

Elektrostatik der Erbsubstanz

Einfache physikalische Prinzipien bestimmen die makromolekularen Strukturen der DNS

Roland Netz

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS), ein stark negativ geladenes, fadenförmiges Biopolymer, ist der universelle Träger der Erbinformation aller Lebewesen. Ihre Struktur und Eigenschaften sind von zentralem Interesse in der Mikrobiologie und der bio- oder gentechnologischen Anwendung. Für den Physiker ist die DNS charakterisiert durch einige wenige Parameter wie Länge, Biegesteifigkeit und Ladungsdichte. Durch die relativ einfache Herstellung von gut definierten DNS-Proben und die inzwischen perfekt beherrschten Methoden ihrer Manipulation und Charakterisierung ist sie zu einem beliebten Untersuchungsobjekt für Physiker geworden. Wichtige offene Fragen, z. B. wie die DNS-Strukturen in lebenden Zellen aussehen, aber auch die gezielte Manipulation von DNS-Strängen für gentherapeutische Anwendungen oder für die DNS-Analyse, lassen sich mithilfe von einfachen Konzepten aus der statistischen Mechanik und der Elektrostatik angehen.

Polymere, also Makromoleküle, die aus einer linearen Aneinanderreihung von kleinen Molekülen bestehen, nehmen in der Biologie eine wichtige Stellung ein: Proteine statten die Zelle mit Struktur aus und übernehmen einen Großteil der mechanischen und chemischen Funktionen. Kohlenhydrate dienen als Energiespeicher. Die gesamte Erbinformation jedoch ist in der chemischen Struktur der DNS gespeichert, die mit einem aus vier Buchstaben bestehenden Alphabet (den Basenpaaren) den Bauplan jedes Organismus enthält. Dabei ist die schiere Menge von DNS erstaunlich: In jeder Zelle des Menschen sind alle ca. 35 000 Gene doppelt vorhanden, die in 46 separate Stränge, so genannte Chromosomen (23 von jedem Elternteil), aufgeteilt sind. Das menschliche Genom besteht aus ca. 3×10^9 Basenpaaren, bei einer Länge von 0,34 nm pro Basenpaar kommt man so auf eine Gesamtlänge aller 46 Chromosomen von ungefähr zwei Metern. Die gesamte DNS ist in einen Zellkern gepackt, der einen Durchmesser von nur einigen Mikrometern hat. Sehr ausgeklügelte Mechanismen der Speicherung von DNS ermöglichen es, die DNS nicht nur platzsparend zu packen, sondern auch alle biologischen Mechanismen der Transkription zur RNS, der Reparatur und der Vervielfältigung in einem sehr begrenzten Raum ablaufen zu lassen. Dieser Verpackungsmechanismus beruht auf

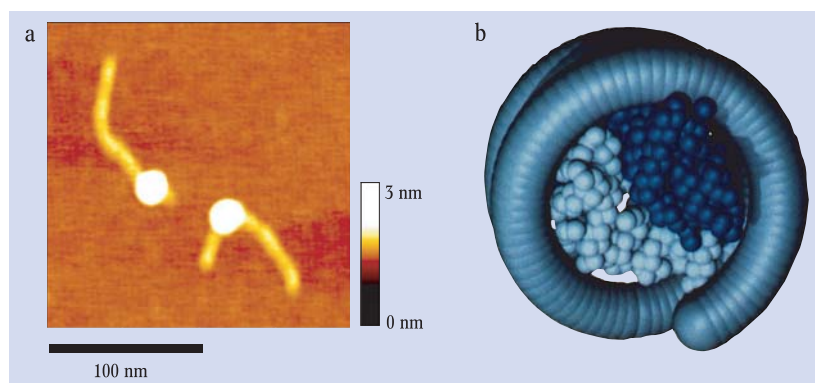


Abb. 1: Das lineare Makromolekül der DNS passt nur aufgrund eines ausgeklügelten Mechanismus, durch den sich die DNS auf ein Histon-Protein aufwickelt, in den Zellkern.
 ► a) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Komplexes aus einem positiv geladenen Histon-Protein und einem teil-

weise herumgewickelten 130 nm langen DNS-Strang [3].
 ► b) Aus Elektronenbeugung an Kristallen ermittelte Feinstruktur des DNS-Histon-Komplexes. Der DNS-Verlauf ist schematisch angedeutet, der Durchmesser beträgt 10 nm.

einfachen physikalischen Prinzipien, wie im nächsten Abschnitt besprochen wird.

Von Bedeutung für das Folgende sind dabei die mechanischen und die elektrischen Eigenschaften der DNS: Zum einen ist sie eine sehr schlanke, aus eng gestapelten Basenpaaren aufgebaute Doppelhelix mit einem Durchmesser von ca. 2 nm und einer Länge, die bis zu mehreren Zentimetern betragen kann. Damit lässt sie sich mit dem Rasterkraftmikroskop direkt abbilden. Das Molekül ist ziemlich biegsam, wobei die Biegeenergie gut durch lineare Elastizitätstheorie beschrieben wird. So beträgt die Energie, die aufgewendet werden muss, um einen 1 μm langen DNS-Strang zu einem Kreis zu biegen, ungefähr $1 k_B T$ bei Zimmertemperatur.¹⁾ Ein DNS-Strang der Länge 1 μm wird also bei Zimmertemperatur durch thermische Anregung (vermittelt durch Stöße mit den benachbarten Wassermolekülen) eine geknäuelte Struktur annehmen, umgekehrt wird ein sehr viel kürzerer Strang eine gerade, gestreckte Form haben. Zum anderen ist die DNS stark negativ geladen, es werden nämlich pro Basenpaar zwei Protonen an das wässrige Medium abgegeben, sodass die DNS zwei negative Ladungen pro Basenpaar trägt. Es sind erst die Ladungen auf der DNS, die sie in Wasser löslich machen. In Abwesenheit von elektrischen Ladungen wäre sie in Wasser genauso

1) Nach dem Gleichverteilungssatz der klassischen statistischen Mechanik enthält im Gleichgewicht jeder Freiheitsgrad eine mittlere thermische Energie von $k_B T/2$, was ein gutes Maß für die Stärke von thermischen Fluktuationen abgibt.

Prof. Dr. Roland Netz, Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, Theresienstr. 37, 80333 München, E-Mail: netz@theorie.physik.uni-muenchen.de

unlöslich wie andere neutrale Polymere (zum Beispiel das im Styropor enthaltene Polystyrol). Einfach gesprochen sind es die abstoßenden Wechselwirkungen zwischen den gleichnamig geladenen DNS-Basenpaaren, die ein Zusammenklumpen der DNS (und damit Ausfällen aus der Lösung) im wässrigen Medium verhindern. Analog zu dieser Diskussion kann man ganz generell kolloidale Objekte (d. h. Objekte im Größenbereich zwischen einem Nanometer und einigen Mikrometern, also z. B. Proteine, kleine Plastikugeln, synthetische und biologische Polymere) durch elektrische Ladungen wasserlöslich machen und damit wässrige Dispersionen ermöglichen. Da Biologie immer in Wasser stattfindet, Wasser aber auch in technischen Anwendungen eine attraktive Alternative zu organischen Lösungsmitteln darstellt (da man so billige, umweltfreundliche und ungiftige Produkte erhält), sind Ladungseffekte in wässrigen Dispersionen von höchster Relevanz. Wichtig ist, dass das Gesamtsystem immer elektrisch neutral ist, das heißt, für jede durch Dissoziation gebildete Ladung an der DNS wird ein so genanntes *Gegenion* in die Lösung abgegeben. Tatsächlich sind die Kräfte zwischen geladenen Objekten durch das Verhalten der diffus an sie gebundenen Gegenionenwolken bestimmt: Diese fluktuieren stark, sind also thermisch angeregt. Andererseits herrschen

zwischen allen Ladungen langreichweitige elektrische Kräfte. Zusätzlich sind weiche Materialien (Polymere, Membranen, Proteine) verformbar und zeigen selber thermisch angeregte Formfluktuationen. Wir haben es bei den durch DNS gebildeten Strukturen mit einer reizvollen Kombination von statistischen und elektrostatischen Fragestellungen zu tun (= *Elektrostatistik*) [1].

Aber nicht nur die Erklärung von biologisch beobachtbaren DNS-Strukturen ist wichtig. Die Separierung, Reinigung und Analyse von DNS-Molekülen sind wichtige Arbeitsgänge der modernen Biotechnologie und erfordern die gezielte Manipulation der Struktur von geladenen Biopolymeren. So ist die Adsorption von DNS-Molekülen auf planaren Substraten wichtig für die Produktion von wohldefinierten DNS-Chips [2]. In der modernen Gentherapie sollen kranke Zellen mit fehlenden Genen bestückt werden, dazu müssen künstliche Viren aus einem DNS-Strang und unterstützenden anderen Komponenten hergestellt werden, die die erforderlichen Gene an die richtige Stelle im Zellkern transportieren. Eine erfolgversprechende Strategie besteht aus einem Komplex aus der negativ geladenen DNS und einem entgegengesetzt geladenen flexiblen Polymer. In allen diesen Anwendungen ist ein physikalisches Verständnis der Mechanismen wichtig.

Elektrostatistik in Salzlösungen

In einer Salzlösung befinden sich zusätzlich zu den festen Ladungen auf geladenen Makromolekülen (z. B. DNS) oder anderen geladenen Objekten auch noch mobile Kationen und Anionen, die durch Dissoziation von Salzen entstehen. So zerfällt Kochsalz in Wasser in Natrium- und Chlorid-Ionen. Diese mobilen Ionen umgeben die geladenen Objekte in einer diffusen Schicht und verändern die effektiven Wechselwirkungen zwischen ihnen.

Poisson-Boltzmann-Gleichung:

Die Poisson-Gleichung verknüpft das elektrostatische Potential $U(\mathbf{r})$ mit der lokalen Ladungsdichte $\varrho(\mathbf{r})$

$$\nabla^2 U(\mathbf{r}) = -\varrho(\mathbf{r})/\varepsilon, \quad (1)$$

wobei ε die dielektrische Konstante bezeichnet. Für eine im Ursprung befindliche Punktladung $q^{(0)}(\mathbf{r}) = e\delta(\mathbf{r})$ entspricht die Lösung der Poisson-Gleichung dem Coulomb-Potential, welches sich in reduzierter Form (pro Elementarladung und geteilt durch die thermische Energie) schreiben lässt als

$$u^{(0)}(\mathbf{r}) = \frac{eU^{(0)}(\mathbf{r})}{k_B T} = \frac{\ell_B}{|\mathbf{r}|} \quad (2)$$

Die Bjerrum-Länge $\ell_B = e^2/(4\pi\epsilon k_B T)$ ist der Abstand, bei dem die elektrostatische Wechselwirkung zwischen zwei Elementarladungen gerade der thermischen Energie $k_B T$ entspricht. In Wasser ist $\ell_B \approx 0,8$ nm und damit die elektrostatische Energie zweier sich berührender Ionen (mit typischem Radius $\approx 0,3$ nm) von der Größenordnung der thermischen Energie.

In einer Salzlösung setzt sich die lokale Ladungsdichte $\varrho(\mathbf{r})$ zusammen aus einem Beitrag der mobilen Ionen (da die Konzentration von Anionen und Kationen lokal nicht unbedingt gleich

sein muss) und dem Beitrag der immobilisierten Ladungen $\varrho_{\text{im}}(\mathbf{r})$. Wie mithilfe von feldtheoretischen Methoden gezeigt werden kann [17], ist die Ionenverteilungsfunktion unter Vernachlässigung von Korrelationseffekten gegeben durch das Boltzmann-Gewicht des elektrostatischen Potentials, die lokale Ionenkonzentration ist also proportional zu $e^{-eqU(\mathbf{r})/k_B T}$ für Kationen und $e^{eqU(\mathbf{r})/k_B T}$ für Anionen der Valenz q . Die lokale Ladungsdichte ist damit

$$\varrho(\mathbf{r}) = \varrho_{\text{im}}(\mathbf{r}) + eqc_s e^{-eqU(\mathbf{r})/k_B T} - eqc_s e^{eqU(\mathbf{r})/k_B T}. \quad (3)$$

Die Salzkonzentration für verschwindendes äußeres Potential ist dabei c_s . Durch Verknüpfung der Gl. (1) und (3) erhält man die klassische Poisson-Boltzmann-Gleichung

$$\nabla^2 U(\mathbf{r}) = 2eqc_s \sinh[eqU(\mathbf{r})/k_B T]/\varepsilon - \varrho_{\text{im}}(\mathbf{r})/\varepsilon, \quad (4)$$

die allerdings wegen der Nichtlinearität in U nur für den Fall einer planaren geladenen Wand exakt gelöst werden kann [18]. Für multivalente Gegenionen brechen die mean-field-artigen Näherungen, die zur Poisson-Boltzmann-Theorie führen zusammen [15].

Debye-Hückel-Näherung: Für niedrige lokale Potentiale $eqU/k_B T < 1$ kann man die Nichtlinearität in Gl. (3) entwickeln. In linearer Näherung erhält man die Debye-Hückel-Gleichung

$$\nabla^2 U(\mathbf{r}) = \kappa^2 U(\mathbf{r}) - \varrho_{\text{im}}(\mathbf{r})/\varepsilon, \quad (5)$$

wobei κ^{-1} die Abschirmlänge ist, definiert durch $\kappa^2 = 8\pi q^2 \ell_B c_s / \varepsilon$ [5]. Mit einer immobilisierten Punktladung im Ursprung, $\varrho_{\text{im}}^{(0)}(\mathbf{r}) = e\delta(\mathbf{r})$, ist die Lösung der Debye-Hückel-Gleichung gegeben durch

$$u_{\text{DH}}^{(0)}(\mathbf{r}) = \frac{eU_{\text{DH}}^{(0)}(\mathbf{r})}{k_B T} = \frac{\ell_B e^{-\kappa r}}{|\mathbf{r}|}. \quad (6)$$

Wie man sieht, ist in Anwesenheit von mobilen Ionen das Coulomb-Potential durch einen exponentiellen Abschirmterm abgeschwächt und geht im Limes verschwindender Salzkonzentration $\kappa \rightarrow 0$ in das reine Coulomb-Potential, Gl. (2), über. Damit ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ladungen für Entfernungen größer als die Abschirmlänge irrelevant; die Ladungen werden durch ihre Gegenionenwolken effektiv neutralisiert. Unter physiologischen Bedingungen, also Salzkonzentrationen von ca. 100 mM, ist die Abschirmlänge von der Größenordnung $\kappa^{-1} \approx 1$ nm.

Debye-Hückel-Potentiale von ausgedehnten Ladungen: Ein angenehmer Nebeneffekt der Linearität von Gl. (5) ist, dass sich Potentialverteilungen von komplizierteren Ladungsverteilungen $\varrho_{\text{im}}(\mathbf{r})$ durch Superposition berechnen lassen,

$$u_{\text{DH}}(\mathbf{r}) = \int d\mathbf{r}' u_{\text{DH}}^{(0)}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \varrho_{\text{im}}(\mathbf{r}'). \quad (7)$$

Das Potential der Punktladung in Gl. (6), $u_{\text{DH}}^{(0)}(\mathbf{r})$, ist die so genannte Greensche Funktion der Debye-Hückel-Gleichung. So erhält man für das Potential einer geladenen Wand mit Oberflächenladungsdichte σ , also für $\varrho_{\text{im}}(\mathbf{r}) = \sigma\delta(z)$, das Potential

$$u_{\text{DH}}(\mathbf{r}) = 2\pi\ell_B \sigma e^{-\kappa z}/\kappa. \quad (8)$$

Für eine geladene Linie der linearen Ladungsdichte τ , also für $\varrho_{\text{im}}(\mathbf{r}) = \tau\delta(x)\delta(y)$, ist das Potential

$$u_{\text{DH}}(\mathbf{r}) = 2\ell_B \tau K_0 \left[\kappa \sqrt{x^2 + y^2} \right]. \quad (9)$$

Die Bessel-Funktion $K_0[x]$ hat das asymptotische Verhalten $K_0[x] \approx -\ln|x|$ für $x < 1$.

DNS-Packung im Zellkern

Obwohl die DNS ein stark negativ geladenes, steifes Biopolymer ist und einer Faltung somit mechanischen und elektrostatischen Widerstand entgegengesetzt, ist das zwei Meter lange menschliche Erbgut in einem nur einige Mikrometer großen Zellkern verstaut. Der Mechanismus dieser Faltung ist einfallreich: Die DNS wickelt sich um eine Vielzahl von positiv geladenen Proteinen (so genannte Histone) herum, wird dadurch kompaktifiziert und teilweise neutralisiert. Abbildung 1a zeigt rasterkraftmikroskopische (RKM) Bilder von im Reagenzglas rekonstituierten Komplexen aus 130 nm langen DNS-Strängen und Histonen (mit einem Durchmesser von circa 8 nm) bei einer Salzkonzentration von $c_s = 50$ mM [3]. Die genaue Wicklung der DNS um die Histone kann nicht aufgelöst werden, aber aus der Länge des überstehenden DNS-Stückes ergibt sich, dass die DNS mindestens einmal um das Histon gewickelt ist. Abbildung 1b zeigt die durch Röntgenbeugung an Kristallen gewonnene Feinstruktur des Komplexes. Tatsächlich wickelt sich die DNS fast zweimal komplett um das Histon herum. Experimente haben gezeigt, dass diese Struktur nur stabil ist für mittlere Salzkonzentrationen zwischen 20 mM und 500 mM (der physiologische Wert im Körper ist $c_s \approx 100$ mM, was ungefähr der Salzkonzentration im Meer entspricht). Für nach unten und nach oben abweichende Salzkonzentrationen fällt der Komplex auseinander [4]. Da Salz vor allem die elektrische Wechselwirkung moduliert, liegt also ein elektrostatischer Mechanismus zugrunde.

Salze zerfallen in wässriger Lösung in ihre ionischen Bestandteile und erhöhen damit die Ionen-Konzentration in den die DNS und die Histone umgebenden Gegenionenwolken. Da sich zwei geladene Objekte gegenseitig immer im Zusammenhang mit ihren Gegenionenwolken sehen, wird die effektive elektrostatische Wechselwirkung reduziert durch Salzzugabe, man spricht von einem *Abschirmungseffekt*. In der einfachsten linearen Theorie nach Debye-Hückel (DH) [5] ist die abgeschirmte Coulomb-Wechselwirkung zweier Elementarladungen im Abstand r gegeben durch $u_{DH}(r) = \ell_B e^{-\kappa r}/r$ (siehe Infokasten „Elektrostatik in Salzlösungen“, Gl. (6)), wobei die Abschirmlänge κ^{-1} von der Salzkonzentration c_s abhängt wie $\kappa^2 = 8\pi q^2 \ell_B c_s$ (q ist die Ionenvalenz und die Bjerrum-Länge $\ell_B = e^2/(4\pi\epsilon k_B T)$ bezeichnet den Abstand, bei dem zwei Elementarladungen mit $k_B T$ wechselwirken). Je größer die Salzkonzentration, desto kleiner die Abschirmlänge κ^{-1} und desto schwächer die elektrostatischen Wechselwirkungen.

In unserer Modellrechnung wird ein durch die Persistenzlänge ℓ charakterisierter steifer Stab²⁾ mit homogener Linienladungsdichte an einer entgegengesetzt geladenen Kugel betrachtet. Die Länge des Stabes ($L = 50$ nm), seine Biegesteifigkeit oder Persistenzlänge ($\ell = 30$ nm) und seine lineare Ladungsdichte ($\tau = 6 e/\text{nm}$) entsprechen den in Experimenten benutzten DNS-Strängen [4], der Radius der Kugel entspricht mit $R = 5$ nm ungefähr dem eines Histonproteins. Es lässt sich zeigen, dass die thermischen Fluktuationen der Gegenionenwolken wichtig sind und auf einem befriedigenden Niveau durch Verwendung des linearisierten DH-Potentials berücksichtigt werden, dass aber Formfluktuationen der kurzen DNS-Stränge wegen der großen Steifigkeit irrelevant sind. Wichtig ist tatsächlich der Grundzustand, und Abb. 2a zeigt einige nume-

risch bestimmte optimale DNS-Konformationen für eine feste Kugelladung $Z = 25$ und verschiedene inverse Abschirmängen κ (proportional zur Wurzel der Salzkonzentration c_s) [6]. In Übereinstimmung mit den Experimenten ist der Komplex nur für mittlere Salzkonzentrationen stabil. Abbildung 2b zeigt das Phasendiagramm als Funktion von der Ladung der Kugel Z (die genaue Histonladung ist variabel und schwer zu

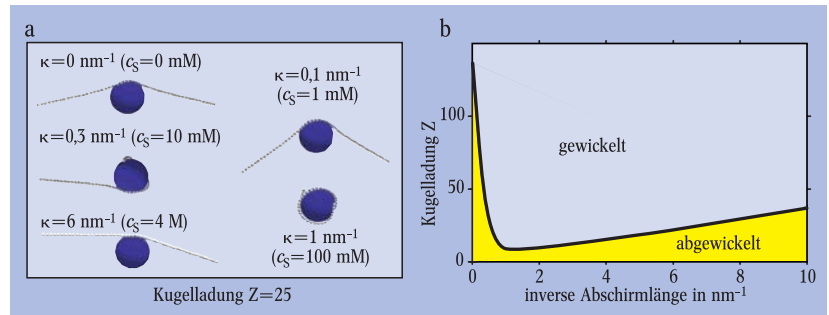


Abb. 2: Die Kompaktifizierung der DNS lässt sich durch ein Modell beschreiben, in dem sich ein geladener, biegsamer Stab auf eine entgegengesetzt geladene Kugel wickelt. ► a) Die Grundzustands-Konfiguration für eine feste Kugelladung $Z = 25$ hängt

stark von der Salzkonzentration ab. ► b) Phasendiagramm als Funktion der inversen Abschirmlänge $\kappa = \sqrt{8\pi q^2 \ell_B c_s}$ und der Kugelladung Z . Wie im Experiment ist der gewickelte Zustand nur für mittlere Salzkonzentration c_s stabil.

ermitteln, sollte aber im Bereich $20 < Z < 100$ liegen) und von κ . In dem gelb gefärbten Bereich des Diagramms wickelt sich die DNS nicht um die Kugel. In dem verbleibenden Bereich des Diagramms, und zwar vor allem für mittlere Salzkonzentrationen, wickelt sich die DNS dagegen fest um die Kugel. Die Linie zwischen diesen Bereichen stellt einen Formübergang dar, bei dem sich die DNS schlagartig von der Kugel abwickelt. Durch Analyse der verschiedenen Energiebeiträge versteht man den Mechanismus dieses Verhaltens: Für eine kleine Salzkonzentration ist die Abstoßung zwischen den geladenen DNS-Einheiten zu groß, für eine große Salzkonzentration ist die Anziehung zwischen Kugel und DNS zu schwach und kann die elastische Biegeenergie der DNS nicht überwinden. Die optimale Salzkonzentration, bei der der gewickelte Zustand für eine minimale Kugelladung beobachtet wird, liegt bei $c_s \approx 100$ mM (oder einer Abschirmlänge von 1 nm, siehe Abb. 2b), was ungefähr dem physiologischen Wert entspricht. Bei dieser optimalen Salzkonzentration reicht eine Kugelladung von $Z \approx 10$, um die gesamte DNS (mit einer Gesamtladung von $\tau L \approx 300 e$) fest zu binden und damit den Platzbedarf im Zellkern drastisch zu reduzieren. Offensichtlich lässt sich also eine biologisch sehr wichtige Funktion durch einen relativ einfachen physikalischen Mechanismus erklären.

DNS auf planaren Trägern

Für viele Anwendungen ist es wichtig, DNS kontrolliert auf planaren Substraten zu adsorbieren, so z. B. bei der Herstellung von DNS Chips.³⁾ Wichtig sind die Struktur der adsorbierten DNS und die Menge von adsorbiertem Material, die bei bestimmten Parameterwerten (z. B. Salzgehalt der umgebenden Lösung) erreicht werden kann. Abbildung 3a zeigt eine RKM-Aufnahme einer Schicht von adsorbierter DNS auf einer positiv geladenen Unterlage [7], die aus einer Lösung mit einer relativ hohen Salzkonzentration von 1 M auf das Substrat gebunden wurde. Die Analyse der RKM-Daten zeigt, dass die DNS flach in einer sehr dünnen Schicht

2) Um einen steifen Stab der Länge ℓ auf einen Kreisabschnitt mit Radius ℓ zu biegen, wird eine Biege-Energie von $k_B T/2$ benötigt.

3) DNS-Chips enthalten eine große Anzahl von fest verankerten oder adsorbierten, verschiedenen DNS-Strängen und werden zur schnellen und parallelen Analyse von DNS-Sequenzen verwendet [2].

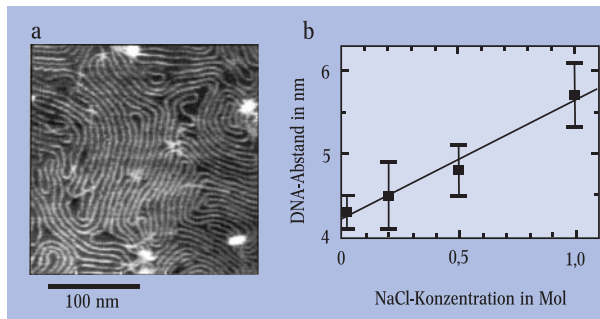
auf dem Substrat gebunden ist, was im Widerspruch zu den sehr diffusen Adsorptionsschichten von synthetischen Polymeren steht. Die einzelnen Stränge halten einen relativ wohl definierten Abstand voneinander, der bei $c_s = 1$ M mit ungefähr $B \approx 6$ nm deutlich größer als der DNS-Durchmesser von $D \approx 2$ nm ist. Oberhalb einer Längenskala von etwa 100 nm ändern die DNS-Stränge ihre Richtung, die Struktur ähnelt einem Fingerabdruck. Der Abstand zwischen den DNS-Strängen steigt mit wachsender Salzkonzentration an (Abb. 3b).

Viele von diesen Ergebnissen lassen sich durch den Wettstreit zwischen einer entropisch-bedingten Abstoßung zwischen den Biopolymeren und der elektrostatischen Anziehung an das Substrat erklären [8]:

Die elektrostatische Anziehungsenergie eines DNS-Stranges im mittleren Abstand δ vom Substrat ist nach der linearen Debye-Hückel-Theorie, siehe Gl. (8) im Infokasten, gegeben durch $f_{att} = -2\pi\ell_B\sigma\tau\kappa^{-1}e^{-\kappa\delta}$, wobei σ die Oberflächenladungsdichte des Substrats bezeichnet (für eine volle nichtlineare Berechnung der Anziehung siehe [9]). Für die im Experiment benutzten langen DNS-Stränge (die in Abb. 3a gezeigte DNS besteht aus 2880 Basenpaaren und hat somit eine Länge von $L \approx 1 \mu\text{m}$) sind Formfluktuationen wichtig: Die Anwesenheit des festen Substrates führt zu einer so genannten

4) Die in Abb. 3a gezeigte Struktur wurde bei einer Salzkonzentration $c_s = 1$ M erzeugt, aber wegen der starken Formfluktuationen bei einer viel niedrigeren Salzkonzentration abgebildet (bei der die starke elektrostatische Abstoßung Kollisionen verhindert).

Abb. 3:
 ► a) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von DNS, aus einer 1 molaren Salzlösung auf ein positiv geladenes planares Substrat adsorbiert [7]. Der mittlere Abstand zwischen den DNS-Strängen beträgt 6 nm.
 ► b) Mittlerer DNS-Abstand in der adsorbierten Schicht als Funktion der Salzkonzentration.



entropischen Kraft, und zwar einer Abstoßung, da die Anzahl von möglichen Polymerkonformationen eingeschränkt wird. Wie in Abb. 4a schematisch gezeigt, misst die Deflektionslänge λ den Abstand zwischen zwei „Kollisionen“ der DNS mit dem Substrat. Sie ist gegeben durch $\lambda \approx \delta^{2/3}\ell^{1/3}$ [10]. Pro Kollision geht ein Orientierungs-Freiheitsgrad verloren, was die DNS etwa $1 k_B T$ an Entropie kostet. Da die Deflektionslänge λ mit sinkendem Abstand vom Substrat abnimmt, steigt die Anzahl der „Kollisionen“ und damit auch der Entropieverlust. Dies führt zu einer entropischen Abstoßung, die pro Längeneinheit der DNS gegeben ist durch $f_{rep} \approx 1/\lambda \sim \delta^{-2/3}\ell^{-1/3}$. Dieser repulsive Beitrag zur freien Energie ist typisch für weiche, auf der Nanometerskala fluktuierende Objekte wie Membranen oder Polymere. Minimierung der Summe der Beiträge zur freien Energie bzgl. des mittleren Abstands, $\partial(f_{att} + f_{rep})/\partial\delta = 0$, ergibt für kleine Abstände $\delta < \kappa^{-1}$

$$\delta \approx (3\pi\ell_B\sigma\tau)^{-3/5}\ell^{-1/5}.$$

Der Abstand wird mit wachsender Polymerbiegesteifigkeit ℓ kleiner, steife Polymere (wie DNS) sollten also in der Tat in sehr flachen Schichten adsorbieren. Mit den für Abb. 3a benutzten Parameterwerten ergibt sich eine Schichtdicke von 0,1 nm, die DNS sollte also vollkommen flach und ausgebreitet auf dem Substrat liegen (wie experimentell beobachtet). Einen Desorptionsübergang erwartet man, wenn die mittlere Schichtdicke die Abschirmlänge erreicht, was bei einer Salzkonzentration von mehr als 1 M der Fall ist.

Mit ähnlichen Argumenten ergibt die Balance zwischen der elektrostatischen Anziehung der DNS an das Substrat und der lateralen entropischen Abstoßung zwischen benachbarten DNS-Strängen (wie in Abb. 4b gezeigt) einen mittleren lateralen DNS-Abstand von⁴⁾

$$B \approx \frac{\kappa^{3/2}}{(\ell_B\sigma\tau)^{3/2}\ell^{1/2}}.$$

Da $\kappa^2 \sim c_s$ steigt der mittlere DNS-Abstand also mit zunehmender Salzkonzentration an, wie in Abb. 3b experimentell belegt. Der Grund ist, dass bei gleichbleibender entropischer Abstoßung zwischen benachbarten DNS-Strängen die elektrostatische Anziehung an das Substrat bei hohem Salzgehalt schwächer wird. Durch geeignete Wahl der Salzkonzentration in der Lösung, aus der die DNS adsorbiert wird, lässt sich der Abstand zwischen den Strängen und damit die mittlere Bedeckungsdichte sehr präzise einstellen, was für Anwendungen von Bedeutung sein kann.

DNS-Polymer-Komplexe

In der Gentherapie versucht man, ausgewählte DNS-Stränge in Körperzellen eines Patienten zu schleusen, um defekte Gene (aufgrund einer Erbkrankheit, z. B. Mukoviszidose) auszutauschen. Für das Einschleusen therapeutischer Gene gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen benutzt man speziell präparierte Viren, die von Natur aus in Wirtszellen eindringen und ihr Erbgut installieren. Wegen der schädlichen Nebenwirkungen und Gefahren dieser Methode erforscht man seit geraumer Zeit synthetische Viren, die aus dem Gen (d. h. einem DNS-Strang) und einem positiv geladenen Polymer bestehen [11]. (Andere Techniken bauen auf die DNS-Kompaktifizierung durch Zugabe von mehrwertigen Ionen, z. B. Sperminen oder Spermidinen, wie sie in Spermien vorkommen, oder von kationischen Lipiden [12].) Diese Komplexe haben relativ gute Transfektionseigenschaften, wandern also spontan durch die Zelle und die Zellkernmembran in den Zellkern und bauen das Target-Gen in das Erbgut ein. Der Transfektionsmechanismus ist nicht genau verstanden, aber es ist klar, dass die Morphologie des DNS-Komplexes eine wichtige Rolle spielt. Eine Frage ist, ob und wie sich die DNS und das entgegengesetzt geladene Polymer umeinander wickeln. Für die in klinischen Experimenten benutzten Polymere (z. B. flexible kationische Polypeptide wie Polylysin [11]) lässt sich diese Frage wegen der kleinen Abmessungen schwer beantworten.

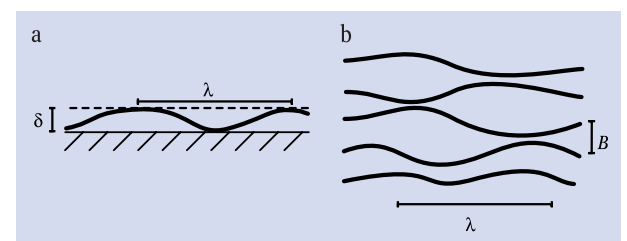


Abb. 4:
 Eine adsorbierte DNS-Schicht in der Seitenansicht (a) und in einer Ansicht von oben (b). Für eine mittlere DNS-Schichtdicke δ kleiner als die Persistenzlänge ℓ ist die DNS flach adsorbiert. Der mittlere laterale Abstand B zwischen DNS-Strängen ergibt sich aus einem Gleichgewicht zwischen entropischer Repulsion zwischen den Biopolymeren und der elektrostatischen Anziehung an das Substrat. Die Deflektionslänge λ gibt den Abstand zwischen zwei Kollisionen der DNS an (mit dem Substrat oder untereinander).

Für ein analoges System bestehend aus einem 850 nm langen DNS-Strang und einem etwa 50 nm langen kationischen Dendropolymer lässt sich diese Frage hingegen elegant beantworten. Die Dendropolymer sind relativ dicke (Durchmesser ungefähr 6 nm), in mehreren Schritten synthetisierte Polymere und stark positiv geladen. In diesem Fall wickelt sich die DNS um das Dendropolymer herum, wie es im Rasterkraftmikroskop zu sehen ist (Abb. 5a) [13]. Aus der Messung der Länge des überstehenden DNS-Segments kann die Länge des herumgewickelten DNS-Teils bestimmt werden. Tatsächlich wickelt sich mehr DNS um das Dendropolymer als zur Neutralisierung nötig ist, eine Tatsache, die uns im Folgenden beschäftigen wird. Abbildung 5b zeigt zwei mögliche Wickelmorphologien, experimentell scheint die helikale Struktur verwirklicht zu sein.

In unserer Modellrechnung berücksichtigen wir zum einen nur die elektrostatische Anziehung zwischen dem umwickelten Polymer mit der linearen Ladungsdichte τ_{uw} (welches als Zylinder modelliert wird) und dem gewickelten Polymer der Ladungsdichte τ_{gw} , sowie zum anderen die Abstoßung zwischen den gewickelten Segmenten auf dem Debye-Hückel-Niveau. Zwischen allen Ladungen wirkt also das bereits mehrfach benutzte DH-Potential $u_{DH}(r) = \ell_B e^{-\kappa r}/r$, siehe Gl. (6). Wie in Abb. 5a zu sehen, ist das gewickelte Polymer (in diesem Fall DNS) im Überschuss vorhanden, das Längenverhältnis L_{gw}/L_{uw} zwischen gewickeltem und umwickeltem Polymer im Komplex kann sich also frei einstellen. Formfluktuationen der Polymere sind hier unwichtig, da sie beide Morphologien gleichermaßen betreffen, wir aber an einem Vergleich der parallelen und helikalen Struktur interessiert sind. Ein Vergleich der gesamten Bindungsenergie ergibt, dass beide Morphologien eng miteinander konkurrieren. Wie im Phasendiagramm Abb. 6a gezeigt, ist die helikale Morphologie für geringe Salzkonzentrationen (kleines κ) und stark geladene gewickelte Polymer (großes τ_{gw}) von niedrigerer Energie und damit stabil [14]. Es ist nicht klar, ob die theoretisch vorhergesagte parallele Morphologie für große Salzkonzentration experimentell beobachtet werden kann, da es möglich ist, dass die helikale Struktur aus kinetischen Gründen bevorzugt wird. Abbildung 6b zeigt, dass die gewickelte Menge an Polymer als Funktion der Salzkonzentration ansteigt, dabei wechseln sich parallele Morphologien (mit ganzzahligen Längenverhältnissen, in gelb gezeichnet) mit helikalen ab. Für ein lineares Ladungsverhältnis von $\tau_{gw}/\tau_{uw} = 1/2$ wäre der Komplex gerade neutral für ein Längenverhältnis $L_{gw}/L_{uw} = 2$. Tatsächlich ist aber mehr Polymer um den inneren Zylinder gewickelt; der Komplex ist „umgeladen“ (in Übereinstimmung mit den in Abb. 5a gezeigten Resultaten: Die Komplexe dort sind durch den Überschuss an DNS negativ geladen und adsorbieren dadurch stark auf den positiv geladenen Substraten).

Diese Tatsache lässt sich einfach verstehen: Dazu betrachten wir der Einfachheit halber die parallele Morphologie mit n adsorbierten Polymeren der Ladungsdichte τ_{gw} an einem Zylinder der Ladungsdichte τ_{uw} . Im Limes kleiner Salzkonzentration $\kappa R \rightarrow 0$ geht das Zylinderpotential in Gl. (9) gegen einen Logarithmus, die gesamte Attraktion ist also $f_{att} \approx 2n\ell_B\tau_{gw}\tau_{uw} \ln(\kappa R)$. Zwischen den n adsorbierten Polymeren gibt es $n(n-1)/2$ Paarwechselwirkungen, die somit eine repulsive Energiekomponente $f_{rep} \approx -n(n-1)\ell_B\tau_{gw}^2 \ln(\kappa R)$ ergeben (man beachte, dass die von R um einen Faktor

abweichenden Abstände zwischen den adsorbierten Polymeren irrelevant sind und im Limes $\kappa R \rightarrow 0$ nur eine unwichtige Konstante beisteuern). Die Anzahl n von adsorbierten Polymersträngen in der parallelen Morphologie ergibt sich durch Minimierung der Gesamtenergie, $\partial(f_{att}+f_{rep})/\partial n = 0$, woraus folgt

$$n = L_{gw}/L_{uw} = 1/2 + \tau_{uw}/\tau_{gw}.$$

Ohne den konstanten Term $1/2$ entspricht diese Anzahl von gebundenen Polymeren gerade einem neutralen

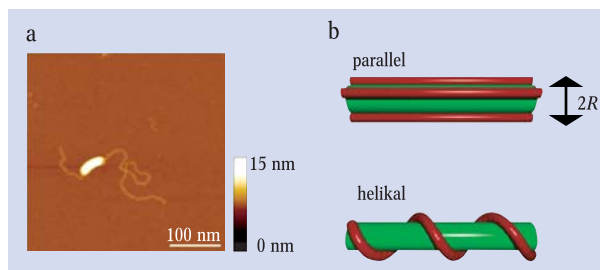


Abb. 5:
 ► a) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines 850 nm langen DNS-Stranges, der teilweise um ein etwa 50 nm langes kationisches Dendropolymer herumgewickelt ist [13].
 ► b) Die beiden theoretisch untersuchten Wickelmorphologien, parallel und helikal.

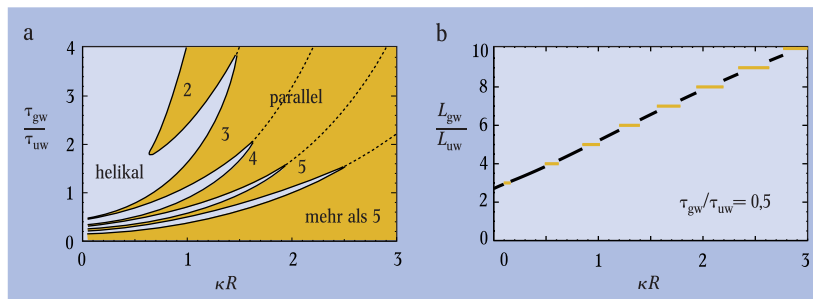


Abb. 6:
 ► a) Phasendiagramm als Funktion des reskalierten Zylinderradius κR und dem Verhältnis der Linienladungsdichten des gewickelten und des umwickelten Polymers, τ_{gw}/τ_{uw} . Parallele und helikale Wickelmorphologie sind für verschiedene Parameterwerte bevorzugt.
 ► b) Längenverhältnis des gewickelten/umwickelten Polymers für $\tau_{gw}/\tau_{uw} = 1/2$.

Komplex, der Term $1/2$ ist also für die Überladung des Komplexes verantwortlich. In Übereinstimmung mit den in Abb. 6b gezeigten Daten erhält man im Limes $\kappa R \rightarrow 0$ und $\tau_{gw}/\tau_{uw} = 1/2$ also $L_{gw}/L_{uw} = 2,5$. Dieses einfache Argument zeigt, dass das herumgewickelte Polymer die effektive Ladung des Komplexes dominiert: Wenn sich also DNS um ein kationisches steifes Polymer herumwickelt, ist der Komplex negativ. Wird DNS von einem flexiblen kationischen Polypeptid umwickelt (wie für Gentherapie benutzt), ist der Komplex positiv geladen. Die effektive Ladung des Komplexes ist wichtig für die Transporteigenschaften in der Zelle, da die meisten Zellwände negativ geladen sind.

Ausblick

Die hier behandelten Beispiele geben einen Überblick über verschiedene DNS-Strukturen, die durch das Zusammenspiel von elektrostatischen Kräften und thermisch angeregten Fluktuationen der Ionenwolken und der DNS-Form erzeugt und erklärt werden können. Die Elektrostatik wurde dabei auf dem einfachsten Niveau behandelt, nämlich der linearen Debye-Hückel-Näherung. In der Tat gibt es eine Reihe von Resultaten, die so nicht erklärt werden kön-

nen (so ist es bekannt, dass sich gleichnamig geladene Objekte in der Anwesenheit von mehrwertigen Gegenionen auch anziehen können [15], im eklatanten Widerspruch zur DH-Theorie). Zusätzlich besitzt jeder geladene Körper eine inhomogene, charakteristische Ladungsverteilung [16], gibt es neben der elektrischen Wechselwirkung noch van-der-Waals- und andere Wechselwirkungen, und trägt das Lösungsmittel, Wasser, durch seine komplexe Struktur zu einer Vielzahl von hier nicht angesprochenen Phänomenen bei (dem die Wahl einer homogenen Dielektrizitätskonstante schwerlich Rechnung trägt). Quanteneffekte kommen auf kleinen Längenskalen ins Spiel. Die hier vorgestellten Modelle stellen also extreme Vereinfachungen dar. Obwohl dynamische Effekte hier nicht besprochen werden konnten, sei angemerkt, dass sie wegen der Vielfalt von Anwendungen im Zusammenhang mit geladenen Biopolymeren (Elektrophorese, Elektroosmose) von großem Interesse sind. Besonders reizvoll für den theoretischen Physiker ist dabei die Verbindung der Mehrkörperproblematik von langreichweitig wechselwirkenden Teilchen mit dem dynamischen Verhalten fernab vom Gleichgewicht.

Es bleibt festzuhalten, dass einfache physikalische Modelle für Strukturen wie sie DNS und andere Biopolymere bilden nicht nur die theoretische Physik bereichern, sondern auch von Relevanz sind für technologische Entwicklung und biologische Forschung.

Danksagung

Ich danke meinen (ehemaligen und momentanen) Doktoranden C. Fleck, K. K. Kunze, A. Moreira für ihre Mitarbeit und I. Gössl, J. P. Rabe, J. Rädler, K. Takeyasu, E. Wagner, K. Yoshikawa für Diskussionen und die Übersendung von Bildmaterial.

Literatur

- [1] Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics, C. Holm, P. Kekicheff, und R. Podgornik (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2001).
- [2] Nature Genetics Supplement **21**, 1 (1999).
- [3] T. Sakaue, K. Yoshikawa, S. H. Yoshimura, K. Takeyasu, Phys. Rev. Lett. **87**, 078105 (2001).

- [4] T. D. Yager, C. T. McMurray, K. E. van Holde, Biochemistry **28**, 2271 (1989).
- [5] P. Debye, E. Hückel, Physik. Z. **24**, 185 (1923).
- [6] K. K. Kunze, R. R. Netz, Phys. Rev. Lett. **85**, 4389 (2000).
- [7] Y. Fang, J. Yang, J. Phys. Chem. **101**, 441 (1997).
- [8] R. R. Netz, J.-F. Joanny, Macromolecules **32**, 9013 (1999).
- [9] C. Fleck, R. R. Netz, H. H. von Grünberg, Biophys. J. **82**, 76 (2002).
- [10] T. Odijk, Macromolecules **13**, 1542 (1980).
- [11] W. Zauner, S. Brunner, M. Buschle, M. Ogris, E. Wagner, Biochim. Biophys. Acta **1428**, 57 (1999).
- [12] J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, C. R. Safinya, Science **275**, 810 (1997).
- [13] I. Gössl, L. Shu, A. D. Schlüter, J. P. Rabe, J. Am. Chem. Soc. **124**, 6860 (2002).
- [14] K. K. Kunze, R. R. Netz, Europhys. Lett. **58**, 299 (2002).
- [15] A. G. Moreira, R. R. Netz, Phys. Rev. Lett. **87**, 078301 (2001).
- [16] A. G. Moreira, R. R. Netz, Europhys. Lett. **57**, 911 (2002).
- [17] R. R. Netz, H. Orland, Eur. Phys. J. E **1**, 201 (2000).
- [18] G. Gouy, J. de Phys. **IX**, 457 (1910); D. L. Chapman, Phil. Mag. **25**, 475 (1913).

Der Autor

Roland Netz interessiert sich seit seiner Promotion am Forschungszentrum Jülich 1994 für die Theoretische Physik der weichen Materie und für biologische Systeme. Forschungsaufenthalte führten ihn an die Tel-Aviv-University, UC Santa Barbara, UW Seattle und CEA Saclay. Er habilitierte sich 2000 am Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächenforschung in Golm und ist seit Februar diesen Jahres Professor an der LMU München. In seiner Freizeit widmet er sich seinen beiden Söhnen und dem Klavierspiel.

