische Messungen	112				
	6.5	Diskussion	115				
7	Ausblick						
Li	terat	turverzeichnis	120				
Ve	eröffa	entlichungen	131				
• •		~ 	-01				

Zusammenfassung

Kationische Lipide und DNA kondensieren in wässriger Lösung zu mesoskopisch geordneten Lipid–DNA–Komplexen. In dieser Arbeit werden die thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften von lamellaren Kondensaten aus doppelsträngiger DNA und Lipidmischungen aus dem kationischen Lipid Dimyristolyltrimethylamoniumpropan (DMTAP) und Dimyristolylphosphatidylcholin (DMPC) und deren Wechselwirkung mit den anionischen Polymeren Dextransulfat und Hyaluronsäure untersucht.

Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS), Weitwinkelröntgenstreuung (WAXS), Kalorimetrie (DSC) und Gefrierbruchelektronenmikroskopie (EM) wurden eingesetzt, um das Phasenverhalten von Vesikeln aus binären Mischungen des kationischen Lipides DMTAP mit dem neutralen Helferlipid DMPC zu untersuchen und mit dem Phasenverhalten korrespondierender Lipidmischungen komplexiert mit DNA zu vergleichen. Für die reinen und mit DNA komplexierten Lipidmischungen konnten kalorimetrisch jeweils vollständige Phasendiagramme aufgenommen werden, wobei die auftretenden Phasen mittels Röntgenstreuung und Elektronenmikroskopie detailliert in ihrer Struktur charakterisiert wurden.

Im binären Lipidphasendiagramm dominieren die lamellaren Lipid–Phasen L_{α} und $L_{\beta'}$. In der $L_{\beta'}$ –Phase zeigt sich nichtideales Mischverhalten, das bei $\chi_{TAP}=0.5$ zu einer gegenüber den einzelnen Lipidkomponenten erhöhten Hauptumwandlungstemperatur führt. Durch DNA–Interkalation bilden sich stabile Lipid–DNA–Komplexe, was das Phasenverhalten der Lipide maßgeblich beeinflußt: (i) die Phasenübergangstemperatur von L_{α} nach L_{β} erhöht sich und (ii) eine Entmischungslücke tritt bei niedrigen Molbrüchen von DMTAP ($\chi_{TAP} < 0.25$) auf, in der Lipidvesikel und Lipid–DNA–Komplexe verschiedener Lipidzusammensetzungen koexistieren. Die Erhöhung der Hauptumwandlungstemperatur wird mit Hilfe eines thermodynamischen Modells durch elektrostatische Abschirmung der positiv geladenen Lipidköpfe durch DNA erklärt.

Der DNA-Abstand wurde in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidmembran und des Ladungsverhältnisses von kationischen Lipidgruppen zu DNA-Phosphatgruppen untersucht. Dazu wurden Lipid-DNA-Komplexe mit zwei verschiedenen neutralen Helferlipiden DMPC und DMPE (Dimyristoylphosphatidylethanolamin) verwendet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Während der DNA-Abstand in DMPC / DMTAP-Komplexen einen theoretisch vorhergesagten Sprung am isoelektrischen Punkt macht, bleibt er im DMPE / DMTAP - DNA System konstant. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern die unterschiedlichen Protonierungs-

bzw. Deprotonierungseigenschaften von DMPC und DMPE.

Kontrastvariation wurde in Kombination mit Kleinwinkelneutronenstreuung eingesetzt, um die absoluten Schichtdicken von Wasser (zwischen DNA und Lipidköpfen), Lipidköpfen selbst, und den CH₂ und CH₃ Bereichen der Lipidketten auf etwa 1 bis 2 Å genau zu bestimmen. Dies wurde durch Austausch der protonierten gegen deuterierte Lipidketten einerseits und D₂O gegen H₂O andererseits erreicht. Die hohe räumliche Auflösung resultiert aus der simultanen Auswertung der großen Anzahl von Datensätzen.

Im Rahmen der Röntgenstreuexperimente wurde eine neue Phase entdeckt, in der die DNA-Moleküle in einem zweidimensionalen rhombisch zentrierten Gitter angeordnet sind. Diese Entdeckung führte zur theoretischen Vorhersage der "gleitend kolumnaren" Phase [23, 58, 24]. Es gelang erstmals, Messungen an orientierten Proben von Lipid-DNA-Komplexen in der $L^{\mathcal{C}}_{\beta}$ - und $L^{\mathcal{C}}_{\alpha}$ -Phase durchzuführen, mit denen die Korrelationslängen in Richtung senkrecht (L^C_{β} :1100 Å, L^C_{α} :44 Å) und parallel $(L_{\beta}^{C}:1750 \text{ Å}, L_{\alpha}^{C}:419 \text{ Å})$ zu den Membranen unabhängig voneinander bestimmt werden konnten. Ein systematischer Anstieg der Korrelationslänge im DNA-Gitter mit dem DNA-Abstand konnte gemessen werden. Demnach hängen die Korrelationslängen vom DNA-Abstand in den Komplexen ab. Die rhombisch zentrierte Korrelation ist in der Gelphase wesentlich stärker ausgeprägt als in der fluiden Phase der Ketten. Zweidimensionale Elektronendichterekonstruktionen mit einer kanonischen Auflösung von etwa 8 Å zeigen, daß die Membranen in der kolumnaren Phase um die DNA-Moleküle herum gekrümmt sind. Diese beiden Beobachtungen, führen zu der Interpretation, daß die DNA-Ordnung durch korrelierte mikromechanische Deformationen der Membranen hervorgerufen wird.

Um die Wechselwirkung von weiteren anionischen Polymeren mit kationischen Lipiden und Lipid–DNA–Komplexen zu untersuchen wurden Dextransulfat (DS) und Hyalorunsäure (HS) als biologisch relevante Polyelektrolyte verwendet. Mit kationischen Lipidmembranen bilden beide Polymere ähnlich wie DNA multilamellare Komplexe, wobei in SAXS Messungen kein Hinweis auf parallele Anordnung der Polymere gefunden wurde. Vierkomponentige Mischungen aus Dextransulfat, DNA und kationischen Lipiden führen zur Ausprägung von heterogenen Lipid–DNA–DS–Komplexen. Mischt man Dextransulfat zu vorher präparierten Lipid–DNA–Komplexen, wird die interkalierte DNA durch das stärker geladene DS substituiert. Die Front der DS–reichen Phase dringt dabei mit ca. $4\mu m/min$ vor.

Einleitung

Wechselwirkungen zwischen Polyelektrolyten und entgegengesetzt geladenen Amphiphilen riefen in den letzten zwei Jahrzehnten wachsendes Interesse im Bereich der Polymer- und Biophysik hervor und fanden biologische und industrielle Anwendungen ([101] und enthaltene Referenzen). Diese Wechselwirkungen sind relativ stark und führen zur Ausbildung von Komplexen, die häufig durch Selbstorganisation hoch geordnete Strukturen aufweisen.

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Komponenten einerseits und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Moleküluntereinheiten wie z.B. Lipid-Alkylketten andererseits spielen bei dem Selbstassemblierungprozeß die dominierende Rolle [2, 76]. Unter gewissen Umständen bilden sich selbstorganisierte, hochgeordneten Strukturen auf mesoskopischer Längenskala, also im Bereich von wenigen bis Tausenden von Å. Die Untersuchung der gebildeten Strukturen wiederum läßt Rückschlüsse auf Art und Größe der Wechselwirkungen zu. Eine detaillierte Kenntnis der Wechselwirkungen macht es möglich, gezielt Anwendungen in Medizin, Biologie, Nahrungsmitteltechnologie und Kosmetik, aber auch für industrielle Farben oder verbesserte Ölrückgewinnung zu entwickeln.

Nur wenige Techniken, darunter Kleinwinkelröntgen-, Kleinwinkelneutronenstreuung, Nuklear-Magnet-Resonanz oder Elektronenmikroskopie sind zur Strukturuntersuchung im mesoskopischen Bereich geeignet. Besondere Bedeutung kommt wegen der oft auftretenden Periodizitäten in geordneten Strukturen den Streumethoden zu. Eine weitere Methode Ordnungsphänomene in mesoskopischen Phasen zu untersuchen ist DSC (differential scanning calorimetry). Damit können direkt enthalpische Übergänge quantitativ gemessen werden, die in fast allen Fällen mit Veränderungen des Ordnungsparameters koinzidieren, und damit Phasenübergänge anzeigen. Die Kombination der Untersuchungen aus thermodynamischen und strukturellen Untersuchungen gibt Einblicke in das Phasenverhalten der mesoskopischen Verbundphasen.

Ein typisches Beispiel für selbstassemblierte Strukturen aus Polyelektrolyten und Amphiphilen sind Komplexe aus DNA und kationischen Lipiden. Lipid–DNA–Komplexe fanden zunächst großes Interesse wegen ihrer vielversprechenden Eigenschaften als

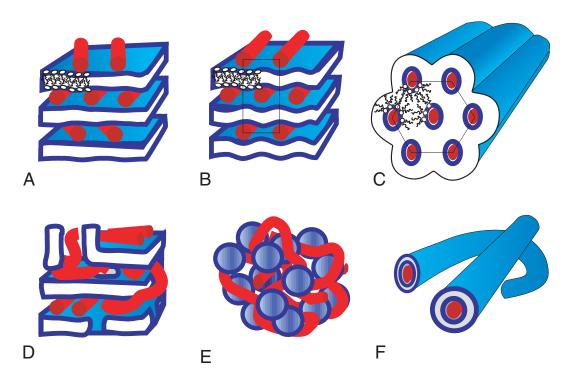


Abb. 1: Polymorphismus von Lipid-DNA-Phasen. Welche Phase ausgebildet wird, hängt maßgeblich von der Zusammensetzung der binären Lipidmischungen, von dem Verhältnis von DNA-Ladungen zu Lipid-Ladungen und nicht zuletzt von der spontanen Krümmung der Lipidmembran ab. (A): lamellar isotrop, (B): lamellar orthorhombisch, (C): invertiert hexagonal, (D): isotrop, (E): mizellar, (F): tubulär.

hocheffiziente, nichtvirale Genvektoren in eukaryotische Zellen [22]. Die Effizienz solcher Genvektoren hängt maßgeblich von physikalischen Parametern Partikel ab, die die Erbsubstanz tragen ([56] und enthaltene Referenzen). Besonders interessant ist dabei, daß man durch Änderung der Mischungsverhältnisse der einzelnen Komponenten, insbesondere der Ladungsträger (DNA und kationische Lipide), maßgeblich die physikalischen Eigenschaften wie Größe und Gesamtladung der Partikel kontrollieren kann [62].

Komplexe aus kationische Lipiden und DNA zeigen einen reichen Polymorphismus an Phasen. In Abb. 1 sind verschiedene mögliche Konformationen von Lipid-DNA-Mischungen zusammengefaßt. In der unteren Reihe ist eine hypothetische isotrope Phase gezeigt, in der jede Form von langreichweitiger Ordnung fehlt (D). Die mizellare Phase (E) wurde von Boukhnikachvili et al. beschrieben [7]. Elektronenmikroskopische Studien weisen klar auf die Existenz von tubulären Strukturen (F) hin [82], deren Stabilität auch theoretisch untersucht wurde [52, 17]. Für die Existenz der invertierten

hexagonalen Phase H_{II}^{C} in Abb. 1 C, ist ein genau definiertes Ladungsverhältnis der DNA-Oberfläche und der sie umgebenden Lipidoberfläche nötig. Die Tatsache, daß diese Phase nur in einem extrem kleinen Bereich des ternären Phasendiagramms stabil ist [43], ist ein typisches Beispiel für die Empfindlichkeit mesoskopischer Systeme gegenüber dem Mischungsverhalten der Einzelkomponenten.

Rädler et al. konnten durch Kleinewinkelstreuexperimente die Struktur der lamellaren Lipid-DNA-Komplexe aufklären [63]. Demnach interkalieren die DNA-Moleküle zwischen die gestapelten Lipiddoppelschichten in Galerien, in denen die DNA-Moleküle parallel angeordnet sind. Die wichtigsten meßbaren Parameter dieses Systems sind der Membranwiederholabstand d_{mem} , der DNA-Wiederholabstand d_{DNA} und der mittlere Abstand der Lipidketten in der Membran d_c . Eine interessante Fragestellung ist, ob bzw. wie d_{mem} , d_{DNA} und d_c über die molekularen Kräfte innerhalb der Komplexe miteinander verknüpft sind.

Aus Sicht der Physik von Flüssigkristallen stellt die Untersuchung der Anordnung der DNA innerhalb der Lipidmembranen eine besondere Herausforderung dar. Dabei wird die DNA als in zwei Dimensionen gefangenes semiflexibles Polymer betrachtet. Die parallele Anordnung der DNA bezeichnet man als 2D–smektische Phase. Salditt et al. konnten numerisch die Peakform des diffusen DNA–Peaks mit dem für die 2D–smektische Phase berechneten Formfaktor angepassen [73, 74]. Eine kleine systematische Abweichung führte dabei zur Annahme, daß zwischen benachbarten DNA–Galerien möglicherweise schwache, räumliche Positionskorrelation der DNA–Moleküle bestehen könnte.

In den genannten Arbeiten wurden bisher ausschließlich fluide Lipid-Membranen verwendet, die eine hohe Flexibilität aufweisen. Welchen Einfluß hat eine erhöhte Steifheit der Membran bzw. höhere Ordnung der Lipidketten in der Membran auf die Struktur von Lipid-DNA-Komplexen? Diese Frage wird experimentell durch Verwendung von gelartigen Membranen untersucht, in denen die gesättigten Lipidketten "eingefroren" sind.

Diese Fragestellung wird in Kap. 5 genau betrachtet. Anders als in früheren Arbeiten werden in der vorliegenden Arbeit Lipid–DNA–Komplexe untersucht, die gesättigte Lipide anstelle von ungesättigten enthalten. Die gesättigten Lipide zeigen bei niedrigen Temperaturen die Gelphase L_{β} und unter Umständen die Rippelphase $P_{\beta'}$. Das Auftreten dieser Phasen in Lipid–DNA–Komplexen machte es möglich, tatsächlich eine geordnete Überstruktur des DNA–Gitters nachzuweisen.

Aufbau der Arbeit

In Kap. 1 werden die experimentellen Aufbauten und physikalischen Konzepte zur Auswertung der Daten vorgestellt. In Kap. 2 wird das experimentelle System und dessen Einzelkomponenten sowie Präparationen erklärt.

In Kap. 3 wird das thermotrope und lyotrope Phasenverhalten von Lipidvesikeln und von Lipid–DNA–Komplexen mit gleichen Mischungsverhältnissen der Lipide untersucht und miteinander verglichen. Dabei steht das Phasenverhalten der Lipidmembranen in den Komplexen im Vordergrund.

Die Kap. 4 und 5 beschäftigen sich mit der Struktur der Lipid-DNA-Komplexe. Dabei werden die in den vorher konstruierten Phasendiagrammen auftretenden Phasen genau strukturell charakterisiert. Es wird darüberhinaus gezeigt, daß die zwischen den Membranen interkalierte DNA ein zweidimensionales Übergitter ausbildet, das interessante Ordnungsphänomene aufweist.

Die gewonnen Ergebnisse werden in Kap. 6 angewendet, um die Wechselwirkung von Lipid-DNA-Komplexen mit den anionischen Polymeren Hyaluronsäure und Dextransulfat zu untersuchen.

Am Ende werden Vorschläge für weiterführende Experimente zu offenen Fragestellungen diskutiert.

1. Experimentelle Methoden

1.1 Kleinwinkelstreuung

1.1.1 Grundlagen

Biologische Materie besteht größtenteils aus organischen Verbindungen und Wasser. Lipide und DNA bestehen ausschließlich aus den Elementen Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Stickstoff (N), Kohlenstoff (C) und Phosphor (P). Für Röntgenstreuuntersuchungen bedeutet das, daß einfallende Wellen nur schwach gestreut werden und damit die Bornsche Näherung anwendbar ist. Das gleiche gilt für Neutronen, die im allgemeinen schwächer mit Materie wechselwirken als elektromagnetische Strahlung. In der ersten Bornschen Näherung geht man davon aus, daß die Intensität der einfallenden Welle im gesamten Probenvolumen konstant ist, d.h. daß ein vernachlässigbarer Teil der Intensität durch Absorption und Streuvorgänge innerhalb der Probe verloren geht. In schwach streuenden Materialien werden einmal gestreute Wellen nur mit extrem niederiger Wahrscheinlichkeit ein zweites mal gestreut. Mehrfachstreuung kann also vernachlässigt werden. Dies und die i.a. hohe Mosaizität in Kristallen aus biologischer Materie sind verantwortlich, daß die im Vergleich zur dynamischen Streutheorie wesentlich einfachere kinematische Streutheorie angewendet werden kann. Letztere benötigt man im Falle von nahezu perfekten Kristallen etwa aus Germanium und Silizium.

In der kinematischen Theorie wird elastische Streuung einer einfallenden ebenen Welle an Materie in Verbindung mit der ersten Bornschen Näherung dadurch beschrieben, daß jedes Streuzentrum in der Materie angeregt durch die einfallende Welle eine Kugelwelle gleicher Wellenlänge erzeugt. Konstruktive Interferenz entsteht dabei in Richtungen in denen der Weglängenunterschied der Kugelwellen zweier Streuzentren genau einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge entspricht (Abb. 1.1). Bei Beugungsexperimenten mißt man die durch die Superposition dieser Kugelwellen entstehenden Interferenzmuster der Intensität. Bei den Streuzentren handelt es sich um einzelne Atome, Moleküle bzw. Anordnungen von diesen. Mathematisch läßt sich dieser Sachverhalt ausdrücken durch die Summe von Kugelwellen $e^{-i\vec{q}\vec{x}}$ gewichtet mit

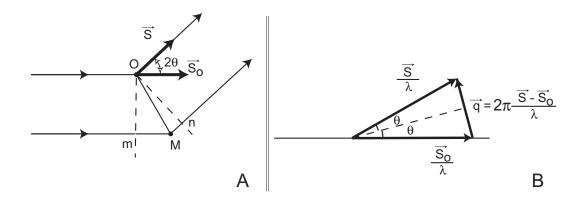


Abb. 1.1: (A) Von links fällt eine planare, kohärente Wellenfront entlang dem Einheitsvektor \vec{S}_0 auf die Streuzentren O und M. Im Falle elastischer Streuung werden von den Streuzentren Kugelwellen ausgesandt, die positiv miteinander interferieren, wenn der von der Richtung \vec{S} abhängige Weglängenunterschied $\overline{mM} + \overline{Mn}$ einem ganzzahligem Vielfachen der Wellenlänge λ ist. (B) Die Interferenz hängt nur vom Impulsübertrag q, der durch die Impulsdifferenz zwischen einfallenden und gestreuten Wellen definiert ist.

dem Streufaktor f_n des n-ten Streuzentrums am Ort \vec{x}_n . \vec{q} ist der Impuls der Welle mit $|\vec{q}| = \frac{2\pi}{\lambda}$ und zeigt in Richtung der Ausbreitungsrichtung:

$$A(\vec{q}) = \sum_{n=1}^{N} f_n e^{-i\vec{q}\vec{x}_n}$$
 (1.1)

In realen Experimenten ist die Anzahl von Streuzentren N derart groß, daß die diskrete Darstellung durch ein Integral ersetzt werden kann:

$$A(\vec{q}) = \int_{V} \rho(\vec{x}) e^{-i\vec{q}\vec{x}} dv_{x}$$
 (1.2)

 $\rho(\vec{x})$ läßt sich auffassen als die Summe einzelner Streuzentren mit jeweiligen Mittelpunkt \vec{x}_n , $\rho(\vec{x}) = \sum_{n=1}^{N} \rho_n(\vec{x} - \vec{x}_n)$. Damit läßt sich die Amplitude schreiben als:

$$A(\vec{q}) = \int \sum_{n=1}^{N} \rho_n(\vec{x} - \vec{x}_n) e^{-i\vec{q}\vec{x}} dv_x$$

$$= \sum_{n=1}^{N} e^{-i\vec{q}\vec{x}_n} \left[\int \rho_n(\vec{x} - \vec{x}_n) e^{-i\vec{q}(\vec{x} - \vec{x}_n)} dv_x \right]$$
(1.3)

Das Integral in den eckigen Klammern entspricht genau dem Streufaktor f_n von Gl. 1.1.

Röntgenstrahlen werden als elektromagnetische Strahlung vor allem am elektrischen Potential der Elektronenwolken um die Atomkerne gestreut, d.h. $\rho(\vec{x})$ repräsentiert die Elektronendichte der Probe am Ort \vec{x} . In erster Näherung ist $\rho(\vec{x})$ proportional zur Kernladungszahl.

Neutronen dagegen werden an Atomkernen gestreut. In diesem Fall wird ρ als kohärente Streulängendichte bezeichnet und durch seine J Atome mit Streulänge b_j beschrieben (V Molekülvolumen):

$$\rho(\vec{x}) = \frac{1}{V} \sum_{j=1}^{J} b_j \delta(\vec{x} - \vec{x}_j)$$
 (1.4)

Die Streulängen können für verschiedene Isotope sehr stark variieren. Am stärksten ist die Variation im Fall von Wasserstoff und Deuterium. Durch Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium kann man also Streulängendichten bestimmter Bereiche der Proben gezielt verändern, was als Kontrastvariation bezeichnet wird. Streulängendichten verschiedener biologischer Materialien finden sich z.B. in [37].

1.1.2 Das reziproke Gitter

Zu den wichtigsten Anwendungen der Streuexperimente zählt die Untersuchung von periodischen Anordnungen von Atomen und Molekülen in Gittern. Von grundlegender Bedeutung ist, daß die Fouriertransformierte eines periodischen Gitters wiederum ein periodisches Gitter ist, das reziproke Gitter.

Das reale Gitter $\rho_c(\vec{x})$ läßt sich auffassen als eine Faltung der Elektronendichte der Einheitszelle $\rho(\vec{x})$ mit Dirac-Funktionen an den Stellen $\vec{x_n} \equiv \vec{x}_{pqr}$ mit $\vec{x}_{pqr} = p \cdot \vec{a} + q \cdot \vec{b} + r \cdot \vec{c} \ (p, q, r \in \mathbb{N})$. Die Vektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} spannen des reale Gitter als Translationsvektoren auf:

$$\rho_c(\vec{x}) = \rho(\vec{x}) \otimes [z(\vec{x}) \cdot \sigma(\vec{x})] \tag{1.5}$$

 $z(\vec{x})$ beschreibt die Positionen der Einheitszellen, $\sigma(x)$ berücksichtigt die endliche Größe des Kristalls(V Volumen des Kristalls):

$$z(\vec{x}) = \sum_{p} \sum_{q} \sum_{r} \delta(\vec{x} - \vec{x}_{pqr}) \quad \text{und} \quad \sigma(\vec{x}) = \begin{cases} 1 & : \quad \vec{x} \in V \\ 0 & : \quad sonst \end{cases}$$

Für die Interpretation von Streudaten benötigt man die Fouriertransformierte von

Gl. 1.5:

$$A(\vec{q}) = \int_{\mathbb{R}^3} \rho_c(\vec{x}) e^{-i\vec{q}\vec{x}} dv_x$$

$$= \underbrace{\int_{V} \rho(\vec{x}) e^{-i\vec{q}\vec{x}} dv_x}_{F(\vec{q})} \cdot \underbrace{\int_{V} z(\vec{x}) e^{-i\vec{q}\vec{x}} dv_x}_{S(\vec{q})}$$

$$(1.6)$$

 $F(\vec{q})$ wird im allgemeinen als Formfaktor, $S(\vec{q})$ als Strukturfaktor bezeichnet. Die Amplitude ist gleich dem Formfaktor der Einheitszelle multipliziert mit dem Strukturfaktor des Gitters ¹.

Der Strukturfaktor entspricht der Fouriertransformierten des realen Gitters und wird verwendet, die Symmetrie des Gitters zu bestimmen. Die Bragg-Peaks des Strukturfaktors sind die Gitterpunkte $\vec{q}_{hkl} = h\vec{a^*} + k\vec{b^*} + l\vec{c^*}$ des reziproken Gitters, wobei die Vektoren $\vec{a^*}$, $\vec{b^*}$ und $\vec{c^*}$ das reziproke Gitter aufspannen.

Der Formfaktor entspricht der Fouriertransformierten der Einheitszelle. Aus ihm läßt sich durch Rücktransformation die Elektronenverteilung innerhalb der Einheitszelle bestimmen (Kap. 1.1.6).

Die durch Streumessungen zugängliche Größe ist das Quadrat des Absolutbetrages der Amplitude, nämlich die Intensität.

$$I(\vec{q}) = |A(\vec{q})|^2 = |F(\vec{q})|^2 \cdot |S(\vec{q})|^2$$
(1.7)

Bei der Messung der Intensität geht die Phaseninformation verloren. Die Bestimmung der Elektronendichte der Einheitszelle durch inverse Fouriertransformation der Streuamplitude ist also unmöglich. Man muß auf indirekte Methoden der Phasenbestimmung zurückzugreifen, um die Elektronendichte bestimmen zu können. Die beiden im Falle von Flüssigkristallen wichtigsten Methoden werden in Abschnitt 1.1.6 geklärt.

1.1.3 Diffuse Streuung an gestörten Kristallgittern

Messung von Fluktuationen mittels Röntgenstreuung

Der Strukturfaktor eines perfekt periodischen Gitters besteht aus einer Summe von Dirac-Distributionen. Streumessungen an idealen Gittern sind folglich durch eine

¹An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Nomenklaturen und Definitionen von Strukturund Formfaktor in der Literatur stark voneinander abweichen. In dieser Arbeit wird die Nomenklatur von Ref. [26] verwendet.

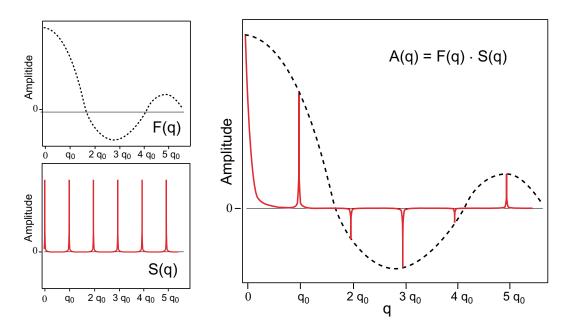


Abb. 1.2: Zur Interpretation von Form- und Strukturfaktor: Links oben ist der Formfaktor, links unten der Strukturfaktor schematisch dargestellt. Rechts die daraus resultierende Amplitude. Man beachte, daß durch die Ausprägung des reziproken Gitters die Amplitude bzw. das Amplitudenquadrat nur an den Peakpositionen meßbar ist. Dort ist sie proportional zur Anzahl der geordneten Streuzentren, was eine Messung bei hohen q-Werten ermöglicht.

Peakform charakterisiert, die durch Faltung der Gerätefunktion mit einer Diracdistribution entsteht. Die Gerätefunktion wird durch Strahlprofil und -divergenz und die Detektorauflösung bestimmt und kann durch Abbildung des abgeschwächten, direkten Strahles gemessen werden.

In natura wird jedes Gitter durch thermische Anregung dadurch gestört, daß Phononen mit einer mittleren Energie von k_BT erzeugt werden. Die Atome bzw. Einheitszellen befinden sich also nicht in Ruhe, sondern folgen kollektiven Schwingungsanregungen. Dies läßt sich dadurch ausdrücken, daß die Positionen der n-ten Einheitszelle in Gl. 1.5 durch eine Störung $\vec{u_n}(\vec{x})$ gegenüber dem idealen Gitter verschoben sind. Die Elektronendichte im realen Kristall läßt sich schreiben als:

$$\rho(\vec{x}) = \sum_{n} \rho(\vec{R} + \vec{r}_n + \vec{u}_n) = \sum_{n} \rho_n(\vec{R})$$
 (1.8)

Dabei zeigt der Vektor \vec{r}_n auf das Zentrum der n-ten Einheitszelle, und \vec{R} ist die

Position relativ zum Zentrum der Einheitszelle. Die gemessen Intensität ist dann:

$$I(\vec{q}) = \int \rho(\vec{x})\rho^*(\vec{x})e^{-i\vec{q}(\vec{x}-\vec{x}')}d^3xd^3x'$$

$$= \sum_{n,n'} \left(\int \rho_n(\vec{R})\rho_{n'}^*(\vec{R}')e^{-i\vec{q}(\vec{R}-\vec{R}')}d^3R \ d^3R' \right) e^{-i\vec{q}(\vec{u}_n-\vec{u}_{n'})}e^{-i\vec{q}(\vec{r}_n-\vec{r}_{n'})}$$

$$= \sum_{n,n'} f_n f_{n'}^* e^{-i\vec{q}(\vec{u}_n-\vec{u}_{n'})}e^{-i\vec{q}(\vec{r}_n-\vec{r}_{n'})}$$
(1.9)

Für den Fall, daß die Störung des Gitters ausschließlich durch räumliche Verzerrung und nicht durch Substitution der Streuzentren verursacht wird, sind die Streufaktoren f_n real. Führt man die Variable $\vec{x}_m = \vec{x}_{n'} - \vec{x}_n$ ein, läßt sich Gl. 1.9 folgendermaßen umschreiben:

$$I(\vec{q}) = \sum_{m} \left(\sum_{n} f_n f_{n+m}\right) e^{-i\vec{q}\vec{u}_m} e^{i\vec{q}\vec{x}_m}$$
(1.10)

Die charakteristischen Zeiten der Gitterschwingungen sind gegenüber der typischen Meßdauer kurz und die Anzahl der Einheitszellen groß, was dazu führt, daß das Mittel der Störungen beobachtet wird. Von Interesse ist also nur das Mittel über eine genügend große Anzahl von Streuzentren P. Man erhält als räumliche Korrelationfunktion:

$$g(\vec{x}) := \langle e^{-i\vec{q}(\vec{u}(\vec{x}) - \vec{u}(0))} \rangle = \frac{1}{P} \sum_{p=1}^{P} f^2 e^{-i\vec{q}_m \vec{u}_m}$$
(1.11)

Dabei zeige $\vec{u}(0)$ per definitionem die Auslenkung der Einheitszelle am beliebig gewählten Ursprung. Man beachte, daß \vec{q}_m impliziert, daß die Reflexe im q–Raum an der gleichen Stelle auftreten wie im ungestörten Kristall. Für kleine Störungen kann man den Fluktuationsterm entwickeln: $\langle e^{-i\vec{q}(\vec{u}(\vec{x})-\vec{u}(0))}\rangle \approx \langle 1-i\vec{q}(\vec{u}(\vec{x})-\vec{u}(0))-\frac{1}{2}|\vec{q}|^2|\vec{u}(\vec{x})-\vec{u}(0)|^2\rangle$. Der lineare Term ist im Mittel Null. Außerdem gilt $e^{-\frac{1}{2}|\vec{q}|^2\langle|\vec{u}(\vec{x})-\vec{u}(0)|^2\rangle}\approx \langle 1-\frac{1}{2}|\vec{q}|^2|\vec{u}(\vec{x})-\vec{u}(0)|^2\rangle$. Bei der harmonischen Näherung geht man davon aus, daß $\vec{u}(\vec{x})$ gaußverteilt ist. Damit ergibt sich die räumliche Korrelations–Funktion $g(\vec{x})$ zu:

$$g(\vec{x}) := \langle e^{-i\vec{q}(\vec{u}(\vec{x}) - \vec{u}(0))} \rangle \approx e^{-\frac{1}{2}|\vec{q}_0|^2 \langle |\vec{u}(\vec{x}) - \vec{u}(0)|^2 \rangle}$$
(1.12)

Sie ist ein Maß für die relativen, örtlichen Fluktuationen von Einheitszellenpaaren gegeneinander.

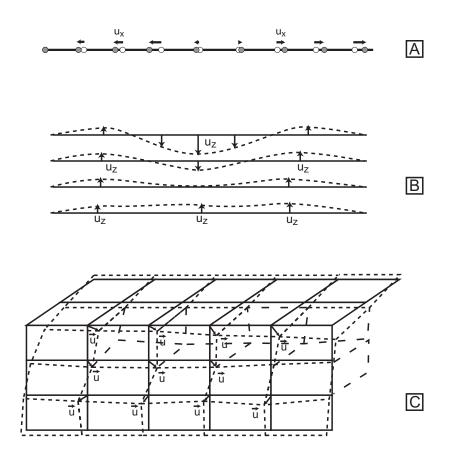


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Verzerrungsfeldes einer eindimensionalen Kette mit elastischen Verbindungen (A), eines smektischen Flüssigkristalls (B), und eines 3D-Kristalls (C). In die freie Energie geht nur die relative Verschiebung ein, so daß nur die Ableitungen des Verzerrungsfeldes relevant sind. Beim smektischen Flüssigkristall kommt zur Kompression zusätzlich die Krümmung der Lamellen hinzu.

1.1.4 Einfluß von thermischen Fluktuationen auf Kristallgitter in verschiedenen Dimensionen

Dreidimensionale Kristalle haben die faszinierende Eigenschaft, daß die Kristallgitter thermisch zu Schwingungen angeregt im zeitlichen Mittel nicht die örtliche Korrelation der Gitterplätze verlieren. Dies hat zur Folge, daß die räumliche Periodizität im zeitlichen Mittel perfekt ist,was als langreichweitige Ordnung (LRO) bezeichnet wird.

Die Reichweite der Ordnung hängt u.a. von der Dimension des Systems ab. Zur Veranschaulichung werden im folgenden thermische Fluktuationen einer eindimensionalen Perlenkette, eines smektischen Kristalls und eines dreidimensionalen Kristalls aufgeführt. Eine detailliertere Betrachtung und systematische Herleitung findet sich z.B. in [18, 15]. \vec{u} stehe für die Störung aus der Gleichgewichtslage. Für die Perlenkette

und den smektischen Kristall ist \vec{u} eindimensional, für den 3D–Kristall dreidimensional (Abb. 1.3).

Die freie Energie der Perlenkette ist F_{kette} , des smektischen Kristalls F_{sm} und des 3D–Kristalls F_{kr} . Dann gilt:

$$F_{kette} = \frac{C}{2} \int \left(\frac{du}{dx}\right)^2 \tag{1.13}$$

$$F_{sm} = \frac{C}{2} \int d^3x [(\nabla_z \vec{u})^2 + \lambda^2 (\nabla_\perp^2 \vec{u})^2]$$
 (1.14)

$$F_{kr} = \frac{C}{2} \int d^3x (\nabla \vec{u})^2 \tag{1.15}$$

Dabei ist C jeweils eine materialabhängige elastische Konstante. Im Falle der Kette und des 3D–Kristalls handelt es sich um das Hooksche Gesetz und C entspricht der Federkonstanten. Die freie Energie des smektischen Kristalls setzt sich zusammen aus der Auslenkung senkrecht zu den Lamellen $B\nabla_z^2u$ und der Krümmung der Lamellen, die durch den $K(\nabla_\perp^2u)^2$ –Term berücksichtigt wird. B ist der Kompressionsmodul, K die Biegesteifigkeit. In der obigen Notation gilt C=B und $\lambda^2=K/B$, wobei λ einer charakteristischen Eindringtiefe von externen Deformationen entspricht.

Unter Anwendung des Differentiationsatzes der Fouriertransformation kann man die freie Energie im Fourierraum berechnen:

$$F_{kette} = \frac{C}{2} \int \frac{dq}{2\pi} q^2 |u(q)|^2$$
 (1.16)

$$F_{sm} = \frac{C}{2} \int \frac{d^3q}{(2\pi)^3} (q_z^2 + \lambda^2 q_\perp^4) |u(q)|^2$$
 (1.17)

$$F_{kr} = \frac{C}{2} \int \frac{d^3q}{(2\pi)^3} q^2 |u(q)|^2 \tag{1.18}$$

Darauf wendet man den Gleichverteilungssatz an und erhält für die Fluktuationen im Fourierraum:

$$\langle |u(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{Cq^2}$$
 Kette (1.19)

$$\langle |u(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{Cq_z^2 + \lambda^2 q_\perp^4}$$
 smektisch (1.20)

$$\langle |u(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{Cq^2}$$
 3D-Kristall (1.21)

Um zu den Fluktuationen im realen Raum zurückzukehren, muß integriert werden, wobei als untere und obere Integrationsgrenzen die inverse Ausdehnung des Volumens

 L^{-1} und die charakteristische inverse Länge q_c dienen, bei der die elastische Theorie an Gültigkeit verliert. Also gilt:

$$\langle |u^2(r)| \rangle = \frac{k_B T}{2\pi C} \int_{L^{-1}}^{q_c} \frac{dq}{q^2} = \frac{k_B T}{2\pi C} (L - \frac{1}{q_c})$$
 Kette (1.22)

$$\langle |u^2(r)| \rangle = \frac{k_B T}{(2\pi)^3 C} \int_{L^{-1}}^{q_c} \frac{d^3 q}{q_z^2 + \lambda^2 q_\perp^4} \approx \frac{k_B T}{4\pi \lambda C} ln(q_c L) \text{ smektisch}$$
 (1.23)

$$\langle |u^2(r)| \rangle = \frac{k_B T}{(2\pi)^3 C} \int_{L^{-1}}^{q_c} \frac{d^3 q}{q^2} \approx \frac{k_B T}{2\pi^2 C} q_c$$
 3D-Kristall (1.24)

Im Falle des 3D–Kristalls ist die relative Fluktuation also nicht von der Größe des Kristalls abhängig. Also besteht langreichweitige Ordnung (LRO). Im Fall der eindimensionalen Perlenkette wachsen Fluktuationen proportional mit der Länge L der Kette und die Fluktuationen im smektischen Kristall wachsen logarithmisch mit L. Dieses Verhalten ähnelt stark dem von Flüssigkeiten. In niederdimensionalen Systemen reicht die eingeschränkte Informationsübertragung nicht aus, um über thermische Fluktuationen zu dominieren. Durch die schwache logarithmische Abhängigkeit läßt sich die Divergenz der Fluktuationen nur mit ausgezeichneter Auflösung in Streuexperimenten nachweisen. Man spricht in diesem Fall von quasilangreichweitiger Ordnung (QLRO).

Um den Einfluß der Fluktuationen auf die Peakform zu untersuchen, wird der Strukturfaktor unter Verwendung der Gleichungen 1.22 und 1.12 und $\langle |u^2(r)| \rangle$ berechnet. Im Falle der der linearen Kette ergibt die Fouriertransformierte der Korrelationsfunktion wegen der linearen Abhängigkeit vom Abstand:

$$I_{kette}(q) \propto \int e^{-iqx} e^{-\gamma|x|} dx = \frac{2\gamma}{\gamma^2 + q^2}$$
 (1.25)

Die Röntgenpeaks haben demnach die Form einer Lorentzfunktion, wobei die Breite quadratisch mit q wächst. In $\gamma = \frac{k_B T}{2\pi C}$ sind die materialspezifischen Konstantem enthalten.

Im 3D-Kristall ist die Fluktuation unabhängig vom Abstand. Die Fouriertransformierte einer Konstante ist eine Deltadistribution.

$$I_{kr} \propto \int e^{-\frac{1}{2}\vec{q}_{hkl}^2\beta} e^{-i\vec{q}\vec{x}} d^3q = e^{-\frac{1}{2}\vec{q}_{hkl}^2\beta} \cdot \delta(\vec{q}_{hkl})$$
 (1.26)

mit $\beta = \frac{k_B T q_c}{2\pi^2 C}$. Das ist der bekannte Debye–Waller–Faktor, der zu einer Verringerung der Peakintensität führt, indem diese in den Untergrund der Peaks gestreut wird. Dabei handelt es sich um echte Braggpeaks, wie an der Deltadistribution zu sehen ist.

Im smektischen Flüssigkristall ist das Peakprofil abhängig von der Richtung. Die beiden Vorzugsrichtungen sind senkrecht $(q_{\perp}=q_x^2+q_y^2=0)$ und parallel $(q_z^2=0)$ zu den Schichten. Nach Caillé gilt:

$$I_{sm} \propto \begin{cases} \frac{1}{(q_z - \frac{2\pi}{d})^{2-\eta}} & \text{für } q_{\perp} = 0\\ \frac{1}{q_{\perp}^{2-2\eta}} & \text{für } q_z = 0 \end{cases}$$
 (1.27)

Die logarithmische Abhängigkeit in smektischen Flüssigkristallen wurde unabhängig von Landau und Peirls vorhergesagt [45, 60]. Die Auswirkung dieses Verhaltens wurde von Caille [12] berechnet und in fundamentalen Experimenten von Als-Nielsen et al. [1] bestätigt.

1.1.5 Längenmessung - Beziehung zwischen realem und reziproken Gitter

Mit Hilfe des reziproken Gitters kann man die charakteristischen Abstände des realen Gitters bestimmen. Dabei nützt man aus, daß die reziproken Gittervektoren $\vec{q}_{hkl} = h\vec{a^*} + k\vec{b^*} + l\vec{c^*}$ senkrecht auf den zugehörigen (h,k,l)–Ebenen des realen Gitters stehen (siehe z.B. [26]). Deswegen gilt die Beziehung

$$d_{hkl} = \frac{2\pi}{|\vec{q}_{hkl}|} = \frac{2\pi}{\sqrt{(h\vec{a}^*)^2 + (k\vec{b}^*)^2 + (l\vec{c}^*)^2}}$$
(1.28)

Ein anschauliches Beispiel liefert das Bragg–Gesetz (Fig.1.4). Die dicken waagrechten Linien kennzeichnen reale Gitterebenen. Eine Welle der Wellenlänge λ fällt im Winkel ϑ zur Ebene auf die Ebenen. Positive Interferenz, d.h. ein Bragg-Peak entsteht genau dann, wenn der Weglängenunterschied von Strahlen, die an benachbarten Ebenen reflektiert werden, genau ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge beträgt. Dieser Sachverhalt ist als Bragg–Gesetz bekannt.

$$n\lambda = 2d\sin\vartheta$$
 Bragg-Gesetz (1.29)

1.1.6 Bestimmung der Elektronendichteprofile

Wie im letzten Abschnitt gezeigt, verliert man bei der Ermittlung der Intensität der gebeugten Röntgenstrahlung die Phaseninformation. Wäre diese Phaseninformation direkt meßbar, könnte man die Elektronendichteprofile $\rho(x)$ direkt aus der inversen

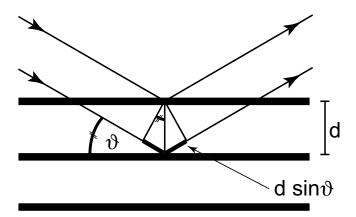


Abb. 1.4: Zum Bragg–Gesetz: Monochromatische, kohärente und parallele Wellen, die auf äquidistante Ebenen fallen, zeigen positve Interferenz, wenn der vom Winkel ϑ und vom Ebenenabstand dabhängige Weglängenunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ beträgt (siehe Gl. 1.29).

Fouriertransformation von Gl. 1.2 ermitteln:

$$\rho(\vec{x}) = \int_{V} A(\vec{q}) e^{-i\vec{q}\vec{x}} dv_{q}$$

$$= \int_{V} A(\vec{q}) \cos(\vec{q}\vec{x}) dv_{q} + i \int_{V} A(\vec{q}) \sin(\vec{q}\vec{x}) dv_{q}$$
(1.30)

Offensichtlich läßt sich die Elektronendichte von spiegelsymmetrischen Kristallen durch die ebenfalls spiegelsymmetrische Kosinus-Transformierte ausdrücken. Ist die Anzahl der periodisch angeordneten Streuzentren groß genug, kann man zur Summenschreibweise übergehen [95]:

$$\rho(\vec{x}) = \sum_{hkl} \sigma_{hkl} |A_{\vec{q}_{hkl}}| |\cos \vec{q}_{hkl} \vec{x}| \qquad (1.31)$$

Die wichtigste Konsequenz daraus ist, daß die Phase entweder 0 oder π ist. σ kann nur die Werte -1 oder 1 annehmen, was sich durch die nach oben und unten deutenden Peaks in Fig. 1.2 ausdrückt. Das Elektronendichteprofil wird mit einer Basis von Kosinus–Funktionen rekonstruiert, denen man als Phase entweder das Vorzeichen -1 oder 1 zuordnen muß, wie in Fig. 1.5 A für den eindimensionalen Fall gezeigt ist.

Die Ausdehnung der Einheitszelle entspricht genau der Wellenlänge der ersten Kosinusfunktion, zwei Wellenlängen des zweiten Terms, drei Wellenlängen des dritten Terms usw. Die Amplituden $|A_{\vec{q}_{hkl}}|$ sind die Formfaktoren an den reziproken Gitterpunkten, die wie im folgenden beschrieben ermittelt werden. Die an einem reziproken

Gitterpunkt gemessene Intensität pro Einheitsvolumen einer hkl-Ebene schreibt sich quantitativ folgendermaßen:

$$I = I_0 r_e^2 \frac{1 + \cos^2 2\vartheta}{2} \frac{\lambda^3}{\sin 2\vartheta} \frac{A_{hkl}^2}{V_c^2}$$

$$\tag{1.32}$$

 I_0 ist die Intensität des Primärstrahles, $r_e^2 = 7.9 \cdot 10^{-26} cm^2$ der quadrierte klassische Elektronenradius und V_c das Volumen der Einheitszelle. $\frac{1+cos^2 2\vartheta}{2}$ ist der sogenannte Polarisationsfaktor für einen unpolarisierten Primärstrahl. Die waagrechte Komponente des Ē-Feldes von Synchrotronstrahlung ist um den Faktor 7 intensiver als die senkrechte. Die lineare Polarisation wird durch die Röntgenoptik (Monochromator etc.) stark verändert. Bei kleinen Winkeln ist der Einfluß des Polarisationsfaktors geringer und spielt im Falle von Kleinwinkelstreuung keine bedeutende Rolle. Im Einzelfall ist die Polarisation des jeweiligen Primärstrahls zu überprüfen. $\frac{\lambda^3}{sin2\vartheta}$ wird als Lorentzfaktor bezeichnet und berücksichtigt die geometrische Lage des reziproken Gitterpunktes relativ zur Ewaldkugel bei der Integration der Intensität [93].

In Fig. 1.5 B oben ist ein rekonstruiertes Elektronendichteprofil einer lamellaren Phase von Membranen, in Abb. 1.5 B oben unten das zur Simulation verwendete Streifenmodell dargestellt. Es dient dazu, die beobachtete Struktur der Probe durch Streifen konstanter Elektronendichte bzw. Streulängendichte zu modellieren. Die Wahl der Streifen muß dem jeweiligen Problem angepaßt werden. Streifenmodelle für Lipidmembranen setzen sich meist aus getrennten Bereichen für die hydrophoben CH₃- und CH₂-Gruppen der Lipidketten, der stark streuenden Lipidköpfe und der Wasserschicht, die die Lipidmembranen voneinander trennt, zusammen.

Wie man durch Vergleich sehen kann, hängt die Genauigkeit stark vom zu beobachtenden Profil ab. Sinoidale Profile werden mit der ersten Ordnung perfekt dargestellt, scharfkantige Profile hingegen benötigen sehr hohe Ordnungen für eine korrekte Darstellung. Unter der kanonischen Auflösung versteht man in der Kristallographie den Quotient d/h_{max} aus d, dem gemessenen Abstand der Struktur, und h_{max} , der höchsten zu beobachtende Ordnung des Reflexes [92].

1.2 Debye-Scherrer: radiale Mittelung

Bei vielen experimentellen Systemen ist es einfacher, Pulverproben aus einer großen Anzahl kleiner Kristalle herzustellen als einen großen Einkristall. Die Streugeometrie, bei der an einem Pulver von kleinen Kristalliten einer Substanz monochromatisches Röntgenlicht gestreut wird, bezeichnet man als Debye-Scherrer-Verfahren. Es hat

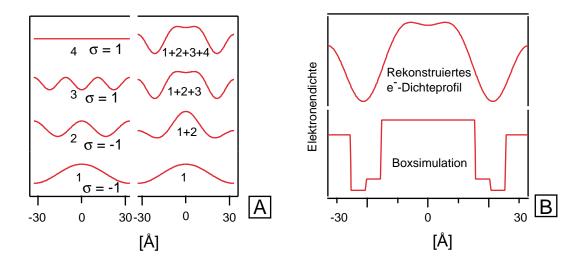


Abb. 1.5: In der linken Spalte von (A) sind die einzelnen Kosinus-Funktionen mit ihren gekennzeichneten Ordnungen dargestellt. Durch die auf Aufsummierung der einzelnen Funktionen (sukzessive dargestellt auf der rechten Seite von (A) wird das Elektronendichteprofil (B, oben) rekonstruiert. In (B, unten) ist zum Vergleich das zu simulierende Elektronendichteprofil als Summe von Streifen konstanter Elektronendichte dargestellt.

den Vorteil, daß sich die kleinen Kristalle statistisch, d.h. homogen, im Raum orientieren. Die Bragg-Bedingung aus Gl. 1.29 ist dadurch automatisch erfüllt. Man kann ohne Anderung der Orientierung der Probe mit einer Messung den reziproken Raum großflächig bestimmen. Andererseits geht durch die statistische Verteilung der Orientierung die Information über die räumliche Verteilung der Bragg-Peaks im reziproken Raum verloren. Die reziproken Gitterpunkte werden in homogene Ringe verschmiert. Die Indizierung der Linien, und damit die Zuordnungen zu den zugehörigen hkl-Ebenen, muß folglich ohne die Informationen über deren Orientierung im Raum erfolgen. Sie kann trotzdem durchgeführt werden, da die numerischen Verhältnisse der Peak-Abstände einer Debye-Scherrer-Aufnahme für die 14 verschiedenen Bravais-Gitter kalkulierbar sind. Man betrachte zum Beispiel das rhombische zentrierte Gitter in Abb. 1.6 A. Jeweils an den Ecken der Einheitszelle (Seitenlängen a und b) und im Zentrum befindet sich ein identisches Streuzentrum. In Abb. 1.6 B ist das zugehörige reziproke Gitter gezeigt, wie es an einem orientierten Kristall durch Röntgenbeugung aufgenommen wird. Interessanterweise sind die Reflexe (1,0) und (0,1) nicht vorhanden, da sie durch die negative Interferenz mit den durch die zentrierten Streuzentren gebildeten Ebenen mit den Abständen a/2 und b/2 ausgelöscht werden. Die sichtbaren Reflexe auf den Achsen (2m,0) und (0,2m), m ganzzahlig, entsprechen dem halben Abstand der Einheitszellen. Die zum Mittelpunkt nächsten

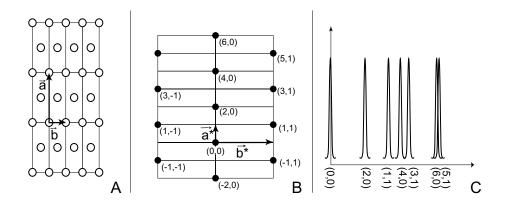


Abb. 1.6: Orthorombisches Gitter: Realraum (A), Fourierraum (B) und Fourieraum in Debye-Scherre-Geometrie (C)

sichtbaren Reflexe sind $(\pm 1,\pm 1),(\pm 3,\pm 1)$ und $(\pm 5,\pm 1)$ etc. Diese Reflexe liegen nicht auf einer der beiden Achsen. In Abb. 1.6 C ist das Streubild dargestellt, daß sich an einer rhombischen zentrierten Pulverprobe mit dem Debye-Scherrer-Verfahren ergibt. Die Abstände der Peakmaxima von 0 entsprechen den Abständen derreziproken Gitterpunkte von (0,0) in Abb. 1.6 B. Die Peakintensität hängt von der Multiplizität n der Reflexe auf. So haben etwa die symmetrischen Peaks (2,0) und (-2,0) den gleichen Abstand von (0,0). Ihre Multiplizität ist also n=2. Dagegen tritt der Peak $(\pm 1,\pm 1)$ viermal in verschiedenen Richtungen auf und hat die Multiplizität n=4.

1.2.1 Intensität der Debye-Scherrer-Reflexe

Die beim Debye-Scherrer-Verfahren gemessenen Intensitäten unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Geometrie von den an einem orientierten Kristall gemessen Intensitäten:

$$I = I_0 r_e^2 \frac{1 + \cos^2 2\vartheta}{2} \frac{\lambda^3}{16\pi r \sin^2 \vartheta \cos \vartheta} \frac{A_{hkl}^2}{V_c^2} nDdV$$
 (1.33)

Im Vergleich mit Gl. 1.32 erkennt man eine Veränderung des Lorenzfaktors zur Form $\frac{\lambda^3}{\sin^2\vartheta\cos\vartheta}$. Außerdem ist die Intensität jedes Peaks mit dessesn Multiplizität n multipliziert. D ist der Debye–Waller–Faktor, der thermisch angeregte harmonische Schwingungen der Streuzentren um die Gleichgewichtslage berücksichtigt, V_c ist das Volumen der Einheitszelle, r der Proben–Detektor–Abstand und dV das Volumen des streuenden Pulvers. Wegen $q \propto \frac{\sin\vartheta}{\lambda}$ und $\frac{1+\cos^22\vartheta}{2\cos\vartheta} \approx 1,5$ für kleine Winkel, läßt sich für die

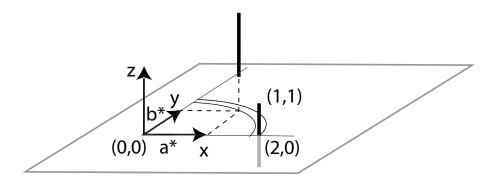


Abb. 1.7: Die radiale Mittelung des Zustandes aus Abb. 1.8 A in der q_xq_y -Ebene projeziert den reziproken Raum auf die q_xq_z -Ebene. Der Mittelpunkt des (2,0) Peaks in der q_xq_y -Ebene ist bei $q_z=0$. In Gegensatz dazu liegt der (1,1)-Peak durch die Neigung der Ketten in diesen Richtungen bei positiven z-Werten. Er hat die Multiplizität 2.

Amplitudenermittlung folgender genäherter Ausdruck verwenden:

$$A_{hkl} = const \cdot \frac{r}{n} |\vec{q}_{hkl}| \sqrt{I}$$
 (1.34)

Diese Näherungsformel gilt insbesondere für Messungen im Kleinwinkelbereich bei konstanter Wellenlänge. In der Praxis verwendet man vorzugsweise nur die relativen Werte der an einer Probe gemessenen Intensitäten, wobei Abstandsänderungen zwischen Probe und Detektor zu berücksichtigen sind.

1.2.2 Einfluß der radialen Mittelung auf das Linienprofil

Die radiale Mittelung durch das Debye-Scherrer-Verfahren nimmt i.a. starken Einfluß auf das Linienprofil der Pulverprobe. Als wichtiges Beispiel für diese Arbeit werden die Linienprofile betrachtet, die bei Debye-Scherrer-Messungen an Alkylketten mit verschiedenen Kipprichtungen in Lipid-Membranen auftreten [85, 16]. Die Lipidmembran liege dabei in der xy-Ebene und die z-Achse stehe senkrecht auf ihr. In Abb. 1.8 sind drei verschiedene Fälle von relativ zur z-Achse gekippten Alkylketten schematisch dargestellt. In Abb. 1.8 A sind die Lipid-Ketten zum nächsten Nachbarn hin, in B genau zwischen die beiden nächsten Nachbarn geneigt. Die beiden Phasen werden mit $L_{\beta I}$ und $L_{\beta F}$, Phasen mit Neigungsrichtungen zwischen diesen beiden Extremfällen werden als $L_{\beta L}$ bezeichnet [79, 31]. Als L_{β} wird die Phase bezeichnet, in der die Ketten nicht geneigt sind (C).

Die Elektronendichte des Lipidketten–Gitters kann durch das Produkt eines entsprechend geneigten, hexagonalen Gitters aus unendlich langen Stäben mit dem durchschnittlichen Elektronendichteprofil der Lipidmembran ausgedrückt werden. Im Fourierraum erhält man folglich eine Faltung aus Fouriertransformierter der gekippten unendlich langen Stäbe und dem näherungsweise kastenförmig angenommenen Profil der Membran in z–Richtung. Die Fourietransformierte der Stäbe sind Punkte im reziproken Raum, wobei die Richtung und der Abstand von (0,0) vom Kippwinkel der Stäbe abhängig ist. Unter der Annahme einer kastenförmigen Elektronendichte der Lipidketten entlang der z–Achse in der Membran, ist deren Fouriertransformierte eine sinc–förmige $(sinc(x) = \frac{sinx}{x})$ Intensitätsverteilung entlang der q_z –Achse. In der

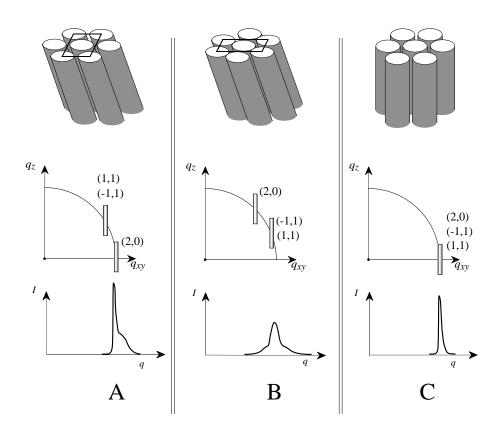


Abb. 1.8: Einfluß des Kippwinkels und der Peakposition von Lipidketten auf das Linienprofil in der Debye-Scherrer-Streugeometrie. (A) Kipprichtung zum nächsten Nachbarn, (B) zwischen nächste Nachbarn, (C) keine Neigung.

zweiten Zeile von Abb. 1.8 ist der Fourierraum so abgebildet, daß die 2-dimensionale Integration in der q_xq_y -Ebene bereits durchgeführt wurde (Abb. 1.7). Man sieht also die radiale Projektion des dreidimensionalen Raumes auf die q_xq_z -Ebene. Führt man die radiale Mittelung in dieser Ebene aus, erhält man die Debye-Scherrer-Peaks, die

in Abb. 1.8, unterste Zeile, dargestellt sind.

Im nicht geneigten Zustand bilden die Lipidketten eine zweidimensionale hexagonale Phase aus, die hier als Spezialfall hoher Symmetrie des rhombische-zentrierten Gitters aufgefaßt werde. Durch Neigung der Ketten ändern sich die Gitterkonstanten a und b des rhombisch-zentrierten Gitters.

Im Falle der Kettenneigung zum nächsten Nachbarn (1.8 A) erzeugt die Projektion des (2,0)–Peak im Fourieraum einen scharfen Peak. Die Projektion des (1,1)– und (-1,1)–Peaks ergibt dagegen einen breiten Peak bei etwas größerem |q| mit genau der doppelten Fläche wie (2,0), da er die doppelte Multiplizität hat. Sind die Ketten genau zwischen die nächsten Nachbarn geneigt (1.8 B) erhält man zwei Linien mit dem Zentrum bei $q_z > 0$. Die Projektion der beiden Peaks führt zu einer charakteristischen und i.a. unsymmetrischen Form des resultierenden Debye–Scherrer–Peaks. Ohne Neigung erhält man in der Debye–Scherrer–Messung genau einen scharfen Peak, da alle Mittelpunkte der Linien bei $q_z = 0$ liegen (1.8 C).

1.3 Experimenteller Aufbau: SAXS und WAXS

Bei der Streuung an Flüssigkristallen gibt es im Normalfall zwei verschiedene charakteristische Längen. In kristalliner Richtung ist die charakteristische Länge meist um etwa eine Größenordnung größer als in der fluiden.

Bei lamellaren Phasen von Lipidmembranen beträgt z.B. der Wiederholabstand senkrecht zu den Schichten 40 bis 100 Angström, in der fluiden Richtung etwa vier Angström. Um also die liquiden Bereiche zu charakterisieren, muß die Wellenlänge deutlich kleiner als vier Angström sein. Die typischerweise verwendeten Wellenlängen liegen zwischen einem knappen Angström und der charakteristischen Wellenlänge k_{α} -Linie von Kupfer (1.54 Å). Der große Unterschied der im Kristall auftretenden, charakteristischen Längen impliziert, daß die Messungen bei kleinen Winkeln in kristalliner und bei größeren Winkeln in fluider Richtung durchgeführt werden müssen. Daher spricht man von SAXS (Small Angle X-ray Scattering) und WAXS (Wide Angle X-ray Scattering).

Ein typischer SAXS-Aufbau ist in Fig.1.9 abgebildet. Der Strahl fällt von der Röntgenquellen in x-Richtung auf die Probe. Der Durchgang des direkten Strahles im Detektor definiert den Ursprung des reziproken Raumes. Der Detektor befindet sich im Abstand d von der Probe. In Anlehnung an das Bragg-Gesetz definiert man den Winkeln zwischen gestreutem und direktem Strahl als 2ϑ . Bezeichnet man den Abstand zwischen den Aufpunkten von direktem und gebeugtem Strahl mit r, erhält

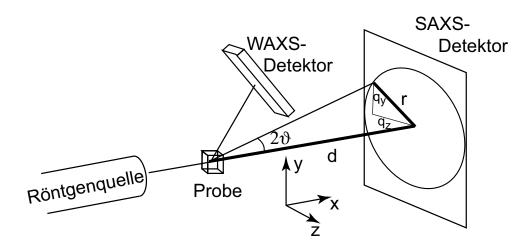


Abb. 1.9: Auf die Probe im Abstand d
 vom Detektor fällt parallele, monochromatische und kohärente Röntgenstrahlung in x
–Richtung. Zwischen gebeugtem und einfallenden Strahl, dessen Position am Detektor den Ursprung des rezip
roken Raumes definiert, liegt der Winkel 2 ϑ .

man durch Einsetzen des Winkel $\vartheta = \frac{1}{2} \arctan \frac{r}{d}$ in Gl. 1.29 die für die praktischen Auswertung verwendete Beziehung:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{1}{2} \arctan\frac{r}{d}\right) \tag{1.35}$$

Im Falle von WAXS-Experimenten wird lediglich bei größeren Winkeln gemessen, was im einfachsten Fall durch einen kleineren Proben-Detektor-Abstand realisiert werden kann. Beobachtungen von Phasenübergängen in Flüssigkristallen mittels simultanen SAXS und WAXS Messungen können den Zusammenhang zwischen strukturellen Parametern in kristalliner und fluider Richtung erleuchten. Um die Auflösung in beiden Winkelbereichen gleichzeitig zu optimieren, ist es günstig getrennte WAXS und SAXS Detektoren mit unterschiedlichem Proben-Detektor-Abstand zu verwenden.

Mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortpflanzung und unter der Annahme $\frac{r}{d} << 1$ erhält man für den relativen Fehler $\frac{\Delta q}{a}$:

$$\frac{\Delta q}{q} = 4\pi sin(\frac{1}{2}arctan\frac{r}{d})\frac{\Delta\lambda}{\lambda} + \frac{4\pi}{\lambda}\left(\frac{\Delta r}{r} - \frac{3}{4}\frac{r}{d^2}\Delta r + O\left[\frac{x}{d}\right]^3\right)$$
(1.36)

Der relative Fehler in q ist proportional zu dem der Wellenlänge. Δr ist im allgemeinen durch die Detektorauflösung gegeben. Das führt dazu, daß der relative Meßfehler in q verringert werden kann, indem man den Absolutwert von r durch den Detektor—Proben-Abstand d vergrößert.

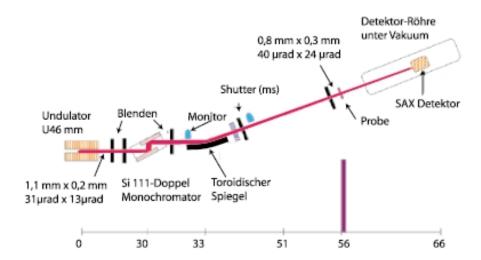


Abb. 1.10: Die Beamline ID2A, ESRF im schematischen Überblick. Das im Undulator erzeugte Röntgenlicht fällt durch ein Blendensystem auf den Doppelmonochromator, bestehend aus zwei Stickstoff-gekühlten Siliziumkristallen in 111-Richtung. Mit Hilfe eines toroidischen Spiegels wird der Strahl je nach Bedarf auf die Probe oder direkt auf den Detektor fokussiert. Jeweils die Fläche und die Divergenz des Strahles vor und nach dem Optiksystem sind angegeben. Zur quantitative Auswertung mißt der Monitor die tatsächliche Strahlintensität. Mit dem Shutter kann der Strahl in ms-Intervallen ein- und ausgeschaltet werden. Der Detektor läßt sich in der 10 m langen Vakuumröhre vollautomatisch positionieren.

Deswegen ist es günstig für simultane SAXS und WAXS-Messungen einen Kleinwinkeldetektor bei größerem und einen separaten, meist linearen Weitwinkeldetektor bei kleinerem Abstand zu verwenden (siehe Fig. 1.9).

1.3.1 Verwendete Aufbauten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an drei verschiedenen Synchrotron-Beam-Lines gemessen. Das sind die Beam-Line D43 des Beschleunigerringes DCI auf dem Gelände LURE (Laboratiore pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnetique), Paris, die Beam-Line X13 der EMBL-Außenstelle Hamburg am Beschleunigerring DORIS III des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron), Hamburg, und die Beamline ID2A des ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), Grenoble. Bei dem DCI von LURE handelt es sich um einen Beschleunigerring der ersten Generation. Die Brillianz des DCI (Tabelle 1.1) ist um zwei Größenordnungen geringer als die des Synchrotronringes zweiter Generation DORIS III in Hamburg und sogar um knapp sechs Größenordnungen geringer als die des Synchrotronringes dritter Generation des ESRF. Dabei

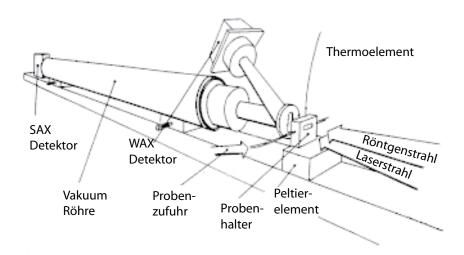


Abb. 1.11: Der Aufbau der Beamline X13, DESY, ist auf zeitaufgelöste, simultane SAXS- und WAXS-Messungen optimiert. Durch die genaue und schnelle Temperaturkontrolle über Peltierelemte eignet sich die Beamline besonders gut für Untersuchungen struktureller Parameter bei thermotropen Phasenübergaängen.

versteht man unter der Brillianz des Röntgenstrahles eines Synchrotronbeschleunigerringes die Anzahl der Photonen in einem Energieintervall von $\frac{\Delta E}{E}=0.1\%$, die in einen Raumwinkelbereich von 1 $mrad^2$ pro Sekunde bei einem Umlaufstrom von 100 mA auf 1 mm^2 fallen. Für den deutlichen Unterschied in der Brillianz bei den angegebenen Wellenlängen ist neben der höheren Energie des Beschleunigerringes die Art verantwortlich, wie die Röntgenstrahlung erzeugt wird. An D43 und X13 werden die geladenen Teilchen mit einem Ablenkmagneten auf eine Kreisbahn gezwungen. Daraus resultiert praktisch weißes Röntgenlicht mit fast kontinuierlichem Intensitätsprofil, das bei einer von der Energie abhängigen minimalen Wellenlänge abbricht. Im Gegensatz dazu wird an ID2A ein Undulator verwendet, der aus antiparallel nacheinander aufgereihten Permanentmagneten besteht, zwischen denen die Elektronen in kleinen Radien auf und ab beschleunigt werden. Die abgestrahlten elektromagnetischen Wellen interferieren miteinander, so daß ein Großteil der Strahlleistung bei bestimmten Wellenlängen abgestrahlt wird. Diese Linien eignen sich hervorragend für Experimente, bei denen mit einer bestimmten Wellenlänge gemessen werden soll.

Neben der Brillanz, die vor allem den Vorteil hat, daß man mit kürzeren Meßzeiten ausreichend gute Statistik erhält, spielt für die Qualität der Messung die Strahlgröße und -divergenz und die Auflösung der Wellenlänge $\frac{\Delta\lambda}{\lambda}$ eine zentrale Rolle. Diese drei Größen definieren die Auflösung des Meßinstruments. Dabei ist zu beachten, daß die

	D43 DCI (LURE)	X13 DORIS III (DESY)	ID2A (ESRF)
Brillianz	$5 \cdot 10^{9}$	$5 \cdot 10^{11}$	$1.4 \cdot 10^{17}$
Strahlgröße	$1 \text{mm} \times 1 \text{mm}$	$3 \text{mm} \times 1 \text{mm}$	$0.8 \text{mm} \times 0.3 \text{mm}$
Strahldivergenz	keine Angaben	keine Angaben	$40\mu rad \cdot 24\mu rad$
Ring Energy [Gev]	1.8	4.45	6
Ring Strom [mA]	300	100	200
Monochromator	einzeln Ge 111	einzeln Ge 111	doppelt Si 111
Art der Quelle	Ablenkmagnet	Ablenkmagnet	Undulator U46
verwendetes $\lambda[\mathring{A}]$	1.49	1.50	0.99
$\frac{\Delta \lambda}{\lambda}$	$1\cdot 10^{-3}$	$1\cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Tab. 1.1: Gegenüberstellung der verwendeten Synchrotron-Einrichtungen.

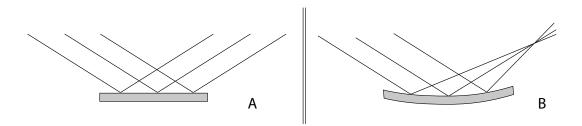


Abb. 1.12: Strahlgröße und Strahldivergenz sind eng aneinander gekoppelt. Will man die Divergenz minimieren, verliert man an Flußdichte (A). Erhöht man andererseits die Flußdichte durch Fokussieren, erhöht man gleichzeitig die Divergenz (B).

Strahlgröße und die Strahldivergenz unmittelbar aneinander gekoppelt sind, wie schematisch in Abb. 1.12 dargestellt ist. Das bedeutet, daß bei einer starken Fokussierung des Strahles auf einen Punkt automatisch die Divergenz des Strahles erhöht wird. Möchte man dagegen einen Strahl mit minimaler Divergenz, so ist man gezwungen, einen unfokussierten Strahl zu verwenden, was sich durch den größeren Strahldurchmesser negativ bemerkbar macht. Die einzige Möglichkeit, bei minimaler Divergenz gleichzeitig einen kleinen Strahl zu erhalten, ist, die Größe des unfokussierten Strahles und damit auch die Intensität mit Hilfe von Blenden zu reduzieren. Für gleichzeitig minimale Divergenz und maximale Inensität ist die Energie der Elektronen bzw. Positronen im Speicherring von maßgeblicher Bedeutung. Dies sieht man, wenn man die Ursache für Synchrotronstrahlung betrachtet. Ein elektrisch geladenes Teilchen wird senkrecht zur Bewegungsrichtung beschleunigt. Die Beschleunigte Ladung sendet im

Ruhesystem des beschleunigten Teilchens elektromagnetische Wellen mit einer keulenartigen Intensitätsverteilung ab, wobei die Kegel senkrecht zum Geschwindigkeitsund Beschleunigungsvektor stehen. Im Laborsystem richten sich die Kegel aufgrund der Eigenschaften der Lorentztransformation in Richtung tangential zur Trajektorie des Teilchens nach vorne aus. Der horizontale Winkel θ , in den praktisch die gesamte Energie abgestrahlt wird, läßt sich wie folgt berechnen [36]:

$$tan\theta = \frac{sin\theta'}{\gamma(\beta + cos\theta')} \approx \frac{1}{\gamma} tan\frac{\theta'}{2}$$
 (1.37)

 $\beta = (\frac{v}{c})^2$, $\gamma = \frac{1}{1-\beta}$ und θ' ist der Abstrahlwinkel im Ruhesystem des Teilchens und deswegen etwa $\frac{\pi}{2}$. Bei den relevanten Energien ist $v \approx 0.999c$ und $\beta \approx 1$. θ ist also näherungsweise:

$$\theta \approx \frac{1}{\gamma} \tag{1.38}$$

Die vertikale Aufweitung des Strahles ist sogar noch geringer. Nach dieser Abschätzung ist die Divergenz des Strahles am ESRF mit $8.5 \cdot 10^{-5}$ rad nur etwa die Hälfte von der des Strahles am LURE $2.8 \cdot 10^{-4}$.

Für das Debye-Scherrer-Verfahren ist ein zu kleiner Röntgenstrahl auf der Probe nur bedingt von Vorteil, da die Mittelung im Pulver unter einem zu kleinen Strahldurchmesser leiden kann. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit - wenn möglich - direkt auf den Detektor fokussiert, was zusätzlich zu einer verbesserten Auflösung führt.

Neben den Gesichtspunkten, die die Auflösung und die Qualität der Messungen betreffen, unterscheiden sich die drei Beamlines zusätzlich maßgeblich durch die Handhabbarkeit. Dabei zeichnet sich D43 durch Flexibilität aus, d.h. eine große Anzahl von Versuchen können mit z.B. unterschiedlichen Distanzen und anderen variierenden Parametern in kurzer Zeit durchgeführt werden. Die im Vergleich zu klassischen Röntgenröhren etwa 20 mal höhere Brillianz ist dabei insbesondere hilfreich. Diese Flexibilität bezahlt man mit geringerer Auflösung, da aus Zeitgründen auf die Optimierung diesbezüglich teilweise verzichtet wird. Die an verschiedenen Positionen angebrachten linearen Detektoren für SAXS und WAXS der Beamline X13 ermöglichen eine beinahe unbegrenzte Anzahl von schnell aufeinanderfolgenden simultanen SAXS- und WAXS-Messungen bei einem bestimmten Abstand, und eignen sich dadurch insbesondere für die Untersuchung von Phasenübergängen in mesoskopischen Systemen [64, 65]. Andererseits verliert man durch den Lineardetektor an Statistik, die für hochauflösende Experimente, wie sie etwa an ID2A durchgeführt werden können, von entscheidender Bedeutung sind. Die Aufnahme mit Hilfe des 2D-Detektors verringert aufgrund der

1.4. DSC 27

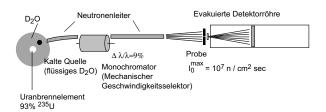


Abb. 1.13: Die Beamline D11 des ILL, Grenoble, für Neutronenkleinwinkelstreuung. Die Neutronen werden im Monochromator mechanisch nach ihrer Geschwindigkeit selektiert. In der Detektorröhre wird der Detektor automatisch verschoben. Proben- Detektorabstände zwischen 1.1 m und 36 m sind möglich.

Datenmenge die Anzahl der pro Zeit gemessenen Datensätze und erhöht den Aufwand der Datenanalyse. Die Kombination dieser drei Geräte ermöglicht rasches und produktives Arbeiten mit Hilfe von Synchrotron-Strahlung.

Kleinwinkelinstrument D11, ILL

Neutronenstreuung wurde am Kleinwinkelinstrument D11 des Instituts Laue Langevin, Grenoble, durchgeführt. In Abb. 1.13 ist schematisch der Aufbau des Kleinwinkelinstruments gezeigt. Die Energieauflösung sowie die maximal erreichbare Intensität des Primärstrahls sind nicht vergleichbar mit den Synchrotrongeräten. Andererseits kann man extre kleine q-Werte von bis zu $5 \cdot 10^{-4} \mathring{A}^{-1}$ messen. Der Monochromator funktioniert mechanisch. Er besteht aus um die Längsachse gewunddenen Röhren, so daß bei Rotation um die Längsachse zu schnelle und zu langsame Neutronen absorbiert werden. Eine bessere Energieauflösung ist möglich, würde aber die Primärintensität stark abschwächen.

1.4 DSC

DSC (Differential Scanning Calorimetry) ist eine sehr empfindliche Methode um die Wärmekapazität (c_P) einer meist wäßrigen Lösung bei konstantem Drcuk zu bestimmen. Dabei werden die Meßkammer mit der Probe und die Referenzkammer, in der sich der entsprechende Puffer ohne die zu untersuchende Substanz befindet, mit konstanter Geschwindigkeit erwärmt. Gemessen wird die Differenz der Wärmemengen, die nötig sind, um die Probenkammer und Referenzkammer gleich schnell zu erwärmen. Das Signal ist bei endothermen Vorgängen der Probe positiv, bei exothermen Vorgängen in der Probe negativ.

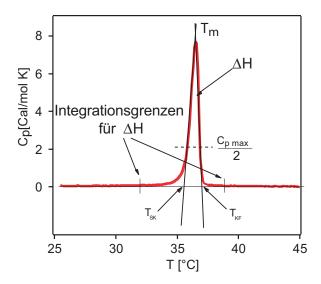


Abb. 1.14: Beispiel eines DSC–Wärmekapazitätsprofils als Funktion der Temperatur. Das Maximum des Peaks wird als Phasenumwandlungstemperatur definiert, die Fläche des Peaks entspricht der Übergangs–Enthalpie. Durch die Tangentenkonstruktion werden T_s und T_f bestimmt.

Bei einem Phasenübergang erster Ordnung erwartet man, daß c_P divergiert. Die Enthalpie des Phasenüberganges (ΔH) läßt sich bei konstantem Druck (dQ = dH) durch das Integral über c_P berechnen:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} c_P(T) dT \tag{1.39}$$

Neben der Enthalpie des Phasenüberganges lassen sich außerdem die Grenzen der Phasengebiete wie z.B. die Fluidus-Temperatur T_f und die Solidus-Temperatur T_s durch die in Abb. 1.14 angedeutete Tangentenkonstruktion bestimmen. Unterhalb von T_s befindet sich die Substanz in der festen Phase mit i.a. niedriger Entropie, oberhalb T_f in der fluiden Phase mit i.a. höherer Entropie. Zwischen T_s und T_f liegt das Koexistenzgebiet, in dem feste und fluide Phasen im Gleichgewicht koexistieren.

Nach der Phasenregel ist die Anzahl eines zweikomponentigen Systems bei konstantem Druck F = 3 - P, wobei P die Anzahl der koexistierenden Phasen darstellt. Das bedeutet, daß die maximale Anzahl der koexistierenden Phasen 3 ist, und die drei Phasen genau an einem Punkt (Tripelpunkt) koexistieren. Ein Gebiet, in dem zwei Phasen koexistieren, wird durch Linien, die sogenannten Fluidus- und Liquidus-Linien begrenzt.

Das Lösungsmittel (Wasser, Puffer) wird bei Lipidmischngen oft nicht als Komponente berücksichtigt, da die Wärmekapazität des Wassers bei kleinen Lipidmengen 1.4. DSC 29

im relevanten Temperaturbereich (20-60 °C) im Mittel nicht stark variiert. Außerdem kann man die Effekte, die die Lipide auf das Wasser ausüben, den beobachteten Phasen zuschreiben.

Phasendiagramme

Trägt man Fluidus- und Solidus-Temperaturen eines zweikomponentigen Systems als Funktion des Molbruchs einer der beiden Komponenten auf, erhält man in den resultierenden Phasendiagrammen getrennte Gebiete, die durch die dort existierenden Phasen charakterisiert sind. Anhand von Abb. 1.15 werden nun für diese Arbeit wichtige Phasendiagramme besprochen (nach [13]). Die typische Zigarren-Form in

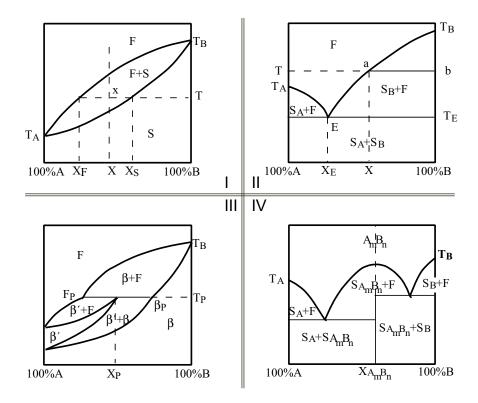


Abb. 1.15: Temperatur-Molbruch-Phasendiagramme von Mischungen zweier Komponenten A und B. (I) Ideale Mischung, (II) Eutektisches Verhalten, (III) Peritektisches Verhalten und (IV) Stöchiometrische Mischung.

Abb. 1.15 (I) ergibt sich bei Lipiden, die perfekt miteinander Mischen, d.h. wenn die Wechselwirkungen der Lipide nicht von der Art des nächsten Nachbars abhängen. In Abb. 1.15 (II) sieht man schematisch ein eutektisches Phasendiagramm, das durch

ideales Mischverhalten in der fluiden Phase und völlige laterale Entmischung in der soliden Phase gekennzeichnet ist. Unterhalb der eutektischen Temperatur T_E sind die Lipide A und B in den unmischbaren, festen Phasen S_A und S_B . Über der eutektischen Temperatur und links vom eutektischen Punkt E gibt es einen Koexistenzbereich zwischen S_A und der fluiden Phase F rechts vom eutektischen Punkt Koexistenz zwischen S_B und F. Das peritektische Phasendiagramm (Abb. 1.15 (III)) ist durch die drei Koexistenzgebiete $\beta + \beta'$, $\beta' + F$ und $\beta + F$ charakterisiert, die sich am peritektischen Tripelpunkt berühren. β und β' sind unterschiedliche solide Phasen. Ein typisches Beispiel für peritektische Phasendiagramme stellt das DPPC-DPPE-Phasendiagramm dar [5]. Durch attraktive Wechselwirkung kann es zur Ausbildung eines Komplexes eines bestimmten stöchiometrischen Verhältnisses kommen (Abb. 1.15 (IV)). In diesem Fall kann die Phasenübergangstemperatur des stöchiometrischen Aggregates oberhalb der Phasenübergangstemperatur der einzelnen Komponenten liegen. Mischungen können in verschiedenen Bereichen des Phasendiagrammes verschiedene Verhalten aufweisen. So ist etwa in IV erkennbar, daß links und rechts vom stöchiometrische Verhältnis $X_{A_mB_n}$ jeweils eutektisches Verhalten auftritt.

2. Kationische Lipide und DNA

2.1 Präparation von Lipid-DNA-Komplexen

2.1.1 Lipide und DNA

Verwendete Lipide

Lipide sind amphiphile Moleküle bestehend aus mindestens zwei hydrophoben Alkylketten und einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe. Durch die stark unterschiedliche Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln ist es unter Mitberücksichtigung der freien Energie des Lösungsmittels, i.a. Wasser, für die Lipide am günstigsten, die polaren Ketten aneinander zu lagern und zwar so, daß sie von den polaren Kopfgruppen vom polaren Lösungsmittel abgeschirmt sind. Den dominierenden Einfluss auf die freie Energie des Lösungsmittels hat die Orientierungs-Entropie der Wassermoleküle, die durch dipolare Wechselwirkungen in direktem Kontakt mit Alkylketten zu einer lokal geordneten Orientierung gezwungen werden. Das wichtigste Beispiel solcher selbstassemblierten Phasen ist die Lipiddoppelmembran. Sie umgibt fast alle biologischen Zellen und dient dabei als Trägermedium z.B. für membranständige Proteine und als Abgrenzung in Form einer semipermeablen Membran der Zelle gegenüber der extrazellulären Matrix.

Lipid-DNA-Komplexe wurden aus kationischen Lipidmembranen und DNA gebildet. Die kationischen Lipidmembranen sind ihrerseits aus binären Mischungen des kationischen Lipids Tri-Methyl-Amonium-Propan (TAP) und einem neutralen Helferlipid zusammengesetzt. Der Molbruch des kationischen Lipides wird als χ_{TAP} bezeichnet. Als Helferlipid wird in diesem Zusammenhang die Komponente bezeichnet, die keinen elektrostatischen Beitrag zur Lipidmischung liefert, so daß durch das Mischungsverhältnis von geladenen und ungeladenen Lipiden z.B. die Oberflächenladungsdichte der Membran kontrolliert werden kann. Bei DMTAP handelt sich um ein synthetisch hergestelltes, nicht natürlich vorkommendes Lipid, das wie alle verwendeten Lipide von Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA) gekauft wurden. Die

Abb. 2.1: Die in der Arbeit verwendeten Lipide. Die TAP-Lipidköpfe tragen je eine positive Ladung und sind im Vergleich zu den zwitterionischen Phosphocholinköpfen (PC) weniger als halb so groß. Die Myristylketten (C14) sind gesättigt. Die Oleoylketten haben eine Doppelbindung genau in der Mitte der Alkylketten, nämlich zwischen den C-Atomen 9 und 10.

TAP-Kopfgruppe trägt bei biologisch relevanten pH-Werten (5-9) des Lösungsmittels genau eine positive Ladung am Stickstoffatom der Amoniumgruppe (Abb. 2.1). Als neutrale Lipidkopfgruppen wurden Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) eingesetzt, um durch Mischen mit kationischen Lipiden die Oberflächenladungsdichte der Membranen kontrollieren zu können. PC-Kopfgruppen tragen keine Nettoladung, besitzen jedoch einen starken elektrischen Dipol, erzeugt durch die negative Phosphatgruppe und die positive Amoniumgruppe. PC trägt außerdem im Gegensatz zu PE am Stickstoffatom anstelle der drei H-Atome je eine Methylgruppe. Phosphatidylcholine haben einen Anteil von ca. 30% in natürlichen Zellmembranen. Die kettendeuterierten Analoga von DMPC und DMTAP wurden zur Neutronenstreuung verwendet. Sämtliche H-Atome im Kettenbereich - insgesamt 54 - sind gegen H² substituiert. Man kennzeichnet die kettendeuterierten Lipide deswegen häufig mit

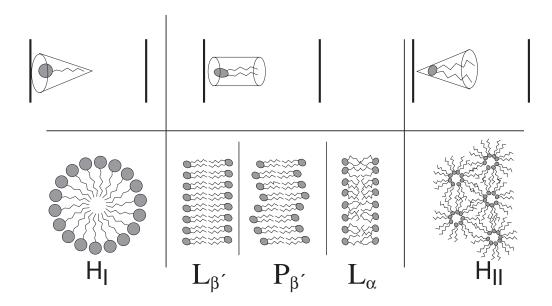


Abb. 2.2: Polymorphismus von Lipiden mit unterschiedlichen Verhältnissen von Kopfgruppenflächenbedarf zu Lipidkettenflächenbedarf (nach Ref. [35]). Durch die invertierte Kegelform des oberen Systems wird eine mizellare Phase erzeugt. Die Mizellen können tubuläre oder sphärische Form haben. Die lamellaren Phasen $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ und L_{α} bilden sich aus zylindrischen Lipiden. Die invertierte hexagonale Phase H_{II}^C entsteht, wenn die Lipidmoleküle die gezeigte Form eines Kegels annehmen (nach Ref. [35]).

dem Anhang "-d₅₄". Die Deuterierung der Ketten beeinflußt nach Messungen von Knoll et al. nicht das Mischungsverhalten mit nicht deuterierten Lipidketten [41].

Durch Vergleich des PC-Kopfes mit TAP in Abb. 2.1 sieht man, daß der PC-Kopf gut doppelt so lang ist, was von der zusätzlichen Phosphatgruppe und Ethyl-Einheit herrührt.

Lipid-Wasser-Polymorphismus

Lipid-Wasser-Emulsionen weisen einen reichen strukturellen Polymorphismus auf, wie in grundlegenden Arbeiten gezeigt wurde [50, 69, 76, 85]. Dabei hat das Verhältnis des Flächenbedarfs der Kopfgruppen zu den Ketten großen Einfluß auf das Phasenverhalten der Amphiphile. Das Prinzip der Selbstassemblierung von Lipiden beruht auf der Vermeidung von Kontakt der unpolaren Molekülregionen mit dem polaren Lösungsmittel, da solche durch Reorientierung der polaren Gruppen, i.a. der Wassermoleküle, zu einem drastische Anstieg der freien Enthalpie führt.

In Abb. 2.2 sind reine Lipidphasen dargestellt. Welche Phase in Wasserüberschuß ausgebildet wird, hängt vor allem vom Verhältnis von Kopfgruppenflächenbedarf zu Lipidkettenflächenbedarf [35] und von elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Lipidkopfgruppen [47] ab. Mizellare Phasen wie z.B. H_I bilden sich typischerweise bei Lipiden, bei denen der Flächenbedarf der Kopfgruppen den der Ketten übertrifft. Im umgekehrten Fall bildet sich die invertierte hexagonale Phase H_{II} aus. Die nichtinvertierten und invertierten Mizellen können tubuläre oder elliptische Form annehmen. In der Biologie spielen planare Lipiddoppelschichten, die aus einer großen Anzahl verschiedener Lipidsorten zusammengesetzt sind, eine wichtige Rolle, indem sie das Zellinnere von der extrazellulären Matrix abgrenzen. Natürliche Lipidmembranen befinden sich praktisch immer in der flüssigkristallinen L_{α} -Phase, in der die Lipidketten ungeordnet sind. Das liegt an dem hohen Anteil von ungesättigten Fettsäuren als Lipidketten. Phosphocholine mit gesättigten Ketten zeigen dagegen bei niedrigen Temperaturen eine Gel-Phase L_{β} , in der die Alkylketten ausgestreckt und in der Membranebene hexagonal gepackt sind. Die $P_{\beta'}$ -Phase ist durch periodische Wellungen der Membranen charakterisiert und kann kalorimetrisch [6] und mittel Gefrierbruchelektronenmikroskopie beobachtet werden [69].

DNA als semiflexibles Polymer

DNA ist neben RNA der wichtigste Erbinformationsträger in lebenden Organismen. Doppelsträngige DNA besteht aus zwei einfachen Strängen aus einer Aufreihung von Nukleotiden (Phosphatgruppe + Deoxyribose + Base). Die vier Basen sind Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Die Paarung der Stränge ist durch die spezifische Basenpaarung durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Basen determiniert. D.h., es können sich i.a. jeweils nur A und T, und C und G verbinden. Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die physikalischen Eigenschaften von Interesse, nämlich Ladung und geometrische Gestalt. Die Ladung rührt von zwei dissoziierten Phosphatgruppen pro Basenpaar her. Damit trägt DNA zwei negative Elementarladungen pro Basenpaar. Ihre geometrische Gestalt hängt von der Struktur der verwendeten Deoxyribose und vom Verhältnis A/C ab (Näheres siehe z.B. [72]). Für die Bildung der Lipid-DNA-Komplexe wurde in dieser Arbeit ausschließlich Kalbsthymus-DNA von Sigma (Deisenhofen) als Natrium-Salz verwendet. Sie hat eine unbestimmte Länge von einigen tausend Basenpaaren. Ihre Helixstruktur bezeichnet man als B-Form. In dieser Form hat DNA eine Persistenzlänge von

Abb. 2.3: Doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid in B-Form mit 10 Basenpaaren. In erster Näherung ist die Dichte und Ladung homogen über einen Zylinder mit ca. 2 nm Durchmesser und 3.4 Å pro Basenpaar verteilt. Auf der rechten Seite sind die vier Basen A, C, G und T und deren durch Wasserstoffbrücken bedingte spezifische Paarung dargestellt.

ca. 50 nm, wobei die Persistenzlänge definiert ist als die Länge, in der im statistischen Mittel die Korrelation der Orientierung in einem Molekül auf den $\frac{1}{e}$ -ten Teil abgefallen ist.

2.1.2 Proben-Präparationen

Vesikel

Zur Präparation von Lipidvesikeln bestehend aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der verwendeten Lipide wurden die in Chloroform gelösten Lipide im gewünschten Verhältnis gemischt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Temperatur der Chloroformlösungen der Umgebungstemperatur entsprach, um Kondensation von Luftfeuchtigkeit zu unterdrücken. Das Chloroform wurde mit Stickstoff verblasen und

in einem Vakuumschrank bei Zimmertemperatur mindestens 12 Stunden völlig verdampft.

Die eingetrockneten Lipidmischungen wurden mit Wasser gequollen und in den darauffolgenden zwei Stunden alle 20 min für je 2 min mit Hilfe eines Vortex-Gerätes geschüttelt. Das Wasser wurde vor dem Quellen auf ca. etwa 20 °C über die Phasenübergangstemperatur der Lipidmischungen erwärmt und die Lipidsuspension für die Quelldauer konstant auf dieser Temperatur gehalten, um Lipidentmischung während der Präparationsphase zu vermeiden. Es wurden Lipidkonzentrationen von 5 - 25 mg/ml.

Nach dieser Präparationsmethode entstehen multilamellare Vesikel (MLV) mit Durchmessern von 1 - 30 μ m, was durch den milchigen Charakter der Lipidsuspensionen überprüfbar ist. Mit der Lipidkonzentration steigt die Viskosität der Suspensionen. Zur Handhabung ist es deswegen ratsam, die Viskosität der Lipidsuspensionen durch Erwärmen zu verringern.

Um kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUV) zu erhalten, wurden die MLV-Suspension mit einem Rüsselbeschaller (Bachhofer TYP UV70, Reutlingen, Deutschland) bis zum Aufklaren der Lösung etwa 5 min lang beschallt. Eventuell in die Lösung geratene Metallspäne wurden durch einminütige Ultarzentrifugation und Abpipettieren des Überstandes aus der Lösung entfernt. Die beschallten Lösungen sind durchsichtig, was zur Charakterisierung dient. Bei hohen Konzentrationen (25 mg/ml) trüben die Lösungen oft nach wenigen Stunden ein, was auf die Ausbildung von großen multilamellaren Vesikeln, bzw. gequollenen lamellaren Phasen hinweist.

Lipid-DNA-Komplexe für Streuexperimente

Lipid–DNA–Komplexe wurden durch das Mischen von beschallten Vesikeln mit Natriumsalz von Kalbs–Thymus–DNA der Firma Sigma (Deisenhofen) hergestellt. Für DSC–Messungen wurde hierzu eine DNA–Lösung mit ca. 2 mg/ml mit Vesikel–Lösungen mit ähnlicher Konzentration gemischt, so daß die Anzahl der DNA–Ladungen gleich der Anzahl der Lipidkopf–Ladungen war (isoelektrische Mischung). Für die Röntgenexperimente mußten Lipid–DNA–Komplexe in Quarz–Kapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) mit einem Innendurchmesser von ca. 1 mm präpariert werden. Zu

diesem Zweck wurde die gewünschte Menge DNA-Gel mit einer Kanüle in die Kapillare gefüllt und abgewogen, um die tatsächlich eingefüllte Menge DNA zu bestimmen. Dort wurde die DNA gefriergetrocknet und die berechnete Menge Vesikelsuspension aus SUV's zupipettiert. Auf diese Weise lassen sich Lipid-DNA-Komplexe mit verschiedenen Verhältnissen von TAP- zu PC-Köpfen und verschiedenen Ladungsverhältnissen DNA-Basenpaaren zu TAP-Köpfen herstellen. Um die Proben möglichst schnell ins thermische Gleichgewicht zu bringen, wurden die Proben mindestens eine Woche zyklisch um die Phasenübergangstemperatur der Lipidmembranen erwärmt und abgekühlt. Bei zu langer Lagerung der Proben bei Temperaturen größer als 50 °C verfärbten sich die weißen Proben braun und waren für Messungen unbrauchbar. SUV's haben durch die kleine Masse den Vorteil, daß sie schneller diffundieren und die Proben so schneller ins thermische Gleichgewicht kommen. Die Proben wurden mit Hilfe von Edelstahl-Stäbchen in der Kapillare mechanisch verdichtet, um ein besseres Signal- zu Untergrund-Verhältnis bei Streuexperimenten zu erhalten.

Präparation für die Elektronenmikroskopie

Die Gefrierbruchtechnik erlaubt durch extrem schnelles Abkühlen, den Zustand einer Probe in der Ausgangstemperatur sichtbar zu machen. Dazu preßt man eine kleine Menge der Probe (ca. 1μ l) zwischen Goldplättchen und kühlt die Probe mit Hilfe von flüssigem Propan mit einer Kühlrate von ca. 1000-3000 °C/min ab, wie in Standard–Protokollen beschrieben [67, 27]. Der Gefrierbruchvorgang wurde in einem Balzers HVA BAF 400T bei 10^{-6} mbar und etwa -170 °C durchgeführt. Beide Beschattungen wurden mit Elektronenstrahl–Verdampfern durchgeführt, und zwar die Platin–Kohlenstoff–Beschattung unter einem Winkel von 45 ° und die stabilisierende reine Kohlenstoffbeschattung horizontal [102, 103]. Die Replica wurde an einer Wasser–Aceton–Trennschicht von der Probe gelöst, so daß keine weitere Reinigung nötig war. Die Replica wurde mit einem Kupfergitter (400–mesh) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit dem Gerät Philips CM 100 bei 100kV auf Agfa Scientia Elektronenmikroskopie–Filme aufgenommen.

3. Thermotropes Phasenverhalten von DMPC-DMTAP-Vesikeln und Lipid-DNA-Komplexen

3.1 DSC-Messungen

In Abb. 3.1 links sind DSC–Messungen an Vesikeln aus DMPC / DMTAP Mischungen gezeigt. DEer Molbruch von DMTAP χ_{TAP} nimmt von unten nach oben hin zu und ist in Prozent angegeben. Unten sieht man den bekannten DMPC–Peak mit einer Hauptübergangstemperatur von T_m =24.5 °C. Dabei geht das System von der Gel–Phase $P_{\beta'}$ bzw. L_{β} in die fluide Phase L_{α} über. Mit steigendem χ_{TAP} steigt die Hauptübergangstemperatur bis zu ihrem Maximalwert bei χ_{TAP}^{max} =0.43 auf 37.3 °C an. Oberhalb von χ_{TAP}^{max} fällt die Übergangstemperatur der Hauptumwandlung ab, wobei sich der Peak stark verbreitert. Bei χ_{TAP} =0.73 erscheint bei 16.6 °C ein weiterer Peak, der bei ähnlicher Temperatur auch bei den Messungen mit χ_{TAP} =0.84 und 0.92 erscheint. Die DSC–Messungen bei reinem DMTAP waren nicht reproduzierbar.

Im χ_{TAP} -Intervall von 0 bis 0.27 zeigen die DSC Messungen zusätzlich bei Temperaturen unterhalb des Hauptüberganges einen breiten enthalpischen Peak, der dem Vorübergang von der Gel-Phase L_{β} in die Gel-Phase $P_{\beta'}$ zugeordnet wird, wie in Abb. 3.2 links vergrößert dargestellt ist. Die DSC-Messungen an den Lipid-DNA-Komplexen zeigen im Bereich 0.35 $<\chi_{TAP}<$ 0.67 wie die reinen Lipid-Vesikel einen einzelnen scharfen Peak, der der dem Hauptübergang der Lipid-Membranen von der L_{α} - in die L_{β} -Phase zugeordnet werden kann (Abb. 3.1 rechts). Bei höheren χ_{TAP} zeigt sich bei den Lipid-DNA-Komplexen ein an Intensität zunehmender Peak unterhalb des Hauptüberganges bei etwa gleichbleibender Temperatur, was auf eutektisches Verhalten hinweist. Bei niedrigem χ_{TAP} weisen die DSC-Messungen an den Lipid-DNA-Komplexen einen deutlichen Unterschied zu den Vesikeln auf, wie in Abb. 3.2 rechts zu sehen ist: neben dem Hauptübergangspeak bei etwa 37 °C für χ_{TAP} =0.9 zeigt sich ein intensiver Niedrigtemperatur-Peak, dessen Maximum bei ca. 26 °C nur

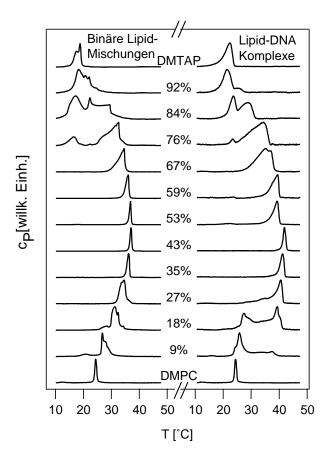


Abb. 3.1: DSC-Messungen von Vesikeln aus binären DMPC-DMTAP-Mischungen (links) und Lipid-DNA-Komplexen (rechts). Die Prozentangaben in der Mitte geben den Molbruch DMTAP in Probe. Ausgehend von einer reinen DMPC-Probe steigt der DMTAP-Gehalt von unten nach oben an.

etwa 1.5 °C über der Hauptübergangstemperatur der reinen DMPC-Vesikel liegt. Bei diesen Proben ist außerdem ein schwacher Vorübergang bei noch niedrigeren Temperaturen zu sehen (Abb. 3.2 rechts).

3.2 Konstruktion der Phasendiagramme

3.2.1 Phasendiagramm der DMPC-DMTAP-Vesikel

Das aus den

DSC-Messungen der Vesikel aus binären Lipid-Mischungen abgeleitete Phasenverhalten ist im linken Phasendiagramm in Abb. 3.3 A zusammengefaßt. Unterhalb

	DMP	C-DM	TAP MLV's	DMPC-DMTAP-DNA complexes				
χ_{TAP}	T_m	T_{pre}	ΔH	T_m	T_{pre}	ΔH		
	[°C]	$[^{\circ}C]$	[kcal/mol]	[°C]	$[^{\circ}C]$	[kcal/mol]		
0.00	24.5	12.7	6.2	24.45	12.65	6.2		
0.04	25.8	19.0	6.5	32.25	19.85	> 5.9		
0.09	26.8	20.7	6.8	37.35	25.85	> 4.1/0.7		
0.18	31.3	28.2	8.9	39.35	27.45	> 1.9/2.4		
0.27	34.6	33.8	6.6	40.55		> 0.5/2.5		
0.35	36.3		6.9	41.15		> 1.9		
0.43	37.1		5.4	41.85		> 1.6		
0.51	36.7	_	6.8	40.25		> 2.0		
0.53	36.9		6.1	39.25		> 5.0		
0.59	36.1	_	7.1	39.35		> 1.7		
0.67	34.6		7.3	36.65		> 3.9		
0.76	32.6	16.6	6.9	34.45	23.25	> 0.2/3.2		
0.84	22.4	17.0	ca. 5	29.05	23.55	> 2.2/2.4		
0.92	20.7	18.2	ca. 3	25.46	20.95	> 3.1/0.1		
1.00	18.9	17.6			22.45	> 8.3		

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Übergangstemperaturen und –enthalpien für Lipidmischungen und Lipid–DNA–Komplexe.

des grau ausgefüllten Koexistenzbereiches zwischen soliden $(P_{\beta'})$ links, L_{β} und fluiden Phasen (L_{α}) zeigt sich die L_{β} -Phase. Darüber die fluide L_{α} -Phase. Bei niedrigen χ_{TAP} -Werten durchquert man auf einem vertikalen Pfad zwei Koexistenzbereiche. Im unteren koexistieren die Gel-Phasen $L_{\beta'}$ und die Rippelphase $P_{\beta'}$. Im darüberliegenden Koexistenzbereich existieren die $P_{\beta'}$ - und die L_{α} - Phasen. Es handelt sich demnach um peritektisches Verhalten. Am peritektischen Punkt (χ_{TAP}^{P} =0.18) koexistieren alle drei Phasen. Besonders interessant ist das ausgeprägte Maximum der Hauptübergangstemperatur in der Mitte des Phasendiagramms, bei dem außerdem eine deutliche Verschmälerung des Koexistenzbereiches auftritt. Dies deutet klar auf die Existenz eines stöchiometrischen Aggregats mit einer Zusammensetzung nahe des Maximums χ_{TAP}^{max} =0.45 hin. Bei hohen χ_{TAP} -Werten werden mit zunehmender Temperatur die kristallinen Phasen S_1 und S_2 durchlaufen (gestrichelte Bereiche). Diese Phasen lassen sich durch unterschiedliche WAXS-Daten unterscheiden, die später besprochen werden. Folglich wird der DSC-Übergangspeak mit niedrigster Temperatur dem Übergang von S_1 nach S_2 zugeordnet, der mittlere Peak dem Übergang von S_2 nach L_{α} und der Peak mit Maximum bei höchster Temperatur dem L_{β} - L_{α} -Übergang. Das gestrichelte Dreieck am rechten Rand von Abb. 3.3 A zeigt den Bereich an, in

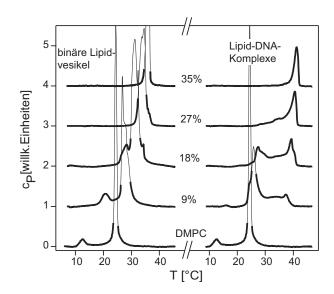


Abb. 3.2: Vergrößerte Ansicht der DSC Messungen bei niedrigem DMTAP-Molbruch. Die binären Lipidmischungen zeigen den von DMPC bekannten Vorübergang bis zu einem Molbruch von 18 % DMTAP, was deutlich auf peritektisches Verhalten hinweist. Die Lipid–DNA–Komplexe auf der rechten Seite zeigen dagegen zwei äquivalente enthalpische Übergänge, wobei der niedrigere Übergang einer reinen Lipid–Phase (ca. 25 °C) mit steigendem χ_{TAP} an Fläche verliert, während der höhere Übergang (ca. 40 °C) auf dessen Kosten an Fläche gewinnt. Dieses Verhalten ist typisch für eine Mischungslücke.

dem nicht reproduzierbar DSC-Peaks von reinem DMTAP beobachtet wurden.

3.2.2 Phasendiagramm der Lipid-DNA-Komplexe

Das Phasendiagramm der Lipid-DNA-Komplexe enthält zusätzlich zu den zwei Lipiden als dritte Komponente DNA. Es handelt sich dabei also um ein dreidimensionales Phasendiagramm. Durch die Zusatzbedingung, daß die Anzahl der DNA-Ladungen der Anzahl der DMTAP-Moleküle und damit der positiven Lipid-Ladungen entspricht, wählt man einen zweidimensionalen Schnitt aus dem dreidimensionalen Phasendiagramm aus. Man könnte diese Darstellung als pseudo-binäres Phasendiagramm bezeichnen. Durch die dritte Komponente erhöht sich jedoch nach der Phasenregel die Anzahl der Freiheitsgrade um 1.

Im mittleren Bereich ähnelt das Phasendiagramm der Komplexe dem der reinen Lipidvesikel. Unterhalb des grau unterlegten Koexistenzbereichs sind die Lipidmembranen in der $L_{\beta'}$ -Phase. Da die Lipide mit der DNA komplexiert sind, kann man die Phase mit $L_{\beta'}^C$ bezeichnen und die komplexierte Phase mit fluiden Lipidketten als L_{α}^C .

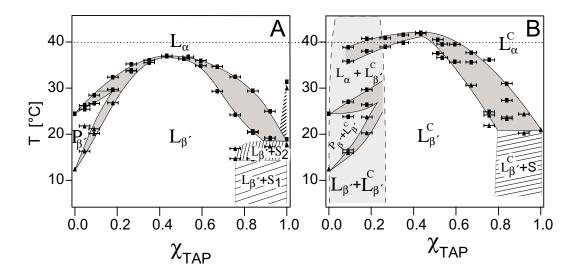


Abb. 3.3: Das Phasendiagramm der Lipid-Vesikel (A) und der Lipid-DNA–Komplexe (B). Die gegen χ_{TAP} aufgtragenen Meßpunkte entsprechen den Solidus- und Fluidustemperaturen, durch die zur Augenführung die Solidus- und Fluiduslinien eingezeichnet sind. Die Koexistenzgebiete sind schraffiert bzw. grau markiert. Die waagrechte Linie bei T=40 °C dient zum Vergleich der maximalen Übergangstemperaturen.

Auf der linken Seite des Phasendiagramms tritt eine Entmischungslücke auf (hellgrau dargestellt). Darin entmischen Lipidvesikel und Lipid–DNA–Komplexe mit unterschiedlicher DMPC / DMTAP–Zusammensetzung, da durch die elektrostatische Anziehung der DNA in den Lipid–DNA–Komplexen eine höhere DMTAP–Konzentration zu einer gesamten Verringerung der freien Energie führt. Der Vorübergang läßt sich dem Übergang $L_{\beta'}$ – $P_{\beta'}$ der Lipidvesikel zuordnen. Auf der rechten Seite des Phasendiagramms zeigt sich nur eine kristalline Phase S bei niedrigen Temperaturen.

3.3 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Um die Zur Überprüfung der These, ob das peritektische Verhalten tatsächlich auf Phasenseparation zwischen der Rippelphase $P_{\beta'}$ und $L_{\beta'}$ zurückzuführen ist, wurden die in Abb. 3.4 gezeigten elektronenmikroskopischen Gefrierbruchaufnahmen von Lipid–Vesikeln aus reinem DMPC und mit $\chi_{TAP}=0.9$ angefertigt [81]. Multilamellare DMPC–Vesikel wurden ausgehend von einer Anfangstemperatur von 21.6 °C präpariert, 9% DMTAP enthaltende Vesikel von einer Anfangstemperatur von 24 °C. In

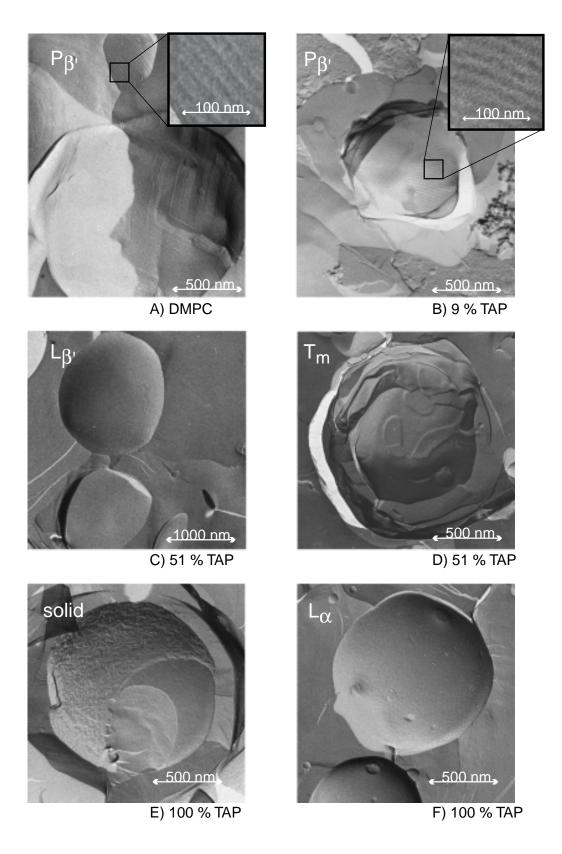


Abb. 3.4: Elekronenmikroskopische Aufnahmen von Lipid-Vesikeln mittels Gefrierbruchtechnik. Abgebildet sind Vesikel in der Rippelphase $P_{\beta'}$ von reinem DMPC (**A**)und DMPC mit 8% DMTAP (**B**), in der L_{β} -Phase (**C**) und im Bereich des L_{α} - L_{β} -Phasenüberganges (**D**) eines Vesikels mit χ_{TAP} =0.48 und reine DMTAP-Proben in der kristallinen S-Phase (**E**) und in der L_{α} -Phase (**F**).

beiden Fällen sieht man deutlich die Rippelstruktur der Oberfläche, die mittels Gefrierbruchaufnahmen in multilamellaren und unilamellaren DMPC-Vesikeln gefunden wurde [88, 71]. Die Wellenlänge beträgt bei reinem DMPC 20.7 nm und bei 9% DM-TAP 20.4 nm und ist damit auffallend ähnlich. Gefrierbruchaufnahmen von Vesikeln mit χ_{TAP} =0.51 zeigten weder in der $L_{\beta'}$ - (Abb. 3.4 C, 34 °C) noch in der L_{α} -Phase (ohne Abb.) eine Rippelstruktur. Eine Aufnahme exakt bei der Phasenübergangstemperatur T_m =36.5 °C zeigte bei dieser Lipidkomposition die in Abb. 3.4 D gezeigte Struktur. Diese Reliefstruktur sind ein Zeichen für Membrandeformationen, die möglicherweise durch die Koexistenz von $L_{\beta'}$ - und L_{α} -Domänen verursacht werden [49]. Reine DMTAP-Vesikel zeigen ausgehend von 26 °C glatte und rauhe Bereiche auf der Oberfläche (Abb. 3.4 E). Möglicherweise deutet das auf laterale Phasenseparation der kristallinen und L_{β} -Phase hin. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werde, daß jeweils der Bruch zwischen Ketten und Köpfen zu den unterschiedlichen Erscheinungen auf ein und demselben Vesikel führen. In der L_{α} -Phase wurden nur glatte Membranoberflächen gefunden (Abb. 3.4 F, 36 °C).

In Abb. 3.5 ist eine Gefrierbruchaufnahme eines elektrisch neutralen Lipid–DNA–Komplexes aus einer equimolaren DMPC / DMTAP–Mischung gezeigt. In der Ausgangstemperatur von 20 °C befindet sich die Probe in der $L_{\beta'}^C$ –Phase. Hunderte von lamellar angeordneten Membranen zeigen keine Stapelfehler. Die parallele Anordnung im Abstand von ca. 30 nm der DNA kann nicht aufgelöst werden.

3.4 Weitwinkelröntgenstreuung

Zur weiteren Charakterisierung der in Abb. 3.3 eingezeichneten Phasenregionen wurden WAXS-Daten von Lipidmembranen mit verschiedenen DMTAP-Konzentrationen in Vesikeln und Lipid-DNA-Komplexen aufgenommen. Die Ergebnisse sind als Rohdaten in Abb. 3.6 gezeigt. Als Referenz sind die bekannten Peaks der $L_{\beta'}$, der $P_{\beta'}$ und der L_{α} -Phase gezeigt (Abb. 3.6 A). Der DMPC $L_{\beta'}$ -Reflex setzt sich aus einem scharfen, Peak, dessen HWHM durch die Auflösung des Aufbaus gegeben ist, und einem verbreiterten Peak mit doppelter Fläche zusammen [83]. Die Verbreiterung des zweiten Peaks resultiert aus der Pulvermittelung in Verbindung mit der Lage des (1,1)-Peaks im dreidimensionalen Fourierraum wie in Abschnitt 1.2.2 besprochen. Diese radial gemittelte Peakform ist charakteristisch für die Neigung der Ketten zum nächsten Nachbarn.

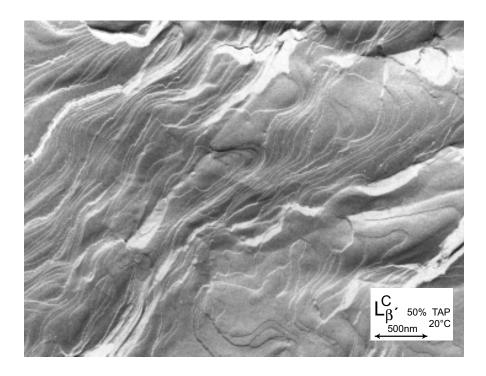


Abb. 3.5: Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahme eines lamellaren Lipid-DNA-Komplexes. Man beobachtet eine große Anzahl lamellar angeordneter, defektfreier Lipidmembranen.

In Abb. 3.6 B sind die WAXS–Reflexe von drei Proben von DMPC / DMTAP– Vesikeln mit χ_{TAP} =25%, 50% und 75% gezeigt. Alle drei Messungen zeigen die gleiche charakteristisch unsymmetrische Form, die für Neigung genau zwischen nächste Nachbarn typisch ist. Auffällig ist die Ähnlichkeit zum WAXS–Reflex der $P_{\beta'}$ –Phase des reinen DMPC. Nach Untersuchungen an orientierten Phosphatidylcholin–Proben von Hentschel et al. [31] kommt die Verbreiterung des $P_{\beta'}$ –Peaks tatsächlich durch eine Orientierungsänderung der Kettenneigung von "zum nächsten Nachbar" nach "zwischen nächste Nachbarn". Aufgrund der elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann jedoch das Auftreten der Rippelphase bei den gemischten Vesikeln ausgeschlossen werden.

In Abb. 3.6 D sind WAXS–Messungen an den gleichen Lipidmischungen, die jedoch mit DNA komplexiert sind, gezeigt. Auffällig ist der scharfe, intensive einzelne Peak der χ_{TAP} =25% Probe. Diese Form ist typisch für eine nicht geneigte L_{β} –Phase. Mit zunehmendem χ_{TAP} verbreitert sich der Peak und ähnelt dem der Lipid–Vesikel, was wiederum auf die Neigungsrichtung "zwischen nächste Nachbarn" hinweist.

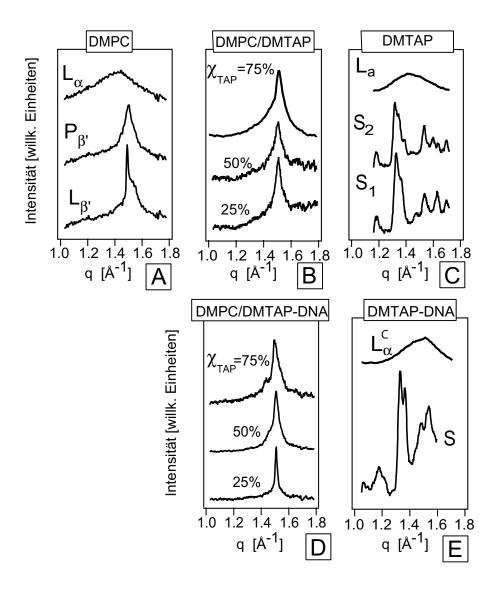


Abb. 3.6: Weitwinkelröntgenstreuung an multilamellaren DMPC-Vesikeln in den Phasen $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ und L_{α} (A), von Vesikeln mit χ_{TAP} =25%, 50% und 75% in der L_{β} -Phase (B) und von reinen DMTAP-Proben (C). Die Phasen S_1 und S_1 lassen sich klar unterscheiden, der WAXS-Reflex von DMTAP in der L_{α} -Phase unterscheidet sich nicht von dem von reinem DMPC. Untere Reihe: WAXS-Reflexe von Lipid-DNA-Komplexen bei verschiedenen χ_{TAP} in der L_{β} -Phase (D). In (E) solide S-Phase und fluide L_{α} -Phase von Lipid-DNA-Komplexen mit reinem DMTAP.

3.5. DISKUSSION 47

Die Weitwinkelreflexe von reinem DMTAP sind in Abb. 3.6 C und DMTAP komplexiert mit DNA in E gezeigt. Die kristallinen Phasen S_1 und S_2 sind ebenso voneineder zu unterscheiden wie von der komplexierten kristallinen Phase S. Reines DMTAP zeigt eine L_{α} -Phase bei hohen Temperaturen, die sich jedoch bei raschem Abkühlen nur zeitlich verzögert zu eine metastabilen L_{β}^C -Phase umwandelt (Ergebnisse nicht abgebildet). Dies erklärt die fehlende Reproduzierbarkeit im gestrichelten Dreieck im Lipid-Phasendiagramm. Es sei betont, daß alle anderen Proben ohne meßbare zeitliche Verzögerung sofort ihr Phasenverhalten äußeren Temperaturänderungen anpaßten.

Bei hohen Temperaturen zeigt mit DNA komplexiertes DMTAP eine $L^{\mathcal{C}}_{\alpha}$ -Phase.

3.5 Diskussion

Nichtideales Mischungsverhalten von kationischen Lipiden und Phosphocholinen

Der interessanteste Aspekt des binären Lipid–Phasendiagramms in Abb. 3.3 A ist das ausgeprägte Maximum der Koexistenzregion von fluider und gelartiger Phase bei $\chi_{TAP}^{max} = 0.45$. Ähnliches Verhalten von anderen kationischen Amphiphilen findet sich in der Literatur [48, 78]. Das Phasenverhalten von Legierungen aus kationischen Lipiden und Phosphocholinen ist stark unterschiedlich von Legierungen aus anionischen Lipiden mit Phosphocholinen wie z.B. DMPS/DMPC, die beinahe ideal miteinander mischen [29].

In der regulären Mischungstheorie wird die Wechselwirkung zwischen den Legierungskomponenten A und B durch einen additiven Term g^E in der freien Enthalpie berücksichtigt:

$$g^E = E_s X_A X_B \tag{3.1}$$

wobei $E_s = \frac{1}{2}(E_{AA} + E_{BB} - 2E_{AB})$, die Energie ist, die bei der Paarbildung der Komponenten A mit B umgesetzt wird. Für den Fall $E_s = 0$ ist das Mischungsverhalten ideal. Ist $E_s < 0$ ist die Wechselwirkung zwischen A und B attraktiv und es können sich Einheiten bestimmter stöchiometrischer Zusammensetzung bilden. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß der Ausdruck "Komplex", mit dem in der Literatur oft solche stöchiometrischen Einheiten bezeichnet werden, in dieser Arbeit

für die Lipid–DNA–Aggregate reserviert sei. Die Ausprägung des Maximums im vorliegenden Lipid–Phasendiagramm bei χ_{TAP}^{max} =0.45 legt die Ausbildung einer stöchiometrischen Untereinheit von 1:1 nahe, wobei die Abweichung von 5% zum kleineren χ_{TAP}^{max} –Wert mit dem mit χ_{TAP} linear steigenden elektrostatischen Anteil der freien Enthalpie zu erklären ist. Nach einem Vorschlag von Silvius wird die attraktive Wechselwirkung zwischen kationischen und zwitterionischen Lipiden durch elektrostatische Effekte dominiert und nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen [78].

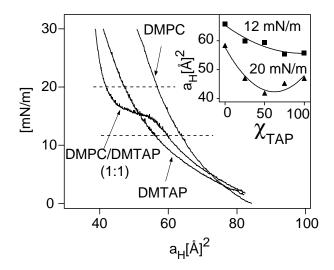


Abb. 3.7: Druck–Flächendiagramme aufgenommen mittels Filmwaage von DMPC, DMTAP und einer equimolaren DMPC / DMTAP–Mischung. Die DMPC / DMTAP Mischung zeigt im Gegensatz zu den anderen Kurven ein ausgeprägtes Plateau. Die Kopfflächengröße ist im Einsatz gegen den DMTAP–Molbruch bei zwei verschiedenen Drücken (12mN/m und 20mN/m) aufgetragen. Bei dem höheren Druck ist der Kopfflächenbedarf der equimolaren Mischung minimal. (Mit freundlicher Genehmigung von Laura Rusu.)

In metallischen Legierungen gehen Maxima in binären Phasendiagrammen meist mit intermetallischen Phasen einher [11]. Für eine Ausprägung von lateraler Phasenseparation differenzierter Phasen mit stöchiometrischen Verhältnis konnte in den experimentellen Daten jedoch kein Hinweis gefunden werden.

Dennoch ist anzunehmen, daß sich PC-TAP Konformationen bilden, die sich aus Einheiten mit stöchiometrischen Verhältnis 1:1 zusammensetzen. Filmwaagenmessungen an gespreiteten DMPC-DMTAP Filmen zeigen ein deutliches Minimum des Lipidkopfflächenbedarfs bei einem 1:1 Verhältnis (Abb. 3.7, [99]). Eine Erklärung auf molekularer Ebene ist in Abb. 3.8 vorgeschlagen.

3.5. DISKUSSION 49

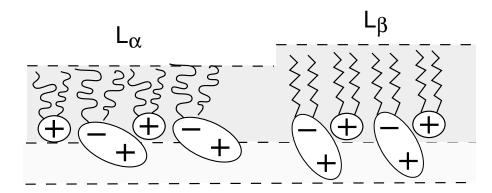


Abb. 3.8: Zur Erklärung der attraktiven Wechselwirkung von DMPC- und DMTAP-Molekülen in equimolarem Mischungsverhältnis.

Die kationischen Trimethylammonium—Gruppen des TAP liegen räumlich im gleichen Abstand vom Kettenbereich der Lipidschicht wie die Phosphatgruppen der Phosphocholine. Die abwechselnde Struktur von kationischen und anionischen Gruppen führt in dieser Ebene zu einer elektrostatischen Anziehung. NMR—Messungen haben gezeigt, daß kationische Kopfgruppen tatsächlich zu einer Veränderung der Cholin—Dipol—Orientierung um mehr als 30° in Richtung senkrecht zu Membranoberfläche führen[75]. Durch die im Vergleich zur Membran hohe Dielektrizitätskonstante des Wassers werden die ins Wasser ragenden Ammoniumgruppen des PC stärker abgeschirmt, was zur Reduktion der elektrostatischen Abstoßung führt. In ihrer molekalur dynamischen Simulationen von Komplexen aus B—DNA und DMPC / DMTAP Membranen fanden Bandyopadhyay et al., daß die DMTAP—Kopfgruppen zu dem beschriebenen Ausklappen der Ammonium—Gruppe der Phosphocholine führt [3].

Erhöhung der Hauptübergangstemperatur der Lipid-DNA-Komplexe

Monte–Carlo–Simulationen von PC–TAP Kopfgruppenanordnungen geben Hinweise auf Entmischung von besser geordneten, equimolaren Untereinheiten und weniger geordneten Bereichen anderer Zusammensetzung [61]. Die stärksten experimentellen Argumente für die Komplexbildung sind: die Ausbildung eines Maximums der Fluiduslinie, im Vergleich zu reinem DMPC die Verschmälerung des Koexistenzgebietes am Maximum der Fluiduslinie und die Verringerung der Kopfgruppenfläche $a_H^{1:1} < \frac{1}{2} \cdot (a_H^{PC} + a_H^{TAP})$ in der kristallinen Phase des Monolayers.

Die Kondensation von DNA an kationische Lipidmembranen erhöht deren Hauptumwandlungs-Temperatur um einige Grad Celsius. In einer theoretischen Untersuchung von Träuble und Eibel ist der Einfluß elektrostatischer Ladungen in der Membran auf des Kettenschmelzen behandelt [86]. Eine gleichmäßige Verteilung elektrostatischer Ladungen führt generell zu einer Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur. Der Temperaturunterschied ΔT_m wird durch die Verringerung des elektrostatischen Anteils an der freien Enthalpie, ΔG_{el} hervorgerufen, d.h. durch den Übergang von der dichteren Kopfgruppenanordnung in der L_{β} -Phase in die entspanntere Kopfgruppenanordnung in der L_{α} -Phase. Der laterale elektrostatische Druck, Π_{el} begünstigt die Zunahme der Kopfgruppenfläche a_H . Die Übergangstemperatur einer geladenen Membran erniedrigt sich im Vergleich zu einer neutralen Membran um:

$$\Delta T_m = \frac{\Delta G_{el}}{\Delta S^*} = \frac{\Pi_{el}}{\Delta S^*} \tag{3.2}$$

 ΔS^* symbolisiert die Entropiezunahme durch das Kettenschmelzen. Unter der Annahme, daß alle kationischen Kopfgruppen disoziieren und ein elektrischen Oberflächenpotential $e\Psi >> k_BT$ vorhanden ist, gibt die klassische Gouy-Chapman-Theorie [38, 86]:

$$\Delta T_m = \frac{2RT}{\Delta S^*} \frac{\Delta A}{A} - (20\epsilon \epsilon_0 RTc)^{1/2} (40RT/e\Delta S^*) \Delta A$$
 (3.3)

Im ersten Term steht die Veränderung der Phasenübergangstemperatur durch die elektrostatische Oberflächenladung. Der zweite Term berücksichtigt den entropischen Anteil der diffusen Schicht, die durch die abschirmenden Gegenionen gebildet wird. Für die in dieser Arbeit verwendeten Lipide kann man die gemessene Zunahme des Lipidkopfflächenbedarfs $\Delta A/A = 0.19$ (Kap. 5.1.1, [98]) und für den von reinem DMPC bekannten Wert für $\Delta S^* = 2 \cdot 10^{22} kT/mol^{\circ}C$ [38] einsetzen. Damit erlaubt Gl. 3.3 die Phasenübergangstemperatur zu berechnen. Z.B. zeigen die Messungen eine tatsächliche Zunahme der Hauptumwandlungstemperatur von Vesikeln einer equimolaren DMPC / DMTAP–Mischung von $\Delta T_m = 2.6^{\circ}C$ durch Zugabe von 10mM NaCl und $\Delta T_m = 4.3^{\circ}C$ durch Zugabe von 100mM NaCl (Abb. 3.9)

Bei einer völligen Abschirmung der elektrostatischen Kopfgruppen durch DNA im Falle von Lipid–DNA–Komplexen, erhielte man unter der Berücksichtigung nur des ersten Terms in Gl. 3.3 eine Erhöhung von $\Delta T_m = 10.8^{\circ}C$. Der gemessene Wert liegt um ca. 5 °C darunter. Man sollte also eine Hauptübergangstemperatur von $T_m^{max} + \Delta T_m = 37^{\circ}C + 10.8^{\circ}C = 47.8^{\circ}C$ finden, die jedoch über den gemessenen Übergangstemperaturen liegt (Abb. 3.9).

Für eine korrekte Beschreibung der Hauptübergangsverschiebung in DMPC / DMTAP-Membranen, die durch die Komplexierung mit DNA hervorgerufen wird,

3.5. DISKUSSION 51

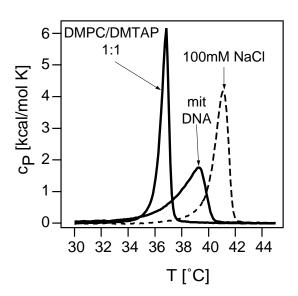


Abb. 3.9: Vergleich der DSC-Hauptumwandlungspeaks einer equimolaren DMPC / DMTAP-Mischung mit und ohne DNA. Zugabe von Salz führt ebenso wie Anlagerung von DNA zu einer Verschiebung des Maximums zu höheren Temperaturen.

muss der Beitrag des DNA-Gitters zur freien Energie berücksichtigt werden. Dabei sind die Erkenntnisse über die molekulare Anordnung der DNA in den Galerien mittels Röntgenstreuung von zentrale Bedeutung (Kap. 5, 4 und Referenzen [63, 98]). Daher ist für elektroneutrale Lipid-DNA-Komplexe bekannt, daß die DNA-Moleküle parallel und in einem definierten Abstand d_{DNA} zueinander angeordnet sind. d_{DNA} ist durch die Oberflächenladungsdichte der Membran bestimmt. Die Bildung einer wohlgeordneten Gegenionenschicht aus DNA-Molekülen dient zur elektrostatischen Neutralisation der Membran-Flächenladungsdichte. In der Nähe des DNA-Abstandes $d_{(1/2)}$ bei χ_{TAP} =0.5 findet man experimentell folgende Näherungsformel für d [98, 63]:

$$d_{DNA} \approx \frac{d_{1/2}}{2 \cdot \chi_{TAP}} \tag{3.4}$$

Um den Energiebeitrag der elektrostatischen Repulsion zu berücksichtigen, betrachtet man die laterale Kompressibilität der DNA-Moleküle innerhalb einer Galerie [73, 74]:

$$B_{el}^{DNA} = -d_{DNA} \left(\frac{\partial \Pi_{el}}{\partial d_{DNA}}\right)_T = \frac{\lambda^2}{6\pi\epsilon d_{DNA}}$$
(3.5)

 $\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$ ist die Dielektrizitätskonstante von Wasser und $\lambda = e/1.7 \text{Å}$ ist die Linienladungsdichte der DNA in B-Form. Der zweidimensionale Kompressionsmodul hat die Einheit Energie pro Fläche und wurde durch diffuse Röntgenstreuung am DNA-Gitter

bestimmt [73, 74].

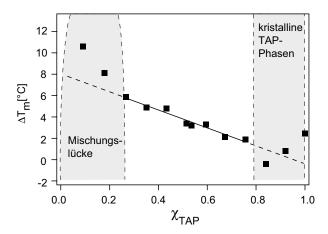


Abb. 3.10: Die Veränderung der Hauptumwandlungstemperatur ΔT_m aufgetragen gegen χ_{TAP} . Im mittleren χ_{TAP} -Bereich stimmt die theoretische Vorhersage einer linearen χ_{TAP} -Abhängigkeit (durchgezogene Linie) gut mit den Meßdaten (\blacksquare) überein. Links und rechts davon verhindert die Mischlücke und das komplizierte Verhalten der kristallinen DMTAP-Phasen einen direkten Vergleich.

Durch das Kettenschmelzen beim Hauptübergang expandiert die Membran lateral, was eine Abnahme der Flächenladungsdichte zur Folge hat. Die Veränderung der elektrostatischen freien Energie ist ungefähr $\Delta F/A = \Delta [1/2B(d_{DNA}/d_0)^2] \approx B(\Delta d/d_{DNA}]$. Das bedeutet, daß die Änderung der Hauptübergangstemperatur durch den ersten Term in Gl. 3.3 und Gl. 3.5 abgeschätzt werden kann, indem berücksichtigt wird, daß das DNA-Gitter (i) die Membranoberflächenladung komplett kompensiert und (ii) eine endliche laterale elektrostatische Kompressibilität hat.

$$\Delta T_m = \frac{2RT}{\Delta S^*} \frac{\Delta A}{A} - \frac{\Delta A}{\Delta S^*} B_{el}^{DNA} \frac{\Delta d}{d}$$
(3.6)

Gl. 3.6 stimmt gut mit den experimentellen Werten der Verschiebung der Hauptübergangstemperatur überein, wie in Abb. 3.10 gezeigt. Setzt man Gl. 3.4 in Gl. 3.5 ein sieht man, daß B_{el}^{DNA} linear von χ_{TAP} abhängt. Die Hauptumwandlungstemperaturänderung $\Delta T_m = T_A - T_B \cdot \chi_{TAP}$ ist also ebenfalls linear in χ_{TAP} . Für $(d_{1/2}) = 36 \mathring{A}$ ergibt sich aus Gl. 3.5 $B_{el}^{DNA} = 2 \cdot 10^{-2} kT/\mathring{A}^2$. Für diesen Wert ist $T_A = 10.8$ °C und $T_B = 7.6$ °C bei Verwendung der sonst gleichen Werten wie zuvor $(\Delta A/A = \Delta d/d = 0.19, \Delta S^* = 2 \cdot 10^{22} kT/mol$ °C). Die experimentellen Werte liegen bei $T_A = 11$ °C und $T_B = 13$ °C in mittleren χ_{TAP} -Bereich. Noch bessere Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erhält man unter Verwendung der von

3.5. DISKUSSION 53

Salditt et al. ermittelten experimentellen Wertes für $B_{el}^{DNA}=2.8\cdot 10^{-2}kT/\mathring{A}^2$ bei $d_{1/2}$ [74]. Für kleine und große χ_{TAP} -Werte lassen sich Experiment und Theorie nicht vergleichen. Das liegt einerseits an der Mischungslücke im Lipid-DNA-Komplex Phasendiagramm und andererseits an den instabilen festen bzw. kristallinen Phasen im Lipid-Phasendiagramm (Abb. 3.3 und 3.10).

Die relativ gute Übereinstimmung zwischen der angewendeten Theorie und Experiment ist angesichts der hohen Komplexität des betrachteten Systems überraschend. Dies ist auf folgende Punkte zurückzuführen. Erstens führt die Neutralisation der Membranoberflächenladung durch die Anlagerung der DNA zur Auflösung der Gouy-Chapman-Schicht der im Lösungsmittel gelösten, neutralisierenden Gegenionen, indem die DNA in Form einer Stern-Schicht (siehe z.B. [32]) die Funktion der Gegenionen übernimmt. Zweitens spielen kurzreichweitige Kräfte eine untergeordnete Rolle, da aus den Röntgenexperimenten bekannt ist, daß der Abstand zwischen DNA und Lipidoberfläche 2 Å beträgt, und sich die DNA-Moleküle weder überschneiden noch berühren. Darüber hinaus wird der Einfluß von monovalenten Salzionen auf die geladenen Membranen gut durch die Gouy-Chapman-Theorie beschrieben, was Voraussetzung für die erweiterte Anwendung dieser auf die DNA-Schicht ist.

DMPE hat mit 48 °C eine ähnliche Hauptübergangstemperatur wie die völlig neutralisierte, equimolare DMPC / DMTAP–Mischung, berechnet nach dem ersten Term in Gl. 3.3. In diesem Fall ordnen sich die PC und TAP–Köpfe ähnlich günstig an wie DMPE, was sich möglicherweise in ähnlichem Hydratationsverhalten ausdrückt. Die absolute Enthalpieänderung konnte für die Lipid–DNA–Komplexe nicht gemessen werden. Das liegt daran, daß die koagulierten Komplexe nicht in einer genau definierten Menge in die schwerzugänglichen Meßkammern des verwendeten DSC–Gerätes gebracht werden konnten. Die in Tab. 3.1 zusammengefaßten Enthalpieänderungen von 6 auf 3-5 kcal/mol zeigen Ähnlichkeit zu Enthalpieänderung von negativen Membranen in Anwesenheit von Cytochrom C [30]. Interessanter als die Übergangsenthalpie ist die Enthalpie, die bei Bildung der Lipid–DNA–Komplexe frei wird. Diese wurden mittels Titrations–Kalorimetrie gemessen [80]. Abschließend sei gesagt, daß die markante Verbreiterung des Hauptübergangpeaks im Falle der Lipid–DNA–Komplex die Frage aufwirft, ob die Verbreiterung durch DNA–induzierte laterale Phasenseparation bedingt ist.

4. Neutronenstreuung: Ermittlung der Schichtdicken mit Hilfe eines Streifen-Modells

Die Rekonstruktion der Elektronendichteprofile mit Hilfe von Röntgenstreuung ist limitiert durch die kanonische Auflösung definiert durch d/h_{max} , wobei d der lamellare Abstand und h die höchste Ordnung der meßbaren Röntgenreflexe ist. McIntosh und Simon konnten in Modellrechnungen zeigen, daß eine leichte Veränderung der Position der stark streuenden Phosphatgruppen in multilamellaren Lipid-Doppelmembranen um wenige Å zu signifikanten Änderungen des Fourierdichteprofils führen [54]. Das bedeutet, daß die Positionen großer Gradienten der Streuamplitude von angrenzenden Streifen in Streifenmodellen mit einer Auflösung von wenigen Å bestimmt werden können. Das trifft nicht für schwache Gradienten zu. Eine deutlich verbesserte Auflösung kann man also erhalten, wenn man die Gradienten an den verschiedenen Positionen des Streifenmodells variiert. Am effektivsten geschieht dies durch Kontrastvariation in Verbindung mit Neutronenstreuung.

4.1 Experiment und Ergebnisse

Zur Bestimmung der molekularen Anordnung von Lipiden, DNA und Wasser in lamellaren Lipid–DNA–Komplexen wurde Kleinwinkelneutronenstreuung in Verbindung mit Kontrastvariation verwendet. Dazu wurden Lipid–DNA–Komplexe hergestellt, die verschiedene Molbrüche von deuterierten Lipid–Ketten enthielten. Außerdem wurden als Lösungsmittel verschiedene Konzentrationen von D_2O in H_2O verwendet. Der Molbruch von PC–Kopfgruppen in den Membranen ist bei allen Proben χ_{PC} =0.7, außerdem enthalten alle Proben die gleiche Menge an DNA, so daß sie ladungsneutral sind.

Im ersten Datensatz wurde der D₂O–Anteil im Wasser x_{D_2O} =0.63 so gewählt, daß die DNA kontrastneutralisiert ist, d.h. daß die Streulängendichte des Lösungsmittels genau der der DNA entspricht. Variiert wurde in 8 Proben der Molbruch $x_{d_{54}}$ der

deuterierten Lipidketten, der 0%, 40%, 55%, 65%, 70%, 75%, 85% und 100% betrug. Dabei wurden bei den ersten 5 Proben DMPC durch DMPC- d_{54} substituiert, so daß bei Proben mit $x_{d_{54}} \le 0.7$ nur die Ketten der PC-Lipide deuteriert waren. Bei $x_{d_{54}} > 0.7$ wurden die DMTAP-Moleküle durch DMTAP- d_{54} substituiert d_{54} .

Für einen zweiten Datensatz wurden vier Proben hergestellt, indem jeweils in H₂O und D₂O Lipid–DNA–Komplexe präpariert wurden. Je eine Lipidsorte war deuteriert, die andere protoniert. Möglicherweise tritt DNA–induzierte Phasenseparation der Lipide mit der gleichen Periodizität wie im DNA–Gitter auf. Dies ließe sich ausnützen, um den Kontrast der DNA und dadurch die von ihr resultierende diffuse Streuamplitude zu verstärken. In Abb. 4.1 A und B wird die Probe DMTAP in D₂O als Probe 1, DMPC–d₅₄ in H₂O mit Probe 2, DMTAP–d₅₄ in H₂O mit Probe 3 und die Probe DMPC–d₅₄ in D₂O als Probe 4 bezeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline D11 am ILL–Grenoble durchgeführt.

Die Neutronenkleinwinkelstreudaten bei 15 °C (A und C) und bei 57 °C (B und D) sind ohne Korrekturen in Abb. 4.1 dargestellt. Bei den meisten Datensätzen sind die ersten vier lamellaren Ordnungen korrespondierend mit dem lamellaren Wiederholabstand d_{lam} zu sehen. Im Gegensatz zu den Röntgenmessungen ist kein DNA–Korrelationspeak zu finden. Lediglich in Abb. 4.1 könnten die diffusen Peaks in den Kurven 3 und 4 rechts neben der ersten lamellaren Ordnung auf DNA–Korrelation hinweisen. Dagegen spricht allerdings, daß die Position des möglichen DNA–Peaks deutlich zu kleineren q-Werten verschoben ist im Vergleich zu den Röntgendaten an einer Probe vergleichbarer Lipidzusammensetzung bei 60 °C (Abb. 5.6).

Der durchschnittliche lamellare Wiederholabstand in der Gelphase (fluiden Phase) ist 75.63 (65.77) Å mit einer Standardabweichung von 0.64 (1.23) Å. Wie zu erwarten schwanken die Intensitäten der Peaks stark aufgrund der unterschiedlichen Deuterierungsgrade und der damit verbundenen Unterschiede im Streulängenprofil. Besonders aufällig ist, daß in Abb. 4.1 C und D die Fläche der ersten lamellaren Ordnung zunächst mit steigendem Molbruch an deuterierten Lipidketten abnimmt und ab 65% wieder zunimmt. Die Intensitäten der zweiten und dritten Ordnungen nimmt mit dem Molbruch der deuterierten Lipidketten zu.

¹Auf diese Weise hätte Phasenseparation der Lipide innerhalb der Membranen durch Extrapolation der Intensität I(q=0) untersucht werden können. Entsprechende Arbeiten konnten laterale Phasenseparation von DMPC–DSPC–d₅₄, DMPC–d₅₄–DMPA und DMPC–Cholesterol Mischungen nachweisen [41, 42]. Im Falle der Lipid–DNA–Komplexe fällt bei allen Proben im Kleinwinkelbereich die Streuintensität mit $q^{-\eta}$ ab. Die Werte für η fallen von 3.74 (0%) auf 1.9 (0.65%) ab, und steigen wieder bis auf 3.67 (100%) an. Dieses für polydisperse Systeme charakteristische Verhalten bei kleinen Winkeln, macht die Extrapolation der Intensität zu q=0 unmöglich und verhindert so die Bestimmung von lateraler Phasenseparation.

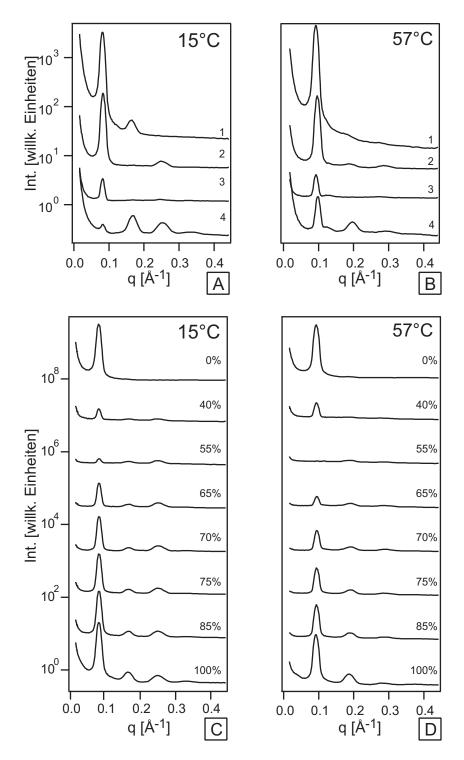


Abb. 4.1: Kleinwinkelneutronenstreudaten an ladungsneutralen Lipid-DNA-Komplexen mit konstantem Verhältnis an PC/TAP-Kopfgruppen von 70/30. (A) 15 °C (1) PC TAP- d_{54} in D_2O , (2)PC- d_{54} TAP in H_2O , (3) PC TAP- d_{54} in H_2O , (4) PC- d_{54} TAP D_2O . (B) 57 °C gleiche Proben (1),(2),(3),(4) wie in (A). (C) 15 °C. Die DNA in den Wasserschichten ist kontrastneutralisiert in x_{D_2O} =0.63. Die Prozentzahlen geben den Molbruch der deuterierten Lipidketten an. Bis 70% werden nur Ketten an PC-Köpfen deuteriert. Darüber ebenfalls Ketten der TAP-Moleküle. (D) Proben wie (C) jedoch bei 57 °C.

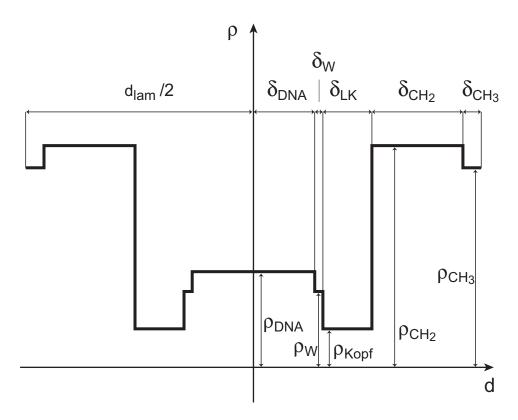


Abb. 4.2: Zur Anpassung der Neutronendaten verwendetes Streifenmodell. Der halbe lamellare Wiederholabstand d_{lam} setzt sich aus den eingezeichneten Streifen zusammen. Die horizontale Achse mißt den Abstand vom DNA–Zentrum in Richtung der Flächennormalen der Lamellen. Die vertikale Achse entspricht der Streulängendichte ρ des jeweiligen Kastens.

Die durch die Kontrastvariation unterschiedlichen Peakintensitäten lassen sich ausnützen, um unter Zuhilfenahme eines geeigneten Streifenmodells, die Schichtdicken der einzelnen Bereiche zu bestimmen. Dabei geht man folgendermaßen vor: Man wählt sich eine geeignete Repräsentation der Struktur durch Streifen mit unterschiedlichen Streulängendichten. Für das Streifenprofil berechnet man die ersten Fourierkoeffizienten und vergleicht diese den gemessenen Intensitäten der Peaks entsprechender Ordnungen. Durch Minimierung einer geschickt gewählten Vergleichsgröße zwischen modellierten und gemessenen Werten erhält man als Ergebnis die Streifenbreite der einzelnen Molekülschichten.

4.2 Streifenmodell

Die Wahl der Anzahl der zu verwendenden Streifen wird zunächst abgeschätzt durch Vergleich mit den rekonstruierbaren Streulängenprofilen [40]. Außerdem sollte die Schichtdicke der einzelnen Streifen nicht deutlich kleiner sein als die halbe kanonische Auflösung $d/2h_{max}[4]$. Im vorliegenden Fall beträgt diese etwa 75 Å/8=9.4 Å. Die endgültige Wahl trifft man durch Anpassen des Modells mit verschiedenen Streifenkonfigurationen und durch Vergleich der Übereinstimmung von Modell und Meßdaten. Im Vordergrund steht dabei, mit einer möglichst geringen Anzahl von Streifen möglichst gute Übereinstimmung mit dem Modell zu erzielen.

In Abb. 4.2 ist das nach diesen Kriterien ausgewählte Streifenmodell abgebildet. Der halbe lamellare Abstand setzt sich demnach aus 6 Streifen zusammen. δ_{DNA} entspricht dem DNA-Radius, δ_w der Dicke der Wasserschicht zwischen DNA und Lipidköpfen, δ_{LK} der Schichtdicke der Lipidköpfe, δ_{CH_2} und δ_{CH_3} den Kettenbereichen mit CH₂und CH₃-Gruppen im hydrophoben Bereich der Lipidmembran.

Um ein Maß für die Übereinstimmnug zwischen Modell und Meßdaten zu erhalten, vergleicht man die gemessenen Fourierkoeffizienten der h-ten Ordnung $F_{obs}(h)$ mit denen, die man aus dem Streifenmodell berechnet. Sie werden mit $F_{calc}(h)$ bezeichnet und lassen sich folgendermaßen berechnen [40]:

$$A_{calc}(h) = \frac{d}{\pi} \sum_{i=1}^{n-1} (\rho_i - \rho_{i+1}) \frac{\sin(2\pi h d_i/d)}{h}$$
(4.1)

Als Maß für die Übereinstimmung von F_{calc} und F_{obs} ist in dieser Arbeit der R-Wert folgendermaßen definiert:

$$R = \sum_{h} \frac{|A_{calc}(h) - k(A_{obs}(h))|}{|A_{calc}(h)| + k|A_{obs}(h)|}$$
(4.2)

wobei k eine Proportionalitätskonstante ist, die z.B. unterschiedliche Mengen an Material im Strahl ausgleicht. Sie läßt sich definieren als:

$$k = \left[\frac{\sum_{h} |A_{calc}(h)|^2}{\sum_{h} |A_{obs}(h)|^2} \right]^{1/2}$$
(4.3)

Der R-Wert ist gegenüber früheren Arbeiten modifiziert, in denen er durch

$$R' = \frac{\sum_{h} ||A_{calc}(h)| - k|A_{obs}(h)||}{\sum_{h} |A_{calc}(h)| + k|A_{obs}(h)|}$$

definiert wurde (siehe z.B. [94]). Durch diese Definition werden jedoch kleine Absolutwerte der Fourierkoeffizienten schwächer gewichtet als große, was jedoch physikalisch ρ_{H_2O} ρ_{D_2O} ρ_{DNA} ρ_{LK} ρ_{CH_2} ρ_{CD_2} ρ_{CH_3} ρ_{CD_3} -0.00562 0.06404 0.034 $+0.007x_{D_2O}$ 0.011 -0.0031 0.0744 -0.0085 0.0495

Tab. 4.1: Verwendete Streulängendichten in $[10^{-12}cm\text{\AA}^{-3}]$ (aus Ref. [37]). DNA ist bei $x_{D_2O}=0.63$ kontrastneutralisiert.

nicht zu begründen ist. In Gl. 4.2 werden alle Fehler relativ berücksichtigt. Diese Wahl des R-Wertes führt im Gegensatz zu der zitierten zu realistischeren Werten der Breiten im Streifenmodell.

Der R–Wert wurde in der vorliegenden Arbeit durch Variation der Werte δ_w , δ_{LK} , δ_{CH_2} und δ_{CH_3} minimiert. Für die Werte ρ_i der Streulängendichten der einzelnen Komponenten wurden die in der Literatur übereinstimmend angegebenen Zahlen verwendet. Sie sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt. δ_{DNA} ist der bekannte DNA–Radius (10 Å) und wird bei der Datenanpassung festgehalten. Minimierung von R unter Variation von δ_{DNA} ergab für die L^C_β -Phase den Wert 11 Å in der L^C_α -Phase den Wert 9 Å.

Die aus den Streudaten ermittelten lorentzkorrigierten Streuamplituden $A_{obs} = q \cdot \sqrt{I}$ sind in Tab. 4.2 zusammen mit den endgültig gewählten Vorzeichen σ angegeben.

4.3 Wahl der Vorzeichen

Die Wahl der Vorzeichen $\sigma(h)$ wurde schrittweise durchgeführt. Zunächst werden die Vorzeichen so gewählt, daß die eindimensionale Fourierentwicklung

$$\rho(d) = \sum_{h} \sigma(h) A_{obs}(h) \cos 2\pi dh / d_{lam}$$
(4.4)

den rekonstruierten Streulängendichteprofile der erwarteten Form der Einheitszelle ähnelt. Dabei sind zusätzlich kontinuierliche Entwicklungen von A_{obs} hilfreich, wie z.B. anhand der ersten und dritten Ordnung in Abb. 4.1 C und D deutlich wird. Die monoton zunehmende Amplitude der 3. Ordnung macht einen Vorzeichenwechsel für diese Ordnung unwahrscheinlich. Die abnehmende und danach zunehmende Intensität der ersten Ordnung ist ein klarer Hinweis darauf, daß sich das Vorzeichen in der Nähe des minimalen Punktes ändert. Die Bestimmung des Vorzeichens des Formfaktors in der unmittelbaren Umgebung des Nulldurchganges ist dabei schwierig. Diese Information kann man erhalten, indem man mit den vorerst gewählten Vorzeichen den R-Wert unter Berücksichtigung der Formel aus Gl. 4.2 minimiert. Die Vorzeichen

C	1	

			$x_{D_2O} = 0.63$						PC-	$-d_{54}$	TAP	$ m -d_{54}$	
	Ord.	0%	40%	55%	65%	70%	75%	85%	100%	D_2O	H_2O	D_2O	H ₂ O
F_{obs}	I	1.0	0.187	0.104	0.343	0.495	0.596	0.719	1.064	0.072	1.271	1.066	0.299
	II	0	0.137	0.184	0.213	0.223	0.256	0.293	0.398	0.402	0.077	0.233	0.150
	III	0	0.312	0.411	0.490	0.537	0.554	0.567	0.585	0.499	0.602	0	0.247
	IV	0.146	0	0.138	0.161	0.184	0.224	0.271	0.367	0.282	0.434	0	0.150
σ	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
$\overline{\mathrm{F}_{obs}}$	I	1.0	0.270	0	0.191	0.326	0.413	0.526	0.843	0.028	1.187	1.163	0.321
	II	0.192	0.243	0.204	0.264	0.296	0.321	0.353	0.476	0.322	0.239	0	0.000
	III	0	0.331	0.214	0.281	0.303	0.301	0.293	0.265	0.217	0.423	0	0.247
	IV	0.119	0.000	0.000	0.144	0.150	0.163	0.170	0.274	0.000	0	0	0
σ	I	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	_	-	-	_

Tab. 4.2: Lorentzkorrogierte, beobachtete Streuamplituden $F_{obs} = q\sqrt{I}$ und ermittelte Phasen σ von isoelektrischen Lipid–DNA–Komplexen mit einer Lipid–Zusammensetzung von PC:TAP=70:30.

der berechneten Streuamlituden A_{calc} werden nun in $\sigma(h)$ übernommen und R wird erneut minimiert. Auf diese Weise erhält man als Ergebnisse die exakte Wahl der Vorzeichen und damit die Lösung des Phasenproblems und zweitens die in Tab. 4.3 aufgeführten Breiten der jeweiligen Streifen des gewählten Streifenmodells.

4.4 Diskussion

Die unter Berücksichtigung der endgültigen Vorzeichen-Wahl mit Gl. 4.4 rekonstruierten Streulängendichteprofile sind in Abb. 4.3 dargestellt. Die dünnen vertikalen Linien geben die Positionen der unterschiedlichen Streifen an, die mit den jeweils unten schwach eingezeichneten Verteilungen der Moleküle zu begründen sind.

Die Streulängendichte der DNA ist größer als die der Kopfgruppen, und das Verhältnis wird in diesem Datensatz konstant gehalten. Von oben nach unten nimmt die Konzentration der deuterierten Lipid-Ketten in den Membranen zu, was sich durch die deutliche Vergrößerung der Streulängendichte im hydrophoben Bereich der

4.4. DISKUSSION 61

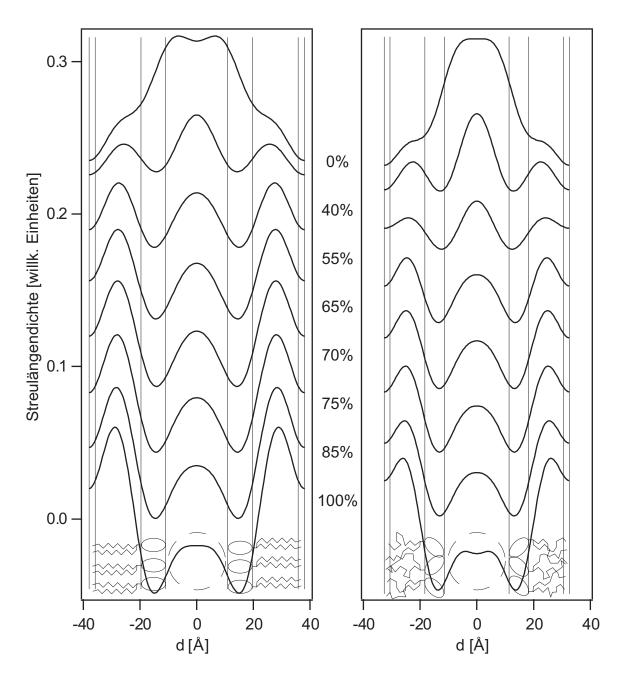


Abb. 4.3: Aus vier lamellaren Ordnungen rekonstruierte Streulängendichteprofile der Lipid–DNA–Komplexe mit unterschiedlichen Deuteriumanteil der $\mathrm{CH_2}$ –Gruppen im Kettenbereich. Links bei 15°C, rechts bei 57°C. Die dünnen, vertikalen Linien geben die im Streifenmodell verwendete Unterteilung in Wasser-, Kopfgruppen-, $\mathrm{CH_2}$ - und $\mathrm{CH_3}$ –Bereiche an. Die Prozentzahlen geben den Molbruch $\mathrm{x}_{d_{54}}$ der deuterierten Ketten an.

	d_{lam}	δ_{DNA}	δ_w	δ_{LK}	δ_{CH_2}	δ_{CH_3}
L^C_{β}	75.63	10.0	0.93	8.65	16.07	2.16
L_{α}^{C}	65.77	10.0	1.32	7.0	12.30	2.08

Tab. 4.3: Durch Anpassung des Streifenmodells ermittelte Werte für die einzelnen Schichtdicken. δ_{DNA} entspricht dem bekannten DNA–Radius und wird bei der Datenanpassung festge-

Lipidketten ausdrückt. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, daß in beiden Phasen das Minimum hervorgerufen durch die CH₃Gruppen im Zentrum des hydrophoben Bereichs ein charakteristischer Bestandteil der Streulängendichteprofile ist.

Es wurde darauf verzichtet, die aus der Literatur übernommenen Streulängendichten der einzelnen Streifen als variable Parameter bei der Minimierung des R-Wertes zu verwenden, um die Zahl der frei wählbaren Parameter klein zu halten. Ebenso wurde bewußt zur Interpretation der Daten das einfachst mögliche, nämlich das Streifenmodell gewählt. Verfeinerte Methoden, die die zu untersuchende Struktur detaillierter auflösen könnten, bergen die Gefahr, die Daten zu überinterpretieren. Ein Beispiel dafür ist das quasimolekulare Modell, in dem anstelle der Streifen konstanter Streulängendichten eine Summe über eine größere Anzahl von Gaußkurven verwendet wird, die jeweils eine zu wählende molekulare Untereinheit in den Molekülen repräsentieren [54]. Dadurch hofft man die Rauhigkeit bzw. diffuse Übergänge zwischen den unterschiedlichen Schichten zu modellieren. Die Anzahl der anzupassenden Parameter wird dadurch jedoch mehr als verdreifacht und gleichzeitig hängt das Ergebnis stärker als beim Streifenmodell von der Wahl der Parametrisierung ab.

Trotz der Einfachheit des gewählten Modells und der geringen Anzahl der anzupassenden Parameter sind die berechneten Werte des Streifenmodells im erwarteten Bereich. Schon durch geringe Variation der Parameter um die angepaßten Minimalwerte steigt der R-Wert drastisch an, was zu einer Auflösung von 1 bis 2 Å führt [92].

Die ermittelte Breite des CH₂-Streifens von 16.07 Å stimmt gut mit der Kettenlänge einer ausgestreckten (all-trans) C-14 Alkylkette überein. Der auf die Längsachse projizierte Abstand zwischen zwei einfach gebundenen C-Atomen beträgt 1.125Å. Damit ergibt sich für 14 Bindungen eine Kettenlänge von 15.75Å.

Für multilamellare DMPC $-d_{54}$ -Doppelschichten ermittelten Lemmich et al. in die Schichtdicke des hydrophoben Kettenbereich zu 32.1 Å und die der Lipid Köpfe zu 4.4. DISKUSSION 63

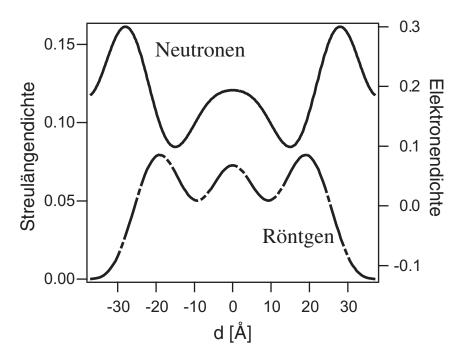


Abb. 4.4: Vergleich von rekonstruiertem Streulängendichteprofil durch SANS und Elektronendichteprofil durch SAXS.

7.2 Å bei einer Temperatur von 15 °C [46]. Berücksichtigt man den Neigungswinkel der Lipidketten von reinem DMPC in der Gelphase von ca. 30° gegenüber der Flächennormalen [87], findet man für die Schichtdicke des gesamten hydrophoben Bereichs $(2(\delta_{CH_2}+\delta_{CH_3})=36.46$ Å) vergleichbare Werte: $32.1\text{Å}/\cos30^\circ=37.0659\text{Å}$. Die WAXS-Messungen in Kap. 3.4 zeigen, daß die Komplexierung mit DNA im Bereich von $\chi_{PC}\approx 0.75$ in DMPC / DMTAP-Mischungen diese Kettenneigung tatsächlich stark reduziert. Die hier gefundene Schichtdicke der Kopfgruppen ist mit 8.65 Å etwas größer als für multilamellare Strukturen reiner Phosphocholinmembranen (z.B. für DMPC-d₅₄ 7.2 Å [46], für DPPC 8 Å [9, 10] bzw. 7.4 Å [91]). Dieser Effekt läßt sich mit der durch die DNA-hervorgerufene Orientierung der Phoshatidylcholin-Kopfgruppen erklären (siehe Kap. 3.5).

Auch die gefundene Schichtdicke der Kopfgruppen in der fluiden Phase ist etwas geringer als die etwa von fluidem DPPC (ca. 6 Å [9, 10]), was sich ebenfalls auf die durch die DNA und die kationischen Lipide bedingte Umorientierung der Kopfgruppen zurückführen läßt. Die Abnahme von d_{lam} in der fluiden Phase gegenüber der Gelphase wird größtenteils durch die Abnahme von δ_{CH_2} hervorgerufen. Dies ist zu erwarten, da die Lipid–Ketten beim Schmelzen von der ausgestreckten in eine teilweise

abgeknickte Konformation übergehen [13].

Besonders interessant ist die Beobachtung, daß sich die Wasserschicht in der fluiden Phase zwischen DNA und Membran etwas stärker darstellt als in der Gelphase. Dies ist in Übereinstimmung mit den aus den Röntgendaten rekonstruierten Elektronendichteprofilen in Kap. 5.1.1.

In Abb. 4.4 sind zum Vergleich das Streulängendichteprofil von Lipid-DNA-Komplexen mit 70% deuteriertem PC, 30 % hydrogeniertem TAP mit kontrastneutralisierter DNA (63% D₂O) und das aus Röntgendaten einer entsprechende nicht deuterierten Probe gezeigt. Beide Profile sind mit der gleichen kanonischen Auflösung gezeigt, indem jeweils die Intensitäten der ersten vier Reflexe der SANS bzw. SAXS-Daten verwendet wurden. Man beachte, daß im Streulängendichteprofil der Neutronen an der Stelle der Kopfgruppen ausgeprägte Minima sind, wobei im Gegensatz dazu die Phosphatgruppen der Phosphocholine sehr hohe Elektronendichten besitzen, was an deren Positionen zu deutlichen Maxima führt. Das Zentrum dieser Maxima der Phosphatgruppen in der Elektronendichte ist um 4.24 Å weiter vom Zentrum der Wasserschicht entfernt. Diese Verschiebung resultiert aus der mittleren Distanz zwischen der Mitte des im Streifenmodell für die Kopfgruppen verwendeten Bereichs und der der Phosphatgruppen in den Phosphocholinen.

Unter diesem Aspekt ist die Kontrastvariation des Neutronenexperimentes hilfreich für die Lösung des Phasenproblem der ersten vier lamellaren Reflexe der Röntgendaten im nächsten Kapitel.

5. Die mesoskopische Struktur von lamellaren Lipid-DNA-Komplexen

Messungen der mesoskopischen Anordnung von Flüssigkristallen geben neben rein strukturellen Informationen unter Umständen Zugang zu weiteren physikalischen Parametern wie z.B. den anisotropen thermischen Ausdehnungskoeffizienten oder der Biegesteifigkeit von Membranen. Dazu ist es nötig, den periodischen Abständen die im Röntgenspektrum auftretenden Reflexe zuzuordnen. Eine typische Röntgenmessung an einer Pulver-Probe eines Lipid-DNA-Komplexes ist in Abb. 5.1 gezeigt. Dabei wird die Intensität logarithmisch gegen den Betrag der reziproken Koordinate q aufgetragen, um den im Verhältnis zu den lamellaren Peaks ca. 100 fach schwächeren DNA-Peak (mit dem Pfeil gekennzeichnet) sichtbar zu machen. Die ersten drei Ordnungen der lamellaren Bragg-Peaks sind sichtbar und geben den Wiederholabstand d_{lam} der Lipid-Membranen in Richtung deren Flächennormaler an. Der diffuse, deutlich verbreiterte DNA-Peak ist ein Maß für den Wiederholabstand d_{DNA} der DNA-Moleküle senkrecht zu deren Längsachse und parallel zu den Lipid-Membranen. Der Wiederholabstand der Alkylketten d_c in den Membranen läßt sich durch die Position des WAXS-Reflexes (Einsatz in Abb. 5.1) bestimmen. Dabei ist zu beachten, daß bei den verwendeten Lipiden auf eine Lipidkopfgruppe jeweils zwei Alkylketten kommen, was bei der Bestimmung des Flächenbedarfs eines Lipides in der Membran zu berücksichtigen ist. Außerdem können wie im letzten Kap. 3.4 beschrieben die Ketten geneigt sein, was ebenfalls in die Bestimmung des Lipidflächenbedarfs eingeht.

5.1 Thermotrope strukturelle Veränderungen

5.1.1 Experimentelle Ergebnisse

Eine Serie von SAXS- und WAXS-Messungen an einer equimolaren, isoelektrischen Pulverprobe aus DMPC:DMTAP-DNA (1:1-1) bei verschiedenen Temperaturen ist in Abb. 5.2 A gezeigt. SAXS und WAXS Mesungen wurden simultan an der Beamline X13 (DESY Hamburg) nach einer jeweils 15 minütigen Temperatur-Equilibrierung

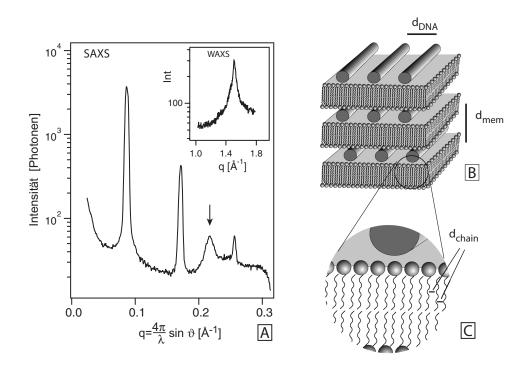


Abb. 5.1: Charakteristische Kleinwinkelröntgenmessung (SAXS) eines lamellaren Lipid–DNA–Komplexes (**A**) zur Messung des Membranabstandes (d_{mem}) und des DNA–Abstandes (d_{DNA}). Der zugehörige WAXS–Reflex ist vekleinert dargestellt. In (**B**) ist eine schematische Darstellung eines lamellaren Lipid–DNA–Komplexes gezeigt. Die Galerien, in denen die DNA–Stränge parallel zueinander angeordnet sind, werden von Lipid–Doppelschichten voneinander getrennt. In (**C**) ist die Kettenregion vergrößert. Mittels WAXS ist es möglich, die Abstände d_{chain} der Alkylketten zu messen.

aufgenommen. Bei 15 °C zeigt der WAXS–Reflex an, daß sich die Membran in der L^C_β –Phase befindet. Zwischen 35 und 45 °C weicht der intensive WAXS–Peak einem deutlich verbreiterten Peak, wobei sich das Maximum zu niedrigerem q verschiebt. Innerhalb dieses Temperaturintervalls ändert sich die Position des DNA–Peaks zu kleineren q–Werten und die Positionen der lamellaren Peaks hin zu höheren q–Werten. Also vergrößert sich der DNA–Abstand bei gleichzeitiger Verringerung des Membranabstandes.

In Abb. 5.3 sind Messungen mit einem 1 °C-Abstand gezeigt. Man sieht, daß zwischen 39 und 43 °C eine Koexistenz von zwei lamellaren Peak-Serien auftritt. Bei 42 °C haben die Peaks der jeweils zweiten Ordnung die gleiche Fläche. Es bietet sich an, diesen Punkt aus struktureller Sicht als Phasenübergang zu definieren. In Abb. 5.4 A sind die gemessenen Abstände der Membranen (\blacksquare), der DNA(\bullet) und der Ketten (\blacktriangle) gegen die Temperatur aufgetragen. d_{DNA} vergrößert sich sprunghaft von 29 auf

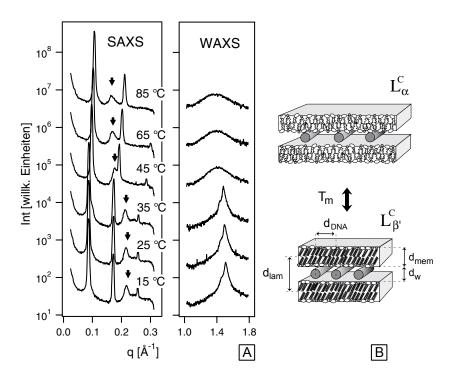


Abb. 5.2: SAXS und WAXS Messungen bei steigender Temperatur (angegeben) an einem isoelektrischen DMPC / DMTAP–DNA Komplex mit xtap=0.5 (A). Der DNA–Korrelationspeak ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Zwischen 35 °C und 45 °C verschwindet der scharfe WAXS–Reflex und zeigt damit den Übergang der Membran von der L_{β} in die L_{α} Phase an (schematisch in (B) dargestellt). Dabei verringert sich der lamellare Wiederholabstand d_{lam} , bei gleichzeitiger Vergrößerung des DNA Abstandes d_{DNA} .

35 Å bei der Phasenübergangstemperatur von etwa T_{trans} = 42 °C und steigt unterund oberhalb davon linear mit der Temperatur an. d_{lam} zeigt exakt gegenläufiges Verhalten und verringert sich bei T_{trans} von 73 auf 65 Å.

In Abb. 5.4 B sind Elektronendichteverteilungen senkrecht zu den Membranen in dem Lipid-DNA-Komplexe aus der equimolaren und elektrisch neutralen DMPC / DMTAP-DNA Mischung bei drei verschiedenen Temperaturen abgebildet. Zur Berechnung wurden die sieben meßbaren Ordnungen der lamellaren Reflexe auf den Lorentzfaktor korrigiert und verwendet. Die Phase wurde so gewählt, daß zwischen den elektronenreichen Phosphatgruppen der Lipidköpfe ein drittes Maximum aufgrund der ebenfalls phosphathaltigen DNA auftritt. Dabei wird die aus der Literatur bekannte Elektronendichteverteilung der Lipidmembran benützt [84]. Maxima treten bei Phospholipidmembranen im Bereich der Phosphatgruppen der Lipidköpfe auf und die wasserstoffreichen Methylgruppen am Ende der Lipidketten führen zu einem deutlichen Minimum in der Mitte des hydrophoben Bereichs der Membran. Die kanonische

χ_{TAP}	L/D	d_{lam}		d_{DNA}		d_c	d_{mem}		ϑ_T
		Γ=15 °C	T=45 °C	T=15 °C	T=45 °C	CT=15 °C	T=15 °C	T=45 °C	CT=15 °C
$\overline{0.25}$	9.5	75.6	67.0	34.4	43.1	4.16	39.6	35.0	0
0.5	4.5	73.2	65.3	28.9	35.3	4.17	37.2	33.3	ca. 20°
0.75	2.7	66.8	60.4	26.2	31.2	4.19	30.8	28.4	ca. 40°

Tab. 5.1: Übersicht über die strukturellen Daten von drei isoelektrischen Proben mit unterschiedlichem χ_{TAP} . L/D: Lipid-zu-DNA Masseverhältnis, d_{lam} : lamellarer Wiederholabstand, d_{DNA} : DNA-Wiederholabstand, d_{mem} : Membrandicke; d_c abgeleitet vom Maximum des WAXS-Peaks und ϑ_T Kettenneigung in der L^C_{β} -Phase.

	$\alpha(L_{\alpha}) = \frac{1}{d_0} \frac{\partial d_{\alpha}}{\partial T} [K^{-1}]$	$\alpha(L_{\beta}) = \frac{1}{d_0} \frac{\partial d_{\beta}}{\partial T} [K^{-1}]$	$\Delta_{\alpha\beta} = \frac{d_{\alpha} - d_{\beta}}{d_0} [K^{-1}]$
d_{mem}	$-7.1 \cdot 10^{-4}$	$-9.5 \cdot 10^{-1}$	-0.11
d_{DNA}	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0.19

Tab. 5.2: Die thermalen Expansionskoeffizienten, α , und die relative Änderung $\Delta_{\alpha\beta}$, an der Hauptphasenumwandlung eines isoelektrischen DMPC / DMTAP–DNA Komplexes mit χ_{TAP} =0.5. Die Koeffizienten sind relativ zu Abstand d_0 angegeben, der an der Phasenumwandlungstemperatur in der Gelphase gemessen wurde.

Auflösung der Elektronendichte-Rekonstruktion liegt zwischen 8 und 10 Å.

Im Gegensatz zu den Kontrastvariationsexperimenten im Kap. 4 steht für jede Lipidkomposition nur je ein Datensatz von Fourierkoeffizienten für die Elektronendichterekonstruktion zur Verfügung. Deswegen ist es nicht möglich, die Schichtdicken δ_w , δ_{DNA} und δ_{LK} voneinander zu unterscheiden. Als Membrandicke d_{mem} sei deswegen der Abstand der Maxima, die von den Lipidkopfgruppen stammen, definiert. Damit läßt sich die Dicke der Wasserschicht zwischen den Membranen als $d_w = d_{lam} - d_{mem}$ schreiben.

 d_w ergibt sich bei 35 °C zu 35 Å, bei 45 °C zu 32 Å und bei 90 °C zu 26 Å. In Komplexen mit höherem Molbruch kationischen Lipides χ_{TAP} verringert sich die Membrandicke zusätzlich, sowohl in der L^C_α als auch in der L^C_β -Phase. Die Werte sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. In der L^C_α -Phase läßt sich dieser Effekt einfach auf die im Vergleich zu DMPC kleinere Kopfgruppe von DMTAP zurückführen. In der L^C_β -Phase spielt dabei zusätzlich die Kettenneigung eine Rolle, die in Kap. 3.4 anhand der WAXS-Reflexe analysiert wurde. Tatsächlich wächst die Neigung der

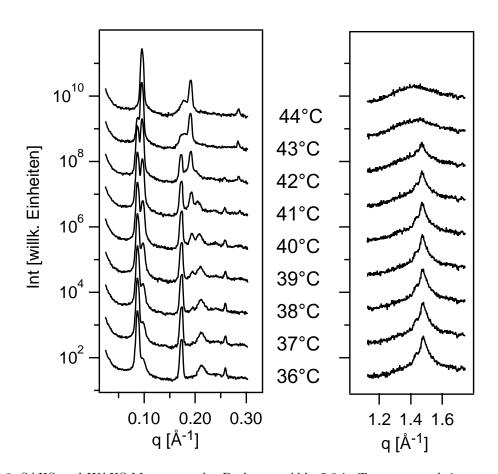


Abb. 5.3: SAXS und WAXS Messungen der Probe von Abb. 5.2 in Temperaturschritten von 1 °C. Bei 42 °C ist die Fläche der 2. Ordnung der lamellaren Peaks, die der L^C_β bzw. L^C_α -Phase zugeordnet werden, etwa gleich. Die Fläche des scharfen WAXS-Reflexes ist etwa auf die Hälfte reduziert. Die Probe befindet sich demnach im Phasengleichgewicht zwischen L^C_β und L^C_α -Phase.

Alkylketten mit χ_{TAP} . Bei χ_{TAP} =0.25 zeigt sich ein scharfer Peak im Weitwinkelbereich (siehe Abb. 5.5). Dies deutet darauf hin, daß der Flächenbedarf der Lipidköpfe bei diesem Mischungsverhältnis der Lipide genau dem Flächenbedarf der Ketten entspricht und damit kleiner ist als der von reinem DMPC. Bei höherem χ_{TAP} wächst der Flächenbedarf der Kopfgruppen aufgrund der steigenden elektrostatischen Abstoßung der kationischen Kopfgruppen, was zu der wachsenden Kettenneigung zwischen die nächsten Nachbarn führt. Obwohl klar ist, daß eine genaue Analyse der Kettenneigung nur mit orientierten Proben möglich ist, kann man sie grob abschätzen. Dazu wird zum einen d_{mem} und zum anderen die Breite des WAXS-Reflexes verwendet.

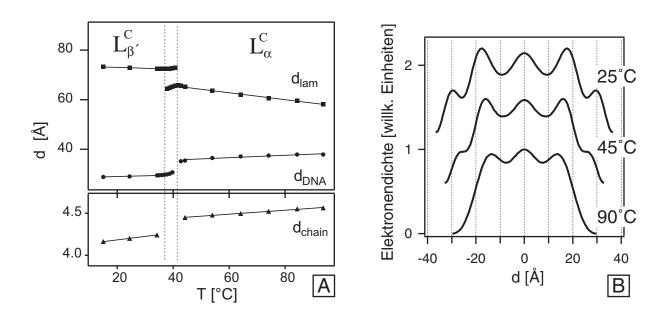


Abb. 5.4: (A) Temperaturabhängigkeit des lamellaren Wiederholabstandes d_{lam} , des DNA-Abstandes d_{DNA} und der Abstand der Lipidketten d_c , resultierend aus den WAXS-Reflexen. (B) Elektronendichteprofile rekonstruiert aus den ersten 7 lamellaren Peakintensitäten (kanonische Auflösung 8 Å) bei drei verschiedenen Temperaturen.

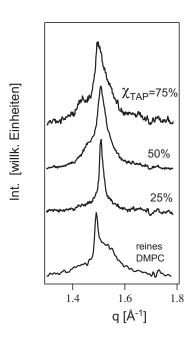


Abb. 5.5: WAXS–Reflexe von reinem DMPC und Lipid–DNA–Komplexen mit Molbrüchen kationischen Lipids $\chi_{TAP} = 0.25$, 0.5 und 0.75. Besonders auffällig ist die scharfe symmetrische Peakform bei $\chi_{TAP} = 0.25$. Demnach stehen die Lipidketten genau senkrecht auf den Membranen.

5.1.2 Diskussion

Die in den Lipid-DNA-Komplexen gemessenen anisotropen strukturellen Veränderungen im Bereich des Kettenschmelzens der Lipide sind typisch für Membranen. Der Ubergang von einer wohl geordneten Kettenkonfiguration bei niedrigen Temperaturen zu einer für Flüssigkeiten typischen Organisation der CH₂-Gruppen der Ketten geht mit einer Expansion der Membranoberfläche und einer Abnahme der Membrandicke einher [85]. Wie im folgenden gezeigt wird, ist der DNA-Wiederholabstand ein Maß für die Flächenausdehnung der Membran. Erstens sei darauf hingewiesen, daß die thermotrope Veränderung des DNA-Abstandes bei konstanter DNA-Länge mit den bekannten Flächenänderungen für reine Lipidmembranen übereinstimmt. In mikromechanischen Experimenten an DMPC-Riesenvesikeln wurde die relative Flächenänderung $(A_{\alpha} - A_{\beta})/A_0 = 0.13$ bei der Hauptphasenumwandlung der Membran gemessen. Außerdem wurden die thermischen Flächenexpansionkoeffizienten $\alpha(L_{\alpha}) = (4-6)$. 10^{-3} / °C und $\alpha(L_{\beta'}) = (5-8) \cdot 10^{-4}$ / °C [21]. Zweitens läßt sich der DNA-Abstand aus dem Verhältnis der Lipidmasse L und der DNA-Masse D bestimmen. Dabei wird angenommen, daß Komplexe aus einer homogenen Phase bestehen, die durch lokale Ladungsneutralität charakterisiert ist. So läßt sich der DNA-Abstand folgendermaßen ausdrücken[63]:

$$d_{DNA} = \frac{A_{DNA}\rho_{DNA}}{d_{mem}\rho_{mem}} \cdot \frac{L}{D} \tag{5.1}$$

wobei A_{DNA} und ρ_{DNA} der Flächenquerschnitt und die Volumendichte der DNA und d_{mem} und ρ_{mem} die Dicke und die Dichte der Lipidmembran sind. Es konnte experimentell bestätigt werden, daß die einfache Formel gut den DNA-Abstand im Bereich von 30 bis 70 Å für DOPC/DOTAP-DNA Komplexe abschätzt, und zwar unter Verwendung von $A_{DNA} = 186 \text{ Å}^2$, $\rho_{DNA} = 1.5 \text{ g/cm}^3 \text{ und } \rho_{mem} = 1.07 \text{ g/cm}^3 \text{ [63]}$. Die hier gemessenen Daten folgen ebenfalls dieser Gleichung mit 1% Genauigkeit für $\chi_{TAP}=0.5$. Man beachte, daß die Gleichung auch die Gelphase L^{C}_{β} gut beschreibt, wenn man die in dieser Phase gemessene Membrandicke und die Massendichte, die gegenüber der flüssigkristallinen Phase um ca. 5% erhöht ist, berücksichtigt. Die gleiche relative Zunahme wird für die gemessene Volumenänderung der Membran gemessen, $\Delta_V = \Delta_{DNA} + \Delta mem \approx 5\%$ (Tab. 5.2). Gl. 5.1 und die gute Übereinstimmung mit dem bekannten Lipidverhalten weist darauf hin, daß der Phasenübergang $L^C_\beta - L^C_\alpha$ alleine von der Lipidmembran gesteuert ist. Für χ_{TAP} =0.75 sind die experimentell gemessenen Werte kleiner als mit Gl. 5.1 vorhergesagt. Dies ist durch kurzreichweitige elektrostatische Abstoßung zwischen den DNA-Strängen erklärbar, die sich nicht eng genug aneinander anlagern können, um die Lipid-Membran vollständig elektrisch zu neutralisieren.

5.2 Betrachtung der Strukturellen Parameter in Abhängigkeit von der Lipid-Zusammensetzung und des Lipid-DNA- Ladungsverhältnisses

5.2.1 Lipid–Zusammensetzung

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, daß sich die Zusammensetzung der Lipidmembran auf die strukturellen Parameter, d_{DNA} und d_{lam} , der lamellaren Lipid-DNA-Komplexe auswirkt. Der am isoelektrischen DMPC / DMTAP-Systems zur systematischen Untersuchung der strukturellen Parameter aufgenommenen Datensatz ist in Abb. 5.6 A gezeigt. Die Membranzusammensetzung wurde zwischen χ_{PC} =1- χ_{TAP} =0.5 und 0.9 variiert und bei zwei verschiedenen Temperaturen, 30 °C(links) und 60 °C (rechts) aufgenommen. Darstellungsbedingt sind die Messungen logarithmisch und übereinander gestapelt gegen |q| aufgetragen, wobei χ_{PC} der jeweiligen Messung in % angegeben ist. Die aus der vierten lamellaren Ordnung ermittelten Werte von d_{mem} sind in Abb. 5.6 B gezeigt. Demnach steigt in der Gelphase der lamellare Abstand d_{lam} von 71 Å bei χ_{PC} =0.5 bis zum Maximum bei χ_{PC} =0.73 auf 75.9 Å und fällt dann bis auf 74.4 Å bei χ_{PC} =0.8 ab. In der fluiden Phase folgt d_{mem} dem Verlauf in der Gelphase, ist jedoch im Mittel um 9.36 Å zu kleineren Werten verschoben. In Abb. 5.6 C ist der DNA-Wiederholabstand gegen χ_{PC} aufgetragen, wobei die Symbole \blacksquare und \blacktriangle jeweils die Meßpunkte von d_{DNA} bei 30 °C und 60 °C angeben. Die durchgezogenen Linien wurden nach Gl. 5.1 berechnet, wobei für die Membrandicke $d_{mem}=d_{lam}-25$ Å bei der jeweiligen Temperatur verwendet wurde. Im Falle der kristallinen Lipidketten (30 °C) ist die Übereinstimmung der Meßdaten mit der einfachen Berechnung von d_{DNA} nach Gl. 5.1 zwischen χ_{PC} =0.65 und 0.75 gut. Bei kleinerem χ_{PC} ist die Abweichung durch elektrostatische Abstoßung der benachbarten DNA-Moleküle zu erklären. In der fluiden Phase der Ketten gibt es nur qualitative Ubereinstimmung zwischen Theorie und Experiment, vor allem, weil bei hohem χ_{PC} die gemessenen Werte deutlich unterhalb der theoretisch vorhergesagten Kurve liegen.

In der Diskussion von Kap. 3 wird die molekulare Struktur der Lipide zur Erklärung des Phasenverhaltens herangezogen. Um zu überprüfen, ob die molekulare Struktur des neutralen Lipides DMPC auch Einfluß auf die Struktur der Lipid–DNA–Komplexe hat, wurde ein weiteres Lipidsystem untersucht. Dazu wurde anstelle des neutralen Lipides DMPC das bei physiologischem pH ebenfalls neutrale DMPE als

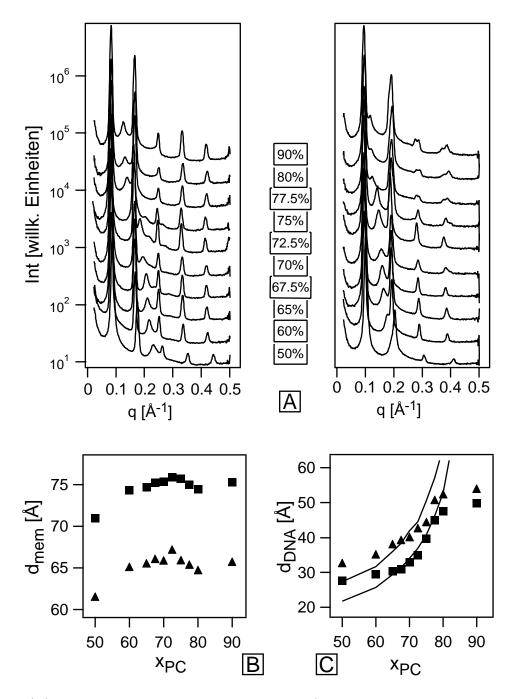


Abb. 5.6: (A) SAXS Messungen an isolektrischen DMPC / DMTAP Komplexen mit variierendem $\chi_{PC} = 1 - \chi_{TAP}$ (in Prozent angegeben). Die aus den SAXS-Daten ermittelten lamellaren Wiederholabstände d_{mem} (B) und DNA-Wiederholabstände d_{DNA} (C) in der gelartigen (\blacksquare) und der fluiden (\blacktriangle) Phase gegen χ_{PC} aufgetragen. Die durchgezogenen Linien in (C) sind nach Gl. 5.1 berechnet.

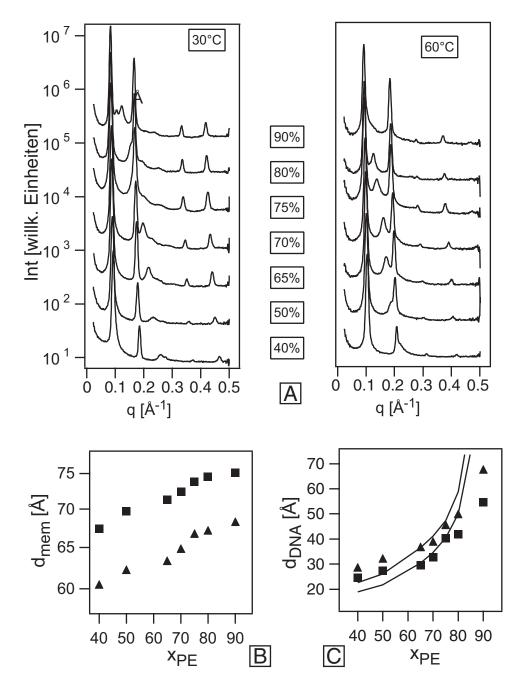


Abb. 5.7: (A) SAXS Messungen an isolektrischen DMPE–DMTAP Komplexen mit variierendem $\chi_{PE}=1-\chi_{TAP}$ (in Prozent angegeben). Die aus den SAXS–Daten ermittelten lamellaren Wiederholabstände d_{mem} (B) und DNA–Wiederholabstände d_{DNA} (C) in der gelartigen (\blacksquare) und der fluiden (\blacktriangle) Phase gegen χ_{PC} aufgteragen. Die durchgezogenen Linien in (C) sind nach Gl. 5.1 berechnet.

Helferlipid verwendet. In Abb. 5.7 A ist die entsprechende Verdünnungsreihe der DMPE-DMTAP-Mischungen isoelektrisch komplexiert mit DNA gezeigt. Wie im Falle des DMPC / DMTAP-DNA Systems zeigt die Kleinwinkelstreuung, daß es sich um lamellare Komplexe handelt und zwar bei beiden Temperaturen (30 °C links, 60 °C rechts) und jeweils allen gemessenen Molbrüchen von DMPE, $0.4 \le \chi_{PE} \le 0.9$ (jeweils in % angegeben). Zunächst fällt das vom Formfaktor verursachte Fehlen der dritten lamellaren Ordnung in der Gel-Phase und eine sehr geringe Intensität dieser Ordnung in der fluiden Phase auf. Wie beim DMPC-System wandert der DNA-Peak bei beiden Temperaturen mit steigendem χ_{PE} zu kleineren q-Werten. Es fällt auf, daß sich in diesem System auch die lamellaren Peaks zu kleineren q-Werten verschieben, wie deutlich an der vierten Ordnung bzw. fünften Ordnung zu erkennen ist. Aus den Peakpositionen ergeben sich jeweils die in Abb. 5.7 B und C gezeigten Entwicklungen von d_{lam} und d_{DNA} mit χ_{PE} . d_{lam} vergrößert sich in der Gelphase von 67.4 Å bei $\chi_{PE}=0.4$ mit einer durchschnittlichen Steigung von 1.5 Å pro 10% χ_{PE} . Die Werte von d_{lam} in der fluiden Phase liegen um durchschnittlich 7.3 Å zu kleineren Werten verschoben. Der DNA-Wiederholabstand wächst wie erwartet mit Zunahme des Helferlipides. Wiederum sind die durchgezogenen Linien nach Gl. 5.1 wie für das DMPC-System berechnet, wobei für die Dichte der Membran der gleiche Wert $(\rho = 1.07 \text{ g/cm}^3)$ verwendet wurde.

5.2.2 Ladungsverhältnis

Bisher wurden auschließlich isoelektrische Lipid-DNA-Komplexe betrachtet, bei denen das Verhältnis zwischen der Anzahl der kationischen Lipidköpfe und der DNA-Phosphatgruppen genau 1 war. In diesem Abschnitt wird untersucht, wie sich die strukturellen Parameter in Lipid-DNA-Komplexen verändern, wenn ein Überschuß an positiven bzw. negativen Ladungen besteht.

Aus dem letzten Abschnitt ist bekannt, daß sich die DNA bei kleinen Molbrüchen des Helferlipides weniger dicht anordnet, als durch das auf Ladungsneutralität beruhende theoretische Modell vorhersagt. Ebenso sind Abweichungen bei sehr hohen Anteilen des neutralen Lipides in der anderen Richtung zu verzeichnen, was möglicherweise auf laterale Phasenseparation zwischen Lipid-Vesikeln und Lipid-DNA-Komplexen zurückzuführen ist (s. Diskussion).

Für die Untersuchung der Ladungsabhängigkeit wählt man deswegen den Molbruch des Helferlipides (χ_{PC} bzw. χ_{PE}) gleich 0.7, da bei diesem Wert die Ladungsneutralität sowohl im DMPC- wie auch im DMPE-System in fluider und gelartiger

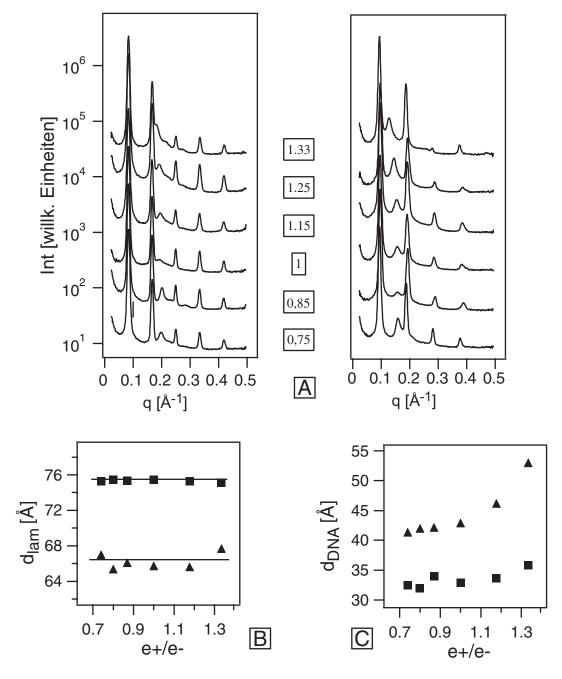


Abb. 5.8: (A) SAXS an Lipid–DNA–Komplexen mit konstantem DMPC:DMTAP Verhältnis von 70:30 bei 30 °C (links) und 60 °C (rechts). Variiert wird das Ladungsverhältnis von Lipiden zu DNA. In (B) ist d_{lam} , in (C) d_{DNA} in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis dargestellt.

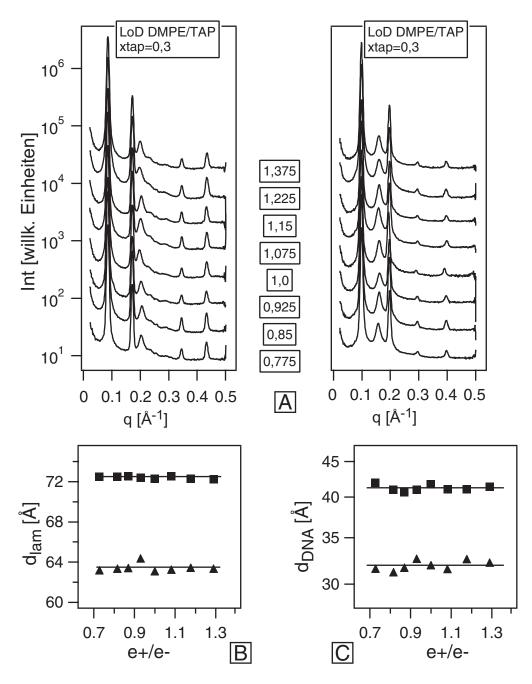


Abb. 5.9: (A) SAXS an Lipid–DNA–Komplexen mit konstantem DMPE:DMTAP Verhältnis von 70:30 bei 30 °C (links) und 60 °C (rechts). Variiert wird das Ladungsverhältnis von Lipiden zu DNA. In (B) ist d_{lam} , in (C) d_{DNA} in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis dargestellt.

Phase durch Randeffekte lediglich in geringem Maß gestört ist.

In Abb. 5.8 A sind SAXS–Messungen bei 30 °C (links) und 60 °C (rechts) mit an DMPC / DMTAP–DNA Komplexen zu sehen, bei denen das Ladungsverhältnis $\rho = \frac{e^+}{e^-}$ zwischen 0.75 und 1.33 variiert wird. Der lamellare Wiederholabstand ist in der L^C_{β} –Phase praktisch konstant (Durchschnitt 75.31 Å) und schwankt in der L^C_{α} –Phase nur leicht um den Mittelwert von 66.24 Å (Abb. 5.8 B). Der DNA–Wiederholabstand ist für $\rho < 1$ nahezu konstant und steigt bei $\rho > 1$ in der fluiden Phase stark an (Abb. 5.8 B). In der Gelphase ist dort ebenfalls ein leichter Anstieg zu verzeichnen.

Im deutlichen Gegensatz dazu ist der DNA–Wiederholabstand in DMPE–DMTAP–DNA Komplexen sowohl in der gelartigen Phase als auch in der fluiden Phase innerhalb des untersuchten Bereichs von $0.775 < \rho < 1.375$ konstant. Bei 30 °C schwankt er leicht um den Mittelwert von 31.93 Å, bei 60 °C um 41.2 Å (Abb. 5.9). Die gemessenen Werte für d_{lam} schwanken in der Gelphase sehr leicht um den Mittelwert 72.40 Å in der fluiden Phase um 63.43 Å. Insbesondere sei betont, wie ähnlich die unterschiedlichen SAXS–Messungen sind, insbesondere bezüglich der Peak–Intensitäten und der Peakformen. Es gibt tatsächlich keine Hinweise auf mögliche Unterscheidungskriterien der Proben anhand der SAXS–Messungen.

5.2.3 Diskussion

Lipidzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Lipidmembran spielt die dominierende Rolle bei der Kontrolle der strukturellen Parameter, nämlich des lamellaren Wiederholabstands und des DNA–Wiederholabstands. In dem Bereich um $\chi_{TAP}=0.3$ erhält man für beide Arten von Helferlipiden bei der Variation des Molbruchs des Helferlipides in ladungsneutralen Lipid–DNA–Mischungen eine gute Übereinstimmung des gemessenen DNA–Abstandes mit der rein auf der Ladungsneutralität und Massenerhaltung beruhenden Vorhersage von Gl. 5.1. Das läßt den Schluß zu, daß in diesem Bereich die gesamte Menge an Lipid und DNA in einer einzigen kondensierten Phase organisiert ist, und die in der Membran beweglichen kationischen Lipide die Rolle der Gegenionen der DNA übernehmen. Die kationischen Lipide schirmen die DNA–Moleküle so gegeneinander ab, daß sie sich bis auf ca. 5 Å aneinander annähern können. Die einwertigen Gegenionen der DNA (Na⁺) und des kationische Lipides (Cl⁻) werden entropisch in den Wasserüberstand getrieben. Tatsächlich haben direkte Messungen von Wagner et al. der Ionenstärke im Wasserüberstand gezeigt, daß praktisch alle Salzionen aus den Lipid–DNA–Komplexen losgelassen werden [89]. Die Komplexe haben genau

einen lamellaren Abstand und einen DNA-Abstand, was zeigt, daß die Lipidmembranen überall in den Komplexen die gleiche Lipidzusammensetzung haben müssen. Das stimmt überein mit der kalorimetrischen Beobachtung eines schmalen $L^C_{\beta}-L^C_{\alpha}$ - Überganges in Kap. 3, da andernfalls Lipid-Membranen mit unerschiedlichen χ_{TAP} unterschiedlich Phasenübergangstemperaturen aufweisen würden.

Bei Molbrüchen des Helferlipides < 0.65 liegt der gemessene DNA-Abstand in beiden betrachteten Systemen oberhalb der Kurve, die sich aus der Ladungsneutralität zwischen kationischen Lipidköpfen und DNA-Phosphatgruppen ergibt.

Bei χ_{PC} =0.5 ist der DNA–Wiederholabstand 27.6 Å. Abzüglich des DNA–Durchmessers von 20 Å haben also zwei benachbarte DNA–Moleküle nur noch etwa 7 Å Abstand voneinander, was zu einer beträchtlichen elektrostatischen Repulsion führt. Dadurch wird die freie Energie des Systems stärker erhöht, als durch die Anlagerung von einwertigen Gegenionen aus der Lösung und dem damit verbundenen Entropieverlust. Die überschüssige DNA ist im umgebenden Wasser gelöst mit einer Wolke von Gegenionen, die nach Mannings an dem stark geladenen Polymer kondensieren, um die elektrische Ladung zu neutralisieren [51]. Der DNA–Abstand wird also durch das Gleichgewicht zwischen Maximierung der Entropie der Gegenionen der geladenen Lipide in der Membran und der DNA einerseits und andererseits durch der Minimierung der elektrostaischen Abstoßung der benachbarten DNA–Moleküle bestimmt. Dieses Verhalten wurde von May et al. durch Minimierung der freien Energie durch selbstkonsistente Lösung der Poisson–Boltzmann–Gleichung vorhergesagt [53].

Bei Molbrüchen des Helferlipides > 0.75 ist der gemessen DNA-Abstand kleiner als mit Hilfe von Gl. 5.1 vorhergesagt. Dies läßt sich auf Entmischung von Lipid-DNA-Komplexen und Lipidmembranen erklären, wobei in den Lipidmembranen die Konzentration des kationischen Lipides geringer ist als die Gesamtkonzentration. Ein direkter experimenteller Nachweis dieser lateralen Phasenseparation ist die Mischlücke des Lipid-DNA-Phasendiagramms in Kap. 3, in der kalorimetrisch zwei verschiedenen Phasenübergangstemperaturen gemessen wurden. Bei 60 °C teilt sich bei χ_{PC} > 0.75 (Abb. 5.6) der lamellare Peak in zwei Peaks auf. Die daraus resulierenden, zwei verschiedenen lamellaren Abstände sind charakteristisch für laterale Phasenseparation. Das Auftreten der Entmischung bei χ_{PC} =0.75 stimmt genau mit den kalorimetrischen Daten aus Kap. 3 und mit der theoretischen Berechnung von May et al. überein [53]. Der geringe Unterschied in der Peakposition z.B. der vierten lamellaren Ordnung deutet auf Entmischung in Domänen mit geringfügig unterschiedlichem lamellaren Wiederholabstand in den Komplexen hin. Neutrale multilamellare Lipidvesikel

würden Korrelationspeaks korrespondierend mit deutlich kleineren Membranwiederholabständen aufweisen. Multilamellare Lipidphasen werden typischerweise durch van der Waals Kräfte zwischen den benachbarten Lipidkopfgruppen stabilisiert [68], so daß die lamellaren Wiederholabstände im Bereich der Membrandicke zuzüglich einer dünnen Hydratationsschicht liegen [34, 40]. Für multilamellare Vesikel zu erwartende Werte lägen somit etwa bei 40 bis maximal 50 Å, der gemessene Wert liegt bei ca. 65 Å, was deutlich höher ist als für Vesikel erwartet wird.

Eine weitere klärungsbedürftige Frage ist, warum man bei Phasenseparation von Lipid-DNA-Komplexen und reinen Lipidvesikeln keinen Röntgenpeak beobachtet, der Vesikeln zuzuordnen ist. Quellmessungen von Rädler et al. an Lipid-Vesikeln aus DOPC und DOTAP zeigen, daß die Oberflächenladung der Membranen zu einer abstoßenden Kraft führt, die größer ist als die van der Waals-Kräfte, die die multilamellare Phase stabilisieren [63]. Das Fehlen eines scharfen Röntgenreflexes von Vesikeln ist also nicht im Widerspruch zur Koexistenz von Vesikeln und Lipid-DNA-Komplexen, sondern ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung dafür, daß kationische Lipidmembranen unilamellare Vesikel bilden.

Ladungsabhängigkeit

Die Betrachtung des DNA-Abstandes in Abhängigkeit von der Gesamtladung von Lipidmembranen und DNA kann Aufschluß über Phasenseparation zwischen drei unterschiedlichen Phasen geben: erstens kann DNA gelöst im Wasser vorkommen, zweitens können Lipide Vesikel bzw. Mizellen ohne DNA-Anlagerung bilden und drittens können DNA und Lipide zu Komplexen kondensieren. Erhöht man etwa ausgehend vom isoelektrischen Punkt, an dem nur Komplexe existieren, die relative Menge der Lipidmischung im Verhältnis zur DNA-Menge, sind zwei Effekte denkbar. Einerseits kann das Lipid die effektive Fläche in den Membranen der Komplexe erhöhen, was sich durch einen vergrößerten DNA-Abstand ausdrücken würde. Andererseits kann Lipid etwa in Form von Vesikeln mit Komplexen phasenseparieren. Dabei ist im allgemeinen die Lipidzusammensetzung in den Vesikeln nicht die gleiche wie die in den Komplex-Membranen. Dies kann im Extremfall dazu führen, daß der DNA-Abstand konstant bleibt.

Erhöht man dagegen ausgehend vom isoelektrischen Punkt die DNA-Menge im Verhältnis zu den Lipiden kann die DNA "elektrostatischen Druck" in der Lösung erzeugen, der im allgemeinen den DNA-Abstand in den Komplexen verringert.

In beiden Fällen, ob bei Lipid oder DNA-Überschuß, kann man davon ausgehen, daß einwertige Ionen aus der Lösung benötigt werden, um lokale Ladungsneutralität in

den Komplexen zu gewährleisten. Der damit verbundene Verlust an Entropie bildet das maßgebliche Gegengewicht zum elektrostatischen Druck der freien Lipide bzw. DNA.

Die beiden Systeme DMPC / DMTAP–DNA und DMPE / DMTAP–DNA zeigen stark unterschiedliches Verhalten unter Ladungsvariation. Im PC–System sieht man einen Sprung des DNA–Abstandes am isoelektrischen Punkt, wie er aus früheren Messungen am DOPC–DOTAP–DNA–System bekannt ist [62, 43]. Unterschiedliche theoretische Ansätze können dieses Verhalten erklären.

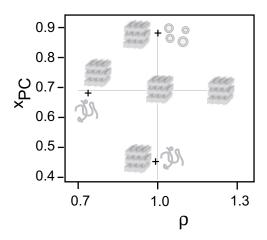
Bruinsma fand die Instabilität des DNA-Abstandes am isoelektrischen Punkt durch analytisches Lösen der Poisson-Boltzmann-Gleichung unter der Näherung für große DNA-Abstände $(d_{DNA}>>d_{mem})$. Diese Annahme ist im Falle von $\chi_{TAP}=0.3$ annähernd erfüllt und kann qualitativ den sprunghaften Anstieg des DNA-Abstandes erklären [8]. Ähnlich gute Übereinstimmung besteht mit der numerischen Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung von Harries et al. [28].

Lipid-Überschuß führt im DMPC / DMTAP-System nahe am isoelektrischen Punkt zu einer Zunahme des DNA-Abstandes. Nach May et al. können die DOPC-DOTAP-DNA Komplexe bis $\rho \approx 1.3$ Überschußlipid aufnehmen, so daß in diesem Bereich keine Koexistenz mit reinen Lipidmembranen in vesikulärer Form zu erwarten ist. Die DNA maximiert unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ihren Abstand, um die elektrostatische Abstoßung zu minimieren. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, daß nur ein mittlerer DNA-Abstand in den Komplexen gefunden wird. Es gibt also keine Koexistenz zwischen Domänen mit dichter und weniger dichter gepackter DNA.

Das DMPE-DMTAP-System zeigt am isoelektrischen Punkt keinen Sprung des DNA-Abstandes. Im Fall von Lipidüberschuß ist zwingende Voraussetzung für konstanten DNA-Abstand, daß die Lipidmenge im Verhältnis zur DNA in der Membran konstant ist. Im Fall von DNA-Überschuß darf der elektrostatische Druck der DNA in Lösung die interkalierte DNA nicht weiter komprimieren.

Das legt die Annahme nahe, daß DMPE–DMTAP–Lipidphasen schon können schon bei kleinstem Lipid–Überschuß mit Komplexen phasenseparieren. Dies läßt sich aus der Beobachtung ableiten, daß der DNA–Abstand bei Lipidüberschuß konstant bleibt. Das läßt sich positive Umladung der DMPE–Kopfgruppen so vorkomprimiert ist, daß der elektrostatische Druck das Gitter nicht weiter komprimieren kann.

Es stellt sich die Frage, welcher Unterschied zwischen den Helferlipiden DMPC und DMPE zu so drastisch unterschiedlichem Verhalten führen.



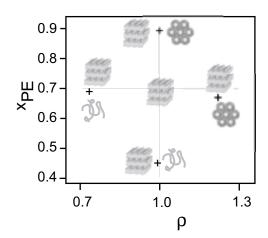


Abb. 5.10: Schematische Molbruch–Ladungsverhältnis–Phasendiagramme des DMPC / DMTAP–Systems (links) und des DMPE–DMTAP–Systems. In den Messungen wurde der Molbruch des Helferlipides χ_{PC} bzw. χ_{PE} auf der Linie $\rho=1=const.$ und das Ladungsverhältnis ρ entlang der Linie $\chi_{H}=0.7$ variiert. Bei $\rho<1$ koexistieren gelöste DNA und lamellare Lipid–DNA–Komplexe, bei $\rho>1$ ist sämtliches Material des DMPC / DMTAP–Systems in lamellaren Komplexen einer Zusammensetzung organisiert. Im DMPE–DMTAP System koexistieren lamellare Komplexe mit einer reinen Lipidphase, die aufrund der natürlichen negativen Krümmung des DMPE wahrscheinlich invers hexagonal ist. In beiden Systemen koexistieren bei $\chi_{H}>0.75$ Komplexe mit reinen Lipidphasen, und für $\chi_{H}<0.65$ Komplexe mit DNA.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen neutralen Lipiden ist das Verhalten bei extrem niedrigem und extrem hohen pH-Werten. Unterhalb eines pH-Wertes von 2 können sich beide Lipide durch Protonierung der Phosphatgruppe in einfach positive Moleküle umwandeln [14]. Bei pH-Werten über 12 kann die Amonium-Gruppe des DMPE deprotoniert werden, was im Falle des Trimetrhylammonium des DMPC nicht möglich ist.

$$\begin{array}{c}
DMPC + H_3O^+ \rightleftharpoons DMPC^+ + H_2O \\
DMPE + H_3O^+ \rightleftharpoons DMPE^+ + H_2O
\end{array} \qquad \text{für} \quad pH < 2 \\
DMPE + OH^- \rightleftharpoons DMPE^- + H_2O \qquad \text{für} \quad pH > 12
\end{array} \tag{5.2}$$

Die kationischen Lipide in den Membranen führen in Abwesenheit von DNA zu einer hohen Dichte an Anionen an der Membran-Wassergrenzschicht, was äquivalent zu einem extrem hohen pH ist. Es ist denkbar, daß die Möglichkeit der Deprotonierung von DMPE dazu führt, daß Mischungen aus DMPE und DMTAP wesentlich leichter

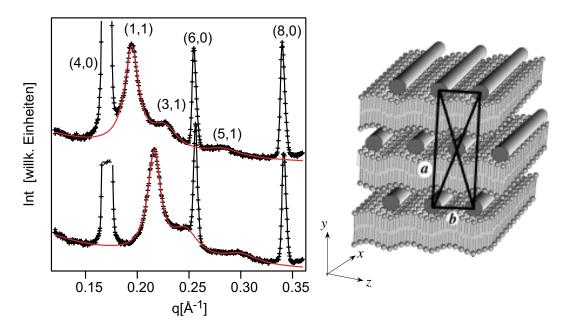


Abb. 5.11: Vergrößerte Darstellung der DNA–Peak–Region. Die lamellaren Peaks korrespondieren mit dem halben Abstand der Einheitszellen eines rhombisch zentrierten Gitters mit den Kantenlängen a= $2d_{lam}$ und b= d_{DNA} , und werden deswegen mit den Millerschen Indizes (2n,0) bezeichnet. Die diffusen DNA–Peaks entsprechen den Ordnungen (1,1), (3,1) und (5,1). Die durchgezogene Linie wurde angepaßt unter der Annahme, daß die Peaks Lorentz–Form besitzen. Die Positionen sind nach der rhombisch zentrierten Ordnung verknüpft. Rechts ist schematisch ein Komplex dargestellt, der die beschriebene Symmetrie des DNA–Übergitters aufweist.

mit Komplexen phasenseparieren können als DMPC / DMTAP–Mischungen. Insbesondere kann angenommen werden, daß mögliche Umladung der PE–Kopfgruppen in der Nachbarschaft von kationischen Lipidkopfgruppen zu Favorisierung von mizellaren Phasen gegenüber Vesikeln führt, wie von Koltover et al. entdeckt [43].

Dieser Mechanismus könnte in der Lage sein, den Abstand der vollständig in den Komplexen gebundenen DNA konstant zu halten.

5.3 Überstruktur des DNA-Gitters

Bisher wurden die Röntgendaten in bezug auf die lamellaren Abstände und den DNA-DNA Abstand untersucht. Bei genauerer Betrachtung sieht man unter bestimmten Voraussetzungen höhere Ordnungen des diffusen DNA-Korrelationspeaks. In Abb. 5.11 ist die diffuse Region stark vergrößert dargestellt. Die drei diffusen Peaks

lassen sich in Übereinstimmung mit einem rhombisch zentrierten (=orthorhombischen) Gitters mit $q_{kl} = 2\pi\sqrt{(k/a)^2 + (l/b)^2}$ indizieren - mit Gitterkonstanten a und b. Die orthorhombische Ordnung ist in der schematischen Zeichnung in Abb. 5.11 dargestellt. Die x-Achse des gewählten, kartesischen Koordinatensystems zeige entlang der Längsachse der DNA-Moleküle. Die y-Achse ist demnach senkrecht, die z-Achse parallel zu den Lamellen. Beide Richtungen stehen senkrecht zu den Längsachsen der DNA-Stränge, die im Mittel parallel zu x-Achse orientiert sind. Das System verhält sich in x-Richtung kontinuierlich. Das zweidimensionale Gitter kann also mit dem Vektor (y,z) im Realraum und mit den Millerschen Indizes (k,l) für (q_y,q_z) im reziproken Raum beschrieben werden. Jeweils ein DNA-Molekül liegt an den Eckpunkten der Einheitszelle, die durch ein weiteres DNA-Molekül im Schwerpunkt flächenzentriert ist. Man beachte, daß dadurch die Höhe der Einheitszelle a dem doppelten lamellaren Abstand entspricht, wobei die Breite b gleich dem DNA-Abstand ist. Die DNA-Korrelationspeaks haben die Millerschen Indizes (1,1), (3,1) und (5,1). Die lamellaren Peaks entsprechen Reflexen der Ordnungen (2n,0). Durch die rhombisch zentrierte Symmetrie des Gitters sind die Reflexe (1,0) und (0,1) ausgelöscht und werden deswegen in Röntgenmessungen nicht beobachtet.

5.3.1 2D-Messungen an orientierten Proben

$L^{\mathcal{C}}_{\beta}$ –Phase in orientierten Proben

Um den endgültigen Beweis für die rhombisch zentrierte Symmetrie des DNA-Übergitters zu erbringen, wurden orientierte Proben auf 2D-Detektoren abgebildet. In Abb. 5.12 A und C sind zwei Aufnahmen von orientierten Proben bei 20 °C gezeigt. In beiden Fällen wurden Phosphor-Platten der Firma Fujifilm Medical Systems (USA) zur Intensitätsdetektion verwendet (Pixelgröße $100\mu m$). Die Aufnahmen A wurde an der Beamline ID2A, ESRF, mit einer sehr guten Auflösung von $\Delta q \approx 4 \cdot 10^{-4} \mathring{A}^{-1}$ aufgenommen und ohne jegliche Korrektur des Hintergrundes abgebildet. Die Auflösung kann direkt an der minimalen FWHM der lamellaren Reflexe gemessen werden. Um Probendestruktion zu minimieren wurde in 10 Sekunden Abständen 150 mal jeweils 0.1 Sekunde mit voller Strahlintensität belichtet. Eine bessere Auflösung ist praktisch nicht erreichbar, da hierzu ein Dreiachsspektrometer mit Analysator zu verwenden wäre. Um mit solch einem Gerät den reziproken Raum vollständig abzubilden, müßte die Probe lange hoher Intensität der ionisierenden Strahlung ausgesetzt werden, was zwangsläufig zur Destruktion der Probe führen würde. Die Aufnahme in Abb. 5.12

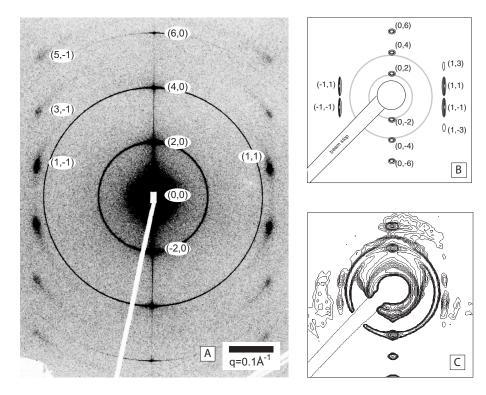


Abb. 5.12: Röntgenmessungen an orientierten Proben von Lipid-DNA-Komplexen. In Aufnahme (A) konnten 3 Ordnungen der DNA-Korrelationspeaks auf einem Image-Plate Detektor aufgenommen werden. Die Ringe stammen von unorientierten Probenmaterial, das vom Strahl gestreift wurde. In (B) ist schematisch der reziproke Raum des rhombisch zentrierten Gitters indiziert. (C) zeigt eine andere 2D-Aufnahme mit deutlich geringerer Intensität und Auflösung, die am LURE, Paris, aufgenommen wurde.

C wurde mit geringerer Auflösung und Intensität am LURE in Paris an einer anderen Probe abgebildet. Tatsächlich befand sich die Probe mehr als 4 Stunden im Strahl, was wegen der geringen Primärintensität nicht zu Strahlenschäden führte. Die diffusen Peaks konnten nur durch intensive Korrektur des Hintergrundes dargestellt werden.

In beiden Fällen sind deutlich die intensiven und schmalen lamellaren Braggpeaks sichtbar. Sie liegen im Rahmen der Auflösung auf der q_y -Achse und sind äquidistant. Die Debye-Scherrer-Ringe stammen von unorientiertem Probenmaterial, das vom Strahl berührt wird und ist um einen Faktor tausend geringer als die orientierten Reflexe. In Abb. 5.12 A sind darüberhinaus die diffusen DNA-Korrelationspeaks mit den Ordnungen $(\pm 1,\pm 1)$, $(\pm 3,\pm 1)$ und $(\pm 5,\pm 1)$ gezeigt. Die Abbildung des reziproken Gitters auf den planaren Detektor führt zu einer verzerrten Darstellung des reziproken Raumes. Der Einfluß auf die lamellaren Peaks ist im Gegensatz zu den

DNA-Peaks vernachlässigbar. Wie im folgenden gezeigt wird, ist es dennoch möglich die Ordnung (1,1) des DNA-Peaks in Detektorkoordinaten q_x und q_y zu analysieren, um die Korrelationslängen in x- und y-Richtung des Realraumes relativ genau abzuschätzen.

Verzerrte Abbildung des reziproken DNA-Gitters auf den Detektor

In dem in Abb. 5.12 gezeigten zweidimensionalen Datensatz weichen scheinbar die Positionen der beobachteten DNA-Korrelationspeaks systematisch von denen des idealen orthorhombischen Gitters ab. In Abb. 5.13 A sind die beobachteten Positionen der DNA-Peaks als Kreuze dargestellt.

Um diese Abweichungen zu erklären, muß beachtet werden, daß beim Streuexperiment die Schnittmenge aus Ewaldkugeloberfläche und dem reziproken Objekt betrachtet wird. In Abb. 5.14 A ist die obere Hälfte der Ewaldkugel und des reziproken Raums des orientierten Lipid-DNA-Komplexes dargestellt. Die Ewaldkugel hat den Radius $r = \frac{2\pi}{\lambda} \text{Å}^{-1}$. Der einfallende Strahl liegt auf der q_x -Achse. Also ist der Mittelpunkt der Ewaldkugel bei $(q_x,q_y,q_z)=(-r,0,0)$ und der Ursprung des reziproken Raumes durch den direkten Strahl auf dem Detektor definiert. Im reziproken Raum werden die lamellaren Lipidmembranen durch die Punkte mit Abstand $2q_{10}$ auf der q_y -Achse repräsentiert, wobei die Bezeichnung $q_{kl} := |q_{0kl}| = \sqrt{(k*a^*)^2 + (l*b^*)^2}$ verwendet wurde. Die DNA–Schichten können um die q_y –Achse rotieren und lassen sich am besten als 2D-Pulver beschreiben. Die reziproke Darstellung der DNA entspricht deswegen Ringen parallel zur q_x-q_z -Ebene mit Mittelpunkten $(0,(2n-1)|a^*|,0)$, n={1,2,3...}. Der Radius dieser Ringe ist $R=q_{01}=\frac{2\pi}{d_{DNA}}$ und folglich durch den DNA-Abstand bestimmt. Es sei darauf hingewiesen, daß zur besseren Darstellung die Ewaldkugel in Abb. 5.14 A gegenüber der reziproken Repräsentation der DNA-Anordnung etwa 5 fach verkleinert dargestellt ist.

Die gemessene Intensität auf dem Röntgendetektor entspricht der Schnittmenge der Oberfläche der Ewaldkugel mit der reziproken Darstellung der beobachteten Struktur. Im Fall des DNA Gitters müssen also die Ringe mit der Kugeloberfläche geschnitten werden.

Das Verhältnis der Radien von Ewaldkugel und DNA–Ringen ist ca. ist mit $\frac{R}{r}=0.17616\text{\AA}^{-1}/\frac{2\pi}{0.997\text{Å}}\approx 1/36.$

Zunächst wird abgeschätzt, ob die Krümmung der Ewaldkugel die Abweichung der DNA-Peaks vom idealen Gitter erklären kann. Dazu ist in Gl. 5.3 q_z in Abhängigkeit

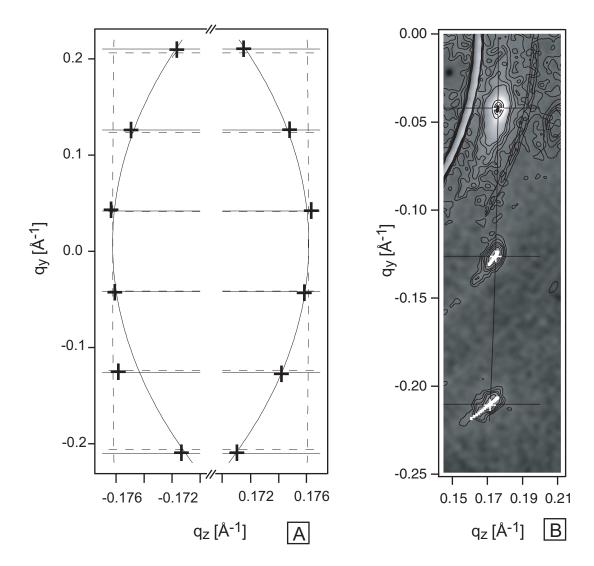


Abb. 5.13: (A) Positionen der DNA-Peaks in den Koordinaten q_y und q_z (weiße Kreuze). Die gestrichelten Linien sind exakt nach Gl. 5.3 und 5.4 berechnet und geben die zu erwartenden Positionen eines rhombisch zentrierten Gitters unter Berücksichtigung der Krümmung der Ewaldkugel an. Die gemessenen Positionen weichen davon ab und liegen auf den Schnittpunkten der durchgezogenen Linien, die mit Gl. 5.5 und 5.6 berechnet wurden. Diese Abweichung läßt sich nicht durch Konstruktion eines Schnittes der Ewaldkugel mit dem Detektor erklären. (B) Höhenlinienbild der DNA-Peak Ordnungen (-1,1),(-3,1) und (-5,1). Die Intensität scheint entlang der Debye-Scherrer-Ringe verschmiert zu sein. Der Effekt stammt von der Krümmung der Lipid-DNA-Komplexe, die entlang der gekrümmten Kapillarwand orientiert sind. Er stammt nicht von der Mosaizität der Probe, auch wenn diese eine ähnliche Verschmierung der Peaks hervorrufen würde. Die kleinen weißen Vierecke auf den Positionen der (-3,1)- und (-5,1)-Peaks bzw. die schwarzen Vierecke auf der Position des (-1,1)-Peaks zeigen die berechnete Verschmierung der Intensität der Peaks aufgrund des gemittelten Winkels von 5°.

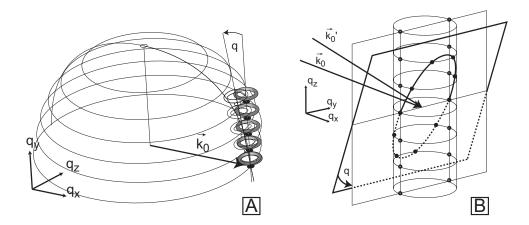


Abb. 5.14: (A) Schematische Repräsentation der oberen Hälfte $(q_y>0)$ des reziproken Raumes von orientierten Lipid–DNA–Komplexen und der Ewaldkugel (darstellungsbedingt etwa 5 fach verkleinert). Die Membranen sind orientiert und führen in q_y –Richtung zu kleinen schwarz dargestellten Scheiben. Die in den einzelnen Schichten parallel zueinander geordnete DNA bildet ein zweidimensionales Pulver, was zu den Ringen um die q_y –Achse führt, die in dieser Richtung durch den reziproken Abstand der Membranen voneinander getrennt sind. Eine Rotation der Membranen um die z–Achse im Realraum entspricht der durch θ angedeuteten Rotation der Achse durch die Zentren der DNA–Ringe um die Achse q_z . (B) Effekt auf die Schnittlinie zwischen Zylinder und Ebene durch Neigung gegeneinander.

von q_y berechnet und bis zum quadratischen Term nach $\frac{R}{r}$ entwickelt.

$$q_{z_{1/2}}(q_y) = \pm \sqrt{R^2 - \left(\frac{R^2 + q_y^2}{2r}\right)^2} \approx \pm \left(R - \frac{(R^2 + q_y^2)^{3/2}}{8r^2R}\right) + O(\frac{R}{r})^3$$
 (5.3)

Entwickelt man q_y nach $\frac{R}{r}$ bis zur ersten Ordnung erhält man:

$$q_{y_{1/2}}(q_z) = \pm \sqrt{2r\sqrt{R^2 - q_z^2} - R^2} \approx \pm \sqrt{2r\sqrt{R^2 - q_z^2}} - \frac{r^2}{2\sqrt{2r}(R^2 - q_z^2)^{1/4}} + O(\frac{R}{r})^2$$
(5.4)

Damit läßt sich die Abweichung durch die Krümmung der Ewaldkugel abschätzen, indem man die Werte für den DNA-Peak der höchsten beobachtetet Ordnung (5,1) eingesetzt, nämlich $R=0.1761 \mathring{A}^{-1}$ und für $q_{50}=0.1284 \mathring{A}^{-1}$. Die relative Abweichung von q_z ist $\frac{\Delta q_z}{q_z}=1.03\cdot 10^{-3}$ und von q_y ist $\frac{\Delta q_y}{q_y}=7.75\cdot 10^{-3}$, also in beiden Fällen unter einem Prozent.

Die gestrichelten Linien in Abb. 5.13 A sind exakt nach Gl. 5.3 und 5.4 berechnet. Die Schnittpunkte entsprechen den Positionen der DNA-Peaks, die aufgrund der Krümmung der Ewaldkugel zu erwarten wären.

Die DNA-Peaks sind offensichtlich gegenüber den Schnittpunkten der gestrichelten Linien systematisch zu kleineren q_z - und zu größeren q_y -Absolutwerten hin verschoben. Tatsächlich liegen die DNA-Peaks auf einer Ellipse. Sie entspricht der Schnittlinie der Ewaldkugeloberfläche mit einer relativ dazu geneigten Ebene, wie in Abb. 5.14 B gezeigt ist. Im realen Experiment wird die Ewaldkugel, d.h. die Ebene festgehalten, und der Zylinder, auf dem äquidistant die DNA-Ringe verteilt liegen, ist in der q_x - q_z -Ebene um den Winkel θ geneigt. Diese Neigung kommt dadurch zustande, daß die Lamellen nicht parallel zum einfallenden Impulsvektor \vec{k}_0 liegen, sondern damit in der q_x - q_z -Ebene einen Winkel von $\theta/2$ einschließen.

Die Schnittkonstruktion erklärt erstens die Verzerrung der gemessenen DNA-Peak-Positionen von einem rechtwinkligen Gitter und zweitens die Verschmierung der DNA-Peaks scheinbar tangential zu den Debye-Scherrer-Ringen.

Zur Vereinfachung der Rechnung nähert man nun die Ewaldkugel in der Umgebung des Ursprungs als Ebene an, die durch die q_y und q_z -Achsen aufgespannt wird. Diese Näherung verändert das Ergebnis wie oben gezeigt um weniger als 1%. In Abb. 5.14 B sind die Schnittlinien eines dünnwandigen Zylinders mit zwei Ebenen abgebildet. Eine der Ebenen ist zur Zylinder-Achse parallel und die andere relativ dazu geneigt. Der Zylinder schneidet die parallele Ebene entlang zweier gerader Linien. Die Schnittlinie zwischen Zylinderoberfläche und geneigter Ebene ist eine Ellipse.

Sei q_y^0 die Entfernung vom Ursprung zum Mittelpunkt des DNA-Ringes entlang der geneigten Achse und q_y und q_z die Koordinaten auf der geneigten Ebene, die dem 2D-Detektor entspricht. Dann gilt für q_z

$$q_z(\theta, q_y^0) = \sqrt{R^2 - q_y^0 \tan^2 \theta}$$
 (5.5)

und für q_y

$$q_y(\theta, q_y^0) = \frac{q_y^0}{\cos \theta} \tag{5.6}$$

Die durchgezogenen Linien in Abb. 5.13 A lassen sich mit diesen Gleichungen an die gemessen Maxima der DNA-Peaks mit sehr guter Übereinstimmungen angepassen. Die resultierenden Werte ergeben die Gitterparameter $q_{10} = a^* = 0.041 \text{Å}^{-1}$ und $q_{11} = 0.176 \text{Å}^{-1}$ und für den Winkel maximaler Intensität $\theta = 10.8^{\circ}$. Variiert man θ leicht, ergeben sich die in Abb. 5.13 B als weiße Vierecke eingezeichneten Pfade. Man sieht deutlich, daß der resultierende Effekt der variierenden Neigung für die höheren Ordnungen der DNA-Peaks stärker ist. Für kleine Winkel stimmt die Ellipse, auf der die DNA-Peaks erwartet werden, beinahe mit Kreisen durch die DNA-Peaks überein, was den Eindruck vermittelt, daß die Verschmierung der DNA-Peaks in radialer

Richtung von der Mosaizität der lamellaren Komplexe herrührt. Tatsächlich folgt aus der obigen Analyse, daß die Verschmierung von der leicht variierenden Neigung der beinahe perfekt orientierten Komplexe gegenüber dem einfallenden Strahl stammt. Nach grober Abschätzung variiert θ demnach um ca. 5° um den Mittelwert von 10.8° .

Eine wichtige Folge dieses Ergebnisses ist, daß die Form und die Halbwertsbreite der DNA-Peaks niedriger Ordnung nur leicht aufgrund der geringen Neigung beeinflußt wird. Man kann also die gemessenen Werte der Halbwertsbreiten für die Abschätzung der Korrelationslängen in erster Näherung ohne Korrekturen verwenden. Die Winkelverteilung läßt sich durch eine Anlagerung des lamellaren Komplexes an die gekrümmte Kapillarwand mit einem Radius von ca. 0.5 mm erklären. Mit dem oben angenommenen Wert für die Variation von θ von etwa 5°, handelt es sich etwa um einen 50μ m langen Komplex, dessen Anzahl an Schichten größer als 80 ist, was aus der Korrelationslänge der Lamellen dividiert durch d_{lam} berechnet werden kann.

L_{α} -Phase in orientierten Proben

In Abb. 5.15 A ist eine Messung der orientierten Probe von Abb. 5.12 A bei 60 °C gezeigt. Die Bilayer sind bei dieser Temperatur fluide und der Komplex befindet sich in der L_{α}^{C} -Phase. Als Detektor diente eine CCD-Kamera, die durch Abschwächung der lamellaren Peaks mit Hilfe eines Aluminiumstreifens geschützt wurde. Die lamellaren Peaks ändern wie in Abschnitt 5.1.1 gezeigt ihre Position zu größeren q-Werten. Aus den bei 20 °C beobachteten Ordnungen der DNA-Peaks entlang der Richtung $(q_{y},0)$ entsteht jeweils ein sehr breiter DNA-Peak, dessen Form am besten als in q_{z} -Richtung langgezogenes Oval mit Mittelpunkt bei (0,1) bzw. (0,-1) beschrieben werden kann. Schematisch ist das Röntgenmuster in Abb. 5.15 B dargestellt.

In Abb. 5.16 sind die Höhenlinien des (0,1) DNA-Peaks aus Abb. 5.15 A und des DNA-Peaks (1,1) aus Abb. 5.12 A gezeigt. Die daraus ermittelten Halbwertsbreiten und berechneten Korrelationslängen sind in Tab. 5.3 zusammengefaßt. Der DNA-Peak in der fluiden Phase ist in q_y -Richtung deutlich breiter als in q_z -Richtung. Die Profile beider Richtungen lassen sich mit befriedigender Genauigkeit mit Lorentz-kurven anpassen (durchgezogene Linien). Der (1,1)-Peak der Gelphase ist schärfer, die Kurvenform läßt sich in q_y - und q_z -Richtung durch Lorentz-Peaks beschreiben. Die HWHM ist wie beim (1,0)-Peak der fluiden Phase in Richtung q_y größer als in Richtung q_z , allerdings ist der Unterschied wesentlich geringer.

In Abb. 5.17 sind das Höhenlinienprofil und die Intensitätsverteilungen in q_y und q_z Richtung des lamellaren Peaks der Ordnung (6,0) repräsentativ für alle lamellaren Reflexe dargestellt. Der Peak ist in Richtung q_y beinahe exakt durch das Strahlprofil

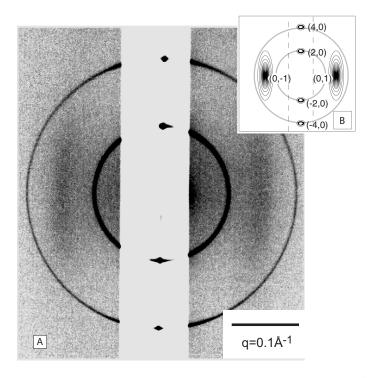


Abb. 5.15: Röntgenmessung eines orientierten Lipid–DNA–Komplexes in der L^{C}_{α} –Phase. Die lamellaren Peaks (x,0) liegen auf der Senkrechten durch den Mittelpunkt. In der L^{C}_{α} –Phase zeigt sich nur ein diffuser DNA-Peak auf der Achse Auflösung der lamellaren Peaks (x,0) ist instrumentell begrenzt.

limitiert, so daß die Korrelationslänge mit 1.6 μ m nur nach unten hin abgeschätzt werden kann. In q_z -Richtung fällt wie in der doppellogarithmischen Auftragung in Abb. 5.17 unten rechts zu sehen ist, algebraisch $(q^{-\eta})$ ab, wobei $\eta=1.375$. Die Korrelationslängen wurden anhand der HWHM einer angepaßten Lorentzkurve abgeschätzt.

5.3.2 Korrelationslängenänderung

Die rhombisch zentrierte Ordnung des DNA-Übergitters ist über weite Bereiche der Lipid-Zusammensetzung zu beobachten. Als wichtiges experimentelles Ergebnis ist hierbei festzuhalten, daß sich die Reichweite der rhombische zentrierten Ordnung mit dem DNA-Wiederholabstand erhöht. In Abb. 5.18 sind Röntgenmessungen an ladungsneutralen DMPC / DMTAP-DNA Komplexen mit unterschiedlichem χ_{TAP} gezeigt. Die Auflösung dieses an der Beamline D43 (LURE) aufgenommenen Datensatzes ist durch die Breite des Primärstrahl begrenzt und beträgt etwa $\Delta q = 0.0025 \mathring{A}^{-1}$.

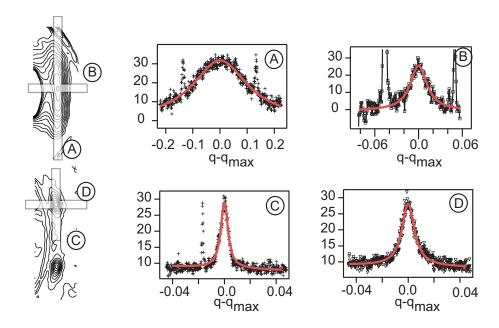


Abb. 5.16: Linke Spalte von oben nach unten: Höhenliniendarstellung der DNA–Korrelationspeaks (0,1) der L^C_{α} und (1,1) der L^C_{β} Phasen. Die eingezeichneten Balken geben an, über welche Bereiche das mit den Buchstaben markierte Höhenprofil ermittelt wurde. Mittlere Spalte: Höhenprofile in q_y -Richtung. Rechte Spalte: Höhenprofile in q_z -Richtung.

	L^C_{lpha} (0,1)	L_{β}^{C} (1,1)	L^{C}_{eta} (6,0)
$q_y^{max}[\mathring{A}^{-1}]$ $q_z^{max}[\mathring{A}^{-1}]$	0	0.0428	$6 \cdot 0.04126$
$q_z^{max}[\mathring{A}^{-1}]$	0.14625	0.17616	0
HWHM $q_y \ [\mathring{A}^{-1}]$	$1.26 \cdot 10^{-1}$	$5.1\cdot10^{-3}$	$3.6 \cdot 10^{-4}$
HWHM q_z [Å ⁻¹]	$1.35 \cdot 10^{-2}$	$3.2\cdot 10^{-3}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$
$\xi_y[\mathring{A}]$	44	1100	15708
$\xi_z[\mathring{A}]$	419	1750	6813
Form q_y	Lorentz	Lorentz	auflösungsbegrenzt
Form q_z	Lorentz	Lorentz	$q^{-\eta}; \eta = 1.37$

Tab. 5.3: Aus den orientierten Proben der Abb. 5.12 und 5.15 ermittelte Positionen der Peakmaxima, Halbwertsbreiten in den Vorzugsrichtungen q_x und q_y und daraus errechnete Korrelationslängen ξ_y und ξ_z . In den zwei unteren Zeilen sind die Kurvenformen mit bester Übereinstimmung nach Anpassung gegeben.

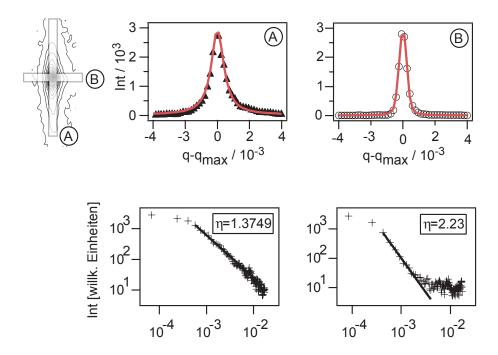


Abb. 5.17: Höhenliniendarstellung des lamellaren Korrelationspeaks der Ordnung (6,0) und Intensitätsverteilung, gemittelt über die eingezeichneten Pfade. In der unteren Zeile sind die Flanken der lamellaren Peaks doppeltlogarithmisch aufgetragen, um sie auf einen algebraischen Abfall hin zu überprüfen.

Für eine semiquantitative Abschätzung der Korrelationslänge geht man davon aus, daß Strahlprofil und zu beobachtender Peak jeweils annähernd Lorentzform haben, um auszunutzen, daß das Faltungsprodukt zweier Lorentzpeaks wieder einen Lorentzpeak ergibt, dessen Breite der Summe der beiden ursprünglichen entspricht. Daher kann man die Breite der Gerätefunktion von der des untersuchten Peaks einfach subtrahieren und sich den aufwendigen und ungenauen Analyseschritt einer Entfaltung von Strahlprofil und Messung ersparen. Auf diese Weise aus den jeweils niedrigsten Ordnung des DNA-Peaks ermittelte Korrelationslängen sind im Einsatz von Abb. 5.18 gegen den Molbruch aufgetragen.

Bei $\chi_{TAP}=0.5$ sieht man einen breiten DNA-Peak der auf eine Korrelationslänge von 60 Å schließen läßt. Höhere Ordnungen sind nicht erkennbar. Mit sinkendem χ_{TAP} verschmälert sich der (1,1)-DNA-Peak und die Ordnungen (3,1) und (5,1) werden deutlicher sichtbar. Bei $\chi_{TAP}=0.25$ zeigt sich ein scharfer (1,1)-Peak (Korrelationslänge 320 Å) und auch die höheren Ordnungen sind deutlich schärfer.

Aufgrund der Auflösung des Experimentes sind die Korrelationslängen nur grobe Abschätzungen nach unten hin. Tatsächlich müßte man eigentlich berücksichtigen,

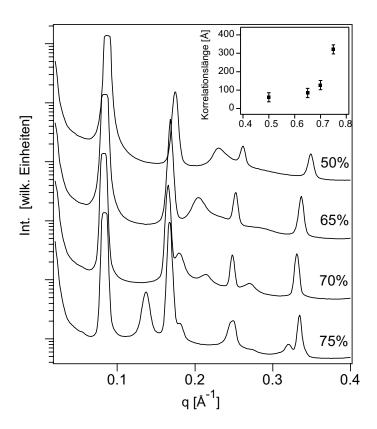


Abb. 5.18: Kleinwinkelröntgendaten gemessen an Lipid–DNA–Komplexen aus DMPC / DMTAP und Kalbsthymus–DNA. χ_{PC} der jeweiligen Mischung nimmt von unten nach oben ab und ist in Prozent angegeben. Die Breite der DNA–Peaks nimmt mit steigendem χ_{TAP} kontinuierlich zu, was die Abnahme der Korrelationslänge im DNA–Übergitter belegt.

daß es in q_y und q_z -Richtung unterschiedliche Korrelationlängen gibt, wie im vorigen Abschnitt an den orientierten Proben gezeigt wurde. Durch die radiale Mittelung werden beide Richtungen auf einen Peak reduziert. Die grobe Abschätzung reicht dennoch aus, um eine deutliche Zunahme der Korrelationslänge mit wachsendem DNA-Abstand zu erkennen.

5.3.3 2-Dimensionale Elektronendichteprofile

Die Beobachtung höherer Ordnungen des DNA–Korrelationspeaks kann dazu verwendet werden, das zweidimensionale Elektronendichteprofil des rhombisch zentrierten Lipid–DNA–Komplexes zu rekonstruieren. Dazu wurde zunächst durch Messung bei unterschiedlichen Abständen der betrachtete reziproke Raum vergrößert. Die erhaltenen Daten sind in Abb. 5.19 unten gezeigt. Die Intensität wurde mit dem Lorentzfaktor aus Gl. 1.33 korrigiert und daraus nach Gl. 1.34 die Streuamplitude ermittelt

und die Elektronendichte $\rho(y,z)$ folgendermaßen berechnet:

$$\rho(y,z) = \sum_{k,l} \sigma_{kl} A_{kl} \cos(kyq_{10}) \cos(lzq_{01})$$
 (5.7)

Diese Gleichung erhält man für zentrosymmetrische Elektronendichten aus Gl. 1.31, wenn man berücksichtigt, daß $\cos(a+b) = \cos a \cdot \cos b - \sin a \cdot \sin b$ gilt, und die Sinusfunktion asymmetrisch ist.

Zur Lösung des Phasenproblems wurde σ_{kl} in Gl. 5.7 zunächst unter Berücksichtigung der Ordnungen (2n,0) für die Elektronendichte in y-Richtung, d.h. senkrecht zu den Lamellen bestimmt. Die zur Wahl entscheidenden Kriterien sind:(i) die Alkylketten habe wegen des hohen Wasserstoffanteils der CH₂-Gruppen die geringste Elektronendichte und wegen der CH₃-Gruppen am Lipidkettenende ein betontes Minimum im Bereich, in dem sich die Lipidmonoschichten berühren. (ii) die Lipidkopfgruppen haben wegen der Phosphatgruppe im Phosphatidylocholin hohe Elektronendichte und (iii) die Elektronendichte der Wasserschicht, in der sich DNA befindet, entspricht dem Durchschnitt in q_z -Richtung aus DNA- und Wasser-Elektronendichte. Dabei nützt man aus, daß das Elektronendichteprofil und die Schichtdicken der unterschiedlichen, im Streifenmodell angenommenen Schichten (Ketten- und Kettenendenbereich, Kopfgruppenbereich, Wasserschicht) von Lipid-Doppelmembranen bekannt ist [84, 91]. Im Lipid-DNA-Komplex taucht zwischen den beiden Maxima, die aus den durch eine Wasserschicht geringerer Elektronendichte getrennter Lipidkopfgruppenlagen resultieren, ein drittes mit vergleichbarer Intensität auf, das durch die Phosphat-reiche DNA hervorgerufen wird. Außerdem ist die Elektronendichte mit der Lipid-Kopfgruppen Zusammensetzung (χ_{TAP}) variabel, da TAP- und PC- Kopfgruppen unterschiedliche Elektronendichten besitzen.

Das Elektronendichteprofil in q_z -Richtung wird dann bei festgehaltenen $\sigma_{2n,0}$ durch Wahl der Vorzeichen der übrigen meßbaren Amplituden bestimmt. Unter Ausschluß von offensichtlich unrealistischen Lösungen, wie z.B. zwei DNA-Molekülen mit 10 Å Durchmesser zwischen den Lipidmembranen etc., muß zwischen den in Abb. 5.19 A und B gezeigten Lösungen entschieden werden. Gegen B spricht, daß die DNA abgeflacht erscheint und noch entscheidender, daß die Dicke des Lipidkettenbereichs schwankt. Die Rekonstruktion des Elektronendichteprofils der Rippelphase $P_{\beta'}$ von Rappolt et al. zeigt, daß die Schichtdicke der Lipidketten konstant ist [66]. Dies wird zusätzlich dadurch erhärtet, daß sich in der Rippelphase anscheinend sämtliche Alkylketten in der "all-trans" Konformation befinden, d.h. ausgestreckt sind. Betrachtet man Abb. 5.19 B und D, findet man, daß in der rechten Lösung die Methylgruppenregion stärker gewellt ist als die Kopfgruppenregion, was im Widerspruch zu der

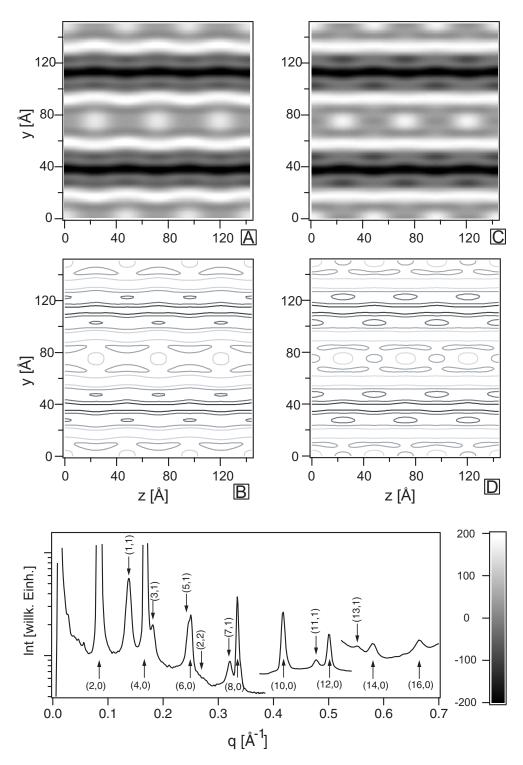


Abb. 5.19: 2D–Elektronendichteprofil rekonstruiert aus dem unten gezeigten und indizierten Datensatz. In (A) und (B) sind die einzig in Betracht kommenden Lösungen des Phasenproblems in Graustufenansicht gezeigt (relative Skala unten rechts), in (C) und (D) die jeweiligen Höhenlinienbilder. Die endgültige Wahl fällt auf die Lösung in (A), da dort die Bedingung einer konstanten Stärke des Lipidkettenbreichs in der L_{β} –Phase erfüllt und der DNA–Querschnitt kreisförmiger ist.

konstanten Dicke des Kettenbereichs steht.

Die erste wichtige Aussage des endgültigen Elektronendichteprofils in Abb. 5.19 A ist, daß die Membran die Form eines Wellblechs annimmt und die Phase zweier benachbarter Wellbleche um 90° verschoben ist, so daß sich der Abstand periodisch vergrößert und verkleinert. Die DNA-Moleküle liegen jeweils am Ort des maximalen Abstandes, was zur Maximierung der angenäherten Fläche zwischen DNA und Membran führt. Auf diese Weise entsteht aus dem Wunsch der DNA, lokal durch die die Membran neutralisiert zu werden, die quasilangreichweitige, rhombisch zentrierte Ordnung des DNA-Übergitters.

Die zweite bemerkenswerte Beobachtung ist, daß die Elektronendichte im Lipidkopfbereich in q_z -Richtung mit der Periodizität der DNA-Dichte oszilliert. Die Elektronendichte ist in unmittelbarer Nähe der DNA am größten und dazwischen minimal. Dies ist ein direkter Hinweis auf eine geringe Schwankung der lokalen Lipidzusammensetzung in der Lipidmembran, und zwar so, daß unter der DNA die DMPC-Konzentration gegenüber dem Durchschnitt erhöht ist. Tatsächlich kann in den PC-Köpfen die Ammonium Gruppe weiter ins Wasser ragen und so den Abstand zur DNA verringert, was zu einer optimierten Ladungsneutralisierung der DNA-Phosphatgruppen führt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Erklärung für die Erhöhung der Phasenübergangstemperatur in Kap. 3.5.

5.3.4 Einfluß der Ordnung im DNA-Gitter auf die Peakform

Debye-Scherrer–Messungen mit einer beträchtlich verbesserten Auflösung von $\Delta q = 8 \cdot 10^{-4} \text{Å}^{-1}$ wurden an der Beamline ID2A des ESRF durchgeführt und sind in Abb. 5.20 abgebildet. Durch die Pulvermittelung verliert man in erster Näherung die Möglichkeit die beiden Vorzugsrichtungen x und y zu unterscheiden. Die Korrelationslängen in diesen Richtungen werden gemittelt.

Die höhere Auflösung macht es möglich, unterschiedliche Formen der Peaks von einander zu unterscheiden. Die Messungen in Abb. 5.20 A wurden bei 20 °C durchgeführt, so daß sich die Proben in der L^C_{β} -Phase befinden. Abb. 5.20 B zeigt Messungen bei 60 °C, also oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Membran. Zunächst sei betont, daß in diesem Fall auch in der L^C_{α} -Phase die mit den Pfeilen markierten höheren Ordnungen des DNA-Peaks auftreten, die mit Ordnungen (3,1) und (5,1) des rhombisch zentrierten Gitters übereinstimmen.

Nun werde jeweils der DNA-Korrelationspeak der Ordnung (1,1) betrachtet. Der

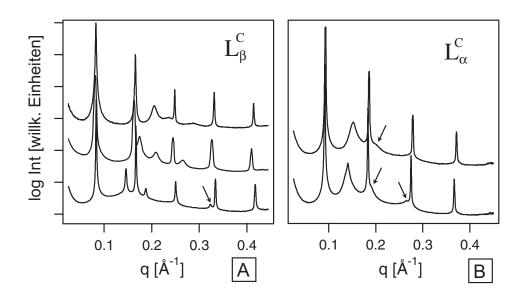


Abb. 5.20: Kleinwinkelröntgendaten gemessen an Lipid–DNA–Komplexen aus DMPC / DMTAP und Kalbsthymus–DNA. Sowohl in der L^C_{β} –Phase (links) wie auch in der L^C_{α} –Phase nimmt die Korrelationslänge, gemessen durch die DNA–Peakbreite, mit dem DNA–Abstand zu. An den lamellaren Peaks kann man die Auflösung von $\Delta q = 8 \cdot 10^{-4} \mathring{A}^{-1}$ abschätzen. Die Pfeile deuten auf DNA–Korrelationspeaks höherer Ordnung mit geringer Intensität. In der L^C_{α} –Phase gibt es demnach ebenfalls orthorombische Ordnung des DNA–Übergitters.

(1,1)-Peak der unteren Kurve von Abb. 5.20 B ist durch ein spitzes Maximum, Dreieckform und einen breiten Hintergrund charakterisiert. In Abb. 5.20 A findet man in der oberen Kurve die typische Lorentzform des (1,1)-Peaks mit rundem Maximum. Die mittlere Kurve zeigt eine Verschmälerung der HWHM. Die Spitze des DNA-Korrelationspeak besteht aus einem schmalen Bereich, deren Breite mit der eines lamellaren Peaks vergleichbar ist, und einem extrem breiten Fuß, der typisch für Funktionen der Art $q^{-\eta}$ ist.

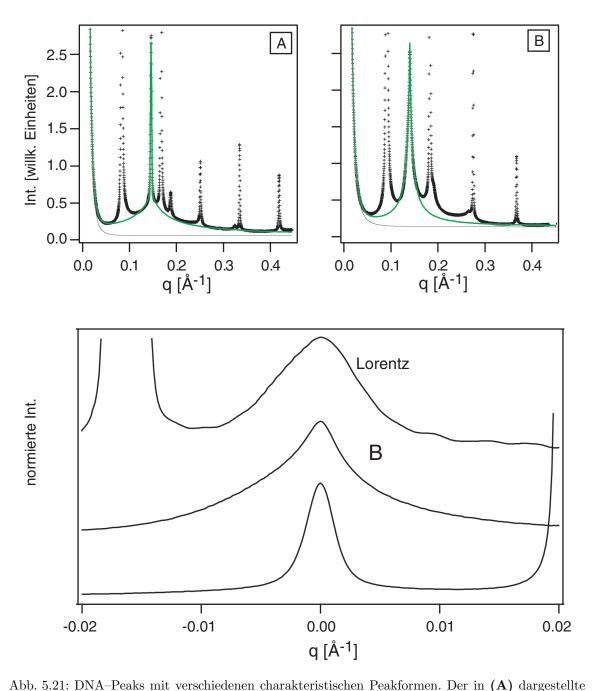
Zur Veranschaulichung sind der (1,1)-Peak der jeweils unteren Messungen von Abb. 5.20 A und B vergrößert in Abb. 5.21 dargestellt. Außerdem ist die jeweils verwendete Basislinie gezeigt.

In Abb. 5.20 A wurde der DNA-Korrelationspeak mit einer Funktion der Form

$$a_1 \cdot e^{-\left(\frac{q-q_0}{c}\right)^2} + a_2 \cdot |q-q_0|^{-\eta}$$
 (5.8)

angepaßt. Der erste Term beschreibt den schmalen Bereich um das Maximum als gaußförmig, der zweite beschreibt den breiten Fuß. Diese Form wird nach [20] für Funktionen der Form

$$a \cdot |q - q_0|^{-\eta} \tag{5.9}$$



Peak hat eine extrem scharfe Spitze und einen breiten Fuß, der in (**B**) gezeigte Peak läßt sich durch ein Potenzgesetz mit $\eta = -1.7$ anpassen. Die beiden Peaks aus (**A**) und (**B**) sind unten noch einmal zusammen mit einem DNA-Peak dargestellt, der eine typische Lorentz-Form aufweist. Alle drei Messungen wurden mit der gleichen Auflösung aufgenommen ($\Delta q = 8 \cdot 10^{-4} \text{Å}^{-1}$). Die Intensität ist auf die maximale Amplitude des DNA-Peaks normiert und linear gegen die Differenz von $q - q_{max}$ geplottet.

erwartet, deren Spitze deutlich schmaler als die Gerätefunktion ist. Ein Peak der Form von Gl. 5.8 hat aufgrund der Divergenz bei q_0 eine beträchtliche Intensität in einem Bereich um q_0 , der schmäler als die Gerätefunktion ist. Das beobachtete Signal ergibt sich als Faltung aus tatsächlichem Signal der Probe und der Gerätefunktion. Als Resultat wird die Intensität unterhalb des Bereiches mit einer geringeren Breite als die Gerätefunktion in einen Peak der Form der Gerätefunktion, d.h. des Primärstrahls gestreut. Tatsächlich entspricht die Breite der Spitze des ersten Terms in Gl. 5.8 der des Primärstrahls. In Abb. 5.21 B wurden die Rohdaten mit Gl. 5.9 angepaßt. Die Spitze dieses Peaks in der fluiden Phase ist deutlich breiter als die des vorher betrachteten in der Gelphase. Ein direkter Vergleich der Peakformen ist in Abb. 5.21 unten gezeigt, wobei die Position des Maximums jeweils zum Ursprung verschoben wurde. Dabei ist ein typischer DNA-Peak mit Lorentzform im Vergleich zu den Peaks aus Abb. 5.21 A und B gezeigt. Der Lorentzpeak wurde durch radiale Mittelung der 2D-Röntgenaufnahme aus Abb. 5.12 A ermittelt. Der Lorentzpeak und der Peak aus Abb. 5.21 B haben etwa vergleichbare Halbwertsbreiten, was auf ähnliche Korrelationslängen von etwa 1500-2000 Å schließen läßt (siehe Tab. 5.3). Die Spitze des Peaks aus Abb. A ist dagegen deutlich schmaler. Genau am Maximum zeigt der Lorentzpeak eine runde Form. Die beiden anderen Spitzen sind - wie im Falle von algebraischen Singularitäten erwartet - durch die Gerätefunktion auflösungsbegrenzt.

5.3.5 Diskussion

Anisotropie der Korrelationslängen

Die orientierten Proben zeigen unterschiedliche Korrelationslängen in in q_y - und q_z - Richtung (Tab. 5.3). In der L^C_α -Phase erstreckt sich die Korrelationlänge parallel zu den Membranen über 10 DNA-Abstände, senkrecht dazu ist sie geringer als die Membrandicke. Die L^C_β -Phase zeigt Korrelation des DNA-Gitters über 14 Membranschichten in q_y -Richtung und über 50 DNA-Abstände in q_z -Richtung.

In der L^C_{α} -Phase fehlt also jegliche Translationskorrelation zwischen zwei benachbarten DNA-Lagen in der beobachteten Probe. Die voneinander unabhängigen, einzelnen DNA-Lagen bilden eine smektische Phase in zwei Dimensionen (2D-Smektik) aus. Sie ist dadurch charakterisiert, daß die DNA-Moleküle in y-Richtung durch die Lipidmembranen in einer Ebene gehalten werden und dadurch Fluktuationen in dieser Richtung unterdrückt werden. In erster Näherung wurde das Intensitätsprofil mit

einer Funktion folgender Form angepasst:

$$I(q_y, q_z) = I_0 \frac{1}{q_y^2 + \xi_y^2} \frac{1}{q_z^2 + \xi_z^2}$$
(5.10)

Sie besteht aus zwei miteinander multiplizierten Lorentzfunktionen, jeweils in Richtung q_y und q_z . Wie in Abb. 5.16 gezeigt, ist die Übereinstimmung mit den Lorentzkurven in beiden Phasen und Richtungen relativ gut. Damit läßt sich durch inverse Fouriertransformation auf die Korrelationsfunktion des DNA-Gitters im Realraum schließen:

$$g(x,y) = \langle e^{iq_0[u(x,y) - u(0,0)]} \rangle = e^{-(y/\xi_y + z/\xi_z)}$$
 (5.11)

Die Ordnung fällt demnach in beiden Phasen $(L_{\beta}^{C} \text{ und } L_{\alpha}^{C})$ wie in einer eindimensionalen Kette, jedoch mit stark unterschiedlichen und anisotropen Korrelationslängen ab (siehe Kap. 1.1.4). In der L_{β}^{C} -Phase ist demnach die Korrelationslänge $\xi_{z} \approx 1750$ Å deutlich größer als $\xi_{y} \approx 1100$ Å. Die Ordnung im DNA-Gitter fällt demnach anisotrop in den beiden Vorzugsrichtungen ab. Noch deutlicher zeigt sich dieser Effekt in der L_{α}^{C} -Phase, in der die Korrelationslänge $\xi_{z} \approx 419$ Å ist, und $\xi_{y} \approx 44$ Å nur etwa einer Lipidmembrandicke entspricht. Das bedeutet, daß höchstens eine schwache Korrelation zwischen genau benachbarten DNA-Galerien besteht.

Salditt et al. haben die Korrelationsfunktion für die 2D–smektische Phase numerisch exakt berechnet [74]. Dabei wurde berücksichtigt, daß die sich DNA–Moleküle auch in x–Richtung krümmen können, was zu einer dritten Korrelationslänge ξ_x in x–Richtung führt. Für $\xi_x > d_{DNA}$ verhält sich das DNA–Gitter in z–Richtung äquivalent zu einem Ensemble von steifen Stäben endlicher Länge, die ausschließlich in z–Richtung fluktuieren, was genau der gezeigten experimentellen Beobachtung entspricht.

Kopplungsmechanismus des DNA-Gitters zwischen benachbarten Galerien: Analyse der DNA-Peakform

Wie in Kap. 1.1.3 besprochen, deutet die Ähnlichkeit des DNA-Peaks in Abb. 5.21 auf quasilangreichweitige Ordnung (QLRO) hin. Der Fuß resultiert aus einer unvollständigen Extinktion der Intensität in den Bereichen des reziproken Raumes zwischen den Braggpeaks. Diese verlieren dadurch an Intensität. Die Tatsache, daß auch in großen q-Abständen vom Peakmaximum noch eine wesentliche Intensität des Fußes meßbar ist (Potenzfunktion), ist ein Anzeichen dafür, daß die Nahordnung im DNA-Gitter gestört ist. Die dennoch extrem scharfe Spitze weist auf hohe Ordnung auf größeren

Längenskalen (ca. 1000 Å) hin. Also ist es naheliegend diese Peakform so zu interpretieren, daß vorhandene Störungen der Gitterposition auf kleineren Längenskalen in radialer Richtung rasch abfallen und nicht die räumliche Korrelation auf größeren Längenskalen vernichten. Je geringer das Verhältnis der Fläche des Fußes zur Fläche des scharfen Peaks ist, desto größer ist die Ähnlichkeit der Phase mit einer echten 3D-kolumnaren Phase.

Die Form eines Lorentz-Peaks legt eine qualitativ andere Interpretation nahe, als zuvor diskutiert. Die runde Spitze zeigt verschwindende räumliche Korrelation auf größeren Längenskalen. Der Fuß des Peaks ist im Vergleich zu einer Potenzfunktion schmäler, und deutet dadurch auf vergleichsweise gute lokale Korrelation hin.

Im Lipid–DNA–System sind zwei unterschiedliche Arten von Defekten denkbar, die lokale Störungen des Gitters hervorrufen können, ohne zwangsläufig die Ordnung auf größeren Längenskalen zu zerstören. Dies sind statische Defekte wie z.B. 3D–Stapelfehler in den Membranen bzw. 2D–Stapelfehler in den 2D–smektischen DNA–Galerien einerseits und andererseits thermische Fluktuationen in Form von Phononen, die je nach Dimension des Systems unterschiedliche Effekte im Gitter hervorrufen können (siehe Kap. 1.1.4).

Statische Störungen, die in Kristallgittern durch Gitterfehlstellen hervorgerufen werden, fallen in guter Näherung etwa mit dem Quadrat des Abstandes ab, so daß dadurch die langreichweitige Ordnung des Gitters bei geringer Konzentration an Störstellen erhalten bleibt [44]. Der Einfluß von Gitterstörstellen mit geringer Konzentration auf das Streusignal wurde zuerst von Huang untersucht [33]. Wichtigstes Ergebnis ist, daß statische Störstellen den gleichen Einfluß auf das Streusignal haben können, wie thermische Anregungen des Gitters, insbesondere diffuse Streuung in den Peakfuß. Es ist also generell nicht möglich, aus statischen Messungen heraus, Unordnungsphänomene aufgrund von statischen Defekten und thermischen Anregungen zu unterscheiden. Zu den in dieser Arbeit gefundenen vergleichbare Peakformen aufgrund von Huang-Streuung wurden z.B. in SiO₂-kontaminierten Siliziumkristallen gefunden [39].

Hinweise darauf, daß die Störungen des Gitters vor allem durch thermische Anregung entstehen, geben die theoretischen Arbeiten von Lubensky et al. und Golubović et al. [23, 58, 24]. Nach deren Abschätzung ist die Dichte von sogenannten Hairpin–Defekten in der 2D–smektischen Phase extrem niedrig, so daß der Effekt von Huang–Streuung keine dominierende Rolle spielen kann. In diesen theoretischen Ansätzen geht man von einem Hamiltonoperator aus, in dem die elastischen Beiträge der 2D–smektischen DNA–Phasen innerhalb der jeweiligen Galerien genauso berücksichtigt

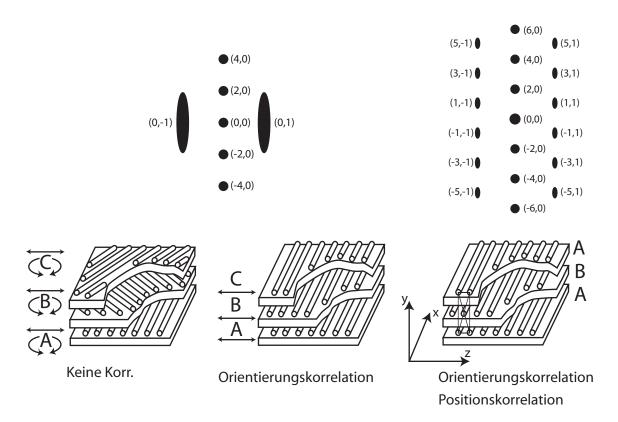


Abb. 5.22: Schematische Darstellung der drei möglichen Ordnungszustände der DNA-Galerien. Links könne die DNA-Schichten frei gegeneinander verschoben und rotiert werden (links), in der gleitend-kolumnaren Phase herrscht Orientierungskorrelation und in der kolumnaren Phase zusätzlich Positionsordnung.

werden, wie die der 3D-smektischen Phasen der Membranen. Darüberhinaus wird Kopplung der Orientierung und der Positionen benachbarter DNA-Gitter berücksichtigt. Die wichtigsten Beiträge zur freien Energiedichte stammen von Kompression $(E_{com}(u,h))$ und Krümmung $(E_{bend}(u,h))$. h steht für Auslenkungen aus der Gleichgewichtslage in y-Richtung, u für Auslenkungen in z-Richtung. Die freie Energiedichte der Komplexe hat damit unter Berücksichtigung von Termen bis zur zweiten Ordnung die Form:

$$E_{komplex}(u,h) = \underbrace{\frac{B_{sm}^{(2D)}}{2} \left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^{2} + \bar{B}\frac{\partial u}{\partial z}\frac{\partial h}{\partial y} + \underbrace{\frac{B_{sm}^{(3D)}}{2} \left(\frac{\partial h}{\partial y}\right)^{2}}_{E_{com}(u,h)} + \underbrace{\frac{E_{bend}^{(3D)} + E_{bend}^{(2D)} + E_{bend}^{int}}_{E_{bend}(u,h)}}_{(5.12)}$$

Wobei $E_{bend}^{(3D)} = \frac{1}{2} B_{sm}^{3D} \left(\frac{\partial h}{\partial y} \right)^2 + K_{sm}^{(3D)} \left(\frac{\partial u^2}{\partial x^2} + \frac{\partial u^2}{\partial z^2} \right)^2$ und $E_{bend}^{(2D)} = \frac{1}{2} K_{sm}^{(2D)}$ die Energiebeiträge durch Krümmung der 3D–Lamellen und der 2D–smektischen Phase des

DNA–Gitters sind. E_{bend}^{int} ist von der Form:

$$E_{bend}^{int} = \frac{K_{yx}}{2} \left(\frac{\partial^2 u}{\partial y \partial x}\right)^2 + \frac{K_{yz}}{2} \left(\frac{\partial^2 u}{\partial y \partial z}\right)^2$$
 (5.13)

 K_{yx} berücksichtigt die Kopplung der Orientierung von DNA-Gittern in benachbarten Schichten, K_{yz} beschreibt die Kopplung von lokalen Dichten der smektischen DNA-Phase $(=\partial_z u)$.

Eine besondere Rolle spielt der Term E_{bend}^{int} . Ist nämlich K_{yz} endlich, führt dieser Energiebeitrag zu einem endlichen Schermodul zwischen zwei benachbarten DNA-Gittern. Ein endlicher Schermodul wiederum führt zu Ausprägung einer 3D-kolumnaren Phase und damit zu langreichweitiger Ordnung. Ist K_{yz} vernachlässigbar, K_{yx} jedoch nicht, führt dies zu einer Phase in der die Orientierung benachbarter DNA-Schichten, jedoch nicht deren Positionen korreliert sind. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 5.22 gezeigt. Die Phase von Lipid-DNA-Komplexen, in der Orientierung und lokale Dichte von benachbarten DNA-Schichten gekoppelt sind, bei gleichzeitig verschwindendem Schermodul der DNA-Gitter, wird als sliding-columnar (SC)(gleitend kolumnare)-Phase bezeichnet. Sie wurde unabhängig voneinander von Golubović und Lubensky unter Verwendung des genannten Hamiltonoperators vorhergesagt [23, 58].

Für den oben beschriebenen theoretischen Ansatz existiert bisher keine analytische Lösung, mit der es möglich ist, die Form des DNA-Peaks anzupassen. Um die Übereinstimmung mit dem Modell zu erzielen wären umfangreiche numerische Routinen nötig.

Andererseits resultiert aus obigem Ansatz die Vorhersage, daß für Fluktuationen entlang der z–Achse $\langle u \rangle \propto (lnL)^2$ gilt. Die für 3D-smektische Phasen bekannte (lnL)– Abhängigkeit der Fluktuationen unterscheidet sich nicht drastisch von $(lnL)^2$. Man kann damit für die Form des DNA–Peaks eine qualitativ ähnliche Form wie für 3D-smektischen Phasen erwarten. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, daß tatsächlich neben der Lorentzform und der auflösungsbegrenzten Form des DNA–Peaks als charakteristische Form der Potenzgesetzabfall auftritt.

Gegenstand der aktuellen Diskussion ist, ob die SC-Phase existiert und, wenn dies der Fall ist, ob der Übergang von der SC-Phase zur 3D-kolumnaren Phase kontinuierlich oder diskontinuierlich ist. Unter der Voraussetzung, daß die diffuse Streuung tatsächlich durch thermische Deformationen der Komplexe hervorgerufen wird, weisen die Daten von equimolaren Lipidmischungen auf die Existenz der SC-Phase hin. Außerdem ist der kontinuierliche Zuwachs der Korrelation mit dem DNA-Abstand ein Indiz für einen kontinuierlichen Übergang der SC-Phase in eine 3D-kolumnare

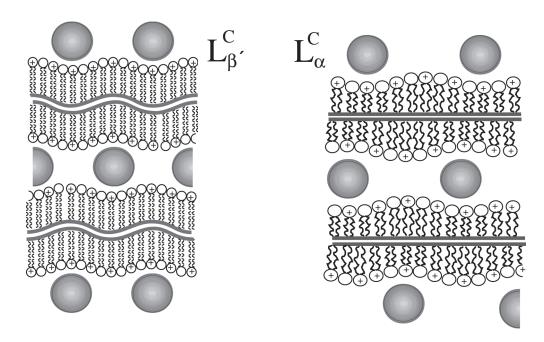


Abb. 5.23: Vorstellbarer Kopplungsmechanismus unter benachbarten DNA–Galerien durch DNA–bedingte, periodische Membrandeformationen. In der L_{α} –Phase können die Ketten benachbarter Lipidmonoschichten interdigitieren, was zu einem geringeren Schermodul als in der L_{β} –Phase führt.

Phase. Der systematische Zuwachs der Korrelationslänge mit dem DNA-Abstand legt darüberhinaus nahe, daß tatsächlich thermische Fluktuationen auschlaggebend für diffuse Streuung sind, da kein naheliegender Grund existiert, der die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Defekten in dichter gepackten DNA-Gittern gegenüber weniger dicht gepackten DNA-Gittern erhöht.

Die Theorie von Golubović und Lubensky macht keine Aussage über die Art der Kopplung, ob diese etwa elektrostatische bzw. mechanische Gründe hat. Es stellt sich Frage, welche Art der Kopplung zwischen den DNA–Galerien ohne topologische Veränderung dazu führt, daß die Korrelation mit dem DNA–Abstand wächst und in der L^C_β –Phase stärker als in der L^C_α –Phase ausgeprägt ist.

Die naheliegendste Erklärung zur Stabilisierung der rhombisch zentrierten Ordnung des DNA-Übergitters ist die Übertragung der Ortsinformation durch Wellung der Membran, die in der rekonstruierten Elektronendichte entdeckt wurde. Diese Anordnung ist darüber hinaus günstig, um die Ladungen der DNA effektiv durch die in der Membran beweglichen Gegenionen zu ermöglichen. Mit steigendem Abstand vergrößert sich der Krümmungsradius, der ja invers quadratisch in die freie Energie

der Biegeenergie der Membran eingeht. Also ist bei größerem DNA-Abstand weniger Energie für eine größere Amplitude der Membran-Wellung erforderlich. Gleichzeitig läßt sich leicht einsehen, daß die Membran-Wellung in der L_{β}^{C} -Phase zu einer stärkeren Korrelation als in der L_{α}^{C} -Phase führt. Dazu betrachte man Abb. 5.23. In der L_{α} -Phase der Membranen ist zwar die Biegesteifigkeit der Membran geringer als in der Gelphase, aber im Gegensatz zur L_{β} -Phase können die Methylgruppen am Ende der Alkylketten in der L_{α} -Phase in die angrenzende Lipidkettenschicht eindringen [25]. Das hat zur Folge, daß in der L_{α}^{C} -Phase die beiden Monoschichten, die die Lipid-Doppelschicht bilden, leichter gegeneinander verschoben werden, was letztendlich zu einer Verringerung des Schermoduls führt. Wie aus dem Elektronendichteprofil in Abb. 5.19 erkennbar ist, beträgt die Amplitude des Membran-Wellblechs nur wenige Å. In der Gelphase dagegen zeigt sich kaum Durchdringung der CH₃-Gruppen so, daß die Wellungen der aneinander angelagerten Monoschichten viel stärker korreliert ist.

Parallel zu den Membranen, d.h. in z-Richtung, bilden die DNA-Moleküle eine 2D smektische Phase, die vor allem durch elektrostatische Abstoßung stabilisiert wird. Senkrecht zu den Membranen, d.h. entlang der y-Achse, sind die DNA-Schichten durch die geladenen Membranen getrennt, wodurch die direkte elektrostatische Wechselwirkung zwischen den DNA-Molekülen in dieser Richtung weitgehend abgeschirmt ist. Elektrostatische Effekte werden eher durch periodische, laterale Phasenseparation der kationischen und neutralen Lipide zwischen den Lipid-Monoschichten übermittelt. Eine zweite Möglichkeit, die Information über die Lage des benachbarten DNA-Gitters durch die Membran zu vermitteln, ist eine Deformation der Membran, die durch elektrostatische Anziehung zwischen DNA-Molekülen und Membran hervorgerufen wird.

6. Kondensierte Phasen aus kationischen Lipiden und anionischen Polymeren

Die Ergebnisse für das thermodynamische und strukturelle Verhalten von Lipid-DNA-Komplexen der vorangegangenen Kapitel können nun angewendet werden, um das Verhalten von Lipid-DNA-Komplexen in der unmittelbaren Nähe von natürlichen Zellmembranen zu simulieren. Die Oberfläche der Zellmembran besteht zum Teil aus negativen Polymerketten, wie z.B. Polyzuckern und Polypeptiden, die an einem Ende in der Zellmembran verankert sind und deren zweites Ende in die extrazelluläre Matrix ragt. Ähnlich wie kationische Lipide und DNA in dicht gepackte Aggregate kondensieren, bilden solche Polyelektrolyte mit entgegengesetzt geladenen Lipiden kondensierte Phasen, die nicht zwangsläufig lamellar sein müssen[19, 104]. Hauptbestandteil dieser negativen Polymerschicht ist Hyaluronsäure. Ein anderes Beispiel sind Proteoglykane, die aus einem zentralen Protein mit kovalent daran gebundenen Seitenketten aus Polysacchariden bestehen, den sog. Glykoaminoglykanen. Diese wiederum bestehen aus Monomeren aus sulfatierten Disacchariden wie z.B. Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Heparin und Deparansulfat. Heparin führt zur Destabilisation von kationischen Lipid-DNA-Komplexen [96]. Repräsentativ für diese geladenen Polyzucker wurde in dieser Arbeit Dextransulfat aufgrund seiner starken Ladung und hohen mechanischen Flexibilität verwendet. In Abb. 6.1 ist schematisch der mögliche Gentransfektions-Mechanismus unter Verwendung eines Lipid-DNA-Komplexes dargestellt. Der Komplex wird über Endozytose aufgenommen, wie für Transfektionsexperimenten in vitro nachgewiesen wurde [97].

6.1 Struktur von kationischen Lipid-Komplexen mit Hyaluronsäure und Dextransulfat

Ebenso wie DNA bilden Hyaluronsäure (HA) und Dextransulfat (DS) (Abb. 6.2) in wässeriger Lösung zusammen mit beschallten, kationischen Lipidvesikeln aus 1:1

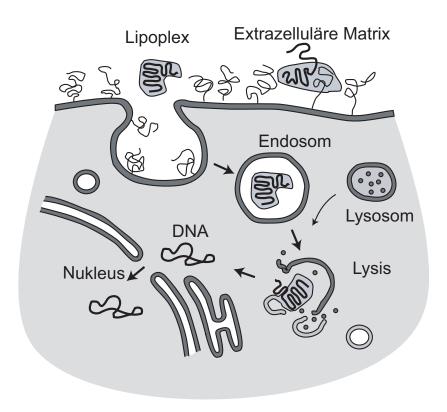


Abb. 6.1: Schematische Zeichnung eines mögliches möglichen Transfektionsvorgangs mittels eines Lipid-DNA-Komplexes. Durch Endozytose gelangt der Genvektor durch die äußere Zellmembran und wird von Lysosomen durch Fusion aufgelöst. Neben immunologischen Abwehrmechanismen bilden die negativen Polysaccharide an der extrazellulären Zellmembran und Lipidorganellen im Zytosol physikalische Barrieren für den Gentransport.

DMPC / DMTAP Mischungen weiße Aggregate, die präzipitieren. Genau wie die im vorigen Kapitel untersuchten lamellaren Lipid-DNA-Komplexe streuen diese Aggregate Röntgenstrahlung in Debye-Scherrer-Ringe, die auf eine isotrope Verteilung von geordneten Domänen hinweisen. In Abb. 6.3 A sind die radial gemittelten Intensitäten von SAXS Messungen an den kationischen Lipid-Aggregaten mit HA und DS zum Vergleich zusammen mit einer SAXS-Messung an DNA-Lipid-Komplexen gezeigt. Die äquidistanten Bragg-Reflexe deuten auf eine lamellare Struktur der Lipidmembranen und dazwischen interkalierten negativen Polymeren hin. Im Gegensatz zu den Lipid-DNA-Komplexen, weisen die Röntgenmessungen der beiden anderen Polymere jedoch keinen Peak auf, der auf Ordnung der Polymere innerhalb der Wasserschichten hinweist. Die an der Beamline D43, LURE, durchgeführten Messungen ließen es zu, die Intensitäten der ersten 6 Ordnungen der lamellaren Peaks zu integrieren. Die daraus rekonstruierten Elektronendichteprofile senkrecht zur Membran sind in

Proben	$d_{lam}(A)$	$d_w(\text{Å})$	$d_{mem}(\text{Å})$	$d_{lam}(\text{Å})$
	$20~^{\circ}\mathrm{C}$	$20~^{\circ}\mathrm{C}$	$20~^{\circ}\mathrm{C}$	$50~^{\circ}\mathrm{C}$
DNA	73.5	35	38.5	65.5
HA	71	26	45	62.5
DS	62.5	21	41.5	54
DMPC	54^a	21^{b}	33	-

Tab. 6.1: Strukturelle Parameter der DMPC / DMTAP / Polyelektrolyt – Komplexe. Die Werte für reines DMPC sind zum Vergleich angegeben. Die Wasserschichtdicke d_w ist vom Abstand der Kopfgruppenamxima abgeleitet. ${}^a[84]$, ${}^b[79]$

Abb. 6.3 B gezeigt. Die Wahl der Vorzeichen wurde nach den gleichen Kriterien wie für die Lipid-DNA-Komplexe getroffen (Kap. 5.1.1 beschrieben). Die gemessenen lamellaren Abstände sind in guter Übereinstimmung mit der Doppelmembran-Dicke von reinem DMPC zuzüglich einer interkalierten Wasserschicht, deren Dicke durch das enthaltene negative Polymer kontrolliert wird. In Tab. 6.1 sind für die drei betrachteten Polymere die lamellaren Abstände und die Dicke der Wasserschichten, die durch den Abstand von Kopfgruppenmaximum zu Kopfgruppenmaximum definiert ist, zusammengefaßt.

Die Wasserschichtdicken stimmen gut mit den geschätzten dehydrierten Durchmessern der Polyelektrolyte, $D_{DNA} \approx 20 \text{Å}$, $D_{HA} \approx 13 \text{Å}$ und $D_{DS} \approx 8 \text{Å}$, zuzüglich einer Hydratationsschicht überein. Die rekonstruierten Elektronendichten zeigen im Zentrum der Wasserschicht von den Polyelektrolyten stammende Maxima. Die Maxima in der DS- und der DNA-Probe sind aufgrund der Sulfat-Gruppen im DS und den Phosphat-Gruppen in DNA stärker ausgeprägt als in der HA-Probe, die geringere Elektronendichten aufweisen sollte.

6.2 Mischungen konkurrierender Polyelektrolyte

Die Frage stellt sich, was passiert, wenn zwei verschiedene negativ geladene Polyelektrolyte gemeinsam mit kationischen Lipidvesikeln gemischt werden? Sind in der Mischung weniger kationische Ladungen enthalten, um die negativen Ladungen der Polyelektrolyte zu neutralisieren, erwartet man Konkurrenz um die starke Abschirmung zwischen den Membranen zwischen den Polyelektrolyten. Dazu wurden SAXS-Messungen an Mischungen aus DS / DNA / DMPC / DMTAP mit verschiedenen molaren Verhältnissen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 6.4 gezeigt sind. In der Abb. sind die molaren Verhältnisse der dissoziierungsfähigen negativen Gruppen

Abb. 6.2: Strukturformeln von Dextransulfat (DS) und Hyaluronsäure (HA).

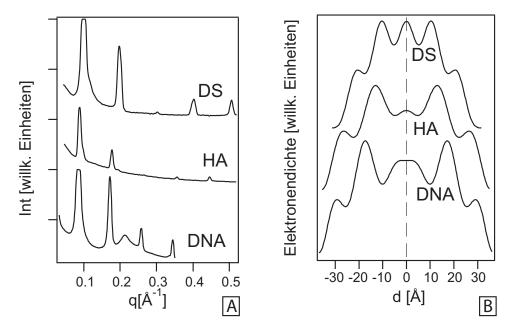


Abb. 6.3: SAXS (A) und daraus ermittelte Elektronendichteprofile (B) von kationischen Lipid-komplexen einer 1:1 DMPC / DMTAP-Mischung mit Dextransulfat, Hyaluronsäure und DNA.

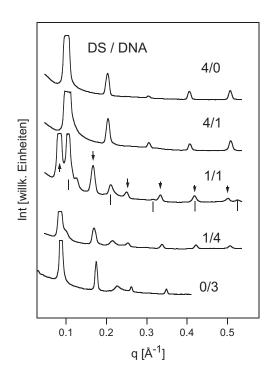


Abb. 6.4: SAXS von kationischen Lipidkomplexen mit variierenden Mischungen aus DS und DNA.

von DS und DNA zu der Anzahl der kationischen Lipidköpfe angegeben. Die oberste Kurve zeigt einen DS-Lipid-Komplex mit vierfachem Überschuß an DS gegenüber den kationischen Ladungen. Diese Probe zeigt eine lamellare Phase, deren Wiederholabstand mit $d_{lam} = 62.0$ Å dem der isoelektrischen DS-Lipid-Komplexe aus Abb. 6.3 entspricht. Dabei koexistieren die Komplexe mit einem dreifachen Überschuß an negativen DS-Ladungen. Die Proben wurden bei 20 °C in der L_{β} und bei 50 °C in der L_{α} Phase gemessen, wobei nur die Messungen in der Gel-Phase gezeigt sind. Die Zugabe von kleinen Mengen DNA zu einem Verhältnis 4:1:1 DS:DNA:kationisches Lipid ändert scheinbar nichts an dem Aussehen der Röntgenkurve und d_{lam} ist in diesem Fall 61 Å. Mischt man zu den kationischen Lipiden DS:DNA im Verhältnis 1:1:1 zeigen sich gleichzeitig zwei lamellare Phasen mit lamellaren Wiederholabständen von d_{lam1} =59.8 Å und d_{lam2} =75.3 Å. Die mit d_{lam1} korrespondierenden Bragg-Peaks sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die mit d_{lam2} korrespondierenden mit Strichen. Die Probe mit deutlichem DNA-Uberschuss von DS:DNA 1:4 schließlich zeigt die für reine Lipid-DNA-Komplexe charakteristische Struktur mit einer kleinen Schulter am linken Fuß der ersten lamellaren Ordnung, was von der DS-Lipid-Phase stammen könnte.

6.3 Thermotropes Verhalten der DS-DNA-Lipid-Komplexe

In Analogie zu den Untersuchungen in Kap. 5.1.1 kann man die gemischt lamellare Phase von DS-Lipid-Komplexen und DNA-Lipid-Komplexen untersuchen. In Abb. 6.5 A ist ein einfacher Aufbau zur Durchführung von strukturellen Messungen in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt. Dazu wird eine Fuji Phosphor-Platte mit konstanter Geschwindigkeit an einem Schlitz vorbeigezogen, so daß nur ein schmaler Bereich der Platte belichtet wird. Erhöht man die Probentemperatur mit konstanter Heizrate, erhält man mit diesem Aufbau die strukturellen Parameter der Probe in Abhängigkeit von der Temperatur. Die zweidimensional aufgezeichneten Daten ergeben einen Graphen, in dem wie in Abb. 6.5 B zu sehen ist, die Intensität $I(q_x,T_y)$ aufgetragen ist, wobei x nach rechts und y nach oben aufgetragen ist. Diese Probe zeigt eine Veränderung des lamellaren Abstandes der isoelektrischen DS / DMPC / DMTAP-Komplexe bei T_m =42 °C, was dem Phasenübergang von der L_{β} zur L_{α} -Phase der Membran zugeordnet wird. Die Probe gemischt aus DS:DNA:DMPC:DMTAP im Verhältnis 1:1:1:1 zeigt die zwei lamellaren Abstände für DS-Lipid-Komplexe und DNA–Lipid
—Komplexe, die sich bei $T_{m1}=38\ ^{\circ}\mathrm{C}$ und $T_{m2}=41\ ^{\circ}\mathrm{C}$ sprunghaft vergrößern. Die Veränderungen der lamellaren Abstände sind voll reversibel und zeigen dabei keine Hysterese.

6.4 Kinetische Messungen

Im folgenden Kapitel werden Experimente zur Untersuchung der Kinetik der Bildung einer gemischten DS-DNA-Lipid-Phase vorgestellt. Dazu wurden Lipid-DNA-Komplexe in einer Kapillare mit Außendurchmesser von 1mm gebildet und mechanisch komprimiert. Zum Zeitpunkt t_0 wird in den Wasserüberstand ein großer Überschuß von Dextransulfat dazugefügt. Der Röntgenstrahl durchdringt die Probe nahe am oberen Rand der Lipid-DNA-Komplexe. Die strukturellen Parameter werden mit dem oben beschriebenen Aufbau in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen. Abb. 6.6 A zeigt wie sich die reine Lipid-DNA-Phase mit der Zeit zu einer neuen Gleichgewichtstruktur umwandelt, wie sie die Kurve 4/1 in Abb. 6.4 aufweist. Dieser Übergang ist durch eine Abnahme der Intensität der lamellaren Reflexe der DNA-Lipid-Komplexe auf Kosten der Reflexe der DS-Lipid-Struktur charakterisiert. Dabei bleibt die Summe der normalisierten Intensitäten gleich, was zu der Annahme führt,

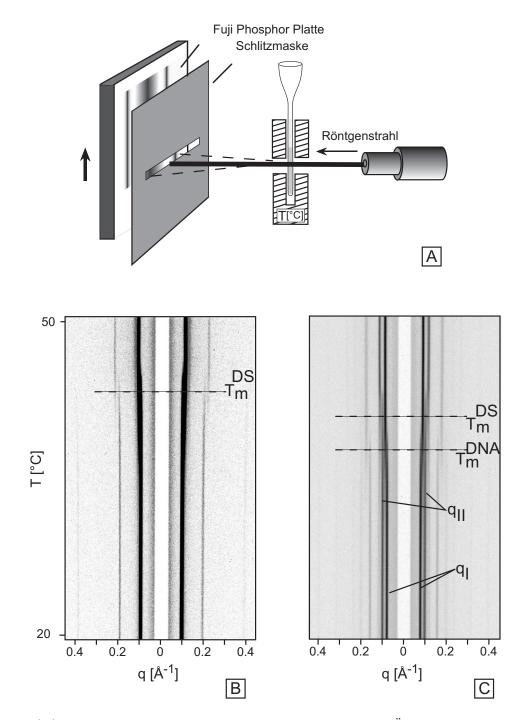
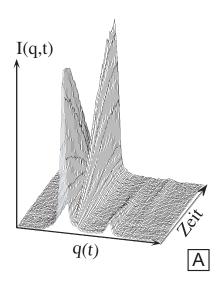


Abb. 6.5: (A) Experimenteller Aufbau für zeitabhängige Messungen der Änderung von strukturellen Parametern mittels SAXS. (B) SAXS einer isolektrischen DMPC / DMTAP–DS Probe mit 0.1° C/min steigender Temperatur und (C) äquivalente Messung an einer DMPC / DMTAP / DS / DNA (1:1:1:1) Mischung. Anhand der jeweils ersten Ordnungen der Bragg–Reflexe (q_I, q_{II}) läßt sich der Unterschied in der Phasenübergangstemperatur der Lipidketten zeigen, was Folge lateraler Phasenseparation ist.



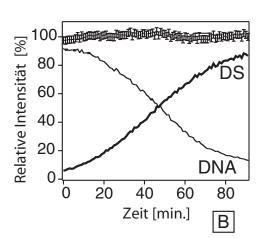


Abb. 6.6: (A) der zeitlichen Entwicklung des Streusignals eine 1:1:1 DMPC / DMTAP / DNA–Komplexes nach Zugabe von DS zum Wasserüberstand. (B) Relative Intensitäten der ersten lamellaren Ordnungen korrespondierend mit DNA–Lipid–Komplexen und DS–Lipid–Komplexen. Die Summe der relativen Intensitäten bleibt zeitlich konstant bei 100% (obere Kurve).

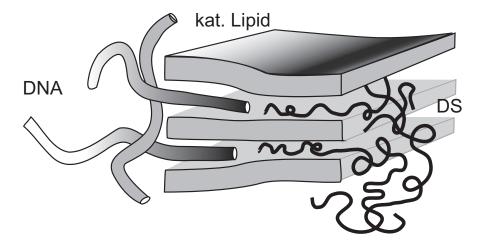


Abb. 6.7: Schematische Zeichnung zur Verdrängung von DNA durch DS in der lamellar kondensierten Phase. Freies Dextransulfat wird in den Komplex gezogen, was DNA-Freisetzung einer stöchiometrisch äquivalenten Einheit bewirkt.

6.5. DISKUSSION 115

daß der Phasenübergang nicht über eine intermediäre Phase abläuft. Diese Vorstellung ist in Abb. 6.7 illustriert. Als interessantes Ergebnis läßt sich festhalten, daß das Dextransulfat von oben nach unten durch die Meßkapillare diffundiert, wobei es die DNA–Lipid–Komplexe auflöst und die DNA aus den Wasserschichten verdrängt. Die Diffusionsgeschwindigkeit kann durch die Zeit abgeschätzt werden, die benötigt wurde, um alle Komplexe im vom Strahl beleuchteten Gebiet umzuwandeln. Damit ergibt sich die Diffusionsgschwindigkeit zu etwa 500 μ m in 2 Stunden, also 4μ m/min. Die in der Gentherapie eingesetzten Komplexe sind im Normallfall kleiner als 1 μ m und würden durch überschüssiges Dextransulfat praktisch instantan aufgelöst werden.

6.5 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß Lipid-DNA-Komplexe durch negativ geladene Polyelektrolyte an der Zelloberfläche noch in der extrazellulären Matrix zerlegt werden können. Dazu reichen jedoch sehr geringe Mengen bzw. Konzentrationen des anionischen Polymers nicht aus, wie die Daten aus Abb. 6.4 zeigen. Kleine Mengen an negativen und flexiblen Polymeren können in Komplexen aufgenommen werden bzw. adsorbieren, was zu einer physikalischen Immobilisierung der Komplexe durch an der Zelloberfläche verankerte Polyelektrolyte führt. Zu diesem Zweck müssen die Gentransferkomplexe jedoch aureichend groß sein. Zum Auflösen kleinerer Komplexe ist weniger anionisches Polymer nötig, da das Verhältnis von zur Verfügung stehender DNA und negativem Polymer zur kationischen Komponente über die Stabilität des DNA-Komplexes entscheidet - nicht die absolute Menge an negativem Polymer. Immobilisierung an der Zelloberfläche ist wahrscheinlicher, wenn die Gesamtladung des Gentransferkomplexes positiv ist. In diesem Falle trägt das negative Polymer zur Neutralisierung der Komplexe bei, immobilisiert den Komplex gleichzeitig an der Zelloberfläche und erleichtert der Zelle auf diese Weise, den Gentransferkomplex durch Endozytose aufzunehmen. Insgesamt folgt, daß die Größe der Gentransferkomplexe für einen effektiven Transfer durch die äußere Zellmembran groß genug zu wählen ist, um nicht von der Glykokalix schon in der extrazellulären Matrix lysiert zu werden, jedoch klein genug, um Endozytose zu erleichtern.

7. Ausblick

DNA-induzierte Lipid-Entmischung

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die thermodynamische Untersuchung der flüssig-kristallinen Phasen in Lipid–DNA–Komplexen. Die Betrachtung des Systems mittels DSC gibt Aufschluß über die thermotropen Eigenschaften der auftretenden Phasen. Eines auffälliges Ergebnisse ist, daß der Koexistenzbereich zwischen den Phasen $L_{\beta'}^C$ und L_{α}^C der Komplexe deutlich breiter ist, als der zwischen $L_{\beta'}$ und L_{α} der reinen Lipidmischungen. Dies ist ein klarer Hinweis für das Auftreten von DNA–induzierter Lipidentmischung in den Membranen, die theoretisch bereits in mehreren Arbeiten behandelt wurde [61, 55, 8, 53]. Ein erster experimentelle Nachweis von DNA–induzierter lateraler Phasenseparation - allerdings für ungesättigte Lipide - wurde von Mitrakos und Macdonald mittles ²H NMR erbracht [57]. In der Gelphase haben Lipidlegierungen i.a. größere Tendenz zur Entmischung, was nahe legt, daß der DNA–induzierte Entmischungseffekt in den Komplexen im Falle von gesättigten Lipidketten verstärkt auftritt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Fourietransformation Infrarot Spektroskopie Experimente (FTIR) durchgeführt, um diese Technik auf Anwendbarkeit zur Beobachtung lateraler Phasenseparation in Lipid–DNA–Komplexen zu testen. In FTIR–
Experimenten mißt man die Absorption von infrarotem Licht in Abhängigkeit der
Wellenlänge. Die charakteristischen Absorptionsbanden lassen sich auf ca. eine halbe
Wellenzahl [cm⁻1] genau bestimmen und sind abhängig vom Molekül und der Art der
Anregungen. Phasenseparation läßt sich durch Beobachtung der Absorptionsbande
der symmetrischen Streckschwingung der CH₂–Gruppen in den Lipidketten im Bereich des Phasenüberganges messen, da deuterierte und nicht deuterierte Komponenten leicht unterscheidbare Absorptionsbanden aufweisen. Die Resonanzfrequenz, d.h.
das Absorptionsmaximum, der CH₂–Gruppen in der Gelphase (2850 cm⁻¹) verschiebt
sich beim Übergang zur ungeordneten fluiden Phase der Ketten um ca. 1-2 cm⁻¹ zu
höheren Werten. Die Resonanzfrequenz der symmetrischen Streckschwingung deuterierter Methylgruppen , CD₂ (2089 cm⁻¹), liegt aufgrund gut 760 cm⁻¹ unterhalb
der Resonanzfrequenz im Falle nichtdeuterierter Alkylketten in Lipidmembranen. Sie

erhöht sich durch die Hauptumwandlung ebenfalls um einige Wellenzahlen. Man kann also die Umwandlungstemperaturen von deuterierten und nichtdeuterierten Lipidketten getrennt von einander beobachten. Im Falle lateraler Phasenseparation lassen sich koexistierende Phasen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnisse durch die unterschiedlichen Hauptumwandlungstemperaturen voneinander unterscheiden.

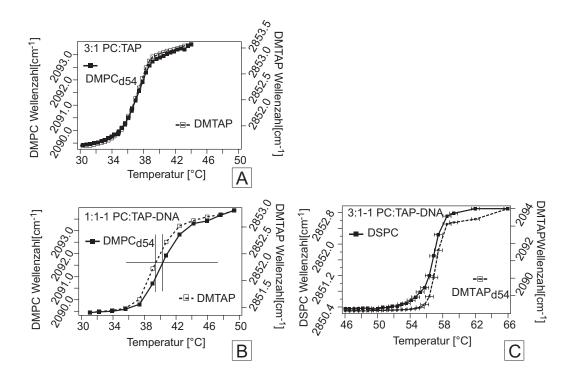


Abb. 7.1: (A) FTIR-Messungen an einer binären DMPC / DMTAP Mischung im Bereich des Hauptphasenüberganges. Aufgetragen sind die Absorptionsmaxima der symmetrischen Streckschwingung der CH₂-Gruppen von DMTAP und der CD₂-Gruppen des kettendeuterierten DMPC gegen die Temperatur. Es ist kein Unterschied zwischen den Hauptumwandlungstemperaturen der deuterierten und nicht-deuterierten Anteile zu erkennen. In der unteren Zeile sind die Absorptionsmaxima der symmetrischen Streckschwingungen in Lipid-DNA-Komplexen gegen die Temperatur aufgetragen. Die verwendeten Lipidmischungen sind DMPC-d₅₄ und DMTAP (1:1) (B) und DSPC und DMTAP-d₅₄ (C). In diesen Fällen sieht man, daß sich die Phasenübergangstemperaturen der deuterierten und nicht-deuterierten Anteile um etwa 1 °C unterscheiden.

In Abb. 7.1 A ist die Position des Maximums des Absorptionspeaks der symmetrischen Streckschwingung gegen die Temperatur aufgetragen. Die Probe besteht aus beschallten Vesikeln, die aus einer Mischung aus kettendeuteriertem DMPC- d_{54} (linke Achse) und nicht-deuteriertem DMTAP (rechte Achse) besteht. Die Kurven liegen klar übereinander, was laterale Phasenseparation unwahrscheinlich macht und

7. AUSBLICK

in guter Übereinstimmung mit der Ausbildung von stöchiometrisch isomolaren Untereinheiten in der Gelphase ist (Kap. 3.5). Betrachtet man im Vergleich dazu die in Abb. 7.1 A aufgetragenen Werte für Lipid–DNA–Komplexe bestehend aus DMPC–d $_{54}$ und DMTAP isoelektrisch gemischt mit DNA sieht man in diesem Fall einen signifikanten Unterschied von ca. 1 °C zwischen deuterierten und nicht deuterierten Ketten. Haben DMTAP–reiche Gebiete eine etwas niedrigere Hauptumwandlungstemperatur als DMPC–d $_{54}$ –reiche Gebiete.

Ein zweites Beispiel ist in Abb. 7.1 B gezeigt, in dem als Lipidmischungen DMTAP– d_{54} und DMPC im Verhältnis 3:1 verwendet und isoelektrisch mit DNA gemischt wurden. Auch in diesem Fall deutet die unterschiedlich Hauptumwandlungstemperatur laterale Phasenseparation an.

Detailliertere Informationen über Entmischungsphänomenen erhält man durch Kontrastvariation in Neutronenstreuexperimenten. Solche Untersuchungen haben jedoch als Voraussetzung, daß die beobachtete Probe keine polydisperse Größenverteilung hat, was für Pulverproben von Lipid–DNA–Komplexe in Lösung i.a. der Fall ist. In diesem Fall ist es nötig, orientierte Proben mit einer ausreichenden Anzahl von Lipid–DNA–Schichten zu präparieren. Bei kleinen Winkeln könnten dann die Intensitäten in der Kratky–Porod–Darstellung ($log(q^2 \cdot Int)$ vs q^2) zur Intensität am Winkel θ =0 extrapoliert werden, woraus laterale Phasenseparation in der Membran gemessen werden kann [41, 42]. In näherer Vergangenheit wurden verschiedenen neue Methoden zu Präparation von orientierten Lipid–DNA–Komplexen veröffentlicht [59, 77, 90] mit denen solche Messungen möglich sein könnten.

Statische Defekte oder thermische Fluktuationen

Um generell statische Defekte von thermischen Fluktuationen in geordneten Strukturen zu untersuchen, bietet es sich an, dynamische Messungen durchzuführen. Kurz nach dem Mischen der Lipid- und DNA-Komponenten zu Lipid-DNA-Komplexen, erwartet man eine hohe Dichte an statischen Defekten wie etwa Haarnadeldefekten. Diese Art von Defekten führt bei DNA mit einigen tausend Basenpaaren, die zweidimensional an kationische Membranen adsorbiert ist, zu einem typischen Muster, das stark an Fingerabdrücke erinnert (Abb. 7.2 A) [100]. Aus den Streuexperimenten ist

¹An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß sich die festkörpergestützte Membran [70] maßgeblich von freien Membranen unterscheidet, da z.B. elastische Deformationen durch die feste Unterlage über elektrostatische und van der Waals Kräfte fast völlig unterdrückt werden. Gerade die DNA–induzierte Wellung der Membran führt jedoch nach der Diskussion von Kap. 5.3 zu der hohen Ordnung des DNA–Übergitters in dreidimensionalen Lipid–DNA–Komplexen.

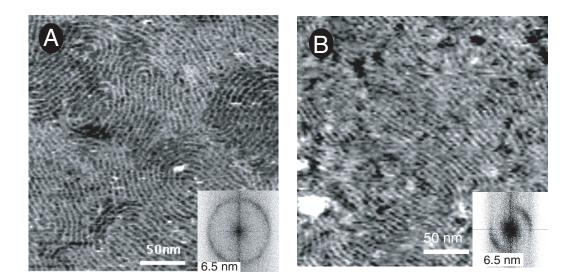


Abb. 7.2: (A) Atom–Kraft–Mikroskopie (AFM) Aufnahmen an doppelsträngiger DNA, die auf festkörperunterstützten Membranen adsorbiert ist. In (A) handelt es sich um ΦΧ174 Hae III digest DNA (78-1353 Basenpaare), in (B) um Oligonukleotiden mit 80 Basenpaaren. Die längere DNA zeigt Domänen mit unterschiedlicher Vorzugsrichtung. Die Oligonukleotide zeigen eine Domäne, in der die DNA–Stäbchen im Mittel in eine Richtung zeigen - trotz der vielen sichtbaren Defekte.

bekannt, daß nach ca. 2 wöchiger Equilibrierung zumindest ein großer Teil der statischen Defekte ausgeheilt ist. Der Verlauf dieses Ausheilungsprozesses beobachtet mit zeitaufgelösten Streuexperimenten kann möglicherweise Aufschluß über den Einfluß von statischen und thermischen Störungen des DNA-Gitters liefern. In Abb. 7.2 B zeigt doppelsträngige DNA-Oligonukleotide mit 80 Basenpaaren und einer Länge von ca. 270 Å. Wie man an dem numerisch Fouriertransformierten Einsatz in den Bildern sieht, ist die Orientierung der kurzen DNA-Moleküle deutlich höher, als die der langen DNA-Moleküle. Die vielen sichtbaren Defekte in der 2D-smektischen Phase haben viel geringeren Einfluß auf die Ordnung des Gesamtsystems als im Falle langer DNA. Durch Vergleich von Streuexperimenten mit langer und kurzer DNA sollte es demnach möglich sein statische und thermische Defekte zu unterscheiden. Bei vergleichbarer Korrelation des DNA-Gitters für lange und kurze DNA-Moleküle könnte man davon ausgehen, daß vor allem thermische Fluktuationen die Gitterordnung stören. Wären die Korrelationslängen in Proben mit DNA-Oligonukleotiden meßbar größer, wäre es naheliegender, daß Huangstreuung an Haarnadeldefekten die Ordnung in Proben mit langer DNA stört.

Literaturverzeichnis

- [1] Als-Nielsen, J., J.D. Lister, R.J. Birgeneau, M. Kaplan, C.R. Safinya, A. Lindegaard-Andersen, and S. Mathiesen, Observation of algebraic decay of positional order in a smectic liquid crystal, Phys. Rev. B 22 (1980), 312–320.
- [2] Antonietti, M., J. Conrad, and A. Thünemann, Polyelectrolyte-surfactant complexes: A new type of solid, mesomorphous material, Macromolecules 27 (1994), 6007–6011.
- [3] Bandyopadhyay, S., M. Tarek, and M.L. Klein, *Molecular dynamics study of a lipid–DNA complex*, J. Phys. Chem. B **103** (1999), 10075–10080.
- [4] Blaurock, A.E. and C.R. Worthington, Treatment of low angle x-ray data from planar and concentric mulilayered structures, Biophys. J. 6 (1966), 305–312.
- [5] Blume, A., R.J. Wittebort, S. K. Das Gupta, and R. G. Griffin, *Phase equilibria*, molecular conformation, and dynamics in phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine bilayers, Biochemistry **21** (1982), 6243–53.
- [6] BlumeA., Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion, Biochemistry 22 (1983), 5436–5442.
- [7] Boukhnikachvili, T., O. Aguerre-Chariol, M. Airiau, S. Lesieur, M. Ollivon, and J. Vacus, Structure of in–serum transfecting DNA–cationic lipid complexes, FEBS Lett. 409 (1997), 188–194.
- [8] Bruinsma, R., Electrostatics of DNA-cationic lipid complexes: Isoelectric instability, Eur. Phys. J. B 4 (1998), 75–88.

- [9] Büldt, G., H.U. Gally, A. Seelig, J. Seelig, and G. Zaccai, Neutron diffraction studies on selectively deuterated phospholipid bilayers, Nature (London) 271 (1978), 182–184.
- [10] Büldt, G., H.U. Gally, J. Seelig, and G. Zaccai, Neutron diffraction studies on phosphatidylcholine model membranes, J. Mol. Biol. 134 (1979), 673–691.
- [11] Cahn, R.W. and P. Haasen, Physical metallurgy, 3. ed., North-Holland Physics Publising, Amsterdam, 1983.
- [12] Caillé, C.R., Remarques sur la diffusion des rayons x dans les smectiques, Sci. Ser. B 274 (1972), 891–893.
- [13] Cevc, G. and D. Marsh, *Phospholipid bilayers*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [14] Cevz, G., How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer, Biochemistry **26** (1987), 6305–6310.
- [15] Chaikin, P.M. and T.C. Lubensky, *Principles of condensed matter physics*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- [16] Craievich A. F., A. M. Levelut, M. Lambert, and Albon N., Polymorphisme du dipalmitoyl 1,2 glyceride, J. Physique 39 (1978), 377–388.
- [17] Dan, N., The structure of DNA- complexes with cationic liposomes cylindrical or lamellar?, BBA 1369 (1998), 34–38.
- [18] de Gennes, P.G. and J. Probst, The physics of liquid crystals, 2. ed., Clarendon Press, Oxford, 1993.
- [19] de Kruijff, B., A. Rietfeld, N. Telders, and B. Vaandrager, Molecular aspects of the bilayer stabilization induced by poly(l-lysines) of varying size in cardiolipin liposomes, BBA 820 (1985), 295–304.

- [20] Dutta, P. and S.K. Sinha, Analytic form for the static structure factor for a finite two-dimensional harmoic lattice, Phys. Rev. Lett. 47 (1981), 50–53.
- [21] Evans, E. and R. Kwok, Mechanical calorimetry of large dimyristoylphosphatidycholine vesicles in the phase transition region, Biochemistry 21 (1982), 4874– 4879.
- [22] Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielson, Lipofection: A highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7413.
- [23] Golubović, L. and M. Golubović, Fluctuations of quasi-two-dimensional smectics intercalated between membranes in multilamellare phases of DNA-cationic lipid complexes, Phys. Rev. Lett. 80 (1998), 4341–4344.
- [24] Golubović, L., T.C. Lubensky, and C.S. O'Hern, Structural properties of the sliding columnar phase in layerd liquid crystalline systems, Phys. Rev. E 62 (2000), 1069–1094.
- [25] Gruen, D.W.R., A statistical mechanical model of the lipid bilayer above its phase transition, BBA **595**, 161–183.
- [26] Guinier, A., x-ray diffraction in crystals, imperfect crystals and amorphous bodies, Dover Publications, New York, 1994.
- [27] Gulik-Krzywicki, T. and M.J. Costello, The use of low temperature X-ray diffraction to evaluate freezing methods in freeze-fracture electron microscopy, J. Microscopy 112 (1978), 103–114.
- [28] Harries, D., S. May, and A. Ben-Shaul, Structure, stability, and thermodynamics of lamellar DNA-lipid complexes, Biophys. J. **75** (1998), 159–173.
- [29] Hauser, H., Effect of inorganic cations on phase transitions, Chemistry and Physics of Lipids 57 (1991), 309–325.

- [30] Heimburg, R.L. and T. Biltonen, Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrom c., Biochemistry **33** (1994), 9477.
- [31] Hentschel, M.P. and F. Rusticelli, Structure of the ripple phase $P_{\beta'}$ in hydrated phosphatidylcholine multimembranes, Phys. Rev. Lett. **66** (1991), 903–906.
- [32] P.C. Hiemenz, Principles of colloid and surface chemistry, 2. ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1986.
- [33] Huang, K., X-ray reflexions from dilute solid solutions, Proc. Roy. Soc. London A 190 (1947), 102–117.
- [34] Inoko, Y. and T. Mitsui, Structural parameters of dipalmitoyl phosphatidylcholine lamellar phases and bilayer phase transitions, J. Phys. Soc. Jap. 44 (1978), 1918–1924.
- [35] Isreallachvilli, J.N., *Physics of amphiphiles: Micelles, vesicles and microemulsi-ons*, North Holland, New York, 1985.
- [36] Jackson, J.D., *Klassische Elektrodynamik*, Walter de Gryter, Berlin New York, 1983.
- [37] Jacrot, B., The study of biological structures by neutron scattering from solution, Rep. Prog. Phys. **39** (1976), 911–953.
- [38] Jähnig, F., Electrostatic free energy and shift of the phase transition for charged lipid membranes, Biophys. Chem. 4 (1976), 309–318.
- [39] Keitel, S., T. Niemller, Lambert U., and J.R. Schneider, Bragg reflection and diffuse defect scattering during the annealing of cz grown silicon crystals, Anual Report, Hasylab (1998).
- [40] King, G.I. and S.H. White, Determining bilayer hydrocarbon thickness from neutron diffraction measurements using strip-function models, Biophys. J. 49 (1986), 1047–1054.

- [41] Knoll, W., J. Haas, H.B. Stuhrmann, Füldner H.H., H. Vogel, and E. Sackmann, Small-angle neutron scattering of aqueous dispersions of lipids and lipid mixtures. A contrast variation study, J. Appl. Cryst. 14 (1981), 191–202.
- [42] Knoll. W., G. Schmidt, K. Ibel, and E. Sackmann, Small-angle neutron scattering study of lateral phase separation in dimyristoylphosphatidylcholine-cholesterol mixed membranes, Biochemistry 24 (1985), 5240–5246.
- [43] Koltover, I., T. Salditt, J.O. Rädler, and C.R. Safinya, An inverted hexagonal phase of cationic liposome–DNA complexes related to DNA release and delivery, Science 281 (1998), 78–81.
- [44] Krivoglaz, M.A., X-ray and neutron diffraction in nonideal crystals, Springer, 1996.
- [45] Landau, L.D., Collected Papers of L.D. Landau, Gordon and Breach, New York, 1965.
- [46] Lemmich, J., K. Mortensen, J.H. Ipsen, T. Hønger, R. Bauer, and O.G. Mouritsen, Small-angle neutron scattering from multilamellar lipid bilayers: Theory, model, and experiment, Phys. Rev. E 53 (1996), 5169–5180.
- [47] Lewis, R.N.A.H. and R.N. McElhaney, Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase–forming propensities of lipid bilayer membranes: Calorimetric and ³¹P–nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids, Biophys. J. **79** (2000), 1455–1464.
- [48] Linseisen, F.M., S. Bayerl, and T. Bayerl, ²H-NMR and DSC study of DPPC-DODAB mixtures, Chem. Phys. Lip. 83 (1995), 9–13.
- [49] Lipowski, R., *Handbook of Biological Physics*, North Holland Publishing Corp.: Amsterdam, 1995.
- [50] Luzzati, V., Biological membranes, Acad. Press. London, 1968.

- [51] Manning, G.S., Limiting laws and counterion condensation in polyelctrolyte solutions, i.colligative properties, J. Chem. Phys. **51** (1969), 924–933.
- [52] May, S. and A. Ben-Shaul, *DNA-lipid complexes: stability of honeycomb-like and spaghetti-like structures*, Biophys. J. **73** (1997), 2427–2440.
- [53] May, S., D. Harries, and A. Ben-Shaul, *The phase behavior of cationic lipid–DNA-complexes*, Biophys. J. **78** (2000), 1681–1697.
- [54] McIntosh, T.J. and S.A. Simon, Hydration force and bilayer deformation: A reevaluation, Biochemistry 25 (1986), 4058–4066.
- [55] Menes, R., P. Pincus, R. Pittman, and N. Dan, Fields generated by a rod adsorbed on an oppositely charged surface: The effect of surface ion mobility and dimensionality on screening, Europhys. Lett. 44 (1998), 395–400.
- [56] Miller, A.D., Cationic liposomes for gene therapy, Angew. Chemie. Int. Ed. 37 (1998), 1768–1785.
- [57] Mitrakos, P. and P.M. Macdonald, DNA-induced segregation of cationic amphiphiles in lipid bilayer membranes as detected via ²h NMR, Biochemistry 35 (1996), 16714–16722.
- [58] O'Hern, C.S. and T.C. Lubensky, Sliding columnar phase of DNA-lipid complexes, Phys. Rev. Lett. **80** (1998), 4345–4348.
- [59] Okahata, Y. and K. Tanaka, Oriented thin films of a DNA-lipid complex, Thin Solid Films **284** (1996), 6–8.
- [60] Peierls, R.E., Bemerkung über Übergangstemperaturen, Helv. Phys. Acta Suppl. 7 (1934), 81.
- [61] Pink, D.A., J. Quinn, B. Moeler, and R. Merkel, Computer simulation of DNA interacting electrostatically with phosphatidylcholine and trimethylammonium-propane interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 2 (2000), 4529–4536.

- [62] Rädler, J.O., I. Koltover, A. Jamieson, T. Salditt, and C.R. Safinya, Structure and interfacial aspects of self-assembled cationic lipid-DNA gene carrier complexes, Langmuir 14 (1998), 4272–4283.
- [63] Rädler, J.O., I. Koltover, T. Salditt, and C.R. Safinya, Structure of DNAcationic liposome complexes: DNA intercalation in multi-lamellar membranes in distinct interhelical packing regimes, Science 275 (1997), 810–814.
- [64] Rapp, G., A. Gabriel, M. Dosière, and M.H.J. Koch, A dual detector single readout system for simultaneous small-(saxs) and wide-angle x-ray (waxs) scattering, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 357 (1995), 178–82.
- [65] Rappolt, M. and G. Rapp, Simultaneous small- and wide-angle x-ray diffraction during the main transition of dimyristoylphosphatidylethanolamine, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **100** (1996), no. 7, 1153–1162.
- [66] Rappolt, M. and G. Rapp, Structure of the stable and metastable ripple phase of dipalmitoylphosphatidylcholine, Eur. Biophys. J. 24 (1996), 381–386.
- [67] Rebhun, L., Freeze-substitution and freeze-drying, Princ. and Techn. of EM 28 (1972), 3–49.
- [68] Roux, D. and C.R. Safinya, A synchrotron X-ray study of competing undulation and electrostatic interlayer interactions in fluid multimembrane lyotropic phases, J. Phys. (France) 49 (1988), 307.
- [69] Sackmann, E., Biophysics, Springer-Verlag, 1984.
- [70] Sackmann, E., Supported membranes: Scientific and practical applications, Science **271** (1996), 43-48.
- [71] Sackmann, E., D. Rüppel, and C. Gebhardt, Defect structure and texture of isolated bilayers of phospholipids and phospholipid mixtures, Liquid Crystals of One- and Two-Dimensional Order. Konferenz Garmisch-Partenkirchen

- (G. Helfrich, W. Heppke, ed.), Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 1980.
- [72] Saenger, W., Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1983.
- [73] Salditt, T., I. Koltover, J.O. Rädler, and C.R. Safinya, Two-dimensional smectic ordering of linear DNA chains in self-assembled DNA-cationic liposome mixtures, Phys. Rev. Lett. **79** (1997), 2582–2585.
- [74] Salditt, T., I. Koltover, J.O. Rädler, and C.R. Safinya, Self-assembled DNAcationic-lipid complexes: Two-dimensional smectic ordering, correlations, and interactions, Phys. Rev. E 58 (1998), 889–904.
- [75] Scherer, P.G. and J. Seelig, Electric charge effects on phospholipid headgroups. phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles, Biochemistry 28 (1989), 7720–7728.
- [76] Seddon, J.M. and R.H. Templer, Structure and dynamics of membranes, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [77] Shabarchina, L. I., M.M. Montrel, G.B. Sukhorukov, I.V. Savintsev, and B.I. Sukhorukov, Preparation of DNA-cationic amphiphile multilayer films by alternate adsorption and a study of their structure, Russian Journal of Physical Chemistry 74 (2000), 1908–1914.
- [78] Silvius, J.R., Anomalous mixing of zwitterionic and anionic phospholipids with double-chain cationic amphiphiles in lipid bilayers, BBA **1070** (1991), 51–59.
- [79] Smith, G.S., E.B. Sirota, C.R. Safinya, R.J. Plano, and N.A. Clark, X-ray structural studies of freely suspended hydrated DMPC multimembrane films, J. Chem. Phys. **92** (1990), 4519–4529.

- [80] J.B. Spink, C.H.and Chaires, Thermodynamics of the binding of a cationic lipid to DNA., J. Am. Chem. Soc. 119 (1997), 10920–10928.
- [81] Sprenger, I., 1998, Sämtliche elektronenmikroskopischen Gefrierbruch—Aufnahmen wurden von Irene Sprenger, Institut für Biophysik E22, Physik-department der Technischen Universität München angefertigt.
- [82] Sternberg, B., F.L. Sorgi, and L. Huang, New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy, FEBS Lett. **356** (1994), 361–366.
- [83] Sun, J.-W., R.M. Suter, M.A. Knewtson, C.R. Worthington, S. Tristram-Nagle, R. Zhang, and J.F. Nagle, Order and disorder in fully hydrated unoriented bilayers of gel phase dipalmitoylphosphatidylcholine, Phys. Rev. E 49 (1994), 4665–4676.
- [84] Sun, J.-W., S. Tristram-Nagle, R.M. Suter, and J.F. Nagle, Structure of gel phase saturated lecithin bilayers: Temperature and chain length dependence, Biophys. J. 71 (1996), 885–891.
- [85] Tardieu, A. and V. Luzzati, Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: A study of lecithin-water phases, J. Mol. Biol. 75 (1973), 711– 733.
- [86] Träuble, H. and H. Eibl, Electrostatic effects on lipid phase transitions: membrane structure and ionic environment, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974), 214–219.
- [87] Tristram-Nagle, S., R. Zhang, R.M. Suter, C.R. Worthington, W.J. Sun, and J.F. Nagle, Measurement of chain tilt angle in fully hydrated bilayers of gel phase lecithins, Biophys. J. 64 (1993), 1097–1109.
- [88] Ververgaert, P.H.J., P.F. Elbers, A.J. Luthingh, and H.J. Van Den Berg, Surface patterns in freeze-frectured liposomes, Cytobiology 6 (1972), 85–96.

- [89] Wagner, K., D. Harries, S. May, V. Kahl, J.O. Rädler, and A. Ben-Shaul, *Direct evidence for counterion release upon cationic lipid–DNA condensation*, Langmuir **16** (2000), 303–306.
- [90] Wang, L., J. Yoshida, and N. Ogata, Self-assembled supramolecular films derived from marine deoxyribonucleic acid (DNA)-cationic surfactant complexes: Large-scale preparation and optical and thermal properties, Chem. Mater. 13 (2001), 1273–1281.
- [91] Wiener, M.C. and J.F. Nagle, Structure of the fully hydrated gel phase of dipal-mitoylphosphatidylcholine, Biophys. J. **55** (1989), 315–325.
- [92] Wiener, M.C. and S.H. White, Fluid bilayer structure determination by combined use of x-ray and neutron diffraction, Biophys. J. **59** (1991), 162–173.
- [93] Wölfel, E.R., Theorie und Praxis der Röntgenstrukturanalyse: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, 3. ed., Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1987.
- [94] Worthington, C.R., The interpretation of low-angle X-ray data from planar and concentric multilayered structures: the use of one-dimensional electron density strip models, Biophys. J. 9 (1969), 222–234.
- [95] Worthington, C.R., G.I. King, and T.J. McIntosh, Direct structure determination of multilayered membrane-type systems which contain fluid layers, Biophys. J. 13 (1973), 480-494.
- [96] Xu, Y. and F.C.J. Szoka, Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, Biochemistry 35 (1996), 5616– 5623.
- [97] Zabner, J., A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, and M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to genetransfer by a cationic lipid, J. Biol. Chem. 270 (1995), 18997–19007.

- [98] Zantl, R., F. Artzner, G. Rapp, and J.O. Rädler, *Thermotropic structural changes of saturated-cationic-lipid-DNA complexes*, Europhys. Lett. **45** (1998), 90–96.
- [99] Zantl, R., L. Baicu, F. Artzner, I. Sprenger, and J.O. Rädler, Thermotropic phase behavior of cationic lipid–DNA complexes compared to binary lipid mixtures,
 J. Phys. Chem. B 103 (1999), 10300–10310.
- [100] Zantl, R., H. Clausen-Schaumann, and J.O. Rädler, Spatial order and mobility of rodlike oligonucleotides at cationic supported membranes, submitted to EPJE.
- [101] Zhou, B.S. and B. Chu, Assembled materials: Polyelectrolyte-surfactant complexes, Adv. Mater. 12 (2000), 545–556.
- [102] Zingsheim, H.P., R. Abermann, and L. Bachmann, Apparatus for ultrashadowing of freeze-etched electron microscopic specimens, J. Phys. E: Sci. Instr. 3 (1970), 39–42.
- [103] Zingsheim, H.P., R. Abermann, and L. Bachmann, Shadow casting and heat damage, Proc. 7th Int. Congr. Electr. Micr. 1 (1970), 411–412.
- [104] Zschörschnig, O., K. Arnold, W. Richter, and S. Ohki, Dextran sulfate– dependent fusion of liposomes containing cationic starylamine, Chem. Phys. Lipids 63 (1992), 15–22.

Veröffentlichungen

- [1] Artzner, F., R. Zantl, G. Rapp, and J.O. Rädler, Evidence of a rectangular columnar phase in condensed lamellar cationic lipid-DNA complexes, Phys. Rev. Lett. 81 (1998), no. 22, 5015–5018.
- [2] Zantl, R., F. Artzner, G. Rapp, and J. Rädler, Chain melting transition in cationic lipid - DNA complexes, Euro. Phys. Lett. 45 (1999), no. 1, 97–103.
- [3] Zantl, R., L. Baicu, F. Artzner, I. Sprenger, G. Rapp, and J. Rädler, Thermotropic phase behavior of cationic lipid-DNA complexes compared to binary lipid mixtures, J. Phys. Chem. B. 103 (1999), 10300–10310.
- [4] Artzner, F., R. Zantl, and J.O. Rädler, Lipid-DNA and lipid-polyelectrolyte mesophases: Structure and exchange kinetics, Cell. mol. Biol. 46 (2000), no. 5, 967–978.
- [5] Artzner, F., R. Zantl, J.O. Rädler, and T. Narayanan, *Sliding columnar phase in DNA-membrane complexes*, ESRF Highlights (2000).
- [6] Pohle, W., C. Selle, D. R. Gauger, R. Zantl, F. Artzner, and J. O. Rädler, FTIR-spectroscopic characterization of a cationic lipid-DNA complex and its components, Phys. Chem. Chem. Phys. 2 (2000), 4642–4650.
- [7] Galneder, R., V. Kahl, B. Maier, J. Nissen, J.O. Rädler, and R. Zantl, Verfahren und Vorrichtung zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von Makromolekülen, Patentschrift 19935028.0, 1999.
- [8] Kahl, V. and R. Zantl, Oberflächenbeschichtung auf einer flüssig/fest Grenz-fläche, Patentschrift 10032329.4, 2000.

Vielen Dank...

... an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei

Prof. Erich Sackmann, der zu jeder Zeit gerne in physikalische Diskussionen verwickelt werden wollte, was sicherlich ein ausschlaggebender Punkt für die entspannte und gleichzeitig produktive Stimmung am Lehrstuhl **E22** war,

Prof. Joachim Rädler, der durch seine eigene Begeisterung für wissenschaftliche Fragen immer verstand, zu diese auf mich und andere zu bertragen, zu jeder Tages und Nachtzeit eine offene Tür hatte und viele gute und durchführbare Ideen lieferte, Franck Artzner, von dem ich das meiste über Röntgestreuung lernte, mit dem ich tage- und nächtelang an allerlei Systemen experimentierte (was there a peak?) und der Joachim einen Großteil der Betreuung dieser Arbeit abnahm. Darüberhinaus bei Valerie Artzner, die jedesmal ihren Kühlschrank mit 1664 füllte, wenn ich in Paris zum Abendessen eingeladen war.

Bei dem ganze lieben chaotischen Rest von E22, insbesondere bei den Leuten ...

- ... aus dem Diplomandenzimmer (Almuth Behrisch, Antero Albersdörfer, Gerald Mathe etc.)
- ... Valentin Kahl, für die Idee, eine kleine Firma zu gründen, und den damit verbundenen Spaß.
- ... Ulf Rädler, für seine Risikobereitschaft, dabei mitzumachen.
- ... Julia Nissen für die legendäre Granada Konferenz (... hab ich gestern eigentlich noch Whiskey getrunken?)
- ... Florian Rehfeldt für die Fahrerei und die Einführung ins "Tscherl" und Bauhaus, sowie dem Rest der abstinenten Motomugruppe (Tori ga naku).
- ... Dominique Durand, Jean Doucet, Gert Rapp, Theyencheri Narayanan, Bruno Demé, die ihre Beamlines perfekt im Griff hatten und so effektives Arbeiten ermöglichten.
- ... Karl Eberle für die mechanische Feinstarbeit und Irene Sprenger für die Elektronenmikroskopie.

Der letzte Dank gilt Christiane, ihrer und meiner Familie.