



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**POLYKATION-DNA-
KOMPLEXE:
EIGENSCHAFTEN UND
ANWENDUNG IN DER
GENTRANSFEKTION**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Promotionsfach Chemie

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie
und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Frauke Kühn

geboren in Worms

Mainz, 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2007 bis September 2010 am Institut für Physikalische Chemie angefertigt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 8.10.2010

Zusammenfassung

Polykationen bilden mit DNA spontan Komplexe. Triebkraft ist der Entropiegewinn durch Freisetzung der Gegenionen auf den Polyelektrolyten. Solche Komplexe können in der Gentechnik verwendet werden, um fremde DNA in eine Zelle einzuschleusen. Dies bezeichnet man als Gentransfektion. In dieser Arbeit werden erstmals bürstenförmige Polykationen mit wurmförmiger Topologie zur Gentransfektion verwendet.

Dazu wurde die Komplexbildung von DNA mit Bürstenpolymeren mit Poly-L-Lysin- und Polyvinylpyridinium-Seitenketten und linearen Polykationen untersucht. Die Komplexbildung verläuft in allen Fällen kinetisch kontrolliert, alle Polykationen bilden sphärische Komplexe, die Topologie hat keinen Einfluss auf die Komplexgröße. Komplexe aus Bürstenpolymeren transfizieren mehr als 25% der gesamten Zellpopulation bei Schweinehirnendothelzellen. Gegenüber dem kommerziellen Transfektionsmittel Lipofektamin konnte eine deutliche Steigerung um bis zu 400% erreicht werden. Komplexe, die mit linearen Analoga gebildet wurden, zeigten bei gleicher Komplexgröße Transfektionsraten unter 5%.

Freisetzungsversuche zeigen, dass die Komplexe, die gut transfizieren, recht labil sind, also die DNA unter Kompetitoreinfluss freisetzen können. Stabile Komplexe haben geringe Transfektionseffizienzen. Ebenso wichtig ist der Schutz der DNA vor Abbau durch DNase. Die PVP-Bürste bietet als einziges der untersuchten Polykationen diesen Schutz und zeigt auch die besten Transfektionsraten.

Zusätzlich zu der medizinischen Anwendung wurde die Kinetik der Komplexbildung untersucht. Dazu wurde ein spezieller Aufbau entwickelt, der es ermöglicht die Streuintensität der Komplexlösung bei kleinen Streuwinkeln zeitaufgelöst im Millisekundenbereich zu detektieren. Die Komplexbildung verläuft diffusionskontrolliert, im Bereich von Ladungsverhältnissen (positive zu negativen Ladungen) von 1.8 bis 4.0 schließt sich ein fraktales Wachstum an.

Summary

Polycations spontaneously form complexes with DNA. The driving force is the gain of entropy by release of the counterions from the polyelectrolytes. Those complexes may be used in gene technology to introduce foreign DNA into a cell. Such a process is called gene transfection. In this thesis, brush like polycations with a stiff, worm like topology are used for the first time in gene transfection.

The complexation between DNA and brush like polycations with poly-L-lysine and quaternized poly(vinylpyridine) sidechains and linear analogues was investigated. In all cases, the complex formation is kinetically controlled. All polycations form spherical complexes, topology does not influence the complex size. Complexes formed by brush like polymers show a transfection rate $> 25\%$ on porcine brain microvessel endothelial cells. Compared to the commercial standard Lipofectamine an increase of 400% is reached. Complexes formed with the linear analogues only transfect less than 5% of the total cell population.

Release experiments show that complexes that are able to release DNA under influence of competitors are also good transfection agents. In contrast, very stable complexes have poor transfection efficiencies. As important is the ability of the complex to protect the DNA against degradation by DNase. Only the quaternized poly(vinylpyridine) is performing well in this test and accordingly also shows high efficiency in transfection experiments.

In addition to the medical application, the kinetics of the complex formation was investigated. A new setup was designed allowing the time resolved detection of scattered light at small scattering angles in the millisecond-regime. The complex formation is diffusion controlled, which is followed by a fractal growth for charge ratios (positive to negative charges) between 1.8 and 4.0.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht zum Thema Gene delivery mit Polymeren	3
1.2	Gene delivery mit verzweigten Polymeren	5
1.3	Motivation	7
1.4	Ziel der vorliegenden Arbeit	8
2	Grundlagen	11
2.1	Polyelektrolytkomplexe	11
2.1.1	Struktur der Komplexe	13
2.2	Kondensation von Gegenionen	14
2.3	Zell-Transfektion	15
2.4	Definitionen	18
2.5	Verwendete Methoden	21
2.5.1	Lichtstreuung	21
2.5.2	Gelelektrophorese	30
2.5.3	CD-Spektroskopie	34
2.5.4	CD-Spektroskopie an DNA-Komplexen	34
2.5.5	Rasterkraftmikroskopie	37
3	Verwendete Polymere	39
3.1	Charakterisierung	40
3.2	Toxizitätstest	42
3.2.1	Cytotoxizität an PBMEC	42
3.2.2	Toxizität an dendritischen Zellen	45
3.2.3	Zusammenfassung	45
4	Komplexbildung und -charakterisierung	47
4.1	Komplexe aus quaternisierter PVP-Bürste und DNA	48
4.1.1	Vergleich der Herstellungsmethode: Titration vs. Stopped-Flow-Mikromischer	48
4.1.2	NaCl-Zugabe zu Komplexen	50
4.1.3	Vergleich mit Literatur	51
4.1.4	Zusammenfassung	53

4.2	Komplexe aus Polylysin und DNA	54
4.2.1	Komplexe mit Polylysin-Bürste	54
4.2.2	Komplexe mit linearem Polylysin	63
4.2.3	Vergleich der Komplexe aus Polylysin-Bürste mit Komplexen aus linearem Polylysin	65
4.2.4	Zusammenfassung	66
4.3	Ethidiumbromid-Verdrängung	68
4.3.1	Komplexbildung mit verschiedenen Polykationen	70
4.3.2	Freisetzung der DNA durch NaCl-Zugabe	71
4.3.3	Komplexbildung in Lösungen mit unterschiedlichem Salzgehalt	72
4.3.4	Verwendung von Fischsperma-DNA zur Komplexbildung	76
4.3.5	Diskussion	76
4.3.6	Zusammenfassung	80
5	Komplexeigenschaften	81
5.1	Freisetzungsexperimente	81
5.1.1	Heparin als Kompetitor	82
5.1.2	NaCl als Kompetitor	85
5.1.3	Rinderserumalbumin als Kompetitor	91
5.1.4	RNA als Kompetitor	92
5.1.5	pH-Wert-Änderung zur Freisetzung von DNA	94
5.1.6	Release-Experimente in physiologischem Salzgehalt	94
5.1.7	Zusammenfassung der Freisetzungsexperimente	98
5.1.8	Vergleich mit Literatur	101
5.2	Schutz der DNA im Komplex gegen DNase-Abbau	103
5.2.1	Ergebnisse	104
5.2.2	Zusammenfassung	106
6	Transfektionsexperimente	107
6.1	Aufnahme der Polykationen in PBMEC	108
6.2	Kommerzielles Transfektionsmittel Lipofektamin	109
6.3	Transfektion mit Polylysin und Polyvinylpyridin	109
6.4	Ergebnisse	112
6.5	Literatur	119
7	Kinetik der Komplexbildung	121
7.1	Literatur	121
7.2	Methode	122
7.3	Ergebnisse	122
7.4	Simulation des Strömungsprofils in der Messküvette	130
7.5	Zusammenfassung	130
8	Ergebnisse und Ausblick	133

INHALTSVERZEICHNIS

9	Experimenteller Teil	137
9.1	Komplexbildung	137
9.2	Ethidiumbromid-Verdrängung	138
9.3	Freisetzungsexperimente	138
9.4	CD-Spektroskopie an Komplexen	139
9.5	DNase-Experimente	139
9.6	Markieren der Polykationen mit RhodaminB	139
9.7	Untersuchung der Polykation-Aufnahme in PBMEC	140
9.8	Transfektion auf PBMEC mit Durchflusszytometer-Analyse	140
9.9	Stopped-flow-Messungen	141
9.9.1	Methode und instrumenteller Aufbau	141
9.9.2	Fehlerbetrachtung	142
9.9.3	Probenvorbereitung	143
9.9.4	Komplexbildung	143
9.9.5	Datenaufzeichnung und -bearbeitung	143
9.9.6	Mischartefakte bei kleinen Zeiten	144
	Anhang	146
A	Verwendete Geräte und Chemikalien	147
B	Umrechnung Gewichtsbruch - Ladungsverhältnis	149
C	AFM-Bilder	151
D	Transfektionseffizienz Lipofektamin	155
E	Abkürzungsverzeichnis	157
	Literatur	159

Kapitel 1

Einleitung

Nicht-viraler Gentransfer ist ein vielversprechendes Werkzeug um genetisches Material (DNA, RNA) in lebende Zellen einzubringen [EA04] [Kab99] [TK03] [DSY09] [CH05]. Diesen Prozess bezeichnet man als Transfektion. Die Nukleinsäuresequenz bestimmt dabei die spezifische Aminosäuresequenz des Proteins, das die Zelle synthetisiert, zunächst durch Transkription (Synthese von messengerRNA von der DNA), dann durch Translation (Synthese des Proteins von der messengerRNA). Das Ziel der Gentherapie ist anwendungsspezifisch, zum Beispiel soll im Fall von genetischen Krankheiten der Einfluss des gestörten Gens gemindert oder ausgeschaltet werden. Gentherapie kann aber auch zur Vorbeugung von Krankheiten, z.B. durch Impfungen, angewandt werden. Dazu muss das genetische Material für eine antigene Komponente eines spezifischen Pathogens kodieren. [Put06]

Für einen erfolgreichen Gentransfer benötigt man ein Nukleotid-bindendes Polykation oder Lipid um die DNA/RNA zu kompaktieren, so dass sie in die Zelle aufgenommen werden kann. Von Vorteil ist es dabei, wenn die Partikel nicht zu groß sind ($<100\text{-}200\text{nm}$) und eine positive Ladung haben, da sie sich dann besser an der negativ geladenen Zellmembran anlagern können. Neben dem Eintritt in die Zelle muss ein nicht-viraler Vektor aber auch noch den Eintritt des genetischen Materials in den Zellkern ermöglichen. Deswegen ist neben einer effizienten Kompaktierung der DNA/RNA auch eine gute Freisetzung der DNA/RNA aus dem Komplex nötig. Generell sind für den nicht-viralen Vektor vier Barrieren zu überwinden[BCM⁺00]: Zunächst muss der Gen-Transporter seinen richtigen Bestimmungsort *in vivo* ausfindig machen, ohne vorher vom körpereigenen Immunsystem abgebaut zu werden. Je spezifischer der Vektor auf einen bestimmten Zelltyp optimiert ist, desto höher die Chance auf eine hohe Transfektion. Die zweite Hürde ist der Eintritt des genetischen Materials in den gewünschten Zelltyp. Der Komplex muss durch Endozytose ins

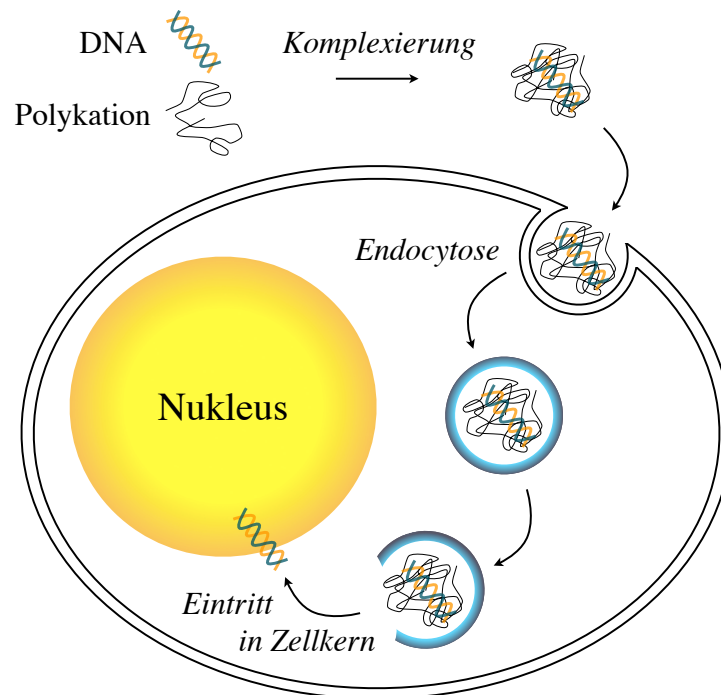


Abbildung 1.1: Schematische Zeichnung der Aufnahme eines DNA-Polykationen-Komplexes in die Zelle.

Zellinnere gelangen. Danach muss als weitere Barriere die DNA/RNA aus dem Endosom gelangen, denn wenn die ganze endosomische Einheit in den Lysosomen abgebaut wird, kann keine Expression der DNA erfolgen. Die vierte und letzte Hürde ist die Translokation der DNA in den Zellkern, in dem sie abgelesen werden kann (vergleiche hierzu Abbildung 1.1).

Die Komplexierung bzw. Kompaktierung von DNA mit verschiedenen positiv geladenen synthetischen und biologischen Polymeren ist im Hinblick auf ihre Anwendung in der nicht-viralen Gentransfektion stark untersucht worden. Unter anderem wurden Peptide, Polysaccharide und Polyamine [TK03] verwendet. Die DNA wird durch die Komplexierung mit Polykationen von ihrer Knäuelstruktur in eine Kugelstruktur kompaktiert, die eine größere Dichte besitzt. Dies kann, wie von Störkle [Sto07] gezeigt und in dieser Arbeit angewendet, mit Lichtstreuung nachgewiesen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie (vgl. hierzu [AAZP+07]). Triebkräfte für die Bildung dieser kompakten Interpolyelektrolytkomplexe sind die Anziehung unterschiedlich geladener Polyionen, die Freisetzung der Gegenionen und der damit verbundene Entropiegewinn, sowie die Abschirmung der elektrostatischen Repulsion gleich geladener DNA-Segmente. Außerdem können hydrophobe Wechselwirkungen oder die Bildung von Wasserstoffbrücken be-

teilt sein [TMD⁺04]. Die Komplexe weisen zumeist eine „scrambled-egg“-Struktur auf und sind stark aggregiert. Die Komplexbildung ist kinetisch kontrolliert, so dass der Aggregationsgrad mit der Konzentration der Komponenten in der Lösung abnimmt. In verdünnten Lösungen und im Überschuss einer Komponente können die Komplexgrößen so klein gehalten werden, dass eine kolloidale Dispersion entsteht. Die Partikel haben einen neutralen Kern und eine geladene Schale der Überschusskomponente, die für die Dispergierbarkeit sorgt.

Die Kenntnis der Stabilität und physikalischen Eigenschaften wie Ladung, Dissoziationsverhalten, Form und Größe dieser Komplexe können beim Verständnis der biologischen Anwendung von großem Nutzen sein [Kab99].

1.1 Übersicht zum Thema Gene delivery mit Polymeren

Die Verwendung von Polymeren zum Transport von genetischem Material ist seit drei Jahrzehnten im Fokus vieler Forschungsgruppen. Polymere haben den Vorteil niedriger Immunogenität, hoher Flexibilität und einfacher Herstellung [XPM⁺09]. Ein häufig verwendetes Polymer, das *in vivo* und *in vitro* erfolgreiche Transfektion zeigt, ist Polyethylenimin (PEI). Es verfügt über primäre, sekundäre und als verzweigtes Polymer auch über tertiäre Amine, die durch Protonierung positive Ladungen tragen können. PEI besitzt eine gute Pufferkapazität. Bei physiologischem pH-Wert sind nur etwa 20% der Aminogruppen protoniert, bei pH = 5 (z.B. im Lysosom) steigt dieser Wert auf 45% an. Diese Eigenschaft als Protonenschwamm zu wirken, macht PEI zu einem effektiven Gentransporter [BLZ⁺95]. Lange PEI-Ketten sind jedoch zelltoxisch und schränken so die Anwendung als Gentransporter ein.

Die Struktur von DNA-PEI-Komplexen wurde durch AFM-Technik von Dunlap et al. untersucht [DMSM97]. Im Überschuss DNA (0.08 Äquivalente PEI 22kDa auf 1 Äquivalent DNA) entstehen gefaltete Schlaufen aus DNA (siehe Abbildung 1.2). Die DNA-Stränge lagern sich im Komplex lateral an und haben partiell eine sehr starke Krümmung, solche Strukturen sind in reiner DNA nicht zu finden. Ähnliches wurde auch von Störkle et al. an PVP-Bürsten-pUC19-Komplexen gefunden [SDH⁺07], wie in Abbildung 1.3 zu sehen. Der stark kompaktierte Kern der Komplexe ist von einer Hülle aus DNA umgeben, die schlaufenförmig aus dem Komplex herausragt.

Ausführliche Untersuchungen zur Struktur-Eigenschaftsbeziehung wurden von Anderson et al. [AAHL05] durchgeführt. In einem Hochdurchsatz-Screening wurden verschie-

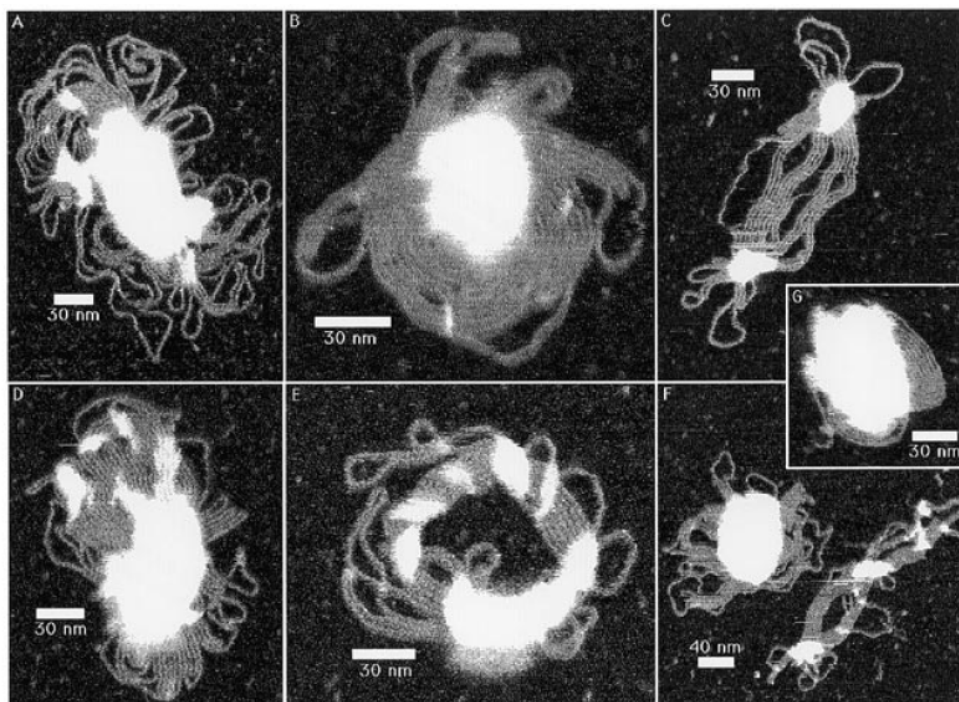


Abbildung 1.2: AFM-Bilder von PEI-DNA-Komplexen, die in 150mM NaCl hergestellt wurden, entnommen aus [DMSM97]. Es wurden 0.08 Äquivalente 22kDa PEI auf 1 Äquivalent DNA (pCMV-Luc DNA) verwendet. Die AFM-Messung wurde auf mit Poly-L-Ornithin beschichtetem Mica in 15mM NaCl durchgeführt. Es bildeten sich DNA-Schleifen, individuelle DNA-Stränge sind zu erkennen. Die gefalteten Schleifen der DNA ordnen sich lateral mit hoher Krümmung an. Ohne PEI bildet DNA diese Strukturen nicht. Die Höhenskala beträgt 5nm.

dene Poly(β -aminoester) synthetisiert und ihr Transfektionsvermögen getestet. Poly(β -aminoester) sind interessant, da sie sowohl positive Ladungen an den protonierbaren Aminogruppen zur Wechselwirkung mit der DNA besitzen als auch potentiell abbaubar sind durch die hydrolysierbare Estergruppe. Zudem sind sie relativ leicht herzustellen durch Konjugataddition eines primärenamins an ein Diacrylat. Eine Bibliothek von über 400 verschiedenen Polymeren wurde synthetisiert und im Hinblick auf Molmasse, Komplexgröße mit DNA, Oberflächenladung, Polymer-/DNA-Verhältnis und Transfektionseffizienz verglichen. Die besten Polymere besitzen ein Amin/Acrylat-Verhältnis von 1.2/1 bzw. 1.1/1 und konnten DNA in 71 und 79nm (Lichtstreuungsmessung bei 90°) große Komplexe mit positiver Oberflächenladung kondensieren. Ihre Transfektionseffizienz an COS-7-Zelllinien liegt deutlich über der des kommerziell erhältlichen Transfektionsmittels Lipofektamin, das auf Lipiden basiert. Dass auch andere Polymere in der Studie DNA stark kompaktieren konnten (sub 150nm Partikel), diese aber keine gute Transfektion zeigten, beweist, dass Größe

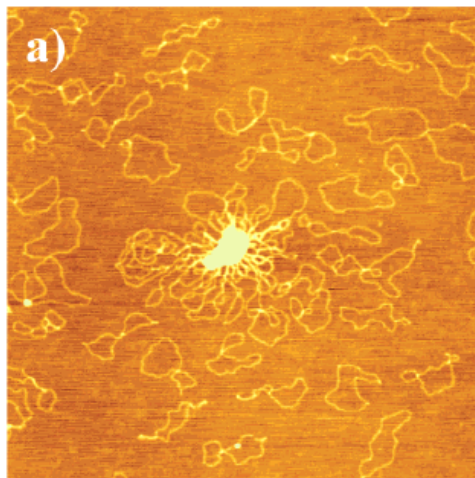


Abbildung 1.3: AFM-Bilder von DNA-PVP-Bürsten-Komplexe mit $w(\text{DNA}) = 0.8$ aus [SDH⁺ 07]. Es wurde pUC19-DNA und eine quaternisierte PVP-Bürste mit einer Seitenkettenlänge von 26 Wiederholungseinheiten verwendet. Die Bilder wurden in getrocknetem Zustand auf Mica aufgenommen.

und Ladung allein nicht die einzig ausschlaggebenden Faktoren zur erfolgreichen Transfektion sind. Austritt aus dem Endosom, Schutz der DNA und Dekomplexierung spielen auch eine Rolle. So sind zum Beispiel Komplexe aus Polykationen mit einem Amin/Acrylat-Verhältnis von 1/1.05 im Vergleich zu 1/1 bei gleicher Molmasse achtfach effektiver. Dies liegt vermutlich an den Kettenterminierungen, die scheinbar einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz besitzen. Die effektivsten Polykationen wurden aus Aminoalkoholen hergestellt. Anderson zeigt auch, dass Polymere mit kleiner Molmasse ($M < 10000 \text{ g/mol}$) keine guten DNA-Transporter sind. Ein allgemein gültiger Trend zur Vorhersage der Transfektionseffizienz aus den Eigenschaften der Polymere wurde nicht gefunden.

1.2 Gene delivery mit verzweigten Polymeren

Die Verwendung von kamm- oder bürstenförmigen Polymeren zur DNA-Komplexierung wird in der Literatur vereinzelt beschrieben. Hauptsächlich werden Kammpolymere untersucht, lediglich eine Gruppe beschreibt bürstenförmige Polymere als Transfektionsagenz. Diese weisen entgegen der Aussage in der Publikation jedoch eher eine Kugelform auf als eine wurmförmige Bürstentopologie. Die Seitenketten von Kammpolymeren sind nicht so dicht gepackt wie in Bürstenpolymeren, es kommt nicht zur Streckung des Polymerrückgrats und Kammpolymere sind deshalb als verzweigte Polymere anzusehen.

Die Gruppe von Toshihiro Akaike hat eine Vielzahl von Publikationen zur Synthese von kammförmigen Polymeren und deren Anwendung in der DNA-Komplexierung veröffentlicht. Sie verwendet unter anderem Polymere mit Polylysin-Rückgrat und Dextran-Seitenketten [MWF⁺98] zur Bildung von löslichen DNA-Komplexen. Abhängig von der Propfdichte konnten verschiedene Veränderungen der physikalischen Eigenschaften beobachtet werden. Niedrige Propfdichten führen zu einer effektiven Kompaktierung der DNA. Polymere mit hohen Propfdichten lagern sich ebenfalls an die DNA an, es kommt jedoch nicht zu einer Konformationsänderung. Die DNA ist sogar noch zur Denaturierung und Rehybridisierung fähig. Ein *in vitro* Zelltest wird nicht durchgeführt. Ein weiteres Polymer besteht aus einem Poly(2-(diethylamino)ethyl-methacrylat)-Rückgrat mit Polylysin-Seitenketten [AMCA97]. Der Schwerpunkt bei dessen Untersuchung liegt auf der pH-Sensitivität der Seitenketten in hohen pH-Bereichen und des Rückgrates bei annähernd neutralen pH-Werten. Die pH-abhängige Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Komplexe könnte zur Klärung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen dienen, Zellexperimente werden nicht präsentiert. Benns et al. verwenden N-Ac-poly(L-Histidin)-graft-poly(L-Lysin) Kammpolymere zur Komplexierung von DNA [BCM⁺00]. 25% der ϵ -Aminogruppen am Poly-L-Lysin-Rückgrat sind mit Poly-L-Histidin modifiziert. Durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromidverdrängungsversuche wird die Komplexierung der DNA durch die Copolymere gezeigt. Die Komplexierungseffizienz ist jedoch im Vergleich zu reinem Polylysin geschwächt, da Polyhistidin bei pH = 7 ungeladen ist. Transfektionsexperimente an 293T Zellen ergeben eine gesteigerte Transfektion im Vergleich zu linearem Polylysin. Das Poly-L-Histidin verstärkt vermutlich die endosomale Freisetzung durch Protonenbindung und Fusion mit der Membran.

Eine ebenfalls erhöhte Transfektionsrate (im Vergleich zu linearem PEI) fanden Liu et al. bei Verwendung von Bürstenpolymeren mit Poly(2-hydroxyethyl-methacrylat)-Rückgrat und Poly(ethylenimin)-*b*-Poly(ethylenglykol)-Seitenketten bei gleichzeitig niedriger Toxizität [LDZ⁺10] in BT474-, HEK293-Zellen und Mausosteoblasten. Bei den verwendeten Polymeren handelt es sich jedoch nicht wie in der Publikation dargestellt um Bürstenpolymere, sondern eher um kugelförmige Polymere. Die Länge der Hauptkette entspricht in etwa der Länge der Seitenketten, so dass hier zwar eine hohe Ladungsdichte, ähnlich zu Bürstenpolymeren, vorliegt, aber nicht die typische Bürstentopologie. Zusätzlich wird nicht das gleiche Blockcopolymer in linearer Form zum Vergleich gewählt, sondern ein PEI ohne PEG-Modifizierung.

Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Polylysinen unterschiedlicher Struktur (linear,

dendritisch, verzweigt) wurde 2002 von Männistö et al. [MVT+02] verglichen. Physikochemische Untersuchungen der Komplexgröße, Zeta-Potentiale, Kondensierung der DNA und Form der Komplexe wurden durchgeführt und die Ergebnisse mit der Transfektionseffizienz an D407 Zelllinien verglichen. Lineares Polylysin komplexiert die DNA effizienter bei kleineren Ladungsverhältnissen +/- als dendritisches Polylysin. Es ist flexibler und besitzt eine höhere Anzahl primärer Amine. Dendritisches Polylysin der 3. Generation konnte die DNA in toroidale und stäbchenförmige Komplexe kondensieren. Die Komplexgrößen unterscheiden sich jedoch nicht sehr stark, alle Komplexe sind aggregiert und polydispers. Die Transfektionseffizienz ist bei allen untersuchten Komplexen niedrig (kleiner als PEI, DOTAP oder Lipofectin), lineares PLL ist effizienter als dendritisches. Es konnte jedoch kein klarer Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften und der Transfektion gefunden werden.

1.3 Motivation

Bürstenpolymere besitzen durch die hohe Propfdichte der Seitenketten, die sich zusätzlich durch die gleichsinnigen Ladungen elektrostatisch abstoßen, eine wurmförmige Topologie. Das macht sie zu interessanten Testreagenzien als Transfektionsmittel. Möglicherweise zeigen die DNA-Komplexe mit Bürstenpolymeren eine andere Struktur als die Komplexe mit linearen Polymeren. Es ist zu erwarten, dass die Anisotropie des Polykations einen Einfluss auf die Komplexbildung mit DNA ausübt. Desweiteren besteht ein Ladungsmismatch zwischen Bürste und DNA (vergleiche Definition in 2.4). Die Ladungsdichte der Bürste ist durch die enge Propfdichte der mehrfach geladenen Seitenketten deutlich höher als die der DNA bzw. eines linearen Polymers. Die Untersuchung der Bürstenpolymere im Vergleich zu linearen Polymeren leistet einen wichtigen Beitrag im Verständnis der Komplexstruktur.

Endothelzellen dienen als Modellsystem in der Untersuchung der Blut-Hirn-Schranke. Transfektionseffizienzen in Endothelzellen sind im allgemeinen aber sehr gering. Ähnlich wie Neurone sind diese Zellen mit Standardmethoden nur schwer zu transfizieren. Es ist daher nötig, bessere Transfektionsagenzien für Endothelzellen zu finden. Dazu ist es insbesondere wichtig, die genaue Funktionsweise des Transfektionsmittels zu verstehen. Eine Analyse der Struktur der DNA-Komplexe im Vergleich zu deren Transfektionseffizienz sollte einen erheblichen Beitrag zur Entwicklung neuer Transfektionsagenzien leisten. Ebenso wichtig ist ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge beim Entpacken der DNA. Hier stellt sich insbesondere die Frage, in wie weit die DNA von Transfektionsmittel ab-

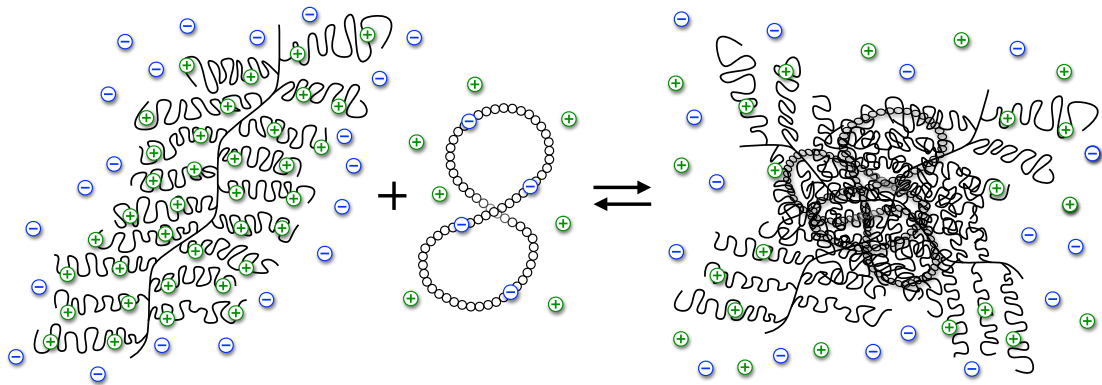


Abbildung 1.4: Schematische Komplexbildung aus büstenförmigem Polykation und DNA im Überschuss der positiv geladenen Komponente. Triebkraft der Komplexbildung sind die elektrostatischen Wechselwirkung und der Entropiegewinn durch Freisetzung der Gegenionen.

trennbar sein muss um eine erfolgreiche Transkription zu gewährleisten.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit werden Komplexe aus positiv geladenen Bürstenpolymeren mit DNA hergestellt und untersucht. Die Komplexbildung ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt. Die büstenförmigen Polykationen bilden ein formpersistentes Element, das durch die hohe Pfropfdichte der Seitenketten eine wurmförmige Topologie besitzt.

Die Komplexbildung und das Komplexverhalten der Bürstenpolymere wird verglichen mit linearen Analoga. Dabei werden die folgenden Punkte systematisch untersucht.

- Die Eigenschaften der Polykationen:
 - Eine ausführliche Charakterisierung mit Hilfe der Lichtstreuung.
 - Ihre Toxizität gegenüber verschiedenen Zellen.
- Die Komplexbildungseffizienz der Polykationen und die resultierende Komplexgröße in verschiedenen Medien und Ladungsverhältnissen +/- (Verhältnis der positiven Ladungen an den Stickstoffatomen des Polykations zu negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA).
- Der Einfluss des Komplexherstellungsverfahrens: sequentielle Titration der Komponenten zueinander im Vergleich zur turbulenten Mischung im Mikromischer
- Die Komplexeigenschaften:

- Der Einfluss unterschiedlicher Salzgehalte in der Lösung auf die Komplexeigenschaften und die Komplexgrößen.
 - Die Freisetzung der DNA aus den Komplexen mit Hilfe verschiedener Kompetitoren. Hier wird neben Modellsystemen (Heparin, BSA) auch RNA als natürlich in der Zelle vorkommendes Polyanion verwendet. Das ist insbesondere für eine mögliche Anwendung als Gen-Transporter notwendig, da die DNA zur Transfektion abgelesen wird und dabei ganz oder teilweise freigesetzt sein muss.
 - Der Schutz vor DNase-Degradation. Ungeschützte DNA wird sofort abgebaut, die Komplexbildung soll die DNA vor DNase-Angriffen bewahren.
 - Die Aufnahme der Komplexe in die Zellen.
 - Das Transfektionsvermögen an Endothelzellen.
- Vergleich der Komplexeigenschaften mit deren Transfektionsvermögen.

Kapitel 2

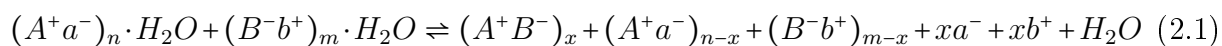
Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen zur Komplexbildung und der Zelltransfektion erläutert. Desweiteren werden die in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden, Lichtstreuung, Gelelektrophorese, CD-Spektroskopie und Rasterkraftmikroskopie, vorgestellt.

2.1 Polyelektrolytkomplexe

Eine gute Übersicht über Polyelektrolytkomplexe ist in [TMD⁺04] zu finden. Polyelektrolytkomplexe sind entweder Komplexe aus negativ und positiv geladenen Polyelektrolyten (PEC), diese werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich behandelt, oder Polyelektrolyte mit entgegengesetzt geladenen Tensiden. Komplexe bilden sich im einfachsten Fall durch Mischen wässriger Lösungen der beiden Komponenten. Polyelektrolytkomplexe weisen meist eine ungeordnete Struktur auf, die keine langreichweitige, periodische Ordnung aufweist. Die Struktur der PECs ist durch die schnelle Kinetik der Bildung bestimmt, nur in sehr verdünnten Lösungen kann man den Einfluss der Komplexmischung, Lösemittel etc. untersuchen.

Die Triebkraft der PEC-Bildung ist die elektrostatische Wechselwirkung der entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyte und die Entropiezunahme durch Freisetzung der Gegenionen und Hydratwassers. Allgemein kann die Komplexbildung mit folgender Reaktionsgleichung beschrieben werden:



Ein Polykation $(A^+)_n$ mit seinen n negativ geladenen Gegenionen a^- bildet mit einem Polyanion $(B^-)_m$ mit m positiven Gegenionen b^+ einen Komplex $(A^+B^-)_x$ unter Freisetzung der x Gegenionen a^- und b^+ . Bei nicht vollständiger Umsetzung bzw. unstöchiometrischen Mischverhältnissen bleiben noch Teile der Polyelektrolyte $(A^+a^-)_{n-x}$ und $(B^-b^+)_{m-x}$ in Lösung. Die Stöchiometrie des Reaktionsansatzes muss nicht notwendigerweise der Zusammensetzung des Komplexes entsprechen.

Wasserlösliche PEC können im Überschuss einer Komponente und vor allem bei unterschiedlichen Molekulargewichten der Komplexkomponenten gebildet werden. Die Stabilisierung der Teilchen in Lösung beruht auf abstoßenden Kräften zwischen den Teilchen. Es wird unterschieden zwischen elektrostatischer und sterischer Stabilisierung. Polyelektrolyte sind geladen, die Ladungen auf der Oberfläche werden durch Gegenionen ausgeglichen, die sich in einer diffusen Ionenwolke um den Polyelektrolyt aufhalten. Die Abstoßung zwischen den Ionenschichten zweier Partikel stabilisiert die Dispersion (elektrostatische Stabilisierung). Von sterischer Stabilisierung spricht man, wenn auf den Oberflächen ungeladene Polymere gebunden sind, die sich sehr gut im Lösemittel lösen. Das Überlappen zweier Partikel wird damit verhindert, da sofort Lösemittel in den Zwischenraum fließt, wenn sich die Teilchen zu nahe kommen.

Tsuchida et al. [Tsu94] haben gezeigt, dass Komplexe bei Zugabe eines weiteren (hochmolekularen) Polyelektrolyten, der stärker an eine der beiden Komplexkomponenten bindet, auch wieder aufgelöst werden. Auch Zugabe von Salzen kann zum Auflösen der Komplexe führen.

Um zu erklären, warum manche Kompetitoren in der Lage sind, die DNA im Komplex zu ersetzen und andere nicht, kann man die Gesamtänderung der freien Energie ΔG_{total} bei der Austauschreaktion betrachten. Diese kann als die Summe der Änderungen der freien Energien der Polymerketten ($\Delta G_{Polymer}$) und der Gegenionen ($\Delta G_{Gegenionen}$) beschrieben werden [AAZP⁺07]. Die Freisetzung des Hydratwassers wird hier nicht berücksichtigt.

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{Polymer} + \Delta G_{Gegenionen} \quad (2.2)$$

Jeder dieser Terme liefert sowohl einen entropischen wie einen enthalpischen Beitrag. Der enthalpische Beitrag kann im Prinzip vernachlässigt werden, da zur Komplexbildung zwei Bindungen gebrochen werden müssen (eine zwischen DNA und positivem Gegenion und eine zwischen Polykation und negativem Gegenion) und auch wieder zwei Bindungen gebildet werden (eine zwischen DNA und Polykation und eine zwischen den beiden entgegengesetzt geladenen Gegenionen). Bei der Auflösung der Komplexe liegt der umgekehrte

Vorgang vor. Wichtiger als der enthalpische Beitrag ist die Änderung der Entropie. Bei der Komplexbildung werden die Gegenionen freigesetzt und zudem gebundenes Wasser aus dem Komplex gedrängt und so die Entropie erhöht. Auf den hochgeladenen Polyelektrolyten sind im unkomplexierten Zustand stets einige Gegenionen kondensiert [Man79]. Bei der Komplexbildung werden diese Gegenionen freigesetzt und tragen so zu einer höheren Entropie bei.

2.1.1 Struktur der Komplexe

Lösliche bzw. dispergierte Komplexe lassen sich nur in stark verdünnten Systemen erhalten. Ein wichtiger Aspekt in der Charakterisierung der PECs ist die Bestimmung der Komplexstöchiometrie. Dazu können Trübungsmessungen, Potentiometrie, Leitfähigkeitsmessungen oder Lichtstreuung verwendet werden. Für starke Polyelektrolyte liegt der Endpunkt meist bei einer 1:1-Stöchiometrie der Komponenten.

Interpolyelektrolytkomplexe sind in der Regel polydispers. Im Überschuss einer Komponente bestehen die Partikel aus einem ungeladenen Kern mit geladener Hülle der Überschusskomponente.

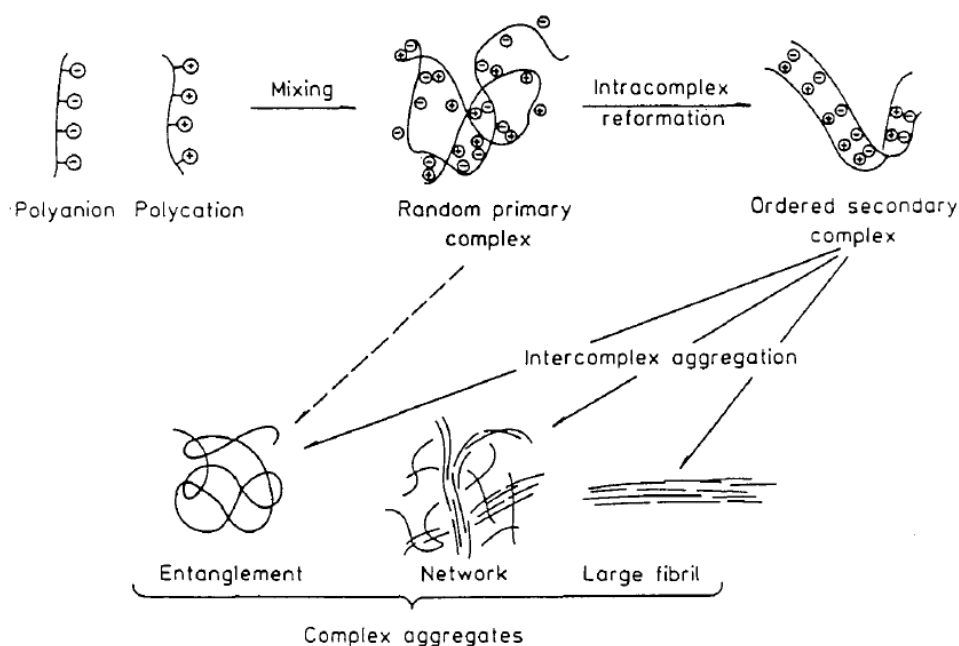


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Aggregation von Polyelektrolytkomplexen aus [Tsu94]

Je höher die Konzentration der Polyelektrolyte, desto stärker die Aggregation der Komplexe. Dies wurde schematisch von Tsuchida [Tsu94] dargestellt (siehe Abbildung 2.1). Er unterscheidet drei Klassen der Komplexbildung:

1. Bildung von Primärkomplexen
2. Bildung von Intrakomplexen
3. Interkomplexaggregation

Der erste Schritt beinhaltet die Bindung durch Coulomb-Kräfte direkt nach dem Mischen der beiden entgegengesetzt geladenen Komponenten. Im Bereich von einer Stunde nach Mischen (Schritt 2) tritt die Bildung von neuen Bindungen und/oder die Korrektur von Verdrehungen der Polymerketten auf. Im dritten Schritt treten Aggregationen der Sekundärkomplexe auf, hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen. Diese Aggregation ist von vielen Faktoren abhängig, unter anderem der Polymerstruktur, der Komplexbildungsbedingung und der Konzentration. Bei niedrigen Konzentrationen präzipitieren die primären Komplexe in der Regel nicht und liegen als kolloidal gelöste Teilchen vor.

Zugabe von Salz kann die Aggregation der Komplexe verändern. Werden die Komplexe in Lösungen kleiner Salzkonzentration (0.01N) hergestellt, wird die Aggregation vermindert. Hohe Salzkonzentrationen (0.1N) verstärken die Aggregation jedoch deutlich. Durch Zugabe von Salz zu fertigen Komplexen können je nach Polyelektrolyt verschiedene Beobachtungen gemacht werden. Starke Polyelektrolyte aggregieren umso schneller je mehr Salz in der Lösung ist, da die Ladungen in der stabilisierenden Hülle neutralisiert werden. Komplexe mit schwachen Polyelektrolyten quellen und lösen sich bei Salzzugabe auf. Ein zusätzlicher Effekt der auftreten kann, ist das Aussalzen der Komplexe bzw. der einzelnen Komponenten. Zugabe großer Mengen Salz stört die Ordnung des Wassers. Die Wassermoleküle lagern sich nicht mehr ausreichend um die gelöste Substanz, die solvatisierende Hülle bricht auf und die Teilchen fallen aus. Unterscheidbar sind diese Effekte durch Kalorimetriemessungen. Aussalzen ist ein ausschließlich entropischer Effekt ohne Änderung von ΔH , währenddessen die Wechselwirkung entgegengesetzt geladener Teilchen mit einer Enthalpieänderung verbunden ist.

2.2 Kondensation von Gegenionen

In wässrigem Medium liegt ein Polykation mit teilweise kondensierten Gegenionen vor. Das Ausmaß der Gegenionenkondensation wurde von Manning für stäbchenförmige Polyelek-

trolyte hergeleitet [Man69]. Er betrachtet die Polyelektrolyten als unendlich lange Geraden, auf denen sich in gleichmäßigen Abständen d Elementarladungen befinden. In Lösung befindet sich die gleiche Anzahl Gegenionen, von denen ein gewisser Anteil ϕ in unmittelbarer Umgebung des Polyelektrolyten lokalisiert ist und so dessen Ladung auf $(1-\phi)$ vermindert. Der Rest der Gegenionen ist frei in Lösung. Nach Manning kondensieren genau so lange Gegenionen auf die Kette bis für den Abstand zweier Ladungen auf dem Polyelektrolyt die elektrostatische Abstoßungsenergie der thermischen Energie kT des Mediums entspricht. Diesen Abstand nennt man Bjerrum-Länge l_b .

$$l_b = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0kT} \quad (2.3)$$

mit e : Elementarladung

ϵ : Dielektrizitätskonstante

ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

k : Boltzmann-Konstante

T :Temperatur

In Wasser beträgt die Bjerrum-Länge 7.1\AA . Unter der Annahme, dass die Polymere unendlich dünne Stäbchen sind, kann der Dissoziationsgrad berechnet werden. In 53% quaternisiertem Polyvinylpyridin beträgt der Abstand zweier chemischer Ladungen im Mittel 4.7\AA , das heißt in Wasser kann dieses PVP nur zu etwa 66% dissoziieren. In Polylysin beträgt die Länge einer Wiederholungseinheit 2.5\AA , bei $\text{pH}=7$ sind alle Aminogruppen der Seitenketten protoniert, der Abstand der Ladungen ist also auch 2.5\AA . In Wasser ist Polylysin deshalb zu 35% dissoziiert.

2.3 Zell-Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukariotische Zellen [DK05]. Diese Übertragung von DNA erfordert einen Vektor zur Überwindung der Zellmembran. Dazu können Viren, Liposomen oder Polykationen dienen. Neben diesen Vektor-basierten Verfahren gibt es auch physikalische Methoden, wie z.B. die sogenannte Elektroporation. Sie beruht auf einer physikalischen Einwirkung auf die Zelle: Durch Anlegen einer Spannung werden Poren in der Zellmembran erzeugt. Das genetische Material kann ohne Vektor durch die Poren in die Zelle eindringen.

Als virale Vektoren werden Adenoviren und Retroviren verwendet, in denen die essentiellen Gene durch das therapeutisch einzubringende Gen ersetzt werden. Viren stellen sehr effektive Transporter dar und erfüllen viele der an sie gestellten Anforderungen für einen effizienten Gentransfer. Ihre breite Anwendung ist jedoch durch schwerwiegende Sicherheitsrisiken [Bre05], Limitierungen bei der Beladungskapazität und Probleme bei der Herstellung und Lagerung [Luo00] begrenzt.

Liposomen als Vektoren sind artifizielle, mit einer Lipiddoppelschicht umschlossene Vesikel, die die zu übertragende DNA enthalten. Diese Vesikel können mit der Zellmembran fusionieren [DK05]. Üblicherweise bestehen solche Liposomen aus einer Mischung aus positiv geladenen Lipiden und neutralen Helferlipiden. Die Fusion der Liposomen mit der Membran hängt mit der negativen Ladung der Zellmembran (Säurereste der Glycolipide oder negativ geladene Proteine) zusammen. Die negative Ladung spielt dabei mehrere Rollen: Zunächst fördert sie den engen Kontakt zwischen Vesikel und Membran, was zu einer gegenseitigen Neutralisierung der Oberflächenladungen führt. Dadurch wird die hydrophile Natur der Membranen verringert, das durch Wasserstoffbrücken gebundene Wasser freigelassen und so eine noch engere Anbindung des Vesikels an die Membran erlaubt. Desweiteren destabilisiert die Neutralisierung des positiv geladenen Lipids die Doppelschicht des Liposoms [BC97].

Xu et al. [XS96] beschreiben den Aufnahmeweg von DNA mit liposomalen Vektoren nach Versuchen zur DNA-Freisetzung mit Ethdiumbromid-Verdrängung, DNase I Degradation und Messung der elektrophoretischen Mobilität wie folgt (siehe Abbildung 2.2): Nach Anlagerung des Liposoms an die Zelloberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen wird dieses in ein Endosom aufgenommen (Schritt 1). Der Vesikel-DNA-Komplex initiiert eine Destabilisierung der endosomalen Membran, die zu einem Flip-Flop (Wechsel der Schicht in der Lipiddoppelschicht) der anionischen Lipide (vorwiegend auf der Seite, die dem Cytoplasma zugewandt ist) führt (Schritt 2). Die anionischen Lipide diffundieren lateral in den Komplex und bilden ladungsneutralisierte Ionenpaare mit den kationischen Lipiden (Schritt 3). Dieser Prozess führt zum Ablösen der DNA aus dem Vesikel und erlaubt deren Eintritt ins Cytoplasma (Schritt 4). Verantwortlich für die Freisetzung der DNA aus dem liposomalen Vektor sind also die negativ geladenen Lipide auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite des Endosoms. Gleiches Verhalten wird von Zelphati et al. durch Versuche mit fluoreszenzmarkierten Lipiden und DNA beobachtet [ZS96]. In dem von Xu et al. vorgeschlagenen Mechanismus muss der Vesikel mit der DNA zunächst durch Endozytose aufgenommen werden. Erst die Verschmelzung mit der Membran des Endosoms erlaubt

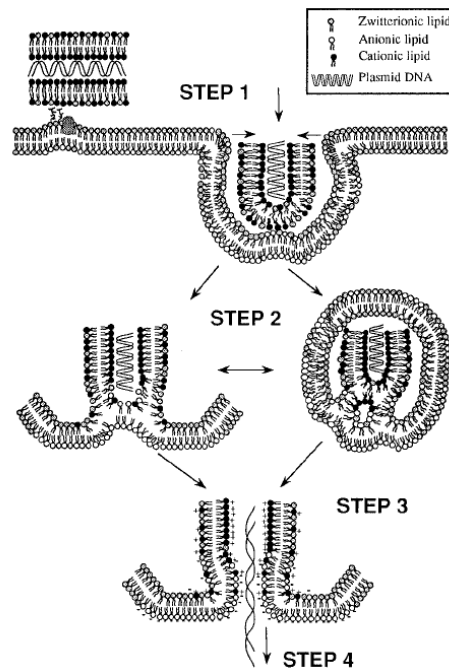


Abbildung 2.2: Aufnahme- und Freisetzungsmechanismus von Plasmid-DNA aus Liposomen. [XS96]

eine Freisetzung der DNA. Prinzipiell ist die gleiche Verschmelzung aber auch mit der Zellmembran möglich. Eine Erklärung ist der verbesserte Kontakt der Vesikelmembran mit der endosomalen Membran, da diese eine stärkere Krümmung besitzt als die Zellmembran. Alternativ könnte auch der mechanische oder osmotische Druck auf die Zellmembran nicht groß genug sein, um die Doppelschicht aufzubrechen und die DNA freizulassen. Neuere Arbeiten von Berezhna et al. [BSH⁺05] an giant vesicles als Modellsystem zeigen, dass nicht nur anionische, sondern auch neutrale Lipide (z.B. Phosphatidylethanolamin) die Freisetzung von kurzen DNA-Strängen aus Liposomen ermöglichen. Vermutlich verursacht die kleine Kopfgruppe des Lipids eine starke Krümmung der Lipiddoppelschicht, in die es integriert ist, und destabilisiert diese dadurch.

Die Abtrennung der DNA vom liposomalen Vektor vor dem Eintritt in den Zellkern wurde von Zelphati et al. [ZS96] durch Fluoreszenzmarkieren gezeigt. Die Freilassung der DNA beim Eintritt ins Cytoplasma scheint ein entscheidender Schritt in der Zelltransfektion zu sein: Komplexe aus kationischen Lipiden und DNA, die direkt in den Zellkern mikroinjiziert werden, zeigen niedrige Transfektionseffizienzen [ZFM⁺95]. Die genomische DNA im Zellkern ist dementsprechend nicht in der Lage, die fremde DNA aus dem Vektor zu lösen. Dies muss schon vor dem Eintritt in den Nukleus stattfinden.

2.4 Definitionen

Chemische Ladungen vs. effektive Ladungen Chemische Ladungen sind alle positiv oder negativ geladenen Gruppen in einem Molekül, unerheblich, ob sie durch Gegenionen ausgeglichen werden oder nicht. Chemische Ladungen sind durch Titration bestimmbar. Effektive Ladungen sind nach außen, über große Entfernungen wirksame Ladungen. Sie lassen sich durch Leitfähigkeitsmessungen oder Zeta-Potential-Messungen bestimmen und sind für die Wanderung von Teilchen in der Elektroforese verantwortlich. Die effektiven Ladungen starten die elektrostatische Bindung an Oberflächen oder andere Moleküle [BS07]. Die Zahl der effektiven Ladungen ist kleiner als die der chemischen Ladungen, da ein Teil der Ladungen durch Kondensation von Gegenionen kompensiert wird. Das Ausmaß der Gegenionenkondensation hängt von der Bjerrum-Länge ab, siehe Abschnitt 2.2.

Ladungsmismatch Als Ladungsmismatch wird der immense Unterschied der Anzahl chemischer Ladungen pro Einheitslänge zwischen DNA und Bürstenpolymer bezeichnet. Die DNA besitzt 5.9 negative Ladungen pro nm Konturlänge, die PVP-Bürste verfügt dagegen durch die hohe Propfdichte der mehrfach geladenen Seitenketten über ca. 55 positive Ladungen pro nm Konturlänge. Eine einzelne Schicht von DNA-Molekülen, die sich um die zylindrische Bürste anlagert, kann deshalb niemals alle positiven Ladungen kompensieren und die effektive Ladung im Inneren des dicht gepackten Kerns eines Komplexes muss folglich positiv bleiben. Dies gilt nur, wenn keine Ladungskompensation durch gebundene Gegenionen, also Ionenpaarbildung, auftritt [SDH⁺07].

Debye-Länge Die charakteristische Länge oder Dicke der diffusen elektrischen Doppelschicht nennt man Debye-Länge $1/\kappa$. Sie definiert den Abstand vom Ion, nach dem das Potential auf $1/e$ des Maximums gesunken ist.

$$1/\kappa = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k T}{2 N_A e^2 I}} \quad (2.4)$$

mit: ϵ_0, ϵ : Dielektrizitätskonstante im Vakuum bzw. im Medium

k: Boltzmann-Konstante

T: Temperatur

N_A : Avogadrozahl

e: Elementarladung

I: Ionenstärke

Die Debye-Länge hängt nur von den Lösemittleigenschaften ab, nicht von Oberflächencharakteristika. Für 1:1 Elektrolyte wie NaCl ist $1/\kappa = 0.304/\sqrt{c(NaCl)}$ nm während für 1:2 und 2:1 Elektrolyte wie CaCl₂ oder Na₂SO₄ $1/\kappa = 0.176/\sqrt{c(CaCl_2)}$ nm gilt. In reinem Wasser bei pH 7 beträgt die Debye-Länge 960nm.

Wasserstoffbrücken, hydrophober Effekt und Hydrophilie Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen Wasserstoff und elektronegativen Atomen (wie O, N, F und Cl). Die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen liegt zwischen einfachen van der Waals-Kräften und kovalenten oder ionischen Bindungen. Sie sind beispielsweise verantwortlich für den hohen Siedepunkt von Wasser und halten die Stränge in der DNA-Helix zusammen. In reinem Wasser bildet jedes Wassermolekül 3.0 bis 3.5 Wasserstoffbrücken aus. Wenn Wasser in Kontakt mit unpolaren Stoffen, die keine Wasserstoffbrücken bilden können, kommt (z.B. Alkane, Kohlenwasserstoffe oder inerte Atome), so verringert sich die Zahl der H-Brücken, die das Wassermolekül bilden kann, da in Richtung des unpolaren Stoffs keine H-Brücken ausgebildet werden können. Ist das unpolare Molekül jedoch nicht zu groß, so können die Wassermoleküle dieses Molekül, wenn es eine passende Geometrie hat, umschließen. Durch Neuorientierung der Wassermoleküle können diese wiederum Wasserstoffbrücken ausbilden, oft sogar mehr als in reinem Wasser. Diesen Effekt nennt man hydrophobe Hydratation. Er ist jedoch entropisch ungünstig, da das Wasser um das gelöste Molekül herum einen höheren Ordnungsgrad hat als in reinem Wasser. Deshalb sind die meisten Kohlenwasserstoffe in Wasser unlöslich. Diese Unmischbarkeit inerter Substanzen mit Wasser aufgrund des Entropieverlustes nennt man hydrophoben Effekt.

Hydrophile Substanzen ziehen im Gegensatz zu hydrophoben Gruppen den Kontakt mit Wasser dem Kontakt mit sich selbst vor. Hydratisierte Ionen sind hydrophil, genauso wie polare Stoffe, die elektronegative Atome besitzen, die Wasserstoffbrücken zum Wasser ausbilden können. Während hydrophobe Stoffe die Ordnung der um sie herum angelagerten Wassermoleküle erhöhen, führen hydrophile Stoffe eher zur Ausbildung von Unordnung. Einige polare Moleküle können die Wasserstruktur sehr effektiv verändern bzw. zerstören, sodass sie drastische Auswirkungen auf gelöste Teilchen haben können. Ein Beispiel ist Harnstoff, der Proteine zur Entfaltung bringt. Solche Materialien nennt man chaotrop. Sie verringern die Ordnung des Wassers, indem sie die Käfigstrukturen des Wassers, die sich um ein gelöstes Molekül bilden, zerstören. Bei Zugabe von Salzen, die die Entropie des Systems erhöhen, können Polymere aus der Lösung ausfallen. Man spricht dann von Aus-

salzen.

Hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Anordnung von amphiphilen Stoffen wie Tensiden oder bestimmten Blockcopolymeren in Lösung.

2.5 Verwendete Methoden

2.5.1 Lichtstreuung [Bee96] [Sch07]

Mit Hilfe der Lichtstreuung kann die Form, Molmasse und Größe von Teilchen in Lösung bestimmt werden. Sie ist eine Absolutmethode, die ohne Kalibrierung mit Standards auskommt. Es wird unterschieden zwischen statischer und dynamischer Lichtstreuung, je nachdem ob die gemittelte Intensität oder die zeitaufgelöste Intensitätsfluktuation ausgewertet wird. Beide Methoden liefern unterschiedliche charakteristische Merkmale der untersuchten Partikel.

Statische Lichtstreuung

Trifft ein Lichtstrahl auf Moleküle oder Atome, so verschiebt er durch seine Eigenschaft als elektromagnetische Welle die Elektronen relativ zum Kern und erzeugt so in den Teilchen ein oszillierendes Dipolmoment. Die entstandenen Dipole senden wiederum elektromagnetische Wellen senkrecht zur Schwingungsrichtung des Dipols aus, die sogenannten Streuwellen. Die Größe des Dipolmoments ist dabei proportional zur Polarisierbarkeit α der Dipole. In der statischen Lichtstreuung wird ausschließlich elastische Streuung betrachtet, bei der die Wellenlänge der gestreuten Welle mit der der einfallenden Welle übereinstimmt.

Die fundamentale Gleichung zur statischen Lichtstreuung wurde von Lord Rayleigh theoretisch hergeleitet. Sie gilt allerdings nur für verdünnte Gase. Einstein und Smoluchowsky erweiterten die Gleichung mit der Fluktuationstheorie auch auf Flüssigkeiten und Lösungen. Dabei gilt, dass Streuung nur beobachtet werden kann, wenn das betrachtete Volumenelement einen anderen Brechungsindex besitzt als die Umgebung. In reinen Flüssigkeiten tritt dies durch Dichteschwankungen auf, in Lösung gibt es zusätzlich noch Konzentrationsschwankungen.

Durch statische Lichtstreuung kann das Gewichtsmittel der Molmasse M_w , das z-Mittel des Trägheitsradienquadrat $\langle R_g^2 \rangle_z$ und der 2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks A_2 bestimmt werden. Letzterer beschreibt die Wechselwirkungen zwischen Polymersegmenten und Lösemittel. In der statischen Lichtstreuung wird die über einen bestimmten Zeitraum gemittelte Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuwinkel gemessen.

Punktstreuer Teilchen, die kleiner als $\lambda/20$ sind, können als Punktstreuer betrachtet werden, deren Streuzentren im Molekül so eng beeinander liegen, dass nur konstruktive Interferenz auftritt. Die Streuintensität ist deshalb unabhängig vom Streuwinkel und kann

mittels Fluktuationstheorie wie folgt beschrieben werden:

$$I \propto KkT \frac{c}{\left(\frac{\partial \pi}{\partial c}\right)_{T,N}} \quad (2.5)$$

mit K: Kontrastfaktor, beschreibt die Streukraft der einzelnen Teilchen

k: Boltzmann-Konstante

T: Temperatur

c: Konzentration

$\frac{\partial \pi}{\partial c}$: Änderung des osmotischen Drucks in Abhängigkeit von der Konzentration

Nach van't Hoff gilt für den osmotischen Druck realer Lösungen die Beziehung:

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = RT \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \right) \quad (2.6)$$

mit M: Molmasse der gelösten Teilchen

A_2 : 2. Virialkoeffizient

Die Streukraft der Teilchen hängt wie oben gesagt von der Polarisierbarkeit der Teilchen ab und damit auch vom Brechungsindexunterschied zwischen gelösten Teilchen und Lösemittel. Der Kontrastfaktor K kann deshalb formuliert werden wie in Gleichung 2.7.

$$K = \frac{4\pi^2 n_D^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (2.7)$$

mit n_D : Brechungsindex der gelösten Substanz

λ_0 : Wellenlänge des einfallenden Lichts

N_L : Avogadro-Zahl

$\frac{\partial n}{\partial c}$: Brechungsindexinkrement

Der Absolutwert der Intensität ist auch von Faktoren wie der Laserleistung, dem Abstand des Detektors zur Probe r_D , der Größe des Streuvolumens V etc. abhängig. Deshalb ist es sinnvoll, die gemessene Intensität für die Probe mit der eines bekannten Standards (meistens Toluol) zu kalibrieren. So erhält man das sogenannte Rayleigh-Ratio R.

$$R = (I_{\text{Lösung}} - I_{\text{Lösemittel}}) \frac{r_D^2}{V} = \frac{I_{\text{Lösung}} - I_{\text{Lösemittel}}}{I_{\text{Standard}}} \cdot RR_{\text{Standard}} \quad (2.8)$$

Führt man Gleichungen 2.5, 2.6 und 2.7 zusammen, so erhält man die Zimm-Gleichung für kleine Teilchen ($\ll \lambda/20$), Gleichung 2.9.

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad (2.9)$$

Teilchen größer $\lambda/20$ Betrachtet man die Streuung größerer Teilchen, so befinden sich in einem Molekül mehrere Streuzentren. Zwischen deren Streustrahlen tritt sowohl konstruktive wie auch destruktive Interferenz auf. Die Streuintensität ist also nicht mehr winkelunabhängig, da sich die Interferenz mit dem Beobachtungswinkel ändert (siehe Abbildung 2.3 für den vereinfachten Fall zweier Streuzentren).

Zweckmäßigerweise führt man den Streuvektor \vec{q} ein, der definiert ist als Differenz des Streustrahls und des einfallenden Strahls. Sein Betrag ist $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta/2)$.

Für stark verdünnte Lösungen, in denen man lediglich Wechselwirkungen zwischen Streuzentren eines Moleküls, aber nicht die Interferenz von Streustrahlen aus verschiedenen Teilchen berücksichtigen muss, kann die Streuintensität nach Gleichung 2.10 berechnet werden. Dazu summiert man paarweise über alle Wechselwirkungen.

$$I(q) = NK \sum_{i=0}^Z \sum_{j=0}^Z \exp(-i\vec{q}\vec{r}_{ij}) \quad (2.10)$$

mit N: Zahl identischer Teilchen im Streuvolumen

Z: Anzahl der Streuzentren pro Teilchen

\vec{r}_{ij} : Abstandsvektor zwischen 2 Streuzentren innerhalb eines Teilchens

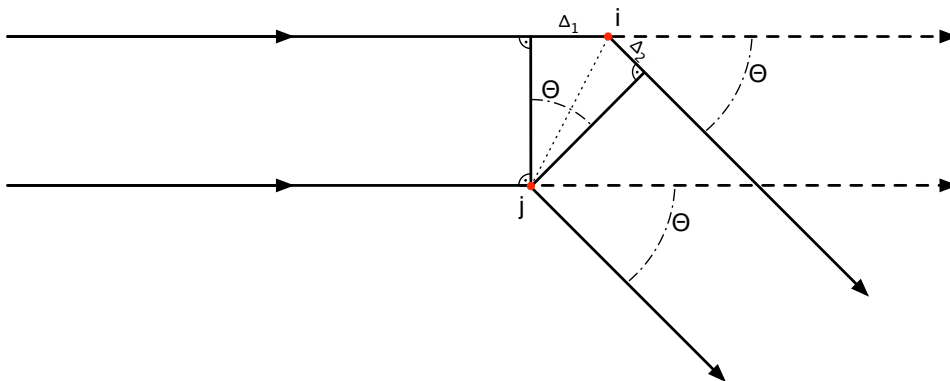


Abbildung 2.3: Interferenz bei zwei Streuzentren

Für isotrope Teilchen erhält man die normierte Streuung eines einzelnen Teilchens, auch bezeichnet als Partikelformfaktor $P(q)$, nach Reihenentwicklung, wie folgt:

$$P(q) = \frac{1}{NZ^2K} I(q) = \frac{1}{Z^2} \sum_{i=0}^Z \sum_{j=0}^Z \exp(-i\vec{q}\vec{r}_{ij}) = \frac{1}{Z^2} \sum_{i=0}^Z \sum_{j=0}^Z \left(1 - \frac{1}{6}q^2\vec{r}_{ij}^2 + \dots\right) \quad (2.11)$$

Vergleicht man diese Beziehung mit der Definition des Trägheitsradius R_g

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{2Z^2} \sum_{i=0}^Z \sum_{j=0}^Z \vec{r}_{ij}^2 \quad (2.12)$$

und setzt sie in Gleichung 2.11 ein, erhält man für den Partikelformfaktor

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle q^2 + \dots \quad (2.13)$$

Der Abbruch nach dem ersten Glied ist gerechtfertigt, wenn $q^2 \langle R_g^2 \rangle \ll 1$.

Um die Winkelabhängigkeit der Streuung an großen Teilchen zu berücksichtigen, wird der Formfaktor in die Zimmgleichung 2.9 eingesetzt.

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{MP(q)} + 2A_2c = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle q^2\right) + 2A_2c \quad (2.14)$$

Für polydisperse Proben lässt sich zeigen, dass mit Hilfe der statischen Lichtstreuung das z-Mittel des Trägheitsradienquadrat $\langle R_g^2 \rangle_z$ und das Gewichtsmittel der Molmasse M_w bestimmt wird. Diese sind wie folgt definiert:

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (2.15)$$

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \frac{\sum_i N_i M_i^2 (R_g^2)_i}{\sum_i N_i M_i^2} \quad (2.16)$$

Der vereinfacht als Trägheitsradius bezeichnete Wert „ R_g “ ist also exakt der radizierte Wert eines quadratischen z-Mittelwertes.

Mit Hilfe des aus der Zimm-Gleichung abgeleiteten Zimm-Plots (Abbildung 2.4) kann man durch doppelte Extrapolation auf $c = 0$ und $q = 0$ das Gewichtsmittel der Molmasse, das z-Mittel des Trägheitsradienquadrat und den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks bestimmen.

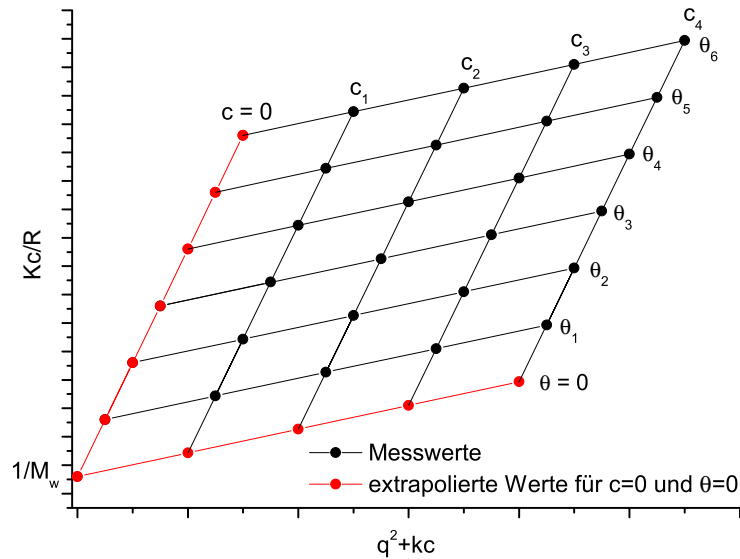


Abbildung 2.4: Exemplarischer Zimm-Plot

Dynamische Lichtstreuung

Im Unterschied zur statischen Lichtstreuung, die lediglich den Mittelwert der Streuintensität auswertet, wird in der dynamischen Lichtstreuung die zeitliche Fluktuation der Streuintensität beobachtet. Auf Grund der Brownschen Molekularbewegung diffundieren die Teilchen frei im Lösemittel in alle Richtungen, damit ändert sich auch ständig die Interferenz zwischen den Streustrahlen und damit die gemessene Gesamtintensität. Daraus kann dann der Diffusionskoeffizient und daraus der hydrodynamische Radius der Probe bestimmt werden.

Aus der Fluktuation der Streuintensität wird zunächst eine Intensitätskorrelationsfunktion g_2 berechnet, indem die Intensität zum Zeitpunkt t mit der Intensität zum Zeitpunkt $t+\tau$ multipliziert wird. Wiederholt man diese Operation (Gleichung 2.17) für verschiedene Werte von τ und deren Vielfache und mittelt über die gesamte Messzeit, erhält man eine exponentiell abfallende Kurve für $g_2(q, \tau)$ (siehe Abbildung 2.5).

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t) * I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad (2.17)$$

Mit Hilfe der Siegert-Relation (2.18) kann die Intensitätskorrelationsfunktion $g_2(q, \tau)$

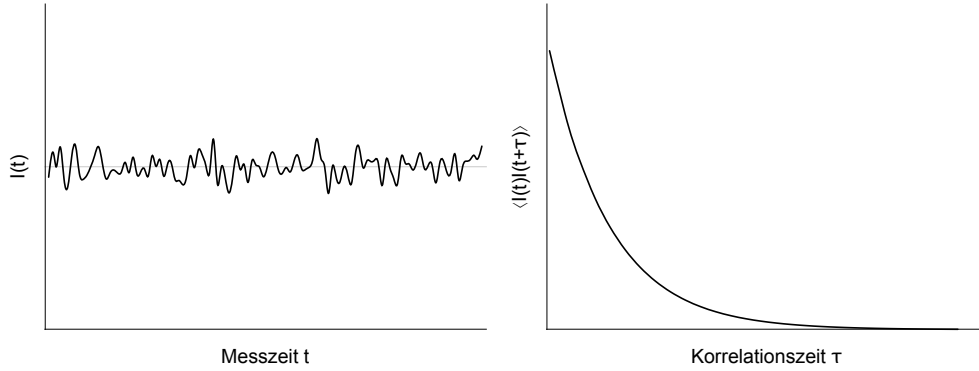


Abbildung 2.5: Fluktuation der Streuintensität $I(t)$ mit der Zeit und die daraus berechnete Intensitätskorrelationsfunktion $g_2(q, \tau)$

in die Amplitudenkorrelationsfunktion $g_1(q, \tau)$ überführt werden.

$$g_1(q, \tau) = \sqrt{\frac{\langle I(q, t) * I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2}} - 1 = \sqrt{g_2 - 1} \quad (2.18)$$

$g_1(q, \tau)$ ist die Fouriertransformierte der van Hove-Selbstkorrelationsfunktion, die den Bezug zum Diffusionskoeffizienten liefert (Herleitung siehe Literatur, z.B. [BP00]).

$$g_1(q, \tau) = B \cdot \exp(-q^2 D \tau) \quad (2.19)$$

mit B: Signal-Rausch-Verhältnis (abhängig vom experimentellen Aufbau)

D: translatorischer Diffusionskoeffizient

Für polydisperse Systeme ist $g_1(q, \tau)$ keine einfach abklingende Exponentialfunktion, sondern besteht aus einer Überlagerung mehrerer Exponentialfunktionen gewichtet mit $P(D)$.

$$g_1(q, \tau) = \int_0^\infty P(D) \exp(-q^2 D_i \tau) \partial D \quad (2.20)$$

Die Verteilungsfunktion $P(D)$ hängt dabei von der Teilchenzahl, ihrer Masse und dem Partikelformfaktor ab.

Aus der Anfangssteigung der Korrelationsfunktion kann man den Diffusionskoeffizienten für einen Winkel berechnen. Da, wie oben erwähnt, der Diffusionskoeffizient vom Formfaktor abhängt, ist dieser auch winkelabhängig. Der bestimmte Diffusionskoeffizient

Tabelle 2.1: ρ -Verhältnisse für verschiedene Partikeltopologien

Topologie	ρ -Verhältnis
Homogene Kugel	0.775
Hohlkugel	1
Ellipsoid	0.775-4
Polymerknäuel	1.505
Zylinder der Länge l und Durchmesser d	$\frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \ln(\frac{l}{d} - 0.5)$

ist deshalb nur ein apparenter Diffusionskoeffizient, D_{app} .

$$D_{app} = \frac{\sum n_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum n_i M_i^2 P_i(q)} \quad (2.21)$$

Das z -Mittel des Diffusionskoeffizienten $\langle D \rangle_z$ kann dann durch Extrapolation der apparenten Diffusionskoeffizienten gegen $q = 0$ erhalten werden, da für $q = 0$ alle Formfaktoren $P(q) = 1$ sind.

Durch Verwendung der Stokes-Einstein-Beziehung kann aus dem z -Mittel des Diffusionskoeffizienten der kugeläquivalente hydrodynamische Radius als inverses z -Mittel berechnet werden. Dieser wird als hydrodynamischer Radius bezeichnet.

$$\frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} = \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} \equiv R_h \quad (2.22)$$

ρ -Verhältnis

Das ρ -Verhältnis verbindet die charakteristischen Größen der dynamischen und statischen Lichtstreuung. Es erlaubt eine Aussage über die Topologie untersuchter Teilchen im Größenbereich von 20 bis 200nm. Für diese Partikel ist eine detaillierte Analyse des Partikelformfaktors nicht möglich, da ein Lichtstreuexperiment keinen ausreichend großen q -Bereich abbildet. Das ρ -Verhältnis ist definiert als

$$\rho = \frac{R_g}{R_h} = \frac{\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}}{\left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1}} \quad (2.23)$$

Bei polydispersen Systemen muss man die Mittelwertberechnung (z -Mittel des Trägheitsradienquadrat bzw. z -Mittel des reziproken hydrodynamischen Radius) beachten.

Tabelle 2.1 fasst die ρ -Verhältnisse für verschiedene Partikeltopologien zusammen [Sch07].

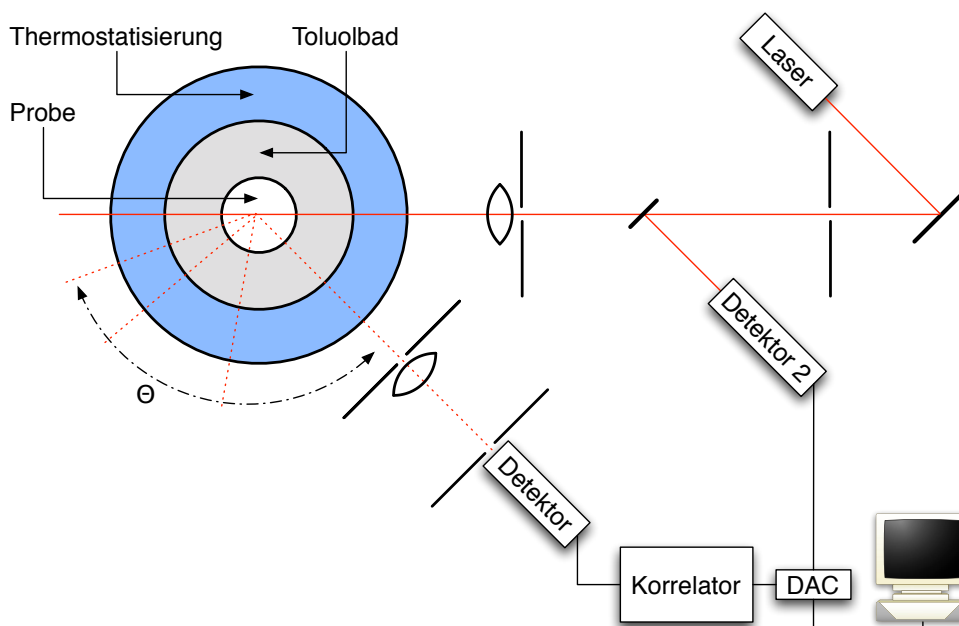


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuapparatur (nach [Sch93])

Aufbau einer Lichtstreuapparatur

Im allgemeinen besteht eine Lichtstreuapparatur aus der Lichtquelle (Laser), verschiedenen Linsen und Lochblenden um den Strahl zu fokussieren, dem Detektor (Photomultiplier), der auf einem beweglichen Goniometerarm befestigt ist und einer Auswerteeinheit (Korrelator, Digital-Analog-Wandler, Rechner). Typischerweise wird bei Streuwinkeln zwischen 15° und 150° gemessen. Neben dem schwenkbaren Goniometerarm ist auch ein Aufbau mit mehreren Detektoren an verschiedenen Winkeln möglich. Ein zweiter Detektor (Photomultiplier oder Photodiode) zeichnet die Stabilität der Laserstärke auf. Die Küvette mit der Probenlösung steht in einem temperierten Toluolbad, dessen Brechungsindex dem von Glas ähnelt, um Reflexionen zu vermeiden und das zur Thermostatisierung dient.

Lichtstreuung an Polyelektrolyten [Bee96]

Polyelektrolyte bedürfen einer besonderen Behandlung in der Lichtstreuung, da sowohl in Wasser als auch in organischen Lösemitteln langreichweitige Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auftreten. Die resultierenden abstoßenden Wechselwirkungen zwischen den gleichgeladenen Makroionen behindern eine isotrope Verteilung der Moleküle im Lösemittel. Es kommt zu einer regelmäßigen Anordnung, die sich bei statischen Messungen in einem Maximum der Streuintensität, dem sogenannten Bragg-Peak, äußert. Für die

Lage dieses Intensitätsmaximums q_{max} erhält man aus der Bragg-Gleichung:

$$q_{max} = \frac{2\pi}{\bar{d}} \quad (2.24)$$

mit \bar{d} : mittlerer Abstand der Polyionen.

Geht man von einem kubischen „Gitter“ aus, erhält man für den Abstand \bar{d} von Makroionen der Molmasse M und der Konzentration c_P folgende Gleichung:

$$\bar{d} = \left(\frac{M}{N_L \cdot c_P} \right)^{1/3} \quad (2.25)$$

q_{max} wächst also mit der dritten Wurzel der Polymerkonzentration. Durch Zugabe von niedermolekularem Salz (z.B. LiCl, NaCl, LiBr für wässrige Lösungen oder LiBr, LiClO₄, Lithium-trifluoracetat oder Tetrabutylammoniumbromid für Lösungen in organischen Lösungsmitteln) werden die Coulomb-Wechselwirkungen der Polyelektrolyte abgeschirmt und der Bragg-Peak unterdrückt. Dadurch wird die Messung des Trägheitsradius erst erlaubt.

In der dynamischen Lichtstreuung tritt in salzfreien Lösungen ein Slow Mode auf, also ein zweiter langsamer Relaxationsprozess zusätzlich zu dem des reinen Polyelektrolyten. Die Ursache für diesen langsamen Diffusionsprozess ist bislang ungeklärt. Durch Zugabe niedermolekularen Salzes kann er jedoch verhindert werden. Der ebenfalls beobachtete Fast Mode wird bedingt durch die Wechselwirkung mit den kleinen Gegenionen. Deren schnelle Diffusion verursacht eine beschleunigte Diffusion der Ketten bzw. deren Segmente. Fast und Slow Mode verhindern die experimentelle Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der Einzelkette, weshalb zur hydrodynamischen Charakterisierung eines Polyelektrolyten immer in Salzlösung gemessen werden muss. Typischerweise sollte das molare Verhältnis $c_{Salz} / c_{Polymerladungen} > 1$ bis 10 sein.

2.5.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine weit verbreitete analytische Methode um geladene Teilchen ihrer Masse und Ladung nach aufzutrennen. Dazu werden die Proben auf ein Gel aufgetragen, das in einer Pufferlösung steht. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proben gemäß ihrer Ladung im elektrischen Feld. Die erste elektrophoretische Trennung wurde in den 1930er Jahren von Tiselius [Tis37] veröffentlicht, der 1948 den Chemie-Nobelpreis für seine Forschung erhielt. Die Charakterisierung von DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde von Thorne [Tho67] durchgeführt. Elektrophorese wird seither als Standardtechnik in der Biochemie verwendet.

Im folgenden werden kurz die theoretischen Grundlagen der elektrophoretischen Trennung erläutert. Die Kräfte, die auf ein Teilchen der Ladung q im elektrischen Feld wirken, sind zum einen die beschleunigende Kraft F_e

$$F_e = q \cdot E \quad (2.26)$$

mit $q = z \cdot e$ und zum anderen die Reibungskraft F_r

$$F_r = f_c \cdot v \quad (2.27)$$

wobei E die elektrische Feldstärke, v die Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchen und f_c der Reibungskoeffizient ist. Dieser ist abhängig von der Viskosität des Mediums und der Porengröße der Matrix. Beide Kräfte stehen im Gleichgewicht und so ergibt sich für die Wanderungsgeschwindigkeit

$$v = \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E \quad (2.28)$$

Den Proportionalitätsfaktor u zwischen Geschwindigkeit und angelegter Feldstärke nennt man auch elektrophoretische Mobilität. Mit Hilfe des Stokesschen Gesetzes, das die Reibungskraft für kleine kugelförmige Teilchen beschreibt, kann man u wie folgt formulieren:

$$u = \frac{q}{f_c} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2.29)$$

mit z : Ladungszahl

e : Elementarladung in Coulomb

η : Viskosität der Lösung

r : Stokes-Radius des Teilchens

Je kleiner und stärker geladen die Moleküle sind, desto schneller wandern sie also durch das Gel. Zudem ist die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Feldstärke und umgekehrt proportional zur Viskosität des Probe.

In unendlich verdünnten Lösungen treten zwei weitere Effekte auf, die zur Mobilität der Teilchen beitragen: der Relaxations- und der Retardationseffekt. Wie in der Debye-Hückel-Theorie beschrieben, ist jedes geladene Teilchen in Lösung von einer Ionenwolke entgegengesetzter Ladung umgeben. Legt man eine Spannung an, bewegt sich das Teilchen in die entgegengesetzte Richtung zu den es umgebenden Ionen. Es muss also einen „Gegenstrom“ überwinden und seine Geschwindigkeit verlangsamt sich deshalb (Retardationseffekt). Außerdem ist die Anziehung zwischen geladenem Teilchen und Ionenwolke zu beachten, die dazu führt, dass das Zentralteilchen die Ionenwolke hinter sich herzieht und auch so wiederum abgebremst wird (Relaxationseffekt). Diese beiden Effekte sind umso stärker, je höher die Molarität der Lösung ist. Deshalb bereiten Proben mit hohen Salzkonzentrationen in der Gelelektrophorese häufig Probleme und sollten vor der Analyse entsalzt werden.

Muthukumar berechnet die elektrophoretische Mobilität von Polyelektrolyten in unendlich verdünnten Lösungen für verschiedene Salzkonzentrationen [Mut96]. Diese hängt nicht nur vom Molekulargewicht ab, sondern wird auch von den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten ab. Für sehr kleine Salzkonzentrationen ist die elektrostatische Abstoßung der einzelnen Polymersegmente stark und das Polymer nimmt eine stäbchenförmige Topologie an. In höheren Salzkonzentrationen wird die Reichweite der elektrostatischen Kräfte verringert und das Polymer verhält sich eher wie ein Knäuel. Das Maß für die Reichweite der elektrostatischen Kräfte ist die Debye-Länge κ^{-1} (siehe Definition in 2.4, wobei κ^2 ungefähr proportional zur Salzkonzentration ist. Für die elektrophoretische Mobilität u gilt

$$u = \frac{q}{6\pi\eta_0 R_g} M(\kappa R_g) \quad (2.30)$$

mit η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

R_g : Trägheitsradius des Teilchens

Die Molmasse ist hier keine Konstante, sondern eine Funktion von κR_g . Sie erreicht die Grenzen $M(\kappa R_g) = \ln N - 1$ für sehr niedrige Salzkonzentrationen ($\kappa R_g \ll 1$) bzw. $M(\kappa R_g) =$

$(\kappa R_g)^{1-d_f}$ für sehr hohe Salzkonzentrationen ($\kappa R_g \gg 1$). d_f ist die effektive fraktale Dimension des Polymers.

Für salzfreie Lösungen, in denen die Polymere stäbchenförmig sind, gilt unter Berücksichtigung von $R_g = Nl/\sqrt{12}$ folglich

$$u = \frac{q}{\sqrt{3}\pi\eta_0 Nl} (\ln N - 1) \quad (2.31)$$

mit N: Molmasse des Polyelektrolyten

l: Kuhnlänge

Da die Ladung q proportional zu N ist, ist die elektrophoretische Mobilität proportional zu $\ln N - 1$ und damit extrem gering.

Für höhere Salzkonzentrationen verhält sich der Polyelektrolyt wie ein Knäuel und es gilt

$$u \propto \frac{q}{\eta_0} R_g^{-d_f} \frac{1}{\kappa^{d_f-1}} \quad (2.32)$$

Da $R_g^{d_f}$ proportional zu N ist, wird u unabhängig von N und proportional zu κ^{1-d_f} . Folglich gibt es keine elektrophoretische Auftrennung in Lösungen mit hoher Salzkonzentration.

Eine Trennung ist aber trotzdem möglich, wenn man eine Gelmatrix mit ungeladenen Polymeren verwendet.

Gelelektrophorese von DNA und RNA

Zur Trennung von DNA und RNA werden Agarosegele verwendet. Je nach Konzentration der Agarose entstehen verschieden große Poren im Gel im Bereich von 150nm (1% Gele) bis 500nm (0.16% Gele), durch die die Moleküle wandern [LE09]. Agarose ist ein Polysaccharid, das in Wasser durch Aufkochen gelöst wird und beim Abkühlen geliert. Es bilden sich Doppelhelices, die sich in Gruppen zusammenlagern und so relativ große Poren bilden.

Da das Ladungs- zu Masseverhältnis bei DNA konstant ist, werden verschiedene DNA-Stränge nach ihrer Masse und Konformation aufgetrennt. Kurze DNA-Moleküle laufen schneller als lange, supercoiled-DNA läuft schneller als lineare DNA. Um die DNA auf dem Gel sichtbar zu machen, färbt man diese mit Ethidiumbromid an, das in die DNA-Helix interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Vorteile der Gelelektrophorese sind ihre einfache Anwendbarkeit, die schnelle Durchführung und bei korrekter Wahl der Gelkonzentration die gute Auftrennung verschiedener Moleküle.

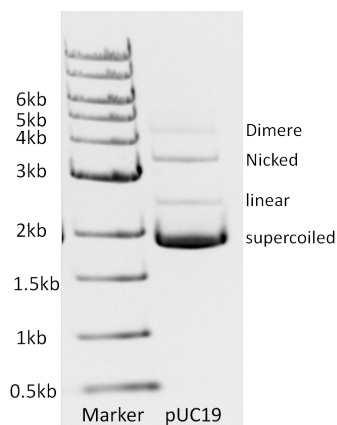


Abbildung 2.7: 1% Agarosegel mit 1kb-Marker und pUC19-DNA

Abbildung 2.7 zeigt ein 1% Agarosegel von pUC19-DNA. Die Plasmid-DNA trennt sich in vier Banden, von denen die stärkste die größte elektrophoretische Mobilität besitzt. Dieser Anteil der DNA ist supercoiled, durch die kompakte, steife Struktur läuft die supercoiled-DNA am schnellsten zur Anode. Die Komponente, mit dem zweit schnellsten Laufverhalten, ist linearisierte DNA. Beide DNA-Stränge sind an einer Stelle durchtrennt, sodass sich der Plasmidring öffnet und die DNA als lineares Molekül vorliegt. Die dritte Bande von unten ist sogenannte Nicked-DNA. Nur ein Strang der DNA ist durchtrennt, sodass die Spannung im supercoiled-Ring gelöst wird und die DNA als offener Ring vorliegt. Die Bande mit der kleinsten Mobilität besteht aus Dimeren.

In dieser Arbeit wird die Agarose-Gelelektrophorese zur Untersuchung des Freisetzungsvhaltens von DNA aus den Polyelektrolytkomplexen verwendet (siehe Kapitel 5.1). Es werden 1% Agarosegele verwendet und 1x TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer als Elektrolyt. Die Intensität der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden ist dabei proportional zur Menge freigesetzter DNA. Da die gemessene Fluoreszenzintensität aber auch von der Konzentration der Färbelösung und der Ionenstärke abhängig ist, werden die Intensitäten vor allem zum qualitativen Vergleich der Proben auf einem Gel verwendet.

2.5.3 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie (Circulardichroismus-Spektroskopie) lassen sich Sekundärstrukturen von Proteinen und DNA bestimmen. Dazu wird die unterschiedliche Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht untersucht. Unterschiedliche Absorptionen treten bei chiralen Molekülen auf. Der Messwert ist die Elliptizität θ , die die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten von rechts- und linkspolarisiertem Licht ϵ_L und ϵ_R angibt. Sie wird in Abhängigkeit der Wellenlänge λ gemessen.

$$\theta(\lambda) = \text{const.} \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (2.33)$$

Dabei ist d die Schichtdicke und c die Konzentration der Lösung.

CD-Spektroskopie wird zur Strukturanalyse von Proteinen und DNA angewendet. Proteinsekundärstrukturen lassen sich im Wellenlängenbereich von etwa 160-250nm untersuchen. Dort treten die $n \rightarrow \pi^*$ - und die $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung auf. Elektronische Übergänge von Nukleotiden sieht man vor allen im Bereich von 250-350nm.

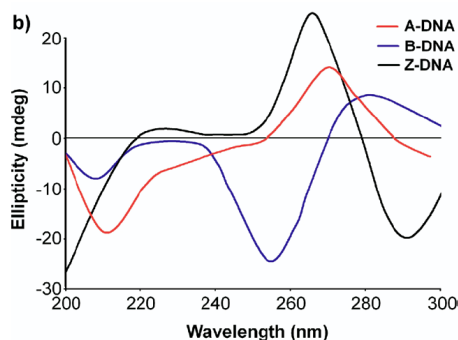


Abbildung 2.8: CD-Spektrum von DNA in A-, B- und Z-Form aus [BB07]

Abbildung 2.8 zeigt das zu erwartende CD-Spektrum von DNA in ihrer A-, B- bzw. Z-Form [BB07]. A-DNA hat ein Maximum bei 265nm, für B-DNA liegt das Maximum bei 280nm und für Z-DNA ist eine große Elliptizität bei 260nm zu erwarten. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie lässt sich also die Form der DNA bestimmen.

2.5.4 CD-Spektroskopie an DNA-Komplexen

Shapiro et al. haben die Wechselwirkungen zwischen Polylysin und DNA untersucht [SLF69]. Die Komplexe wurden in 0.85 bis 1mol NaCl hergestellt und die CD-Spektren der reinen

DNA mit der des Komplexes verglichen. Durch die Komplexierung verstärkt sich das CD-Signal bei ca. 290nm im Vergleich zur reinen DNA und zusätzlich kehrt sich das Vorzeichen um. Das gleiche Verhalten ist bei ca. 250nm zu beobachten. Aus dem negativen Signal der DNA wird ein positives, sehr viel stärkeres Signal des Komplexes (siehe Abbildung 2.9).

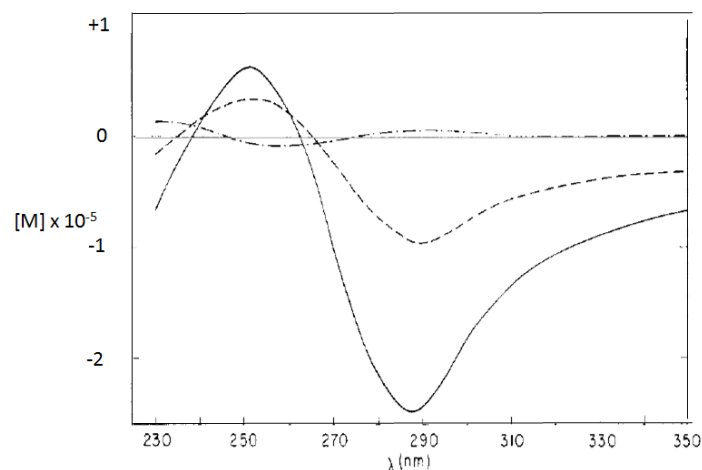


Abbildung 2.9: CD-Spektren von DNA und Polylysin-DNA-Komplexen aus [SLF69].

(—) Kalbsthymus-DNA + Poly-L-Lysin (DP = 70) in 1M NaCl
 (- - -) Kalbsthymus-DNA + Poly-L-Lysin (DP = 50) in 1M NaCl
 (----) Kalbsthymus-DNA allein

Das Auftreten dieser Banden können Shapiro et al. nicht endgültig erklären. Sie schlagen vor, dass ein Verkippen der DNA-Basen relativ zum Helix-Rückgrat die Ursache sein könnte oder dass Strukturen mit langreichweitiger Ordnung auftreten. Durch die Komplexierung wird das gebundene Wasser aus dem Inneren des Komplexes freigesetzt. Diese Dehydrierung ist mit einer Änderung der Basenanordnung verbunden, die ebenfalls das CD-Signal ändern könnte.

Fasman et al. haben CD-Spektren von DNA-Histon-Komplexen [FSGA70] sowohl in Abhängigkeit des Histon:DNA-Verhältnisses als auch in Abhängigkeit der Ionenstärke gemessen. Bei Erhöhung der Histonmenge im Komplex, werden zwei Effekte beobachtet: zum einen die Abnahme der Elliptizität bei 275nm, zum anderen die Verschiebung der Bande bei 245nm auf 251nm. Je mehr Salz in der Lösung ist (zwischen 0.01M und 0.3M NaF), desto stärker nimmt die Bande bei 275nm ab (siehe Abbildung 2.10).

Die Autoren schreiben die Änderung im CD-Spektrum einer Verkippen der Basen der Doppelstrang-DNA durch das Binden der Histone zu. Hinzu kommt die Neutralisierung der DNA-Ladungen sowie die Abschirmung der verbleibenden negativen Ladungen und der Einfluss der Komplex-Solvatisierung, die zu einer Assoziation der Komplexe führen.

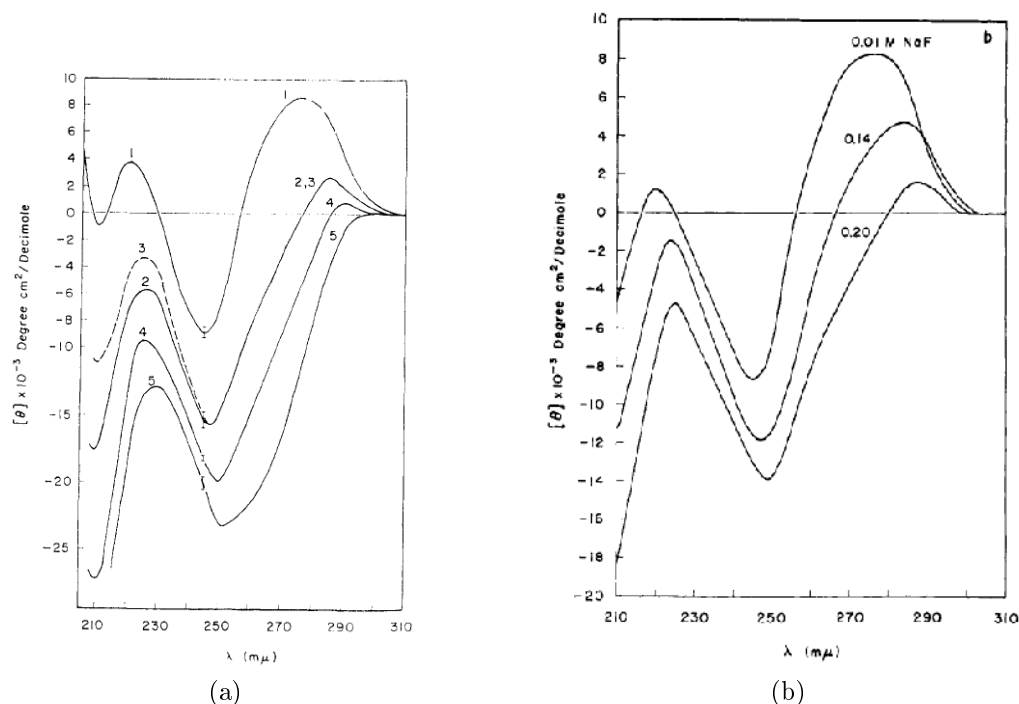


Abbildung 2.10: CD-Spektren an Histon-DNA-Komplexen aus [FSGA70]

a) CD-Spektren in Abhängigkeit des Histon (mol Reste):DNA (mol Phosphat)-Verhältnisses r . Die Konzentration der DNA beträgt 10^{-4} mol Phosphat in 0.14 mol NaF, pH = 7. Kurve 1: native DNA, Kurve 2: $r = 0.75$, Kurve 3: $r = 0.75$ korrigiert um den Histonanteil, Kurve 4: $r = 1.0$, Kurve 5: $r = 1.25$

b) CD-Spektren in Abhängigkeit der Ionenstärke (NaF-Konzentration). Die DNA-Konzentration beträgt 10^{-3} mol Phosphat, $r = 0.5$

Eine weitere Erklärung für die Änderung im CD-Spektrum kann die Hydratisierung der Komplexe sein, da gebundenes Wasser nötig ist um die B-Form der Helix zu stabilisieren. Darauf aufbauend verwenden Khadake et al. die Abnahme der positiven Elliptizität bei 270 nm als Maß für die DNA-Kondensation [KR97]. Das gleiche Phänomen beobachteten Evdokimov et al. bei der Zugabe von PEG zu DNA-Lösungen [EPTV72]. PEG konkurriert mit der DNA um Wasser, so dass die steife Struktur der Doppelstrang-Helix aufgehoben wird. Je höher der PEG-Gehalt in der Lösung, desto kleiner die Amplitude der positiven Bande bei 270 nm bei gleichzeitiger Rotverschiebung des Bandenmaximums.

2.5.5 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie ermöglicht Aufnahmen mit einer Auflösung bis in den molekularen Bereich. Sie wurde 1986 von Binnig und Quate entwickelt. Gemessen werden die auf eine Sonde wirkenden Kräfte. Diese sind bei ungeladenen, atomaren Strukturen abhängig vom Abstand. Bei großen Abständen wirken attraktive van der Waals-Kräfte, beim Verringern des Abstandes gehen diese schließlich in repulsive Kräfte (Hardcore-Potential) über.

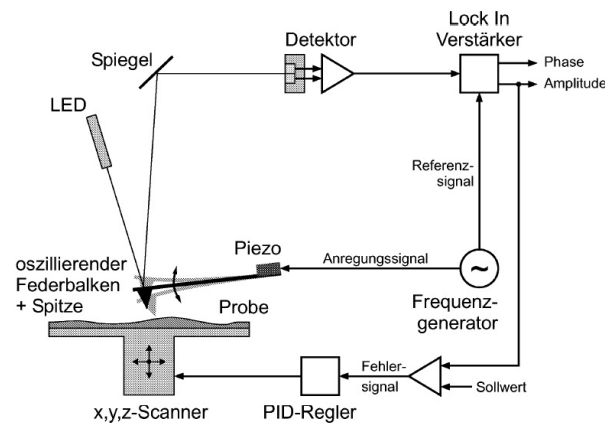


Abbildung 2.11: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops im Tapping Mode [Kue03]

Abbildung 2.11 zeigt schematisch den Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Als Sonde dient eine mikroskopisch kleine, scharfe Spitze, die an einem Federbalken (englisch: cantilever) befestigt ist. Die Cantileverspitzen bestehen aus Silizium oder Siliziumnitrid und haben Federkonstanten zwischen 0.01N/m und 100N/m . Die Auslenkung des Cantilevers wird mit Hilfe des Lichtzeiger-Prinzips gemessen. Hierbei wird ein Laser auf den Cantilever gerichtet, dessen Strahl von dort auf einen Photodetektor reflektiert wird. Eine Auslenkung des Cantilevers bewirkt somit ebenfalls eine Auslenkung des Laserstrahls, welche dann durch die Photodiode detektiert wird. Als Detektor wird eine Vierfeld-Differenzphotodiode verwendet, mit der eine ortsauflösende Detektion möglich ist. Mit Hilfe von Piezostellelementen kann die Probe in alle drei Raumrichtungen verschoben werden.

Es gibt drei verschiedene Messmodi beim Rasterkraftmikroskop - Contact Mode, Non-Contact Mode und Tapping Mode. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich im Tapping Mode gemessen. Dazu wird der Cantilever mit einer Frequenz nahe seiner Resonanzfrequenz zur Oszillation angeregt. Die Sonde kommt der Probe in diesem Modus immer nur für kurze Zeit nah, im Idealfall berührt sie die Oberfläche nicht. Aufgezeichnet

wird ein Höhenbild der Probe, ein Amplituden- und ein Phasenbild. Letzteres ergibt sich aus der Phase zwischen anregender und resultierender Schwingung. Nähert sich die Spitze der Probe, erfährt sie verschiedene Kräfte (Abbildung 2.12).

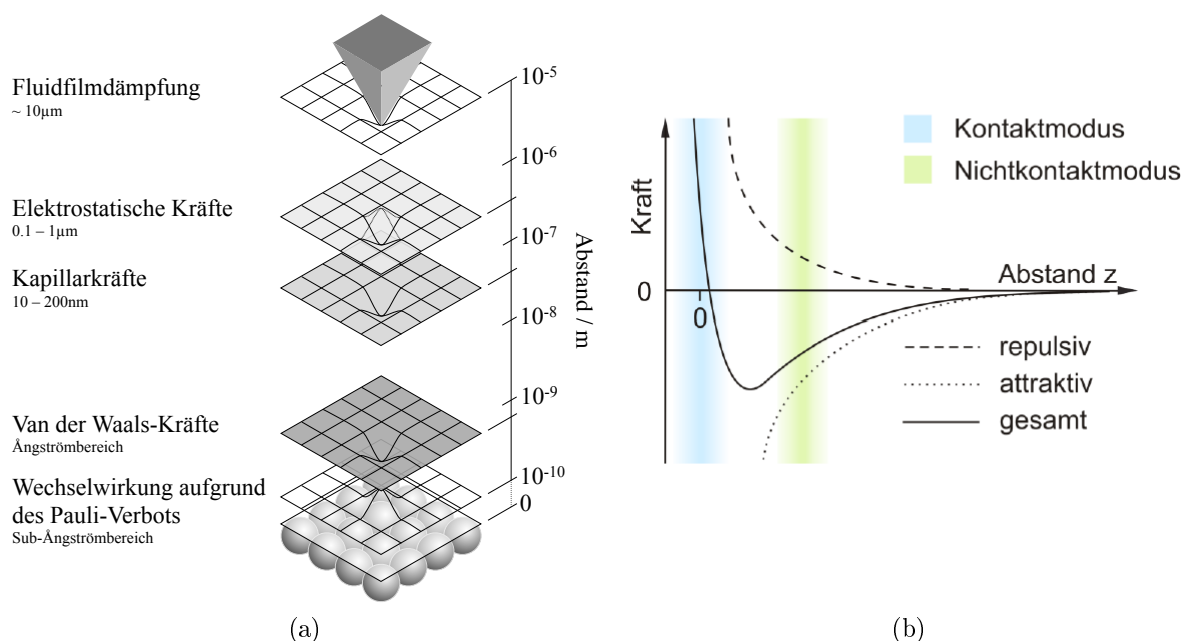


Abbildung 2.12: Kräfte, die auf die Cantileverspitze wirken.

2.12a) Reichweite von Wechselwirkungskräften zwischen Spitze und Probe. Fluidfilmdämpfung, Kapillarkräfte und van der Waals-Kräfte sind attraktiv, elektrostatische Kräfte können repulsiv oder attraktiv sein, die Wechselwirkung aufgrund des Pauli-Verbots ist repulsiv [Dus07].

2.12b) Kraft-Abstandskurve: Die wirkende Kraft setzt sich zusammen aus repulsiven und attraktiven Kräften. Je nachdem, in welchem Messmodus (Kontakt oder Nichtkontakt) gemessen wird, befindet sich die Spitze in anderen Abständen zur Probe [Kit09]. Im tapping-mode wird der gesamte Abstandsbereich überstrichen.

Die Regelung erfolgt mit konstanter Amplitude. Bei großen Abständen von der Probe schwingt der Cantilever ungestört mit der anregenden Frequenz. Nähert man ihn der Probe in den Bereich der attraktive Wechselwirkungen an, so wirken diese wie eine scheinbare Massenzunahme der Spitze. Die Resonanzfrequenz verschiebt sich deshalb zu kleineren Werten. Um Artefakte zu vermeiden, regt man den Cantilever mit einer Frequenz an, die etwa 5-8% niedriger ist als die Resonanzfrequenz des frei schwingenden Cantilevers.

Kapitel 3

Verwendete Polymere

Der Schwerpunkt der Untersuchung liegt auf bürstenförmigen Polykationen, wie der Polyvinylpyridinium-Bürste (PVP-Bürste) und der Poly-L-Lysin-Bürste (PLL-Bürste). Zum Vergleich wurden auch lineare Polymere untersucht, die kommerziell erhältlich sind.

Poly-2-vinylpyridinium, dessen Strukturformel in Abbildung 3.1 gezeigt ist, verfügt über permanente positive Ladungen am quaternisierten Stickstoff des Pyridinrings. Die Quaternisierung erfolgt mit Ethylbromid, durch unterschiedlich lange Reaktionszeiten lassen sich verschiedene Ladungsgrade einstellen. Poly-L-Lysin ist ein Polypeptid, das ausschließlich aus L-Lysin-Einheiten aufgebaut ist (Strukturformel des linearen und bürstenförmigen Polylysins in Abbildung 3.2). Die Aminogruppen der Seitenketten haben einen pKs-Wert von 10.53 [JJ82], in neutralem pH sind die Seitenketten also vollständig protoniert. Die bürstenförmigen Polymere beider Spezies verfügen über ein methacrylisches Rückgrat, die Seitenketten bestehen aus PVP bzw. PLL. Die Synthesen werden im folgenden kurz beschrieben.

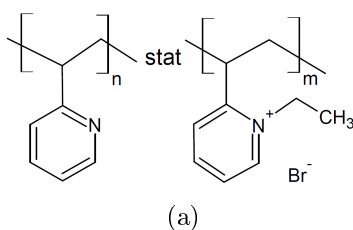


Abbildung 3.1: Strukturformel von partiell quaternisiertem Polyvinylpyridin

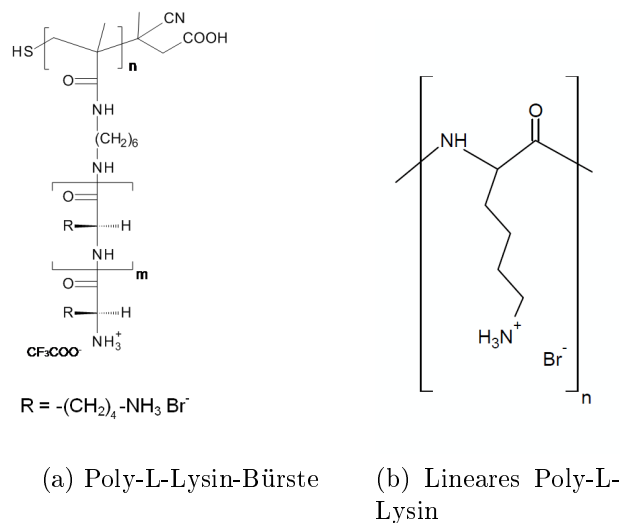


Abbildung 3.2: Strukturformeln der verwendeten Poly-L-Lysine

3.1 Charakterisierung

Die Synthese der PVP-Bürsten wurde von Tim Stephan nach der Makromonomermethode durchgeführt [Ste02]. Sie bestehen aus einem Polymakromonomer mit methacrylischer Hauptkette und 2-Vinylpyridin-Seitenketten des Polymerisationsgrads 26, die mit Ethylbromid quaternisiert wurden. Durch Elementaranalyse wurde ein Quaternisierungsgrad der Vinylpyridineinheiten von 53% bestimmt. Damit beträgt die Molmasse einer positiven Ladungseinheit 307g/mol.

Abbildung 3.3 zeigt den Zimm-Plot der verwendeten PVP-Bürste in 5mM Natriumphosphatpuffer. Das Gewichtsmittel der Molmasse M_w beträgt $9.2 \cdot 10^6$ g/mol, der Trägheitsradius $R_g=91$ nm, der zweite Virialkoeffizient $A_2 = 1.74 \cdot 10^{-8}$ mol \cdot dm³/g² und der hydrodynamische Radius $R_h=52$ nm. Die mittlere Konturlänge der PVP-Bürste beträgt 200nm.

Die Poly-L-Lysin-Bürste wurde von Mike Sahl im Rahmen seiner Dissertation nach der Grafting-from-Methode synthetisiert. Das Polymerrückgrat besteht aus Polymethylmethacrylat, an das dann durch ringöffnende Polymerisation von Leuchs Anhydriden die Seitenketten polymerisiert werden. Angesetzt wurde eine Seitenkettenlänge von 55 Monomereinheiten unter der Annahme einer 100% Propfdichte. Da mit der Grafting-from-Methode die Propfdichte aber immer kleiner 100% ist, sind die Seitenketten im Mittel länger als 55 Einheiten. Eine positive Ladungseinheit hat eine Molmasse von 209g/mol.

In Abbildung 3.4 ist der Zimm-Plot der Polylysine-Bürste in 5mM Phosphatpuffer zu sehen. Die Molmasse beträgt $M_w = 9.7 \cdot 10^6$ g/mol, der Trägheitsradius $R_g = 78$ nm, der

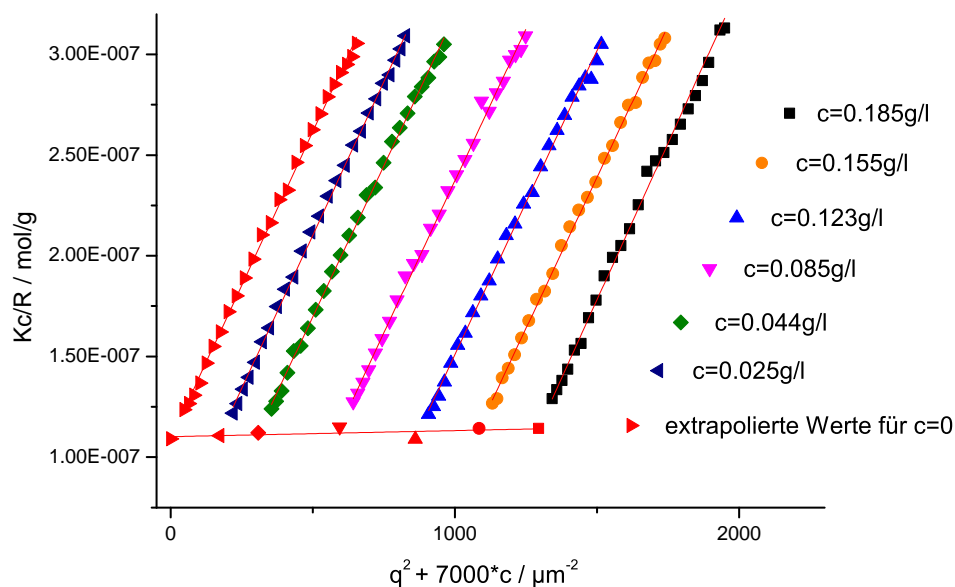


Abbildung 3.3: Zimm-Plot der PVP-Bürste in 5mM Phosphatpuffer. Als Brechungsindexinkrement wurde 0.1776ml/g verwendet.

zweite Virialkoeffizient $A_2 = 2.48 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^3 / \text{g}^2$. Der hydrodynamische Radius in 5mM Phosphatpuffer beträgt 56nm.

Es wurden zwei verschiedene Plasmid-DNAs untersucht. Für Transfektionsexperimente wurde der pEGFP-C3-Vektor (im folgenden GFP-DNA (Green Fluorescent Protein)) verwendet. GFP-DNA kodiert für ein grün fluoreszierendes Protein. Eine erfolgreiche Transfektion kann so sehr einfach durch die grüne Fluoreszenz beobachtet und gemessen werden. GFP-DNA besteht aus 4700 Basenpaaren und hat damit eine Molmasse von $3.1 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$. Für Struktur- und Eigenschaftsuntersuchungen wurde zusätzlich pUC19-DNA, ebenfalls eine Plasmid-DNA, allerdings mit 2686 Basenpaaren und einer Molmasse von $1.7 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$, verwendet. Die Molmasse eines negativen Ladungsäquivalents beträgt 330g/mol.

Tabelle 3.1 stellt die untersuchten Polymere mit ihren Molmassen und Radien zusammen.

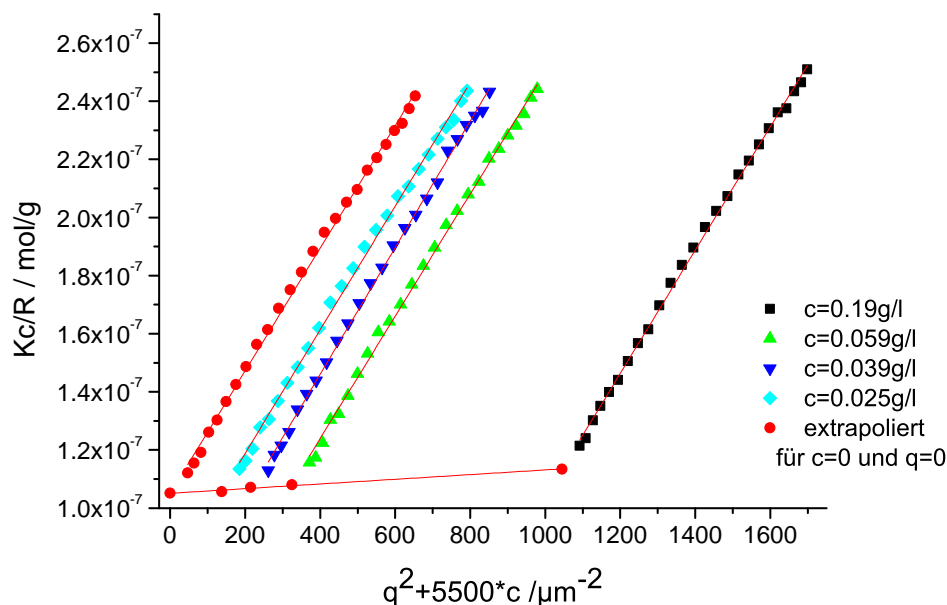


Abbildung 3.4: Zimm-Plot der PLL-Bürste in 5mM Phosphatpuffer. Als Brechungsindexinkrement wurde 0.18ml/g verwendet.

3.2 Toxizitätstest

In diesem Abschnitt wird die Toxizität der verschiedenen Polymere beschrieben. Die Experimente wurden in Kooperation mit der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

3.2.1 Cytotoxizität an PBMEC

Die Cytotoxizität wurde an Schweinehirnendothelzellen (PBMEC: Porcine Brain Microvessel Endothelial Cells) untersucht. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Polykationen und unterschiedliche Inkubationszeiten getestet. Die Anzahl lebender Zellen wurde durch DCF-Färbung (5,6-Dicarboxy-2,7-dichlorofluorescein-diacetat) bestimmt. Die acetylierte Form des Reagenzes fluoresziert nicht bis die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten werden und Oxidation auftritt. Nach Abspaltung der Acetatgruppen wird der Farbstoff deutlich besser in der Zelle gehalten als die Ausgangskomponente [BPD+83]. Die Fluoreszenz kann dann mit einem Photometer gemessen werden und in Verhältnis zu einer Kontrollprobe gesetzt werden. Die Fluoreszenz der Proben wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in einem Platerader ausgelesen und so die Überlebensrate nach 0.5 bis 24 Stunden bestimmt. Untersucht wurden unterschiedliche Konzentrationen an Po-

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Polymere. Molmassen M_w und M_n wurden mit Lichtstreuung bzw. GPC bestimmt, Trägheitsradien R_g und hydrodynamische Radien R_h wurden durch dynamische und statische Lichtstreuung gemessen.

Polymer	M_w / (g/mol)	M_n / (g/mol)	R_g /nm	R_h /nm
lineares Poly-L-Lysin Hydrobromid	326600 (A.d.H)		27	21
Poly-L-Lysin-Bürste Hydrobromid	9.7E6 (LS)	6E6 (GPC)	78 (LS)	56 (LS)
lineares Polyvinylpyridin, 35% quaternisiert mit Ethylbromid *	1.16E6 (GPC)	9.7E5 (GPC)	-	-
Polyvinylpyridin-Bürste, 53% quaternisiert mit Ethylbromid	9.2E6 (LS)	1.5E6 (GPC)	91 (LS)	52 (LS)
pUC19-DNA	1.7E6 (LS)	-	77 (LS)	43 (LS)
GFP-DNA	3.1E6 (Theorie)	-	125 (LS)	94 (LS)

A.d.H.: Angabe des Herstellers

LS: durch Lichtstreuung bestimmt

GPC: mit GPC bestimmt

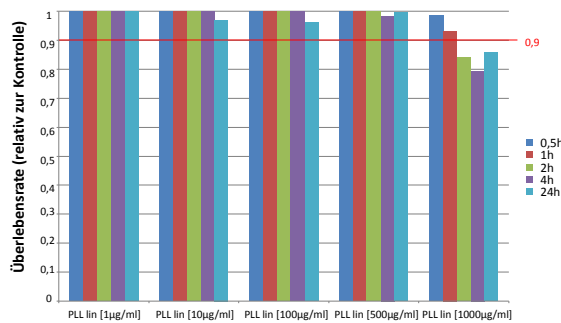
Theorie: theoretisch berechnete Molmasse

* Lineares PVP wurde nur in den Toxizitätstest (Kapitel 3.2) verwendet.

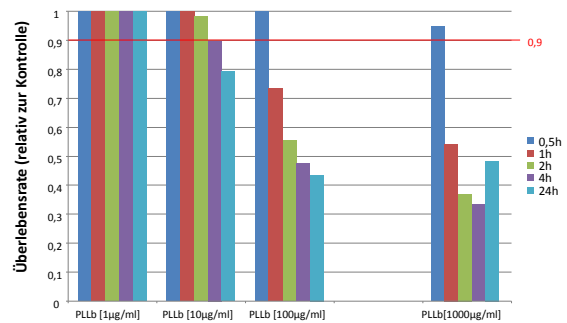
lymeren. Pro well wurden 100 μ l Polymerlösung aufgetragen.

Wie in Abbildung 3.5a zu sehen, ist lineares Polylysin bis zu hohen Konzentrationen von 500 μ g/ml nicht toxisch, in einer Konzentration von 1000 μ g/ml beträgt die Vitalität auch nach 24 Stunden noch über 80% im Vergleich zur Kontrolle. Die Polylysin-Bürste (Abbildung 3.5b) ist im Vergleich zum linearen Analogon in hohen Konzentrationen über 100 μ g/ml toxischer, Überlebensraten liegen bei 40 bis 50% nach 24 Stunden. In kleinen Konzentrationen (1 und 10 μ g/ml) ist jedoch keine hohe Sterbensrate zu beobachten. Die Vitalitätsrate der PBMECs liegt bei Zugabe von PVP-Bürste in kleinen Konzentrationen (1 und 10 μ g/ml) bei 100%, je höher die Konzentration an Polykation wird und je länger die Inkubationszeit, desto kleiner wird die Vitalitätsrate, sie sinkt auf 40 bis 50% nach 24 Stunden Inkubationszeit (siehe Abbildung 3.6b). Das lineare Polyvinylpyridin mit einem Quaternisierungsgrad von 33% (Abbildung 3.6a) ist im Gegensatz dazu in allen Konzentrationen und über alle beobachteten Zeiten nicht toxisch.

Nach 24 Stunden kann in manchen Fällen eine Erhöhung der Überlebensrate beobachtet werden. Dies ist durch die Messmethode zu erklären: Die Fluoreszenz, die als Maß für lebende Zellen gilt, tritt nur dann auf, wenn die Zellen den Farbstoff deacetylieren und oxidieren. Zellen, zu denen die Komplexe gegeben wurden, sind unter Umständen geschädigt

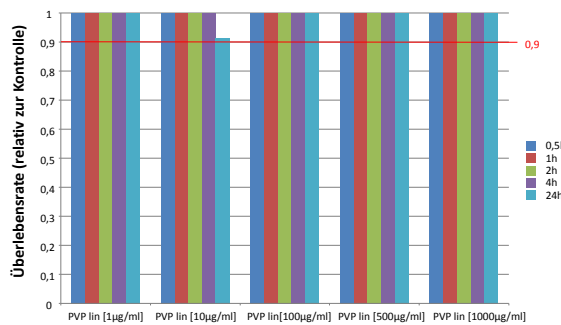


(a) Lineares PLL

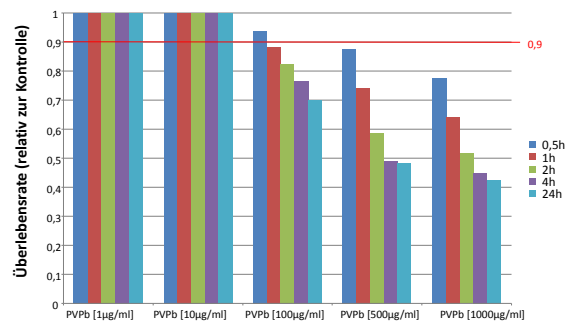


(b) PLL-Bürste

Abbildung 3.5: Cytotoxizität von linearem und büstenförmigem Polylysin an PBMEC



(a) Lineares PVP



(b) PVP-Bürste

Abbildung 3.6: Cytotoxizität von linearem und büstenförmigem quaternisiertem Polyvinylpyridin an PBMEC

bzw. stehen unter dem Einfluss der Komplexzugabe, sodass die Umsetzung des Farbstoffs länger dauert als in völlig intakten Zellen. Während nach kurzen Zeiten im Vergleich zur Kontrolle also wenig fluoreszierendes Material gebildet wurde, kann die Menge an Fluoreszenzmarker nach 24 Stunden höher sein als nach 4 Stunden, da mehr Zeit zur Verfügung stand.

Die Beobachtung, dass die linearen Polykationen weniger toxisch sind als die büstenförmigen, kann auch mit der Molmasse der Polymere und deren Ladungsdichte zusammenhängen. Für Polyethylenimin wurde gezeigt, dass die Toxizität bei hohen Molmassen höher ist als bei niedrigen [FBL+99]. Choksakulnimitr et al. berichten von erhöhter Toxizität der Polylysine, je länger das Polymer (Vergleich von $M_w = 8000$ und $M_w = 39800$ g/mol)[CMT+95] Morgan et al. finden ein ähnliches Verhalten für Polylysin im Molmassenbereich zwischen 40000 und 120000g/mol an humanen vaskulären Endothelzellen [MCP88]. Kleinere Polylysine waren im untersuchten Konzentrationsbereich (0-800nM) nicht toxisch. Die Autoren schlussfolgern, dass die hohe Ladungsdichte, die bei langen Polymeren vorliegt, für die hohe Toxizität verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit zeigt das verwendete Polylysin mit einer vergleichsweise hohen Molmasse von 326600g/mol keine Toxizität an den Schweinehirnendothelzellen, die Polylysin-Bürste ist in hohen Dosen toxisch. Eventuell ist dafür auch die sehr hohe, chemische Ladungsdichte verantwortlich.

Die Toxizitätstests belegen, dass alle Polymere bis zu einer Konzentration von $10\mu\text{g/ml}$ keine Zellschäden an den Schweinehirnendothelzellen verursachen. Generell sind die büstenförmigen Polykationen toxischer als ihre linearen Analoga.

3.2.2 Toxizität an dendritischen Zellen

Die Toxizität an dendritischen Zellen wurden durch *in vitro* Pulsing mit $20\mu\text{g}$ Polymer in Phosphatpuffer an $3 \cdot 10^6$ Zellen für 30min getestet. Die Zellen wurden danach gewaschen und 36 Stunden inkubiert. Die Tests wurden in Duplikaten durchgeführt. Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse des Tests. Nach 18 Stunden Inkubation wurde unter dem Mikroskop massiver Zelltod beobachtet. Die besten Ergebnisse liefert die PVP-Bürste mit einer Vitalitätsrate von ca. 40%, die anderen Polymere sind deutlich toxischer, teilweise liegt die Überlebensrate nur bei 10%.

3.2.3 Zusammenfassung

Die Untersuchung der Cytotoxizität brachte folgende Ergebnisse:

Tabelle 3.2: Toxizität der verschiedenen Polykationen an dendritischen Zellen. Angegeben ist die Menge lebender Zellen in %, die Tests wurden in Duplikaten durchgeführt.

Polykation	% vitale Zellen (36h), Duplikate	
Poly-L-Lysin, linear	8.4	18.2
Poly-L-Lysin-Bürste	11.2	24.6
Polyvinylpyridin, linear	9.9	26.0
Polyvinylpyridin-Bürste	39.0	42.8
Kontrolle (Phosphatpuffer)	78.2	76.6

- Die Toxizität an dendritischen Zellen ist deutlich höher als an Endothelzellen.
- In dendritischen Zellen sind die Überlebensraten sehr klein, eine Ausnahme bilden die PVP-Bürsten mit ca. 40% vitalen Zellen. Da die Abweichung der Wiederholungsmessungen sehr groß ist, ist kein klarer Trend zwischen Bürstenpolymeren und linearen Analoga zu erkennen.
- An PBMECs liegen die Überlebensraten mit linearen Polymeren nahezu bei 100%.
- Bürstenpolymere sind für PBMECs in hohen Konzentration toxischer als die linearen Analoga. Bei ausreichend kleinen Konzentrationen ($c < 100\mu\text{g/ml}$) können Überlebensraten von annähernd 100% gesichert werden.

Kapitel 4

Komplexbildung und -charakterisierung

Im folgenden Kapitel werden die Herstellung und Charakterisierung der Polykation-DNA-Komplexe beschrieben. Es ist aufgeteilt in drei Unterkapitel, zunächst werden die Komplexe mit PVP-Bürsten und dann die Polylysin-Komplexe besprochen. Die Herstellung der Komplexe erfolgt entweder durch Titration der beiden Komponenten zueinander oder mit Hilfe eines Mikromischverfahrens (Kugelmischer), das schnelles turbulentes Mischen garantiert. Die Komplexe werden mit Hilfe der statischen und dynamischen Lichtstreuung sowie durch AFM-Aufnahmen in Lösung charakterisiert. Neben der Herstellung in niedrigen Salzkonzentrationen (5mM Phosphatpuffer) wird die Komplexbildung in physiologischem Salzgehalt (150mM/l) und bei sehr hohen Molaritäten (1mol/l) untersucht. Im dritten Unterkapitel wird die Komplexbildung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Verdrängung verfolgt. Die Methode wird erklärt und deren Grenzen, vor allem bei hohen Salzkonzentrationen in Lösung, aufgezeigt. Die Zusammensetzung der Komplexe kann entweder als Gewichtsbruch an DNA, $w(\text{DNA})$, oder als Verhältnis der positiven zu negativen Ladungen +/- ausgedrückt werden. Im Anhang B befinden sich Graphen und Tabellen zur Umrechnung.

4.1 Komplexe aus quaternisierter PVP-Bürste und DNA

Bürstenförmiges Polyvinylpyridin, dessen Pyridingruppen zu 53% mit Ethylbromid quaternisiert sind, verfügt über permanente positive Ladungen. Es vermag deshalb negativ geladene DNA zu komplexieren, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

4.1.1 Vergleich der Herstellungsmethode:

Titration vs. Stopped-Flow-Mikromischer

Die Komplexe aus PVP-Bürste und pUC19-DNA wurden auf verschiedene Weise präpariert. Entweder folgend der Vorschrift von Störkle durch Zutropfen der Unterschusskomponente zur Überschusskomponente [SDH⁺07] oder durch Mischung der beiden Komponenten mit Hilfe eines Stopped-Flow-Mikromischers (Kugelmischer), der turbulent mischt.

Komplexierung in 5mM Phosphatpuffer Zunächst wurde die Komplexierung in 5mM Phosphatpuffer untersucht. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, bleiben die hydrodynamischen Radien der Komplexe bei sequentieller Titration der Komponenten mit zunehmendem Gewichtsbruch an DNA, $w(\text{DNA})$, zunächst annähernd konstant in einem Größenbereich unter 75nm. Bei weiterer Zugabe von DNA wachsen die Komplexe bis sie ein Maximum bei $w(\text{DNA}) > 0.28$ erreichen. Im Bereich zwischen $0.28 < w(\text{DNA}) < 0.55$ aggregieren die Komplexe so stark (grau schraffiert), dass sie teilweise präzipitieren. Im Überschuss des Polykations sind die Komplexradien wieder kleiner und im Größenbereich der unkomplexierten Bürste. Die mit dem Mischer hergestellten Komplexe sind im Vergleich zu den durch Titration hergestellten kleiner. Die „Mischungslücke“ (schwarz gestreift), in der die Komplexgrößen extrem ansteigen, ist kleiner. Sie liegt zwischen $w(\text{DNA}) = 0.35$ und 0.45 . Bei $w(\text{DNA}) = 0.5$ sind die Komplexradien bereits wieder kleiner als 100nm. (vgl. hierzu auch die kinetische Untersuchung der Komplexbildung in Kapitel 7 und [KFS09]). Störkle zeigt durch Gelelektrophoreseexperimente, dass ab einem Gewichtsbruch an DNA von $w(\text{DNA}) = 0.53$, entsprechend einem Ladungsverhältnis von $+/- = 0.95$ keine freie DNA in der Komplexlösung aus PVP-Bürste und pUC19-DNA in 5mM Phosphatpuffer vorhanden ist. Bei höheren Werten von $w(\text{DNA})$ steigt der Gewichtsbruch freier DNA $w(\text{DNA}, \text{frei})$ linear mit $w(\text{DNA})$ an [Sto07].

Komplexierung in physiologischem Salzgehalt Für eine Anwendung der Partikel in Zellversuchen, muss deren Stabilität auch in physiologischem Salzgehalt untersucht und

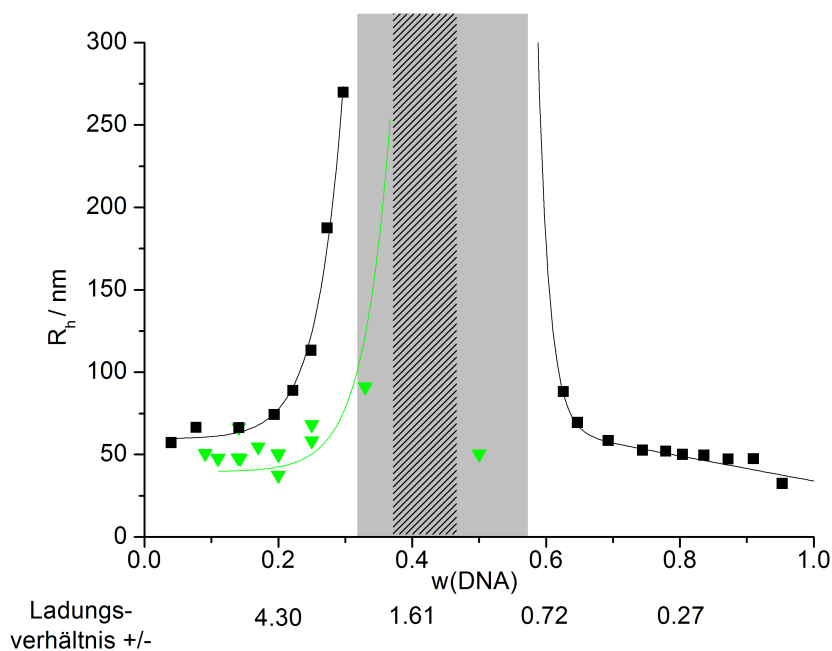


Abbildung 4.1: Vergleich der Komplex-Radien in 5mM Phosphatpuffer bei Herstellung in Kugelmischer (▼) und durch sequentielle Titration (■), $c(\text{PVP}) = c(\text{DNA}) = 10\text{mg/l}$. Die durchgezogenen Linien sind lediglich eine Hilfe zur besseren Lesbarkeit. Die Mischungslücke für die Komplexe, die titriert wurden, ist grau hinterlegt, für die mit dem Mischer hergestellten Komplexe ist sie schwarz gestreift.

sichergestellt sein. Dazu wurden die Komponenten PVP-Bürste und pUC19-DNA jeweils in 5mM Phosphatpuffer mit zusätzlich 150mM NaCl gelöst. Die Komplexbildung wurde wieder durch Titration per Hand oder mit dem Kugelmischer durchgeführt.

Die hydrodynamischen Radien der Komplexe als Funktion des Gewichtsbruchs DNA sind in Abbildung 4.2 aufgetragen.

Wie zu erkennen ist, sind auch in physiologischem Salzgehalt die mit dem Mischer hergestellten Komplexe kleiner im Radius als die von Hand titrierten. Allgemein gilt, je kleiner die Konzentration der Lösung, desto kleiner sind auch die entstehenden Komplexe. Die Radien in 150mM NaCl sind vergleichbar mit denen in 5mM Phosphatpuffer. Der kritische Punkt, an dem die Radien sehr große Werte annehmen und die Lösung instabil wird, liegt bei $w(\text{DNA})=0.22$, sowohl für die titrierten Komplexe als auch für die turbulent gemischten. Er ist also kleiner als bei den Komplexen in 5mM Phosphatpuffer ohne NaCl-Zusatz.

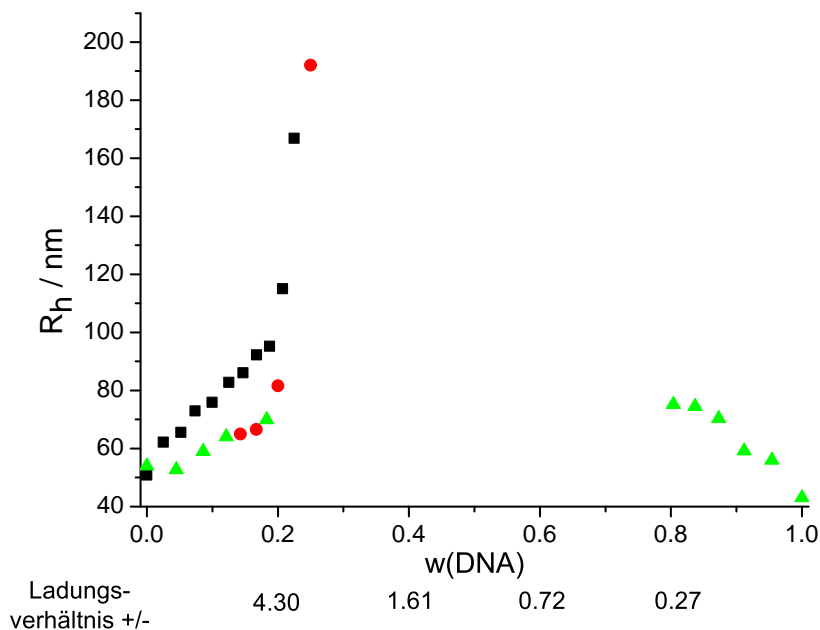


Abbildung 4.2: Hydrodynamische Radien der Komplexe aus PVP-Bürste und DNA in 150mM NaCl. Vergleich der Herstellung durch sequentielle Titration mit $c(\text{PVP})=c(\text{DNA})=10\text{mg/l}$ (■) und $c(\text{PVP})=c(\text{DNA})=2.5\text{mg/l}$ (▲) mit der Herstellung im Kugelmischer (●)

Alle Versuche zeigen, dass die durch turbulente Mischung präparierten Komplexe kleinere Radien haben als die durch Titration hergestellten. Ebenso ist der Bereich, in dem die Komplexe sehr stark aggregieren, erheblich enger.

4.1.2 NaCl-Zugabe zu Komplexen

Die vorherigen Absätze zeigen, dass PVP-pUC19-Komplexe in physiologischem Salzgehalt mit zunehmendem $w(\text{DNA})$ schneller aggregieren als in 5mM Phosphatpuffer. Im folgenden wird deshalb der Komplex ($c(\text{DNA}) = 10\text{mg/l}$) zunächst in Lösung niedriger Molarität hergestellt und dann durch Zugabe hochkonzentrierter NaCl-Lösung auf physiologischen Salzgehalt bzw. noch höhere Salzkonzentrationen eingestellt. Verschiedene Effekte, abhängig vom Ladungsverhältnis der Komplexe, werden beobachtet.

- $w(\text{DNA}) < 0.2$

Komplexe mit Gewichtsbrüchen $w(\text{DNA}) < 0.2$ (dies entspricht einem Ladungsverhältnis von $+/- > 4.3$) sind in der Lösung stabil, d.h. sie aggregieren nicht. Es kann bei diesen Komplexen keine signifikante Änderung des Radius festgestellt werden.

- $w(\text{DNA}) > 0.2$

Bei Anteilen an DNA größer 0.2, aggregieren die Komplexe stark. Dies entspricht den Beobachtungen aus Abschnitt 4.1.1, Absatz *Komplexbildung in physiologischem Salzgehalt*, in dem die Komponenten einzeln in 150mM NaCl gelöst und dann gemischt werden. Komplexe, die in 5mM Phosphatpuffer noch stabil in Lösung bleiben (Radien $< 200\text{nm}$), aggregieren in höherem Salz oder sind bereits unlöslich. Dies wurde insbesondere bei einem Verhältnis von $w(\text{DNA}) = 0.286$ (± 2.7) untersucht (Abbildung 4.3). Bei NaCl-Zugabe aggregiert die Probe zunächst stark, ab einem Salzgehalt von 0.5mol NaCl nimmt der hydrodynamische Radius dann wieder ab. Die vorher auftretenden Aggregate lösen sich wieder auf. Die zunächst stärker auftretende Aggregation bei höheren Salzgehalten kann mit der Abnahme der stabilisierenden positiv geladenen Schale des Komplexes erklärt werden [Sch04]. Je mehr Salz in der Lösung, desto mehr Gegenionen sind auf das Polykation kondensiert und desto schwächer ist die Ladung des Komplexes. Die Repulsion wird verringert und der Komplex fällt aus. Die Abnahme der Komplexradien bei sehr hohen Salzgehalten ist mit einem Auflösen der Komplexe an sich zu erklären, wie auch in den Freisetzungsexperimenten in Kapitel 5.1 gezeigt wird. Erklären lässt sich dies über eine Entropiebetrachtung. In niedrigem Salzgehalt sind die Komplexe hydrophob aggregiert. Bei ihrer Bildung wird Hydratwasser frei und die Gegenionen werden entlassen, deshalb vergrößert sich die Entropie. Bei hohem Salzgehalt sind zum einen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten abgeschirmt, da alle Ladungen durch Gegenionen des Salzes ausgeglichen sind. Zum anderen, und dieser Teil überwiegt deutlich, vergrößert sich die Entropie durch Komplexbildung nicht mehr wesentlich. Bei hohen Salzkonzentrationen sind die Gegenionen nicht mehr auf der Polyelektrolytkette lokalisiert. Diffundiert ein Gegenion von der Kette, lagert sich direkt ein anderes an, da die Konzentration der Ionen in der Lösung sehr hoch und damit die Debye-Länge sehr klein ist (vergleiche Definition in 2.4). Die Komplexbildung bringt somit entropisch keinen Vorteil gegenüber den Einzelpolyelektrolyten in Lösung.

4.1.3 Vergleich mit Literatur

Kabanov et al. haben die Komplexbildung von DNA mit linearem, mit Ethylbromid quaternisiertem Poly-(4-vinylpyridin) untersucht [KAM+93] [KAC+91]. Der Polymerisationsgrad der verwendeten Polymere betrug 18, 200, 400 und 500, der Quaternisierungsgrad wurde

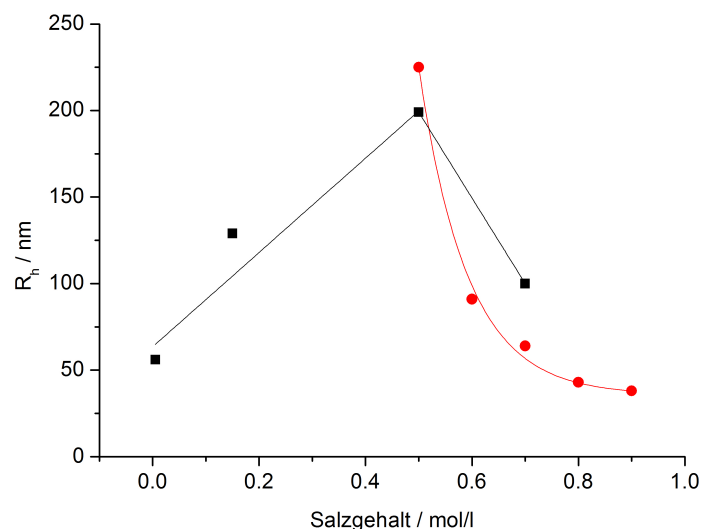


Abbildung 4.3: Entwicklung der hydrodynamischen Radien bei steigender Salzkonzentration in der Lösung für Komplexe aus PVP-Bürste und pUC19-DNA ($c(\text{PVP}) = 5\text{mg/l}$, $c(\text{DNA}) = 2\text{mg/l}$). Die Komplexe wurden in 5mM Phosphatpuffer (■) bzw. in 0.5mol NaCl (●) im Ladungsverhältnis $\pm = 2.7$ hergestellt und dann durch Zugabe hochkonzentrierter NaCl-Lösung aufgelöst. Die chemische Ionenkonzentration auf den Polyelektrolyten beträgt $22\mu\text{mol/l}$. Die durchgezogenen Linien sind lediglich eine Hilfe zur Lesbarkeit.

mit IR-Spektroskopie auf 90-95% bestimmt. Die Komplexe wurden durch einfaches Mischen (Zugabe der Polykationenlösung zur DNA-Lösung in Phosphatpuffer) hergestellt. Bei Ladungsverhältnissen $\pm < 0.5$ bleiben diese in Lösung, die kurzen PVP-Ketten sind gleichmäßig über den DNA-Strang verteilt. Bei höherem PVP-Gehalt ($\pm = 0.5$ bis 1), präzipitieren die Komplexe. Überschuss an Polykation ergibt wieder lösliche Komplexe. Die Ergebnisse stimmen qualitativ mit den in dieser Arbeit erhaltenen Beobachtungen überein. Die von Kabanov verwendeten Polymere sind jedoch deutlich kleiner in der Molmasse als die hier untersuchte PVP-Bürste, außerdem wurde 4-Vinylpyridin statt 2-Vinylpyridin eingesetzt. Die Komplexierung von Poly-(2-Vinylpyridinium) mit DNA wurde bisher nur mit Blockcopolymeren aus Polystyrol-*b*-Poly-(2-Vinylpyridin) quaternisiert mit Methylidiod beschrieben [TP08]. Die Komplexe wurden durch Zutropfen der DNA zur Copolymer-Lösung hergestellt. Präzipitation tritt bei \pm -Verhältnissen um Ladungsstöchiometrie auf. In hohen Salzkonzentrationen von 0.5M finden die Autoren ebenfalls eine zumindest partielle Auflösung der Komplexe, welche sie mit dem Abschirmen der Ladungen auf den Polyelektrolyten durch das niedermolekulare Salz erklären.

4.1.4 Zusammenfassung

DNA wurde mit Polyvinylpyridin-Bürstenpolymeren komplexiert. Variiert wurde neben dem Ladungsverhältnis +/- bzw. Gewichtsbruch an DNA, $w(\text{DNA})$, auch die Herstellungsmethode (sequentielle Titration und Mikromischer), sowie der Salzgehalt der Lösung.

- Stabile Komplexe sind in 5mM Phosphatpuffer für $w(\text{DNA}) < 0.28$ und $w(\text{DNA}) > 0.6$ (entsprechend +/- < 2.8 bzw. +/- > 0.7) zu erhalten. Bei Gewichtsbrüchen zwischen diese Werten kommt es zur Aggregation bzw. Sedimentation (Mischungslücke).
- Die Herstellung im Kugelmischer führt zu einer engeren Mischungslücke, die Komplexe sind bis $w(\text{DNA}) = 0.35$ bzw. ab $w(\text{DNA}) = 0.45$ stabil, dies entspricht +/- $= 2.0$ bzw. +/- $= 1.3$. Die Komplexradien sind generell kleiner als bei sequentieller Titration.
- In 150mM NaCl verschiebt sich der Grenze der Mischungslücke zu $w(\text{DNA}) = 0.22$ (+/- $= 3.8$), da die Komplexstabilisierung durch elektrostatische Abstoßung der gleichgeladenen Komplexe abnimmt. Die Komplexradien sind vergleichbar mit den Werten in 5mM Phosphatpuffer.
- Zugabe von NaCl zu Komplexen, die in 5mM Phosphatpuffer stabil sind, führt zunächst zu einer Aggregation der Komplexe durch Verringerung der elektrostatischen Stabilisierung. Ab einem Salzgehalt von 0.5mol/l kommt es zu einer Abnahme der gemessenen Radien, da sich die Komplexe auflösen.

4.2 Komplexe aus Polylysin und DNA

Poly-L-Lysin (PLL) war eines der ersten Polymere, die zum Gentransfer verwendet wurden [WW87]. Da es als Wiederholungseinheit die Aminosäure Lysin besitzt, ist es prinzipiell biologisch abbaubar. Lysine kommen im Histon vor, das die DNA im Zellkern kondensiert. Es wurde gezeigt, dass DNA-Kondensierung und Transfektionseffizienz bei hohen Molmassen der Polylysine zunehmen, gleichzeitig aber auch eine unerwünschte, hohe Cytotoxizität zu verzeichnen ist [LZW⁺06]. Ohsaki et al. beschreiben die Verwendung von dendritischem Polylysin der 6. Generation, das hohe Transfektionseffizienzen bei gleichzeitig niedriger Cytotoxizität aufweist [OOW⁺02].

Im folgenden wird die Komplexbildung aus Poly-L-Lysin (linear und in Bürstenform) und unterschiedlichen Plasmid-DNAs beschrieben. Für die Transfektionsexperimente ist die Verwendung von GFP-DNA nötig, da diese für grün fluoreszierende Proteine kodiert und die Transfektionseffizienz so einfach ermittelt werden kann. Die Stabilität der Komplexe wird zudem mit pUC19-DNA untersucht.

4.2.1 Komplexe mit Polylysin-Bürste

Das Komplexbildungsvermögen der PLL-Bürste wird mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht. Im Gegensatz zu freier DNA läuft komplexierte DNA im Gel nicht zur Anode. Je schwächer die Bande der freien DNA, desto mehr DNA wurde komplexiert. In Abbildung 4.4 wurde die Komplexbildung bei verschiedenen Ladungsverhältnissen $+/-$ durchgeführt. Es zeigt sich, dass die verwendete pUC19-DNA ab einem Verhältnis $+/- = 2$ (Spalte 7) vollständig gebunden wird. Die Menge freier DNA steigt linear mit dem Gewichtsbruch an DNA, $w(\text{DNA})$ (siehe Abbildung 4.4b).

Zur vollständigen Immobilisierung der DNA ist ein Überschuss Polylysin-Bürste (bezogen auf die Ladungen) nötig. Bei der PVP-Bürste reicht dazu bereits eine stöchiometrische Ladungsmenge aus. Lineares Polylysin, das in Kapitel 4.2.2 untersucht wird, kann ebenfalls mit nahezu stöchiometrischen Mengen Ladungen die DNA vollständig komplexieren.

Komplexe aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA wurden durch Titration der DNA zum Polykation hergestellt, wie im experimentellen Teil detailliert beschrieben wird. Die Ergebnisse der Lichtstreuungsmessung (R_h , R_g und M_w , sowie R_g/R_h) sind in Abbildung 4.5 als Funktion des Gewichtsbruchs an DNA aufgetragen. In 5mM Phosphatpuffer liegen die hydrodynamischen Radien im stabilen Bereich zwischen 40 und 60nm, die Trägheitsradien im Bereich von 50 bis 70nm. In physiologischem Salzgehalt sind die Komplexe bei allen Zu-

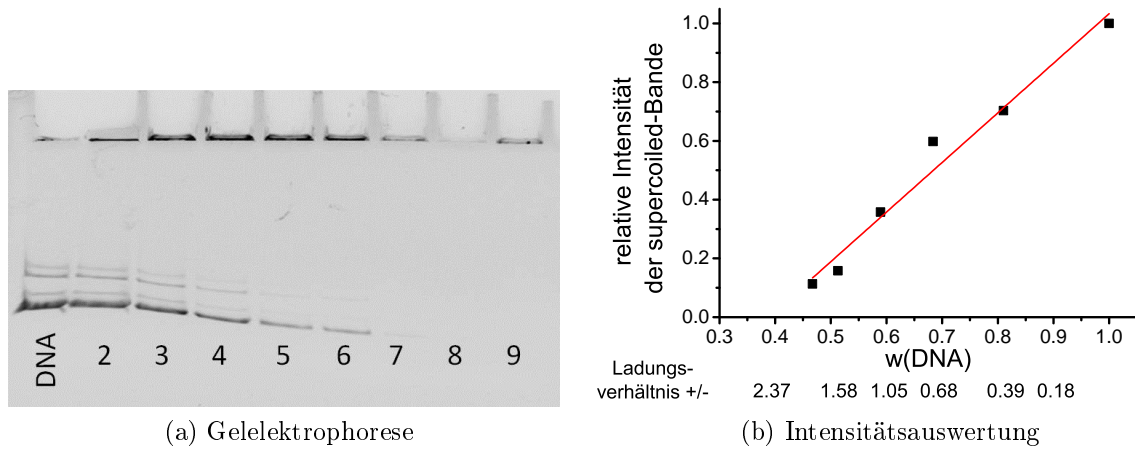


Abbildung 4.4: Komplexierung von pUC19-DNA mit PLL-Bürste in verschiedenen +/- Verhältnissen.

Zum Gelbild 4.4: Spalte DNA: reine DNA, Spalte 2: +/- = 0.37, Spalte 3: +/- = 0.73, Spalte 4: +/- = 1.1, Spalte 5: +/- = 1.5, Spalte 6: +/- = 1.8, Spalte 7: +/- = 2.2, Spalte 8: +/- = 2.9, Spalte 9: +/- = 5.9

In der rechten Abbildung ist die quantitative Auswertung der Intensität der supercoiled-DNA-Bande gegen $w(\text{DNA})$ und das Ladungsverhältnis +/- aufgetragen. Der lineare Fit ist $I = -0.66 + 1.69 \cdot w(\text{DNA})$ bzw. $I = 0.88 - 0.45 \cdot \text{Ladungsverhältnis}$.

sammensetzungen größer im Radius ($R_h = 60\text{-}80\text{nm}$, $R_g = 70\text{-}100\text{nm}$) und in der Molmasse. Der kritische Punkt, an dem die Komplexgrößen rapide zunehmen ist in höherem Salzgehalt leicht zu kleineren Werten von $w(\text{DNA})$ verschoben ($w(\text{DNA}) = 0.35$ bzw. $w(\text{DNA}) = 0.3$ für 5mM bzw. 150mM Salzgehalt). Das ρ -Verhältnis R_g/R_h nimmt mit zunehmendem $w(\text{DNA})$ von 1.4 auf Werte um 1.0 ab. Die Komplexe verfügen also über eine kugelförmige Gestalt und übernehmen nicht die wurmförmige Topologie der Bürstenpolymere. Da die Komplexbildung kinetisch kontrolliert verläuft, ist eine solch ungeordnete Struktur auch nicht überraschend.

Einzelne Komplexzusammensetzungen wurden auch über einen längeren Zeitraum beobachtet, um sicherzustellen, dass diese Komplexe in einer möglichen Anwendung auch länger als eine Stunde in Lösung stabil sind und Aufschluss über Alterungsphänomene zu erhalten. Dazu wurden die Komponenten in niedrigen Konzentrationen ($c(\text{DNA}) = 4\text{mg/l}$ und $c(\text{PLL-Bürste}) = 10\text{mg/l}$) im Volumenverhältnis 1:1 in 5mM Phosphatpuffer gemischt. Dies entspricht $w(\text{DNA}) = 0.286$ bzw. +/- = 3.95. Die Komplexe haben einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 45\text{nm}$. Nach 24 Stunden sind die Komplexe nicht aggregiert ($R_h = 46\text{nm}$). Bringt man die Komplexlösung durch Zugabe gesättigter NaCl-Lösung auf

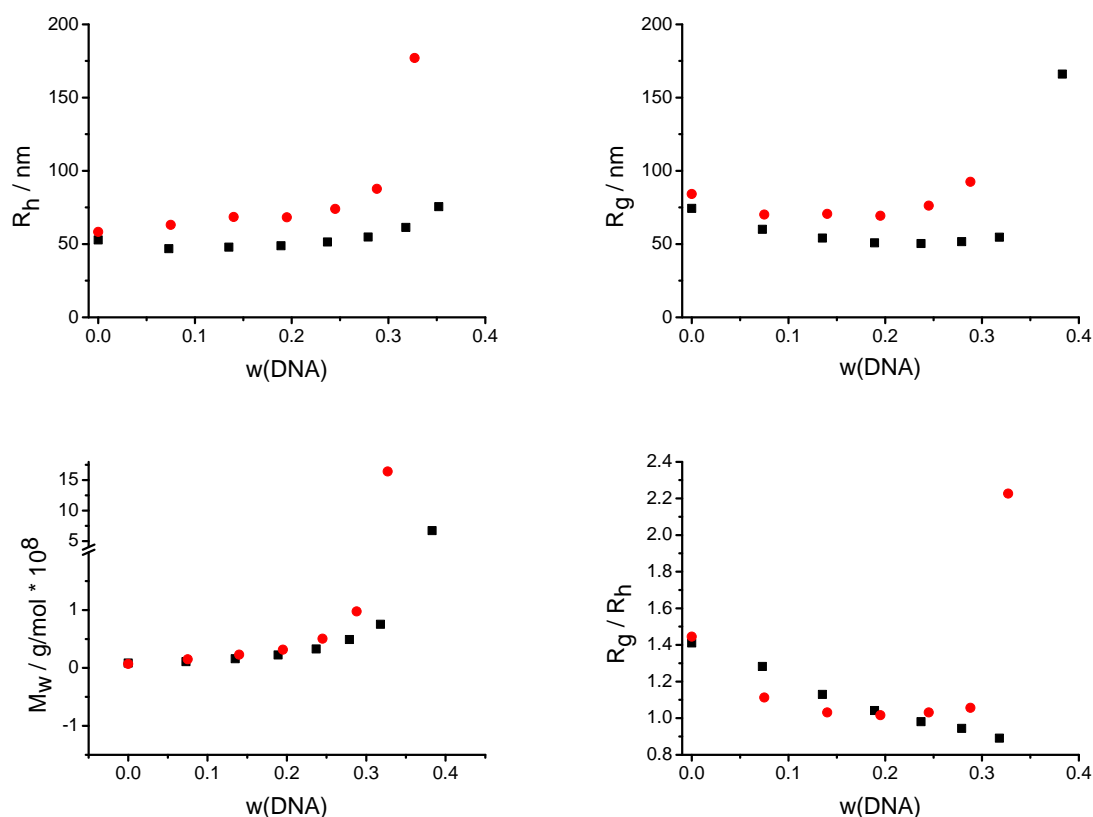


Abbildung 4.5: Komplexbildung aus Polylysinbürste und pUC19-DNA durch Titration in unterschiedlichen Salzgehalten (5mM NaPO ■ und 150mM NaCl ●). Die Konzentrationen der Ausgangskomponenten betragen jeweils 10mg/l. Aufgetragen sind die Radien (R_g und R_h) und Molmassen sowie das Verhältnis R_g/R_h der entstehenden Komplexe gegen den Gewichtsbruch an DNA in der Lösung.

physiologischen Salzgehalt von 150mM, erhöht sich der hydrodynamische Radius etwas auf $R_h = 54$ nm. Dieser Wert ändert sich auch nach 16 Stunden Inkubation bei 20°C nicht.

Für eine Anwendung als Transfektionsagenzien muss in Zellexperimenten die Green Fluorescent Protein DNA (GFP-DNA) zur Komplexbildung verwendet werden. Es wurden verschiedene Verhältnisse von Polymer zu GFP-DNA getestet, Polylysin-Bürste:GFP-DNA = 80:40 und 120:40 (jeweils m/m). Beide Komplexe waren stabil, die Radien betragen $R_h = 77$ nm und $R_g = 88$ nm für PLL-Bürste:GFP-DNA = 80:40 ($w(\text{DNA}) = 0.333$ bzw. ± 4.74) bzw. $R_h = 89$ nm und $R_g = 107$ nm für PLL-Bürste:GFP-DNA = 120:40 ($w(\text{DNA}) = 0.25$ bzw. ± 4.74). Die Konzentration der DNA betrug 40mg/l, das Polylysin wurde in 80mg/l und 120mg/l angesetzt. Die Komplexmischungen wurden jeweils im Volumenverhältnis 1:1 gemischt (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Bestimmung der Komplexradien (R_g und R_h für verschiedene Komplexe aus Polylysin-Bürste und GFP-DNA. Variiert wurde das Massenverhältnis der Komponenten $m:m$, der entsprechende Gewichtsbruch $w(\text{DNA})$ ist ebenfalls berechnet.

Komplex	Verhältnis $m:m$	$w(\text{DNA})$	+/-	R_g/nm	R_h/nm
PLL-Bürste-GFP	80:40	0.33	3.16	88	77
PLL-Bürste-GFP	120:40	0.25	4.74	107	89

Einfluss der Polylysin-Konformation auf die Komplexbildung

Polylysin kann abhängig von den gewählten Bedingungen in Lösung als Knäuel vorliegen oder eine Helix bilden. Durch Zugabe von 0.5mol Lithiumperchlorat kann die Helixbildung induziert werden. Die Helix bildet sich auch in $\text{pH} = 7$, bei dem alle Aminogruppen protoniert sind. Der stabilisierende Effekt der Perchlorat-Ionen überwiegt also gegenüber der Destabilisierung durch elektrostatische Abstoßung [PCTB72]. In einer Lösung gleicher Molarität Natriumchlorid liegt lineares Polylysin als Knäuel vor. Auch die Seitenketten der Polylysinbürste können als Helix oder Knäuel vorliegen. Der Radius der Bürste verkleinert sich bei der Helixbildung der Seitenketten, eine genaue Strukturaufklärung wird derzeit durchgeführt. Der Einfluss der Konformation auf die Komplexbildung soll im folgenden überprüft werden. Dazu werden die Polylysinbürste und die DNA getrennt voneinander in jeweils 0.5mol LiClO_4 bzw. 0.5mol NaCl gelöst und dann gemischt. Die Konzentration der Ausgangskomponenten beträgt 10mg/l. Die Radien (R_g und R_h) sowie die Molmasse der entstehenden Partikel sind in Abbildung 4.6 gegen den Gewichtsbruch DNA aufgetragen. Zur Auswertung der statischen Lichtstreuung wurde ein Brechungsindexinkrement von 0.18mg/l verwendet. Wie zu erkennen, nehmen die Radien und die Molmasse in LiClO_4 -Lösung mit steigendem $w(\text{DNA})$ schneller zu als in NaCl -Lösung. In NaCl sind die Komplexe bis zu $w(\text{DNA}) = 0.4$ stabil, während sie in LiClO_4 -Lösung schon ab einem Gewichtsbruch an DNA von 0.2 stark aggregieren. Dieses Verhalten ist damit zu erklären, dass helikales im Vergleich zu knäueförmigem Polylysin deutlich hydrophober ist. Die Helix bildet sich durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Ammoniumgruppen (in $\text{pH} = 7$ sind die Aminogruppen des Lysins vollständig protoniert) und den Carbonylgruppen. Durch die Komplexbildung mit DNA werden weitere Ladungen ausgeglichen, die Komplexe sind noch hydrophober und aggregieren deutlich schneller als in NaCl -Lösung der gleichen Ionenstärke. Die ρ -Verhältnisse von 1 zeigen wiederum die kugelförmige Gestalt der Komplexe.

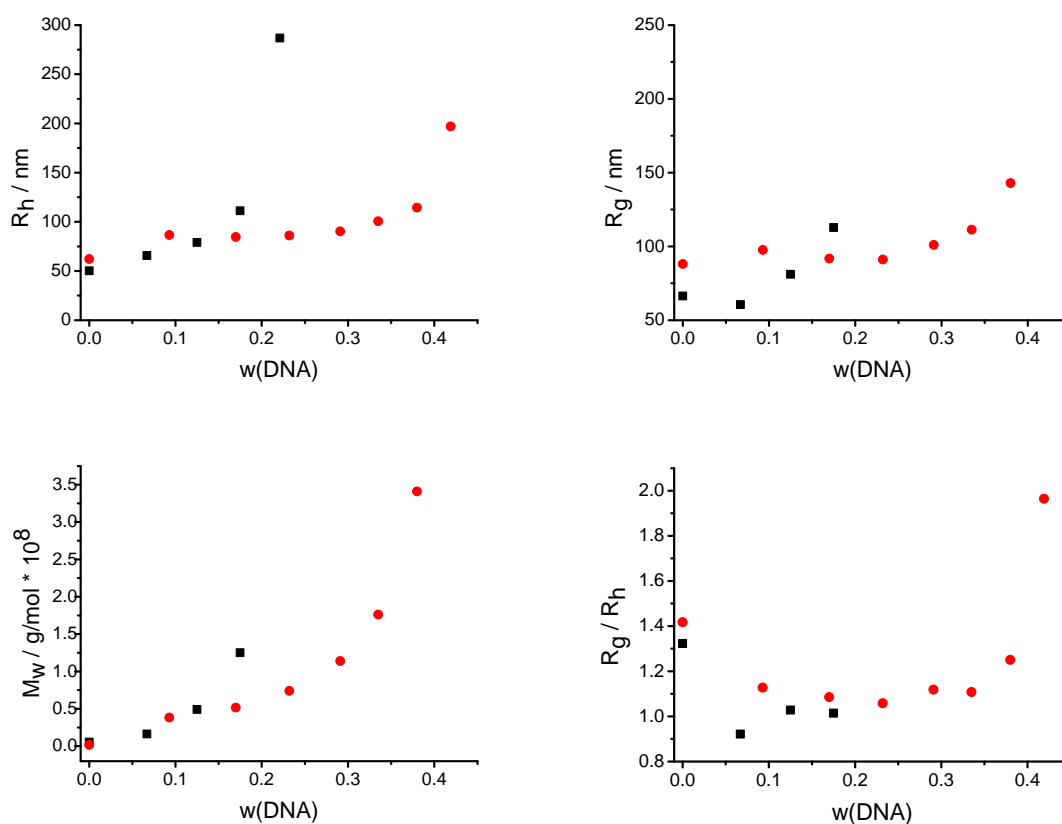


Abbildung 4.6: Komplexbildung aus Polylysinbürste und pUC19-DNA. Durch die unterschiedlichen Salze (LiClO_4 ■ und NaCl ●) liegt das Polylysin einmal als Helix und einmal als Knäuel vor. Die Konzentrationen der Ausgangskomponenten betragen jeweils 10mg/l. Aufgetragen sind die Radien (R_g und R_h) und Molmassen der Komplexmischung sowie das Verhältnis R_g/R_h gegen den Gewichtsbruch an DNA in der Lösung.

Vergleich der Herstellungsmethode: Titration vs. Kugelmischer

Um den Einfluss der Herstellungsmethode auf die Komplexe zu untersuchen, wurden die Komplexe aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA durch sequentielle Titration und im Vergleich dazu mit dem Kugelmischer hergestellt. Abbildung 4.7 zeigt die hydrodynamischen Radien der Komplexe aufgetragen gegen den Gewichtsbruch an DNA. Die Radien unterscheiden sich nicht signifikant bei den unterschiedlich gemischten Komplexen. Wie auch bei den PVP-Komplexen sieht man eine Verschiebung des kritischen Punktes zu größeren Werten von $w(\text{DNA})$ bei Verwendung des Kugelmischers. Dies liegt an der feindispersen Verteilung der Polymere in der Komplexmischung im Mischer. Bei der manuellen Titration liegt lokal an der Stelle des Eintropfens ein hoher Überschuss der zugegebenen Kompo-

nente vor. Die Komplexe können hier sehr schnell wachsen, da die Polymere nur kurze Strecken diffundieren müssen um sich an den Komplex anzulagern. Im Mischer sind beide Komponenten gleich verteilt, die Abstände zwischen den Teilchen sind größer und gleich verteilt über das gesamte Mischvolumen. Die Komplexe aggregieren deshalb nicht so stark und sind bis zu größeren Werten von $w(\text{DNA})$ stabil in Lösung.

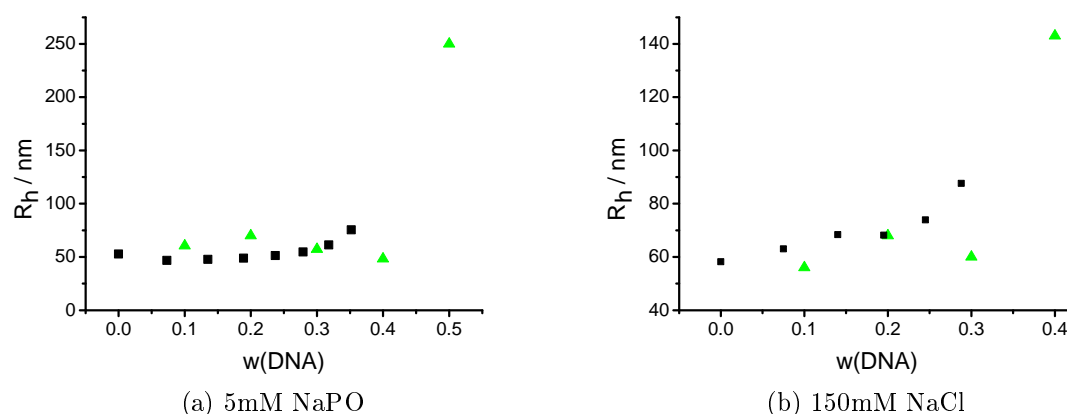


Abbildung 4.7: Vergleich der Komplexbildung aus Polylysinbürste und pUC19-DNA bei Titration per Hand (■) und Mischen mit dem Kugelmischer (▲) in unterschiedlichen Molaritäten. Die Konzentrationen der Ausgangskomponenten betragen jeweils 10mg/l. Aufgetragen sind die hydrodynamischen Radien der entstehenden Komplexe gegen den Gewichtsbruch an DNA in der Lösung.

Stabilität der Komplexe bei Salzzugabe

Im folgenden wird die Stabilität der PLL-Bürsten-DNA-Komplexe in unterschiedlichen Salzgehalten untersucht. Dazu werden die in 5mM Phosphatpuffer hergestellten Komplexe (+/- = 3.9) durch Zugabe gesättigter NaCl-Lösung auf verschiedene Molaritäten gebracht. Die Lichtstremessungen (Abbildung 4.8) zeigen, dass der hydrodynamische Radius bei NaCl-Zugabe zunächst stark ansteigt. Die Komplexe aggregieren bis zu Mikrometer großen Partikeln. Erst bei Molaritäten über 2mol/l lösen sich die Aggregate wieder auf.

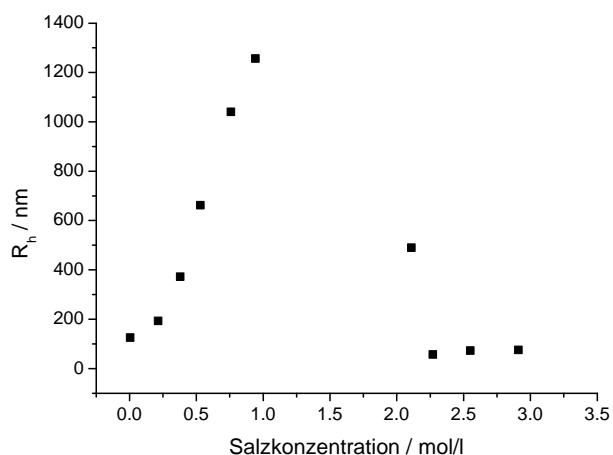


Abbildung 4.8: Hydrodynamischer Radius der Komplexe aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA bei Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung.

Desweiteren wird die Komplexgröße auch in physiologischem HBSS+++-Puffer untersucht, wie er in Zellversuchen verwendet wird. Er enthält neben anorganischen Salzen auch Glukose. Die PLL-Bürsten-Komplexe zeigen keine signifikant veränderten Radien, wenn die Komplexbildung in HBSS+++-Puffer durchgeführt wird. Bis zu $w(\text{DNA})=0.252$ sind die Komplexe stabil und haben einen hydrodynamischen Radius kleiner 60nm (siehe Abbildung 4.9). Dies ist vergleichbar mit den Werten in Phosphatpuffer mit 150mM NaCl . Die weiteren Komponenten des HBSS+++-Puffers beeinflussen die Komplexbildung demnach nicht.

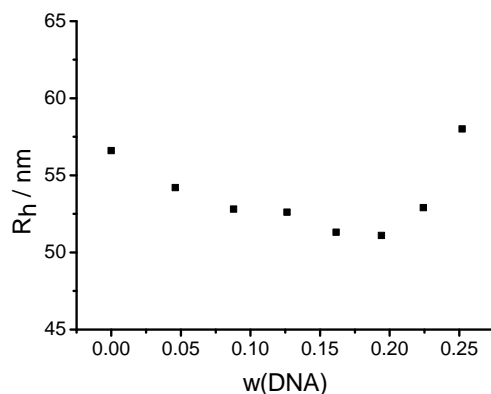


Abbildung 4.9: Hydrodynamischer Radius R_h der Komplexe aus PLL-Bürste und pUC19-DNA in HBSS+++-Puffer als Funktion des Gewichtsbruchs an DNA.

Von den Komplexen aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA wurden AFM-Bilder auf Mica unter Wasser bzw. NaCl-Lösung aufgenommen. Abbildung 4.10 zeigt die AFM-Bilder (Amplitude), die im Tapping-Mode aufgenommen wurden. Phasen- und Höhenbilder, sowie Vergrößerungen befinden sich im Anhang. Die Größen der Komplexe ändern sich, wie mit der Lichtstreuung gezeigt, bei Zugabe von NaCl-Lösung bis zu einer Salzkonzentration von 0.5Mol deutlich. Die Komplexe aggregieren zu großen Agglomeraten. Bei Hinzufügen von 2M NaCl-Lösung lösen sich die Agglomerate wieder auf.

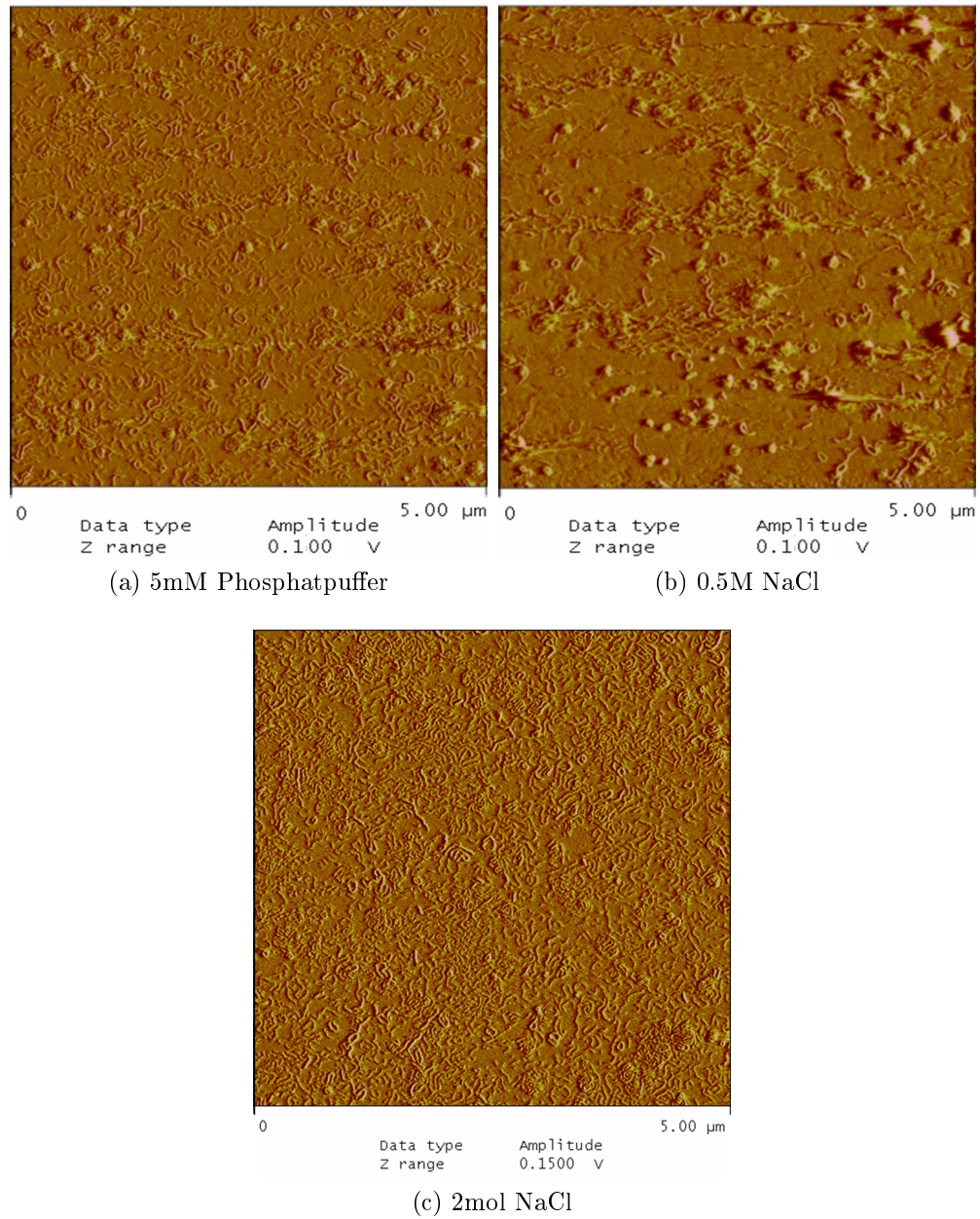


Abbildung 4.10: AFM-Bilder (Amplitudenbilder) der Komplexe aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA ($\pm = 3.9$). Die Bilder wurden unter einem Flüssigkeitsfilm aus 5mM Phosphatpuffer, 0.5mol NaCl bzw. 2mol NaCl aufgenommen. Phasen- und Höhenbilder, sowie Vergrößerungen befinden sich im Anhang.

4.2.2 Komplexe mit linearem Polylysin

Die Komplexierung der DNA mit linearem, kommerziell erhältlichem Polylysin der Molmasse $M_w = 326600 \text{ g/mol}$ wurde als Vergleich zum Bürstenpolymer durchgeführt.

Abbildung 4.11 zeigt die elektrophoretische Mobilität der nicht komplexierten DNA bei verschiedenen +/- Ladungsverhältnissen. Lineares Polylysin ist ein effektives Komplexierungsagens, bei stöchiometrischen Mengen positiver Ladung ($+/- = 1$) wird fast die gesamte DNA immobilisiert. Bei $+/- = 1.5$ ist keine freie DNA mehr auf dem Gel zu erkennen.

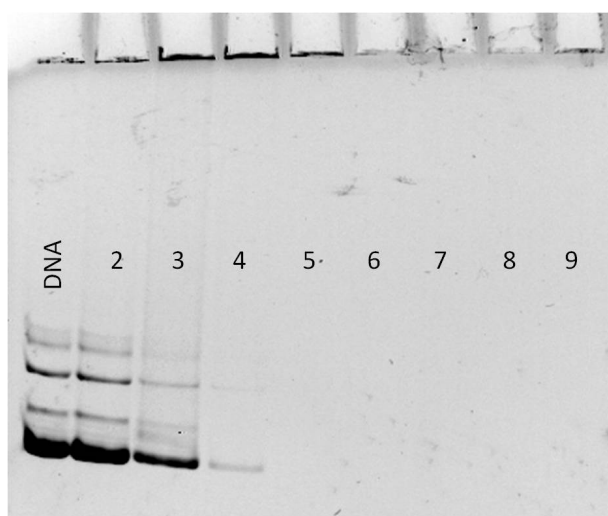


Abbildung 4.11: Komplexierung von pUC19-DNA mit linearem PLL in verschiedenen +/- Verhältnissen.

Spalte DNA: reine DNA, Spalte 2: $+/- = 0.37$, Spalte 3: $+/- = 0.73$, Spalte 4: $+/- = 1.1$, Spalte 5: $+/- = 1.5$, Spalte 6: $+/- = 1.8$, Spalte 7: $+/- = 2.2$, Spalte 8: $+/- = 2.9$, Spalte 9: $+/- = 5.9$

Vergleich der Komplexierung in 5mM Phosphatpuffer und physiologischem Salzgehalt

Die Komplexbildung mit linearem Polylysin wird in verschiedenen Salzgehalten untersucht. Die sequentielle Titration in der Lichtstreuöküvette liefert die in Abbildung 4.12 gezeigten Werte für Molmasse und Radius der Komplexmischung.

Die Komplexe bleiben bis zu einem Gewichtsbruch an DNA von $w(\text{DNA})=0.4$ stabil, (dies entspricht einem Ladungsverhältnis +/- von 2.3) mit hydrodynamischen Radien und Trägheitsradien kleiner als 70nm. Die apparenten Molmassen steigen kontinuierlich von der Molmasse des reinen Polylysins bis auf $9.5 \cdot 10^7 \text{ g/mol}$ an.

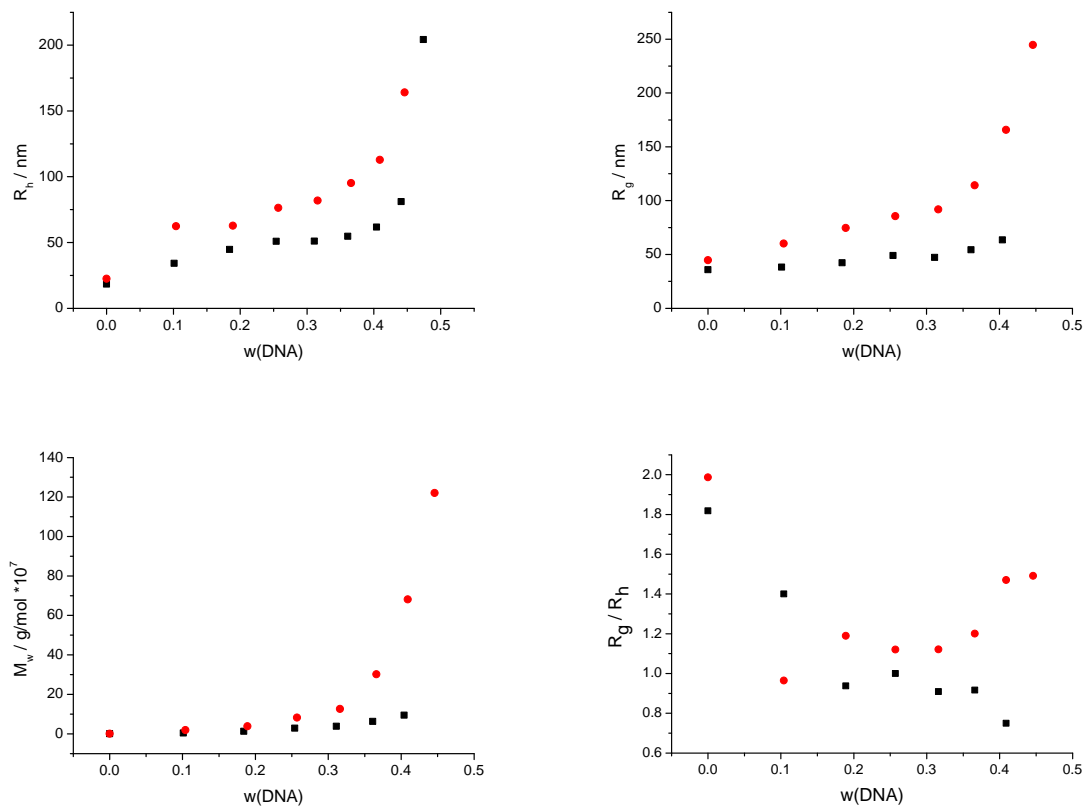


Abbildung 4.12: Komplexbildung aus linearem Polylysine und pUC19-DNA durch Titration in unterschiedlichen Salzgehalten (5mM NaPO ■ und 150mM NaCl ●). Aufgetragen sind die Radien (R_g und R_h) und Molmassen sowie das Verhältnis R_g/R_h der Komplexmischung gegen den Gewichtsbruch an DNA in der Lösung.

Stabilität der Komplexe bei Salzzugabe

Die Stabilität der Komplexe wird in unterschiedlichen Salzgehalten untersucht. Die Komplexe werden in 5mM Phosphatpuffer hergestellt mit einem Ladungsverhältnis von $+/- = 3.9$. Durch Zugabe gesättigter NaCl-Lösung werden verschiedene Molaritäten eingestellt. Lichtstremessungen zeigen eine Zunahme des hydrodynamischen Radius bei steigender Salzkonzentration (Abbildung 4.13). Ab 1.5mol/l NaCl sinken die Radien wieder. Dies ist jedoch im Gegensatz zu den PVP-Komplexen nicht mit einem Auflösen der Komplexe (verbunden mit Freisetzung der DNA) zu erklären. Wie Agarose-Gelelektrophorese zeigt, liegt auch in 2.5M NaCl-Lösung keine freie, ungebundene DNA, die auf dem Gel mobil wäre, vor (vgl. Kapitel 5.1.2). Es muss sich also um einen Solvatationseffekt der sekundären Aggregate handeln.

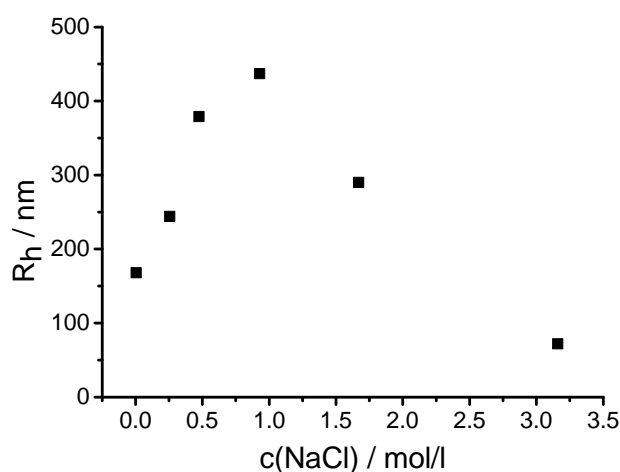


Abbildung 4.13: Hydrodynamischer Radius der Komplexe aus linearem Polylysin und pUC19-DNA bei Zugabe gesättigter NaCl-Lösung

4.2.3 Vergleich der Komplexe aus Polylysin-Bürste mit Komplexen aus linearem Polylysin

Wie in den Titrationsexperimenten (Abbildung 4.5 und 4.12) zu erkennen ist, sind die Größen der entstehenden Komplexe in etwa vergleichbar, unabhängig von der Topologie der Polylysinkette. Die Komplexe aus linearem Polylysin mit pUC19-DNA sind jedoch bis zu höheren Werten $w(\text{DNA})$ stabil als die mit büstenförmigen Polymeren. Ein Grund hierfür kann die bessere sterische Stabilisierung der Komplexe durch lineares PLL im Vergleich

zu bürstenförmigem PLL sein. Das flexible Knäuel des linearen Polylysins nimmt einen großen Raum ein und verhindert so die Aggregation zweier Komplexe. Die kompakte Bürste dagegen bietet keine sterische Abschirmung der Komplexe und erlaubt eher die Anlagerung eines zweiten Komplexes.

Da der Abstand der chemischen Polylysinladungen zueinander 2.5\AA beträgt, der Abstand der DNA-Ladungen jedoch 3.4\AA , gibt es auf den Polylysin-Molekülen unkompensierte positive Ladungen. Im Bürstenpolymer entsprechen die Abstände der Ladungen in den Seitenketten denen im linearen Polylysin, zusätzlich sind die Seitenketten an das Rückgrat gekoppelt und so noch dichter gepackt. Nach Hugenberg haben Bürstenpolymere eine kleinere effektive Ladungsdichte als lineare Polymere [Hug00]. Das heißt, dass bei gleichem Gewichtsbruch an DNA in der Komplexmischung mit Bürstenpolymer weniger effektive positive Ladungen vorhanden sind als mit dem linearen Polymer. Für die Komplexierung ist nach der ersten Annäherung der Polyelektrolyte jedoch nicht die effektive, sondern die chemische Ladungsdichte entscheidend, da es sich um einen kooperativen Prozess handelt. Der wichtige Faktor der zur Aggregation der Komplexe bei einem kleineren Gewichtsbruch (im Vergleich zu linearem Polylysin) führt, ist die Zugänglichkeit der Ladungen. In den Bürstenpolymeren sind nicht alle Ladungen für die DNA zugänglich. Vor allem im Inneren der Bürste sind die Ladungen sterisch abgeschirmt und können nur wenig zur Komplexbildung beitragen.

Sowohl die Bürstenkomplexe als auch die linearen Analoga aggregieren bei Erhöhung der Salzkonzentration deutlich. Ab einem Salzgehalt von etwa 0.5mol/l sind die Dispersionen nicht mehr stabil. Ab ca. 2mol/l lassen sich wieder kleinere Komplexradien messen. Dies ist nicht auf eine elektrolytische Dissoziation der Komplexe zurückzuführen, wie die Freisetzungsexperimente in Kapitel 5.1.2 zeigen, sondern auf eine Deaggregation sekundärer Aggregate. Der Effekt, dass sich die Löslichkeit bei Salzzugabe erhöht, wird als „Einsalzen“ bezeichnet.

4.2.4 Zusammenfassung

Die Komplexierung von DNA mit linearem und bürstenförmigem Polylysin wurde in verschiedenen Salzkonzentrationen (NaCl und LiClO_4) und mit unterschiedlichen Herstellungsmethoden (sequentielle Titration und Mikromischer) untersucht.

- Lineares Polylysin komplexiert ab 50% Überschuss positiver, chemischer Ladungen die gesamte DNA, PLL-Bürsten zeigen das gleiche Verhalten erst ab 100% Überschuss positiver, chemischer Ladungen. Die Ursache hierfür liegt in der durch steri-

sche Gründe geringeren Zugänglichkeit der Ladungen auf dem Bürstenpolymer und deren wurmförmigen, steifen Topologie.

- Stabile Komplexe bilden sich mit PLL-Bürste bis zu $w(\text{DNA}) = 0.35$ in 5mM Phosphatpuffer bzw. bis zu $w(\text{DNA}) = 0.3$ in 150mM NaCl. Je höher der Salzgehalt umso kleiner wird die elektrostatische Abstoßung der gleichgeladenen Komplexe und umso eher kommt es zur Aggregation. Der kritische Punkt liegt aufgrund des Ladungsmismatches, also dem Unterschied in der Ladungsdichte zwischen Bürste und DNA, bei einem Überschuss an positiven Ladungen. Mit linearem Polylysin verschiebt sich der kritische Gewichtsbruch, an dem die Komplexgrößen stark anwachsen, auf $w(\text{DNA}) = 0.4$ in 5mM Phosphatpuffer bzw. $w(\text{DNA}) = 0.38$ in 150mM NaCl.
- Die Herstellungsmethode hat keinen Einfluss auf die Komplexgröße.
- Zugabe von NaCl führt bei beiden Lysinen zunächst zur Aggregation, ab 2mol/l lösen sich die Aggregate durch Einsalzeffekte jedoch wieder auf.
- Die durch LiClO_4 induzierte Helixbildung der Polylysin-Seitenketten führt bei der Komplexierung der DNA mit der PLL-Bürste schon bei kleinen Werten von $w(\text{DNA})$ zu einer verstärkten Aggregation. Der Grund ist die deutlich erhöhte Hydrophobizität des Polykations.

4.3 Ethidiumbromid-Verdrängung

Ethidiumbromid, dessen Strukturformel in Abbildung 4.14 gezeigt ist, bildet mit DNA einen stark fluoreszierenden Komplex. Dieser Effekt wurde zum ersten Mal in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts von LePecq et al. beschrieben [LP67] und beruht auf der Interkalierung des Farbstoffs in die Doppelhelix der DNA.

LePecq unterscheidet zwei Bindungsstellen für Ethidiumbromid an der DNA: die Primärstelle, welche die Interkalation zwischen den Basenpaaren der Doppelhelix beschreibt, und die Sekundärstelle, an der Ethidiumbromid elektrostatisch an die Phosphatgruppen an der DNA-Oberfläche gebunden wird. Die elektrostatische Bindung wird bei niedrigem Salzgehalt und hohem Farbstoffüberschuss bevorzugt [Nor92]. Im gesättigten Zustand wird ein Ethidiumbromidmolekül pro vier bis fünf Basenpaare gebunden.

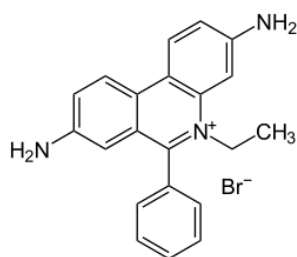


Abbildung 4.14: Ethidiumbromid

Laugaa et al. [LDPR83] zeigen, dass Ethidiumbromid in einem zweistufigen Prozess gebunden wird, zunächst kommt es zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Phosphationen des DNA-Rückgrats und dem positiv geladenen Stickstoff im Phenanthridiniumring, danach interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA-Helix, was zu einer Stabilisierung des Komplexes durch hydrophobe Wechselwirkungen führt. Frei in Lösung wird die Fluoreszenz des Ethidiumbromids von Wasser gequench, dabei wird ein Proton vom angeregten Singulettzustand des Ethidiumbromids auf das Wasser übertragen (siehe Abbildung 4.15)[PCK+91]. Nach Interkalation in die hydrophobe Region der Doppelhelix ist der Farbstoff gegenüber Quenching durch das wässrige Lösemittel geschützt und die Lebenszeit des angeregten Zustands wird deutlich verlängert (von 1.8ns in Wasser auf 23ns in der DNA-Helix) [OIK77]. Die Fluoreszenz nimmt mit steigendem Salzgehalt der Lösung ab. Die Bindung an sich und die Zahl der Bindungsstellen ist unabhängig von der Salzkonzentration, hohe Molaritäten erhöhen aber den Dissoziationskoeffizienten [LP67].

In der Literatur (z.B. [RHBG00], [CMZP05]) wird mehrfach beschrieben, dass die verstärkte Ethidiumbromid-Fluoreszenz durch Zugabe von Polykationen gequench werden kann. Meistens wird die Abnahme der Fluoreszenz mit einer Konkurrenz um die Bindungsstelle an der DNA zwischen Ethidiumbromid und Polykation erklärt und bei ausreichender Bindungsstärke des Polykations erfolgt dann die Verdrängung des Ethidiumbromids aus der DNA-Doppelhelix. Diese Erklärung ist jedoch mit Vorsicht anzuwenden, da effizientes

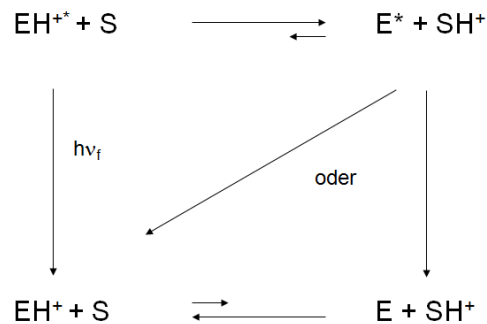


Abbildung 4.15: Mechanismus des Ethidiumbromid-Quenching durch Protonentransfer auf das Lösemittel, EH^+ Grundzustand des Ethidiumbromids, EH^{+*} angeregter Zustand des Ethidiumbromids, E^* angeregter Zustand des deprotonierten Ethidiumbromids, S : Lösemittel, Zeichnung nach Olmsted [OIK77]

Quenchen in verschiedenen Systemen auch nachgewiesen wurde, wenn der Kompetitor und Ethidiumbromid *gleichzeitig* an die DNA gebunden waren [PCK⁺91], z.B. durch Elektronentransfer von angeregtem Ethidiumbromid auf einen Akzeptor.

Trotzdem wird die Verdrängung von Ethidiumbromid oft als qualitative Messung der Komplexierungseffizienz sowie der Stabilität von DNA-Polykation-Komplexen verwendet. Die Methode liefert keine direkte Messung der Bindungskonstanten, sondern kann nur zum qualitativen Vergleich verschiedener Bindungsaffinitäten ähnlicher Polykationen nutzen.

Geall et al. [GB00] beschreiben in ihrer Veröffentlichung mehrere Beispiele, die zeigen, dass die Verdrängung des Ethidiumbromids aus der DNA durch Polykationen oder Lipide mit der Abnahme der Flexibilität der DNA zu tun hat. Die Bindung und Freisetzung von Ethidiumbromid ist ein Gleichgewichtsprozess. Das Gleichgewicht verschiebt sich auf die Seite des Ethidiumbromids in Lösung, wenn die Flexibilität der DNA erniedrigt wird. Änderungen der Konformation bei Kondensation der DNA erleichtern demnach ebenso die Freisetzung von Ethidiumbromid aus der Doppelhelix. Es ist also nicht (nur) die reine Anlagerung eines Komplexbildners verantwortlich für die Verdrängung des Ethidiumbromids aus der DNA, sondern auch die Änderung der DNA-Konformation während der Kompaktierung.

Im folgenden wird die Ethidiumbromid-Verdrängung zur Monitorisierung der Komplexbildung zwischen verschiedenen Polykationen und pUC19-DNA sowie Fischsperma-DNA verwendet. Zunächst wird der Verlauf der Fluoreszenzintensität bei steigendem Ladungsverhältnis +/- in 5mM Phosphatpuffer untersucht (Abschnitt 4.3.1), dann wird NaCl zu den Komplexlösungen zugegeben (Abschnitt 4.3.2). Dies kann, wie in den Freisetzungs-

experimenten (Kapitel 5.1) gezeigt, zu einem Auflösen der Komplexe führen. Im letzten Abschnitt (Abschnitt 4.3.3) wird die Komplexbildung selbst in Lösungen unterschiedlicher Molarität durchgeführt und die Fluoreszenzintensität des Ethidiumbromids nach der Komplexbildung gemessen. Die Werte werden mit den Ergebnissen der Lichtstreuungsmessungen (Trägheitsradien, hydrodynamische Radien und apparente Molmassen) und mit der Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese verglichen.

4.3.1 Komplexbildung mit verschiedenen Polykationen

Abbildung 4.16 zeigt den Ethidiumbromid-Verdrängungsversuch für verschiedene Polymere (PVP-Bürste, PLL-Bürste, lineares PLL) und pUC19-DNA in 5mM Natriumphosphatpuffer. Aufgetragen ist die relative Intensität der Fluoreszenz

$$I_{rel} = (I - I_{EtBr}) / (I_{DNA} - I_{EtBr})$$

gegen das Verhältnis von positiven zu negativen Ladungen, +/-.

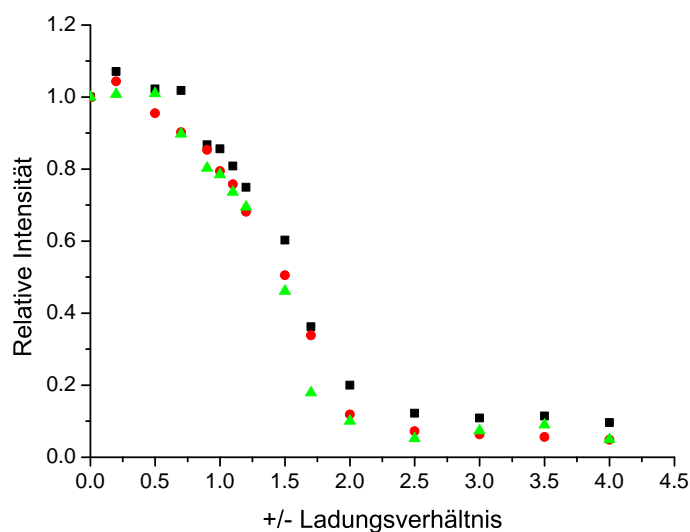


Abbildung 4.16: Ethidiumbromid-Verdrängung an Komplexen aus pUC19-DNA und verschiedenen Polykationen in 5mM Natriumphosphatpuffer: ■ PVP-Bürste, ● PLL-Bürste, ▲ lineares PLL.

Die gemessene Fluoreszenz nimmt bei großem Überschuss DNA den Wert der reinen DNA an. Bei Erhöhen des Ladungsverhältnisses +/- von 0 auf 2, kommt es zu einem steilen Abfall der Fluoreszenz für alle Polykationen bei einem Ladungsverhältnis +/- von 1.5 bis

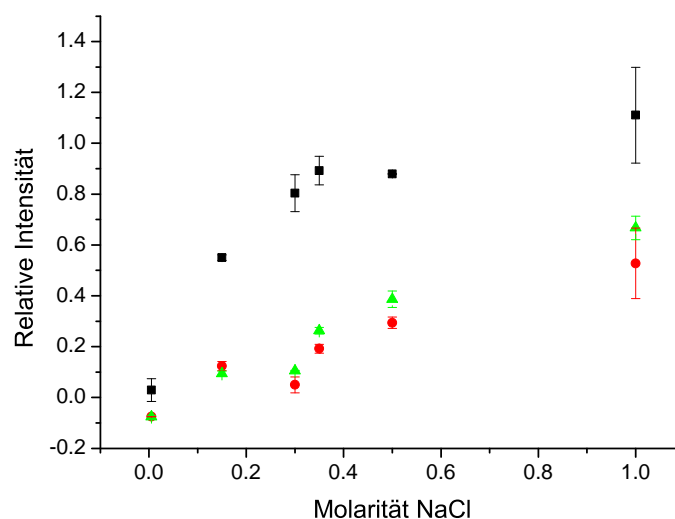


Abbildung 4.17: Intensität der Ethidiumbromidfluoreszenz als Maß für die Freisetzung der DNA durch NaCl-Zugabe ■ PVP-Bürste, ● PLL-Bürste, ▲ lineares PLL.

1.7. Die Bindungsaffinität der Polykationen ist also stark genug um Ethidiumbromid zu verdrängen. Die Fluoreszenz erreicht dann ein Plateau bei ca. 5 bis 10% der ursprünglichen Intensität. Dieser Anteil an Ethidiumbromid kann nicht verdrängt werden. Es sind im Kurvenverlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen Bürstenpolymeren und linearen Polykationen bzw. zwischen verschiedenen Polymeren (PVP und PLL) zu erkennen. Für die Ethidiumbromidverdrängung scheint es nicht relevant zu sein, wie die Ladungen beschaffen sind, ob es permanente positive Ladungen wie im Polyvinylpyridinium sind oder protonierte Ammoniumgruppen wie im Lysin bzw. wie stark die Gegenionen kondensiert sind. Auch die Erreichbarkeit der Ladungen, enggepackt wie in den Bürstenpolymeren oder flexibel wie auf dem linearen Polylysin, spielt keine signifikante Rolle bei der Verdrängung des Ethidiumbromids aus der DNA-Helix. Entscheidend ist alleine das Verhältnis der chemischen positiven und negativen Ladungen in der Komplexmischung.

4.3.2 Freisetzung der DNA durch NaCl-Zugabe

Komplexe aus PVP-Bürste, PLL-Bürste sowie linearem PLL und pUC19-DNA wurden im Ladungsverhältnis $+/- = 2.7$ in 5mM Phosphatpuffer hergestellt und nach 15min Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen versetzt. Die finalen Salzgehalte betragen zwischen 5mM und 1M Salz. Die NaCl-Zugabe bewirkt eine Erhöhung der Ethidiumbromidfluoreszenz.

diumbromidfluoreszenz (Abbildung 4.17), das heißt die Komplexierungstendenz der DNA mit dem Polykation wird verringert und Ethidiumbromid kann in die DNA-Helix interkalieren. Die Komplexe aus PVP-Bürste und pUC19-DNA sind am labilsten gegenüber Salz, in 0.3molarer Lösung sind 80% der DNA-Moleküle ganz oder teilweise aus dem Komplex gelöst. 1 molare NaCl-Lösung bewirkt eine völlige Dekomplexierung, vergleiche hierzu auch Kapitel 5.1.2. Die Komplexe mit anderen Polykationen sind stabiler. Selbst in 1 molarer NaCl-Lösung ist nur ungefähr 50% der DNA für Ethidiumbromid zugänglich. Dass dies keine völlig freie DNA ist, beweisen die Gelbilder in Kapitel 5.1.2. Im direkten Vergleich der PLL-Bürste mit linearem Polylysine scheinen die Komplexe mit dem Bürstenpolymer etwas stabiler zu sein, im Rahmen des Fehlers ist dieser Unterschied aber nicht signifikant.

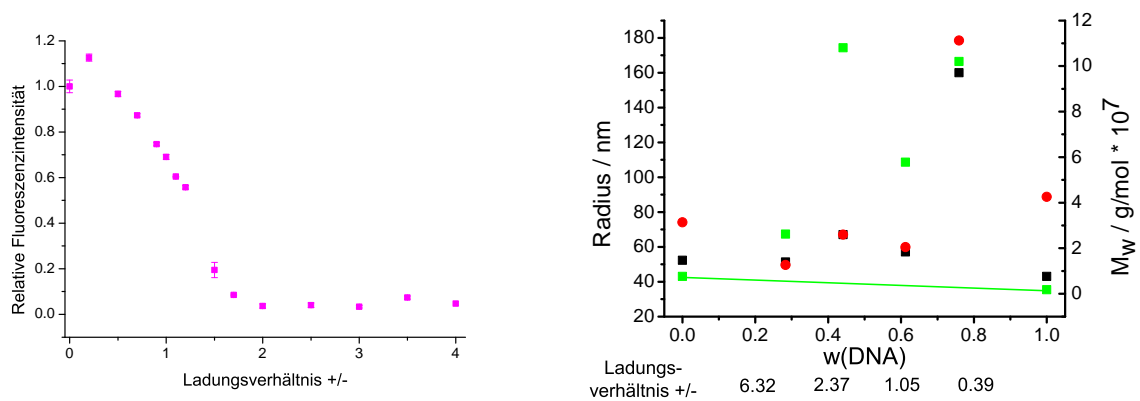
4.3.3 Komplexbildung in Lösungen mit unterschiedlichem Salzgehalt

Zur Komplexbildung bei unterschiedlichem Salzgehalt in der Lösung wurden die pUC19-DNA-Lösungen und die Polymerlösungen getrennt in verschiedenen Molaritäten angesetzt. Zu den Details der Durchführung ist auf den experimentellen Teil zu verweisen. Es wurden jeweils Duplikate angefertigt und der Mittelwert mit Fehler aufgetragen.

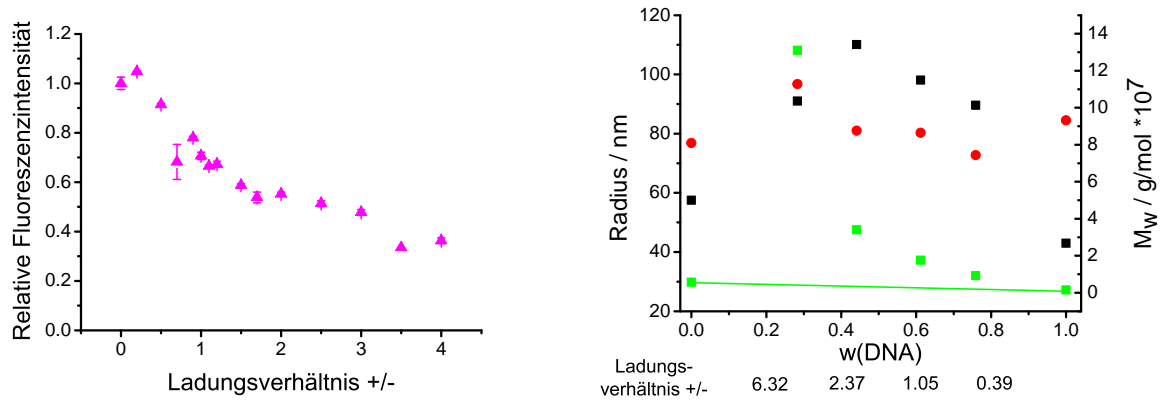
In Abbildung 4.18 ist die Komplexierung von PLL-Bürste mit pUC19 in verschiedenen Molaritäten (5mM Natriumphosphatpuffer, 0.5mol NaCl und 1mol NaCl) gezeigt. Links ist jeweils die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen das Ladungsverhältnis +/- . Wie zu erkennen, nimmt die Fluoreszenz mit steigendem +/- ab und erreicht ein Plateau bei +/- = 2. Dieses liegt in 5mM Phosphatpuffer knapp über 0, bei höherem Salz steigt die Fluoreszenzintensität im Plateau auf 0.4 der Kontrolle. Je höher also die Molarität der Lösungen, desto weniger stark wird die Komplexbildung zwischen Polykation und DNA favorisiert. Bei hoher Molarität der Lösung ist der Entropiegewinn durch die Freisetzung der Gegenionen bei der Komplexbildung nicht mehr so ausschlaggebend und die Ladungen auf den Polyelektrolyten werden durch die vielen Gegenionen besser abgeschirmt. Das zeigt sich in der hohen Fluoreszenzintensität auch bei großem Überschuss an Polykation.

Vergleich mit Lichtstremessungen und Gelelektrophorese

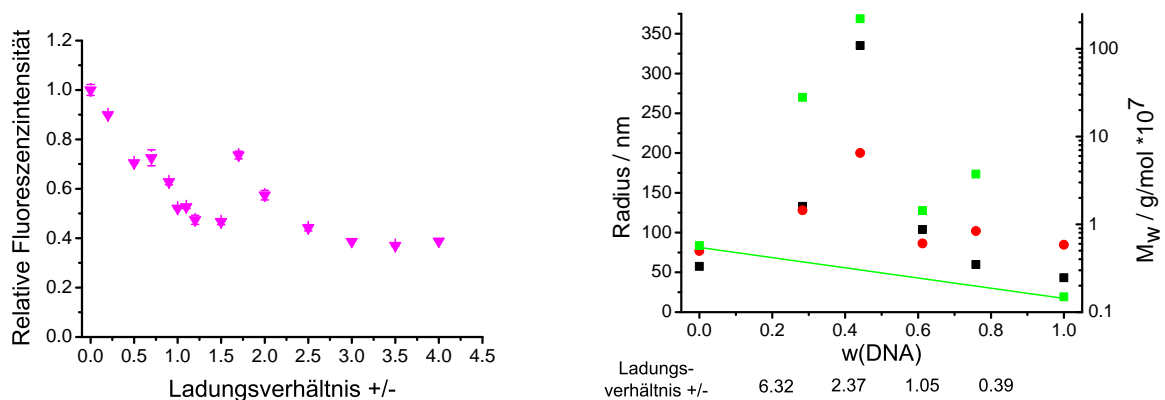
Um zu überprüfen, ob wirklich Komplexe gebildet wurden oder die Homopolymere nebeneinander vorliegen, wurden Lichtstremessungen der Komplexe bei ausgewählten Werten des Ladungsverhältnisses gemacht: +/- = 0.5, 1, 2 und 4. Dies entspricht bei Polylysine-



Komplexbildung mit PLL-Bürste und pUC19-DNA in 5mM Natriumphosphatpuffer.



Komplexbildung mit PLL-Bürste und pUC19-DNA in 0.5mol NaCl



Komplexbildung mit PLL-Bürste und pUC19-DNA in 1mol NaCl

Abbildung 4.18: Komplexbildung aus Polylysin-Bürste und pUC19 in verschiedenen Molaritäten. Links ist jeweils die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Ladungsverhältnisses aufgetragen, rechts werden die Ergebnisse der Lichtstreuemessungen gezeigt wobei auf der linken Achse ■ hydrodynamischer Radius R_h , und ● Trägheitsradius R_g aufgetragen sind und auf der rechten Achse ■ die apparente Molmasse M_w .

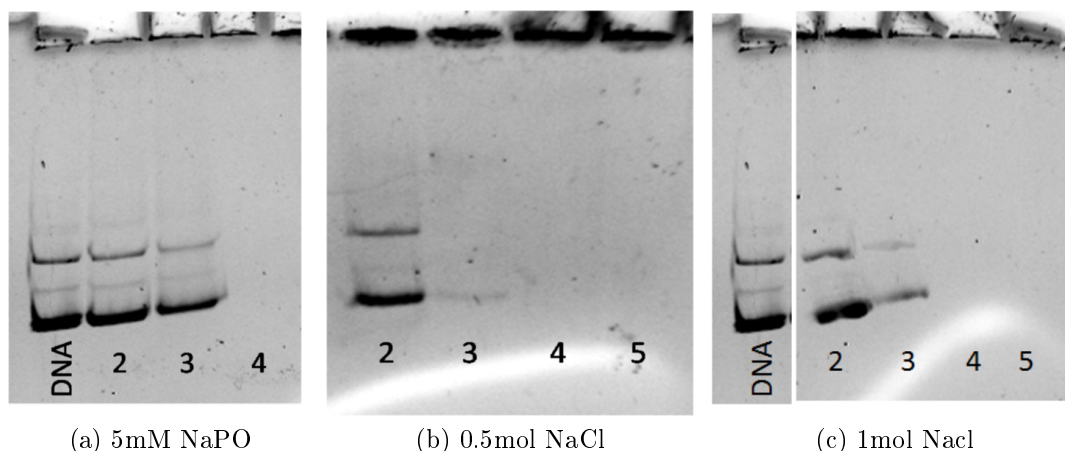
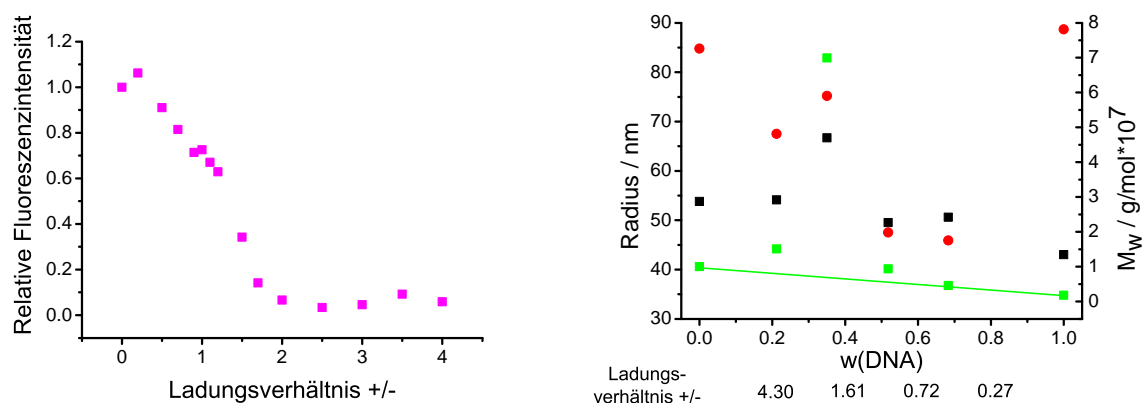


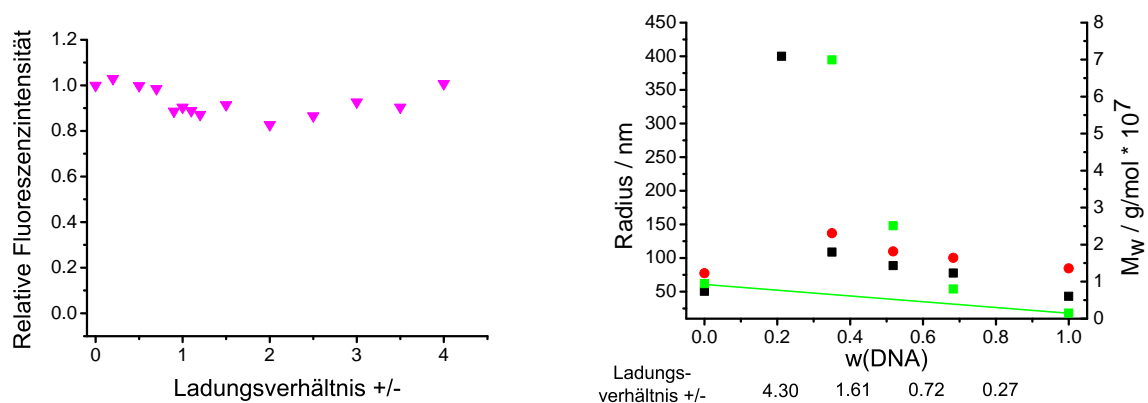
Abbildung 4.19: Gelelektrophorese der Komplexmischungen aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA in verschiedenen Molaritäten. Es wurden die Lösungen aus den Lichtstreuemessungen verwendet. Spalte 2: +/- = 0.5, Spalte 3: +/- = 1, Spalte 4: +/- = 2, Spalte 5: +/- = 4

Komplexen den Gewichtsbrüchen an DNA $w(\text{DNA}) = 0.759, 0.612, 0.441$ und 0.283 . Gemessen wurde neben hydrodynamischem und Trägheitsradius auch die apparente Molmasse. Als Brechungsindexinkrement wurde 0.18ml/g verwendet. Die grüne Linie, die die Molmassenwerte der Einzelkomponenten verbindet, wäre der zu erwartende Verlauf, wenn eine Homopolymermischung vorliegt, ohne Komplexbildung, da die Intensitäten lediglich additiv sind. Wie zu erkennen, liegen die gemessenen Massen alle oberhalb dieser Linie, weshalb von einer Komplexbildung ausgegangen werden kann. Die relative Fluoreszenzintensität ist also nur bedingt ein Maß für die Komplexbildung. Auch wenn noch 40% der Kontrollintensität gemessen werden, heißt das nicht, dass 40% der DNA-Moleküle unkomplexiert sind. Um festzustellen, ob in hohem Salz auch bei +/- Werten von 2 und höher noch freie, unkomplexierte DNA vorliegt, wurden die gleichen Proben in der Gelelektrophorese untersucht (siehe Abbildung 4.19). Wie man sieht, ist ab einem Ladungsverhältnis von +/- = 2 und höher keine freie DNA mehr auf dem Gel mobil. Die hohe Fluoreszenz, die detektiert wird, kommt also nicht von völlig unkomplexierter DNA, sondern von Schlaufen und Enden der DNA, die nicht vollständig von Polylysin komplexiert wurde und noch Stellen hat, die für Ethidiumbromid zugänglich sind.

Die gleichen Experimente wurden auch mit der PVP-Bürste und pUC19-DNA (Abbildung 4.20) sowie linearem Polylysin und pUC19-DNA durchgeführt (Abbildung 4.21). Die Ergebnisse sind prinzipiell vergleichbar mit denen der Polylysinbürsten-Komplexe: Je höher die Molarität der Lösung, desto höher die Fluoreszenzintensität auch bei großem Überschuss an Polykation. Die relative Fluoreszenzintensität der PVP-DNA-Komplexe sinkt in



Komplexbildung mit PVP-Bürste und pUC19-DNA in 5mM Natriumphosphatpuffer



Komplexbildung mit PVP-Bürste und pUC19-DNA in 0.5mol NaCl

Abbildung 4.20: Komplexbildung mit PVP-Bürste und pUC19-DNA in verschiedenen Molaritäten. Links ist jeweils die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Ladungsverhältnisses aufgetragen, rechts werden die Ergebnisse der Lichtstreuemessungen gezeigt wobei auf der linken Achse \blacksquare hydrodynamischer Radius R_h , und \bullet Trägheitsradius R_g aufgetragen sind und auf der rechten Achse \blacksquare die apparente Molmasse M_w .

0.5mol NaCl nicht unter 80% der Referenz. Wie die Lichtstreudaten zeigen, werden aber große Komplexe mit Radien bis zu 400nm gebildet. Die Agarosegelelektrophorese (Abbildung 4.22) zeigt keine freie DNA bei Ladungsverhältnissen größer $+/- = 1$. Auch mit linearem Polylysin bleibt die Fluoreszenzintensität in 1mol NaCl auf hohen Werten (70% der Referenzintensität), obwohl Komplexe gebildet werden. Auch auf dem Agarosegel (Abbildung 4.23) sieht man keine freie, unkomplexierte DNA mehr bei Ladungsverhältnissen über $+/- = 1$.

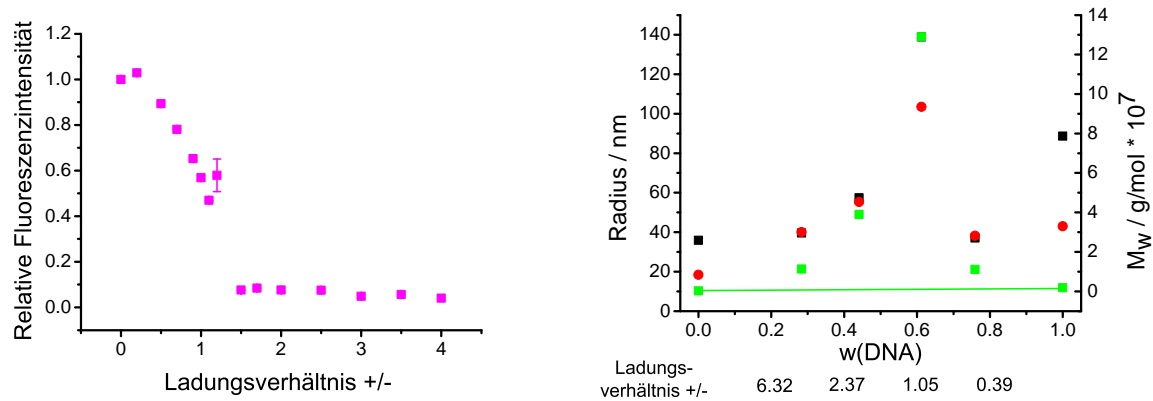
4.3.4 Verwendung von Fischsperma-DNA zur Komplexbildung

Die gleichen Experimente wurden statt mit zirkulärer Plasmid-DNA (pUC19) auch mit linearer Fischsperma-DNA durchgeführt. Abbildung 4.24 zeigt die Versuche in 5mM Phosphatpuffer für die verschiedenen Polykationen und Fischsperma-DNA bzw. pUC19-DNA im Vergleich. Normiert wurde auf die Intensität der reinen DNA mit Ethidiumbromid, als Hintergrund wurde die Ethidiumbromid-Fluoreszenz in 5mM Phosphatpuffer abgezogen.

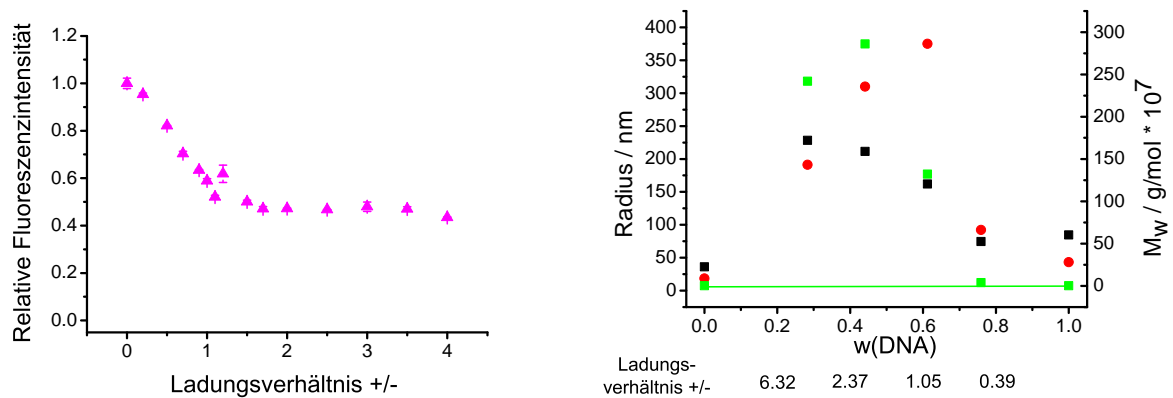
Es ist kein Unterschied zwischen den verschiedenen Polykationen zu erkennen. Mit der Fischsperma-DNA wird der Bereich der vollständigen Komplexierung im Vergleich zu pUC19-Komplexen zu kleineren $+/-$ Verhältnissen verschoben. Das heißt, dass pro Polykation mehr DNA-Wiederholungseinheiten gebunden werden. Die lineare Fischsperma-DNA ist flexibler als die supercoiled pUC19-DNA. Sie kann sich deshalb besser an die Polymere anlagern. Die Topologie der Polymere hat im Vergleich zur Flexibilität der DNA keinen Einfluss auf die Ethidiumbromidverdrängung.

4.3.5 Diskussion

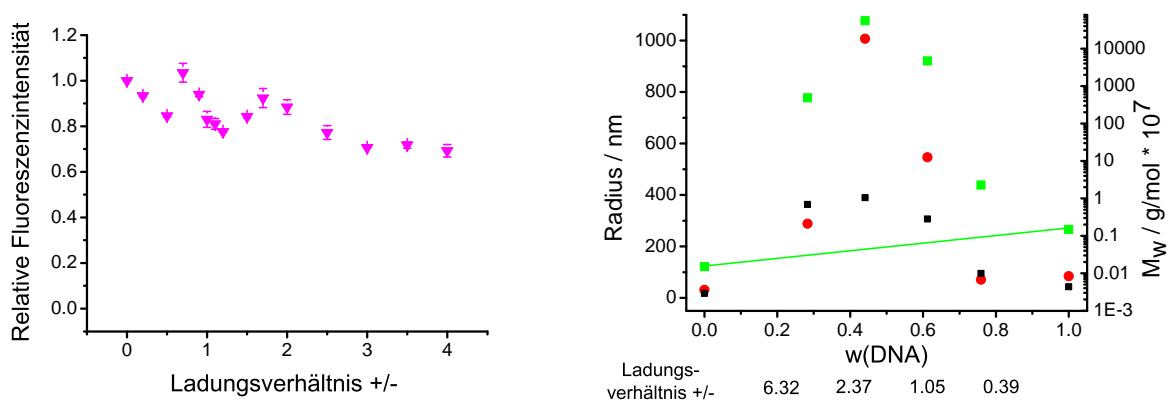
Die Ethidiumbromid-Verdrängungsversuche liefern in 5mM Phosphatpuffer gute Ergebnisse zur Komplexierung der DNA mit verschiedenen Polykationen. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität kann durch Komplexbildung erklärt werden. Die Fluoreszenz wird bei großem Polykationüberschuss fast vollständig gequencht. Anders verhält es sich bei hohen Salzkonzentrationen in der Lösung. Die Fluoreszenzintensität nimmt dann auch bei großem Polymerüberschuss weniger stark ab, sie beträgt teilweise noch bis zu 80% der Referenzintensität unkomplexierter DNA mit interkaliertem Ethidiumbromid. Lichtstreuung und Gelelektrophorese zeigen jedoch, dass auch in hohen Salzkonzentrationen Komplexe gebildet werden und die DNA nicht mehr frei als Einzelmolekül in Lösung vorliegt. Hier muss unterschieden werden zwischen Komplexbildung auf molekularer Ebene (also zwischen dem



Komplexbildung mit linearem PLL und pUC19-DNA in 5mM Natriumphosphatpuffer



Komplexbildung mit linearem PLL und pUC19-DNA in 0.5mol NaCl



Komplexbildung mit linearem PLL und pUC19-DNA in 1mol NaCl

Abbildung 4.21: Komplexbildung mit linearem PLL und pUC19-DNA in verschiedenen Molaritäten. Links ist jeweils die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Ladungsverhältnisses aufgetragen, rechts werden die Ergebnisse der Lichtstreuemessungen gezeigt wobei auf der linken Achse ■ hydrodynamischer Radius R_h , und ● Trägheitsradius R_g aufgetragen sind und auf der rechten Achse ■ die apparente Molmasse M_w .

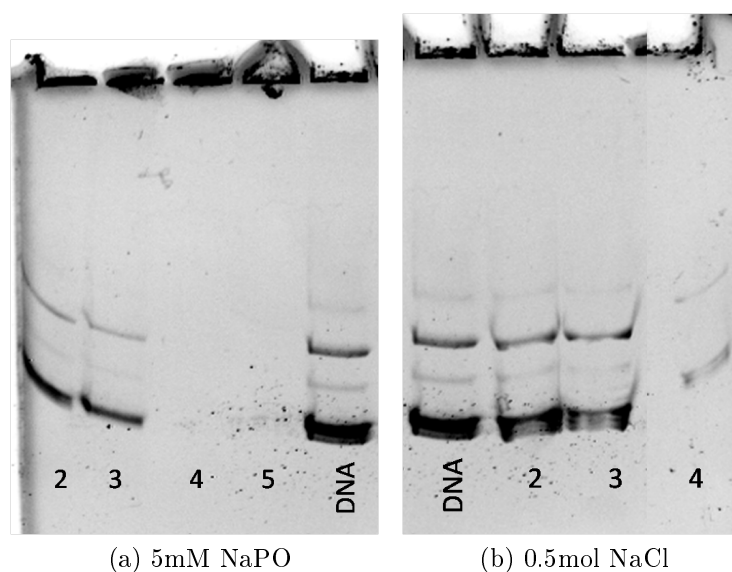


Abbildung 4.22: Gelelektrophorese der Komplexmischungen aus PVP-Bürste und pUC19-DNA in verschiedenen Molaritäten. Es wurden die Lösungen aus den Lichtstreuungsmessungen verwendet. Spalte 2: +/- = 0.5, Spalte 3: +/- = 1, Spalte 4: +/- = 2, Spalte 5: +/- = 4

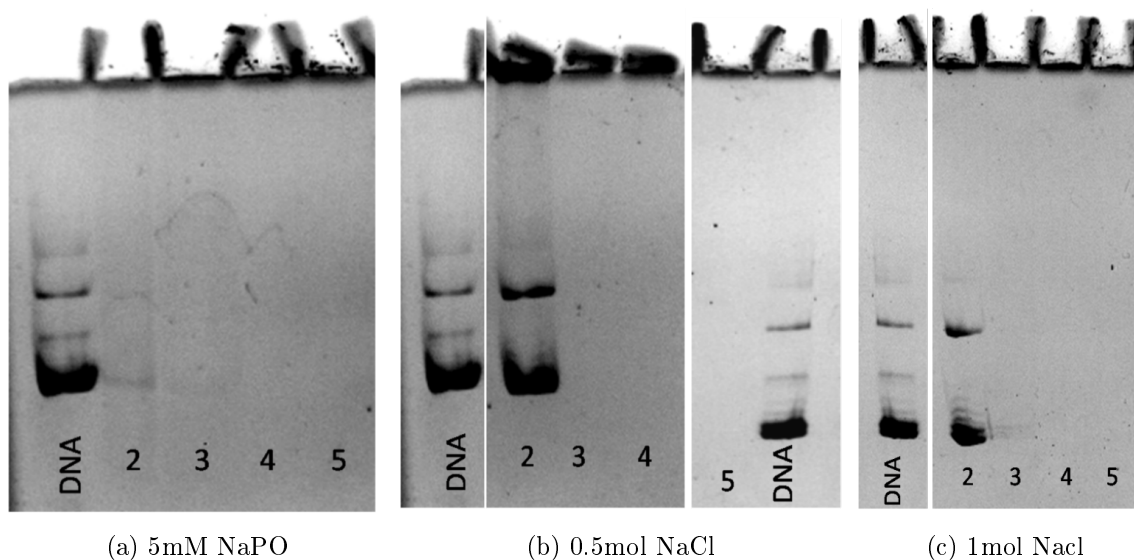


Abbildung 4.23: Gelelektrophorese der Komplexmischungen aus linearem Polylysine und pUC19-DNA in verschiedenen Molaritäten. Es wurden die Lösungen aus den Lichtstreuungsmessungen verwendet. Spalte 2: +/- = 0.5, Spalte 3: +/- = 1, Spalte 4: +/- = 2, Spalte 5: +/- = 4

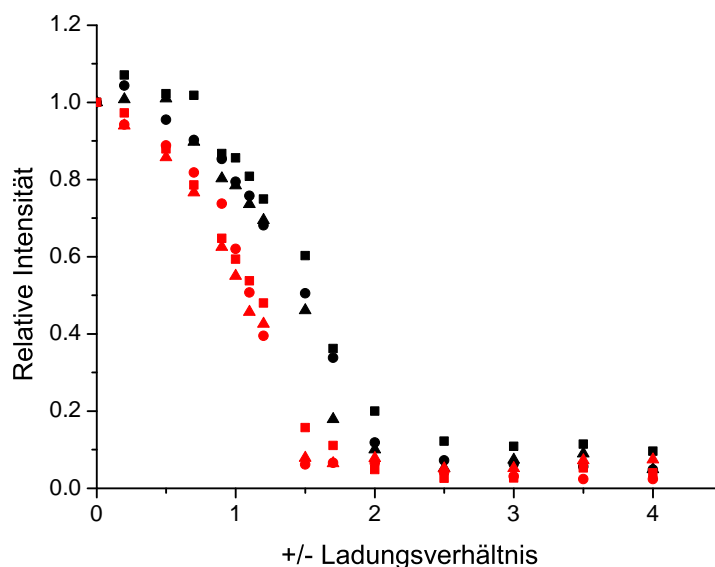


Abbildung 4.24: Komplexbildung mit Fischsperma-DNA (rote Symbole) und pUC19-DNA (schwarze Symbole) im Vergleich. ■ ■ PVP-Bürste, ● ● PLL-Bürste, ▲ ▲ lineares PLL. Alle Experimente wurden in 5mM Phosphatpuffer durchgeführt.

ganzen DNA-Molekül mit einem oder mehreren Polykationen) und der Komplexbildung einzelner Phosphatgruppen an der DNA bzw. kurzer Segmente der DNA durch positive Ladungsträger (Ammonium im Polylysin bzw. Pyridiniumionen im PVP) des Polykations. In der Lichtstreuung beobachtet man die molekulare Komplexbildung: Durch die Zunahme des Radius bzw. der Molmasse in der Komplexlösung kann eine Bindung der DNA an Polykationen nachgewiesen werden. Die Lichtstreuung lässt jedoch keine Aussage über die Zahl der Bindungsstellen im beobachteten Komplex zu. Man kann nicht unterscheiden, ob die DNA lediglich über eine einzelne ionische Wechselwirkung an das Polykation gebunden ist oder über sehr viele Bindungen. Die Molmasse des Komplexes ändert sich nicht signifikant, wenn mehr Bindungen zwischen zwei Molekülen gebildet werden, wichtig ist nur, dass sie verbunden sind. Im Gegensatz dazu kann man mit Hilfe der Ethidiumbromidverdrängung eine Aussage über die Zahl der komplexierten Phosphatreste an der DNA machen. Je mehr Phosphate von einer Ladung des Polykations neutralisiert werden, desto mehr Ethidiumbromid wird aus der Helix verdrängt. Alternativ kann man sagen, je höher die Ethidiumbromidfluoreszenz, desto mehr unkomplexierte Phosphatreste liegen an der DNA vor. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob ein DNA-Molekül völlig unkomplexiert bleibt und ein anderes vollständig komplexiert wird oder ob an beiden DNA-Molekülen

jeweils die Hälfte der Phosphate komplexiert wurden. Die Ethidiumbromidfluoreszenz beweist lediglich, dass es für Ethidiumbromid zugängliche Stellen an der DNA gibt. Die DNA kann aber durchaus an einer anderen Stelle nur partiell an ein Polykation gebunden sein.

Vorhersagen für Komplexbildung auf molekularer Ebene sind also mit Hilfe der Ethidiumbromidverdrängung nur in Lösungen niedriger Salzkonzentration möglich.

4.3.6 Zusammenfassung

Ethidiumbromid fluoresziert bei Interkalation in die DNA-Helix. Komplexierung der DNA kann das Ethidiumbromid verdrängen und so das Fluoreszenzverhalten ändern.

- In 5mM Phosphatpuffer ist die Verdrängung von Ethidiumbromid und die damit verbundene Abnahme der Fluoreszenz ein gutes Maß für die Komplexierungseffizienz.
- In hohen Salzkonzentrationen ist die Ethidiumbromid-Verdrängung ungeeignet zur Bestimmung der Komplexbildung, da auch bei großem Überschuss Polykation eine hohe Fluoreszenz detektiert wird.
- Ethidiumbromidverdrängung detektiert Bindungsstellen der DNA, jedoch nicht die molekulare Komplexbildung, wie z.B. Lichtstreuung.

Kapitel 5

Komplexeigenschaften

Dieses Kapitel beschreibt die Eigenschaften der gebildeten Polykation-DNA-Komplexe. Ein Hauptaugenmerk liegt auf der Stabilität der Komplexe gegenüber verschiedenen Kompetitoren, siehe Abschnitt 5.1. Der Einfluss anderer, natürlich vorkommender Polyanionen auf die Komplexe sowie ihr Verhalten in Lösungen unterschiedlicher Molarität und pH-Werte wird ausführlich untersucht. Ein weiterer Punkt ist der Test der Schutzfunktion der Polykationhülle gegenüber DNase-Degradation (Abschnitt 5.2).

5.1 Freisetzungsexperimente

Sollen die DNA-Komplexe zur Gentransfektion eingesetzt werden, ist es wichtig, ihre Stabilität zu kennen. In der Zelle gibt es verschiedene Polyanionen, die in Konkurrenz zur Komplexierung der DNA treten. Dies sind zum Beispiel andere DNA-Moleküle, RNA oder Proteine. Eine frühe Freisetzung der DNA kann zu ihrer Degradation führen. Wenn die Komplex-Wechselwirkung jedoch zu stark ist, und die DNA-Freisetzung deshalb zu spät oder nur unvollständig erfolgt, wird die Transfektionseffizienz möglicherweise herabgesetzt. Bisher ist unklar, ob die Dissoziation der Komplexe nötig ist, um eine erfolgreichen Transfektion zu erhalten. Der Befund, dass intakte PEI-DNA-Polyplexe im Zellkern gefunden wurden [BMK⁺02], deutet an, dass es nicht notwendig ist die DNA vor Aufnahme in den Zellkern vollständig vom Polykation zu trennen. Godbey et al. konnten durch unterschiedlich fluoreszenzmarkierte PEI und DNA beweisen, dass der Komplex als ganzes in den Zellkern eintritt. Es tritt zwar eine Auflösung der Komplexe im Cytoplasma auf, im Zellkern ist jedoch hauptsächlich die überlagerte Fluoreszenz von PEI und DNA zu sehen [GWM99]. Schaffer et al. zeigen in ihrer Arbeit jedoch, dass Polylysine höherer Molmasse

(180 Wiederholungseinheiten) länger an der DNA gebunden sind und die Transfektion so im Vergleich zu Komplexen mit kürzerem Polylysin (19 Wiederholungseinheiten) behindert ist [SFDL00].

Im folgenden wird die Stabilität der Polykation-DNA-Komplexe bei Einwirkung anderer (Poly-)Ionen untersucht (vgl. [BBS⁺06] [Mor01]). Dazu werden Komplexe mit verschiedenen Kompetitoren versetzt und die Lösung danach auf 1% Agarosegelen untersucht. Die verwendeten Komplexe werden mit einem Überschuss Polykation hergestellt, sodass die DNA vollständig gebunden ist. Freie DNA läuft in der Gelelektrophorese zur Anode. Komplexe dagegen zeigen keine Komponente, die im Gel mobil ist. Ist der Kompetitor in der Lage, die DNA aus dem Komplex zu verdrängen, sieht man die freigesetzte DNA im Gel wandern. Die Intensität der Bande dient als Maß für die Menge freigesetzter DNA. Zur Abschätzung der Freisetzungseffizienz wird als Standard jeweils eine Probe unbehandelte pUC19-DNA auf das Gel aufgetragen. Deren Menge entspricht genau der mit Polykation pro Spalte komplexierten DNA. Wenn also die gesamte DNA aus dem Komplex freigesetzt wird, muss die Intensität der Bande der der reinen DNA entsprechen.

Zur Freisetzung wird der pH-Wert und die Salzkonzentration durch Zugabe von NaCl variiert. Weiterhin werden verschiedene Polyanionen als Kompetitoren ausgewählt: das Polysaccharid Heparin als Modellpolyanion, RNA als in der Zelle vorkommendes Polyanion und das globuläre negativ geladene Protein Rinderserumalbumin (BSA). Heparin gehört zur Stoffklasse der Glykosaminoglykane, die in der extrazellulären Matrix und an der Zelloberfläche vorkommen.

Im folgenden werden die Freisetzungsversuche anhand der Agarosegelbilder mit verschiedenen Polymeren und Kompetitoren gezeigt. Die Spalte *K* bezeichnet jeweils den Komplex alleine, in der Spalte *DNA* ist die reine pUC19-DNA aufgetragen in genau der Konzentration, die auch pro Spalte im Komplex enthalten ist. Die Komplexe werden bei $w(\text{DNA}) = 0.29$ hergestellt, dies entspricht einem Ladungsverhältnis $+/- = 2.7$ für PVP-Komplexe und $+/- = 3.9$ für Polylysin-Komplexe. Am Ende des Kapitels sind die Ergebnisse in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

5.1.1 Heparin als Kompetitor

In Abbildung 5.1 sind die Freisetzungsexperimente mit Heparin als Kompetitor gezeigt. Heparin ist ein Polysaccharid, das bei $\text{pH} = 7$ pro Saccharid-Wiederholungseinheit (281g/mol) 1.43 negative Ladungen trägt [HSH⁺85]. Es wurden verschiedene Komplexe aus PVP-Bürste, PLL-Bürste und linearem PLL mit pUC19-DNA untersucht. Wie in Abbildung 5.1a

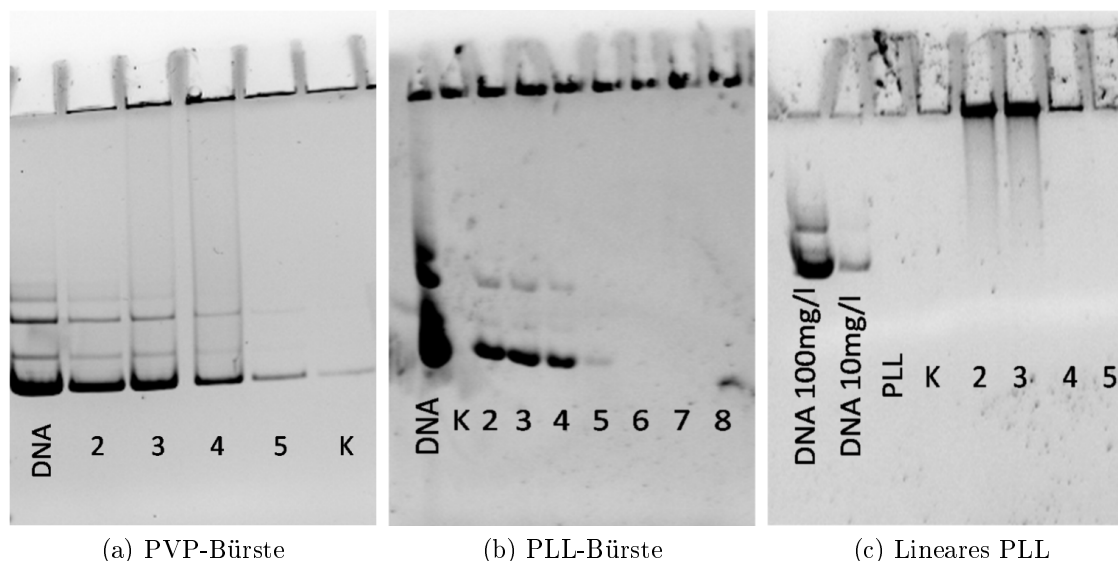


Abbildung 5.1: Freisetzungsexperimente an verschiedenen puC19-DNA-Komplexen mit Heparin als Kompetitor. Den Komplexen wurden jeweils verschiedene Mengen Heparin zugefügt.

Für PVP (5.1a) und lineares Polylysin (5.1c) gilt die Spaltenbeschriftung als Endkonzentration in der Komplexlösung: Spalte 2: 15g/l Heparin, Spalte 3: 1.5g/l Heparin, Spalte 4: 0.15g/l Heparin, Spalte 5: 0.015g/l Heparin.

Für Abbildung 5.1b ist die Endkonzentration Heparin in der Komplexlösung folgendermaßen angegeben: Spalte 2: 5g/l Heparin, Spalte 3: 1.5g/l Heparin, Spalte 4: 0.5g/l Heparin, Spalte 5: 0.15g/l Heparin, Spalte 6: 0.05g/l Heparin, Spalte 7: 0.015g/l Heparin, Spalte 8: 0.005g/l Heparin.

K: Komplex

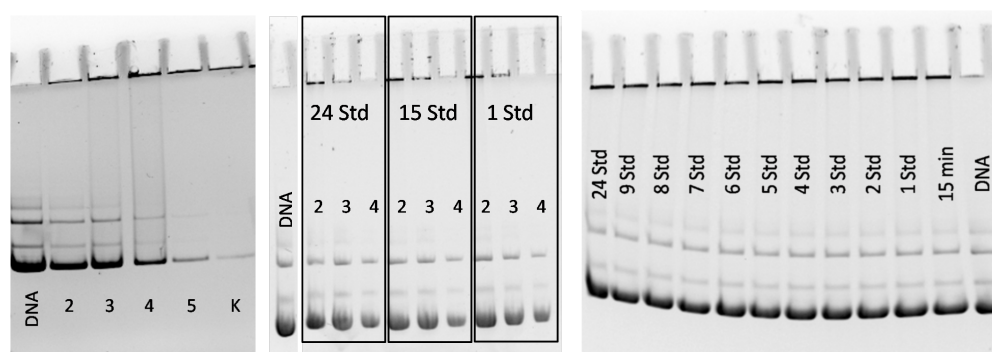
zu sehen ist, ist die Freisetzung aus PVP-Komplexen umso stärker, je mehr Heparin zugesetzt wird. Bei einer Endkonzentration von 15g/l Heparin werden ungefähr 2/3 der gesamten DNA aus den Komplexen gelöst. Das Ladungsverhältnis der negativen Heparinladungen zu den DNA-Ladungen beträgt bei dieser Heparinkonzentration $Ladung_{Heparin}/Ladung_{DNA} = 252$. Heparin wird also in großem Überschuss eingesetzt. Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten der Banden in Abbildung 5.1a und setzt die Bande der reinen DNA auf 100%, erhält man die relative Menge freigesetzter DNA. Tabelle 5.1 zeigt die freigesetzte Menge DNA aus den PVP-Komplexen für die verschiedenen Heparin-Konzentrationen. Mit einer finalen Konzentration von 1.5g/l Heparin, lassen sich 66% der DNA aus dem Komplex lösen. Dies entspricht auch gleichzeitig dem Maximum, denn selbst bei Verzehnfachung der Heparinmenge, wird nicht deutlich mehr DNA aus dem Komplex gelöst. Schon mit 0.15g/l Heparin, dies entspricht 2.5 negativen Heparinladungen pro DNA-Ladung, wird fast die Hälfte der komplexierten DNA freigesetzt. Lichtstremessungen bestätigen die instantane Komplexbildung zwischen PVP und Heparin.

Tabelle 5.1: Menge durch Heparin freigesetzte DNA aus PVP-Komplexen

	Fläche (PVP-Komplexe)	% freie DNA
15g/l Heparin	3655	68
1.5g/l Heparin	3589	66
0.15g/l Heparin	2554	47
0.015g/l Heparin	775	14
Komplex	275	5
reine DNA	5413	100

Für die PLL-Bürste wird ein ähnliches Verhalten beobachtet, die Menge freigesetzter DNA steigt mit der Heparinkonzentration (Abbildung 5.1b). Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität ist bei den PLL-Bürsten-Komplexen nicht möglich, da die DNA-Bande überladen ist und deshalb die Konzentration nicht genau bestimmt werden kann. Deutlich zu erkennen ist allerdings, dass mit 0.05g/l Heparin keine Freisetzung der DNA erfolgt, dies entspricht 0.8 negativen Heparinladungen pro DNA-Ladung. Es sind also mindestens äquimolare Mengen negativer Ladung erforderlich um DNA aus den PLL-Bürsten-Komplexen freizusetzen. Im Gegensatz zu den beiden Bürstenkomplexen werden die Komplexe mit linearem Polylysin im untersuchten Konzentrationsbereich nicht durch Heparin aufgelöst. Bei den höchsten Heparinkonzentrationen (15g/l und 1.5g/l) ist lediglich ein leichtes Schmierer von den Taschen nach unten zu erkennen, es wird jedoch keine freie DNA detektiert.

Für die PVP-Komplexe wurde zusätzlich noch untersucht, ob sich das Freisetzungverhalten altersbedingt ändert oder durch die Inkubationszeit mit Heparin beeinflusst werden kann (Abbildung 5.2). Bei einer Variation der Inkubationszeit mit Heparin zwischen 1 Stunde und 24 Stunden ist kein signifikanter Unterschied in der Menge freier DNA zu erkennen. Wie auf dem Gel 5.2b zu sehen, unterscheiden sich die Intensitäten der DNA-Banden nicht voneinander. Beim Vergleich der Spalten 2 mit den Spalten 4 in Gel 5.2b und 5.2a ist zu erkennen, dass die Heparinkonzentration einen wesentlich größeren Einfluss auf das Release-Verhalten als die Inkubationszeit. Das Alter der Komplexe vor der Heparinzugabe spielt ebenfalls keine Rolle bei der Freisetzung mit Heparin. Untersucht wurde ein Zeitbereich von 15min bis 24 Stunden. Die Komplexe präzipitieren zwar eher, je älter sie sind, aber es kann mit 15g/l Heparin trotzdem die gleiche Menge DNA freigesetzt werden wie bei frisch hergestellten Komplexen.



(a) PVP-Bürste mit Heparin (b) Variation der Inkubationszeit mit Heparin (c) Variation des Komplexalters

Abbildung 5.2: Freisetzungsexperimente an PVP-pUC19-Komplexen mit Heparin. In Abbildung 5.2a wurde die finale Heparinkonzentration variiert von 15g/l (Spalte 2), 1.5g/l (Spalte 3), 0.15g/l (Spalte 4) bis 0.015g/l (Spalte 5).

In der mittleren Abbildung wurden die Komplexe zusätzlich unterschiedlich lang (1 Stunde bis 24 Stunden) mit Heparin inkubiert. Die Spaltenbeschriftungen 2, 3 und 4 entsprechen den Werten in Abbildung 5.2a.

In Abbildung 5.2c wurde der Einfluss des Komplexalters auf die Freisetzung von DNA untersucht. Die Komplexe wurden zwischen 24 Stunden und 15min vor der Heparinzugabe hergestellt. Die Inkubationszeit mit 15g/l Heparin betrug konstant 45min.

Zusammenfassung Heparin ist ein guter Kompetitor für DNA-Komplexe mit PVP- bzw. PLL-Bürsten. Eine erhöhte Freisetzung der DNA wird beobachtet, je höher die Heparinkonzentration ist. Um signifikante Mengen DNA aus den Komplexen freizusetzen, werden für PVP-Komplexe 0.15g/l Heparin benötigt. In dieser Lösung sind 2.5 Heparinladungen pro DNA-Ladung. Für PLL-Bürsten-Komplexe wird eine Heparinkonzentration von 0.5g/l benötigt. Dies entspricht dem 8fachen der DNA-Ladung. Komplexe aus linearem Polylysin können mit Heparin nicht aufgelöst werden. Heparin hat also eine hohe Affinität zu PVP, für Polylysin ist die Affinität deutlich vermindert, die Bürste zeigt in großem Überschuss Heparin noch einen Austausch der DNA gegen Heparin, lineares Polylysin ist so fest an die DNA gebunden, dass Heparin keinen Einfluss auf die Komplexzusammensetzung hat. Im Falle der PVP-Komplexe hat das Alter der Komplexe und die Inkubationszeit mit Heparin keinen Einfluss auf das Ausmaß der DNA-Freisetzung.

5.1.2 NaCl als Kompetitor

Durch Zugabe von Salzen werden die Ladungen auf Polyelektrolyten abgeschirmt. Die effektive Ladung nimmt somit ab, die Wechselwirkung zwischen den entgegengesetzt gela-

denen Polyelektrolyten wird kleiner und ein Rearrangieren der Komplexe wird erleichtert. Prinzipiell sollte es bei ausreichend hohen Salzkonzentrationen möglich sein, die Komplexe wieder aufzulösen. Ab einer bestimmten Salzkonzentration können Polymere und DNA auch aussalzen.

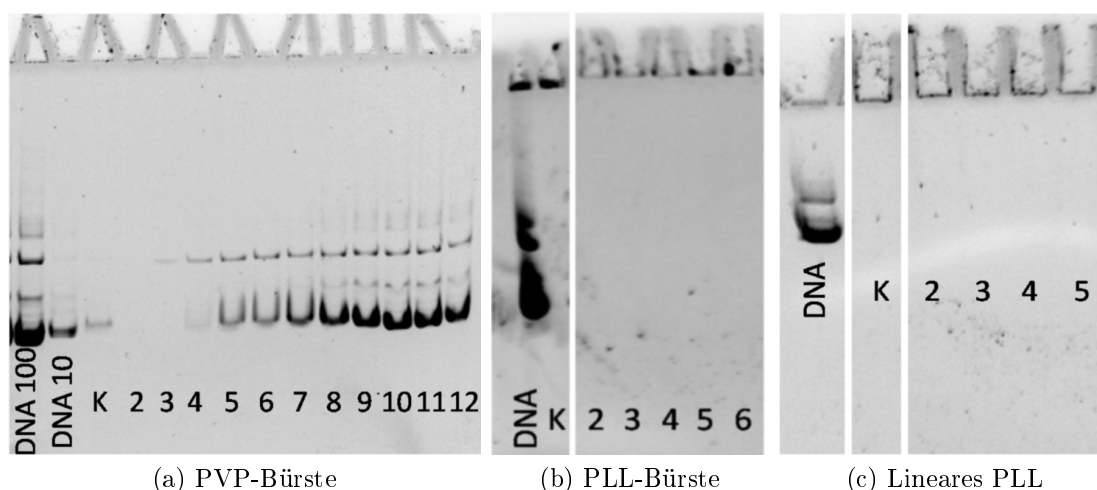


Abbildung 5.3: Freisetzungsexperimente an verschiedenen Komplexen mit pUC19-DNA. Als Kompetitor wurde NaCl verwendet.

Abbildung 5.3a: DNA 100: pUC19-DNA 100mg/l, DNA 10: pUC19-DNA 10mg/l, K: Komplex, Spalte 2: 0.50mol/l NaCl, Spalte 3: 0.52mol/l NaCl, Spalte 4: 0.54mol/l NaCl, Spalte 5: 0.56mol/l NaCl, Spalte 6: 0.58mol/l NaCl, Spalte 7: 0.60mol/l NaCl, Spalte 8: 0.62mol/l NaCl, Spalte 9: 0.64mol/l NaCl, Spalte 10: 0.66mol/l NaCl, Spalte 11: 0.68mol/l NaCl, Spalte 12: 0.70mol/l NaCl; Abbildung 5.3b: Spalte 2: 2mol NaCl, Spalte 3: 1mol NaCl, Spalte 4: 0.5mol NaCl, Spalte 5: 0.33mol NaCl, Spalte 6: 0.15mol NaCl;

Abbildung 5.3c: Spalte 2: 0.15mol NaCl, Spalte 3: 0.5mol NaCl, Spalte 4: 1mol NaCl, Spalte 5: 1.5mol NaCl

Die Untersuchung der Komplexe bei verschiedenen Salzgehalten zeigt, dass alle Komplexe bei physiologischem Salzgehalt (150mM Salz) stabil sind. Dies ist insbesondere für medizinische Anwendungen wichtig. Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, wird DNA aus PVP-Komplexen erst ab etwa 0.56mol/l NaCl freigesetzt. Dann nimmt die Menge der freigesetzten DNA mit der Menge NaCl zu. Tabelle 5.2 fasst die relativen Mengen freigesetzter DNA aus PVP-Bürsten-Komplexen zusammen. Der Verlauf der Freisetzung in Abhängigkeit der NaCl-Menge kann mit einem sigmoidalen Fit angepasst werden (Abbildung 5.4). Die Polylysin-Komplexe (sowohl PLL-Bürste als auch das lineare Analogon) bleiben auch bei sehr hohen Salzkonzentrationen bis zu 2 bzw. 1.5mol/l NaCl stabil. Auf dem Gel kann keine DNA detektiert werden. Auch bei Erhöhung der NaCl-Gehalte auf bis zu 3mol/l wird

keine DNA freigesetzt. Die Verwendung von Salzen mit anderen Anionen (Thiocyanat und Fluorid) führt ebenfalls nicht zur Freisetzung von DNA (Abbildungen nicht gezeigt).

Tabelle 5.2: Menge freigesetzter DNA aus PVP-Bürsten-Komplexen mit NaCl als Kompetitor

	Fläche (PVP-Komplexe)	% freie DNA
0.56mol/l NaCl	393	6
0.58mol/l NaCl	3624	58
0.60mol/l NaCl	3983	64
0.62mol/l NaCl	4799	77
0.64mol/l NaCl	5469	88
0.66mol/l NaCl	5110	82
0.68mol/l NaCl	5231	84
0.70mol/l NaCl	5386	86
Komplex	509	8
reine DNA	6247	100

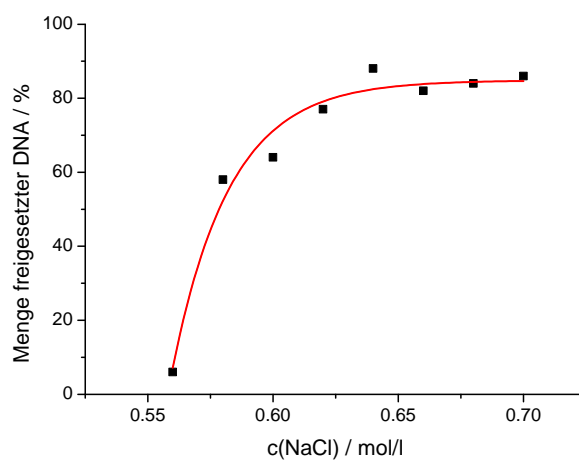


Abbildung 5.4: Menge freigesetzter DNA aus PVP-Bürsten-Komplexen in Abhängigkeit der zugegebenen NaCl-Menge.

Die Messungen können verglichen werden mit den Beobachtungen von Bronich et al. [BKM01]. Hier werden die Komplexbildung von poly[d(AT)]·poly[d(AT)] mit 1620 Basenpaaren und PEO-*g*-PEI-Copolymeren untersucht und eine Abnahme der Assoziationskonstanten mit steigendem Salz (zwischen 17mM und 217mM) festgestellt. In 0.2mol NaCl ist die Änderung der freien Energie $\Delta G_0 = -2.6\text{kcal/mol}$ im Vergleich zu $\Delta G_0 = -5.6\text{kcal/mol}$ in 17mM NaCl. Dies liegt, wie mit ITC-Messungen gezeigt wurde, an der Abnahme des

Entropieterms. Der Enthalpieterm ist positiv, aber sehr klein und unterscheidet sich nicht signifikant bei den verschiedenen Salzkonzentrationen. Je mehr Salz in der Lösung, desto weniger Entropie wird bei der Komplexbildung gewonnen. Dies lässt sich auch bei den untersuchten PVP-pUC19-Komplexen beobachten. Die benötigte Salzmenge ist jedoch deutlich größer als 217mM um eine Assoziation zu verhindern bzw. Komplexe aufzulösen.

CD-Spektroskopie an Komplexen in unterschiedlichem Salzgehalt

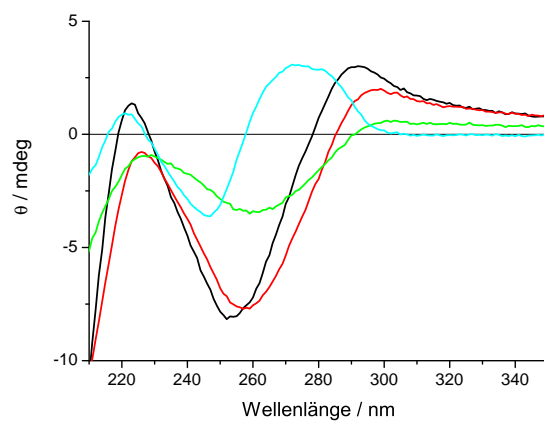
Zur weiteren Überprüfung der Komplexstruktur bei Zugabe von NaCl wurden CD-Spektren aufgenommen. Dazu wurde die Elliptizität θ von pUC19-DNA und verschiedenen Komplexen im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 350nm aufgenommen. Es wurden Komplexe mit Ladungsverhältnissen von $+/- = 1$ und $+/- = 2$ untersucht. Es zeigten sich qualitativ gleiche Spektren, so dass hier nur auf die Komplexe mit $+/- = 2$ näher eingegangen wird.

Ergebnisse Wie in Abbildung 5.5 im blauen Spektrum zu sehen ist, nimmt die reine pUC19-DNA in 500mM NaCl mit 5mM Phosphatpuffer eine typische Helix-B-Konformation an. Das Maximum der positiven Elliptizität liegt bei 275nm, das Minimum der negativen Elliptizität bei 245nm und der Nulldurchgang bei 258nm. Polylysin (Bürste und lineares Polymer) kompaktiert die DNA, wie in der Abnahme der Elliptizität bei 270nm zu sehen ist [FSGA70].

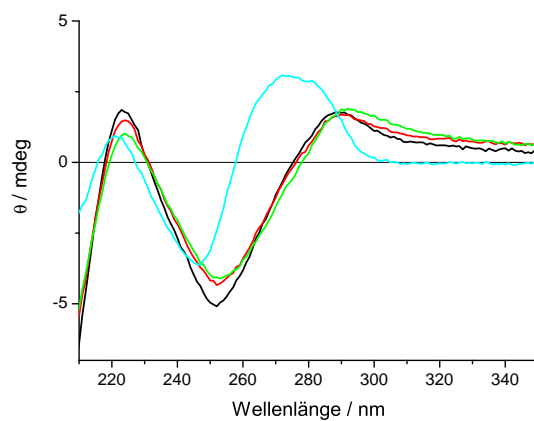
In den PLL-Bürsten-Komplexen (Abbildung 5.5, Mitte) verschiebt sich zusätzlich die negative Bande bei 246nm in der reinen DNA zu 252nm in den Komplexen. Für die verschiedenen Salzgehalte ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Da die Proben durch die Salzzugabe verdünnt werden (in reiner DNA hat die Elliptizität bei 270nm in 1mol NaCl noch 60% des Wertes in 5mM Phosphatpuffer), zeigt die gleichbleibende Höhe des Signals real eine Verstärkung der Bandenintensität mit zunehmender Salzkonzentration.

Mit linearem Polylysin (Abbildung 5.5, oben) verschiebt sich die Bande der reinen DNA (246nm) nach Komplexbildung zu größeren Wellenlängen. Je höher der Salzgehalt der Komplexlösungen, umso stärker die Rotverschiebung (5mM Phosphatpuffer: $\theta=252$ nm, 500mM NaCl: $\theta=282$ nm, 1mol NaCl: $\theta=261$ nm). Die Intensität der Banden (sowohl der negativen wie auch der positiven Elliptizität) nimmt ab, je höher die Molarität. Wie mit PLL-Bürste wird auch in den Komplexen aus linearem Polylysin die Bande bei 270nm kleiner. Das Maximum verschiebt sich zu höheren Wellenlängen. Der Effekt verstärkt sich, je mehr Salz in der Lösung ist.

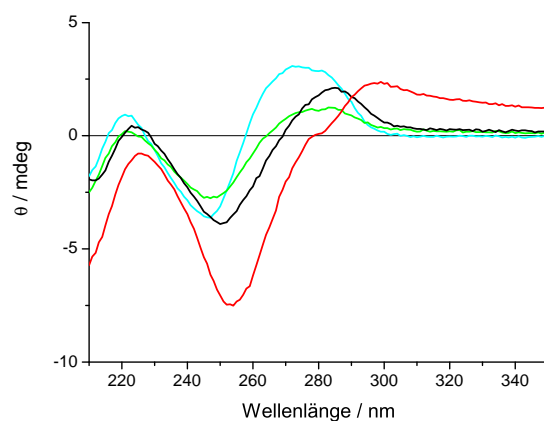
Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Fasman et al.



Lineares PLL-pUC19-Komplex



PLL-Bürsten-pUC19-Komplex



PVP-Bürsten-pUC19-Komplex

Abbildung 5.5: CD-Spektrum der verschiedenen Komplexe in unterschiedlicher Molarität: 5mM Natriumphosphatpuffer (-), 500mM NaCl (-) und 1mol NaCl (-). Zum Vergleich ist jeweils die reine pUC19-DNA in 500mM NaCl (-) aufgetragen.

[FSGA70], die die Kompaktierung der DNA mit Histonen untersucht haben. Die DNA ist also in den Komplexen kompaktiert, Salzzugabe führt zu einer weiteren Aggregation der Komplexe. Der Vergleich der Werte für θ der Komplexe aus linearem Polylysin und Polylysin-Bürste zeigt eine deutlich stärkere Änderung des CD-Spektrums bei Komplexbildung der DNA mit linearem Polylysin als mit dem Bürstenpolymer. Das Minimum ist zu deutlich kleineren Werten verschoben und auch die Rotverschiebung des Maximums ist mit linearem PLL stärker ausgeprägt. Dies könnte an der höheren Flexibilität des linearen Polymers liegen, das im Gegensatz zum steifen Bürstenpolymer bei gleichem Ladungsverhältnis vermutlich mehr DNA-Ladungen ausgleichen kann und damit besser bindet. Die Ladungen in der Bürste sind sehr stark lokalisiert, wenn die Bürste an einen DNA-Strang bindet, kann sie nicht alle ihre Ladungen ausgleichen. Am linearen Polymer dagegen sind die Ladungen weiter verteilt und es können deutlich mehr Bindungen an Phosphatgruppen gebildet werden. Zusätzlich sind die Ladungen im Inneren der Bürste, nahe des Rückgrats, sterisch sehr gut geschützt und deshalb nur schwer zugänglich.

Die PVP-Komplexe zeigen bis zu 500mM NaCl das gleiche Verhalten wie die Polylysin-Komplexe, die DNA wird stark kompaktiert, die Elliptizität bei 270nm nimmt stark ab und das Minimum verschiebt sich zu höheren Wellenlängen. In 1molarer NaCl-Lösung stimmt das CD-Spektrum wieder mit dem Spektrum reiner DNA überein. Die Bandenintensität ist kleiner, die Positionen des Maximums und Minimums sind nahezu bei den Werten der DNA. Die Kompaktierung der DNA nimmt also bei PVP-Komplexen in 1M NaCl wieder ab. Dies wird auch in den Beobachtungen im Freisetzungsexperiment auf dem Agarosegel (vgl. Abbildung 5.3) bestätigt. In 1M NaCl sind die Komplexe vollständig aufgelöst und die DNA liegt unkomplexiert vor. Demgegenüber sind die Polylysin-Komplexe durch hohe Salzkonzentrationen nicht aufzulösen und zeigen in den CD-Spektren einen hohen Kompaktierungsgrad der DNA.

Zusammenfassung Gelelektrophorese und CD-Spektroskopie haben gezeigt, dass durch erhöhte Konzentrationen an NaCl die Komplexe aus PVP-Bürste und pUC19-DNA aufgelöst werden können. Es werden dazu mindestens 0.56mol/l NaCl benötigt. Bei physiologischem Salzgehalt sind alle untersuchten Komplexe stabil. Polylysin-Komplexe lassen sich selbst bei sehr hohen Salzkonzentrationen über 2M nicht auflösen.

5.1.3 Rinderserumalbumin als Kompetitor

Rinderserumalbumin (BSA) ist ein globuläres, negativ geladenes Protein und stellt somit einen möglichen Kompetitor für die Polykation-DNA-Komplexe dar. Serumalbumin ist das häufigste Protein im Blut mit typischen Konzentrationen von 50g/l [CH94]. BSA selbst wird von Ethidumbromid auf dem Gel leicht angefärbt und ist als Schatten in allen Spalten mit BSA zu sehen (Abbildung 5.6). Für die Komplexe aus PVP-Bürste und linearem PLL kann durch Zugabe von BSA in Konzentrationen bis zu 150g/l keine DNA freigesetzt werden (Abbildung 5.6a). Bei Erhöhung der BSA-Menge auf 241g/l kann jedoch aus den PVP-Komplexen DNA freigesetzt werden (vgl. Abbildung 5.11). Für die PLL-Bürsten-Komplexe (Gelbild 5.6b) zeigt sich eine vollständige Auflösung der Komplexe über alle eingesetzten BSA-Konzentrationen von 150g/l bis 25g/l. Lichtstremessungen an Mischungen von PVP-Bürste und BSA zeigen eine deutliche Erhöhung der Streuintensität im Vergleich zu den Einzelkomponenten. Bei einem Streuwinkel von 90° ist $I(\text{PVP}, 10\text{mg/l}) = 4.5\text{kHz}$ und $I(\text{BSA}, 10\text{g/l}) = 58\text{kHz}$, eine 1:1-Mischung der beiden Komponenten sollte also ungefähr in einer Intensität von 20kHz resultieren, beobachtet wird jedoch eine Intensität von 65kHz. Dies deutet auf eine Komplexbildung hin, beim Fitten der Korrelationsfunktionen aus der dynamischen Lichtstreuung lassen sich diese durch einen triexponentiellen Fit anpassen. Dabei werden zwei Exponentialfunktionen konstant gehalten mit den Abklingzeiten der reinen Komponenten und die dritte Exponentialfunktion zum Fitten der Komplexe verwendet. Trotz des hohen BSA-Überschusses liegt also noch freie PVP-Bürste in der Lösung vor. Die Komplexbildung ist unvollständig, BSA zeigt kein gutes Komplexierungsvermögen der PVP-Bürste. Dies erklärt auch, dass mit BSA keine DNA aus den PVP-Komplexen freigesetzt wird. Bei der Mischung von PLL-Bürste mit BSA steigt ebenfalls die Streuintensität über den für eine reine Mischung der Komponenten zu erwartenden Wert. Die Korrelationsfunktion lässt sich jedoch nicht mit einer triexponentiellen Funktion aus PLL-Bürste, BSA und Komplex anpassen. Lediglich die Abklingzeit für BSA kann konstant gehalten werden. Die Polylysinbürste wird also vollständig von BSA komplexiert. BSA bindet effektiv an die Bürste und kann deshalb auch DNA aus dem PLL-Bürsten-DNA-Komplex verdrängen.

Zusammenfassung Rinderserumalbumin vermag schon bei der kleinsten untersuchten Konzentrationen die DNA quantitativ aus den PLL-Bürsten-Komplexen zu lösen (13 BSA-Ladungen pro 1 DNA-Ladung). Komplexe mit linearem Polylysin bleiben dagegen stabil. Aus den PVP-Bürsten-Komplexen kann erst bei BSA-Konzentrationen über 150g/l

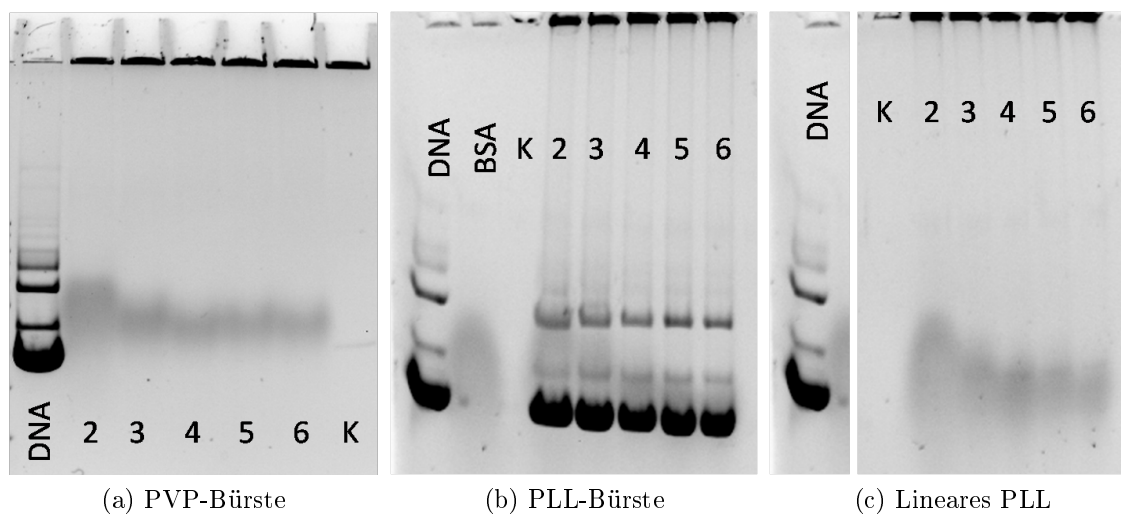


Abbildung 5.6: Freisetzungsexperimente an verschiedenen Komplexen mit pUC19-DNA mit Rinderserumalbumin (BSA) als Kompetitor. Die Gesamtkonzentration an BSA beträgt jeweils: Spalte 2: 150g/l BSA, Spalte 3: 75g/l BSA, Spalte 4: 50g/l BSA, Spalte 5: 37.5g/l BSA, Spalte 6: 25g/l BSA. K: Komplex

DNA freigesetzt werden. Dies entspricht 82 negativen BSA-Ladungen pro 1 negative DNA-Ladung. Lichtstreuungsmessungen zeigen ebenfalls, dass PVP und BSA keine stabilen Komplexe bilden, währenddessen die PLL-Bürste BSA gut komplexiert.

5.1.4 RNA als Kompetitor

RNA kommt in der Zelle natürlich vor, z.B. als Transporter der genetischen Information (transfer RNA), in den Ribosomen (ribosomale RNA) oder als Boten-RNA (messenger RNA) [VVBS94]. Die verschiedenen RNAs nehmen ganz spezifische Aufgaben in der Zelle wahr, trotzdem sind sie prinzipiell auch in der Lage mit dem Komplex zu interagieren. In diesem Versuch wurde RNA aus Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) als Kompetitor verwendet. Da RNA deutlich kleiner ist als DNA, läuft sie auf dem Gel schneller. Sie kann wie DNA auch mit Ethidiumbromid angefärbt werden und ist als Bande auf allen Gelen mit freier RNA zu detektieren.

Wie in Abbildung 5.7 zu sehen, vermag RNA die Komplexe nicht aufzulösen. Es kann keine freie DNA auf dem Gel detektiert werden, weder für die Bürsten-Komplexe noch für die Komplexe mit linearem Polykation. Die Polylysin-Bürsten-Komplexe sind sogar noch in der Lage, die RNA zusätzlich zu komplexieren, so dass auch keine freie RNA auf dem Gel zu erkennen ist. Der RNA-Versuch wurde deshalb noch einmal mit sehr großem

Überschuss an RNA durchgeführt (siehe Abbildung 5.8). Die RNA-Ladungen liegen im 5fachen Überschuss (im Vergleich zu den DNA-Ladungen) vor. Doch auch mit diesem großen Überschuss an Kompetitor, wird keine DNA aus dem Komplex gelöst. Dies könnte daran liegen, dass RNA sehr ähnlich zu DNA aufgebaut ist, der Abstand der Ladungen ist gleich, es ergibt sich also keine bessere Anpassung der Ladungsabstände im Komplex wenn DNA durch RNA ersetzt wird. Außerdem ist die verwendete RNA kürzer als die DNA. Zum Austausch eines DNA-Stranges müssten mehrere RNA-Moleküle an das Polykation gebunden werden, was entropisch ungünstig wäre.

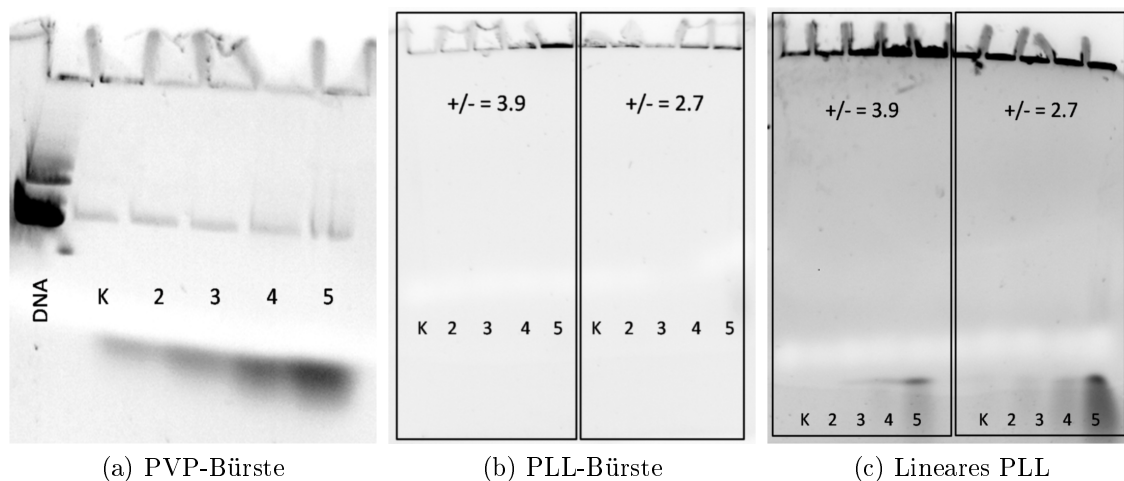


Abbildung 5.7: Freisetzungsexperimente an verschiedenen Komplexen mit pUC19-DNA. Als Kompetitor wurde RNA verwendet. In den Spalten 2-5 wurden dem Komplex verschiedene Mengen RNA zugefügt, sodass folgende Konzentrationen resultierten: Spalte 2: 25mg/l RNA, Spalte 3: 50mg/l RNA, Spalte 4: 100mg/l RNA, Spalte 5: 200mg/l RNA. Wie zu erkennen, wird durch RNA keine DNA aus den Komplexen freigesetzt. Die Polylysin-Bürste komplexiert sogar die gesamte RNA, sodass keine Bande der freien RNA auf dem Gel zu sehen ist.

Zusammenfassung Mit RNA kann im Konzentrationsbereich von 25mg/l bis 1g/l (entsprechend einem bis zu zehnfachen Überschuss negativer RNA-Ladungen) aus keinem der untersuchten Komplexe DNA freigesetzt werden. Der Austausch von DNA gegen RNA ist entropisch ungünstig, da RNA kürzer als die verwendete DNA ist. Außerdem stimmen die chemische Struktur annähernd und die Ladungsabstände völlig mit denen der DNA überein, sodass es auch enthalpisch nicht günstig ist, DNA mit RNA zu ersetzen.

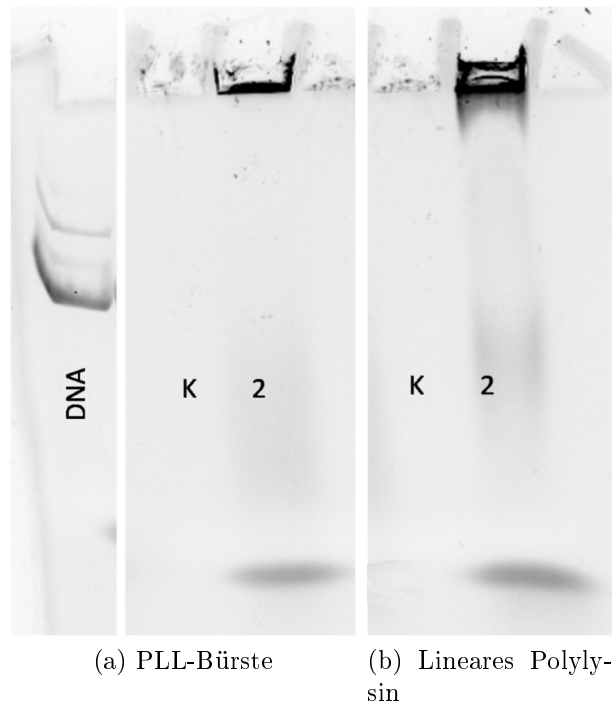


Abbildung 5.8: Freisetzungsexperimente an Polylysin-Komplexen mit pUC19-DNA mit großen Überschuss an RNA. Diese wurde als Lösung der Konzentration 1g/l in gleichen Volumen zu den Komplexlösungen gegeben, die Endkonzentration an RNA in der Lösung beträgt folglich 0.5g/l.

5.1.5 pH-Wert-Änderung zur Freisetzung von DNA

Eine Änderung des pH-Werts im Bereich von $\text{pH} = 7$ bis $\text{pH} = 3$ bewirkt keine Freisetzung der DNA. Auf den Agarosegelen (nicht gezeigt) wird keine freie DNA detektiert.

5.1.6 Release-Experimente in physiologischem Salzgehalt

Die vorigen Experimente wurden alle in 5mM Phosphatpuffer durchgeführt. Um die Freisetzung unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, werden die Versuche in 150mM NaCl mit 5mM Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) wiederholt (siehe Abbildung 5.9).

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- PVP-Bürste

Aus den PVP-Komplexen kann die DNA durch Heparin verdrängt werden. Die Verdrängung ist abhängig von der Heparin-Konzentration, erst ab einer Gesamtkonzentration von 0.15g/l in der Komplexmischung wird DNA freigesetzt. RNA setzt aus

PVP-Komplexen keine DNA frei, BSA kann bei einer Konzentration von 150g/l einen Teil der DNA aus dem Komplex mit PVP-Bürste lösen.

- PLL-Bürste

Die Komplexe aus pUC19-DNA und Polylysin-Bürste lassen sich durch Heparin (abhängig von dessen Konzentration) und durch BSA zum Teil auflösen. RNA hat keine Wirkung auf die Stabilität der Komplexe.

- lineares PLL

Wenn die DNA mit linearem Polylysin kompaktiert ist, kann keiner der untersuchten Kompetitoren sie aus dem Komplex lösen.

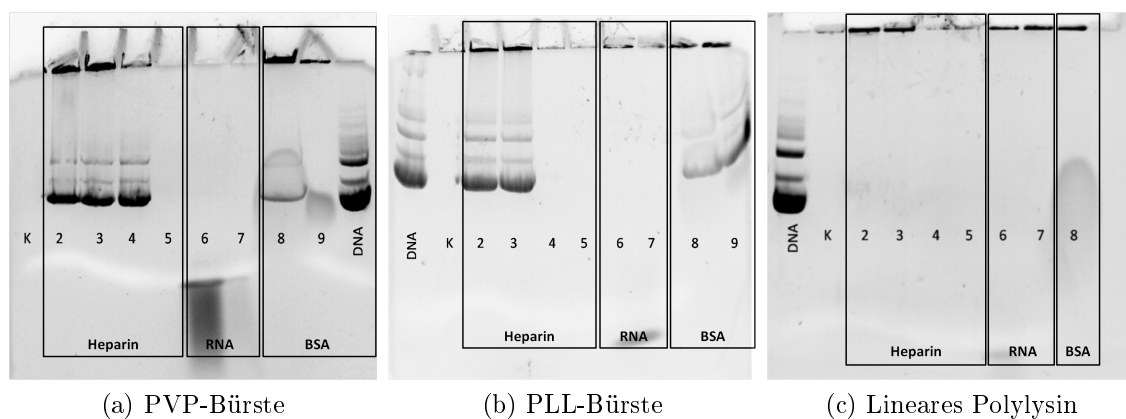


Abbildung 5.9: Freisetzungsexperimente an verschiedenen Komplexen mit pUC19-DNA in 150mM NaCl. In Spalte K ist jeweils der reine Komplex aufgetragen, in Spalte DNA ist die unkomplezierte DNA aufgetragen. In den Spalten 2-5 wurden dem Komplex verschiedene Mengen Heparin zugefügt:

Spalte 2: 15g/l Heparin, Spalte 3: 1.5g/l Heparin, Spalte 4: 0.15g/l Heparin, Spalte 5: 0.015g/l Heparin.

Die Spalten 6 bis 7 zeigen den Verdrängungsversuch mit RNA (Spalte 6: 0.5g/l RNA, Spalte 7: 0.05g/l RNA).

In Spalte 8 und 9 wurden die Komplexe mit BSA inkubiert: Spalte 8: 150g/l, Spalte 9: 15g/l.

Die Ergebnisse unterscheiden sich also lediglich bei der Verwendung von BSA als Kompetitor von den Versuchen in 5mM Phosphatpuffer. In physiologischem Salzgehalt verdrängt BSA in hohen Konzentrationen einen Teil der DNA aus den PVP-Komplexen, in 5mM Puffer ist dies nicht zu beobachten. Für die PLL-Bürsten-Komplexe dagegen ist der Freisetzungsgrad in physiologischem Salzgehalt geringer als in 5mM Phosphatpuffer.

Das unterschiedliche Freisetzungsverhalten in 5mM Phosphatpuffer und in 150mM NaCl lässt sich durch eine strukturelle oder eine Ladungsänderung des BSAs erklären.

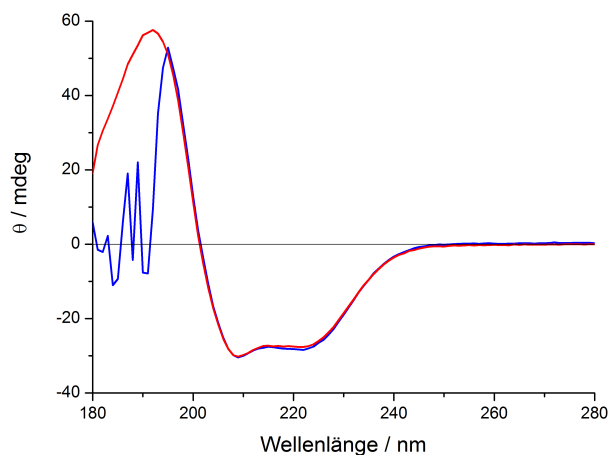


Abbildung 5.10: CD-Spektren von BSA in 5mM Phosphatpuffer (-) und in 150mM NaCl-Lösung (-)

Die CD-Spektroskopie zeigt keine strukturellen Veränderungen des BSA in Abhängigkeit des Salzgehaltes. Die Spektren von BSA (Abbildung 5.10) sind identisch in physiologischem Salzgehalt und in niedrigem Salz.

Es gibt jedoch Unterschiede im Ladungsgrad des BSA, wie von Tanford et al. durch Messung von Titrationskurven herausgefunden wurde [TB56][TBRS55][TSS55]. Die Autoren fanden eine erhöhte Diffusion der Protonen von den Carboxylgruppen, je höher der Salzgehalt der Lösung. Der elektrostatische Wechselwirkungsparameter w nimmt für BSA mit steigender Molarität ab und damit auch die elektrostatische Arbeit, die verrichtet werden muss um ein Proton der COOH-Gruppe abzulösen. Es werden vier Dissoziationskonstanten berechnet, wovon drei (die für Seitenketten-Carboxyle, ϵ -Aminogruppen und phenolische Gruppen) abnormale Werte zeigten. So wird das Carboxylation, die ungeladene Aminogruppe und die unionisierte phenolische Gruppe bevorzugt. Dieses Phänomen ist nicht vollständig geklärt. Tanford argumentiert, dass auf der Oberfläche des im Vergleich zu anderen Proteinen sehr großen BSA-Moleküls nur sehr wenige Ladungen Platz haben und ionisierbare Gruppen aus dem Inneren des Proteins nur schwer abdissoziieren können. Es können sich aber auch Salzbindungen zwischen Gruppen innerhalb des BSA-Proteins ausbilden, und so das Dissoziationsverhalten ändern.

Bei $\text{pH} = 7$ in 10mM Salz trägt BSA 11 negative Ladungen pro Molekül, das entspricht einer negativen Ladung pro 6000g/mol. Erhöht man die Molarität der Lösung auf 100mM, sind 18 negative Ladungen pro BSA-Molekül vorhanden. Dies entspricht einer negativen La-

dung pro 3667g/mol. Verwendet man diese Werte zur Berechnung der Ladungsverhältnisse $-/+$ für die Komplexmischungen aus PVP-pUC19-Komplex und BSA bzw. PLL-Bürsten-pUC19-Komplex mit BSA erhält man die in Tabelle 5.3 zusammengestellten Werte.

Tabelle 5.3: Ladungsverhältnisse $-/+$ für verschiedene pUC19-Komplexe nach BSA Zugabe

	PVP-Komplex	PLL-Bürsten-Komplex
150g/l BSA in 5mM NaPO	$-/+ = 16$	$-/+ = 11$
15g/l BSA in 5mM NaPO	$-/+ = 1.9$	$-/+ = 1.3$
150g/l BSA in 150mM NaCl	$-/+ = 25$	$-/+ = 17$
15g/l BSA in 150mM NaCl	$-/+ = 2.9$	$-/+ = 2.0$

Im folgenden wurden deshalb die Freisetzungsexperimente mit BSA in 5mM Phosphatpuffer und in 150mM NaCl wiederholt. Um die Experimente in Bezug auf das Ladungsverhältnis besser vergleichen zu können, wurde in beiden Proben das gleiche Ladungsverhältnis $-/+$ eingestellt. Hierzu wurden die oben genannten Ladungen in 10mM (11 negative Ladungen pro BSA) und in 100mM (18 negative Ladungen pro BSA) Salz verwendet. Um die gleiche Anzahl negativer Ladungen wie in 150mM Salz zu erhalten, muss die BSA-Konzentration in 5mM Puffer erhöht werden. Gleiche Anzahl negativer Ladungen erhält man bei Lösungen von 150g/l BSA in 150mM NaCl und 241g/l BSA in 5mM Puffer. Ebenso enthalten die Lösungen von 94g/l BSA in 150mM NaCl und 150g/l BSA in 5mM Puffer genau gleich viele negative Ladungen (siehe Abbildung 5.11 Spalten 2 und 3 sowie Spalten 4 und 8). Man sieht im Vergleich zu Abbildung 5.6a, dass bei sehr hohen BSA-Konzentrationen auch in 5mM Salz DNA aus den PVP-Komplexen gelöst wird. Wie aber vor allem im Vergleich der Spalten 2 und 3 zu erkennen ist, wird trotz gleichem Ladungsverhältnis $-/+$ nicht die gleiche Menge DNA freigesetzt. In physiologischem Salzgehalt ist weniger freie DNA vorhanden als in 5mM Phosphatpuffer. Ein Grund hierfür könnte die schlechtere Löslichkeit der PVP-Komplexe bei höherem Salzgehalt sein. Lichtstreuexperimente zeigen, dass in 150mM NaCl PVP-DNA-Komplexe deutlich aggregieren und im Vergleich die Aggregationstendenz auch wesentlich stärker ausgeprägt ist als für die PLL-Komplexe. Die schlechtere Löslichkeit erschwert auch die Freisetzung von DNA durch BSA.

Bei den PLL-Bürsten-Komplexen fällt der Vergleich schwerer, da die Auflösung nicht ausreicht um einen Intensitätsunterschied zu erkennen. Deutlich wird jedoch, dass mit 15g/l BSA (Spalte 6) ungefähr gleich viel DNA freigesetzt wird wie mit 150g/l (Spalte 5) und 94g/l BSA (Spalte 4), mit 1.5g/l BSA (Spalte 7) ist keine freie DNA mehr vorhanden.

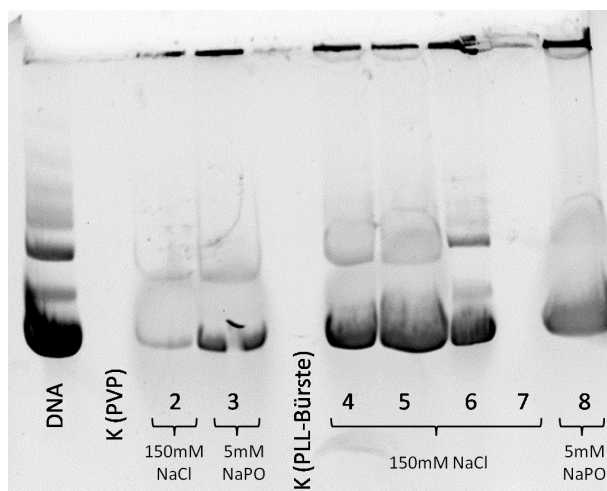


Abbildung 5.11: PVP-Bürsten- und PLL-Bürsten-Komplexe mit BSA in verschiedenen Salzgehalten.

Spalte K-PVP: Komplex aus PVP-Bürste und pUC19, Spalte 2: PVP-Bürste + pUC19 in 150g/l BSA in 150mM NaCl, Spalte 3: PVP-Bürste + pUC19 in 241g/l BSA in 5mM NaPO, Spalte K-PLL: Komplex aus PLL-Bürste und pUC19, Spalte 4: PLL-Bürste + pUC19 in 94g/l BSA in 150mM NaCl, Spalte 5: PLL-Bürste + pUC19 in 150g/l BSA in 150mM NaCl, Spalte 6: PLL-Bürste + pUC19 in 15g/l BSA in 150mM NaCl, Spalte 7: PLL-Bürste + pUC19 in 1.5g/l BSA in 150mM NaCl, Spalte 8: PLL-Bürste + pUC19 in 150g/l BSA in 5mM NaPO.

Spalte 2 und 3 sowie Spalte 4 und 8 haben jeweils das gleiche -/+ Ladungsverhältnis.

5.1.7 Zusammenfassung der Freisetzungsexperimente

Die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst. Auffällig ist der Unterschied zwischen linearem und büstenförmigem Polylysin. Trotz gleicher chemischer Zusammensetzung zeigen die beiden Polykationen ein sehr unterschiedliches Verhalten. Die Komplexe aus linearem Polylysin können mit keinem der verwendeten Kompetitoren aufgelöst werden, währenddessen die Bürstenpolymere durch Heparin und BSA aufgelöst werden. Aus den Komplexen mit PVP-Bürste lässt sich die DNA mit NaCl, Heparin und BSA freisetzen. Eine Änderung des pH-Wertes oder Zugabe von RNA zeigt keinen Effekt. Der Trend zeigt eine stabilere Komplexierung mit dem linearem Polymer. Ursache dafür ist der Ladungsmismatch (siehe Definition in 2.4), der dazu führt, dass die Bürstenpolymere nicht mit allen verfügbaren Ladungen an die DNA binden können. Die positiven Ladungen im Inneren der Bürste sind so dicht gepackt, dass sie schlechter zugänglich sind. Hugenberg zeigt in seiner Dissertation, dass Bürstenpolymere eine geringere effektive Ladung besitzen als lineare Polymere [Hug00]. Dies zeigt sich unter anderem in Messungen der Leitfähigkeit und in Lichtstreuungsmessungen, die einen Slow Mode für die Bürsten bei sehr

viel niedrigeren Salzgehalten zeigen als mit den linearen Polymeren. Die effektive Ladung spielt jedoch nur zu Beginn der Komplexbildung eine Rolle, wenn sich Polykation und Polyanion annähern. Ist die erste Bindung geknüpft, ist die Komplexbildung ein kooperativer Prozess, der durch den Entropiegewinn getrieben wird. Die chemische Ladung ist dann ausschlaggebend und nicht die effektive.

Zur vollständigen Freisetzung eines DNA-Moleküls müssen gleichzeitig alle Bindungen zum Komplex gelöst werden. Je mehr Bindungen vorhanden sind, umso unwahrscheinlicher ist dieser Prozess, wenn der Kompetitor nicht eine sehr viel höhere Affinität zum Polykation hat als DNA.

Eine weitere Erkenntnis aus den Freisetzungsexperimenten ist, dass die DNA durch die Komplexierung nicht verändert, denaturiert oder geschädigt wird. Auf den Gelbildern kann man beim Vergleich der unkomplexierten DNA und der aus den Komplexen freigesetzten DNA keinen Unterschied in der Verteilung von supercoiled, nicked und linearer DNA erkennen. Bei einer Denaturierung der DNA, also dem Trennen des DNA-Doppelstranges, wäre es sehr unwahrscheinlich, dass sich die gleiche Menge nicked-DNA (ein Strang intakt als Ring, der andere Strang an einer Stelle gebrochen) bildet.

Tabelle 5.4: Ergebnisse der Release-Experimente an Komplexen aus pUC19-DNA und verschiedenen Polymeren in 5mM Phosphatpuffer und in 150mM NaCl. Als Kompetitoren wurden Heparin, BSA, NaCl, RNA und eine Änderung des pH-Wertes verwendet.

	PVP-Bürste	PLL-Bürste	lineares PLL
Heparin	Freisetzung steigt mit Konzentration	Freisetzung steigt mit Konzentration	lockert Struktur, aber keine Freisetzung
BSA	Freisetzung in 5mM NaPO über 150g/l BSA weniger Freisetzung in 150mM NaCl	Freisetzung in 5mM NaPO weniger Freisetzung in 150mM NaCl	keine Freisetzung
NaCl	Freisetzung steigt mit Konzentration	keine Freisetzung	keine Freisetzung
RNA	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung
pH	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung

5.1.8 Vergleich mit Literatur

Ähnliche Experimente zum Freisetzungsverhalten wurden von Bertschinger et al. [BBS⁺06] an PEI-Komplexen durchgeführt. Es wurden verschiedene lineare und verzweigte PEI verwendet. Die Autoren zeigen, dass Heparin, RNA und hohe Salzmolaritäten die Komplexe zerstören können. Im Gegensatz dazu sind die Komplexe bei Zugabe anderer DNA, die in Konkurrenz zur komplexierten DNA treten könnte, BSA oder einer Erniedrigung des pH-Wertes stabil. Je aggregierter die Partikel sind, desto weniger DNA konnte herausgelöst werden. Die Zugabe von RNA kann selbst in kleinen Konzentrationen die DNA aus den PEI-Komplexen lösen. Vor allem die kurzen PEI (lineare PEI mit 25000g/mol und Jet PEI (kommerzielles Transfektionsmittel), sowie verzweigtes PEI mit 2000g/mol) haben eine höhere Affinität zu RNA als zu DNA. Für verzweigte PEI höherer Molmasse (25000g/mol und 700000g/mol) werden größere Mengen RNA benötigt, die aber trotzdem nur kleine Mengen DNA freisetzen. Bei Zugabe von Konkurrenz-DNA, also einer anderen DNA, die die komplexierte DNA verdrängen soll, wird keine Freisetzung von DNA aus den Komplexen beobachtet. Die Autoren erklären die Unterschiede zwischen DNA und RNA im Freisetzungsverhalten mit der höheren Flexibilität der Einzelstrang-RNA im Vergleich zur doppelsträngigen DNA.

Die von Bertschinger et al. verwendeten Polykationen sind größtenteils deutlich kleiner als die in dieser Arbeit untersuchten Polylysine und PVP-Bürsten. Ihre Beobachtung, dass die Komplexe mit Polymeren großer Masse mit RNA nicht aufgelöst werden können, bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit.

Je länger ein Polymer, desto mehr Verknüpfungsstellen hat es mit der DNA. Desto unwahrscheinlicher wird es auch, dass alle diese Bindungen zur gleichen Zeit gelöst werden. Denn nur dann kann die DNA aus dem Komplex diffundieren. Schwache Kompetitoren induzieren vermutlich eher ein Gleichgewicht zwischen Bindung des Polykations an die DNA und an den Kompetitor. Je mehr Bindungsstellen vorhanden sind, desto schwerer wird es alle zum gleichen Moment zu brechen. Deshalb können kleine Polymere eher abgetrennt werden als große Polymere.

Izumrudov et al. beschreiben die Austauschreaktion eines Poly(methacrylat)-Poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium)-Komplexes mit DNA [IKZ⁺95]. Die Autoren zeigen, dass DNA umso mehr und umso schneller gegen Poly(methacrylat) ausgetauscht wird, je kürzer die Polykation-Ketten sind. Dazu vergleichen sie PVP des Polymerisationsgrades 30 und 130. Während mit dem kürzeren Polykation die Austauschreaktion schon nach wenigen Minuten im Gleichgewicht ist, dauert es mit dem längeren Polykation mehrere Tage. Außerdem

erhöht sich die Austauschgeschwindigkeit mit der zugesetzten Salzmenge und mit der Steifigkeit der Polyionen.

Die Erhöhung des Salzgehaltes auf 1-2M NaCl führte in Bertschingers Arbeit bei allen Komplexen zur Freisetzung der DNA. Für die PVP-Bürsten-Komplexe wurde dieselbe Beobachtung gemacht, die Polylysin-Komplexe sind jedoch auch bei noch höheren Molaritäten stabil.

Miller et al. haben die Bindung von linearem Poly-4-vinylpyridin, das mit Ethylbromid quaternisiert wurde, an DNA untersucht[MB68]. Dabei vergleichen sie die Bindungskonstanten von Cd^{++} an DNA, wenn bereits PVP an die Nukleinsäure gebunden ist. Sie finden eine ausschließlich elektrostatische Bindung des PVPs an die DNA, die sogar schwächer ist als die Bindung von Natriumionen. Damit bestätigen sie die Aussage von Ross et al. [RS64], dass quaternäre Ammoniumionen schwächer an DNA binden als Na^+ . Desweiteren zeigen die Autoren, dass PVP einen Abschirmeffekt auch auf die ungebundenen Stellen der DNA ausübt.

5.2 Schutz der DNA im Komplex gegen DNase-Abbau

DNase ist ein Enzym, das DNA hydrolisiert. Man unterscheidet Endonukleasen, die den Strang überall schneiden können, und Exonukleasen, die die DNA nur vom Ende her abbauen. DNase I ist eine Endonuklease, die die DNA relativ sequenzunabhängig (mit einer leichten Präferenz für Purin-Pyrimidin-Bindungen) zu Oligonukleotiden spaltet. Die Spaltung erfolgt jedoch relativ spezifisch an doppelsträngiger DNA, DNA-RNA-Hybride oder Einzelstrang-DNA werden vom Enzym schlecht gebunden und geschnitten. Diese Spezifität beruht auf der Bindung der DNase durch eine exponierte Schleifenregion, die sich in die kleine Furche der DNA-Helix einlagert. Die Dimension der kleinen Furche von 13\AA passt ideal zur Größe der DNase und katalysiert so die Hydrolyse-reaktion. Ein kleinerer oder größerer Abstand wirkt inhibitorisch auf das Enzym. Starke Krümmungen, die zu einer Verengung der kleinen Furche führen, verringern deshalb die Effizienz der DNase [VVBS94]. Da DNase I jedoch ein sehr kleines Enzym ist, schneidet sie alle freiliegenden Phosphodiesterbrücken, auch Einzelstränge können geschnitten werden [persönliche Mitteilung von Erwin Schmidt, Institut für Genetik, Universität Mainz].

Suck und Oefner [SO86] haben die Struktur von DNase I durch Röntgenstreuung aufgelöst und den folgenden Wirkungsmechanismus vorgeschlagen (siehe Abbildung 5.12). In einer Säure-Base-katalysierten Reaktion wird ein Proton vom Glutaminsäurerest E75 auf den Histidinrest H131 übertragen, der wiederum ein Proton vom Wasser aufnimmt. Dieses greift dann die Bindung zwischen Phosphor und dem Sauerstoff am 3'-Ende an und spaltet diese. Der nukleophile Angriff wird durch die positive Ladung der Calciumions, das mit der Phosphatgruppe wechselwirkt, erleichtert.

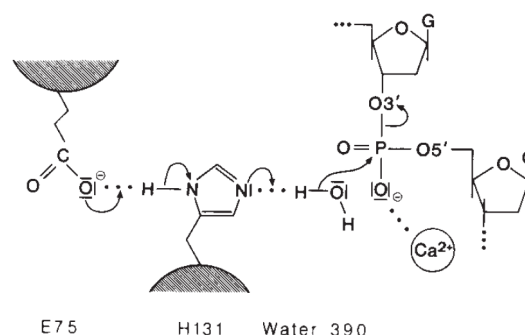


Abbildung 5.12: Wirkungsmechanismus von DNase I. Das Carboxylation an E75 akzeptiert ein Proton von H131, was wiederum ein Proton von Wasser aufnimmt. Dieses kann dann die Phosphatbindung nukleophil angreifen. Das Calciumion erleichtert den nukleophilen Angriff und positioniert die Phosphodiesterbindung in Bezug zum Enzym, sodass die Spaltung optimal erfolgen kann. Abbildung aus [SO86].

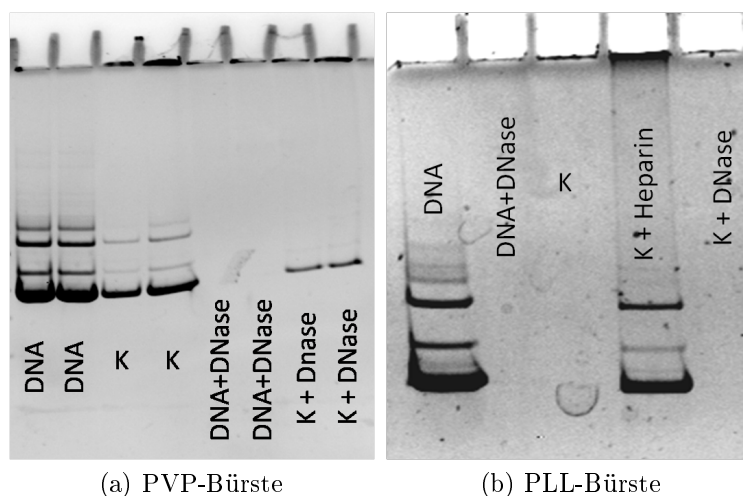


Abbildung 5.13: Tests zum Schutz der DNA in den Komplexen vor Abbau durch DNase. DNA: reine pUC19-DNA in der Konzentration, wie sie pro Spalte im Komplex vorhanden ist, K: Komplex; DNA+DNase: pUC19-DNA + DNase, K+Heparin: Komplex in 15g/l Heparinlösung, K+DNase: Komplex + DNase und nach Inaktivieren der DNase zusätzlich Heparinzugabe

Die Komplexierung von DNA mit Polykationen soll auch als Schutz gegenüber enzymatischen Abbau durch DNasen dienen. Freie DNA kann im Cytoplasma von cytosolischen Nukleasen degradiert werden.

Um den Schutz der DNA bei Kompaktierung mit verschiedenen Polykationen zu testen, werden die Komplexe mit DNase I versetzt. Die verwendete Aktivität der DNase ist genau ausreichend um die gesamte zur Komplexierung verwendete DNA abzubauen.

5.2.1 Ergebnisse

Abbildung 5.13 zeigt DNase-Versuche für Komplexe aus PVP-Bürste bzw. PLL-Bürste mit pUC19-DNA. Die Komplexe wurden im Massenverhältnis 1000:400 (Polykation:DNA) angesetzt. Dies entspricht einem Ladungsverhältnis von $+/- = 2.7$ für PVP-Komplexe bzw. $+/- = 3.9$ für Polylysin-Komplexe. Für PVP wurden alle Experimente in Duplikaten durchgeführt. Wie in den Spalten *DNA+DNase* zu sehen ist, reicht die eingesetzte Menge DNase um die gesamte DNA abzubauen (keine DNA-Bande). In Abbildung 5.13a erkennt man, dass der PVP-Komplex alleine (Spalte K) schon einen Anteil freie, unkomplexierte DNA hat, diese sieht man im Gel zur Anode laufen. Bei DNase-Zugabe wird dieser freie DNA-Anteil natürlich degradiert. Nach Inaktivieren der DNase und Heparinzugabe, sieht man jedoch wieder eine Bande mobiler und intakter DNA auf dem Gel. Der Komplex bietet also

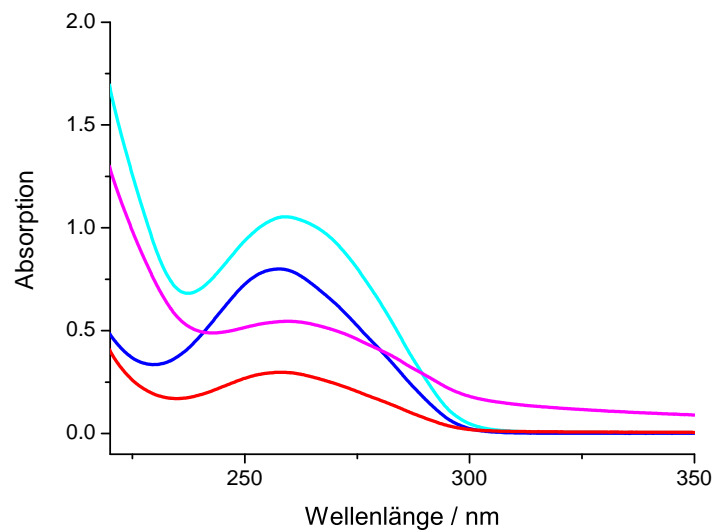


Abbildung 5.14: UV-Spektren von DNA und Komplexen aus linearem Polylysin und DNA vor und nach DNase-Behandlung. (-) DNA, (-) DNA nach DNase-Behandlung, (-) PLL-pUC19-Komplex, (-) PLL-pUC19-Komplex nach DNase-Behandlung.

einen Schutz gegenüber Degradation durch DNase. Erhöht man die DNase-Konzentration auf das fünffache, wird jedoch keine freie DNA mehr detektiert. Die Schutzhülle ist also nur für eine gewisse Menge an DNase wirksam. Der gleiche Versuch führt bei PLL-Bürsten-Komplexen (siehe Abbildung 5.13a) nicht zum Freisetzen intakter DNA. Polylysin-Bürsten bieten also keinen ausreichenden Schutz gegenüber DNase-Abbau.

Für lineares Polylysin konnte der DNase-Versuch nicht in dieser Form durchgeführt werden, da kein Kompetitor gefunden wurde, der die DNA aus dem Komplex freisetzt. So lässt sich nicht bestimmen, ob nach DNase-Einwirkung noch intakte DNA im Komplex vorhanden ist. Deshalb wurde anhand der UV-Absorption das Verhalten gegenüber DNase untersucht. DNase schneidet DNA in kleinere Bruchstücke, diese absorbieren bei einer Wellenlänge von 260nm stärker als der Doppelstrang (siehe Abbildung 5.14). Reine DNA der Konzentration 37mg/l hat eine Absorption von $A(260\text{nm}) = 0.790$. Nach Behandlung mit DNase absorbiert die gleiche Probe bei 260nm $A(260\text{nm}) = 1.052$. Die Absorption des Komplexes aus linearem Polylysin und pUC19-DNA (± 8) beträgt $A(260\text{nm}) = 0.296$, nach DNase-Behandlung ist $A(260\text{nm}) = 0.545$. Wenn die DNA im Komplex geschützt ist, sollte sich die Absorption nicht ändern. Die Erhöhung der Absorption spricht also für eine Degradation der DNA. Eine quantitative Aussage kann anhand der UV-Messung nicht getroffen werden.

Die Komplexierung von DNA mit linearem, quaternisiertem Poly(4-Vinylpyridin) und die Schutzwirkung gegenüber DNase wurde von Kabanov et al. untersucht [KAC⁺91]. Der Polymerisationsgrad des PVP lag allerdings nur bei 18. Verglichen werden Komplexe verschiedener Ladungsverhältnisse zwischen $+/- = 0.2$ und $+/- = 1$. Der Schutz gegenüber DNase-Degradation steigt mit zunehmendem Ladungsverhältnis. Bei $+/- = 1$ fallen die Komplexe aus und sind für einen Angriff der Nukleasen nicht mehr verfügbar.

5.2.2 Zusammenfassung

Der Schutz der DNA vor Angriffen durch DNase durch die Komplexierung wurde untersucht.

- PVP-Bürsten-Komplexe bieten Schutz gegenüber DNase-Degradation.
- In PLL-Bürsten-Komplexen wird die DNA von DNase vollständig abgebaut.
- Lineares Polylysin bietet ebenfalls keinen Schutz vor DNase Abbau.

Kapitel 6

Transfektionsexperimente

Die Transfektionen an Schweinehirnendothelzellen (PBMEC: porcine brain microvessel endothelial cells) wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Luhmann am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin Mainz untersucht. Sämtliche Zellversuche wurden von Diplom-Biologin Eweline Pietrowski durchgeführt und ausgewertet.

Schweinehirnendothelzellen sind interessant, da sie als Modell für die Blut-Hirn-Schranke dienen. Endothelzellen kleiden die Blutgefäße aus und bilden die Barriere zwischen Blut und Gewebe. Endothelzellen im Gehirn sind sehr selektiv in Bezug auf die Stoffe, die ins Gewebe eindringen dürfen. Die Endothelzellen sind durch sogenannte Tight Junctions sehr eng miteinander verbunden. Eine Diffusion durch die Zwischenräume zwischen den Zellen, wie sie z.B. zur Versorgung von Muskeln erfolgt, ist deshalb nicht bzw. nur für sehr wenige Moleküle (z.B. Wasser, Glycerin) möglich. Nur durch spezielle Transportmechanismen können gelöste Teilchen ins Gehirn aufgenommen werden. Das macht die Behandlung von Gehirntumoren so kompliziert. Neben der Diffusion durch die Tight Junctions oder auch durch die Zellen gibt es weitere Aufnahmewege: Transport durch Kanäle, der ohne Energieaufwand stattfindet und der aktive Transport mit zusätzlichem Energiebedarf, sowie den vesikulären Transport, bei dem die Substanzen in Vesikel aufgenommen werden, die sich aus der Zellmembran abschnüren. Zur Transfektion von Endothelzellen muss der Komplex ebenfalls in Membranvesikel aufgenommen werden um dann zum Zellkern transportiert zu werden. Eine erfolgreiche Transfektion beweist also die Aufnahme der Komplexe in die Zelle, der erste Schritt auf dem Weg zum Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke.

6.1 Aufnahme der Polykationen in PBMEC

Zunächst wird die Aufnahme der Polykationen allein, also ohne Komplexierung, untersucht. Es wird ermittelt, ob die Polykationen überhaupt von der Zelle aufgenommen werden oder ob sie gar nicht mit den Zellen wechselwirken. Dazu werden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Polykationen verwendet.

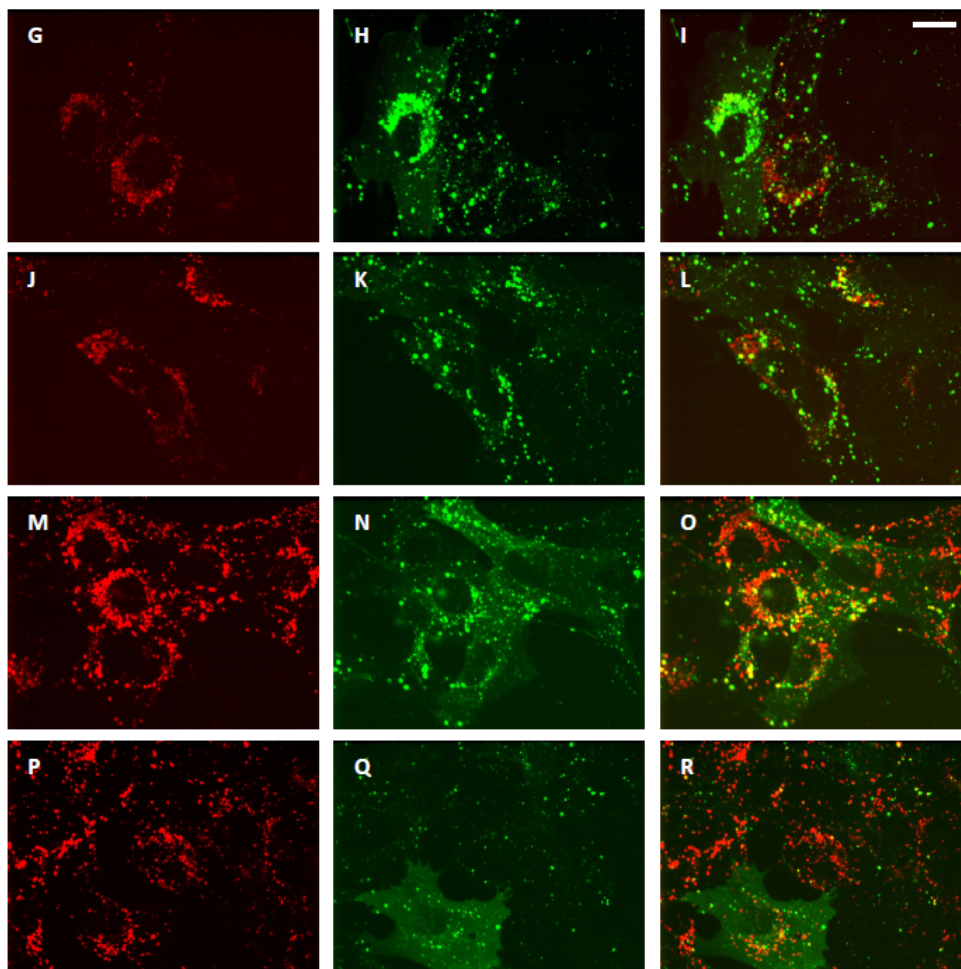


Abbildung 6.1: Konfokale Aufnahme von Rhodamin B auf PBMEC. Der Messbalken entspricht $20\mu\text{m}$.

1. Spalte: Rhodaminfluoreszenz
2. Spalte: Vybrant-Färbung (Zellmembran)
3. Spalte: Overlay

G-L: Rhodamin B $2\mu\text{g/ml}$, M-R: Rhodamin B $10\mu\text{g/ml}$. Mit Rhodaminkonzentrationen von $0.1\mu\text{g/ml}$ konnte keine rote Fluoreszenz detektiert werden.

Um auszuschließen, dass Rhodamin, das nicht an Polykation gebunden ist, in die Zellen eindringt und so die Bilder missinterpretiert werden, wird zunächst die Aufnahme von

reinem Rhodamin B in PBMEC untersucht. Dazu werden verschiedene Konzentrationen Rhodamin B verwendet ($10\mu\text{g}/\text{ml}$ und $2\mu\text{g}/\text{ml}$). Wie in Abbildung 6.1 zu sehen ist, wird auch der reine Farbstoff an die Zellmembran angelagert. Signifikant ist dieser Prozess aber erst bei Konzentrationen von $10\mu\text{g}/\text{ml}$, also deutlich höher als eine Verunreinigung aus nicht abgetrenntem freiem Farbstoff in der Polykationlösung (höchstens $0.35\mu\text{g}/\text{ml}$) sein kann.

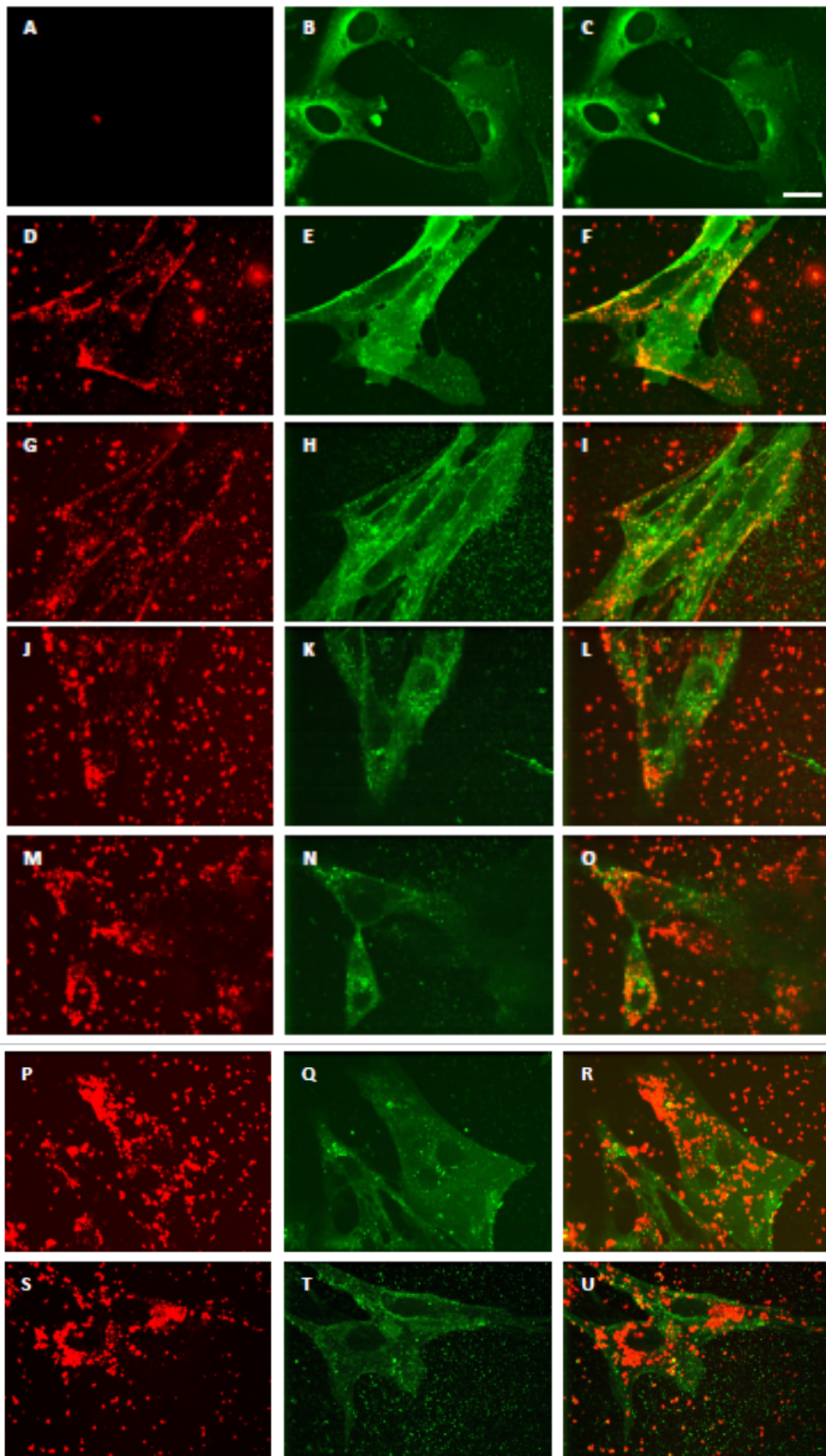
Abbildung 6.2 zeigt die konfokalen Aufnahmen der PBMEC mit linearem Polylysin. Dieses lagert sich an die Zellmembran (mit grünem Fluoreszenzfarbstoff markiert) an. Gelbe Stellen im Overlay der Membran-Färbung und der Rhodamin-Fluoreszenz zeigen, dass die Polykationen wirklich auf der Membran angelagert sind und nicht darüber oder darunter liegen.

6.2 Kommerzielles Transfektionsmittel Lipofektamin

Lipofektamin ist ein kommerziell erhältliches Reagenz (z.B. von Invitrogen) zur Transfektion eukariotischer Zellen. Es ist eine 3:1 (w/w) Liposomformulierung aus dem polykationischen Lipid 2,3-Dioleoyloxy-N-[2(spermin-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl- 1-propanaminium trifluoracetat (DOSPA) und dem neutralen Helferlipid Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE) in Wasser. Für eine optimale Transfektion wird $1\mu\text{g}$ DNA mit $3.33\mu\text{l}$ Lipofektamin gemischt. Die Transfektionseffizienzen von Lipofektamin an verschiedenen Zellen sind in Anhang D aufgelistet.

6.3 Transfektion mit Polylysin und Polyvinylpyridin

GFP-DNA wurde mit linearem und bürstenförmigem Polylysin sowie PVP-Bürste komplexiert, die hydrodynamischen Radien mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt und dann zur Transfektion auf PBMECs gegeben. Untersucht wurden verschiedene Verhältnisse von Polykation zu DNA, es wurde jedoch immer im Überschuss Polykation gearbeitet, um eine positive Ladung der Komplexe zu gewährleisten. Dies ist zur erfolgreichen Transfektion nötig, da sich positiv geladene Komplexe gut an die negativ geladene Zellmembran anlagern. Komplexe, die im Überschuss DNA hergestellt wurden, zeigten keine erfolgreiche Gentransfektion.



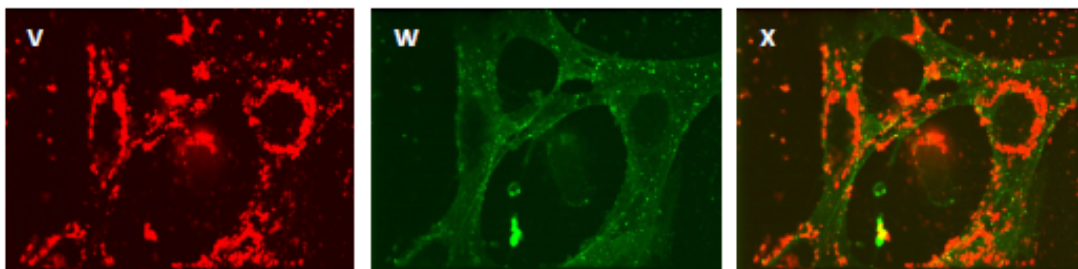


Abbildung 6.2: Konfokale Aufnahme von linearem Polylysine in PBMEC. Der Messbalken entspricht $20\mu\text{m}$.

1. Spalte: Rhodaminfluoreszenz (Polylysine)
2. Spalte: Vybrant-Färbung (Zellmembran)
3. Spalte: Overlay

A-C: Kontrolle ohne Polylysine, D-F: nach 30min Inkubationszeit, G-I: nach 1 Stunde Inkubationszeit, J-L: nach 2 Stunden Inkubationszeit, M-O: nach 4 Stunden Inkubationszeit, P-R: nach 6 Stunden Inkubationszeit, S-U: nach 8 Stunden Inkubationszeit, V-X: nach 24 Stunden Inkubationszeit

Zunächst wurden konfokale Bilder der transfizierten Zellen aufgenommen. Mit Komplexen aus Polylysine (linear und Bürste) können transfizierte Zellen, die das grün fluoreszierende Protein exprimieren, beobachtet werden (siehe Abbildung 6.3). Dabei sind die Zellmembranen mit Calcein rot angefärbt, die grüne Fluoreszenz stammt von den transfizierten Zellen. Die konfokalen Bilder zeigen jeweils nur einen kleinen Ausschnitt des Zellrasens, sie erlauben deshalb keine quantitative Aussage zur Transfektionseffizienz.

Um quantitative Aussagen über die Menge der transfizierten Zellen zu treffen, werden diese mit einem Durchflusszytometer analysiert. Dabei werden die Zellen einzeln durch eine dünne Kapillare gespült und ihre Fluoreszenz ausgelesen. Nicht transfizierte Zellen fluoreszieren ausschließlich rot auf Grund des Membranfarbstoffs, transfizierte Zellen zeigen rote und grüne Fluoreszenz.

In Tabelle 6.1 ist die Charakterisierung der zur Transfektion verwendeten Komplexe zusammengestellt. Die Molmassen sind apparente Molmassen der Mischung aus Komplex und Überschuss Polykation. Die exakte Menge unkomplexierte Polykationen kann durch Analyse der Lichtstreudaten nicht ermittelt werden. Ein Fit der Korrelationsfunktionen mit zwei biexponentiellen Fits (ein Fit für das Polykation und die anderen zwei Exponentialfunktionen für den Komplex) ist möglich. Die Analyse der Amplituden liefert jedoch keine physikalisch sinnvollen Ergebnisse. Verantwortlich dafür ist vermutlich die breite Verteilung der Polykationen (vor allem im Fall der PVP-Bürsten für die die Polydispersität $M_w/M_n = 5$ beträgt) und die sehr breite Verteilung der Komplexgrößen. Hier kommt es zu einer Überlappung der Verteilungsfunktionen, so dass die Komponenten nicht getrennt angefit-

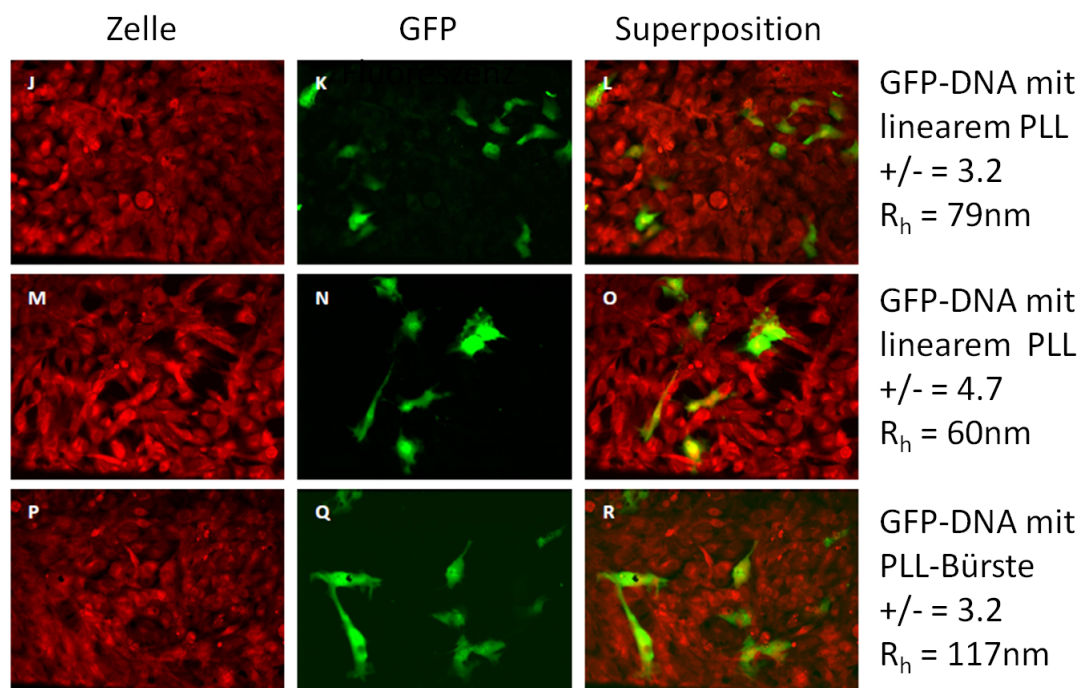


Abbildung 6.3: Konfokale Aufnahmen der mit Polylysin transfizierten PBMECs.

tet werden können. Eine Analyse des Komplexes per GPC ist ebenfalls nicht möglich, da die Bürstenpolymere mit dem Säulenmaterial interagieren und so keine Trennung erfolgt. Kapillarelektrophorese, die ohne Gelmatrix verwendet wird, könnte eine Abtrennung der Komplexe von unkomplexiertem Polykation ermöglichen und soll in Zukunft getestet werden. Dann kann auch die Dichte der Komplexe aus deren Molmasse und Radius bestimmt werden, ein Faktor, der ebenfalls wichtig für das Transfektionsvermögen der Komplexe sein könnte.

6.4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind in Abbildungen 6.4 bis 6.5 zusammengefasst. Alle Komplexe mit bürstenförmigen Polymeren haben gegenüber Lipofektamin eine deutliche höhere Transfektionseffizienz. Komplexe mit PVP-Bürste transfizieren 25% (bei einem Ladungsverhältnis von +/- = 19 in der Komplexmischung) bis 35% (Ladungsverhältnis +/- zwischen 9 und 4) der PBMEC-Zellpopulation, Lipofektamin erreicht nur Transfektionsraten kleiner als 10%. Es ist kein Trend der Transfektionseffizienz mit der Komplexgröße oder Zusammensetzung der Komplexmischung zu erkennen. Bei sehr großem

Tabelle 6.1: Charakterisierung der zur Transfektion verwendeten Komplexe. GFP-DNA wurde mit verschiedenen Polymeren in verschiedenen Verhältnissen komplexiert. R_h , R_g und $M_{w,app}$ wurden mit dynamischer und statischer Lichtstreuung bestimmt. $M_{w,app}$ ist das Gewichtsmittel der Molmasse der Mischung aus Komplexen und Überschuss Polykation.

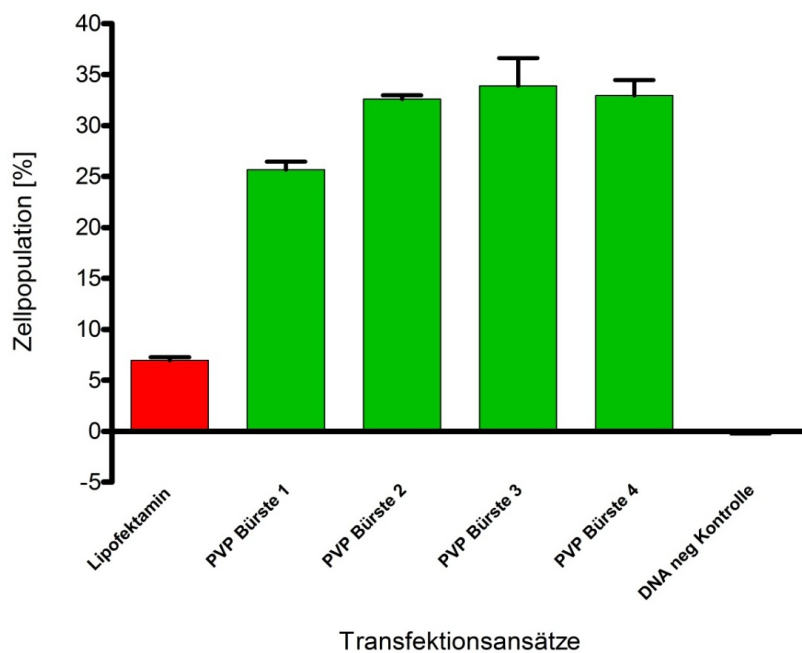
#	Polymer	w(DNA)	+/-	R_h / nm	$M_{w,app}$ / g/mol	R_g / nm	R_g/R_h
1	PVP-Bürste	0.05	19	101	5.13E+07	135	1.34
2	PVP-Bürste	0.1	9	121	5.49E+07	151	1.25
3	PVP-Bürste	0.14	6.1	173	4.11E+08	186	1.08
4	PVP-Bürste	0.19	4.3	216	9.46E+08	178	0.82
1	PLL-Bürste	0.072	20.4	69	1.74E+07	74	1.07
2	PLL-Bürste	0.13	10.6	83	5.56E+07	83	1.00
3	PLL-Bürste	0.2	6.3	94	9.91E+07	93	0.95
4	PLL-Bürste	0.25	4.7	140	9.79E+07	96	0.69
1	lin PLL	0.15	8.9	81	3.32E+07	67	0.83
2	lin PLL	0.2	6.3	145	-	-	-

Überschuss PVP (+/- = 19) ist die Transfektionsrate geringer als bei kleinerem Überschuss. Zwischen den Komplexen mit +/- = 9 und +/- = 4.3 ist jedoch kein Unterschied in der Transfektionseffizienz zu beobachten. Die Komplexgröße scheint ebenfalls kein Kriterium zur Bewertung der Transfektionseffizienz zu sein und auch die oft erwähnte Maximalgröße von 100nm Durchmesser für eine optimale Transfektion bestätigt sich im vorliegenden Experiment nicht. Die effizientesten Komplexe haben hydrodynamische Radien zwischen 120 und 220nm.

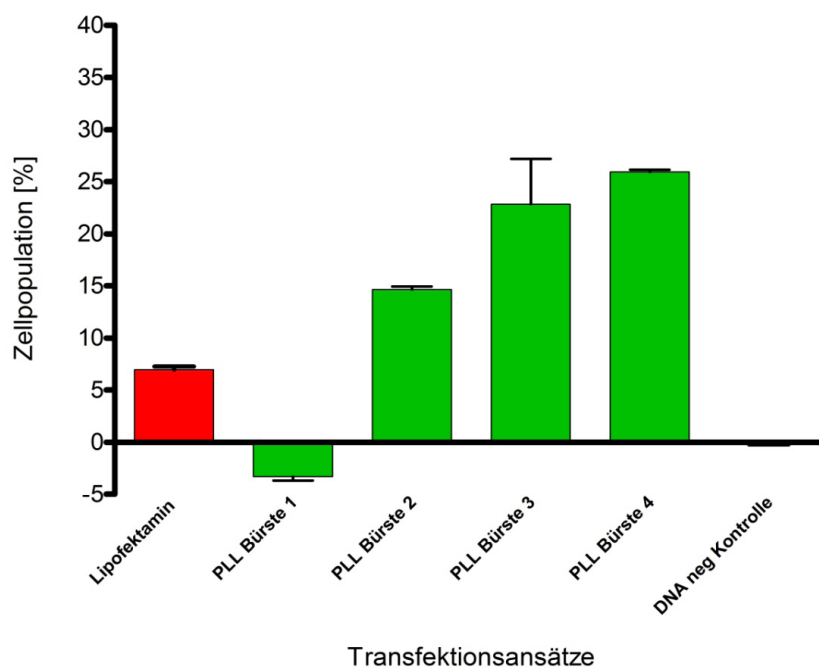
Die Transfektionsversuche mit Polylysin zeigen die Überlegenheit der bürstenförmigen Polykationen gegenüber den linearen Analoga in der Transfektionseffizienz. Komplexe, die bei ähnlichen Ladungsverhältnissen hergestellt wurden (PLL-Bürste #3 entspricht linearem PLL #2), haben völlig verschiedene Transfektionseigenschaften. Lineares Polylysin ist ein schlechtes Transfektionsagens, seine Effizienz liegt unter den Werten von Lipofektamin. Im Gegensatz dazu werden mit bürstenförmigem PLL Transfektionsraten von bis zu 25% erreicht.

Vergleicht man die Transfektionsergebnisse mit den Komplexeigenschaften aus Kapitel 5 (siehe Tabelle 6.2), so kann man folgende Schlüsse ziehen:

- Lineares Polylysin ist das ineffizienteste der getesteten Transfektionsmittel. Die Transfektionseffizienzen liegen deutlich unter den Lipofektamin-Werten. Komplexe mit li-



(a) Transfektionen mit Komplexen aus PVP-Bürste



(b) Transfektionen mit Komplexen aus PLL-Bürste

Abbildung 6.4: Transfektionsergebnisse der Komplexe mit PVP- und PLL-Bürste im Vergleich zum kommerziellen Standard Lipofektamin. Aufgetragen ist die transfizierte Zellpopulation in % der gesamten Population. Die Spaltenbeschriftungen für die Komplexe entsprechen denen in Tabelle 6.1. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Negative Werte entstehen durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz der Kontrollprobe.

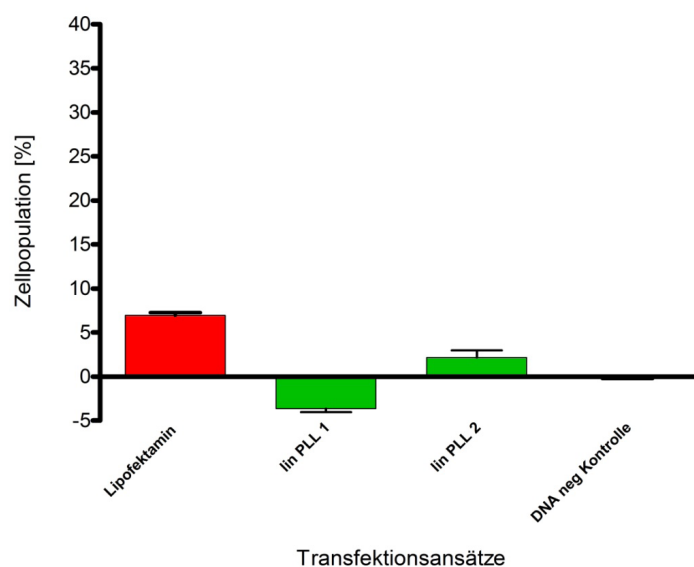


Abbildung 6.5: Transfektionsergebnisse der Komplexe mit linearem PLL im Vergleich zum kommerziellen Standard Lipofektamin. Aufgetragen ist die transfizierte Zellpopulation in % der gesamten Population. Die Spaltenbeschriftungen für die Komplexe entsprechen denen in Tabelle 6.1. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Negative Werte entstehen durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz der Kontrollprobe.

nearem Polylysin lassen sich mit keinem der verwendeten Kompetitoren auflösen. Sie bieten keinen Schutz gegenüber DNase-Abbau.

- Die Polylysin-Bürste zeigt gute Transfektionsraten, die deutlich über den Lipofektamin-Werten liegen. Aus den Komplexen lässt sich durch Heparin und BSA die DNA freisetzen. Sie bieten jedoch keinen Schutz gegenüber DNase.
- Die besten Transfektionen zeigen in dieser Arbeit die Komplexe mit PVP-Bürste. Die Komplexe sind durch NaCl und Heparin auflösbar und bei stöchiometrischer Menge DNase zum Teil vor dem Abbau geschützt.

Die Resultate lassen vermuten, dass das Freisetzungsverhalten einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz besitzt. Die Komplexe, die sehr stabil sind, transfizieren auch schlecht. Umgekehrt lässt sich jedoch nicht in Analogie schlussfolgern, dass Komplexe, die DNA unter Kompetitoreinfluss freisetzen, auch gleichzeitig gute Transfektionsagenzien sind. Der Schutz gegenüber DNase-Abbau ist ein Vorteil um die DNA intakt zum Zellkern zu transportieren. Die Fähigkeit Protonen zu binden und im Endosom als Protonenschwamm zu wirken, kann vorteilhaft beim Austritt aus dem Endosom ins Cytosol sein [vdWMSN⁺99].

Das ist der Grund, warum Polyethylenimin ein so gutes Transfektionsmittel ist. Lysin hat einen pks-Wert von 10.53 [JJ82], für 2-Vinylpyridin beträgt der pks-Wert 4.92 [BS57]. Die Polymere haben vermutlich etwas kleinere pks-Werte, da die Protonierbarkeit abnimmt, je mehr Seitenketten schon protoniert sind [vdWMSN⁺99]. Polylysin ist also bei pH 7 bereits vollständig protoniert, währenddessen das verwendete Polyvinylpyridin nur zu 53% mit Ethylbromid quaternisiert ist und noch Protonen binden kann. Dies kann zu einem osmotischen Quellen und Destabilisierung der endosomalen bzw. lysosomalen Vesikel führen [BLZ⁺95].

Interessant ist der Vergleich der Transfektionseffizienzen mit den Versuchen zur Ethidiumbromidverdrängung in 150mM NaCl. Die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Ladungsverhältnisses +/- ist in Abbildung 6.6 aufgetragen. Die Ethidiumbromidfluoreszenz erlaubt eine qualitative Aussage über die Anzahl der Bindungsstellen zwischen DNA und Polykation. Je niedriger die Fluoreszenz umso mehr Verknüpfungen wurden zwischen DNA und Polykation gebildet. Wie die Messung zeigt, sinkt die Fluoreszenz bei Zugabe von linearem Polylysin und Polylysin-Bürste sehr schnell ab. Bei einem Ladungsverhältnis von 1.5 ist noch etwa 20% der Ethidiumbromidfluoreszenz in unkomplexierter DNA detektierbar. Beide Polylysine binden also an vielen Stellen an die DNA. Im Gegensatz dazu beträgt selbst in hohem Überschuss an PVP-Bürste die Ethidiumbromidfluoreszenz noch 60 bis 80% des Ausgangswerts. Lichtstremessungen zeigen, dass Komplexe gebildet wurden, die Ethidiumbromidverdrängung deutet aber darauf hin, dass es deutlich weniger Bindungen zwischen PVP-Bürste und DNA gibt als zwischen Polylysin und DNA. Möglicherweise sind also freie Schlaufen oder Enden der DNA im Komplex verfügbar, die eine Transkription der DNA erleichtern.

Die Transfektionseffizienz wird also nicht nur durch das Freisetzungsverhalten kompletter DNA-Moleküle bestimmt (dieses kann durch die Freisetzungsexperimente wie in Kapitel 5.1 bestimmt werden), sondern auch durch die lokale Zugänglichkeit einzelner Stellen der DNA.

Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Komplexeigenschaften und Transfektionsergebnisse

	Toxizität Polykation	Schutz vor DNase	Freisetzung durch NaCl	Heparin	BSA	RNA	Transfektion
PLL-Bürste	▼	✗	✗	✓	✓	✗	+
PVP-Bürste	▼	✓	✓	✓	✗	✗	++
lineares PLL	▼	✗	✗	✗	✗	✗	--

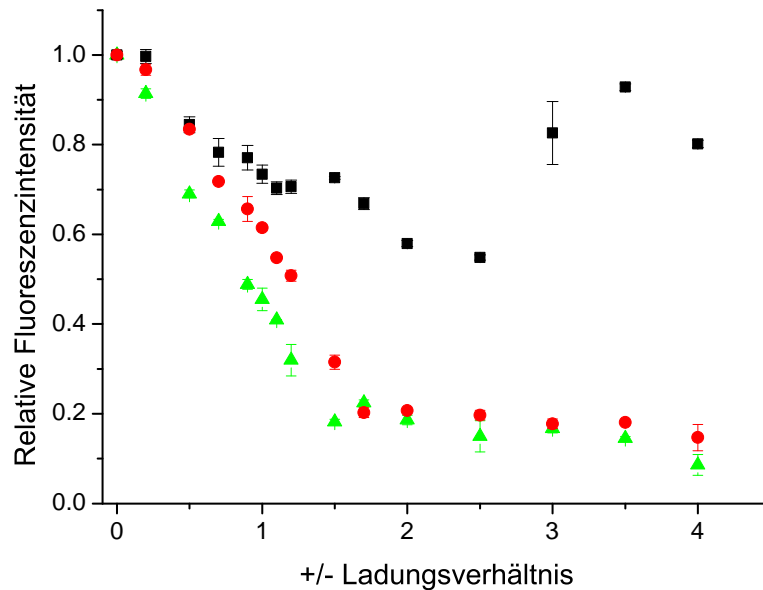


Abbildung 6.6: Ethidiumbromid-Verdrängung an Komplexen aus pUC19-DNA und verschiedenen Polykationen in 150mM NaCl: ■ PVP-Bürste, ● PLL-Bürste, ▲ lineares PLL. Aufgetragen ist die relative EtBr-Fluoreszenzintensität gegen das Ladungsverhältnis +/-.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wird standardmäßig der Anteil der transfizierten, d.h. grün fluoreszierenden Zellen, von der Gesamtheit aller detektierten Zellen bestimmt. Die Zellen werden mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt, das das an einzelnen Zellen gestreute Licht detektiert. Zellklumpen o.ä. werden in der Auswertung nicht mitgezählt. Zur üblichen Auswertung werden 10000 events ausgezählt und daraus die Transfektionseffizienz bestimmt. Sind die Zellen durch die Transfektionsbehandlung stark geschädigt und nur noch wenige intakte Zellen in der Probenlösung, dauert es länger bis 10000 events detektiert werden können. Die Messdauer bzw. die Zahl der events pro Zeiteinheit kann deshalb als Maß für die Schädigung der Zellen betrachtet werden. In Abbildung 6.7 sind neben den Transfektionseffizienzen auch die detektierten events pro Sekunde aufgetragen. Bei den Kontrollen liegen die Werte zwischen 150 und 250 events pro Sekunde, ebenso für alle untersuchten PVP-Bürsten-Komplexe. Deutlich weniger events pro Sekunde sind für die Polylysin-Komplexe zu beobachten.

Sowohl für das lineare Polymer, das in den Toxizitätstests, in denen reines, unkomplexiertes Polylysin verwendet wurde, nicht toxisch auf die Zellen wirkte, als auch das Bürstenpolymer in hohem Überschuss Polykation sind weniger als 75 events pro Sekunde

beobachtbar. Für die PLL-Bürsten-Komplexe 1 und 2 könnte die geringe Zahl der events pro Sekunde an der höheren Konzentration PLL-Bürste liegen. Im Komplex PLL-Bürste 1 beträgt die PLL-Konzentration 26mg/l, für den Komplex PLL-Bürste 13mg/l. Die Toxizität wurde für 10mg/l und 100mg/l überprüft. Bei 100mg/l war die Überlebensrate nach 24 Stunden auf unter 50% gefallen. Die genaue Menge an freien Polylysin in den Komplexen kann nicht bestimmt werden, aber möglicherweise liegt sie über 10mg/l und schädigt die Zellen in merklichem Umfang.

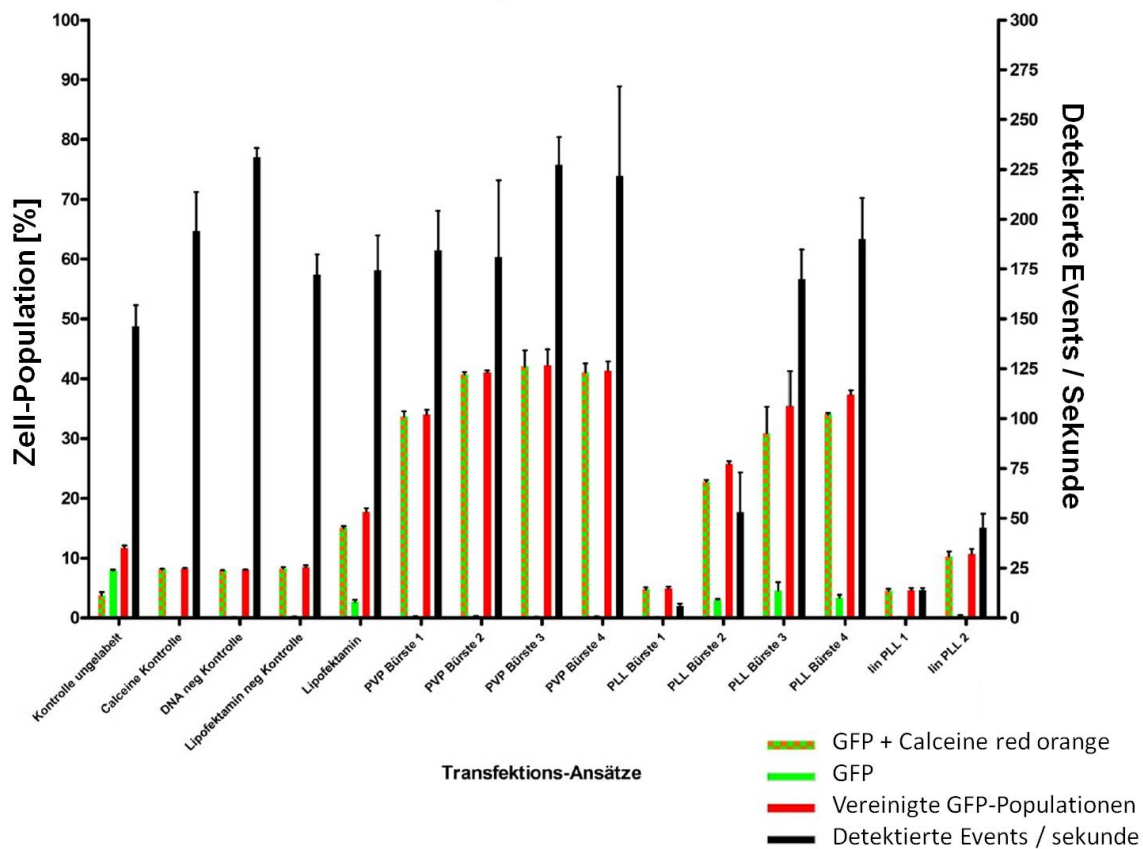


Abbildung 6.7: Darstellung der Transfektionseffizienzen zusammen mit den im Durchflusszytometer detektierten events pro Sekunde für die verschiedenen Transfektionsansätze. Die detektierten events pro Sekunde sind ein Maß für die Schädigung der Zellen. Je weniger events pro Sekunde gezählt werden, desto weniger intakte Zellen sind in der Probe.

Das lineare Polylysin zeigt alleine keine toxische Wirkung, selbst in hohen Konzentrationen von 1000mg/l sind die Zellen zu 100% vital. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Durchflusszytometeranalyse nach der Transfektion. Möglicherweise sind die Zellen in der Zellteilung behindert, so dass weniger Zellen pro Volumen vorhanden

sind. Oder die toxische Wirkung auf die Endothelzellen verändert sich durch der Komplexierung der DNA mit den Polykationen. Die Ergebnisse an unkomplexiertem Polykation lassen sich nicht direkt auf die Toxizität der Komplexe übertragen.

6.5 Literatur

Xu et al. [XPM⁺09] zeigen in ihrer Arbeit zu kammförmigen Polymeren aus einem Hydroxypropylcellulose-Rückgrat mit Poly((2-dimethylamino)ethylmethacrylat)-Seitenketten, dass die kammförmigen Polymere DNA ebenso gut kompaktieren wie lineare Polymere. Die Komplexgrößen liegen bei einem Ladungsverhältnis $+/- \geq 5$ im Bereich von 150 bis 200nm Durchmesser. Optimale Ladungsverhältnisse für die Gentransfektion finden die Autoren in serumfreien Medium bei $+/- = 7$. Bei höherem $+/-$ Werten nimmt die Transfektionseffizienz in HEK293 Zellen ab. Sie erklären dies mit der Anwesenheit von freiem, unkomplexiertem Polykation, das die Cytotoxizität erhöht und so die Transfektionseffizienz erniedrigt. Bei kleineren $+/-$ Verhältnissen führt eine nicht effiziente Kompaktierung zu einem lockeren Polymer-DNA-Komplex, der nicht so einfach in die Zelle eintreten kann. Die Transfektionsraten liegen über denen der Komplexe mit linearem Poly((2-dimethylamino)ethylmethacrylat). Ebenfalls untersucht wird der Einfluss der Seitenkettenlänge. In der Arbeit ergaben längere Seitenketten eine erhöhte Transfektionsrate, da die langen Seitenketten eine höhere Bindungskapazität besitzen und die Komplexstabilität erhöhen. Das Einführen weiterer Ladungen durch Quaternisierung führte nicht zur Verbesserung der Gentransfektion, da diese Polymere zum einen toxisch sind, zum anderen eine erniedrigte Pufferkapazität besitzen, was den Austritt aus dem Lysosom erschwert. Als Grund für die erhöhte Transfektionsrate bei Verwendung der kammförmigen Polymere nennen die Autoren die bessere Wechselwirkung des Polykations mit der DNA bzw. der Zellmembran. Warum aber gerade die kammförmige Struktur die Wechselwirkung erleichtern soll, wird nicht erklärt. Ein flexibles, lineares Polymer kann sicherlich ebenso wirkungsvoll mit DNA interagieren. Entscheidend ist eher, wie viele der Ladungen auf dem verzweigten Polymer an die negativen Ladungen der DNA binden. Messungen des Zeta-Potentials sind hier ungeeignet, da nur Oberflächenladungen einen Einfluss auf das Messergebnis haben.

Liu et al. synthetisieren nach eigener Aussage bürstenförmige Polykationen, die jedoch eher eine kugelförmige Struktur aufweisen, mit PEI-*b*-PEO-Seitenketten und testen diese auf ihre Komplexierungs- und Transfektionseigenschaften [LDZ⁺10]. Sie finden eine Aggregation der Partikel bei einem Ladungsverhältnis $+/- \leq 2.5$ mit Komplexdurchmessern

über 400nm. Bei größerem Polykationenüberschuss ($+/- = 10$) sind die Komplexe stabil in Lösung (Durchmesser 100-150nm). Die Transfektionseffizienz in HEK293-Zellen steigt mit zunehmendem $+/-$ (untersuchter Bereich $+/- = 10$ bis 50) und liegt im Bereich der Lipofectamine2000 Kontrolle. Überlebensraten und Transfektionseffizienzen sind größer als bei verzweigten PEI (25kDa). Der Vergleich ist jedoch ungeeignet um die Polykationenstruktur zu beurteilen, da die PEG-Modifizierung einen großen Einfluss auf die untersuchten Faktoren hat.

Wu finden ebenfalls eine erhöhte Transfektionseffizienz (an 293-T-Zellen, einer Variante der HEK293-Zellen) bei Überschuss an PEI in der Komplexlösung [Wu10][DYJ+09]. Er nutzt dabei die Toxizität der Polyethylenimine gezielt aus, um die Zellmembran zu penetrieren und so permeabler für die DNA-Komplexe zu machen.

Die vorliegende Arbeit kann den Trend der höheren Transfektionsraten bei größerem Überschuss Polykation nicht bestätigen. Vor allem bei den Komplexen aus PLL-Bürste steigt die Transfektionsrate mit abnehmendem Ladungsverhältnis $+/-$. Ein großer Überschuss an Polykation vermindert dagegen die Transfektionsraten.

Untersuchungen zur Komplexierung von DNA mit quaternisiertem Poly(N-ethyl-4-vinylpyridiniumbromid) wurden bereits 1993 von Kabanov et al. durchgeführt [KAM+93]. Die Autoren finden eine geringe Toxizität der Polykationen und der Komplexe an NIH 3T3 Zellen. Die Transfektion der NIH 3T3 Zellen ist nur bei molaren Verhältnissen $n_{Polykation}/n_{DNA} > 1$ erfolgreich. Der optimale Wert liegt bei $n_{Polykation}/n_{DNA} = 10$ und die Effizienz ist dort 4 bis 7fach höher als bei Calcium-Fällung. Es wurden zwei verschiedene Polymerisationsgrade DP untersucht (DP = 18 und DP = 500), wobei das längere Polymer deutlich effektivere Transfektionen zeigte. Die Verkapselung der DNA in quaternisiertem PVP verstärkt die Nukleinsäure-Adsorption auf der Zellplasmamembran und ihre Aufnahme in die Zelle. Die Autoren schlagen vor, dass sich in hohem Überschuss Polykation positiv geladene Schleifen des Polymers bilden, die mit der negativen Zellmembran interagieren. Ein weiterer wichtiger Faktor zur erfolgreichen Transfektion ist ihrer Meinung nach die Kompaktierung der DNA in den Komplexen, die es erleichtert DNA in endozytotischen Vesikeln einzuschließen.

Kapitel 7

Kinetik der Komplexbildung

Die vorhergehenden Kapitel haben sich ausschließlich mit der Herstellung der Komplexe und ihren Eigenschaften beschäftigt. Im folgenden wird die Kinetik der Komplexbildung beschrieben. Deren Kenntnis kann zum Verständnis der vielen Wechselwirkungen (elektrostatisch, dipolar, hydrophob und entropisch) während der Komplexbildung helfen.

7.1 Literatur

Bisherige Untersuchungen beschäftigen sich hauptsächlich mit der Komplexbildung im Zeitbereich von einigen Sekunden, Minuten und Stunden [HAB00] [WB80] [Lai01]. In einigen Arbeiten wird die Stopped-flow-Technik angewandt um die ersten Schritte in der Komplexbildung aufzuzeichnen, die im Millisekunden-Bereich stattfinden [Poe84] [BML03] [TPM03].

Mit Hilfe der Stopped-flow-Lichtstreuung hat Pörschke die Komplexbildung zwischen Giant T4- und λ -DNA mit Spermin und Spermidin untersucht [Poe84]. Bei sehr kleinen Konzentrationen ($c_{DNA} = 1 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $0.7 < c_{Spermin} < 1.5 \cdot 10^{-6} \text{M}$) sind zwei Prozesse zu beobachten: ein sehr schneller Prozess im Zeitbereich unter 1ms, der der Anlagerung vieler Spermin-Moleküle an die DNA zugeordnet wird. Der zweite Prozess, der im Bereich von einigen 10 bis 100ms stattfinden wird interpretiert als Übergang der freien zur kondensierten Form der DNA. Es ist jedoch nicht klar, warum der Prozess der DNA-Kondensation zu einer ca. 10-fachen Erhöhung der Streuintensität führt. Desweiteren kann die Bildung von Komplexen mit mehreren DNA-Molekülen nicht ausgeschlossen werden. Bei höheren Sperminkonzentrationen (5 bis $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$) wird der sehr langsame Anstieg der Streuintensität als intermolekularer Aggregationsprozess mehrerer DNA-Moleküle interpretiert.

Die Komplexbildung zwischen Lachs-DNA (2000 Basenpaare) mit kationisch geladenen Vesikeln wurde von Barreireiro et al. ebenfalls mit Hilfe der Stopped-flow-Technik und Trübungsmessungen untersucht [BML03]. Mit beiden Messtechniken konnten zwei Prozesse im Zeitbereich von 50ms bis 5s aufgezeichnet werden. Diese werden einer diffusen DNA-Vesikel-Aggregation zugeordnet. Danach erfolgt ein Aufbrechen der Vesikel und die Bildung einer Doppelschicht um die DNA. Ein sehr langer Prozess im Bereich von 150s konnte nur durch Fluoreszenzmessungen beobachtet werden und wird mit internen Umordnungsprozessen in den Komplexen erklärt.

Teclat et al. verwenden Stopped-flow-Fluoreszenzmessungen um die Komplexbildung zwischen pUMVC1 DNA (7520 Basenpaare) und Polypeptiden kleiner Molmasse zu untersuchen [TPM03]. Es wurden zwei Prozesse beobachtet, einer bei einigen Millisekunden und der andere im Bereich von 15 bis 100ms, die jedoch nicht erklärt werden, sondern nur in Analogie zur Proteinfaltung gesetzt werden.

7.2 Methode

Die Stopped-flow-Technik wurde 1940 von Chance entwickelt [Cha40] [KSH04], eine Anwendung in Verbindung mit statischer Lichtstreuung erfolgte jedoch erst 1971 [AEC71]. Die detektierte Streuintensität ist proportional zum Gewichtsmittel der Molmasse M_w als Funktion der Zeit. Der Hauptnachteil der Stopped-flow-Apparate ist bisher immer noch die Messung der Streuintensität bei festem Streuwinkel von 90° . Dies führt zu unsicheren Ergebnissen, wenn die Teilchengröße über 20nm liegt, da dann der Einfluss des Partikelformfaktors $P(q)$ nicht mehr vernachlässigbar ist. Im folgenden wird die Integration einer Stopped-flow-Zelle in eine Lichtstreuapparatur beschrieben, die es ermöglicht Streuintensitäten bei einem Streuwinkel von 30° zu messen. Der Einfluss des Partikelformfaktors beträgt bei diesem Winkel weniger als 23% für Partikelradien kleiner 100nm. So kann die Komplexbildung zwischen PVP-Bürste und pUC19-DNA im Bereich von Millisekunden bis Minuten untersucht werden.

7.3 Ergebnisse

Wie in Abbildung 7.1 gezeigt, sind die Streuintensitäten der PVP-Bürste

$$I_{PVP} = I(t = 0) - I_{Puffer}$$

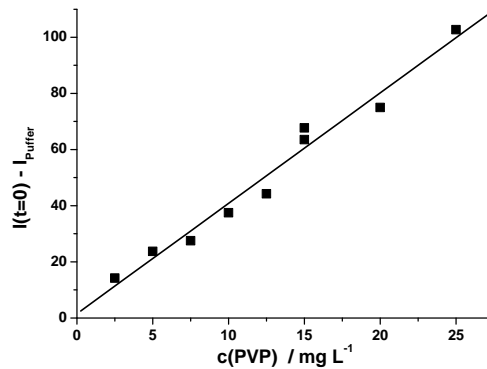


Abbildung 7.1: Intensität der PVP-Bürste zum Zeitpunkt $t = 0$ als Funktion der Bürstenkonzentration

proportional zur PVP-Konzentration. $I(t=0)$ ist dabei die gemessene Intensität der fließenden Lösung während des Injektionsprozesses. Diese ist im Idealfall weniger als 3ms alt (dies entspricht der Totzeit zwischen Mischer und Streuvolumen). Im folgenden entspricht die Zeit $t=0$ der Zeit, wenn die gemischte Lösung ins Streuvolumen eintritt. Der lineare Zusammenhang zwischen Streuintensität und PVP-Konzentration demonstriert die exzellente optische Qualität der Flusszelle.

Um aufwendige Kalibrationen zu vermeiden, wird die relative Molmasse $M_{rel}(t)$ als Anstieg der Exzessstreuintensität relativ zur Streuintensität der Mischung aus DNA- und PVP-Bürsten-Lösung zur Zeit $t = 0$ ausgewertet.

$$M_{rel}(t) = (I(t) - I_{Puffer}) / (I(t=0) - I_{Puffer}) \quad (7.1)$$

Da das Brechungsindexinkrement von DNA ($dn/dc = 0.17\text{ml/g}$) sich nicht signifikant von dem der PVP-Bürste ($dn/dc = 0.188\text{ml/g}$) unterscheidet, können die Streudaten entsprechend einer multimodalen Homopolymermischung analysiert werden. Vernachlässigt man den Einfluss des Formfaktors $P(q)$, kann die relative Molmasse durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$M_{rel} = \frac{c_t \cdot [m_c(t) \cdot M_c(t) + m_{DNA}(t) \cdot M_{DNA} + m_{PVP}(t) \cdot M_{PVP}]}{c_t \cdot [m_{DNA} \cdot M_{DNA} + m_{PVP} \cdot M_{PVP}]} \quad (7.2)$$

mit: c_t : $c_{DNA} + c_{PVP}$

m_i : Massenfraktion der entsprechenden Komponenten PVP, DNA und Komplexe

M_i : Molmasse der entsprechenden Komponenten PVP, DNA und Komplexe

$M_{rel}(t)$ ist ein besonderes w,w-Mittel, da es berechnet wird aus dem Gewichtsmittel der Molmasse der Komplexe und eventuell unkomplexierter DNA und PVP geteilt durch das Gewichtsmittel der Molmasse der DNA-PVP-Mischung zur Zeit $t = 0$. Eine quantitative Interpretation von $M_{rel}(t)$ ist nicht nur wegen des besonderen w,w-Mittel schwierig, sondern auch wegen der Tatsache, dass nicht alle Bürsten- und/oder DNA-Moleküle komplexiert sind.

Abbildung 7.2 zeigt die relative Molmasse M_{rel} als Funktion der Zeit für verschiedene Werte für x_{Anion} .

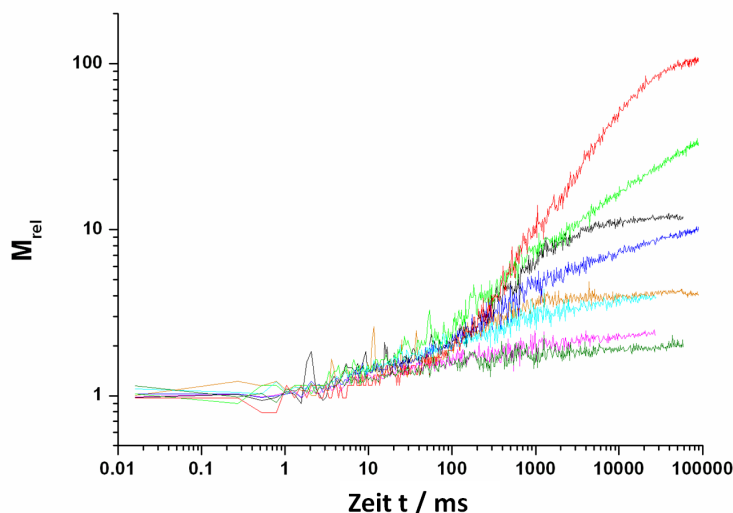


Abbildung 7.2: Relative Molmasse M_{rel} als Funktion der Zeit für Komplexe bei verschiedenen Ladungsbrüchen x_{Anion} . Von oben nach unten: rot: $x_{Anion}=0.398$; grün: $x_{Anion}=0.332$; schwarz: $x_{Anion}=0.498$; blau: $x_{Anion}=0.284$; orange: $x_{Anion}=0.665$; hellblau: $x_{Anion}=0.249$; magenta: $x_{Anion}=0.199$; dunkelgrün: $x_{Anion}=0.166$

Alle Kurven zeigen einen sehr schnellen Prozess im Zeitbereich von wenigen Millisekunden, gefolgt von einem zweiten Prozess im Bereich einiger 100 Millisekunden. Der erste Prozess wird durch ein Mischartefakt verursacht, da ein kleiner Teil älterer Lösung durch Wirbelbildung wieder zurück ins Streuvolumen fließt. Dieser Mischartefakt ist zu klein um die Kinetik der Komplexbildung signifikant zu beeinflussen. Er zeigt jedoch sehr gut, welche kurzen Zeitbereiche die Methode aufzulösen vermag (siehe auch 9.9.6). Dementsprechend stellt der zweite Prozess in Abbildung 7.2 den ersten Wachstumsprozess dar. Für

$0.2 < x_{Anion} < 0.35$ folgt dem ersten Wachstumsprozess ein sehr langsamer Prozess, der zu weiterer Aggregation der Komplexe folgend einem Potenzgesetz (Gleichung 7.3) führt.

$$M_{rel} \propto t^d \quad (7.3)$$

Der Exponent d nimmt dabei von 0.353 für $x_{Anion}=0.332$ bis auf Werte nahe 0 für $x_{Anion} < 0.2$ ab, wie in Tabelle 7.1 gezeigt.

Tabelle 7.1: Exponenten d entsprechend Gleichung 7.3 für verschiedene Ladungsbrüche x_{Anion}

x_{Anion}	d
0.332	0.353
0.284	0.19
0.249	0.107
0.199	0.094

Langzeitmessungen zeigen, dass sich die Komplexe innerhalb einiger Minuten stabilisieren, obwohl die Reproduzierbarkeit der hydrodynamischen Komplexradien für $0.25 < x_{Anion} < 0.5$ schlecht ist. Interessanterweise werden Exponenten d kleiner als 1 in Smoluchowskis Koagulationstheorie [Smo16] nicht erwartet. Ein möglicher Grund könnte die fehlende Extrapolation auf $q=0$ sein. Allerdings ist der relative gegenüber dem absoluten Einfluss des Formfaktors $P(q)$ auf M_{rel} kleiner als $\pm 16\%$. Eine Ausnahme ist die Messung für $x_{Anion}=0.398$, bei der die M_{rel} -Daten vor allem bei langen Zeiten signifikant unterbewertet werden.

Die kinetischen Kurven (außer dem Teil, der fraktales Wachstum zeigt) können mit folgender empirischer Funktion angepasst werden (siehe Abbildung 7.3 bis 7.4):

$$M_{rel} = P_1 \cdot (1 - a_1 \exp(-t/t_1) - a_2 \exp(-t/t_2) - a_3 \exp(-t/t_3)) + 1 \quad (7.4)$$

wobei $1 + P_1$ genau $M_{rel}(t)$ für $t=\infty$ (ohne Berücksichtigung des Potenzgesetzes entsprechend Gleichung 7.3). Die Amplituden $1 + P_1 \cdot \sum_i a_i$ ($i = 1$ bis 3) ergeben $M_{rel}(i)$ nach jedem Aggregationsprozess mit Wachstumszeit t_i . In der Zeit bevor das fraktale Wachstum beginnt können zwei Prozesse eindeutig identifiziert werden: ein sehr schneller Prozess, $t_1 = \tau_1$, der sich sehr gut mit einer Exponentialfunktion beschreiben lässt, im Zeitbereich von 5 bis 10ms. Dieser ist unabhängig von x_{Anion} . Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess durch Wirbelbildung während des Mischprozesses entsteht und ein kleiner Teil alter Lösung zurück ins Streuvolumen fließt. Da der Einfluss auf die Streuintensität aber

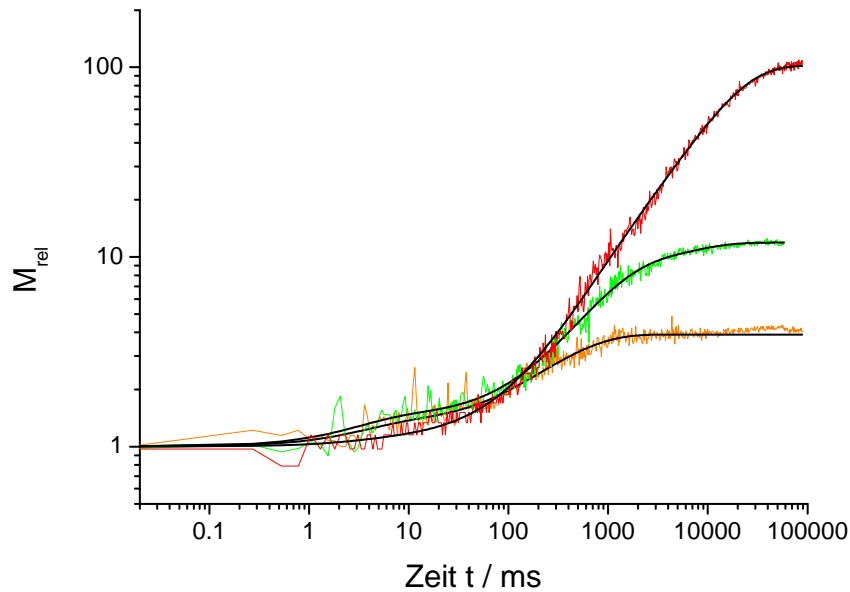


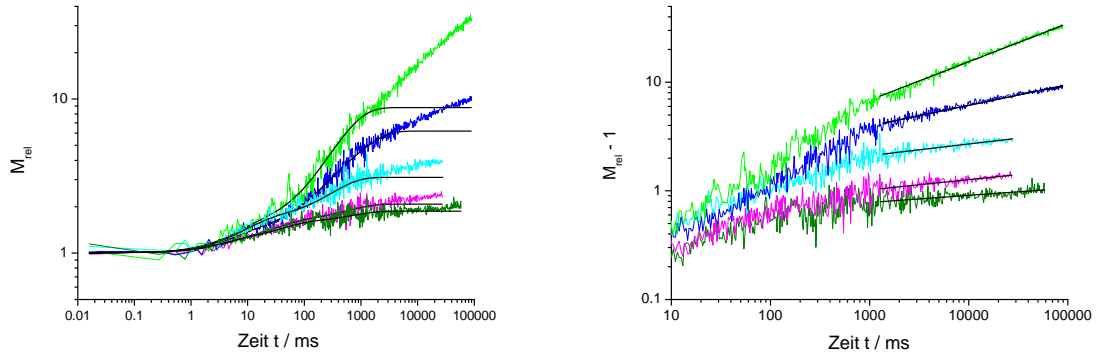
Abbildung 7.3: Fit der Kinetikdaten mit einer triexponentiellen Funktion wie im Text beschrieben. Rot: $x_{Anion}=0.398$; grün: $x_{Anion}=0.498$; orange: $x_{Anion}=0.665$

sehr klein ist, hat dieser Effekt keinen signifikanten Einfluss auf die nachfolgende Komplexbildungskinetik. Der zweite Prozess τ_2 konnte nicht mit einer einzigen Exponentialfunktion angepasst werden. Vielmehr waren mindestens zwei Exponentialfunktionen nötig, um den zweiten Prozess ausreichend zu beschreiben.¹ Da die experimentellen Daten streuen, zeigen die Wachstumszeiten t_2 und t_3 keinen eindeutigen systematischen Trend. Dies macht das Auftreten zweier individueller Wachstumsprozesse unwahrscheinlich. Es existiert eher eine monomodale Verteilung der Wachstumszeiten, die gut mit einem biexponentiellen Fit angepasst werden kann (entsprechend dem Fit der Korrelationsfunktionen in der dynamischen Lichtstreuung). In formaler Analogie zur Lichtstreu-Auswertung kann eine mittlere Wachstumsrate definiert werden als

$$\tau_2^{-1} = \frac{(a_2/t_2 + a_3/t_3)}{(a_2 + a_3)} \quad (7.5)$$

Obwohl diese Definition der mittleren Wachstumszeit τ_2 etwas willkürlich ist, zeigen sich doch eindeutige Trends für die Wachstumsprozesse, wie in Tabelle 7.2 und Abbildung 7.5

¹Der langsamere, aber einfach exponentielle Anstieg könnte durch die extrem breite Molmassenverteilung der PVP-Bürste verursacht werden.



(a) Fit der Kinetikdaten mit triexponentiellem Fit bis zum Beginn des Potenzgesetzes. $\log(M_{rel}-1) \propto t^d$ für verschiedene Werte x_{Anion} . Grün: $x_{Anion}=0.322$; blau: $x_{Anion}=0.284$; hellblau: $x_{Anion}=0.249$; magenta: $x_{Anion}=0.199$; dunkelgrün: $x_{Anion}=0.166$

(b) Wachstum folgende einem Potenzgesetz $\log(M_{rel}-1) \propto t^d$ für verschiedene Werte x_{Anion} . Grün: $x_{Anion}=0.322$, $d=0.353$; blau: $x_{Anion}=0.284$, $d=0.190$; hellblau: $x_{Anion}=0.249$, $d=0.107$; magenta: $x_{Anion}=0.199$, $d=0.094$; dunkelgrün: $x_{Anion}=0.166$, $d=0.065$

Abbildung 7.4: Fit der Kinetikdaten mit anschließendem Potenzgesetz

gezeigt. Aufgrund des Rauschens der Intensitätsdaten und des Einflusses der oberen Limits für den Fit, bei dem das fraktale Wachstum anfängt, liegt der experimentelle Fehler von τ_1 und τ_2 im Bereich von $\pm 30\%$. Der Vorteil der Definition der mittleren Wachstumszeit τ_2 ist, dass die langsamere Wachstumszeit, die sich signifikant mit dem oberen Limit des Fits ändert, diese nicht stark beeinflusst. Die Ergebnisse des Fits werden in Tabelle 7.2 zusammen mit den hydrodynamischen Radien, die nach Ende der kinetischen Messung bestimmt wurden, aufgelistet.

Tabelle 7.2: Amplituden und Wachstumszeiten entsprechend Gleichung 7.4 und 7.5, sowie die hydrodynamischen Radien, die nach Ende der kinetischen Messungen bestimmt wurden.

x_{Anion}	P_1	a_1	τ_1 / ms	a_2+a_3	τ_2 / ms	R_h / nm
0.665	2.9	0.11	3.8	0.89	320	43
0.498	10.9	0.039	3.4	0.96	1410	55
0.398	101	0.00081	3.4	1	10200	239
0.332	7.8	0.066	8.9	0.934	635	99
0.284	5.2	0.07	6.4	0.93	565	58
0.249	2.1	0.15	6.9	0.85	67	45
0.199	1.08	0.19	5	0.81	76	44
0.166	0.87	0.22	3.5	0.78	69	44

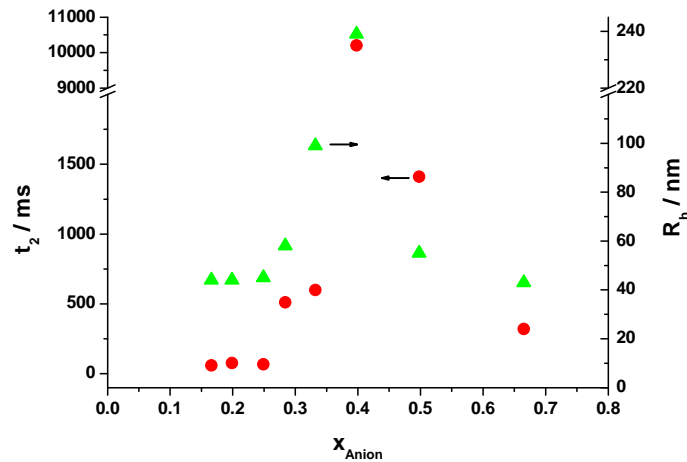


Abbildung 7.5: Wachstumszeiten τ_2 (•, linke Achse) der Komplexbildung als Funktion des Molbruchs anionischer Ladungen x_{Anion} . Zum Vergleich sind die hydrodynamischen Radien, die 2 min nach Ende der kinetischen Untersuchungen gemessen wurden, aufgetragen (▲, rechte Achse).

Die mittlere Wachstumszeit τ_2 ist von x_{Anion} wie in Abbildung 7.5 gezeigt abhängig. Abbildung 7.5 beinhaltet auch die hydrodynamischen Radien, die durch dynamische Lichtstreuung bei einem Streuwinkel von 30° direkt nach Ende der kinetischen Messungen bestimmt wurden. Die größten Komplexe wurden während des beobachteten Zeitraums von einigen Minuten für $x_{Anion} = 0.398$ beobachtet. Das ist zunächst überraschend, da normalerweise die am schnellsten wachsenden oder größten Komplexe nahe Ladungsstöchiometrie, also $x_{Anion} = 0.5$, beobachtet werden. Wie für ein sehr ähnliches System berichtet wurde [SDH⁺07] verursacht der extrem große Unterschied der Ladungsdichte zwischen DNA (5.9 Ladungen pro nm Konturlänge) und der PVP-Bürste ($\propto 55$ chemische Ladungen pro nm Konturlänge) eine Verschiebung des instabilen Bereichs, in dem sich primäre Komplexe verbinden und letztendlich Phasenseparation bzw. Sedimentation auftritt, zu kleineren Werten von x_{Anion} . Obwohl es zu erwarten wäre, dass die unterschiedlichen Herstellungsprotokolle für die Komplexe (schnelles, turbulentes Mischen im Gegensatz zum Zutropfen der DNA-Komponente zum Überschuss Polymerlösung) einen entscheidenden Einfluss nicht nur auf die Stabilität der Komplexe, sondern auch auf die Lage des instabilen Bereichs haben, werden die größten Komplexe im Rahmen dieser Untersuchung bei $x_{Anion} = 0.4$ beobachtet. Dies steht in qualitativer Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen.

Im Hinblick auf eine Interpretation der beobachteten kinetischen Prozesse, ist es aufschlussreich die Diffusionszeiten in einem diffusionslimitiertem Aggregationsszenario zu diskutieren. Der mittlere Abstand zwischen DNA-Molekülen ist in allen Experimenten

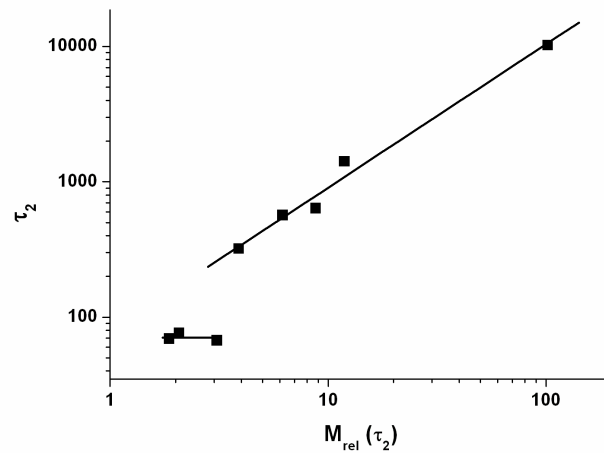


Abbildung 7.6: Wachstumszeit τ_2 als Funktion der relativen Molmasse $M_{rel}(\tau_2)$

konstant und beträgt etwa 800nm. Unter Verwendung des Diffusionskoeffizienten reiner DNA $D_{DNA} = 2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ sollten sich Komplexe, die nur eine DNA enthalten, innerhalb 30ms bilden. Da die beobachteten Wachstumszeiten größer sind und komplexierte (und damit kompaktierte) DNA schneller diffundiert, müssen die Komplexe in dieser Arbeit aus mehreren DNA-Molekülen bestehen. Dies steht in qualitativem Einklang mit früheren Lichtstreuuntersuchungen an einem ähnlichen System (allerdings ohne Verwendung eines schnellen Mischers), in denen Komplexe mit ungefähr 10 DNA-Molekülen im Bereich von $x_{Anion} > 0.6$ bzw. 3 bis 4 DNA-Moleküle im Bereich von $x_{Anion} < 0.2$ gefunden wurden. Für $x_{Anion} > 0.2$ und $x_{Anion} < 0.6$, in dem die meisten der kinetischen Daten liegen, sind sogar noch mehr DNA-Moleküle in einem Komplex immobilisiert.

Es ist aufschlussreich die mittlere Wachstumszeit der Komplexe τ_2 gegen die relative Molmasse aufzutragen (Abbildung 7.6). Für $x_{Anion} < 0.25$ beträgt die Zeit, die zur Komplexbildung benötigt wird, 60 bis 80ms. Wie durch den konstanten hydrodynamischen Radius gezeigt, bilden sich in diesem Bereich nur mehr, aber keine größeren Komplexe mit zunehmendem x_{Anion} . In qualitativer Übereinstimmung mit [SDH+07] koexistieren diese „primären“ Komplexe mit einem Überschuss Polykation.

Für $x_{Anion} > 0.25$ ist die mittlere Wachstumszeit τ_2 proportional zur Molmasse der Komplexe. Dies ist im Rahmen eines einfachen diffusionslimitiertem Aggregationsszenario zu erwarten:

$$\tau_2 \propto \langle R^2 \rangle / D \propto M \quad (7.6)$$

unter der Annahme, dass $D \propto M^{-1/3}$, das heißt für sphärische Komplexe. Ebenso gilt,

dass der quadratische mittlere Abstand zwischen wachsenden Komplexen $\langle R^2 \rangle \propto M^{2/3}$, da $\langle R^2 \rangle \propto c_N^{-2/3}$ und $c_N \propto M^{-1}$ bei konstantem c_P . c_P und c_N sind die Zahlen- bzw. Massenkonzentrationen.

7.4 Simulation des Strömungsprofils in der Messküvette

Am Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH wurden Simulationen des Strömungsprofils in der Messküvette angefertigt. Dazu wurde ein Fluss durch die Messgeometrie angenommen, der nach 0.1s gestopt wird, und dann das Verhalten der Lösung im Inneren der Kammer simuliert. Abbildung 7.7 zeigt die Ergebnisse für den in den Kinetik-Messungen verwendeten Aufbau. Das Streuvolumen, das während der Lichtstremessungen beobachtet wird, liegt im Zentrum des Küvettenraums.

Wie in den Messungen beobachtet zeigt auch die Simulation einen Rückfluss alter Lösung aus den Küvettenvolumen zurück ins Streuvolumen. Würde die Lösung nach dem Stoppen der Injektion direkt stillstehen, gäbe es nur hellblaue Bereiche im Streuvolumen. Der Rückflusses vollzieht sich schon innerhalb der ersten 10ms nach dem Stopp, wie die Messwerte auch bestätigen. Der Effekt der weiteren Wirbelbildung, die sich auf größere Zeiten ausdehnt, ist im Vergleich zur Intensitätsänderung durch das Komplexwachstum vernachlässigbar.

Im folgenden wurde ein anderes Küvettendesign entwickelt, das den Rückfluss alter Lösung ins Streuvolumen mindern kann. Dazu wird am Boden der Küvette ein Kegel aufgesetzt, der die Lösung zu den Seiten leitet und die Wirbelbildung im Inneren der Küvette minimieren soll. Die Simulationen zu dem neuen Design sind in Abbildung 7.8 gezeigt. Die Wirbelbildung im Zentrum der Küvette verkleinert sich, die alte Lösung wird nach oben in den Zulauf gedrängt bzw. bleibt an den Seiten der Küvette. Ein solches Design könnte hilfreich sein, wenn Kinetiken bei sehr kleinen Zeiten untersucht werden.

7.5 Zusammenfassung

Das Wachstum der PVP-DNA-Komplexe wurde durch Messung der zeitabhängigen, absoluten Streuintensität in einer Stopped-flow-Lichtstreu-Apparatur untersucht.

- Prozesse im Millisekunden-Bereich sind mit dem in dieser Arbeit verwendeten Aufbau durch Lichtstreuung verfolgbar.

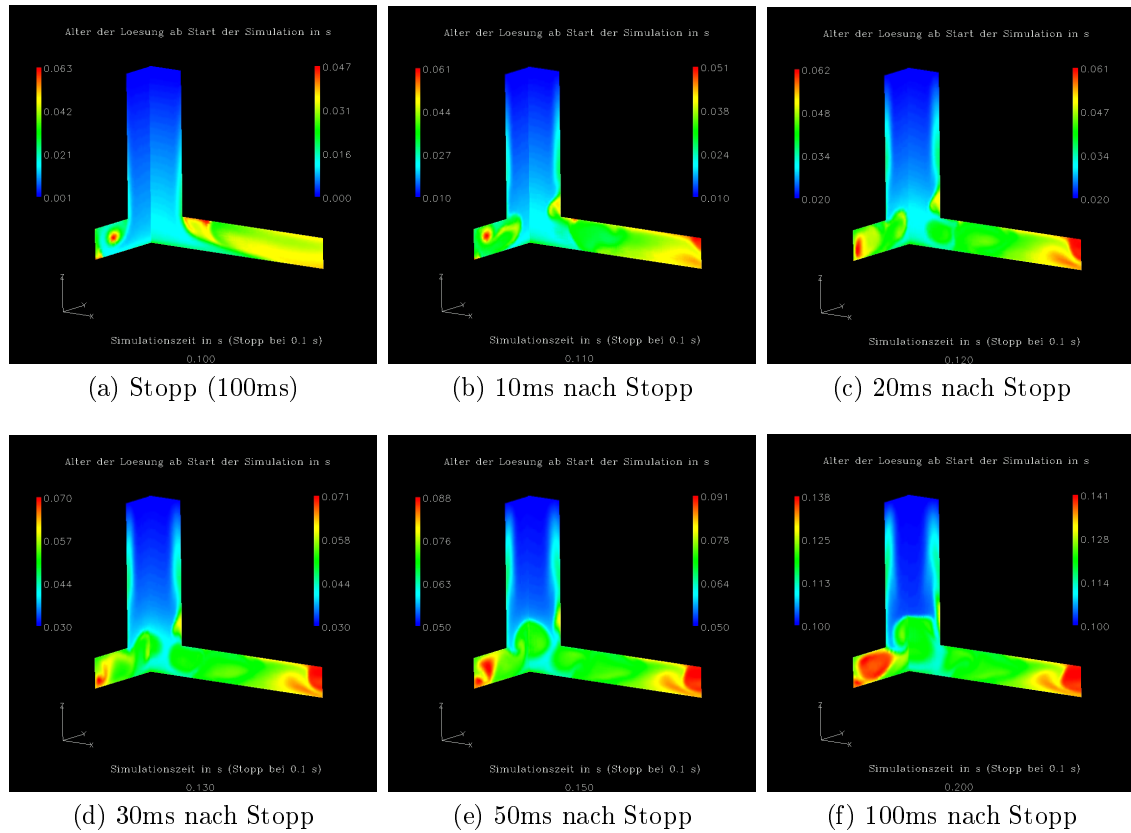


Abbildung 7.7: Simulation des Strömungsprofils in der Messküvette. Da die Küvette zwei Symmetrieebenen hat, muss nur ein Drittel des Küvettenraumes simuliert werden. Gezeigt sind Momentaufnahmen von dem Zeitpunkt, an dem die Lösung stoppt (7.7a), sowie 10ms (7.7b), 20ms (7.7c), 30ms (7.7d), 50ms (7.7e) und 100ms (7.7f) nach dem Stopp. Der Farbcodiert dem Alter der Lösung. Die Simulationen wurden am IMM Mainz angefertigt.

- Stabile Komplexe bilden sich für $x_{Anion} < 0.2$ und $x_{Anion} > 0.35$. Das Wachstum kann durch Diffusion der Komponenten zueinander beschrieben werden. Für $x_{Anion} < 0.2$ bilden sich stabile primäre Komplexe, während bei $x_{Anion} > 0.35$ weitere Aggregation der primären Komplexe auftritt.
- Für $0.2 < x_{Anion} < 0.35$ sind die Komplexe nicht stabil, ein fraktales Wachstum schließt sich an die diffusionslimitierte Aggregation an. Die Exponenten sind kleiner als 1, was nicht zu erwarten ist.
- Die größten und am schnellsten wachsenden Komplexe bilden sich nicht bei Ladungsstöchiometrie, sondern bei $x_{Anion} = 0.4$, was mit dem großen Unterschied in der Ladungsdichte der Komponenten erklärt werden kann.

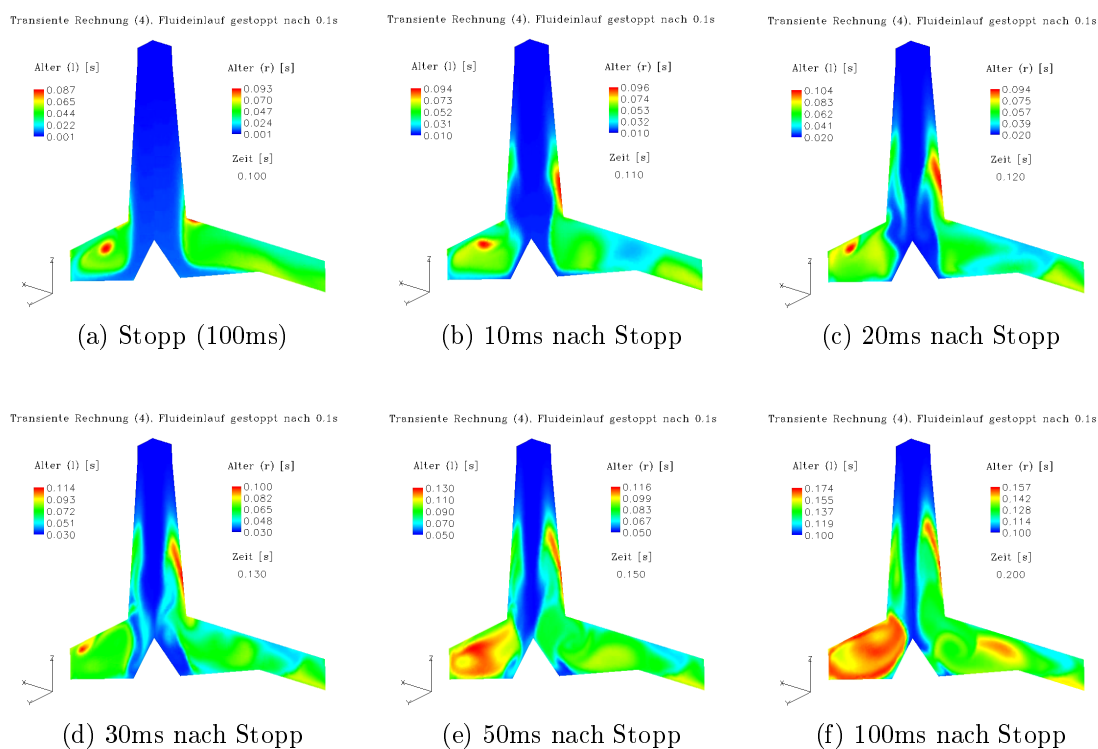


Abbildung 7.8: Simulation des Strömungsprofils in der Messküvette mit zusätzlich eingefügtem Kegel am Küvettenboden. Da die Küvette zwei Symmetrieebenen hat, muss nur ein Drittel des Küvettenraumes simuliert werden. Gezeigt sind Momentaufnahmen von dem Zeitpunkt, an dem die Lösung stoppt (7.8a), sowie 10ms (7.8b), 20ms (7.8c), 30ms (7.8d), 50ms (7.8e) und 100ms (7.8f) nach dem Stopp. Der Farbcode entspricht dem Alter der Lösung. Die Simulationen wurden am IMM Mainz angefertigt.

Kapitel 8

Ergebnisse und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Bildung von Komplexen aus bürstenförmigen Polykationen und DNA, ihre Eigenschaften und Anwendung in der Gentransfektion untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf Poly-L-Lysinen (PLL) in Bürstenform und als lineares Polymer und quaternisierten Polyvinylpyridinen (PVP) in Bürstenform. Solch wurmförmige Polykationen wurden bislang in der Gentransfektion nicht untersucht, ein Einfluss der Topologie auf das Transfektionsverhalten ist jedoch zu erwarten und wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Polymere können DNA in Komplexe kompaktieren, die auf einem 1.0% Agarosegel nicht mobil sind. Bei den Bürstenpolymeren wird dafür ein Überschuss an positiven Ladungen benötigt, lineares Polylysin immobilisiert schon in stöchiometrischen Ladungsmengen die gesamte DNA. Ursache hierfür ist die geringere Zugänglichkeit der Ladungen auf dem Bürstenpolymer. Die Komplexbildung der Polykationen mit DNA ist in allen Fällen kinetisch kontrolliert. Die Komplexstruktur ist kugelförmig mit R_g/R_h -Werten zwischen 0.9 und 1.2, unabhängig von der Struktur der Polykationen und dem Salzgehalt der Lösung.

In Lösung stabile Komplexe bilden sich nur im deutlichen Überschuss einer Komponente. Bei den Bürstenpolymeren ist ein Ladungsverhältnis $+/- > 3$ nötig, lineares Polylysin bleibt bis zu $+/- > 2$ in 5mM Phosphatpuffer dispergiert. Je mehr man sich stöchiometrischer Ladungsverteilung nähert, umso stärker aggregieren die Komplexe. Die Komplexe sind elektrostatisch stabilisiert, bei Zugabe von NaCl werden die Ladungen teilweise ausgeglichen und es kommt zur Aggregation. Die Grenze, bis zu der die Komplexe in Lösung stabil sind, verschiebt sich in 150mM NaCl zu höherem Überschuss des Polykations.


Komplexe aus PVP-Bürste und pUC19-DNA aggregieren bei Salzzugabe zunächst, lö-

sen sich ab einem Salzgehalt von 0.5M aber wieder in die Ausgangskomponenten auf. Ursache ist die Abschirmung der elektrostatischen Anziehung und die Verringerung des Entropiegewinns bei der Komplexbildung durch das Freilassen der Gegenionen. Je mehr Ionen in Lösung sind, umso geringer wird der Entropiegewinn bei der Komplexbildung, da die Gegenionen bereits vor der Komplexierung nicht mehr auf dem Polyelektrolyten gebunden sind. Die Polylysin-Komplexe aggregieren ebenfalls bei Salzzugabe, lassen sich jedoch auch bei hohen Salzkonzentrationen nicht dekomplexieren, sondern nur deaggregieren.

Bei Verwendung eines Kugelmischers, der turbulentes Mischen ermöglicht, sind die Radien der PVP-DNA-Komplexe bei gleicher Konzentration und Zusammensetzung generell kleiner als bei sequentieller Titration einer Komponente zur Überschusskomponente. Die Herstellungsmethode hat bei Polylysin-Komplexen keinen Einfluss auf die Komplexgröße.

In Freisetzungsexperimenten wurde die Stabilität der Komplexe gegenüber verschiedenen Kompetitoren, wie BSA, Heparin und RNA sowie erhöhter Salzkonzentration getestet. Zusätzlich wurde der Schutz der DNA in den Komplexen vor Angriffen durch DNasen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst. Die Komplexe aus linearem Polylysin lassen sich durch keinen der verwendeten Kompetitoren auflösen. Die Bürstenpolymere bilden labilere Komplexe, sie lassen sich jeweils mit zwei der vier Kompetitoren auflösen. Durch Ethidiumbromidverdrängungsversuche konnte gezeigt werden, dass sich PVP an weniger Bindungsstellen der DNA als die beiden untersuchten Polylysine anlagert. PVP und DNA sind deshalb nicht so stark aneinander gebunden und die Wahrscheinlichkeit, dass alle Bindungen gleichzeitig gelöst werden, ist größer als bei den Polylysinen.

Tabelle 8.1: Zusammenfassung der Komplexeigenschaften und Transfektionsergebnisse

	Toxizität Polykation	Schutz vor DNase	Freisetzung durch NaCl	Heparin	BSA	RNA	Transfektion an PBMEC
PLL-Bürste		✗	✗	✓	✓	✗	+
PVP-Bürste		✓	✓	✓	✗	✗	++
lineares PLL		✗	✗	✗	✗	✗	--

Im Konzentrationsbereich unter 100mg/l sind alle verwendeten Polymere nicht toxisch für Schweinehirnendothelzellen. Bei höheren Konzentrationen wirken die Bürstenpolymere im Vergleich zum linearen Poly-L-Lysin deutlich toxischer auf die Zellen. Die Transfektionseffizienz der DNA-Polykation-Komplexe wurde an Schweinehirnendothelzellen (PBMEC) getestet. Die verwendeten Komplexe wurden vor der Transfektion mit Hilfe der statischen

und dynamischen Lichtstreuung charakterisiert. Alle verwendeten Komplexe wurden im Überschuss Polykation hergestellt (Ladungsverhältnisse +/- zwischen 20 und 4) und hatten hydrodynamische Radien zwischen 70 und 220nm. Es gibt keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Komplexgröße und Transfektionseffizienz. Die Komplexe mit den höchsten Transfektionsraten von 35% transfizierter Zellen der gesamten Zellpopulation haben Radien von 173nm. Hierbei handelt es sich um PVP-Bürsten-Komplexe. Im Bereich von +/- = 9 bis 4 sind alle Komplexe aus PVP-Bürste und DNA sehr effizient, mehr als 30% der Zellpopulation sind transfiziert. Das kommerziell erhältliche Transfektionsmittel Lipofektamin erreicht in Schweinehirnendothelzellen nur Werte unter 10%. Ebenfalls gute Transfektionsraten (> 25%) werden mit den Polylysin-Bürsten erreicht, die linearen Polymere können PBMEC nicht oder nur sehr schlecht (< 5%) transfizieren.

Vergleicht man die Transfektionsraten mit den Komplexeigenschaften, so zeigt sich, dass die Toxizität der Polykationen und die Komplexgröße keinen Einfluss haben. Die Komplexe, die sehr stabil sind, die sich nicht durch Kompetitoren auflösen lassen und viele Bindungen an die DNA knüpfen, transfizieren schlecht. Gute Transfektionsagenzien bilden dagegen labilere Komplexe mit weniger Bindungsstellen zur DNA. Die Bürstenform bringt hier einen ganz entscheidenden Vorteil in der Komplexbildung und deren Anwendbarkeit in der Gentransfektion.

Im folgenden müssen weitere Bürstenpolymere und ihre linearen Analoga auf ihr Transfektionsverhalten untersucht werden. Desweiteren muss ein Vergleich mit anderen formstiefen Polymeren erstellt werden und die Ladungsdichte variiert werden. Es ist bisher unklar, ob die sehr guten Transfektionsraten durch das Ladungsmismatch verursacht werden oder ob die wurmförmige Topologie der Polykationen der entscheidende Faktor ist. Die vielversprechenden PVP-Bürsten-Komplexe sollten auch auf anderen Zelllinien, die schwer zu transfizieren sind, z.B. Neuronen, getestet werden.

In einem weiteren Projekt wurde eine neue Methode entwickelt, um die Kinetik der Komplexbildung mit Hilfe der Lichtstreuung aufzuzeichnen. Dazu wurde ein Stopped-Flow-Aufbau entworfen, der es erlaubt, Streulichtintensitäten bei kleinen Streuwinkeln zu detektieren. Dadurch wird die Auswertung der Streuintensitätsänderung als Molmassenänderung ermöglicht. Mit dem vorgestellten Aufbau sind Prozesse im Millisekunden-Bereich auflösbar.

Kapitel 9

Experimenteller Teil

9.1 Komplexbildung

Die Herstellung der Komplexe erfolgte entweder manuell durch sequentielle Tropfentitration oder mit Hilfe eines Stopped-Flow-Mikromischers. Die Konzentrationen wurden sehr klein gehalten um Mehrfachstreuung bei den Lichtstremessungen zu verhindern.

Für die Titration wurde ca. 1ml der Polykationlösung der Konzentration ($c = 10\text{mg/l}$ bzw. 2.5mg/l) in der Lichtstreküvette vorgelegt und dann in $100\mu\text{l}$ -Schritten pUC19-DNA ($c = 10\text{mg/l}$ bzw. 2.5mg/l) zugegeben. Die Titration wurde in 5mM Phosphatpuffer und 150mM NaCl mit 5mM Phosphatpuffer durchgeführt. Nach Schütteln und 10min Inkubation bei 20°C wurde dynamische und statische Lichtstreuung an den Proben gemessen. Die genauen Mengen DNA und Polykation wurden gravimetrisch bestimmt.

Für die Mischereperimente kam ein Stopped-Flow-Mischer BioLogic SFM300 mit der Steuereinheit MPS-60 zum Einsatz. Dieser besteht aus drei Spritzen, die einzeln gesteuert werden können, mit einem Einzelvolumen von je 10ml . Durch einen Schrittmotor wird ein Teflonkolben nach oben gefahren und Lösung aus der Spritze herausgedrückt. Der Fluss wird nach Injektion des angegebenen Volumens abrupt gestoppt. Es sind dabei pro Spritze Volumina zwischen $13\mu\text{l}$ und 1.3ml einstellbar. Zur Steuerung wird das mitgelieferte Programm BioKine verwendet. Die Proben werden mit einem Fluss von 2ml/s gemischt. Die so präparierten Komplexe werden dann direkt in Standard-Quarzküvetten gefüllt und per Lichtstreuung vermessen. Für die Mischereperimente wurde die DNA-Konzentration konstant bei 10mg/l gehalten und die Polykation-Konzentration variiert. Die Lösungen wurden im Mischer immer im Verhältnis $1:1$ (v/v) gemischt und die verschiedenen Mischverhältnisse durch die variable Polykation-Konzentration erreicht.

Die Herstellung der Komplexe mit dem Kugelmischer ist insgesamt zeitlich deutlich aufwendiger als die Titration, da zur Lichtstreuung hohe Präparationsanforderungen erfüllt sein müssen. Dazu muss die gesamte Mischapparatur mit filtriertem Wasser staubfrei gespült werden. Desweiteren werden viel größere Volumina der Einzelkomponentenlösungen benötigt, um die Spritzen des Mischer und die Kapillaren zu füllen.

9.2 Ethidiumbromid-Verdrängung

Die Experimente werden in einer 96 Well Platte durchgeführt. Die pUC19-DNA ($0.86\mu\text{g}$ pro Well) wird mit $0.1\mu\text{g}$ Ethidiumbromidlösung der Konzentration 1g/l gemischt und 10min inkubiert. Die Lösung wird dann mit 5mM Natriumphosphatpuffer auf $100\mu\text{l}$ pro Well aufgefüllt, die DNA-Konzentration beträgt also 8.6mg/l . Zunächst wird das Polykation vorgelegt, zur Einstellung der verschiedenen +/- Verhältnisse, werden unterschiedliche Volumina der Polykationlösung verwendet. Dann wird das Volumen durch Zugabe von 5mM Natriumphosphatpuffer jeweils auf $100\mu\text{l}$ eingestellt. Es werden $100\mu\text{l}$ der DNA-Ethidiumbromid-Mischung pro Well zugefügt, fünf mal auf- und abpipettiert und 10min auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wird die Fluoreszenz ausgelesen, die Anregungswellenlänge beträgt 286nm , die Emissionswellenlänge 620nm . Als Kontrolle wird jeweils die DNA-Ethidiumbromid- bzw. Polykation-Ethidiumbromid-Mischung und Ethidiumbromid in Puffer (gegebenenfalls mit Salz) gemessen. Die Fluoreszenz jeder Probe wird um die Hintergrundfluoreszenz des Ethidiumbromids mit Polykation und gegebenenfalls Salz ohne DNA korrigiert und normiert mit der Ethidiumbromid-Fluoreszenz der reinen DNA ohne Polykation abzüglich der Ethidiumbromidfluoreszenz in Puffer mit gegebenenfalls Salz.

9.3 Freisetzungsexperimente

Zu einer Lösung des Polymers (1g/l) in 5mM Natriumphosphatpuffer wird unter Schütteln auf einem Vortexer das gleiche Volumen pUC19-DNA (400mg/l) in 5mM Natriumphosphatpuffer pipettiert. Dies entspricht einem Ladungsverhältnis +/- = 2.7 für PVP-Komplexe und +/- = 3.9 für Polylysin-Komplexe. Die Komplexe werden 15min inkubiert und dann mit verschiedenen konzentrierten Kompetitorlösungen versetzt ($V(\text{Komplex}) = V(\text{Kompetitorlösung})$). Wenn nicht anders angegeben, werden Komplex und Kompetitor 45min inkubiert bevor die Analyse durch Gelelektrophorese erfolgt. Die Gelelektrophoresen werden mit 1% Agarosegelen in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Der Stromfluss wird

konstant auf 85mA geregelt, die Laufzeit des Gels beträgt durchschnittlich 60min.

Zur Intensitätsbestimmung der Banden auf den Agarosegelen wurde das Programm Scion Image der Firma Scion Corporation, Maryland, USA verwendet.

9.4 CD-Spektroskopie an Komplexen

Die Komplexe wurden in 5mM Natriumphosphatpuffer hergestellt, dabei wurde die Polykation-Komponente vorgelegt und die DNA zupipettiert. Die Konzentration der Ausgangskomponenten betrug 0.2g/l. Um ein Ladungsverhältnis von $+/- = 2$ zu erreichen, wurden 170 μ l PLL-Lösung mit 134 μ l pUC19-DNA gemischt bzw. 200 μ l PVP-Lösung mit 108 μ l pUC19-DNA. Daraus ergibt sich eine finale DNA-Konzentration von 0.088g/l in den Polylysin-Komplexen und $c(\text{DDNA}) = 0.070\text{g/l}$ in den PVP-Komplexen. Zu diesen Komplexlösungen wurde dann gesättigte NaCl-Lösung zugegeben, um die verschiedenen Molaritäten einzustellen. Dadurch wurde die Lösung also verdünnt auf $c(\text{DNA}) = 0.076\text{g/l}$ für PLL-Komplexe in 1mol NaCl bzw. auf $c(\text{DNA}) = 0.059\text{g/l}$ für die PVP-Komplexe.

9.5 DNase-Experimente

Die Komplexe werden aus Polykation ($c=1\text{g/l}$) und pUC19-DNA ($c=0.4\text{g/l}$) im Volumenverhältnis 1:1 hergestellt. Nach 15min Inkubation wird genau die Menge DNase zugegeben, die die gesamte DNA degradiert. Per Definition baut 1U exakt 1 μ g DNA in 10min bei 37°C ab. Nach 10min Inkubationszeit bei 37°C wird die Komplexmischung nach Zugabe von EDTA für 20min auf 80°C im Wasserbad erhitzt, dies inaktiviert die DNase. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit dem gleichem Volumen Heparinlösung ($c=30\text{g/l}$) versetzt. Das Heparin setzt noch intakte DNA aus dem Komplex frei. Diese kann dann auf 1% Agarosegelen analysiert werden. Zum Vergleich wird freie DNA derselben Behandlung mit DNase unterzogen.

9.6 Markieren der Polykationen mit RhodaminB

Um die Position der Polykationen auf und in der Zelle sichtbar zu machen, wird ein Farbstoff angekoppelt. Die Polylysine werden an den freien Aminogruppen der Seitenketten mit Lissamine Rhodamin B-Sulfonylchlorid (Invitrogen) umgesetzt. Dazu wird eine Farbstofflösung der Konzentration 10mg/ml in DMF angesetzt, das Polykation ist in

Natriumbicarbonat-Puffer (pH = 9) gelöst. Um eine möglichst quantitative Aussage über die Polykationaufnahme machen zu können, soll an jedes Polymer ein Farbstoffmolekül gebunden sein. Dazu wird ein vierfacher molarer Überschuss an Rhodamin B-Sulfonylchlorid eingesetzt. Die Polymerlösung wird mit dem Farbstoff über Nacht bei 4°C geschüttelt. Unumgesetzter Farbstoff wird durch Dialyse (Dialyseschläuche aus regenerierter Cellulose) abgetrennt.

9.7 Untersuchung der Polykation-Aufnahme in PBMEC

Das mit Rhodamin markierte Polykation wird auf PBMEC gegeben und in Kulturmedium inkubiert. Die Konzentration des Polykations beträgt 10mg/l, davon werden 500µl auf ein Well aufgetragen. Nach verschiedenen Zeiten werden Bilder mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen (60x Vergrößerung). Dazu wird 30min vor der Messung Vitalfarbstoff (Vybrant) aufgetragen um die Zellmembran anzufärben, sodass sie grün fluoresziert. Anschließend wird drei mal mit HBSS+++ gewaschen und die Aufnahmen ebenfalls in HBSS+++ durchgeführt.

9.8 Transfektion auf PBMEC mit Durchflusszytometer-Analyse

Die PBMEC Zellen werden in Gelatine beschichtete 24 Well Platten mit 60000 Zellen pro Well ausgesät. Nach einem Tag werden die Zellen (etwa 60 bis 70% konfluent) drei mal mit angewärmten HBSS+++ gewaschen. Dann wurde 500µl der Komplexlösung (entsprechend 1µg DNA pro Coverslip) zugegeben bzw. 450µl HEPES-Puffer mit 50µl Transfektionsansatz. Zur DNA-Kontrolle wurde 1µg DNA bzw. 1µg DNA mit 3.33µl Lipofectamin verwendet. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C, davon die erste Stunde auf dem Schüttler, wurde der Überstand abgesaugt und 500µl frisches PBMEC-Medium zugegeben. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 30min mit 1:1000 Calceine red-orange (500µl) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 500µl HBSS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 100µl Trypsin-Lösung für 1-4 min zugegeben um die Zellen vom Boden des Wells abzulösen bzw. um die Zellen zu vereinzeln. Der Dissoziationsprozess wurde mit 400µl HBSS+++ mit 5% FCS abgestoppt und 10 mal mit einer 1ml Pipettenspitze homogenisiert. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurde die Probe auf 1.5ml mit HBSS+++ aufgefüllt.

9.9 Stopped-flow-Messungen

9.9.1 Methode und instrumenteller Aufbau

Zur Beobachtung der Komplexbildungskinetik wird die Stopped-Flow-Methode verwendet. Sie wurde 1940 von Britton Chance zur Untersuchung von Enzym-Kinetiken entwickelt [Kre04]. Vorteile dieser Methode sind der geringe Probenverbrauch, die Möglichkeit den ganzen Verlauf der Reaktion zu beobachten und die sehr schnelle Mischung der Komponenten, übliche Totzeiten liegen im Bereich von 1-5ms. Die Wahl des Detektionssystem muss an den zu beobachtenden Prozess angepasst sein. Der verwendete Stopped-Flow-Mischer BioLogic SFM300 mit der Steuereinheit MPS-60 besteht aus drei Spritzen, die einzeln gesteuert werden können, mit einem Einzelvolumen von je 10ml. Durch einen Schrittmotor wird ein Teflonkolben nach oben gefahren und Lösung aus der Spritze herausgedrückt. Der Fluss wird nach Injektion des angegebenen Volumens abrupt gestoppt. Zusätzlich wird ein Stopventil am Ausgang der Küvette verwendet. Es sind dabei pro Spritze Volumina zwischen $13\mu\text{l}$ und 1.3ml in vorgegebenen Inkrementen einstellbar. Die Lösungen aus Spritze 1 und Spritze 2, werden intern über einen Kugelmischer gemischt und verlassen die Mischapparatur über eine gemeinsame Kapillare. Die Lösung aus Spritze 3 bleibt unverändert. Zur Steuerung wird das mitgelieferte Programm BioKine verwendet.

Die Beobachtungszelle ist eine selbst konstruierte Durchflussküvette mit einem vorgeschalteten Kugelmischer (siehe schematische Zeichnung 9.1, rechte Seite). Die Lösung aus Spritze 3 wird zentral von oben in den Kugelmischer geleitet, die Mischung aus Spritze 1+2 gelangt durch den seitlichen Eingang in den Mischer. Der Kugelmischer hat ein Volumen von $7\mu\text{l}$ und erzeugt eine turbulente, intensive und schnelle Mischung der beiden Komponenten. Die Mischung wird dann zentral in die $50\mu\text{l}$ fassende Küvette gepresst. Dabei wird die alte Lösung, die in der Küvette steht, über die sechs Ausgänge verdrängt. Zwei der Ausgänge befinden sich am Ende der zwei Kanäle, die anderen vier seitlich davon, je etwa 45° versetzt (siehe dazu die linke Seite der schematischen Zeichnung 9.1). Die Küvette besteht aus einer etwa 1cm dicken Quarzglas-Scheibe, in die der Probenraum (6mm Durchmesser, die Kanäle sind 1x1mm breit und hoch und 5mm lang) eingefräst ist. Dieser hat ein Gesamtvolumen von $37\mu\text{l}$. Die komplette Mischzelle besteht aus der Küvette selbst, einer Trennscheibe aus PEEK, über die die Zu- und Abflüsse mit der Küvette verbunden werden und einem PEEK-Block, in dem der Mischer sitzt. Zusammengehalten werden die einzelnen Komponenten von zwei Schrauben, die eine Metallplatte von unten gegen die Einzelteile pressen. Alle Kapillaren und Bohrungen haben einen Durchmesser von 0.75mm.

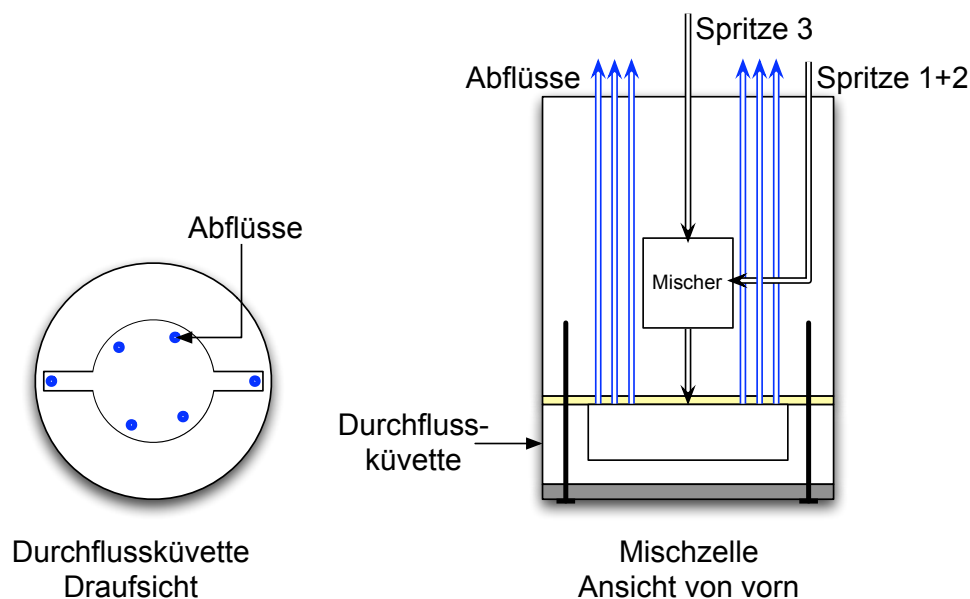


Abbildung 9.1: Mischzelle

Die Flussrate wurde konstant auf 2ml/s gesetzt. Alle Messungen wurden bei einem Streuwinkel von 30° und einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Dies führt, wie im folgenden gezeigt, bei Vernachlässigung der Extrapolation auf $q = 0$ nur zu einem kleinen Fehler in der Molmassenbestimmung.

9.9.2 Fehlerbetrachtung

Der Einfluss des Formfaktors $P(q)$ bei einem Streuwinkel von $\theta=30^\circ$ wird im folgenden betrachtet. Für $qR < 2$ kann der Formfaktor entwickelt werden als

$$P(q)^{-1} \approx 1 + q^2 \frac{R_g^2}{3} \quad (9.1)$$

Da für die PVP-Bürste der Trägheitsradius $R_g = 87\text{nm}$ beträgt, liegt der systematische Fehler ϵ von M_{rel} aufgrund des Formfaktoreinflusses bei $\epsilon = -18\%$. Unter der Annahme, dass R_g/R_h der Komplexlösung im Größenbereich von 1.2 liegt [SDH⁺07], liegen die Werte für R_g der Komplexlösung im Bereich $50\text{ nm} < R_g < 120\text{nm}$ (außer für $x_{Anion} = 0.398$). Es folgt, dass $-6\% < \epsilon < -34\%$ ist, das heißt der maximale relative Fehler für M_{rel} als Funktion der Zeit beläuft sich auf $+12\%$ bis -16% . Nur für die Messung bei $x_{Anion} = 0.398$ ist $R_g \approx 300\text{nm}$ und Gleichung 9.1 gilt nicht mehr. Da der Formfaktor für Komplexe mit großem qR_g unbekannt ist, ist die Übereinstimmung der Streuintensität bei $q = 8.4 \cdot 10^4 \text{cm}^{-1}$ mit

der relativen Molmasse M_{rel} extrem unsicher und spekulativ.

9.9.3 Probenvorbereitung

Vor der Messung wurde die DNA-Lösung durch PALL GHP Acrodisc Filter ($0.2\mu\text{m}$ Porengröße) staubfrei gefiltert. Die Apparatur wurde durch mehrfaches Spülen mit gefiltertem Wasser (Millex LG Filter, $0.2\mu\text{m}$ Porengröße) ebenfalls staubfrei gespült. Die PVP-Bürsten-Lösung wurde in einer Konzentration von 1g/l mit PALL GHP Acrodisc Filtern ($0.45\mu\text{m}$ Porengröße) gefiltert und dann mit filtrierten Puffer verdünnt. Alle Lösungen wurden entgast.

9.9.4 Komplexbildung

Zur Messung der Kinetiken wurde eine DNA-Konzentration von 10mg/L in 5mM Phosphatpuffer (pH 7) verwendet. Die PVP-Bürsten-Konzentration wurde variiert um verschiedene Mischungsverhältnisse einzustellen. Die Polyelektrolyte wurden immer im Volumenverhältnis 1:1 ($500\mu\text{l}$ pro Komponente) gemischt. Das Mischungsverhältnis wird ausgedrückt als Molbruch negativer DNA-Ladungen x_{Anion} :

$$x_{Anion} = \frac{c_{Anion}/M_{Anion}}{c_{Kation}/M_{Kation} + c_{Anion}/M_{Anion}} \quad (9.2)$$

mit $M_{Anion} = 330\text{g/mol}$ und $M_{Kation} = 307\text{g/mol}$, der mittleren Molmasse pro Ladung. x_{Anion} weicht für Komplexe auf PVP-Bürste und pUC19-DNA nicht stark von $w(\text{DNA})$ ab, da M_{Anion} und M_{Kation} sehr ähnlich sind. Für den untersuchten Bereich ist x_{Anion} 2.5 bis 6% kleiner als $w(\text{DNA})$.

Zwischen den Messungen wurde die Flusszelle mit reinem Wasser gespült um alle Komplexe zu entfernen.

9.9.5 Datenaufzeichnung und -bearbeitung

Mit dem Programm ALV 5000 Correlator Software 3.0 wird die Zählrate der Streuintensität, die der Detektor, ein ALV/SO-SIPD Single Photon Detector, misst, als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Die Auflösung liegt bei 0.256ms . Das Stopventil am Ausgang der Küvette liefert ein elektronisches Startsignal. Es öffnet sich 2ms vor Beginn der Injektion. Da pro Messung $1000\mu\text{l}$ Lösung mit einer Flussrate von 2ml/s injiziert wurden, ist die

Injektion 502ms nach dem Startsignal des Stopventils beendet. Dies bestimmt gleichzeitig den Zeitpunkt $t = 0$ für die Komplexbildungskinetik.

Das Komplexwachstum wurde 90s lang durch Messung der Streuintensität in Abhängigkeit der Zeit beobachtet. Anschließend wurde über 60s eine Korrelationsfunktion aufgenommen um den finalen hydrodynamischen Radius der Komplexe exakt zu bestimmen. Für weitere Langzeitmessungen wurde die Komplexmischung aus dem Mischer direkt in Standard Quarzküvetten gefüllt.

Das Signal zu Rausch-Verhältnis wurde durch Mittelung über 20 Wiederholungsmessungen verbessert. Um die Daten weiter zu glätten und um die Datenmenge zu reduzieren, wurden die Daten in n Pakete mit jeweils 40 Intensitäten aufgeteilt. In jedem Paket wurden 2^n Datenpunkte gemittelt bis zu einem Maximum von 2048 Datenpunkten (entsprechend einem Mittelungsintervall von ungefähr 500ms) für lange Zeiten, wenn die kinetischen Prozesse auf viel größeren Zeitskalen stattfinden. Ein Beispiel für die Datenreduzierung und das Glätten finden sich in Abbildung 9.2.

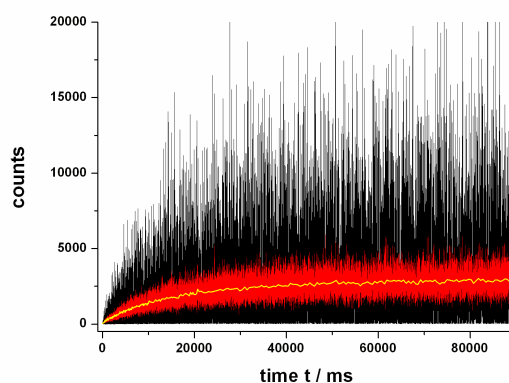


Abbildung 9.2: Datenreduzierung und Glättung der Streuintensitäten. Schwarz: Originaldaten, rot: Mittelung über 20 Wiederholungsmessungen, gelb: geglättete Daten (wie im Text beschrieben).

9.9.6 Mischartefakte bei kleinen Zeiten

Im Bereich von etwa 10ms kann ein Anstieg der Streuintensität beobachtet werden, der jedoch keinen Wachstumsprozess darstellt. In einem Testexperiment wurde stark streuende Polymerlösung in die Durchflussküvette gefüllt und dann $80\mu\text{l}$ reines Wasser, das nur sehr schwach streut, injiziert. Wie in Abbildung 9.3 zu sehen, sinkt die Intensität zunächst ab, da Polymerlösung durch Wasser verdrängt wird. Sie steigt dann im Zeitbereich von 5 bis 10ms

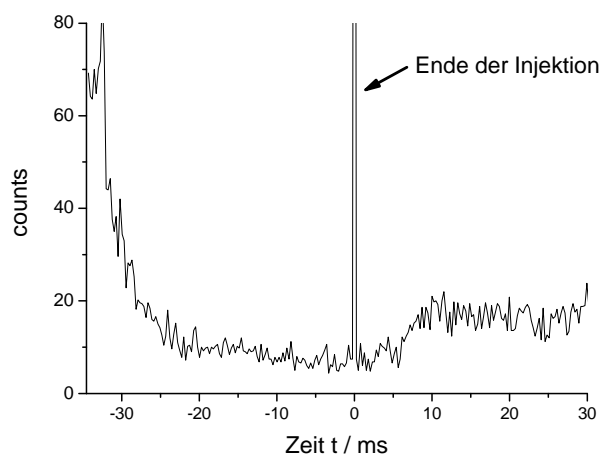


Abbildung 9.3: Testexperiment zur Untersuchung des Mischartefakts. $80\mu\text{l}$ reines Wasser werden in stark streuende Polymerlösung injiziert. Nach Abnahme der Streuintensität während der Injektion, steigt diese nach dem Stopp wieder an. Dies wird durch einen Rückfluss der Polymerlösung in das Streuvolumen verursacht.

nach dem Stopp jedoch wieder an, erreicht aber nicht die ursprüngliche Streuintensität. Die ansteigende Intensität wird durch ins Streuvolumen zurückfließende Polymerlösung verursacht. Der Effekt ist klein und tritt sehr schnell nach dem Ende der Injektion auf.

Anhang A

Verwendete Geräte und Chemikalien

Agarose-Gelelektrophorese Die Experimente zur Komplexierungseffizienz, Degradation durch DNase und zur Freisetzung der DNA aus den Komplexen wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Dazu wurde das vertikale GENTerphorese System (70x66x2mm, GENTerprise Genomics, Deutschland) verwendet. Die Gele enthalten 1% Agarose (ROTI AGAROSE, Carl Roth, Deutschland) in 1x TBE-Puffer. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TBE-Puffer verwendet. 5-20 μ l der Probe wurden mit 5 μ l Ladepuffer (0.05% w/v Bromphenolblau, 40% w/v Sukrose, 0.5% w/v SDS, 0.1M EDTA, pH=8, Sigma Aldrich) gemischt und aufgetragen. Die Gele liefen bei konstantem Stromfluss von 85mA. Die Anfärbung erfolgte für 10min in Ethidiumbromidlösung. Die Gele wurden dann mit einem E-Box 1000/20M Gel Imaging System (Peqlab, Deutschland) fotografiert und mit der E-Capt-Software (Vilber Lourmat) analysiert.

Ethidiumbromid-Verdrängung Zur Detektion der Ethidiumbromidfluoreszenz wurde ein Tecan Microplate Reader Infinite M1000 verwendet.

Lichtstreuung Die dynamischen und statischen Lichtstremessungen wurden an einer Anlage durchgeführt, die aus einem Helium- Neon-Laser (JDS Uniphase 1145p-3083, Wellenlänge 632.8 nm, Leistung 25 mW) und einer Detektionseinheit (Goniometer ALV-SP86, ALV/High QEAPD Avalanche-Photodioden, Faseroptikdetektionssystem, ALV 3000 Korrelator/Strukturator von der Firma ALV, Langen) besteht. Außerdem wurde eine Vielwinkelanlage folgender Spezifikation eingesetzt: ALV/CGS-8F DLS/SLS 5022F Goniometer, 7004 Korrelator, APD Avalanche-Photodioden, optisches Detektorsystem mit Uniphase Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 632.8 nm, Leistung 21 mW).

Für alle Messungen wurden Küvetten aus Quarzglas der Firma Hellma, Müllheim, mit einem Durchmesser von 20mm und einem Volumen von 14ml bzw. einem Durchmesser von 10mm und einem Volumen von 5ml verwendet. Vor dem Befüllen mit der Probenlösung wurden die Küvetten mit destilliertem Aceton staubfrei gespült und danach in einer staubfreien Flow-Box mit der Öffnung nach unten getrocknet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Probenlösungen durch Filter des Typs Acrodisc GHP (Porengröße $0,20\mu\text{m}$, Material der Membran: hydrophilisiertes Polypropylen, Durchmesser der Membran 13 oder 25mm) der Firma Pall Corporation filtriert.

AFM-Aufnahmen Die AFM-Aufnahmen wurden mit einem MultiModeTM Scanning Probe Microscope, ausgestattet mit einem Nanoscope IIIa-Controller, der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, USA, im tapping-Mode gemacht. Die verwendeten Cantilever von der Firma Nanosensors, Wetzlar-Blankenfeld haben eine Resonanzfrequenz von ca. 300 kHz und bestehen aus Silicium. Alle Proben wurden auf frisch gespaltenem Mica präpariert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Probenlösungen mit einer Konzentration von ca. 2.5mg/l durch Spin-coating (ca. 5000 Umdrehungen pro Minute) auf das Mica aufgetragen.

Chemikalien Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, Fisher Scientific oder Merck in p.a.-Qualität bezogen. Für die wässrigen Lösungen wurde Milli-Q-Wasser verwendet, das mit einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore, Schwalbach, hergestellt wurde. Die pUC19-DNA wurde von ElimBiopharmaceuticals bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Anhang B

Umrechnung von Gewichtsbruch DNA zu Ladungsverhältnis +/-

Die folgenden Graphen B.1 und B.2 zeigen den Zusammenhang zwischen Gewichtsbruch an DNA ($w(\text{DNA})$) und Ladungsverhältnis +/- für PVP-DNA- und PLL-DNA-Komplexe. Eine Tabelle zeigt jeweils die +/- Verhältnisse für ausgesuchte Gewichtsbrüche an DNA.

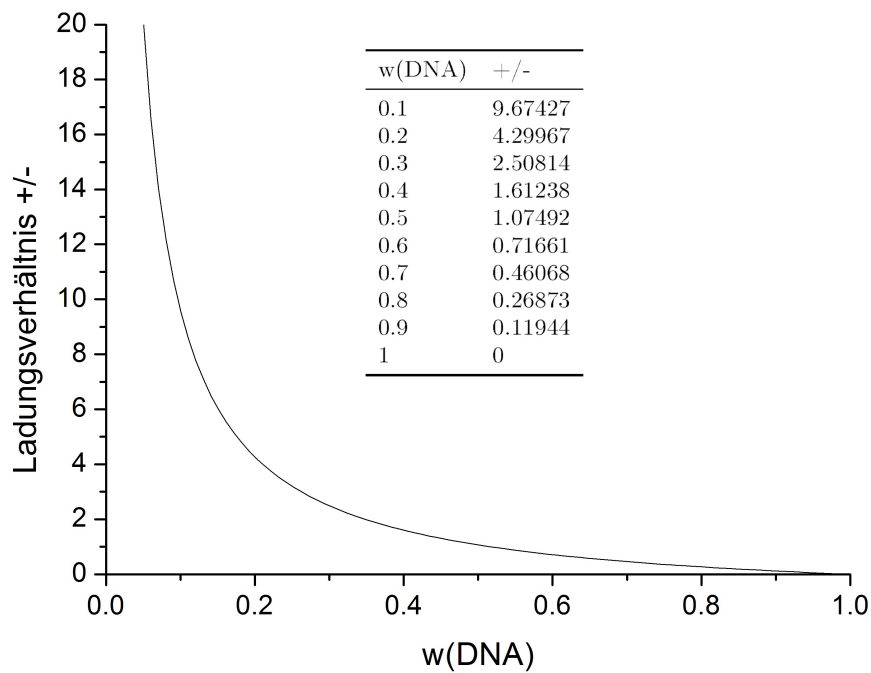


Abbildung B.1: Umrechnung von $w(\text{DNA})$ in Ladungsverhältnis +/- für PVP-Komplexe

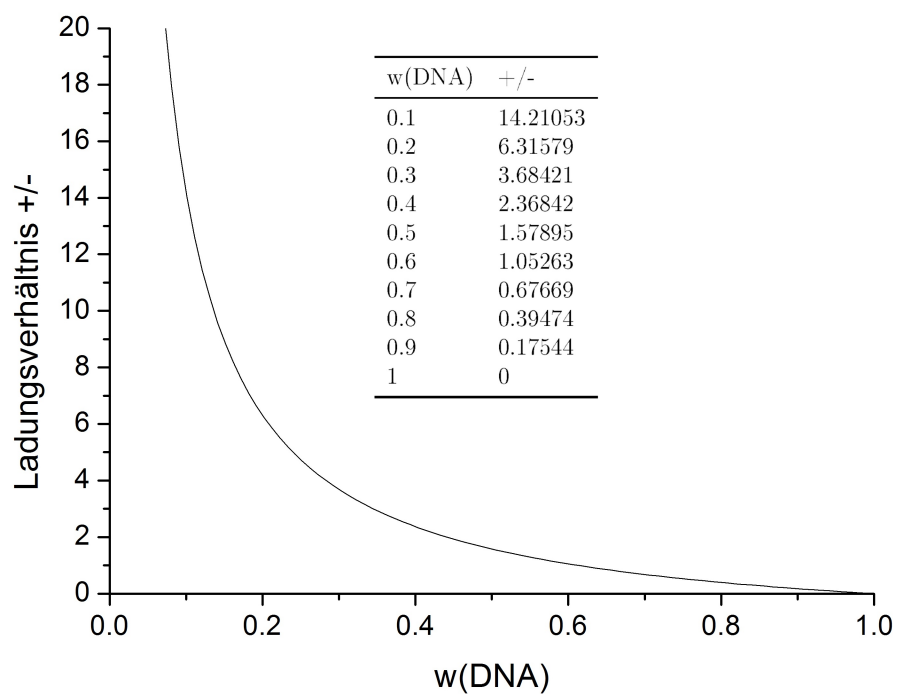


Abbildung B.2: Umrechnung von $w(\text{DNA})$ in Ladungsverhältnis +/- für PLL-Komplexe

Anhang C

AFM-Bilder der PLL-Bürsten-pUC19-Komplexe

Die AFM-Bilder der Polylysin-Bürsten-DNA-Komplexe sind als Höhen- und Phasenbild gezeigt. Zusätzlich sind vergrößerte Ausschnitte der Amplitudenbilder aus Abschnitt 4.2.1 gezeigt.

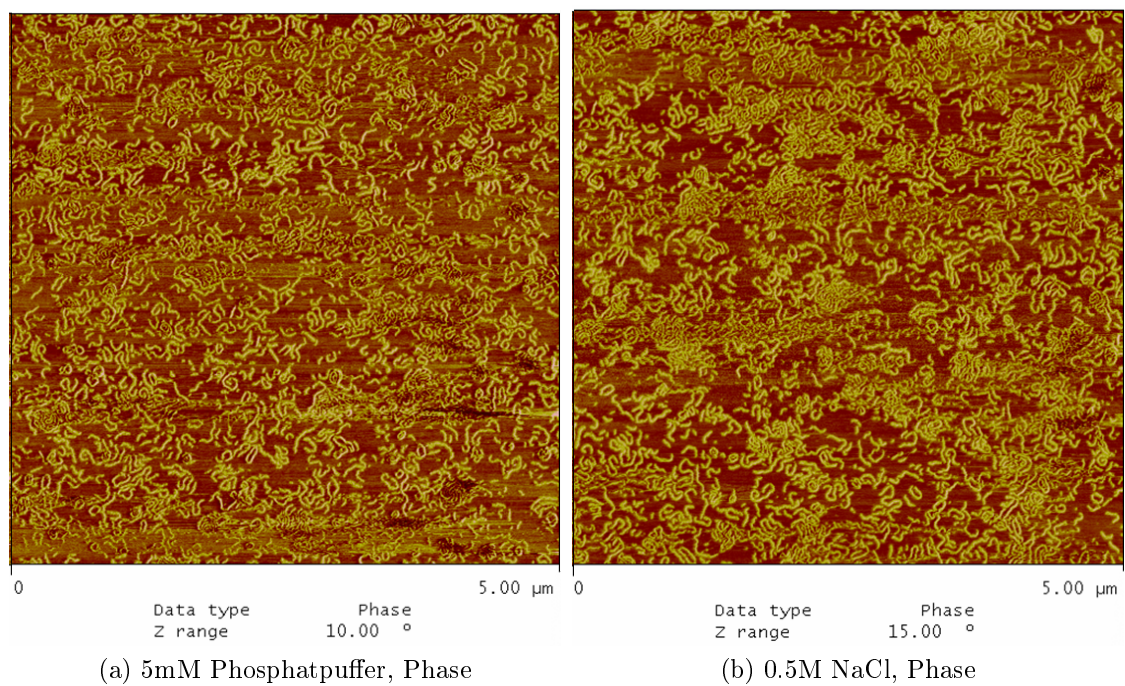
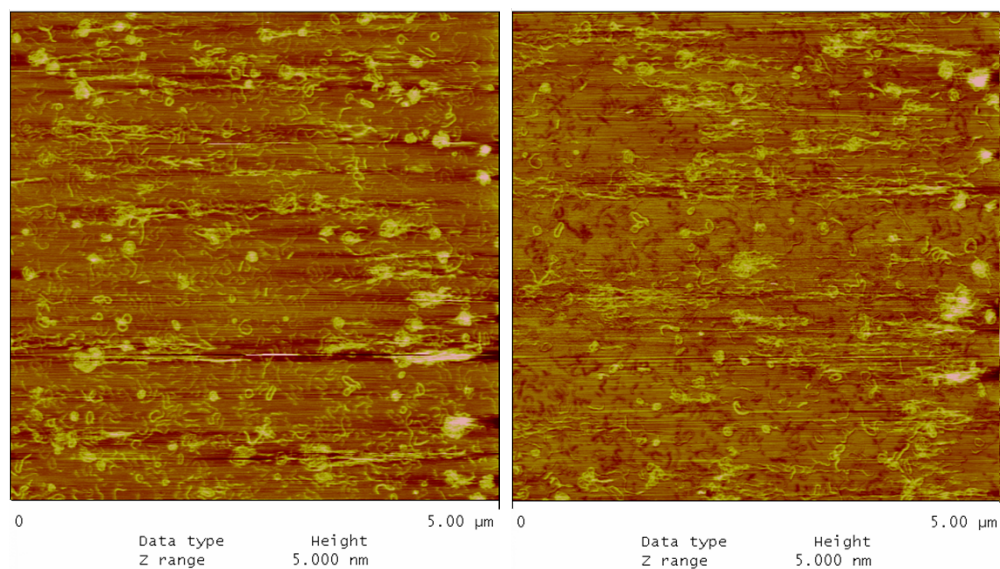
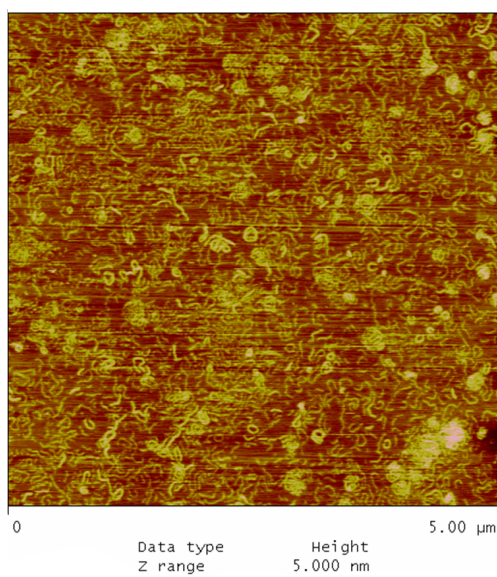


Abbildung C.1: AFM-Phasenbilder der Komplexe aus Polylysine-Bürste und pUC19-DNA ($\pm = 3.9$) in 5mM Phosphatpuffer und 0.5mol NaCl



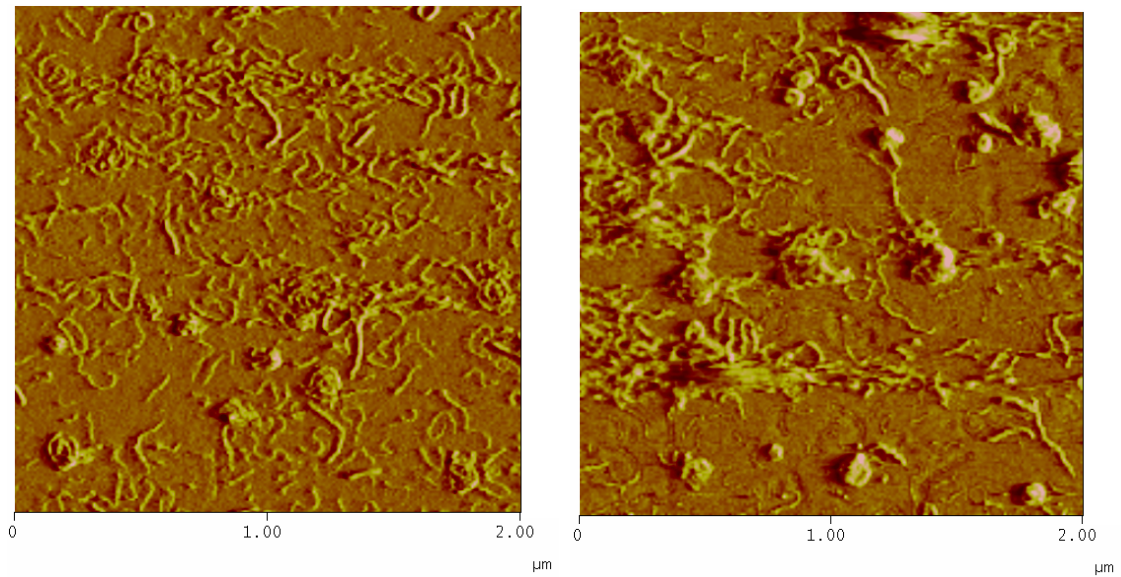
(a) 5mM Phosphatpuffer, Höhe

(b) 0.5M NaCl, Höhe



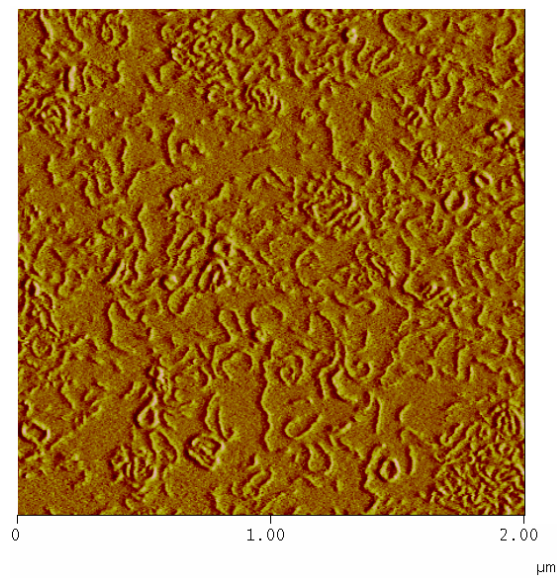
(c) 2M NaCl, Höhe

Abbildung C.2: AFM-Höhenbilder der Komplexe aus Polylysin-Bürste und pUC19-DNA ($\pm = 3.9$) in 5mM Phosphatpuffer, 0.5mol NaCl und 2mol NaCl



(a) 5mM Phosphatpuffer, Amplitude

(b) 0.5M NaCl, Amplitude



(c) 2M NaCl, Amplitude

Abbildung C.3: AFM-Amplitudenbilder der Komplexe aus Polylysine-Bürste und pUC19-DNA ($\pm = 3.9$) in 5mM Phosphatpuffer, 0.5mol NaCl und 2mol NaCl

Anhang D

Transfektionseffizienzen von Lipofektamin in verschiedenen Zelllinien

In Tabelle D.1 sind die Transfektionseffizienzen von Lipofektamin in verschiedenen Zelllinien, wie sie im Datenblatt des Reagens zu finden sind, zusammengestellt.

Tabelle D.1: Transfektionseffizienzen von Lipofektamin in verschiedenen Zelllinien aus dem Datenblatt des Lipofectamine Reagents von Invitrogen.

Zelltyp	Transfektionseffizienz / %
293H	99
293F	99
BE(2)C	77
CHO-S (adhärent)	96
COS7L	99
CV-1	70
HeLa	94
HT1080	81
HUVEC	<2%
MDCK	43
Murine Embryonic Stem Cells, D3	75
PC12	85
Primary Human Fibroblasts	48
RKO	40-60
SKBR3	49
Vero	86
Rat Hepatocytes	50
Rat E18 Cortical Neurons	20-25

Anhang E

Verwendete Abkürzungen

AFM:	Rasterkraftmikroskopie
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
FCS:	fetales Kälberserum
GFP:	Green Fluorescent Protein
GFP-DNA:	DNA, die GFP kodiert
GPC:	Gelpermeationschromatographie
HBSS:	Hank's Buffered Salt Solution
HBSS+++:	HBSS mit zusätzlich 2mM CaCl ₂ , 2mM MgCl ₂ und 10mM Glukose
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hepes-Puffer:	Hepes-Puffer bestehend aus 25mM HEPES, 125mM NaCl, 1mM CaCl ₂ , 2.6mM KCl, 1.2mM MgCl ₂ , 1.2mM KH ₂ PO ₄ , 10mM Glukose, auf pH 7.4 eingestellt
M _w :	Gewichtsmittel der Molmasse
NaPO:	Natriumphosphatpuffer pH = 7
PBMEC:	porcine brain microvessel endothelial cells, Schweinehirnendothelzellen
PLL:	Poly-L-Lysin
pUC19:	künstlich hergestelltes, bakterielles Plasmid
PVP:	mit Ethylbromid quaternisiertes Polyvinylpyridin
R _g :	Trägheitsradius
R _h :	Hydrodynamischer Radius
RNA:	Ribonukleinsäure
TBE:	TRIS-Borat-EDTA-Puffer bestehend aus 89mM TRIS-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), 89mM Borsäure und 2mM Na-EDTA

w(DNA):	Gewichtsbruch DNA, $w(DNA) = \frac{m(DNA)}{m_{gesamt}}$
+/-:	Ladungsverhältnis der positiven Ladungen am Stickstoff zu negativen Ladungen der Phosphate

Literaturverzeichnis

- [AAHL05] ANDERSON, DANIEL G., AKIN AKINC, NAUSHAD HOSSAIN und ROBERT LANGER: *Structure-property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters)*. *Molecular Therapy*, 11(3):426–434, 2005.
- [AAZP+07] ASAD AYOUBI, MEHRAN, ANATOLY A. ZINCHENKO, OLGA E. PHILIPPOVA, ALEXEI R. KHOKHLOV und KENICHI YOSHIKAWA: *Visualization of Different Pathways of DNA Release from Interpolyelectrolyte Complexes*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(29):8373–8378, 2007.
- [AEC71] AUBORN, JAMES J., EDWARD M. EYRING und G. LEW CHOULES: *Kinetics of Sodium Dodecyl Sulfate Solubilization of Mycoplasma laidlawii Plasma Membranes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9):1996–1998, 1971.
- [AMCA97] ASAYAMA, SHOICHIRO, ATSUSHI MARUYAMA, CHONG-SU CHO und TOSHIHIRO AKAIKE: *Design of Comb-Type Polyamine Copolymers for a Novel pH-Sensitive DNA Carrier*. *Bioconjugate Chemistry*, 8(6):833–838, 1997.
- [BB07] BAKER, ERIN SHAMMEL und MICHAEL T. BOWERS: *B-DNA Helix Stability in a Solvent-Free Environment*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(7):1188–1195, 2007.
- [BBS+06] BERTSCHINGER, MARTIN, GAURAV BACKLIWAL, ARNAUD SCHERTENLEIB, MARTIN JORDAN, L. DAVID HACKER und M. FLORIAN WURM: *Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: Implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery*. *Journal of Controlled Release*, 116(1):96–104, 2006.

- [BC97] BAILEY, AUSTIN L. und PIETER R. CULLIS: *Membrane Fusion with Cationic Liposomes: Effects of Target Membrane Lipid Composition*. *Biochemistry*, 36(7):1628–1634, 1997.
- [BCM+00] BENNS, JONATHAN M., JOON-SIG CHOI, RAM I. MAHATO, JONG-SANG PARK und SUNG WAN KIM: *pH-Sensitive Cationic Polymer Gene Delivery Vehicle: N-Ac-poly(l-histidine)-graft-poly(l-lysine) Comb Shaped Polymer*. *Bioconjugate Chemistry*, 11(5):637–645, 2000.
- [Bee96] BEER, MICHAEL: *Konformation von Polyelektrolyten in verdünnter Lösung*. Doktorarbeit, Universität Bayreuth, 1996.
- [BKM01] BRONICH, TATIANA, ALEXANDER V. KABANOV und LUIS A. MARKY: *A Thermodynamic Characterization of the Interaction of a Cationic Copolymer with DNA*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(25):6042–6050, 2001.
- [BLZ+95] BOUSSIF, OTMANE, F. LEZOUALC'H, M. A. ZANTA, M. D. MERGNY, D. SCHERMAN, B. DEMENEIX und JEAN-PAUL BEHR: *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16):7297–7301, 1995.
- [BMK+02] BIEBER, THORSTEN, WOLFGANG MEISSNER, SAWA KOSTIN, AXEL NIEMANN und HANS-PETER ELSASSER: *Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes*. *Journal of Controlled Release*, 82(2-3):441–454, 2002.
- [BML03] BARRELEIRO, PAULA C. A., ROLAND P. MAY und BJORN LINDMAN: *Mechanism of formation of DNA-cationic vesicle complexes*. *Faraday Discussions*, 122:191–201, 2003.
- [BP00] BERNE, BRUCE J. und ROBERT PECORA: *Dynamic light scattering: With applications to chemistry, biology, and physics*. Dover Publications, Mineola, NY, Dover ed. Auflage, 2000.
- [BPD+83] BASS, D. A., J. W. PARCE, L. R. DECHATELET, P. SZEJDA, M. C. SEEDS und M. THOMAS: *Flow cytometric studies of oxidative product for-*

- mation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation.* Journal of Immunology, 130:1910–1917, 1983.
- [Bre05] BREUNIG, MIRIAM: *Polyethylenimine Based Nucleic Acid Delivery.* Doktorarbeit, Universität Regensburg, 2005.
- [BS57] BLAU, N. und C. STUCKWISCH: *Notes - Conjugative Effect of Dimethylsulfonio Group in an Aliphatic System.* The Journal of Organic Chemistry, 22(1):82–83, 1957.
- [BS07] BÖHME, UTE und ULRICH SCHELER: *Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR.* Chemical Physics Letters, 435(4-6):342–345, 2007.
- [BSH+05] BEREZHNA, SVITLANA, STEPHAN SCHAEFER, RAINER HEINTZMANN, MICHAEL JAHNZ, GUIDO BOESE, ASHOK DENIZ und PETRA SCHWILLE: *New effects in polynucleotide release from cationic lipid carriers revealed by confocal imaging, fluorescence cross-correlation spectroscopy and single particle tracking.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1669(2):193–207, 2005.
- [CH94] CARTER, C. DANIEL und X. JOSEPH HO: *Structure of Serum Albumin.* In: ANFINSEN, C.B., DAVID S. EISENBERG und FREDERIC M. EDSALL (Herausgeber): *Advances in Protein Chemistry : Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases,* Band Volume 45, Seiten 153–176, 176a, 176b, 176c, 176d, 176e, 176f, 176g, 176h, 176i, 176j, 176k, 176l, 177–203. Academic Press, 1994.
- [CH05] CONWELL, C. CHRISTINE und LEAF HUANG: *Recent Advances in Non-viral Gene Delivery.* In: LEAF HUANG, HUNG und ERNST WAGNER MIENCHIE (Herausgeber): *Advances in Genetics : Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 1,* Band Volume 53, Seiten 1–18. Academic Press, 2005.
- [Cha40] CHANCE, BRITTON: *The accelerated flow method for rapid reactions.* Journal of the Franklin Institute, 229(4):455–476, 1940.
- [CMT+95] CHOKSAKULNIMITR, SUTHUMMAR, SADA MASUDA, HIDEAKI TOKUDA, YOSHINOBU TAKAKURA und MITSURU HASHIDA: *In vitro cytotoxicity of*

- macromolecules in different cell culture systems.* Journal of Controlled Release, 34(3):233–241, 1995.
- [CMZP05] CHEN, DAVID J., BRIAN S. MAJORS, ALEXANDER ZELIKIN und DAVID PUTNAM: *Structure-function relationships of gene delivery vectors in a limited polycation library.* Journal of Controlled Release, 103(1):273–283, 2005.
- [DK05] DOENECKE, DETLEF und PETER KARLSON: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie.* Thieme, Stuttgart, 15., komplett überarb. und neugestaltete Aufl. Auflage, 2005.
- [DMSM97] DUNLAP, D. D., A. MAGGI, M. R. SORIA und L. MONACO: *Nanosopic structure of DNA condensed for gene delivery.* Nucleic Acids Res, 25(15):3095–3101, 1997.
- [DSY09] DITTO, J. ANDREW, N. PARTH SHAH und H. YANG YUN: *Non-viral gene delivery using nanoparticles.* Expert Opinion on Drug Delivery, 6(11):1149–1160, 2009.
- [Dus07] DUSCHNER, SABRINA: *Tensid- und Interpolyelektrolytkomplexe semiflexibler Polyelektrolyte.* Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2007.
- [DYJ+09] DENG, RUI, YANAN YUE, FAN JIN, YANGCHAO CHEN, HSIANG-FU KUNG, MARIE C. M. LIN und CHI WU: *Revisit the complexation of PEI and DNA – How to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure?* Journal of Controlled Release, 140(1):40–46, 2009.
- [EA04] EL-ANEED, ANAS: *An overview of current delivery systems in cancer gene therapy.* Journal of Controlled Release, 94(1):1–14, 2004.
- [EPTV72] EVDOKIMOV, YU M., A. L. PLATONOV, A. S. TIKHONENKO und YA M. VARSHAVSKY: *A compact form of double-stranded DNA in solution.* FEBS Letters, 23(2):180–184, 1972.
- [FBL+99] FISCHER, DAGMAR, THORSTEN BIEBER, YOUXIN LI, HANS-PETER ELSÄSSER und THOMAS KISSEL: *A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery*

- Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity.* Pharmaceutical Research, 16(8):1273–1279, 1999.
- [FSGA70] FASMAN, GERALD D., B. SCHAFFHAUSEN, L. GOLDSMITH und ALICE J. ADLER: *Conformational changes associated with f-1 histone-deoxyribonucleic acid complexes. Circular dichroism studies.* Biochemistry, 9(14):2814–2822, 1970.
- [GB00] GEALL, J. ANDREW und S. IAN BLAGBROUGH: *Rapid and sensitive ethidium bromide fluorescence quenching assay of polyamine conjugate-DNA interactions for the analysis of lipoplex formation in gene therapy.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 22(5):849–859, 2000.
- [GWM99] GODBEY, W. T., KENNETH K. WU und ANTONIOS G. MIKOS: *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(9):5177–5181, 1999.
- [HAB00] HE, S., P. G. ARSCOTT und V. A. BLOOMFIELD: *Condensation of DNA by multivalent cations: Experimental studies of condensation kinetics.* Biopolymers, 53(4):329–341, 2000.
- [HSH+85] HEUCK, C. C., U. SCHIELE, D. HORN, D. FRONDA und E. RITZ: *The role of surface charge on the accelerating action of heparin on the antithrombin III-inhibited activity of alpha-thrombin.* Journal of Biological Chemistry, 260(8):4598–4603, 1985.
- [Hug00] HUGENBERG, NORBERT: *Darstellung und Charakterisierung perlenkettenartiger und zylindrischer Polyelektrolyte.* Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2000.
- [IKZ+95] IZUMRUDOV, V.A., S.I. KARGOV, M.V. ZHIRYAKOVA, A.B. ZEZIN und V.A. KABANOV: *Competitive reactions in solutions of DNA and water-soluble interpolyelectrolyte complexes.* Biopolymers, 35(5):523–531, 1995.
- [JJ82] JAKUBKE, HANS-DIETER und HANS JESCHKEIT: *Aminosäuren, Peptide, Proteine.* Verl. Chemie, Weinheim, 1982.

- [Kab99] KABANOV, ALEXANDER V.: *Taking polycation gene delivery systems from in vitro to in vivo*. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(9):365–372, 1999.
- [KAC+91] KABANOV, ALEXANDER V., IRINA V. ASTAFYEVA, MIKHAIL L. CHIKINDAS, GENNADII F. ROSENBLAT, VSEVOLOD I. KISELEV, EUGENII S. SEVERIN und VICTOR A. KABANOV: *DNA interpolyelectrolyte complexes as a tool for efficient cell transformation*. *Biopolymers*, 31(12):1437–1443, 1991.
- [KAM+93] KABANOV, ALEXANDER V., IRINA V. ASTAFIEVA, IRINA V. MAKSIMOVA, EUGENII M. LUKANIDIN, GEORGII P. GEORGIEV und VICTOR A. KABANOV: *Efficient transformation of mammalian cells using DNA interpolyelectrolyte complexes with carbon chain polycations*. *Bioconjugate Chemistry*, 4(6):448–454, 1993.
- [KFS09] KÜHN, FRAUKE, KARL FISCHER und MANFRED SCHMIDT: *Kinetics of Complex Formation between DNA and Cationically Charged Cylindrical Brush Polymers Observed by Stopped Flow Light Scattering*. *Macromolecular Rapid Communications*, 30(17):1470–1476, 2009.
- [Kit09] KITTELMANN, MARKUS: *Skript zum Fortgeschrittenenpraktikum: Rasterkraftmikroskopie*, 2009.
- [KR97] KHADAKE, JYOTI R. und MANCHANAHALLI R. SATYANARAYANA RAO: *Condensation of DNA and Chromatin by an SPKK-Containing Octapeptide Repeat Motif Present in the C-Terminus of Histone H1*? *Biochemistry*, 36(5):1041–1051, 1997.
- [Kre04] KRESGE, NICOLE: *Britton Chance: Olympian and Developer of Stop-Flow Methods*. *The Journal of Biological Chemistry*, 10:843, 2004.
- [KSH04] KRESGE, NICOLE, ROBERT D. SIMONI und ROBERT L. HILL: *Britton Chance: Olympian and Developer of Stop-Flow Methods*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50):e10, 2004.
- [Kue03] KUENNEKE, STEPHANIE: *Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörperunterstützten Lipidmembranen*. *Doktorarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2003.

- [Lai01] LAI, EVA: *Monitoring DNA/Poly-L-Lysine Polyplex Formation with Time-Resolved Multiangle Laser Light Scattering*. Biophysical Journal, 80:864, 2001.
- [LDPR83] LAUGAA, PHILIPPE, ALAIN DELBARRE, JEAN-BERNARD PECQ und BERNARD P. ROQUES: *Comparative Binding of Ethidium and Three Azido Analogs to Dinucleotides: Affinity and Intercalation Geometry*. European Journal of Biochemistry, 134(1):163–173, 1983.
- [LDZ+10] LIU, XI-QIU, JIN-ZHI DU, CHU-PEI ZHANG, FANG ZHAO, XIAN-ZHU YANG und JUN WANG: *Brush-shaped polycation with poly(ethylenimine)-b-poly(ethylene glycol) side chains as highly efficient gene delivery vector*. International Journal of Pharmaceutics, 392(1-2):118–126, 2010.
- [LE09] LOTTSPREICH, FRIEDRICH und JOACHIM W. ENGELS: *Bioanalytik*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 2. Aufl., [Nachdr.] Auflage, 2009.
- [LP67] LEPECQ, B. J. und C. PAOLETTI: *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids, Physical-Chemical characterization: Federation of European Biochemical Societies 3rd Meeting*. Journal of Molecular Biology, 27(1):87–106, 1967.
- [Luo00] LUO, DAN: *Synthetic DNA delivery systems*. Nature Biotechnology, 18:33, 2000.
- [LZW+06] LV, HONGTAO, SHUBIAO ZHANG, BING WANG, SHAOHUI CUI und JIE YAN: *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery*. Journal of Controlled Release, 114(1):100–109, 2006.
- [Man69] MANNING, GERALD S.: *Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties*. J. Chem. Phys., 51(3):924–933, 1969.
- [Man79] MANNING, GERALD S.: *Counterion binding in polyelectrolyte theory*. Accounts of Chemical Research, 12(12):443–449, 1979.
- [MB68] MILLER, I. R. und D. BACH: *Interaction of DNA with heavy metal ions and polybases: Cooperative phenomena*. Biopolymers, 6(2):169–179, 1968.

- [MCP88] MORGAN, D. M., J. CLOVER und J. D. PEARSON: *Effects of synthetic poly-cations on leucine incorporation, lactate dehydrogenase release, and morphology of human umbilical vein endothelial cells*. Journal of Cell Science, 91(2):231–238, 1988.
- [Mor01] MORET, INES: *Stability of PEI–DNA and DOTAP–DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum*. Journal of Controlled Release, (76):169–181, 2001.
- [Mut96] MUTHUKUMAR, M.: *Theory of electrophoretic mobility of a polyelectrolyte in semidilute solutions of neutral polymers*. ELECTROPHORESIS, 17(6):1167–1172, 1996.
- [MVT+02] MÄNNISTÖ, MARJO, SYLVIE VANDERKERKEN, VESKA TONCHEVA, MATTI ELOMAA, MARIKA RUPONEN, ETIENNE SCHACHT und ARTO URTTI: *Structure-activity relationships of polylysines: effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery*. Journal of Controlled Release, 83(1):169–182, 2002.
- [MWF+98] MARUYAMA, ATSUSHI, HIROMITSU WATANABE, ANWARUL FERDOUS, MAIKO KATOH, TSUTOMU ISHIHARA und TOSHIHIRO AKAIKE: *Characterization of Interpolyelectrolyte Complexes between Double-Stranded DNA and Polylysine Comb-Type Copolymers Having Hydrophilic Side Chains*. Bioconjugate Chemistry, 9(2):292–299, 1998.
- [Nor92] NORDMEIER, ECKHARD: *Absorption spectroscopy and dynamic and static light-scattering studies of ethidium bromide binding to calf thymus DNA: implications for outside-binding and intercalation*. The Journal of Physical Chemistry, 96(14):6045–6055, 1992.
- [OIK77] OLMSTED III, JOHN und R. DAVID KEARNS: *Mechanism of Ethidium Bromide Fluorescence Enhancement on Binding to Nucleic Acids*. Biochemistry, 16:3647–3654, 1977.
- [OOW+02] OHSAKI, MIO, TATSUYA OKUDA, AKIHIRO WADA, TOSHIYA HIRAYAMA, TAKURO NIIDOME und HARUHIKO AOYAGI: *In Vitro Gene Transfection Using Dendritic Poly-(L-lysine)*. Bioconjugate Chemistry, 13(3):510–517, 2002.

- [PCK+91] PASTERNAK, ROBERT, MELISSA CACCAM, BART KEOGH, THOMAS A. STEPHENSON, ALISON P. WILLIAMS und ESTHER J. GIBBS: *Long-range fluorescence quenching of ethidium ion by cationic porphyrins in the presence of DNA*. Journal of the American Chemical Society, 113(18):6835–6840, 1991.
- [PCTB72] PEGGION, E., A. COSANI, M. TERBOJEVICH und G. BORIN: *Conformational studies on polypeptides. The effect of sodium perchlorate on the conformation of poly-L-lysine and of random copolymers of L-lysine and L-phenylalanine in aqueous solution*. Biopolymers, 11(3):633–643, 1972.
- [Poe84] POERSCHKE, DIETMAR: *Dynamics of DNA condensation*. Biochemistry, 23(21):4821–4828, 1984.
- [Put06] PUTNAM, DAVID: *Polymers for gene delivery across length scales*. Nat Mater, 5(6):439–451, 2006.
- [RHBG00] RAMSAY, EUAN, JON HADGRAFT, JAMES BIRCHALL und MARK GUMBLETON: *Examination of the biophysical interaction between plasmid DNA and the polycations, polylysine and polyornithine, as a basis for their differential gene transfection in-vitro*. International Journal of Pharmaceutics, 210(1-2):97–107, 2000.
- [RS64] ROSS, PHILIP D. und ROBERT L. SCRUGGS: *Electrophoresis of DNA. II. Specific interactions of univalent and divalent cations with DNA*. Biopolymers, 2(1):79–89, 1964.
- [Sch93] SCHMIDT, MANFRED: *Simultaneous static and dynamic light scattering: applicatiob to polymer structure analysis*. In: BROWN, WYN (Herausgeber): *Dynamic Light Scattering, The Method and Some Applications*, Seiten 372–406. Oxford Science Publications, 1993.
- [Sch04] SCHMIDT, MANFRED: *Polyelectrolytes with defined molecular architecture II*, Band 166 der Reihe *Advances in polymer science*. Springer, Berlin, 2004.
- [Sch07] SCHÄRTL, WOLFGANG: *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, 2007.

- [SDH+07] STÖRKLE, DOMINIC, SABRINA DUSCHNER, NILS HEIMANN, MICHAEL MASKOS und MANFRED SCHMIDT: *Complex Formation of DNA with Oppositely Charged Polyelectrolytes of Different Chain Topology: Cylindrical Brushes and Dendrimers*. *Macromolecules*, 40(22):7998–8006, 2007.
- [SFDL00] SCHAFFER, DAVID V., NICK A. FIDELMAN, NILY DAN und DOUGLAS A. LAUFFENBURGER: *Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery*. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5):598–606, 2000.
- [SLF69] SHAPIRO, JEWEL T., MARC LENG und GARY FELSENFELD: *Deoxyribonucleic acid-polylysine complexes. Structure and nucleotide specificity*. *Biochemistry*, 8(8):3219–3232, 1969.
- [Smo16] SMOLUCHOWSKI, M.: *Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen*. *Physikalische Zeitschrift*, 17:557, 1916.
- [SO86] SUCK, DIETRICH und CHRISTIAN OEFNER: *Structure of DNase I at 2.0 [ångström] resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA*. *Nature*, 321(6070):620–625, 1986.
- [Ste02] STEPHAN, TIM: *Amphipolare zylindrische Bürsten: Darstellung und Charakterisierung von Copolymakromonomeren*. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2002.
- [Sto07] STOERKLE, DOMINIC: *Interpolyelektrolytkomplexe zylindrischer Bürstenpolymere*. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2007.
- [TB56] TANFORD, CHARLES und G. JOHN BUZZELL: *The Viscosity of Aqueous Solutions of Bovine Serum Albumin between pH 4.3 and 10.5*. *The Journal of Physical Chemistry*, 60(2):225–231, 1956.
- [TBRS55] TANFORD, CHARLES, JOHN G. BUZZELL, DAVID G. RANDS und SIGURD A. SWANSON: *The Reversible Expansion of Bovine Serum Albumin in Acid Solutions1*. *Journal of the American Chemical Society*, 77(24):6421–6428, 1955.

- [Tho67] THORNE, H. V.: *Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA*. *Journal of Molecular Biology*, 24(2):203–211, 1967.
- [Tis37] TISELIUS, ARNE: *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. *Transactions of the Faraday Society*, 33:524–531, 1937.
- [TK03] THOMAS, M. und A. M. KLIBANOV: *Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1):27–34, 2003.
- [TMD+04] THÜNEMANN, ANDREAS F., MARTIN MÜLLER, HERBERT DAUTZENBERG, JEAN-FRANÇOIS JOANNY und HARTMUT LÖWEN: *Polyelectrolyte Complexes*. In: *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*, Seiten 19–33. 2004.
- [TP08] TALELLI, M. und S. PISPAS: *Complexes of Cationic Block Copolymer Micelles with DNA: Histone/DNA Complex Mimetics*. *Macromolecular Bioscience*, 8(10):960–967, 2008.
- [TPM03] TECLE, MIRIAM, MONIKA PREUSS und ANDREW D. MILLER: *Kinetic Study of DNA Condensation by Cationic Peptides Used in Nonviral Gene Therapy: Analogy of DNA Condensation to Protein Folding*. *Biochemistry*, 42(35):10343–10347, 2003.
- [TSS55] TANFORD, CHARLES, SIGURD A. SWANSON und WILLIAM S. SHORE: *Hydrogen Ion Equilibria of Bovine Serum Albumin1*. *Journal of the American Chemical Society*, 77(24):6414–6421, 1955.
- [Tsu94] TSUCHIDA, EISHUN: *Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures*. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 31(1):1–15, 1994.
- [vdWMSN+99] WETERING, PETRA VAN DE, ED E. MORET, NANCY M. E. SCHUURMANS-NIEUWENBROEK, MIES J. VAN STEENBERGEN und WIM E. HENNINK: *Structure-Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery*. *Bioconjugate Chemistry*, 10(4):589–597, 1999.

- [VVBS94] VOET, DONALD, JUDITH G. VOET und MARTINA BÖRSCH-SUPAN: *Biochemie*. VCH, Weinheim, 1. korr. Nachdr. der 1. Aufl. Auflage, 1994.
- [WB80] WIDOM, JONATHAN und ROBERT L. BALDWIN: *Cation-induced toroidal condensation of DNA: Studies with $Co^{3+}(NH_3)_6$* . *Journal of Molecular Biology*, 144(4):431–453, 1980.
- [Wu10] WU, CHI: *Revisiting an old problem: Complexation of DNA with PEI*, 02.07.2010.
- [WW87] WU, G. Y. und C. H. WU: *Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system*. *Journal of Biological Chemistry*, 262(10):4429–4432, 1987.
- [XPM+09] XU, F. J., Y. PING, J. MA, G. P. TANG, W. T. YANG, J. LI, E. T. KANG und K. G. NEOH: *Comb-Shaped Copolymers Composed of Hydroxypropyl Cellulose Backbones and Cationic Poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate) Side Chains for Gene Delivery*. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8):1449–1458, 2009.
- [XS96] XU, YUHONG und FRANCIS C. SZOKA: *Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection*. *Biochemistry*, 35(18):5616–5623, 1996.
- [ZFM+95] ZABNER, JOSEPH, AL J. FASBENDER, TOM MONINGER, KRISTI A. PÖLLINGER und MICHAEL J. WELSH: *Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32):18997–19007, 1995.
- [ZS96] ZELPHATI, O. und F. C. SZOKA: *Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21):11493–11498, 1996.