
**Bindung von MARCKS an anionische Phospholipidvesikel,
Aggregations- und Transportverhalten von synthetischen
Gentransfer-Komplexen**
Eine Untersuchung mit Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie

Laura Rusu

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Laura Rusu
aus Rumänien

München, den 15.10.2004

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Univ.-Prof. Dr. J. O. Rädler

Univ.-Prof. Dr. E. Wagner

22.12.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Motivation	5
3	Methoden	9
3.1	Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie	9
3.1.1	Grundlagen der Fluoreszenz.....	9
3.1.2	Prinzip der Methode	11
3.1.3	Datenanalyse.....	14
3.1.4	Bestimmung der Bindungskonstanten.....	17
3.1.5	Kalibrierung.....	19
3.1.6	Testexperimente	20
3.2	Quantitative Fluoreszenzmikroskopie	28
3.2.1	Experimenteller Aufbau	28
3.2.2	Digitale Bildverarbeitung	30
4	Bindung von MARCKS an Phospholipidvesikel	31
4.1	Einführung	31
4.2	Material und Präparation	35
4.2.1	Myristoyliertes Alanin-reiches C Kinase Substrat	35
4.2.2	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	37
4.2.3	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin	38
4.2.4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat.....	39
4.2.5	Präparation der Vesikel	40
4.3	Resultate	42
4.4	Diskussion	53
5	Aggregation und Transport von synthetischen Gentransfer-Komplexen	55
5.1	Einführung	55
5.2	Material und Präparation	58
5.2.1	Desoxyribonukleinsäure	58
5.2.2	Reagenzien zur DNA-Kondensation	59

5.2.3	Mucin.....	62
5.2.4	Alveofact	63
5.2.5	TOTO	63
5.2.6	Präparation der DNA-Komplexe	65
5.3	Selbstorganisation und Aggregationsverhalten.....	66
5.3.1	Theoretische Grundlagen der kolloidalen Aggregation.....	66
5.3.2	Resultate und Diskussion	68
5.4	Transportverhalten in Polymer-Netzwerken.....	85
5.4.1	Theoretische Grundlagen.....	85
5.4.2	Resultate und Diskussion	87
6	Anhang	97
6.1	Abkürzungen und Akronyme.....	97
6.2	Referenzen.....	98
6.3	Publikationen	107

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) zum ersten Mal systematisch die Bindung von fluoreszenzmarkierten Peptiden an anionischen Lipidmembranen untersucht. Mit dieser Methode konnten Einzelmolekül-Messungen zur Bindung von myristoyliertem Alanin-reichen C Kinase Substrat, MARCKS (151-175), an unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm durchgeführt werden. Die Vesikel bestanden aus dem neutralen Lipid Phosphatidylcholine (PC) und den negativ geladenen Lipiden Phosphatidylserine (PS) oder Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). Eine Signal/Rausch-Analyse ermöglichte die Bestimmung der Sensitivität und des linearen Messbereichs der Methode. Auf Grund der unterschiedlichen Korrelationszeiten der freien und gebundenen Peptide folgte aus den gemessenen Autokorrelationskurven der prozentuale Anteil des gebundenen Peptids. Die Bindung von MARCKS(151-175) an die anionischen Vesikel wurde für verschiedene prozentuale Anteile von PS und PIP₂ gemessen. Sie war umso stärker, je höher der Anteil anionischer Lipide in der Membran und damit die attraktive elektrostatische Wechselwirkung war. Die ermittelten Bindungskonstanten stimmten gut mit den Resultaten überein, die mit etablierten konventionellen Techniken wie NMR, ITC oder Spinmarkierung gewonnen wurden. Die Experimente konnten zeigen, dass mit FCS direkte Messungen von nanomolaren Peptidkonzentrationen möglich sind. FCS stellt eine präzise Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung von Peptiden und Proteinen mit Lipidmembranen dar.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Selbstorganisation und das Aggregationsverhalten von verschiedenen synthetischen Gentransfer-Komplexen studiert. Mit der Methode der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Größenverteilung bestimmt und die Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex berechnet. Die Polyplexe stellen im Unterschied zu den Lipoplexen unter den experimentellen Bedingungen ein polydisperses kolloidales System dar. Unter dem Einfluss eines natürlichen Surfactants (Alveofact) war ein umgekehrtes Verhalten zu beobachten. Die Messungen zur Kinetik des kolloidalen Systems erfolgten mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie. Mit dieser Methode wurde der Einfluss der Ionenkonzentration und von Alveofact auf die Aggregationskinetik von verschiedenen positiv geladenen Gentransfer-Komplexen untersucht. Die Experimente zeigten, dass die Geschwindigkeit der kolloidalen Aggregation mit der Ionenkonzentration drastisch zunimmt und die mittlere Zahl der Plasmide pro Komplex als Funktion der Zeit linear ansteigt. Nach der Inkubation mit Alveofact stellten die Polyplexe auch unter physiologischen Bedingungen ein stabiles kolloidales System dar und bestanden im Mittel

aus 3-5 Plasmiden. Auch in diesem Fall wurde bei den DNA/Lipofectamine-Komplexen ein anderes Aggregationsverhalten beobachtet. Sie bildeten ohne die Einwirkung von Alveofact unabhängig von der Ionenkonzentration ein stabiles Kolloid und bestanden im Mittel aus nur zwei kondensierten Plasmiden. Dagegen führte die Inkubation mit Alveofact zu einer langsamen kolloidalen Aggregation. Die Lipoplexe erreichten in diesem Fall nach 60 min eine Größe von ~3-4 Plasmiden pro Komplex.

Mit Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie wurde das Transportverhalten verschiedener Vesikel und Gentransfer-Komplexe in einem negativ geladenen Polymer-Netzwerk (Mucin) untersucht. Die Größe und die Ladung der Partikel bestimmten die Diffusion durch das Polymer-Netzwerk. Kleinere Durchmesser und höhere negative Ladungen der Vesikel trugen zu einem effektiveren Transport durch das Netzwerk bei. Aus der Diffusionskonstante und der makroskopischen Viskosität der Polymerlösung wurden die Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation berechnet. Das Diffusionsverhalten anionischer Vesikel wurde zum Vergleich auch in einem positiv geladenen Kollagen-Netzwerk studiert. Bei den synthetischen Gentransfer-Komplexen mit positiver Überschussladung wurde auf Grund der Bindung zum Netzwerk ein deutlicher Abfall der Diffusionskonstante als Funktion der Polymer-Konzentration beobachtet. Im Unterschied dazu zeichneten sich die negativ geladenen Komplexe wegen der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung durch einen effektiveren Transport im Mucin-Netzwerk aus. Unter dem Einfluss von Alveofact zeigten die positiv geladenen Komplexe ein ähnliches Transportverhalten wie die negativ geladenen Komplexe. Eine gezielte Beschichtung der Komplexe ermöglichte also einen verbesserten Transport durch das Polymer-Netzwerk, was im Zusammenhang mit einem effizienten Gentransfer von Interesse ist.

2 Motivation

Die Bindung von peripheren Proteinen an die Plasmamembran spielt für viele biologische Prozesse wie z. B. der zellulären Signalübertragung oder dem Vesikeltransport eine zentrale Rolle (DiNitto et al., 2003). Viele periphere Proteine binden über bestimmte Domänen in ihrer Aminosäuresequenz an spezielle Lipide in der Membran. Im allgemeinen definiert die chemische Struktur der Aminosäuren die Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der Membran. So tragen Aminosäuren mit geladenen oder unpolaren Seitenketten zur elektrostatischen bzw. hydrophoben Wechselwirkung bei. Die Translokation von peripheren Proteinen an die Plasmamembran führt zu einer ~1000-fachen Erhöhung der lokalen Konzentration an der Oberfläche. Dadurch können die Proteine gezielt mit anderen membrangebundenen oder integrierten Molekülen interagieren (Adam und Delbrück, 1968; Berg und Purcell, 1977; Kholodenko et al., 2000; McCloskey und Poo, 1986; McLaughlin und Aderem, 1995). Ein prominentes Beispiel dafür ist die Protein Kinase C (PKC), die mit ihrer C1 und C2 Domäne an die Plasmamembran bindet. Dort trifft das Enzym auf eine höhere effektive Konzentration seines membrangebundenen Substrates (Cullen, 2003; Mellor und Parker, 1998; Newton, 2003). Das myristoylierte Alanin-reiche C Kinase Substrat (MARCKS) stellt in vielen Zelltypen das Hauptsubstrat von PKC dar (Aderem, 1992; Arbuzova et al., 2002; Blackshear, 1993). Es bindet über die Effektor-Domäne, MARCKS(151-175), und einer Myristoyl-Kette am N-terminalen Ende des Proteins an die Membran. Die Effektor-Domäne besteht hauptsächlich aus einer Gruppe von basischen und aromatischen Aminosäuren (McLaughlin und Aderem, 1995).

Die Bindung von MARCKS ist von großem biologischen Interesse, da das Protein in hohen Konzentrationen in der Zelle vorkommt, seine physiologische Funktion jedoch noch nicht genau verstanden ist. Es wird davon ausgegangen, dass MARCKS mit einer hohen Affinität an Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) bindet und damit eine lokale Anreicherung des Lipids in der Plasmamembran induziert. PIP₂ spielt in der Signalübertragung der Zelle eine zentrale Rolle, da durch die Hydrolyse des Lipids mit Phospholipase C (PLC) zwei wichtige intrazelluläre Botenstoffe gebildet werden. Das entstehende Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) stimuliert dabei die Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen aus dem Endoplasmatischen Reticulum in das Zytosol, und Diacylglycerol (DAG) aktiviert spezielle Serin/Threonin Protein Kinasen. Die Bindung von MARCKS inhibiert die PLC-vermittelte Hydrolyse von PIP₂, da es die Bindungsstellen des Enzyms an der Membran (PIP₂) blockiert. Erst die Phosphorylierung von MARCKS durch die aktivierten Protein Kinasen und die Bindung von Kalzium/Calmodulin (Ca/CaM) reduzieren die elektro-

statische Anziehung zwischen Protein und Membran. Nach der Desorption von MARCKS können die gebundenen PIP₂-Moleküle wieder frei in der Membran diffundieren und stehen als Substrat für die PLC-vermittelte Hydrolyse wieder zu Verfügung (Gambhir et al., 2004; Ohmori et al., 2000).

Die Membranbindung von Proteinen, die am System der Kalzium/Phospholipid-Signalübertragung involviert sind (G-Proteine, PLC, PKC, MARCKS), wurde schon mit verschiedenen Methoden untersucht. Eine kürzlich erschienene Zusammenfassung zur Peptid-Lipid-Wechselwirkung stellt diese biophysikalischen Techniken, wie z.B. die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), die Methoden der Spin-Markierung und der Zentrifugation detailliert dar (Simon und McIntosh, 2002). Die konventionellen Techniken haben jedoch den entscheidenden Nachteil, dass Messungen mit nanomolaren Peptidkonzentrationen sehr kompliziert oder kaum möglich sind. Im Unterschied dazu können mit der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) diese geringen Konzentrationen an Peptid direkt gemessen werden. Auf Grund der hohen Sensitivität von FCS ergeben sich breite Anwendungsmöglichkeiten speziell für die Untersuchung von Protein-Membran und Protein-Protein Wechselwirkungen (Elson und Magde, 1974; Magde et al., 1972; Magde et al., 1974). In der Vergangenheit wurden mit FCS schon erste Messungen zur Bindung von Proteinen an Vesikel unternommen (Dorn et al., 1998; Takakuwa et al., 1999). Es sind in der Literatur aber keine systematischen FCS-Messungen zur Peptidbindung bekannt, die den Resultaten aus konventionellen Methoden gegenübergestellt wurden. Im Unterschied dazu soll in dieser Arbeit mit Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie systematisch die Bindung der Effektor-Domäne von MARCKS an anionische Lipidmembranen untersucht werden. Um das Potential der Methode zur Messung von Protein-Membran-Wechselwirkungen zu demonstrieren, wird die Bindung von MARCKS(151-175) an anionische Phospholipid-vesikel bestimmt und die gewonnenen Ergebnisse mit den bekannten Werten aus der Literatur verglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die Aggregation und die Diffusion von synthetischen Gentransfer-Komplexen studiert werden. Die elektrostatische Wechselwirkung ist auch hier die treibende Kraft für die Bindung und die Kondensation von DNA mit kationischen Substanzen. Synthetische Gentransfer-Komplexe werden in der somatischen Genterapie zur Heilung von Erbkrankheiten wie z. B. der Mukoviszidose oder der Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt. Das Ziel der Therapie ist das Einschleusen von therapeutischen Genen in den Nukleus der betroffenen Zellen. Der Transfer von klonierten DNA-Sequenzen wird im allgemeinen als Transfektion bezeichnet. Die Effizienz des Transfers ist jedoch noch so gering, dass die klinische Anwendung noch keinen großen therapeutischen Nutzen hat. Es stellt sich die Frage, wie die therapeutischen Gene effektiv in den Nukleus

von Zellen transportiert werden können und welche Barrieren dabei überwunden werden müssen.

In der Natur haben sich Viren darauf spezialisiert, zur Reproduktion ihre Erbsubstanz mit einer hohen Effizienz in das Genom einer Wirtszelle einzubauen (Felgner et al., 1997). Das Prinzip von Adeno- und Retroviren wird auch im Rahmen der Gentherapie ausgenutzt. Der virale Gentransfer hat jedoch den großen Nachteil, dass es bei der klinischen Anwendung zu unkontrollierbaren Immunreaktionen kommen kann (Lee und Huang, 1996). Aus diesem Grund werden heute diverse nicht-virale synthetische Genfähren (Vektoren) untersucht, die ein geringeres biologisches Risiko darstellen. Zur Kondensation der DNA (Plasmide) werden im allgemeinen positiv geladene Polymere (Wagner et al., 1991) oder Mischungen von neutralen und kationischen Lipiden (Felgner et al., 1994) eingesetzt. Man bezeichnet die entstehenden Komplexe analog der verwendeten kationischen Substanzen auch als Poly- oder Lipoplexe.

Die Komplexe müssen auf ihrem Weg zur Zelle verschiedene Barrieren überwinden, bevor sie über Endozytose aufgenommen und die im Zytosol freigesetzte DNA in den Nukleus transportiert werden kann. Neben der geringen Effizienz bei der Transfektion haben die synthetischen Gentransfer-Komplexe den Nachteil, dass sie unspezifisch auf alle Zellen wirken (keine Spezifität). Aus diesem Grund wird nach multikomponentigen Komplexen gesucht, die ähnlich wie ein natürlicher Virus aufgebaut sind und bei der Transfektion höhere Effizienzen erreichen. In der Literatur sind Beispiele für diese sogenannten synthetischen Viren angegeben (Behr, 1994; Erbacher et al., 1999; Li und Huang, 2000; Wagner et al., 1992). So werden den Komplexen z. B. verschiedene Konstrukte zugegeben, die die zellspezifische endosomale Aufnahme, das Auflösen des Endosoms oder den Transfer der DNA in den Nukleus unterstützen.

Synthetische Gentransfer-Komplexe (Polyplexe) stellen unter physiologischen Bedingungen kein stabiles kolloidales System dar. Sie befinden sich nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht und sind dem Prozess der kolloidalen Aggregation unterworfen. Die Kinetik der Aggregation wird im allgemeinen durch die physikalischen Wechselwirkungen zwischen den Komplexen bestimmt. Die mittlere Größe und die Polydispersität der Komplexe nehmen als Funktion der Zeit zu und haben einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz des Gentransfers. Aus diesem Grund müssen die optimierten Transfektionsprotokolle exakt eingehalten werden, um sinnvolle und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen. Voraussetzung für die klinische Anwendung ist die thermodynamische Stabilität der Gentransfer-Komplexe.

In dieser Arbeit soll demonstriert werden, dass die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und die quantitative Fluoreszenzmikroskopie sinnvolle Methoden zur systematischen Untersuchung von Gentransfer-Komplexen sind. Mit diesen Techniken lassen sich weitere Erkenntnisse über das Aggregationsverhalten und die Wechselwirkung von synthetischen Gentransfer-Komplexen mit der Umgebung gewinnen. Im Zusammenhang mit der Mukoviszidose ist die Frage nach der Wechselwirkung der Gentransfer-Komplexe mit der Lungenoberfläche von Interesse. Dazu wird der Einfluss eines natürlichen Surfactant aus Rinderlungen und das Transportverhalten von Gentransfer-Komplexen im Mucus studiert.

3 Methoden

3.1 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

3.1.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung durch einen Fluorophor kann als ein Übergang zwischen zwei diskreten Energiezuständen des Elektronensystems beschrieben werden. In Abb. 3.1 sind alle relevanten quantenmechanischen Prozesse in einem Termschema dargestellt. Fluorophore sind im allgemeinen stabile organische Moleküle, die von Ausnahmen abgesehen, aus einer geraden Zahl von Elektronen bestehen. Die Molekülorbitale werden von den Elektronen im Grundzustand S_0 paarweise mit antiparalleler Orientierung des Spins besetzt (Singulett-Zustand). Mit der Absorption von elektromagnetischer Strahlung, die nur ein Zeitintervall von 10^{15} s erfordert, kann das Molekül in höhere Singulett-Energiezustände S_1 übergehen.

Des Weiteren existieren zu jedem Energieniveau des Elektronensystems mehrere äquidistante Schwingungszustände des Moleküls. Da die Schwingungen des Moleküls eine Periodendauer von $\sim 10^{12}$ s haben, können nach dem Franck-Condon-Prinzip die Kernabstände während der Anregung als konstant angenommen werden. Die Relaxationszeit der höheren Schwingungszustände ist im allgemeinen viel kleiner als die Lebensdauer des angeregten Singulett-Zustands S_1 im Schwingungsgrundzustand. Aus diesem Grund erfolgen alle weiteren Prozesse, wie die Fluoreszenz, die innere Konversion und die Interkombination aus dem Grundzustand der Molekülschwingungen (Hoppe, 1982). Fluoreszenz (k_F) stellt die direkte Emission von elektromagnetischer Strahlung dar, bei der das Molekül von einem angeregten Singulett-Zustand in die verschiedenen Schwingungsniveaus des Grundzustands übergehen kann. Sie ist im allgemeinen nur für elektronische Übergänge zwischen Zuständen gleicher Multiplizität möglich. Typische Werte für die Fluoreszenzlebensdauer eines angeregten Zustandes liegen im Bereich von $\sim 10^{-9}$ s.

Darüber hinaus existieren auch noch die zur Fluoreszenz konkurrierenden strahlungslosen Prozesse. Im Fall der inneren Konversion und der Schwingungsrelaxation sind Kollisionen des Fluorophors mit den Molekülen des Lösungsmittels für die Abregung des Systems verantwortlich. Aus diesem Grund nimmt die inneren Konversion (k_{IC}) bei einer Erhöhung der Temperatur drastisch zu, was mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluoro-

phors verbunden ist. Dieser Effekt wird auch als dynamische Fluoreszenzlösung oder *dynamic quenching* bezeichnet. Außerdem kann es durch Kollisionen mit freien Radikalen in der Lösung zur Abregung des Fluorophors kommen. Molekularer Sauerstoff und Iod-Ionen sind besonders effektive Radikale, die annähernd bei jeder Kollision mit einem Fluorophor zur Abregung führen. Die Fluoreszenzlösung ($k_q(Q)$) ist nur von der Diffusionskonstante und der Konzentration der Radikale in der Lösung abhängig. Da sie in den Experimenten einen entscheidenden Einfluss auf das Fluoreszenzsignal haben kann, werden in der Fluoreszenzmikroskopie oft Antioxidantien eingesetzt, die die Bildung von freien Radikalen in der Lösung minimieren. Außerdem existiert neben der dynamischen auch die statische Fluoreszenzlösung, bei der sich Komplexe aus Fluorophoren und fluoreszenzlöschenden Molekülen bilden. Die Fluorophore der Komplexe gehen unmittelbar nach der Absorption von Strahlung ohne die Emission eines Photons in den Grundzustand zurück (Lakowicz, 1983).

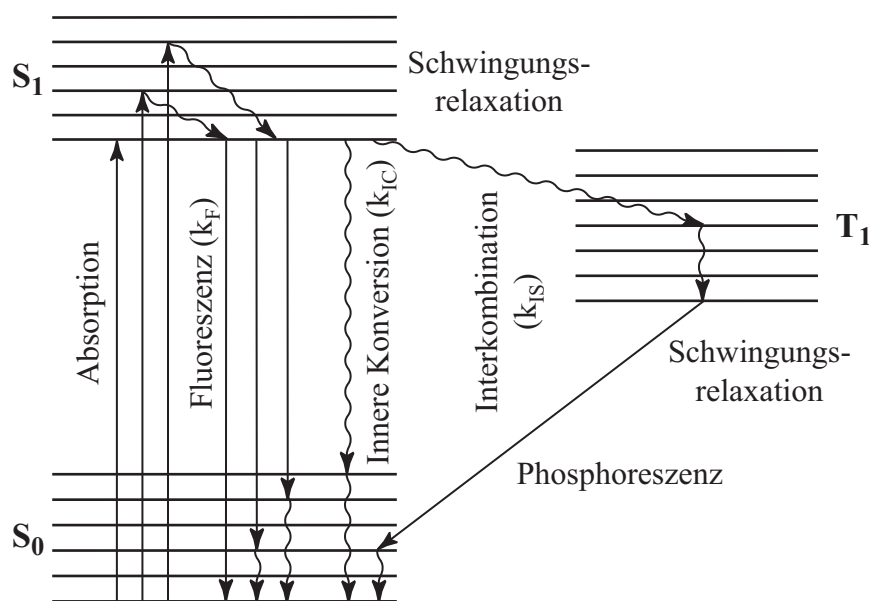


Abb. 3.1: Das Termschema zeigt die relevanten quantenmechanischen Prozesse, die bei der Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung eine Rolle spielen. Im Termschema sind die energetisch niedrigsten Singulett- (S) und Triplettzustände (T) eines Moleküls mit den strahlenden (—) bzw. strahlungslosen (~~~~) Übergängen illustriert.

Bei der Interkombination (k_{IS}) handelt es sich um Übergänge, die einen Singulett- in einen Triplett-Zustand überführen. Im folgenden kann dieser Zustand durch Phosphoreszenz oder innere Konversion wieder in den Singulett-Grundzustand übergehen. Auf Grund des Interkombinationsverbotes hat dieser Übergang jedoch eine geringe quantenmechanische Wahrscheinlichkeit. Des weiteren kann die Abregung des Singulett-Zustandes S_1 auch über den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (k_{ET}) erfolgen, wenn zwei Arten von Fluoro-

phoren existieren, die ein passendes Donor-Akzeptor-Paar darstellen. In diesem Fall transferiert der Donor seine Anregungsenergie strahlungslos auf den Akzeptor. Die Rate dieses Prozesses ist jedoch vom Abstand des Donors zum Akzeptor abhängig.

Die Quantenausbeute Φ_F ist im allgemeinen durch das Verhältnis der emittierten zu den absorbierten Photonen des Systems definiert. Sie kann mit den entsprechenden Raten der verschiedenen Prozesse geschrieben werden als:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q(Q) + k_{ET}} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Die Raten der angegebenen Prozesse beziehen sich auf den Energietransfer (ET), die Fluoreszenz (F), die innere Konversion (IC), die Interkombination (IS) und die Fluoreszenzlöschung durch spezielle Moleküle (Q).

3.1.2 Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie detektiert die emittierte Intensität von fluoreszenzmarkierten Molekülen, die durch das Fokusbereich eines beugungslimitierten Laserstrahls diffundieren. Aus den Fluktuationen des Fluoreszenzlichtes lassen sich Erkenntnisse über die Dynamik der markierten Moleküle oder Partikel in der Lösung gewinnen. Ursachen dieser Fluktuationen der Intensität können z. B. die Diffusion der Partikel durch den Fokus, Fluoreszenzlöschung auf Grund von Änderungen in der Konformation und Triplettübergänge des Fluorophors sein. Aus der Autokorrelation der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität können die charakteristischen Zeitkonstanten und die Gewichte der auftretenden dynamischen Prozesse in der Probe bestimmt werden. So lassen sich aus den Korrelationskurven u. a. Informationen über die Diffusionskonstante, die Bindung bei chemischen Reaktionen und die Triplett-Eigenschaften des Fluorophors gewinnen (Elson, 2001).

Die Prinzipien von FCS wurden schon vor 30 Jahren entwickelt, aber erst die technischen Innovationen der letzten Jahre haben zu einer Renaissance dieser Methode beigetragen. Auf Grund des kleinen konfokalen Detektionsvolumens von ~ 0.2 fl ist es möglich, einzelne durch den Laserfokus diffundierende Partikel nachzuweisen. Mit dieser sensitiven Methode ergeben sich breite Anwendungsmöglichkeiten speziell für viele biophysikalische Fragestellungen und Modellsysteme. Die neuesten Entwicklungen und Anwendungen von FCS sind in der Literatur detailliert beschrieben (Hess et al., 2002; Krichevsky und Bonnet,

2002; Muller et al., 2003; Rigler und Elson, 2001; Schwille und Haustein, 2002; Thompson et al., 2002; Van Craenenbroeck und Engelborghs, 2000).

Die FCS-Messungen wurden mit dem kommerziellen Instrument ConfoCor2 in Kombination mit dem invertierten Mikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Alle Komponenten des Instruments sind an einen Computer angeschlossen und werden über die ConfoCor2-Software gesteuert. Im Lasermodul sind ein Argon-Ionen-Laser mit drei Emissionslinien (458 nm, 488 nm und 514 nm) und zwei Helium-Neon-Laser mit jeweils einer Linie (543 nm bzw. 633 nm) integriert. Für die folgenden Experimente wurde jedoch nur der Argon-Ionen-Laser mit der 488 nm Linie und einer Leistung von 120 μ W eingesetzt. Der Laserstrahl wurde über ein optisches Glasfaserkabel in das Instrument eingekoppelt (Abb. 3.2). Ein Kollimator und verschiedene optische Komponenten zur Korrektur der Abbildung (nicht dargestellt) erzeugten einen aufgeweiteten parallelen Laserstrahl. Nach der Reflexion an einem dichroitischen Spiegel wurde der Laserstrahl mit einer weiteren Linse auf einen Spiegel projiziert und von der Tubuslinse in die Eintrittspupille des Objektivs abgebildet. Ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur bündelte den parallelen Laserstrahl in der Objektivebene zu einem beugungslimitierten Fokus ($d \approx \lambda$). Bei dem verwendeten Objektiv (40 \times 1.2 W korr) von Zeiss handelte es sich um einen C-Apochromat mit Wasser-Immersion und einem Einstellring zur Korrektur der Deckglasdicke.

Diffundieren nun fluoreszenzmarkierte Partikel durch den Laserfokus, dann wird ein Teil des emittierten Fluoreszenzlichts vom Objektiv wieder eingefangen. Im Unterschied zur Laserlinie kann das Fluoreszenzlicht den dichroitischen Spiegel passieren und wird von einem optischen System auf die Photodiode abgebildet. Dazwischen liegen ein Emissionsfilter und die 3-dimensional positionierbare Lochblende mit verstellbarer Apertur. Der Emissionsfilter verhindert die Transmission des Laserlichts, das an den diversen optischen Komponenten reflektiert wurde und den dichroitischen Spiegel passieren konnte. Die Lochblende definiert das Detektionsvolumen in der Probenkammer, indem sie die Fluoreszenz aus anderen Bereichen ausblendet. Nach der Kalibrierung des Instruments ist die Lochblende in einer konjugierten Ebene zum Laserfokus positioniert (konfokaler Fall). Die Photodiode kann die ankommenden Photonen zeitaufgelöst bis zu einer maximalen Rate von 1 MHz detektieren. Das gepulste Signal der Photodiode wurde von einem Korrelator *online* mit einem multiplen Tau-Algorithmus analysiert und vom ConfoCor2-Programm in Form einer Autokorrelationskurve dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus findet sich in Jankowski (Jankowski und Janka, 2001). Die numerische Anpassung der Autokorrelationskurven erfolgte mit den Programmen ConfoCor2 und Igor

4.1. Für das Importieren und Analysieren der Daten in Igor mussten verschiedene Prozeduren geschrieben werden.

Die Messung der Proben erfolgte in speziellen LabTek II Kammern mit 8 Kompartimenten (Nunc, Wiesbaden). Um die Adsorption (unspezifische Bindung) von positiv geladenen Peptiden und Gentransfer-Komplexen zu minimieren, wurden die Wände der Probenkammer mit einer neutralen PC-Lipidmembran beschichtet. Dazu wurden kleine beschallte unilamellare PC-Vesikel in die Probenkammer gegeben. Nach einer Inkubation über mehrere Stunden erfolgte ein 5-faches sanftes Spülen der Kammer mit Puffer, um die nicht mit der Oberfläche fusionierten Vesikel aus der Lösung zu entfernen.

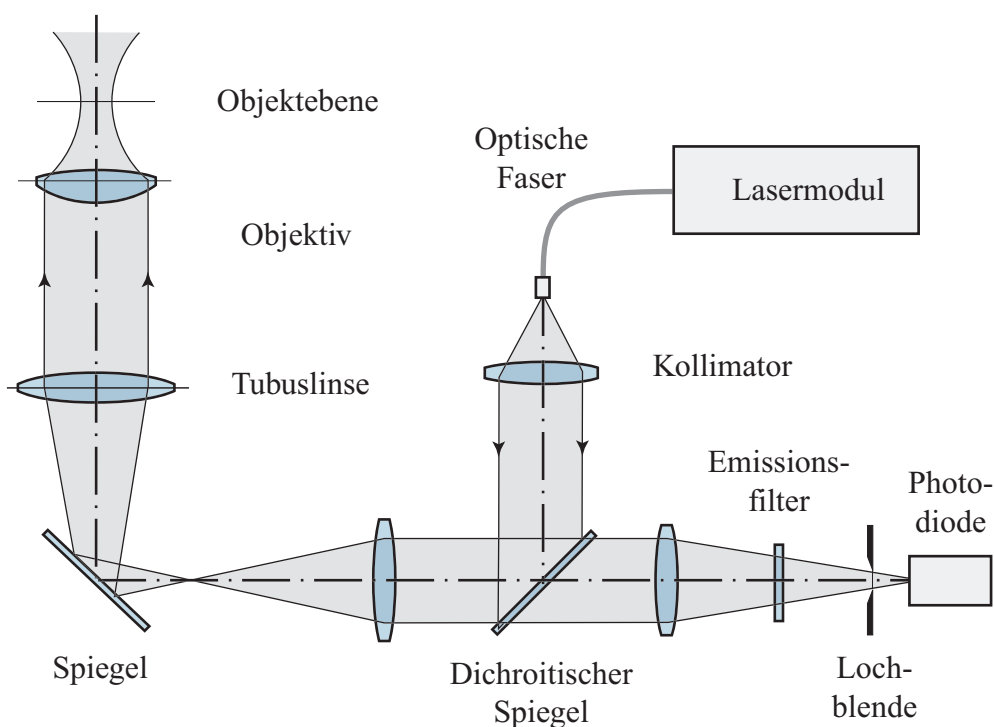


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie. Ein Laserstrahl wurde über ein optisches System in das Mikroskop eingekoppelt und mit einem hochauflösenden Objektiv zu einem beugungslimitierten Fokus gebündelt. Eine konfokal in den Strahlengang integrierte Photodiode detektiert das emittierte Fluoreszenzlicht der durch den Fokus diffundierenden fluoreszenzmarkierten Partikel.

3.1.3 Datenanalyse

Die durch das Detektionsvolumen diffundierenden fluoreszenzmarkierten Partikel emittieren die Intensität $I(t)$, die um einen Mittelwert $I(t) = \langle I(t) \rangle + \delta I(t)$ fluktuiert. Die normierte Zeit-Korrelationsfunktion ist definiert als $G(t) = \langle \delta I(t) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2$. Für identische fluoreszierende Partikel, die Brownsche Bewegungen in einem 3-dimensionalen Gauß'schen Fokusvolumen ausführen, kann die Autokorrelationskurve mit der folgenden Gleichung beschrieben werden (Hess et al., 2002):

$$G(\tau) = \frac{1}{N} g(\tau) \quad \text{mit} \quad (Gl. 3.2)$$

$$g(\tau) = \left(1 + \frac{T}{1-T} e^{-\tau/\tau_{tr}} \right) \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right) \left(\frac{1}{1 + \tau/S^2\tau_D} \right)^{1/2}$$

Hierbei ist N die mittlere Zahl der fluoreszierenden Moleküle im effektiven Fokusvolumen, τ_D die Korrelationszeit der Partikel, T der Anteil der Fluorophore im Triplett-Zustand, τ_{tr} die Triplett-Lebensdauer und S der Strukturparameter. Die Funktion $g(\tau)$ repräsentiert die normierte Autokorrelationskurve der Partikel. Die Korrelationszeit kann als die mittlere Dauer interpretiert werden, die ein in der Lösung diffundierendes Partikel zur Passage des effektiven Fokusvolumens benötigt. Sie wird im folgenden auch als Diffusionszeit bezeichnet und ist für punktförmige Partikel durch die Gleichung gegeben:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (Gl. 3.3)$$

Es bedeuten r_0 die Halbachse des Laserfokus in radialer Richtung und D die Diffusionskonstante der Partikel. Wenn es sich bei den diffundierenden Teilchen nicht um punktförmige sondern um ausgedehnte Objekte mit einem Radius R handelt, dann gilt:

$$\tau_D = \frac{r_0^2 + R^2}{4D} \quad (Gl. 3.4)$$

Eine anschauliche Erklärung für diese Gleichung ist, dass sich das effektive Detektionsvolumen um die endliche Ausdehnung des Objekts vergrößert. Die gemessenen mittleren Diffusionszeiten erhöhen sich um die Zeit, die die Partikel zum vollständigen Eintritt in das Detektionsvolumen benötigen. Experimente mit fluoreszenzmarkierten Latex-Kugeln zeigten, dass eine Korrektur der endlichen Ausdehnung nur dann erforderlich ist, wenn die Partikel eine Größe von 100 nm übersteigen (Starchev et al., 1998).

Der Strukturparameter ist durch die Gleichung $S = z_0/r_0$ definiert, wobei z_0 und r_0 die Halbachsen des effektiven Fokusvolumens bedeuten. Er wird zusammen mit dem effektiven Fokusvolumen V_{eff} bei der Kalibration des experimentellen Aufbaus mit Hilfe einer Rhodamin-Lösung bestimmt. Die Werte des Strukturparameters sollten nach der Justage des Instruments zwischen 5 und 8 liegen. In einem konkreten Fall ergaben sich für den Strukturparameter und dem effektiven Fokusvolumen die Werte von $S = 5.2$ und $V_{\text{eff}} = 0.13 \times 10^{15}$ l.

Im Fall eines Systems mit mehreren Komponenten kann die gemessene Korrelationsfunktion $G(\tau)$ als gewichtete Summe der Autokorrelationskurven jeder einzelnen Komponente $G_i(\tau)$ ($i = 1, 2, \dots, M$) beschrieben werden (Clamme et al., 2003; Thompson, 1991):

$$G(\tau) = \frac{\sum_{i=1}^M q_i^2 N_i^2 G_i(\tau)}{\left(\sum_{i=1}^M q_i N_i\right)^2} = \sum_{i=1}^M A_i g_i(\tau) \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Es bedeuten N_i die mittlere Zahl von Partikel der i -ten Komponente im effektiven Volumen und q_i den Quotient aus der Fluoreszenzintensität der i -ten Komponente relativ zur ersten Komponente. Die Fluoreszenzintensität ist im allgemeinen durch das Produkt aus dem Absorptionsquerschnitt, der Detektions- und der Quanteneffizienz gegeben.

Polydispersität

In polydispersen Systemen wird die kontinuierliche Größen- und Intensitätsverteilung der Partikel als Funktion der Diffusionszeit angegeben. Die Autokorrelationskurven lassen sich in diesem Fall mit dem folgenden Integral ausdrücken (Starchev et al., 1999):

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} A(\tau_D) g(\tau, \tau_D) d\tau_D \quad \text{mit} \quad (\text{Gl. 3.6})$$

$$A(\tau_D) = \frac{q^2(\tau_D) N(\tau_D)}{\left(\int_0^{\infty} q(\tau_D) N(\tau_D) d\tau_D\right)^2}$$

Hierbei bezeichnen $q(\tau_D)$ die mittlere Fluoreszenzintensität eines Partikels und $N(\tau_D)$ die Teilchenzahl im effektiven Fokusvolumen in Abhängigkeit von der Diffusionszeit. Der Integrand in Gl. 3.6 ist durch das Produkt aus der Amplitude $A(\tau_D)$ und der normierten Autokorrelationskurve $g(\tau, \tau_D)$ gegeben.

Polydisperse kolloidale Systeme werden im Zusammenhang mit den Experimenten zum Aggregationsverhalten von synthetischen Gentransfer-Komplexen untersucht. Die Analyse

der Autokorrelationskurven erfolgte mit der sogenannten Histogramm-Methode. Dazu wurde der kontinuierliche Wertebereich der Diffusionszeit in M gleiche Intervalle unterteilt und die Integration in Gl. 3.6 in erster Näherung durch eine Summation über alle Intervalle ($i = 1, \dots, M$) ersetzt. Daraus ergibt sich für die Autokorrelationsfunktion eines polydispersen Systems unter Vernachlässigung des Triplett-Terms:

$$G(\tau) = \sum_{i=1}^M a_i \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_{D,i}} \right) \left(\frac{1}{1 + \tau/S^2\tau_{D,i}} \right)^{1/2} \quad (\text{Gl. 3.7})$$

Für die Amplitude gilt die Formel: $a_i = A(\tau_D)\Delta\tau_D$. Es bedeuten $\Delta\tau_D$ die Breite und $\tau_{D,i}$ die Diffusionszeit des i -ten Intervalls. Die numerische Anpassung der gemessenen Autokorrelationskurven erfolgte dann mit Gl. 3.7 unter den Nebenbedingungen:

$$\begin{aligned} a_i &\geq 0 \\ G(0) &= \sum_1^M a_i \\ \sum_1^M a_i &= \text{min.} \end{aligned} \quad (\text{Gl. 3.8})$$

Der Startwert für die Amplitude $G(0)$ kann in erster Näherung durch die numerische Anpassung der Autokorrelationskurve mit Gl. 3.2 für das Ein-Komponenten-System bestimmt werden (Starchev et al., 1999).

Korrektur der Konzentration

FCS-Messungen basieren auf der Detektion von Fluktuationen der emittierten Fluoreszenzintensität von Teilchen im Fokusbereich. Für geringe Partikelkonzentrationen hat das unkorrelierte Rauschen des Hintergrunds einen Einfluss auf die Amplitude der Autokorrelationskurve. Die gemessene Zahl der Partikel im Fokusbereich N_{mess} kann mit der folgenden Gleichung korrigiert werden (Koppel, 1974):

$$N_{\text{korr}} = N_{\text{mess}} \frac{\langle F^2 \rangle}{\langle F + H \rangle^2} \quad (\text{Gl. 3.9})$$

Hierbei ist F die Intensität der fluoreszenzmarkierten Partikel im Fokusbereich und H die Intensität des Hintergrunds (Puffers). Die Zahl der Partikel würde bei einem zu geringen Signal/Rausch-Verhältnis ohne die Korrektur deutlich überschätzt werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität F ist direkt proportional zur Konzentration c der Partikel im Fokus-

volumen. Für den Hintergrund H kann eine fiktive Konzentration v von Partikel eingeführt werden. Mit $N_{\text{korrr}} = c V_{\text{eff}} N_A$, $F \propto c$ und $H \propto v$ folgt aus Gl. 3.9:

$$N_{\text{mess}} = c V_{\text{eff}} N_A (1 + v/c)^2 \quad (\text{Gl. 3.10})$$

V_{eff} bezeichnet das effektive Detektionsvolumen und N_A die Loschmidtsche-Konstante. Zur Bestimmung des linearen Messbereichs von FCS werden Verdünnungskurven aufgenommen und die gemessene Zahl der Partikel im effektiven Volumen als Funktion der tatsächlichen Konzentration aufgetragen. Die numerische Anpassung der Verdünnungskurven wird mit Gl. 3.10 vorgenommen (Langowski et al., 2000).

3.1.4 Bestimmung der Bindungskonstanten

Im vorliegenden Fall werden nur Systeme mit zwei verschiedenen Komponenten untersucht. Es handelt sich zum einen um die fluoreszenzmarkierten freien Peptide (Index P) und zum andern um die unilamellaren Vesikel mit gebundenen Peptiden (Index V). Die Amplituden aus Gl. 3.5 sind durch die folgenden Formel gegeben:

$$A_P = \frac{N_P}{(N_P + \alpha N_V)^2} \quad (\text{Gl. 3.11})$$

$$A_V = \frac{(\alpha N_V)^2}{N'(N_P + \alpha N_V)^2}$$

N_P bezeichnet die Zahl der freien Peptide und N_V die Zahl der Vesikel im effektiven Fokusvolumen. N' repräsentiert die Zahl der langsam diffundierenden Vesikel mit mindestens einem gebundenen fluoreszenzmarkierten Peptid. \square ist der Quotient aus der Fluoreszenzintensität eines Vesikels mit gebundenen Peptiden relativ zur Intensität eines freien Peptids. Der dimensionslose Quotient \square kann als die mittlere Zahl der gebundenen Peptide pro Vesikel interpretiert werden, wenn sich bei der Bindung die Detektions- und die Quanteneffizienz des Fluorophors nicht ändert. Messungen mit einem konventionellen Spektrometer haben tatsächlich gezeigt, dass die Bindung von MARCKS(151-175) an negativ geladene Vesikel mit keiner Änderung in der Fluoreszenzintensität von Alexa488 verbunden ist (Daten nicht dargestellt). Vermutlich kommt es auf Grund der geringen Zahl an gebundenen Peptiden pro Vesikel zu keiner gegenseitigen Fluoreszenzlöschung der Alexa488 Fluorophore. Wenn die Zahl der gebundenen Peptide pro Vesikel im Mittel $\square \leq 1$ ist, dann ist die Zahl der detektierbaren Vesikel mit der Zahl der gebundenen Peptide identisch und es gilt $N' = \square N_V$. Für die meisten Messungen in dieser Arbeit ist die mittlere Anzahl der gebundenen Peptide pro Vesikel $\square \geq 1$. Dies trifft im besonderen für die Ex-

perimente mit einer geringen Lipidkonzentration und einer Bindungskonstante von $K > 10^4 \text{ M}^{-1}$ zu. In diesem Fall ist die Zahl der Vesikel mit gebundenen Peptiden mit der gesamten Anzahl der Vesikel identisch ($N' = N_V$).

Die Bindung von Peptiden an Lipidmembranen kann durch die Einführung einer Bindungskonstante K (auch als molarer Partitionskoeffizient bezeichnet) beschrieben werden (Ben-Tal et al., 1997; Murray et al., 1998; Peitzsch und McLaughlin, 1993). K ist als Proportionalitätskonstante in der Gleichung $[P]_{\text{mem}} = K [P][V]$ definiert. $[P]_{\text{mem}}$ bezeichnet die molare Konzentration der gebundenen und $[P]$ die der freien Peptide in der Lösung. $[V]$ repräsentiert die Konzentration der ungebundenen Lipide eines Vesikels, die sich potentiell an einer Bindung mit einem Peptid beteiligen können. Dazu gehören jedoch nur die Lipide, die sich auf der Außenseite der Membran befinden und damit den Peptiden „zugänglich“ (accessible) sind. Die Lipide auf der Innenseite stehen für eine Bindung nicht zur Verfügung.

Für die folgenden Experimente ist die molare Konzentration des „zugänglichen“ Lipids $[L]_{\text{acc}}$ viel größer als die Konzentration der membrangebundenen Peptide $[P]_{\text{mem}}$. Unter der Voraussetzung $[L]_{\text{acc}} \gg [P]_{\text{mem}}$ kann die Gleichung der Bindung als $[P]_{\text{mem}} = K [P][L]_{\text{acc}}$ geschrieben werden. Die gesamte Konzentration der Peptide ist die Summe aus den Konzentrationen der gebundenen und freien Peptide $[P]_{\text{tot}} = [P]_{\text{mem}} + [P]$. Aus der Kombination der beiden Gleichungen ergibt sich:

$$\frac{[P]_{\text{mem}}}{[P]_{\text{tot}}} = \frac{K [L]_{\text{acc}}}{1 + K [L]_{\text{acc}}} \quad (\text{Gl. 3.12})$$

In erster Näherung befinden sich ~50% aller Lipide auf der Außenseite eines Vesikels $[L]_{\text{acc}} \approx 0.5 \cdot [L]_{\text{tot}}$. Experimente mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie konnten für riesige unilamellare Vesikel (GUVs) zeigen, dass die Peptide die Membran der Vesikel nicht penetrieren können und damit die Lipide auf der Innenseite nicht zur Bindung beitragen (Gambhir et al., 2004). Die angegebenen Lipidkonzentrationen beziehen sich im folgenden immer auf die „zugänglichen“ Lipide an der Außenseite der Vesikel. Sind 50% aller Peptide gebunden, dann ist die Bindungskonstante aus Gl. 3.12 durch die inverse Lipidkonzentration gegeben.

Die Amplituden A_P und A_V lassen sich aus den Autokorrelationskurven des Peptid-/Vesikel-Systems mit Gl. 3.5 bestimmen. Des weiteren muss auf Grund der Massenerhaltung die gesamte Zahl der Peptide N_0 bei der Bindung konstant sein. Es gilt:

$$N_0 = \alpha N_V + N_P \quad (\text{Gl. 3.13})$$

N_P ist die Zahl der freien Peptide und N_V die Zahl der Vesikel im effektiven Fokussvolumen, α die mittlere Zahl der gebundenen Peptide pro Vesikel. Die Kombination von Gl. 3.11 und 3.13 liefert den Zusammenhang $A_P = N_P / N_0^2$. Der prozentuale Anteil der gebundenen Peptide ist durch die folgende Formel gegeben:

$$\frac{[P]_{\text{mem}}}{[P]_{\text{total}}} = \frac{\alpha N_V}{N_0} = \frac{N_0 - A_P N_0^2}{N_0} = 1 - A_P N_0 \quad (\text{Gl. 3.14})$$

Der Anteil der gebundenen Peptide, der in den Bindungskurven als Funktion der Lipidkonzentration aufgetragen ist, kann mit der Amplitude des freien Peptids A_P und der gesamten Zahl an Peptiden N_0 berechnet werden. Die Amplituden A_P lassen sich mit Gl. 3.5 aus den Autokorrelationskurven des Zwei-Komponenten-Systems bestimmen. N_0 folgt aus der Messung einer reinen Peptidlösung der gleichen Konzentration durch die numerische Anpassung der Autokorrelationskurve mit Gl. 3.2 für ein Ein-Komponenten-System. Die Standardabweichung für den prozentualen Anteil der gebundenen Peptide wurde mit der Gauß'schen Formel zur Fehlerfortpflanzung berechnet. Ist der Anteil an gebundenen Peptiden klein, dann folgt der Fehler hauptsächlich aus der Standardabweichung von N_0 . Im Gegensatz dazu sind die Fehler für einen hohen Anteil an gebundenen Peptiden auf die Standardabweichung von A_P zurückzuführen. In der Summe ergibt sich für den prozentualen Anteil an gebundenen Peptiden eine annähernd konstante Standardabweichung von $\sim 3\%$ des gesamten Peptids.

3.1.5 Kalibrierung

Eine wichtige Voraussetzung für genaue und reproduzierbare Messungen ist die präzise Kalibrierung des Instruments. Dazu wurde eine Lösung aus 30 nM Rhodamin6G (Merck, Darmstadt) unter den experimentellen Pufferbedingungen (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7) in eine Labtek II Probenkammer (Nunc, Wiesbaden) gegeben und der Laserfokus 200 μm über dem Deckglas positioniert. Im nächsten Schritt erfolgte die programmgesteuerte Justage der Lochblende. Dabei wurde mit der Blende der gesamte Verstellbereich in jeder Raumrichtung abgerastert und die mittlere Fluoreszenzintensität der Farbstoff-Lösung gemessen. Die Lochblende befindet sich nach der Positionierung an der

Stelle mit der maximal detektierten Intensität in einer zum Laserfokus konjugierten Ebene (konfokaler Fall). Der Durchmesser der Apertur ist von der Laserlinie abhängig und lag für die verwendete 488 nm Linie des Argon-Ionen-Lasers bei 70 μm . Im nächsten Schritt wurde das Objektiv auf die tatsächliche Dicke des Glasbodens der Probenkammer eingestellt. Die Korrektur erfolgte durch das Drehen eines speziellen Ringes am Objektiv mit dem Ziel, das Fokusvolumen zu minimieren und damit die Zahl der emittierten Photonen pro Molekül zu maximieren.

Zur Bestimmung des Strukturparameters und des effektiven Fokusvolumens wurden 10 Autokorrelationskurven mit einer Messzeit von 20 s aufgenommen. Aus der numerischen Anpassung der Daten mit Gl. 3.2 folgte die mittlere Diffusionszeit von Rhodamin und der Strukturparameter. Die radiale Halbachse des Laserfokus kann aus der Diffusionszeit und der aus der Literatur bekannten Diffusionskonstanten für Rhodamin6G $D_{\text{Rh}} = 2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Magde et al., 1974) mit der Formel $r_0^2 = 4 D_{\text{Rh}} \tau_{\text{Rh}}$ berechnet werden. Die Halbachse des Laserfokus parallel zur optischen Achse z_0 berechnet sich aus der Gleichung $z_0 = S \cdot r_0$, wobei S den Strukturparameter bezeichnet. Damit sind alle Parameter zur Bestimmung des effektiven Volumens mit der Gleichung $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$ gegeben. Die Formel wurde aus einem Modell abgeleitet, das auf der Vorstellung basiert, der Laserfokus hätte die Form einer 3-dimensionalen Gauß'schen Verteilung. Das mit dieser Gleichung berechnete effektive Volumen hatte einen Wert von 0.13fl.

3.1.6 Testexperimente

Farbstoffe

Die Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden Partikel ist für alle FCS-Experimente von entscheidender Bedeutung. Im allgemeinen müssen die Fluorophore die folgenden physikalischen Kriterien erfüllen: Sie sollten sich durch eine hohe Absorption, kurze Fluoreszenzlebensdauer, hohe Quanteneffizienz, niedrige Triplett-Anregung und hohe Photostabilität auszeichnen. Da auch die konkreten Versuchsbedingungen (Laser, Puffer, Konzentration, etc.) eine Rolle spielen, wurden verschiedene Fluorophore vorher getestet. Dazu wurde in sogenannten Verdünnungskurven die Zahl der Fluorophore im effektiven Volumen als Funktion der tatsächlichen Konzentration des Farbstoffs in der Probenkammer gemessen. Aus den Verdünnungskurven folgte dann der lineare Messbereich des Instruments für jeden Farbstoff. In Abb. 3.3 sind die Verdünnungskurven für die Farbstoffe Alexa (\circ), Fluorescein (\triangle), Oregon Green (\diamond) und Rhodamin6G (\square) dargestellt. Die

gemessene Zahl der Fluorophore nimmt mit der Verdünnung der Farbstofflösung linear ab und steigt für sehr geringe Konzentrationen wieder leicht an. Letzteres ist auf das geringe Signal/Rausch-Verhältnis in diesem Bereich zurückzuführen und wurde im Zusammenhang mit der Korrektur der Konzentration in Kap. 3.1.3 beschrieben. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde mit Gl. 3.10 vorgenommen. Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit der 488 nm Linie des Argon-Ionen-Lasers und einer Leistung von 125 μW .

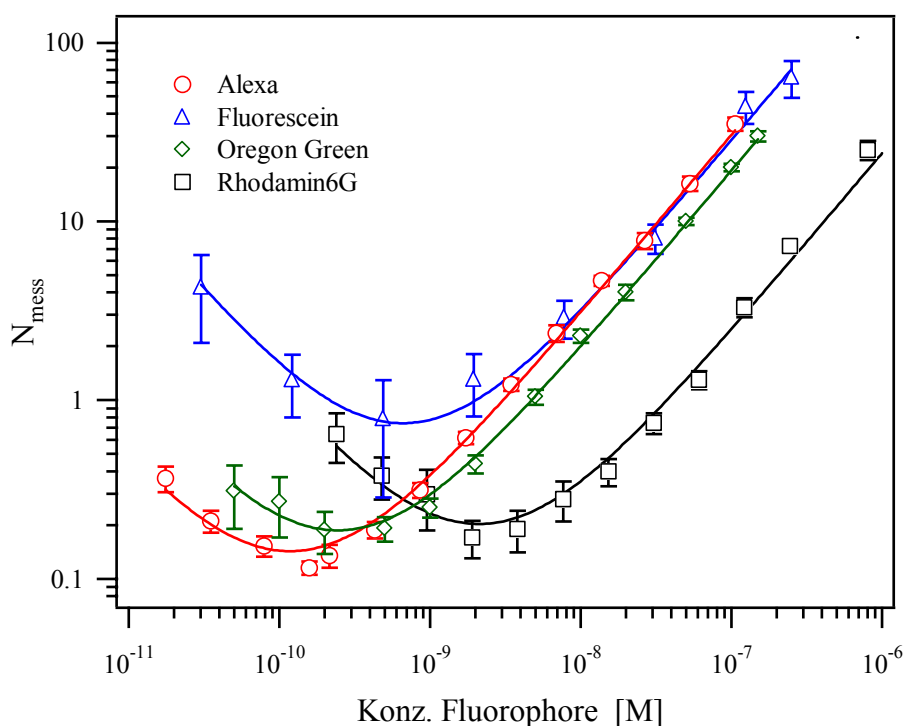


Abb. 3.3: Verdünnungskurven der Farbstoffe Alexa (\circ), Fluorescein (\triangle), Oregon Green (\diamond) und Rhodamin6G (\square). Es ist die gemessene Zahl von Fluorophoren im effektiven Fokusbereich N_{mess} als Funktion der tatsächlichen Konzentration aufgetragen. Im linearen Bereich der Kurven sind präzise Messungen der Konzentrationen mit FCS möglich.

Die Verdünnungskurven sind auf Grund der verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe parallel zur Ordinate verschoben (Zeiss, 2001). Der lineare Messbereich endet für die Kurven von Alexa, Oregon Green, Rhodamin6G, und Fluorescein bei einer minimalen Konzentration von 5×10^{10} M, 10^9 M, 5×10^9 M bzw. 5×10^9 M. Unterhalb dieser Konzentrationen sind mit FCS keine sinnvollen Messungen der Fluorophore im Fokusbereich möglich. Die Verdünnungskurve von Alexa und Oregon Green konnte wegen der hohen emittierten Fluoreszenzintensität des Farbstoffs nur bis zu einer Konzentration von 10^7 M gemessen werden. Eine Reduzierung der Laserleistung würde jedoch auch Messungen von höheren Konzentrationen erlauben. Die Verdünnungskurven in Abb. 3.3

zeigen, dass Alexa die höchste Sensitivität für Messungen im nanomolaren Bereich hat, da sich mit den anderen Farbstoffen nicht so geringe Konzentrationen bestimmen lassen. Der in der Mikroskopie weit verbreitete Farbstoff Fluorescein ist für FCS-Experimente grundsätzlich nicht geeignet, da er eine hohe Triplet-Anregung, geringe Photostabilität und eine pH-abhängige Fluoreszenz hat.

Unspezifische Bindung des Fluorophors

Vor den Experimenten zur Bindung von MARCKS(151-175) an Phospholipidvesikel muss die Frage nach der unspezifischen Bindung des Fluorophors mit den verschiedenen Komponenten des Systems beantwortet werden. Im allgemeinen sollte der verwendete Farbstoff nicht zur Bindung des Peptids an die Lipidmembran beitragen. Für den Fall der unspezifischen Bindung an die Vesikel wäre eine Analyse und Interpretation der Daten wesentlich komplizierter. Abb. 3.4 zeigt die Experimente zur unspezifischen Bindung von 10 nM Alexa bzw. Rhodamin6G an unmarkierte unilamellare POPC-Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm unter Pufferbedingungen (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7). Die Autokorrelationskurven sind vor (\diamond) und nach (\circ) der Zugabe einer (acc.) Lipidkonzentration von 10^{-4} M dargestellt. Die frei in der Lösung diffundierenden Fluorophore Alexa und Rhodamin6G haben eine Diffusionszeit von ~ 25 μ s. Käme es zur unspezifischen Bindung der Farbstoffe, dann würde man als zweite Komponente auch die Vesikel mit einer Diffusionszeit von ~ 1700 μ s detektieren. Der negativ geladene hydrophile Farbstoff Alexa bindet nicht an die neutralen Vesikel, da sich die Autokorrelationskurve nach der Zugabe von Lipid nicht änderte. Die Datenpunkte konnten mit der Gl. 3.2 für eine Komponente beschrieben werden. Im Gegensatz dazu adsorbierte das hydrophobe Rhodamin6G auf der neutralen Lipidmembran. Es lassen sich in der Autokorrelationskurve die Diffusionszeiten des freien und des Vesikel-gebundenen Fluorophors unterscheiden. Die numerische Anpassung der Autokorrelationskurve für zwei Komponenten ergab für Rhodamin6G eine unspezifische Bindung von ~ 50 %.

Alexa ist unter den getesteten Farbstoffen am besten für die FCS-Experimente zur Bindung von MARCKS(151-175) an anionische Phospholipidvesikel geeignet. Zum einen lassen sich mit dem Farbstoff nanomolare Konzentrationen detektieren, und zum anderen bindet er nicht unspezifisch an Lipidmembranen. Aus diesem Grund wurde Alexa zur Markierung von MARCKS(151-175) eingesetzt und kovalent an das N-terminale Ende des Peptids gebunden. Rhodamin6G ist wegen der starken hydrophoben Wechselwirkung mit Lipidmembranen für diese Anwendung nicht sinnvoll. Deshalb sind hydrophobe Fluorophore zur Markierung von kleinen organischen Molekülen oder Peptiden ungeeignet. Daneben

kommt es bei diesen Farbstoffen zur Fluoreszenzlöschung, wenn sie kovalent an Biomoleküle gebunden werden (Zeiss, 2001). Dagegen zeigten Messungen mit einem konventionellen Spektrometer, dass sich bei der Bindung von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) auf anionischen Lipidmembranen die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs nicht veränderte und damit eine Fluoreszenzlöschung ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt).

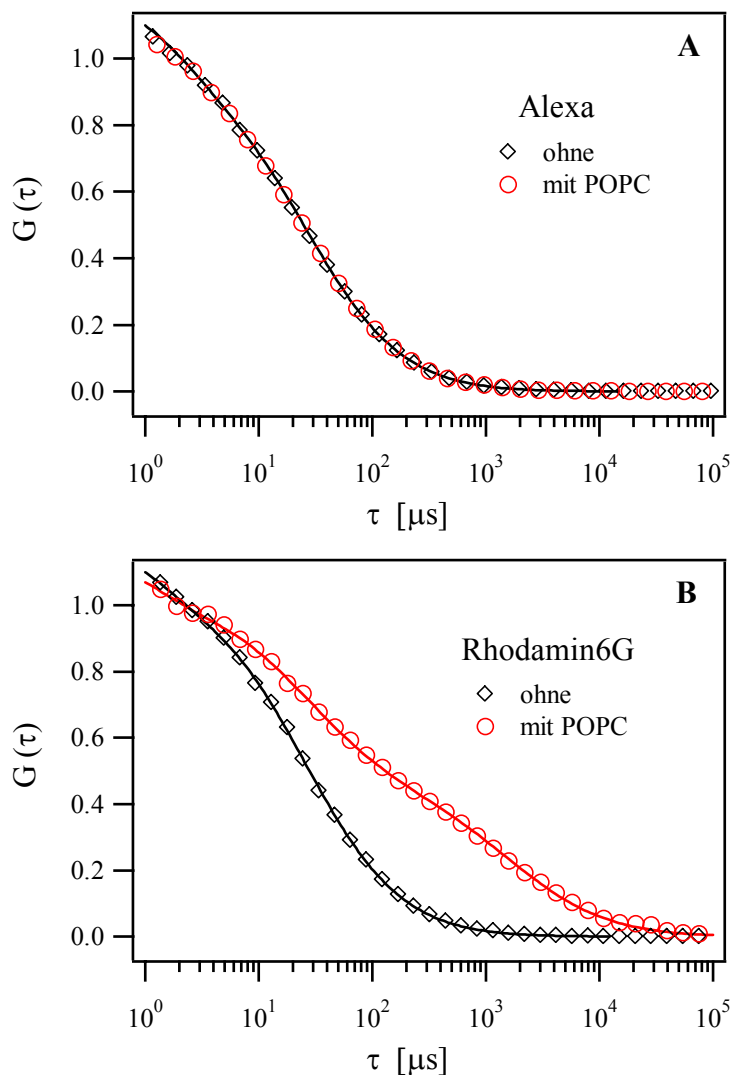


Abb. 3.4: Unspezifische Bindung der Fluorophore Alexa (A) und Rhodamin6G (B) an unilamellare POPC-Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm unter den experimentellen Pufferbedingungen (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7). Es sind die Autokorrelationskurven vor (\diamond) und nach (\circ) der Zugabe von einer (acc.) Lipidkonzentration von 10^4 M dargestellt. (A) Alexa bindet nicht an die neutralen Vesikel, da sich die Autokorrelationskurve nach der Zugabe von Lipid nicht änderte. (B) Im Gegensatz dazu adsorbierte Rhodamin6G auf der neutralen Lipidmembran. Es lassen sich in der Autokorrelationskurve die Diffusionszeiten des freien und des Vesikel-gebundenen Fluorophors unterscheiden.

Unspezifische Bindung von MARCKS(151-175) an die Kammer

In den FCS-Experimenten werden nanomolare Konzentrationen von kationischen Peptiden und Gentransfer-Komplexen eingesetzt. Die unspezifische Bindung der Substanzen an die Glasoberfläche der Probenkammer kann zu unkontrollierten Änderungen in der Konzentration führen. Aus diesem Grund wurde die unspezifische Bindung von 10 nM Alexa-markiertem MARCKS(151-175) an die Oberfläche der verwendeten Probenkammer LabTek II (Nunc, Wiesbaden) als Funktion der Zeit näher untersucht. In einer unbeschichteten Kammer hatte die Zahl der Peptide im Fokusvolumen nach einer Stunde schon um 25% abgenommen. In Abb. 3.5 ist die auf den Anfangswert normierte Zahl an Peptiden im Fokusvolumen aufgetragen. Um die Adsorption der positiv geladenen Peptide an der Oberfläche zu minimieren, wurde die Probenkammer mit einer neutralen POPC-Lipidmembran beschichtet. In diesem Fall blieb die Konzentration der zugegebenen Peptide in der Lösung zeitlich annähernd konstant. Analoge Experimente mit kationischen Gentransfer-Komplexen kamen zum gleichen Ergebnis. Deshalb wurden alle FCS-Experimente mit POPC-beschichteten Probenkammern durchgeführt.

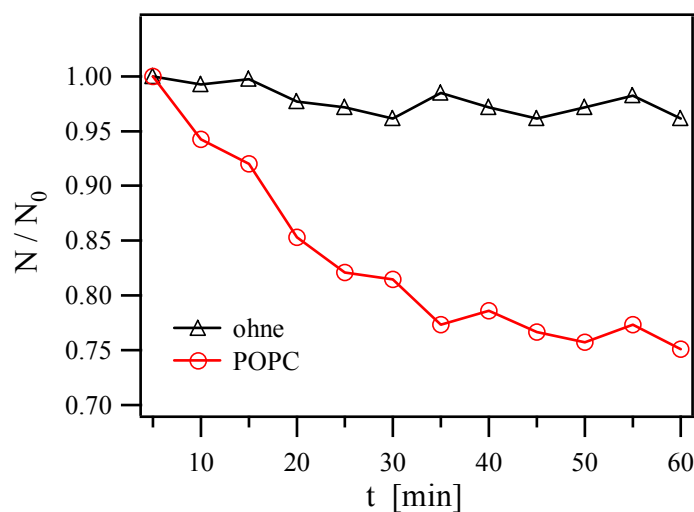


Abb. 3.5: Unspezifische Bindung von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) an die Oberfläche der Probenkammer. Die normierte Zahl von Peptiden im Fokusvolumen nahm in der unbeschichteten Kammer als Funktion der Zeit signifikant ab, während sie für eine POPC-beschichtete Kammer annähernd konstant blieb.

Optimierung der Laserleistung

Die optimale Einstellung der Laserleistung ist für FCS-Experimente von entscheidender Bedeutung. So erzeugen zu geringe Intensitäten nur ein schwaches Fluoreszenzsignal, während hohe Intensitäten zu einer hohen Triplet-Anregung, zur Sättigung und zum Bleichen des Farbstoffs führen. Um den Einfluss der Laserintensität auf die Fluoreszenzeigenschaften des verwendeten Farbstoffs zu untersuchen, wurden für eine 10 nM Alexa/Puffer-Lösung Autokorrelationskurven bei verschiedenen Laserintensitäten aufgenommen. In Abb. 3.6A sind die Autokorrelationskurven für 1% (○), 5% (△), 10% (□), 30% (▽) und 100% (◇) der maximalen Leistung des Argon-Ionen-Lasers ($I_{\max} = 12.5 \text{ mW}$ bei 6.1 Ampere) dargestellt. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte für das Ein-Komponenten-System mit Gl. 3.2. Die Amplitude der Autokorrelationskurven in (A) nimmt mit der Laserleistung kontinuierlich ab. Da sie indirekt proportional zur Teilchenzahl im Fokusbereich ist, werden mit FCS vermeintlich höhere Konzentrationen des Farbstoffs gemessen. Die Ursache für die abnehmende Amplitude in den Autokorrelationskurven ist auf die Sättigung des Farbstoffs zurückzuführen.

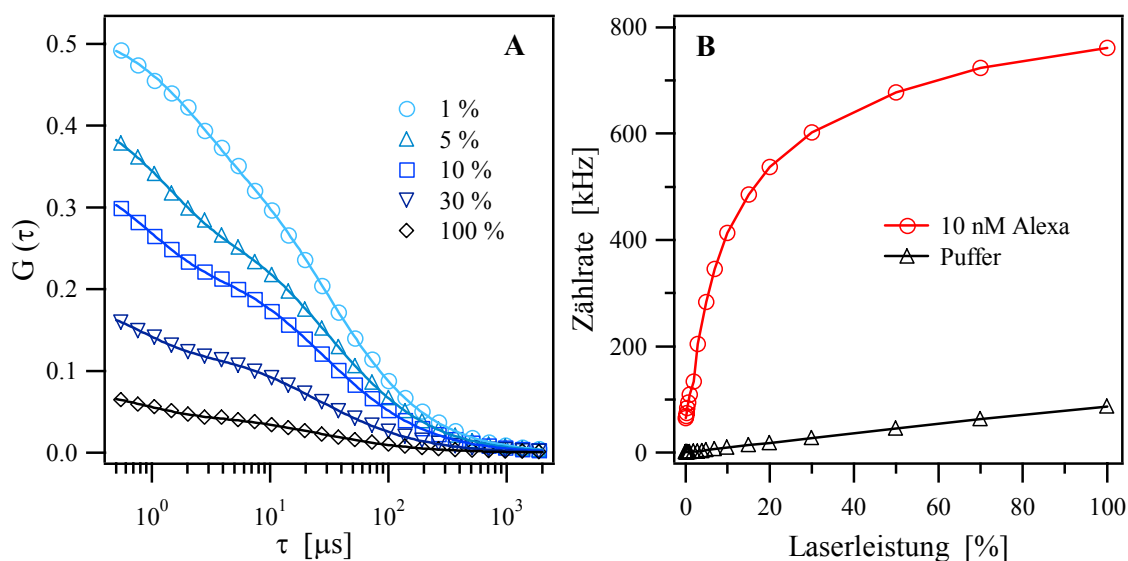


Abb. 3.6: (A) Autokorrelationskurven einer 10 nM Alexa-Lösung für verschiedene Laserintensitäten. Die Amplitude der Autokorrelationskurven nimmt mit der Laserleistung kontinuierlich ab. (B) Die mittlere Fluoreszenzintensität von Alexa (○) ist in Abhängigkeit von der Laserleistung aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Zahl der detektierten Photonen pro Zeitintervall (Zählrate) angegeben. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung ist für geringe Laserleistungen direkt proportional zur einfallenden Intensität, während sie für hohe in eine Sättigung übergeht. Die Messungen mit Puffer (△) definieren das Rauschen des Hintergrunds.

In Abb. 3.6B ist die Photonen-Zählrate des Detektors, die zur mittleren Fluoreszenzintensität der Farbstoff-Lösung äquivalent ist, als Funktion der Laserleistung aufgetragen. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung ist für geringe Laserleistungen direkt proportional zur einfallenden Intensität, während sie für hohe Laserleistungen in eine Sättigung übergeht. Der Grund für dieses Verhalten ist auf die endliche Lebensdauer eines angeregten Zustandes zurückzuführen. Ein Fluorophor im angeregten Zustand kann innerhalb dieses Zeitintervalls keine weiteren einfallenden Photonen absorbieren.

Die abnehmende Amplitude der Autokorrelationskurven in (A) ist ein Indiz für die einsetzende Sättigung des Farbstoffs. Die Teilchenzahlen werden bei höheren Laserleistungen überschätzt, da mit zunehmender mittlerer Fluoreszenzintensität die Fluktuationen im Verhältnis dazu abnehmen. In Abb. 3.7 ist die gemessene Zahl der Farbstoffe im Fokussvolumen und die mittlere Diffusionszeit als Funktion der Laserleistung dargestellt. Die beiden Parameter folgten aus der numerischen Anpassung der Autokorrelationskurven in Abb. 3.6A. Die Standardabweichungen wurden nicht in die Graphen eingetragen, da sie kleiner als die Symbole für die Datenpunkte sind. Die ermittelten Werte für die Teilchenzahl und die Diffusionszeit sind für Laserleistungen bis 5% annähernd konstant. Für höhere Intensitäten ergeben sich systematische Abweichungen vom erwarteten Verhalten. Auf Grund der Sättigung des Farbstoffs nahm die gemessene Teilchenzahl im Fokussvolumen enorm zu, während die Diffusionszeit leicht zurückging.

In diesem Zusammenhang wurde auch der Fluoreszenzhintergrund gemessen, der durch den verwendeten Puffer bestehend aus 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7 hervorgerufen wird. Die gemessene Fluoreszenzintensität des Puffers lag auf Grund der Autofluoreszenz der verschiedenen Substanzen oder der Rückstreuung der einfallenden Laserstrahlung nur bei ~ 0.7 kHz. In Abb. 3.6B ist die Fluoreszenzintensität des Puffers in Abhängigkeit der Laserleistung angegeben, die im Vergleich zur Farbstoff-Lösung um ein Vielfaches geringer als das Rauschen des Hintergrunds ist.

In allen FCS-Experimenten wurde der Argon-Ionen-Laser mit den empfohlenen Einstellungen betrieben und die Laserleistung durch optische Filter auf 1% der maximalen Intensität reduziert. Mit dieser Festlegung lassen sich das Photobleichen und die Sättigung des Farbstoffs bei einem vernünftigen Signal/Rausch-Verhältnis minimieren. Des Weiteren ist die emittierte Fluoreszenzstrahlung der Fluorophore direkt proportional zur einfallenden Intensität.

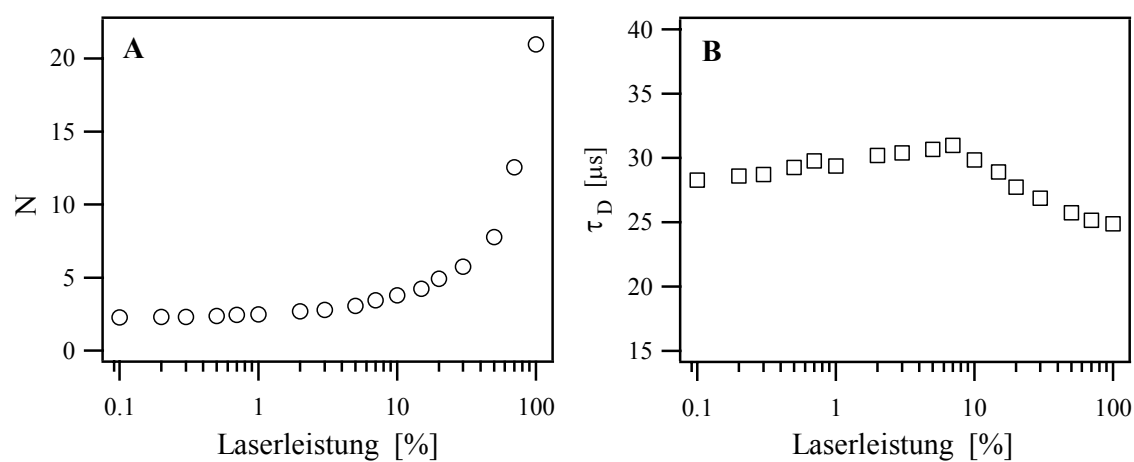


Abb. 3.7: Zahl der Fluorophore im effektiven Fokusbild (A) und mittlere Diffusionszeit (B) als Funktion der Laserleistung. Die beiden Parameter folgten aus der numerischen Anpassung der Autokorrelationskurven mit Gl. 3.2. Die ermittelten Werte für die Teilchenzahl und die Diffusionszeit sind für Laserleistungen bis 5% annähernd konstant. Die Standardabweichungen wurden nicht eingetragen, da sie kleiner als die Symbole für die Datenpunkte sind.

3.2 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie

Aus den allgemeinen Bemerkungen von Kap. 3.1.1 folgt, dass die Quantenausbeute der Fluoreszenz bei einem Fluorophor von vielen Faktoren abhängig ist. Die Quantifizierung der Fluoreszenz gestaltet sich deshalb so kompliziert, da im Experiment alle relevanten Parameter kontrolliert werden müssen, die einen entscheidenden Einfluss auf die Quantenausbeute eines Fluorophors haben könnten. Mit dem vorliegenden experimentellen Aufbau war es möglich, die Fluoreszenzintensität von Gentransfer-Komplexen zu quantifizieren.

3.2.1 Experimenteller Aufbau

Die Messungen erfolgten mit dem motorisierten invertierten Mikroskop Axiovert 100M (Zeiss, Jena). Zum automatischen Abrastern der Probe war das Mikroskop zusätzlich mit einem computergesteuerten XY-Verschiebetisch (Märzhäuser, Wetzlar) ausgerüstet. Die beiden Schrittmotoren erlaubten eine Positionierung des Tisches mit einer Genauigkeit von $\sim 1 \mu\text{m}$. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem hochauflösenden Objektiv Plan-Neofluar 100×1.3 mit Öl-Immersion aufgenommen (Zeiss, Jena). Mit dem Einsatz von Immersionsflüssigkeiten lassen sich höhere Werte für die numerische Apertur erzielen und Verluste durch die Reflexion von Strahlung an den Grenzflächen minimieren. Für die Anregung der Fluorophore stand eine Quecksilber-Dampflampe des Typs HBO 103 (Osram, München) mit einer maximalen Leistung von 100 W zur Verfügung. Das emittierte Spektrum der Quecksilber-Dampflampe hat neben einem kontinuierlichen Hintergrund auch diskrete Linien mit einer hohen Intensität, die eine effiziente Anregung eines Fluorophors ermöglichen. Um das Ausbleichen der Fluorophore nach der Aufnahme eines Fluoreszenzbildes zu verhindern, wurde ein computergesteuerter Fotoverschluss direkt nach der Quecksilber-Dampflampe in den Strahlengang integriert.

Die emittierte Fluoreszenzstrahlung eines Fluorophors kann auf Grund der Stokes-Verschiebung zwischen dem Absorptions- und Emissionsspektrum mit speziellen Filterkombinationen beobachtet werden, die im allgemeinen aus einem dichroitischen Spiegel, einem Anregungs- und einem Emissionsfilter bestehen. Für die folgenden Messungen wurde der für TOTO-1 geeignete Filtersatz 10 (Zeiss, Jena) mit den optischen Komponenten BP(450-490), FT(510) und BP(530-585) verwendet. Der Anregungsfilter selektiert aus dem gesamten Spektrum der Quecksilber-Dampflampe das Licht mit den kürzeren Wellenlängen, das der dichroitische Spiegel in Richtung des Präparats reflektiert. Das

langwelligere emittierte Fluoreszenzlicht kann im Unterschied dazu den dichroitischen Spiegel und den Emissionsfilter passieren.

Bei der verwendeten CCD-Kamera Cool SNAP 12 (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) handelte es sich um eine 12 bit Interline-Kamera mit 1300×1030 Pixel, die mit einer Frequenz von 20 MHz ausgelesen werden konnte. Die elektrischen Signale der CCD-Kamera wurden mit einem A/D-Konverter digitalisiert und in den Computer eingelesen. Die Montage der CCD-Kamera erfolgte am TV-Adapter auf der Unterseite des invertierten Mikroskops. Diese Konfiguration hat im Unterschied zur Montage der CCD-Kamera am Binokulartubus den großen Vorteil, dass im Fluoreszenz-Strahlengang nur ein minimaler Satz von optischen Komponenten vorhanden ist. Im konkreten Fall befinden sich zwischen dem Objektiv und der CCD-Kamera nur der Fluoreszenz-Filterschieber und die Tubuslinse des Mikroskops. Damit kann die Absorption und Streuung des emittierten Fluoreszenzlichtes durch die optischen Komponenten im Strahlengang minimiert werden.

Um genaue statistische Aussagen über die Fluoreszenzintensität von Gentransfer-Komplexen machen zu können, mussten viele Fluoreszenzbilder aufgenommen und analysiert werden. Dies erforderte die Automatisierung der Erfassung und Auswertung der Daten mit dem Programm Metamorph 4.6.6 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA). Dazu wurden verschiedene Prozeduren geschrieben, die das Abrastern der Probe, das Fokussieren des Objekts, das Aufnehmen und Abspeichern der Fluoreszenzbilder automatisierten. In diesem Programm stehen viele Funktionen und Elemente für die Fluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung zur Verfügung.

3.2.2 Digitale Bildverarbeitung

Die Köhler-Beleuchtung des Präparates in der Objektebene durch die Quecksilber-Dampf-lampe ist im allgemeinen nicht vollkommen homogen. Aus diesem Grund müssen die digitalisierten Bilder der CCD-Kamera vor einer Intensitätsanalyse auf ihre inhomogene Beleuchtung korrigiert werden. Dazu wurde das Fluoreszenzbild eines Fluorescein-beschichteten Deckglases in der Objektebene mit definierter Einstellung von Apertur- und Feldblende aufgenommen. Die Intensitätsverteilung dieses Bildes korrespondiert mit dem Beleuchtungsprofil (A) der Quecksilber-Dampf-lampe in der Objektebene. Darüber hinaus erfordert die Korrektur der inhomogenen Beleuchtung die Aufnahme des thermischen Rauschens der CCD-Kamera (B). Die Formel zur Korrektur eines Fluoreszenzbildes (C) lautet:

$$\text{Korrigiertes Bild} = \langle A - B \rangle \cdot \frac{C - B}{A - B} \quad (\text{Gl. 3.15})$$

Das Bild des thermischen Rauschens der CCD-Kamera (B) wird vom unkorrigierten Bild (C) und dem Beleuchtungsprofil in der Objektebene (A) subtrahiert. Mit der Division der resultierenden Bilder (C - B) und (A - B) kann jedes Pixel auf die Intensitätsverteilung der einfallenden Strahlung normiert werden. Die folgende Multiplikation des Quotienten mit dem Mittelwert von Bild (A - B) skaliert die Intensitätswerte des normierten Bildes wieder auf das ursprüngliche Intervall.

Die Intensitätsanalyse der korrigierten Fluoreszenzbilder erfolgte mit digitaler Bildverarbeitung (*Metamorph*). Dazu wurden alle Pixel markiert, die mit ihrer Intensität über dem Hintergrund der Bilder lagen. Die zusammenhängenden markierten Bereiche eines Bildes werden im folgenden als Segmente bezeichnet. Das Programm zur Bildverarbeitung hat alle Segmente ausgeschlossen, die den Rand der Fluoreszenzaufnahmen berührten oder eine bestimmte minimale Fläche unterschritten. Damit konnte vermieden werden, dass in die Statistik zu geringe Intensitäten für Objekte am Rand eines Bildes und Defekte des CCD-Chips wie helle oder dunkle Pixel eingehen. Mit dem Programm wurden dann alle wichtigen physikalischen Parameter für jedes Segment separat bestimmt. Dazu gehören u. a. die Intensität, die Fläche, die verschiedenen Momente der Intensitätsverteilung und die entsprechenden Standardabweichungen. Die Ergebnisse der Analyse wurden für alle Segmente in Form einer Tabelle abgespeichert und in das Programm *IGOR* geladen und ausgewertet. Das für den vorliegenden Fall entwickelte Stapelverarbeitungsprogramm ermöglichte die effiziente Analyse von umfangreichen Bildsequenzen.

4 Bindung von MARCKS an Phospholipidvesikel

4.1 Einführung

Mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ergeben sich breite Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung von Protein-Membran und Protein-Protein Wechselwirkungen. Es muss jedoch zuerst demonstriert werden, dass mit dieser Methode präzise und reproduzierbare Messungen auf diesem Gebiet möglich sind. Deshalb soll die Bindung der einfach aufgebauten und gut charakterisierten Effektor-Domäne von MARCKS, MARCKS(151-175), an anionische Lipidmembranen bestimmt und die gewonnenen Ergebnisse mit den bekannten Werten aus der Literatur verglichen werden.

In den folgenden Experimenten wurden große unilamellare Vesikel (LUVs) mit einem Durchmesser von 100 nm eingesetzt. Die Präparation der LUVs erfolgte durch die schnelle Extrusion einer Suspension multilamellarer Vesikel durch die Poren eines Polycarbonat-Filters (Hope et al., 1985). LUVs stellen ein geeignetes System zur Bestimmung der Peptid-Membran Bindung dar, da sie im Gegensatz zu beschallten Vesikeln thermodynamisch stabil sind. Außerdem haben sie eine definierte Größe, was für Ethanol-injizierte oder multilamellare Vesikel im allgemeinen nicht der Fall ist. Des weiteren sind unilamellare Vesikel mit 100 nm im Durchmesser wesentlich größer als typische Proteine und Peptide. Auch im vorliegenden Fall hat MARCKS(151-175) in ausgestreckter Konformation nur eine Länge von ~ 7 nm.

In Abb. 4.1A sind die Verhältnisse bei der Bindung von fluoreszenzmarkierten Peptiden an unilamellare Vesikel im effektiven Fokusvolumen ($d = 300$ nm) schematisch dargestellt. Für nanomolare Peptidkonzentrationen befinden sich nur eine geringe Zahl an freien und Vesikel-gebundenen Peptiden im Fokusvolumen. Im allgemeinen können nur die Partikel nachgewiesen werden, die sich innerhalb des Detektionsvolumens aufhalten. Auf Grund der Unterschiede im hydrodynamischen Radius diffundieren Peptid/Vesikel-Komplexe viel langsamer durch das Fokusvolumen als freie Peptide. Für MARCKS(151-175) ist die Diffusionszeit der Peptid/Vesikel-Komplexe ~ 25 -fach länger als bei freien Peptiden ($\tau_{\text{gebunden}} \gg \tau_{\text{frei}}$). In Abb. 4.1B ist eine idealisierte Autokorrelationskurve für ein Peptid-Vesikel-System mit weit auseinander liegenden charakteristischen Diffusionszeiten gezeigt. Die gestrichelten vertikalen Linien geben die mittlere Diffusionszeit der beiden

Komponenten an. Aus den relativen Amplituden der gemessenen Autokorrelationskurven kann der Anteil an freien und gebundenen Peptiden bestimmt werden. Sind 50% der Peptide gebunden, dann gilt für die Bindungskonstante $K = 1/[L]_{acc}$.

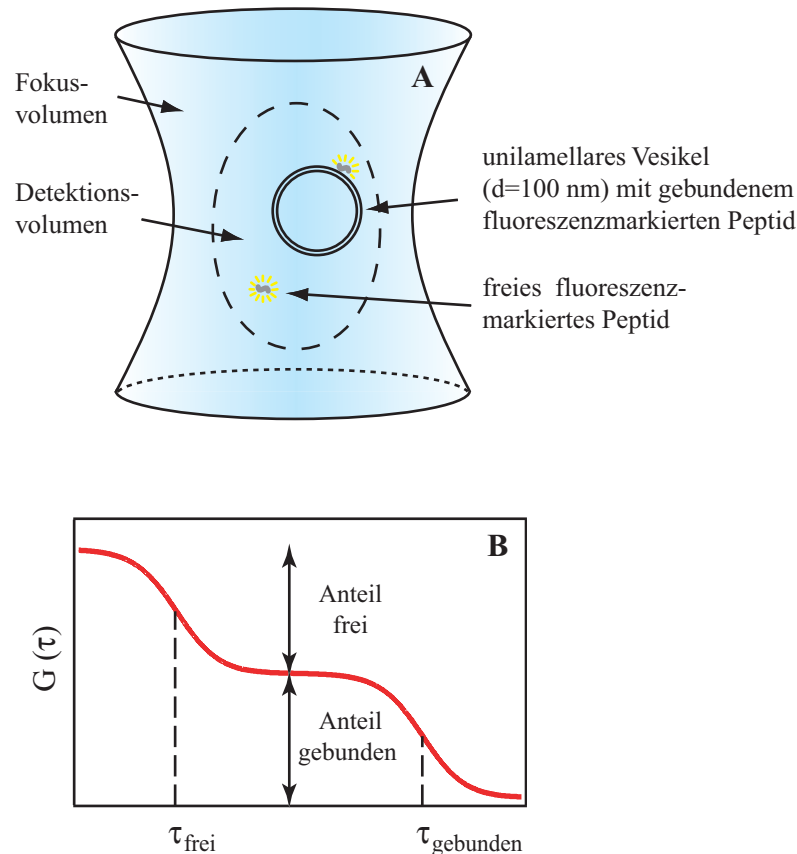


Abb. 4.1: (A) Bindung von fluoreszenzmarkierten Peptiden an unilamellare Vesikel im effektiven Fokusvolumen ($d = 300$ nm). Auf Grund der Unterschiede im hydrodynamischen Radius diffundieren Peptid/Vesikel-Komplexe viel langsamer durch das Fokusvolumen als freie Peptide. (B) Idealisierte Autokorrelationskurve eines Peptid-Vesikel-Systems mit weit auseinander liegenden charakteristischen Diffusionszeiten. Die relativen Amplituden geben den prozentualen Anteil der beiden Komponenten an.

Die Membranbindung des MARCKS-Proteins und seiner Effektor-Domäne wurde schon mit verschiedenen Methoden untersucht (Arbuzova et al., 2002; McLaughlin und Aderem, 1995; McLaughlin et al., 2002; Qin und Cafiso, 1996). Diese Experimente zeigten, dass MARCKS mit seinen aromatischen Aminosäureresten nur sehr schwach an elektrisch neutrale Vesikel (PC) bindet. Mit einem steigenden Anteil an negativ geladenen Lipiden (PS) nahm die Bindung von MARCKS(151-175) an die Membran exponentiell zu, was auf Grund der unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen theoretisch auch zu erwarten war (Arbuzova et al., 2000). Deshalb kann die Bindung des Peptids durch die

systematische Änderung der Vesikelladung über den gesamten Detektionsbereich von FCS gemessen werden. Die effektiven Dissoziationskonstanten des Peptid/Lipid-Komplexes liegen im Intervall von ~ 1 mM bis 10 nM. Die (apparente) Dissoziationskonstante K_d des Peptid/Vesikel-Systems ist im allgemeinen durch die Lipidkonzentration gegeben, bei der 50% der Peptide gebunden sind. Die Beschreibung der Wechselwirkung mit der Dissoziationskonstante ist dann sinnvoll, wenn sich ein Peptid mit einem Lipid zu einem 1:1-Komplex formiert. Die Peptide binden jedoch über unspezifische elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen an die Vesikel (Arbuzova et al., 2000). Aus diesem Grund wird die Bindung mit einem molaren Partitionskoeffizienten beschrieben, der auch als Bindungskonstante bezeichnet wird und durch die Gleichung $K = 1/K_d$ definiert ist.

Es wurde schon darauf hingewiesen, dass MARCKS mit einer hohen Affinität an PIP_2 bindet und damit vermutlich eine lokale Anreicherung des Lipids in der Plasmamembran induziert. Die Phosphorylierung von MARCKS und die Bindung von Kalzium/Calmodulin (Ca/CaM) führen jedoch wieder zur Desorption des Proteins von der Membran. Aus diesem Grund besteht auch ein besonderes Interesse daran, mit FCS die Wechselwirkung von Ca/CaM mit biologischen Effektoren zu untersuchen. Die folgenden FCS-Experimente zur Bindung von MARCKS an PC/ PIP_2 -Vesikel bilden also die Basis für die zukünftigen Einzelmolekül-Messungen mit Calmodulin. Des weiteren gingen einige vor kurzem erschienene theoretische Arbeiten der Frage nach, ob die Bindung eines basischen Peptids zu einer Umverteilung der einfach negativ geladenen Lipide in der Membran führt (Haleva et al., 2003; May et al., 2000). Während einige Publikationen eine signifikante Umverteilung der Lipide annehmen, gehen andere davon aus, dass dieser Prozess keine entscheidene Rolle spielt und deshalb vernachlässigt werden kann (Wang et al., 2004). Eine genaue systematische Untersuchung der Peptid-Membran Bindung mit Hilfe von FCS könnte in diesem Fall dazu beitragen, die Frage nach dem richtigen theoretischen Ansatz zu beantworten.

Bemerkungen zur Bindungskinetik

Die Anwendung von Gl. 3.5 gilt nur unter der Voraussetzung, dass die fluoreszierenden freien oder gebundenen Peptide während der Diffusion durch das Fokusvolumen weder mit einem Vesikel assoziieren bzw. dissoziieren. In diesem Fall existieren also nur zwei Zustände: Entweder es diffundieren freie oder an Vesikel gebundene Peptide durch den Laserfokus. Unter dieser Voraussetzung detektiert FCS zwei Populationen, die sich deutlich in den Diffusionszeiten unterscheiden. Treten jedoch Prozesse auf, bei denen ein Peptid während der Diffusion durch den Laserfokus mit einem Vesikel assoziiert oder

dissoziiert, dann kann nur noch eine mittlere Diffusionszeit für beide Komponenten angegeben werden (Elson, 2001). Wie Messungen zur Kinetik mit der *stopped-flow* Methode gezeigt haben, können kinetische Effekte unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen vernachlässigt werden (Arbuzova et al., 1997). Die Diffusionszeit eines Peptid/Vesikel-Komplexes ($\sim 1700 \mu\text{s}$) ist kleiner als die Lebensdauer der Peptidbindung, die proportional zum Reziproken der Dissoziationskonstante ist. Die gemessene Dissoziationskonstante für 15:1 PC/PS-Vesikel ist $\sim 100 \text{ s}^{-1}$ und entspricht einer Lebensdauer der Peptidbindung von $\sim 10 \text{ ms}$. Damit ist die Lebensdauer deutlich länger als die mittlere Diffusionszeit eines Vesikel gebundenen Peptids von $\sim 2 \text{ ms}$. Da es sich bei der Bindung von MARCKS(151-175) an PC/PS-Vesikel um einen diffusionslimitierten Prozess handelt, ist die Lebensdauer der Peptidbindung $>10 \text{ ms}$ für Vesikel mit mehr als 6% PS (Arbuzova et al., 1998). Die Lebensdauer eines Peptid/Vesikel-Komplexes ist im allgemeinen direkt proportional zur Bindungskonstante und nimmt mit einem steigenden Anteil von PS zu. Die in Abb. 4.11 dargestellten Resultate für Vesikel mit 6% PS ($K = 10^3 \text{ M}^{-1}$) stimmen auch unter der Voraussetzung der diffusionslimitierten Bindung mit unabhängig davon durchgeführten Gleichgewichtsmessungen überein. Aus diesem Grund ist mit FCS eine Untersuchung der Peptidbindung an 100 nm LUVs für Bindungskonstanten von $K \geq 10^3 \text{ M}^{-1}$ sinnvoll.

Kinetische Effekte könnten jedoch eine Rolle spielen, wenn Proteine oder Peptide nur sehr schwach an die Vesikel binden. So ist die Bindungskonstante von MARCKS(151-175) an PC-Vesikel $\sim 100 \text{ M}^{-1}$ und damit die Lebensdauer eines Peptid/Vesikel-Komplexes nur $\sim 100 \mu\text{s}$. Diese schwache Bindung kann nicht mit Gl. 3.5 beschrieben werden. Die Kinetik der Peptidbindung an PC/PIP₂-Vesikel gestaltet sich komplizierter, wenn die Vesikel aus einem geringeren Anteil als 0.5% PIP₂ bestehen. In diesem Fall kann für die Assoziationsrate nicht länger ein diffusionslimitierter Prozess angenommen werden, da drei PIP₂-Moleküle an einen Ort der Membran diffundieren müssen, um eine geeignete Bindungsstelle für das Peptid zu bilden (Wang et al., 2002).

4.2 Material und Präparation

4.2.1 Myristoyliertes Alanin-reiches C Kinase Substrat

Das myristoylierte Alanin-reiche C Kinase Substrat (MARCKS), das in vielen Zelltypen das Hauptsubstrat von PKC darstellt, spielt bei der Signalübertragung, Phagozytose und Sekretion eine wichtige Rolle (Allen und Aderem, 1996). Das Protein bindet über die Effektor-Domäne, MARCKS(151-175), und einer Myristoyl-Kette am N-terminalen Ende des Proteins an die Plasmamembran. Die Bindungsenergie ist hauptsächlich auf die unspezifische elektrostatische Wechselwirkung zwischen den basischen Aminosäuren der Effektor-Domäne und der anionischen Membran zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde die Bindung der MARCKS Effektor-Domäne an negativ geladenen Vesikel näher untersucht. MARCKS(151-175) wurde für die Experimente vom Proteomics Center der State University von New York (Stony Brook, NY, USA) zur Verfügung gestellt. Die Aminosäuresequenz der Effektor-Domäne lautet KKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNNK. Die Buchstaben bezeichnen die folgenden Aminosäuren: K = Lysin, R = Arginin, F = Phenylalanin, S = Serin, L = Leucin, G = Glycin, N = Asparagin. Nach der Synthese des Peptids wurden die Enden mit Acetyl- und Amiogruppen blockiert.

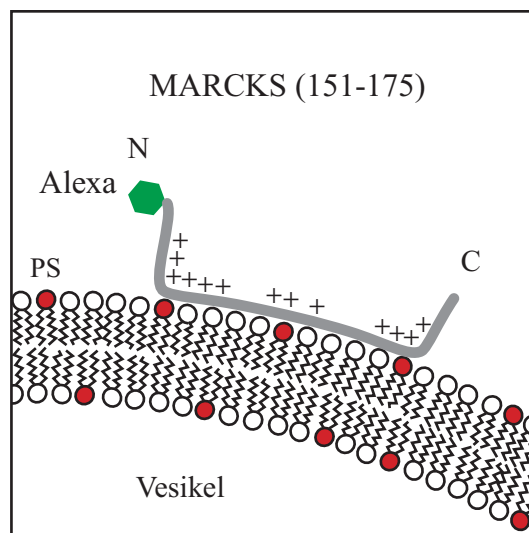


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Bindung von MARCKS(151-175) an negativ geladene PC/PS-Lipidmembranen. Das Peptid besitzt 13 basische Aminosäuren (+), die unter neutralen Pufferbedingungen protoniert sind. Der Fluorophor Alexa488 ist kovalent an ein Cystein am N-terminalen Ende des Peptids gebunden. MARCKS(151-175) bindet auf der Membran in einer ausgestreckten Konformation. Die Bindungsenergie resultiert hauptsächlich aus der unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den basischen Aminosäuren und der anionischen Membran.

Abb. 4.2 zeigt die Bindung der basischen Effektor-Domäne von MARCKS(151-175) an eine negativ geladene PC/PS-Lipidmembran. Das Peptid besteht aus 25 Aminosäuren und befindet sich in Lösung als auch gebunden an eine PC/PS- oder PC/PIP₂-Membran in einer ausgestreckten Konformation mit einer Länge von ~7nm (Gambhir et al., 2004). Die 13 basischen Aminosäuren (+) und die negativ geladene Lipide in der Membran ziehen sich elektrostatisch an. Die 5 aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin) penetrieren die polaren Kopfgruppen der Lipide und reichen in den hydrophoben Bereich der Membran hinein (Ellena et al., 2003; Zhang et al., 2003). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist dies in der Abbildung nicht dargestellt. Die relativ schwache Bindung von MARCKS an elektrisch neutrale Membranen bedeutet, dass die hydrophobe Wechselwirkung nur einen geringen Beitrag zur starken Bindung der Peptide an negativ geladene Vesikel liefert (Arbuzova et al., 2000).

Die Markierung des Peptids erfolgte mit dem hydrophilen Farbstoff Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, USA), der am N-terminalen Ende kovalent über ein Cystein an das Peptid angebunden wurde. Elektron-Spin-Resonanz-Messungen (ESR) demonstrierten, dass die N-terminale Region von MARCKS(151-175) mit ihren vielen basischen Aminosäuren die polare Kopfgruppe der Lipidmembran nicht penetriert (Qin und Cafiso, 1996). Deshalb sollte die kovalente Bindung eines hydrophilen Fluorophors an diese Region des Peptides keinen signifikanten Effekt auf die Bindungskonstante haben. Jedoch hat Alexa488 unter neutralen pH-Bedingungen eine positive und drei negative Ladungen, die im Prinzip die elektrostatische Bindung des Peptids an die Phospholipidvesikel beeinflussen können. Der Farbstoff wurde aber an eine Region des Peptids gebunden, die nicht direkt an der Bindung beteiligt ist und deshalb den größten Abstand zur Membran hat (Abb. 4.2). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die elektrischen Ladungen des Fluorophors keine signifikanten Auswirkungen auf die Messung der Bindungskonstante haben. Unabhängige Messungen mit Zentrifugation zeigten, dass Alexa-markiertes und radioaktiv NEM-markiertes MARCKS(151-175) mit der gleichen Affinität an PC/PS-Vesikel (10:1) binden (Arbuzova et al., 2000). Im Gegensatz dazu würden hydrophobe Farbstoffe den Wert der Bindungskonstanten erhöhen, da sie eine hohe Affinität zu den Alkylketten der Lipide in der Membran haben. Ein prominentes Beispiel für einen hydrophoben Fluorophor ist TexasRed. Eine Markierung mit diesem Farbstoff würde für die meisten kurzen basischen Peptide zu einer 100-fachen Erhöhung der Bindungskonstante führen.

Nach der Präparation wurde die Reinheit von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) mit Massenspektroskopie und Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) überprüft. Die Analyse hatte eine Reinheit des Peptids von mindestens 95% ergeben. Für das Ansetzen

aller notwendigen Pufferlösungen wurde deionisiertes Wasser (Millipore, Eschborn) mit einer Leitfähigkeit von $<0.1 \times 10^6$ S/m verwendet.

4.2.2 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin

Das neutrale Phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) ist ein amphiphiles Molekül mit einem relativen Molekulargewicht von $M_r = 760$, das aus einer polaren hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Bereich besteht (Abb. 4.3). Charakteristisch für die polare Kopfgruppe ist ihre zwitterionische Struktur, bei der sich beide Partialladungen kompensieren. Die beiden Kohlenwasserstoffketten stellen den hydrophoben Bereich dar und sind im Fall von POPC nicht identisch. Bei der ersten handelt es sich um eine Palmitoylkette, die aus 16 Kohlenstoffatomen aufgebaut ist und keine Doppelbindungen aufweist, bei der zweiten um eine Oleoylkette mit 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung. Das Lipid wird mit einer hohen Reinheit ($>99\%$) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) synthetisiert. Im allgemeinen sind Phospholipide mit ungesättigten Fettsäureketten als Pulver nicht stabil und extrem hygroskopisch. Die Absorption von Wasser kann zur Hydrolyse oder Oxidation des Phospholipids führen. Aus diesem Grund werden Phospholipide mit ungesättigten Ketten in Chloroform mit Konzentrationen bis zu 25 mg/ml gelöst und bei Temperaturen von unter -20°C gelagert.

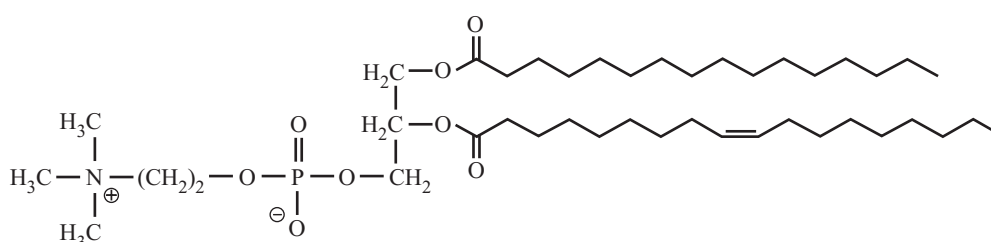


Abb. 4.3: Chemische Struktur von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC).

In dieser Arbeit werden zur Präparation großer unilamellarer Vesikel hauptsächlich binäre Lipidmischungen aus POPC mit unterschiedlichen Anteilen an den negativ geladenen Lipiden 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serin] (POPS) oder Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) hergestellt. Des weiteren wird POPC zur Beschichtung der Probenkammer mit einer neutralen und bei Raumtemperatur fluiden Lipidmembran eingesetzt. Auf Grund der Fluidität können die Lipide in der Membran frei diffundieren und damit ein Ausheilen von kleineren Defekten in der Beschichtung ermöglichen. Eine ideale

Beschichtung verhindert die unspezifische Bindung von positiv geladenen Peptiden oder Gentransfer-Komplexen an die Kunststoff- und Glasoberflächen der Probenkammer. Eine irreversible Bindung würde neben der Denaturierung dieser Stoffe auch zu einer unkontrollierbaren Änderung der Konzentration in der Lösung führen. Da die eingesetzten Probenkonzentrationen bei den FCS-Messungen nur im nanomolaren Bereich liegen, würde dies die Reproduzierbarkeit der Experimente gefährden.

Daneben können auch minimale Konzentrationen von geladenen Molekülen in der Membranbeschichtung einen negativen Effekt auf die Experimente haben. Diese geringen Verunreinigungen entstehen bei der Herstellung der Phospholipide. Im allgemeinen haben Phospholipide mit zwei ungesättigten Fettsäureketten, wie z. B. das 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC), den größten Anteil an Verunreinigungen. Allerdings zeichnen sie sich durch eine höhere laterale Diffusion in der Lipidmembran bei Raumtemperatur aus. Der entscheidende Punkt für die Verwendung von POPC zum Beschichten der Probenkammer war jedoch in diesem Fall die höhere Reinheit.

4.2.3 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin

Das einfach negativ geladene Phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin (POPS) unterscheidet sich nur in der polaren Kopfgruppe von der oben beschriebenen molekularen Struktur von POPC. Die Aminosäure Serin ist über ihre kurze Seitenkette kovalent an die negativ geladene Phosphatgruppe gebunden. Sie besitzt zwei funktionelle Gruppen, die basische Amino- und die saure Carboxylgruppe. Unter den experimentellen Pufferbedingungen ist die Aminogruppe protoniert und die Carboxylgruppe deprotoniert. In der Summe ergibt sich daraus eine einfach negativ geladene Kopfgruppe (Abb. 4.4). POPS (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) hat ein relatives Molekulargewicht von $M_r = 784$.

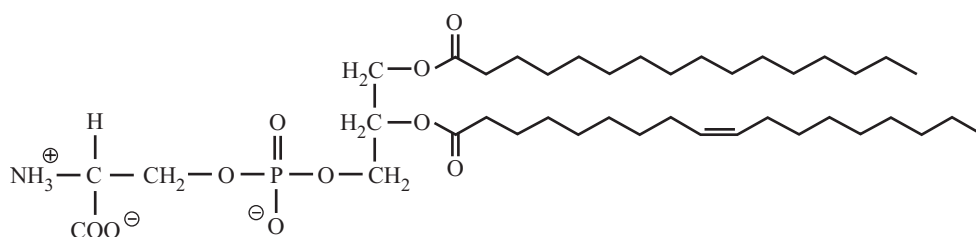


Abb. 4.4: Chemische Struktur von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin (POPS).

4.2.4 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat

Inositol Phospholipide¹ sind hauptsächlich auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und werden durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PI) gebildet. Für den Transfer von Phosphatgruppen auf den Inositolring sind entsprechende Kinasen und ATP erforderlich. Im ersten Schritt entsteht Phosphatidylinositol 4-phosphat (PIP) und im zweiten Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂). Von allen Phosphoinositiden hat PIP₂ die größte Bedeutung in der Signalübertragung, obwohl es im Vergleich zu den anderen nur 10% der Gesamtmenge repräsentiert. Im Verhältnis zu allen Phospholipiden der Plasmamembran stellt es nur 1% an der Gesamtmenge dar (Alberts, 1994).

PIP₂ besteht aus einer hydrophilen Kopfgruppe, die zu den polarsten in der Natur zählt und drei negative Ladungen trägt. Der hydrophobe Bereich wird aus den beiden Kohlenwasserstoffketten Stearin- und Arachidinsäure gebildet. In Abb. 4.5 ist die chemische Strukturformel von PIP₂ wiedergegeben. Neben den in der Einleitung beschriebenen Punkten spielt es vermutlich auch bei der Ca²⁺-induzierten Exozytose in Zellen eine Rolle (Martin, 1998) und kann über spezielle Proteine auch an Aktin-Filamente binden.

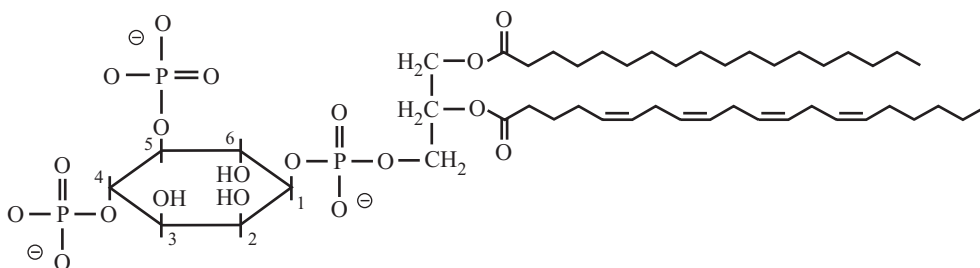


Abb. 4.5: Chemische Struktur von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂).

PIP₂ wird im allgemeinen aus einem Extrakt des Gehirns von Rindern isoliert und hat eine geringere Löslichkeit in Chloroform als viele andere Lipide. Die Herstellung eines homogenen Lipidfilms erfordert deshalb bei Lipidmischungen das schnelle Abdampfen des Lösungsmittels. Das Lipid ist als Ammonium- oder Natriumsalz erhältlich und wurde von Boehringer Mannheim als Pulver bezogen. Das Ammoniumsalz hat ein relatives Molekulargewicht von $M_r = 1098$ und besitzt in Chloroform eine deutlich höhere Löslichkeit als das fast unlösliche Natriumsalz. Für die Experimente zur Bindung von MARCKS an Phospholipidvesikel sind homogene Mischungen von PIP₂ mit POPC notwendig. Das Natriumsalz von PIP₂ bildet im Unterschied zum Ammoniumsalz nach

¹ Sie werden auch als Phosphoinositide bezeichnet.

dem Abdampfen des Chloroforms keinen homogenen Lipidfilm (Toner et al., 1988). Aus diesem Grund wurde für alle Experimente das Ammoniumsalz von PIP₂ verwendet.

4.2.5 Präparation der Vesikel

Die Herstellung der verschiedenen PC/PS- und PC/PIP₂-Vesikel beginnt mit dem Mischen der Lipide in Chloroform. Liegen die Lipide als Pulver vor, dann ist es sinnvoll, zuerst Stammlösungen in Chloroform anzusetzen. Die gelösten Lipide werden mit einer speziellen Pipette (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) in einem Rundkolben aus Glas transferiert und durch leichtes Schwenken des Kolbens gemischt. Die Pipette zeichnet sich dadurch aus, dass die Lipide beim Aufziehen nur mit Glas und Teflon in Kontakt kommen. Bei konventionellen Glasspritzen mit Kanüle aus Edelstahl können Metallionen in Lösung gehen, die im Fall von PIP₂ zur Degeneration des Lipids führen (persönliche Mitteilung von Prof. McLaughlin, Stony Brook, NY). Die Pipetten und die Rundkolben wurden zur Reinigung vorher mehrfach mit Methanol und Chloroform gespült. Für alle Präparationen wurde Methanol und Chloroform mit einer Reinheit von $\geq 99\%$ (HPLC-Qualität) verwendet (Fluka, Deisenhofen).

Auf Grund der im Vergleich zu PC geringen Löslichkeit von PIP₂ in Chloroform ist zur Herstellung eines homogenen Lipidfilms das schnelle Abdampfen des Lösungsmittels mit einem Vakuum-Rotations-Verdampfer notwendig. Der Rundkolben aus Glas mit den in Chloroform gelösten Lipiden rotiert dabei in einem Wasserbad der Temperatur von 25 °C. Bei einem zu langsamen Abdampfen kommt es zur Phasenseparation in der Lipidmischung. In diesem Fall muss der inhomogene Lipidfilm durch die Zugabe von Chloroform wieder gelöst und mit dem Abdampfen des Lösungsmittels neu begonnen werden. Zur Herstellung unilamellarer Vesikel sollte der Glaskolben mit dem Lipidfilm für mindestens 20 min an das Vakuum angeschlossen bleiben, um den größten Teil des Lösungsmittels zu entfernen. Binäre Lipidmischungen aus PC/PS wurden nach der gleichen Prozedur präpariert, allerdings ist das Problem der Phasenseparation nicht so kritisch.

Danach wird Puffer (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7) zugegeben und der Lipidfilm durch leichtes Schwenken des Kolbens resuspendiert. Es bilden sich in der Lösung multilamellare Vesikel, die durch schnelles Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und dem folgenden Auftauen in einem Wasserbad aufbrechen. Dieser Zyklus wird mindestens 5x durchlaufen, bevor mit der Extrusion der Suspension begonnen werden kann. Die

Extrusion erfolgte mit einem Mini-Extruder von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) unter Verwendung von zwei Polycarbonat-Membranen mit 100 nm Porendurchmesser. Die Suspension der aufgebrochenen multilamellaren Vesikel wurde mit Hilfe von zwei Spritzen mindestens 10× langsam durch die Polycarbonat-Membranen gedrückt. Dadurch bildet sich eine ziemlich homogene Suspension unilamellarer Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von ~100 nm (LUVs) (Hope et al., 1985). Die komplizierte Präparation der PC/PIP₂-Vesikel ist in Wang (2002) detailliert beschrieben.

Für die folgenden FCS-Messungen müssen die Probenkammern mit einer neutralen Membran beschichtet werden, um eine unspezifische Bindung von Peptiden oder Gentransfer-Komplexen auf der Glasoberfläche zu verhindern. Zur Beschichtung der Probenkammer wurden kleine beschallte PC-Vesikel eingesetzt. Im Unterschied zur Präparation der unilamellaren Vesikel muss das Abdampfen des Lösungsmittels für mindestens zwei Stunden erfolgen, um alle Spuren von Chloroform aus dem Lipidfilm zu entfernen. Ist das nicht der Fall, dann können die Lipide beim Beschallen zerstört werden (Huang, 1969). Nach der Resuspension des Lipidfilms in Puffer wurde die Lösung mit einem Ultraschallgenerator (Bandelin, Berlin) für 10 min bei einer Leistung von 70 W beschallt, bis die Lösung transparent war. Das Probenglas stand während des Beschallens in einem Wasserbad, um eine Überhitzung der Lösung zu vermeiden. Die von der Titanspitze beim Beschallen abgebrochenen Fragmente wurden durch das Zentrifugieren bei 13.000 U/min für 10 min sedimentiert und der Überstand mit den kleinen beschallten Vesikel abgenommen.

4.3 Resultate

Abb. 4.6 zeigt Autokorrelationskurven von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) und von NBD-markierten unilamellaren PC/PS-Vesikeln mit einem Durchmesser von 100 nm. Die Daten stammen aus zwei separaten Experimenten, bei denen jeweils nur eine Komponente in der Lösung vorhanden war. Alle Experimente zur Bindung von MARCKS(151-175) wurden unter definierten experimentellen Pufferbedingungen (100 mM KCl, 10 mM HEPES und pH 7) durchgeführt. Die numerische Anpassung der Autokorrelationskurven erfolgte mit Gl. 3.2 (Ein-Komponenten-Modell). Für Alexa-MARCKS(151-175) und die PC/PS-Vesikel betragen die ermittelten Diffusionszeiten $\sim 70 \mu\text{s}$ bzw. $\sim 1700 \mu\text{s}$. Die dazu korrespondierenden hydrodynamischen Radien der Partikel liegen für die Peptide und die Vesikel bei 2.2 nm bzw. 55 nm. Beide Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten aus theoretischen Berechnungen. Die gemessenen Datenpunkte der Vesikel lassen sich sehr gut mit einer Ein-Komponenten-Autokorrelationsfunktion beschreiben. Eine numerische Anpassung mit Gl. 3.7 für polydisperse Systeme ergab, dass es sich bei den extrudierten Vesikel tatsächlich um eine sehr monodisperse Lösung handelt.

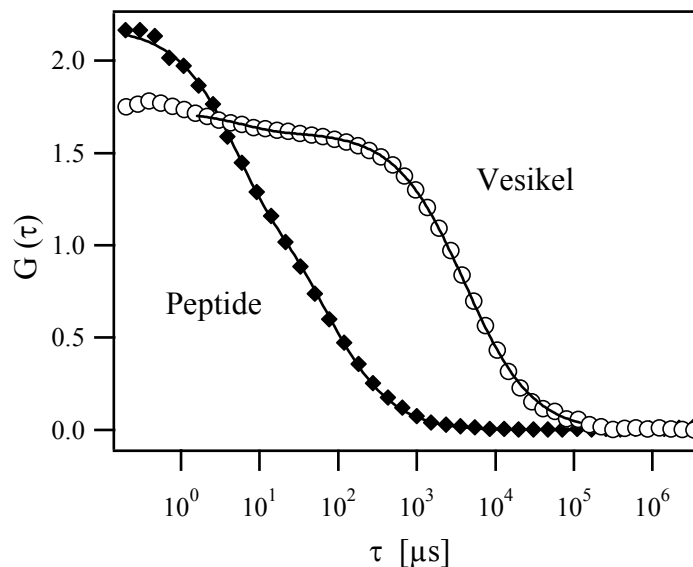


Abb. 4.6: Autokorrelationskurven von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) und NBD-markierten PC/PS-Vesikel (5:1) mit einem Durchmesser von 100 nm. Die Diffusionszeit ist zur Partikelgröße direkt proportional und beträgt für die Peptide und Vesikel $\sim 70 \mu\text{s}$ bzw. $\sim 1700 \mu\text{s}$.

Die Bestimmung der Bindungskonstanten erfordert präzise Messungen der relativen molaren Konzentrationen. Es stellt sich nun die Frage, für welche Konzentrationen die Methode sinnvolle und genaue Resultate liefert. Dazu wurden sogenannte Verdünnungskurven aufgenommen, die die gemessene Zahl der Partikel im effektiven Fokusvolumen in Abhängigkeit der tatsächlichen Partikelkonzentration angeben.

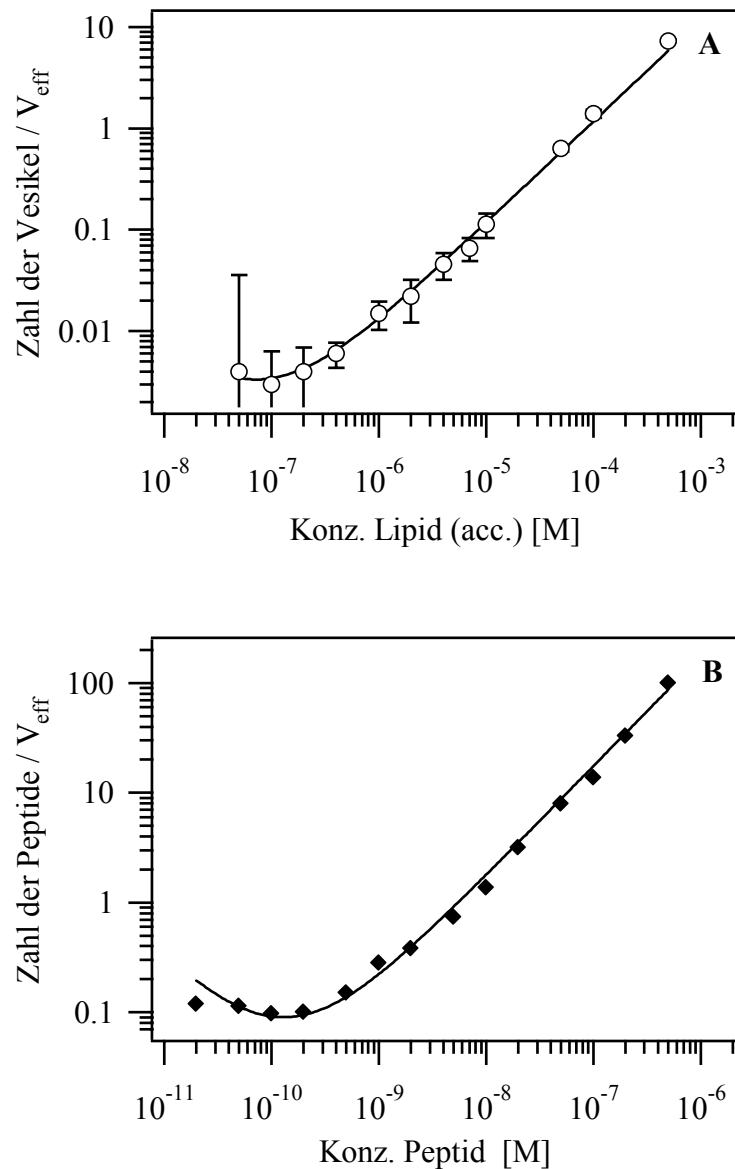


Abb. 4.7: Linearer Messbereich und Detektionsgrenze für die Bindungsexperimente. Die Zahl der Partikel im effektiven Fokusvolumen ist als Funktion der Lipid- (A) und der Peptidkonzentration (B) aufgetragen. Die Standardabweichungen sind nicht angegeben, wenn sie kleiner als die Symbole für die Datenpunkte sind. Die numerische Anpassung der Verdünnungskurven erfolgte mit Gl. 3.10.

In Abb. 4.7 sind die Verdünnungskurven für die NBD-markierten PC/PS-Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm und für Alexa-markiertes MARCKS(151-175) dargestellt. Jedes Vesikel war mit ~ 10 NBD- C_{12} -HPC Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei diesem Fluorophor handelt es sich um ein neutrales Phospholipid, bei dem an eine Fettsäurekette mit 12 Kohlenstoffatomen das fluoreszierende Molekül NBD kovalent gebunden ist (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Für jeden Datenpunkt wurden fünf Autokorrelationskurven mit einer definierten Messzeit von 60 s aufgenommen. Die numerische Anpassung der Autokorrelationskurven mit Gl. 3.2 lieferte dann die Konzentration der Partikel im effektiven Volumen. Die Standardabweichungen sind in den Graphen nur dann angegeben, wenn sie größer als die Symbole für die Datenpunkte sind. Die Messung der Autokorrelationskurven ist für geringe (acc.) Lipidkonzentrationen auf Grund der kleinen Zahl der Vesikel im effektiven Volumen mit einem größeren statistischen Fehler behaftet. So werden bei einer (acc.) Lipidkonzentration von 10^7 M (entsprechende Partikelkonzentration ist 2×10^{12} M, da unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm auf der Außenseite aus $\sim 5 \times 10^4$ Lipiden bestehen) weniger als 0.005 Vesikel im Fokusvolumen detektiert. Die numerische Anpassung der Datenpunkte in den Verdünnungskurven erfolgte mit Gl. 3.10. Im linearen Bereich lassen sich mit den FCS-Experimenten genaue Aussagen über die Konzentration der Partikel im Fokusvolumen machen. Im vorliegenden Fall kann für eine (acc.) Lipidkonzentration im Intervall von 5×10^7 M bis 10^3 M (was einer Vesikelkonzentration von 10^{11} M bis 10^8 M entspricht) und einer Peptidkonzentration von 5×10^1 M bis 10^6 M von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden.

Das Messen von höheren Partikelkonzentrationen ist prinzipiell möglich, würde jedoch eine Reduzierung der Laserleistung und/oder eine geringere Zahl von Fluorophoren pro Partikel erfordern, um im linearen Bereich und unterhalb der maximalen Zählrate des Photonendetektors zu bleiben. Für sehr niedrigere Konzentrationen muss die gemessene Zahl von Partikel im effektiven Volumen mit Gl. 3.9 korrigiert werden, da das unkorrelierte Rauschen des Hintergrunds im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Teilchen nicht mehr vernachlässigt werden kann. Die Verdünnungskurven von freiem Alexa (Abb. 4.7) und von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) zeigen eine gute Übereinstimmung des linearen Messbereichs. Die kovalente Bindung von Alexa an das Peptid hat also keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors.

In Abb. 4.8 sind FCS Messungen zur Bindung von 2 nM Alexa-markiertem MARCKS(151-175) mit unmarkierten PC/PS Vesikel (5:1) gezeigt. Die Graphen A-C geben dabei ein typisches Fluoreszenzsignal wieder, das für verschiedene Lipidkonzentrationen als Funktion der Zeit aufgenommen wurde. Die Zählrate ist durch die Zahl der Photonen definiert, die von der Photodiode pro Zeitintervall detektiert werden. Sie entspricht der Intensität aller fluoreszierenden Partikel, die in diesem Zeitintervall durch das Fokus-

volumen diffundiert sind. Das Analyseprogramm zeichnet die Zählrate während der Messung *online* auf. Daraus lassen sich erste Informationen über das System gewinnen oder erste Abweichungen vom erwarteten Verhalten erkennen. Die Aufnahmen der Zählrate erlauben die Auflösung einzelner Ereignisse, wenn das vom Programm vorgegebene Zeitintervall, in dem eine Summation über alle Photonen erfolgt, mit der mittleren Diffusionszeit des Partikels vergleichbar ist. Um die Diffusion einzelner Vesikel mit gebundenen Peptiden durch das Detektionsvolumen aufzulösen, wurden die Photonen über ein Zeitintervall von 6 ms (Binning) summiert. Graph A zeigt eine Aufnahme von 2 nM Alexa-MARCKS(151-175) mit einer Zählrate von ~ 510 kHz. Für diese geringe Konzentration ist die mittlere Zahl der Peptide im Fokusbereich ungefähr 0.38 ± 0.2 . Bei einer Diffusionszeit der Peptide von $70 \mu\text{s}$ kann im vorgegebenen Zeitintervall die Diffusion von einzelnen Peptiden nicht aufgelöst werden.

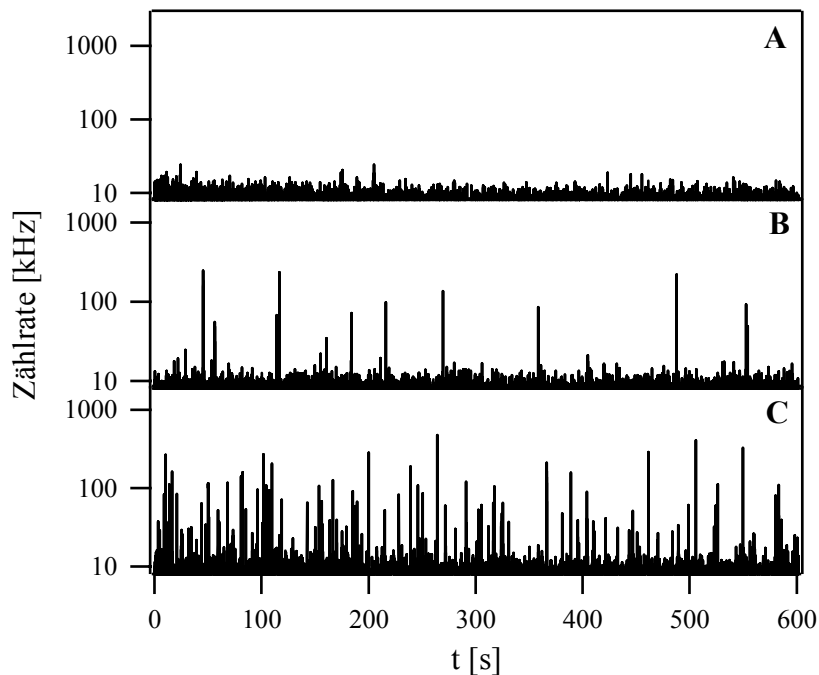


Abb. 4.8A-C: FCS Messungen zur Bindung von MARCKS(151-175) mit PC/PS-Vesikel (5:1). Es werden die Zählraten als Funktion der Zeit für MARCKS(151-175) mit verschiedenen Konzentrationen von Lipid dargestellt (A) Die Lösung enthält 2 nM Peptid und keine Vesikel. (B) Zugabe von 2×10^7 M Lipid zur Peptid-Lösung. In diesem Fall sind $\sim 15\%$ der Peptide an Vesikel gebunden. In der Aufzeichnung der Zählrate erscheinen Maxima mit unterschiedlichen Amplituden, die der Diffusion eines einzelnen Vesikels mit ~ 10 gebundenen Peptiden durch den Laserfokus entsprechen. (C) In der Lösung sind 2 nM Peptid und 10^6 M Lipid. Die Zahl der Maxima steigt signifikant an, da nun $\sim 57\%$ der Peptide an die Vesikel gebunden sind.

Nach der Zugabe von 2×10^7 M Lipid zur Peptid-Lösung sind $\sim 15\%$ der Peptide an die Vesikel gebunden (B). In der Aufnahme der Zählrate werden Maxima mit verschiedenen Amplituden beobachtet, die die Diffusion einzelner Vesikel mit ~ 10 gebundenen Peptiden durch den Laserfokus darstellen. Je länger die Diffusionszeit eines Peptid/Vesikel-Komplexes durch den Fokus ist und je mehr Peptide auf dem Vesikel gebunden haben, desto höher sind die gemessenen Amplituden der Maxima. Mit einer weiteren Erhöhung der Lipidkonzentration auf 10^6 M und einer Bindung von $\sim 57\%$ aller Peptide steigt die Zahl der Maxima nochmal deutlich an. Jedoch nimmt ihre mittlere Höhe auf Grund einer Umverteilung der gebundenen Peptide auf eine größere Zahl von Vesikel ab (C). Diese Experimente liefern ähnliche Resultate, wie sie bei FCS-Messungen zur Komplexation von DNA mit fluoreszenzmarkierten Polykationen (Clamme et al., 2003) oder von Mischungen von Fluorescein mit Fluorescein-beschichteten Kugeln gemessen wurden (Van Craenenbroeck und Engelborghs, 2000).

Die Bindung der Peptiden an die Vesikel führt zu signifikanten Änderungen in der Form der Autokorrelationskurven. In Abb. 4.9 sind die Kurven für die Experimente aufgetragen, bei denen (von unten nach oben) 0%, 15%, 57%, 74% und 90% der gesamten Peptide gebunden sind. Dabei stellt jede Autokorrelationskurve eine Mittelung über 5 Messungen mit einer Messzeit von einer Minute dar. Die unterste Autokorrelationskurve repräsentiert dabei die reine 2 nM Alexa-MARCKS(151-175)-Lösung. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde mit dem festgehaltenen Strukturparameter von $S = 5.2$ und dem Ein-Komponenten-Modell aus Gl. 3.2 vorgenommen. Für die mittlere Diffusionszeit eines freien Peptids hat sich ein Wert von $\tau_D = 66 \mu\text{s}$ ergeben. Binden Peptide an die Vesikel, dann lassen sich in den Autokorrelationskurven zwei charakteristische Diffusionszeiten erkennen. Die erste repräsentiert die freien Peptide und die zweite die Vesikel mit den gebundenen Peptiden. Der relative Anteil der beiden Populationen ist durch ihre Amplitude in der Autokorrelationskurve bestimmt. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte mit dem Zwei-Komponenten-Modell aus Gl. 3.5, bei dem die zuvor bestimmte Diffusionszeit der freien Peptide festgehalten wurde. Der Anteil der gebundenen Peptide kann dann mit den ermittelten Amplituden A_P und A_V berechnet werden (Gl. 3.14). Mit steigender Lipidkonzentration nimmt der Anteil der gebundenen Peptide immer mehr zu und die Amplitude der Peptid/Vesikel-Komplexe mit ihrer längeren Diffusionszeit dominiert in den Autokorrelationskurven. Da viele Peptide auf einem Vesikel binden, nimmt die gesamte Zahl der fluoreszierenden Partikel in der Lösung ab. Dies ist an der zunehmenden Amplitude $G(0)$ der Autokorrelationskurven zu erkennen, die zur Partikelkonzentration im Fokusbereich indirekt proportional ist. Ab einer Lipidkonzentration von 4×10^6 M und einer Bindung von $\sim 90\%$ aller Peptide nehmen die Amplituden $G(0)$ jedoch wieder ab (Kurven nicht dargestellt). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die

gebundenen Peptide auf eine immer größere Anzahl von Vesikel homogen verteilen. Während also mit zunehmender Lipidkonzentration die Zahl der gebundenen Peptide kontinuierlich ansteigt, nimmt im Gegensatz dazu die Zahl der gebundenen Peptide pro Vesikel ab.

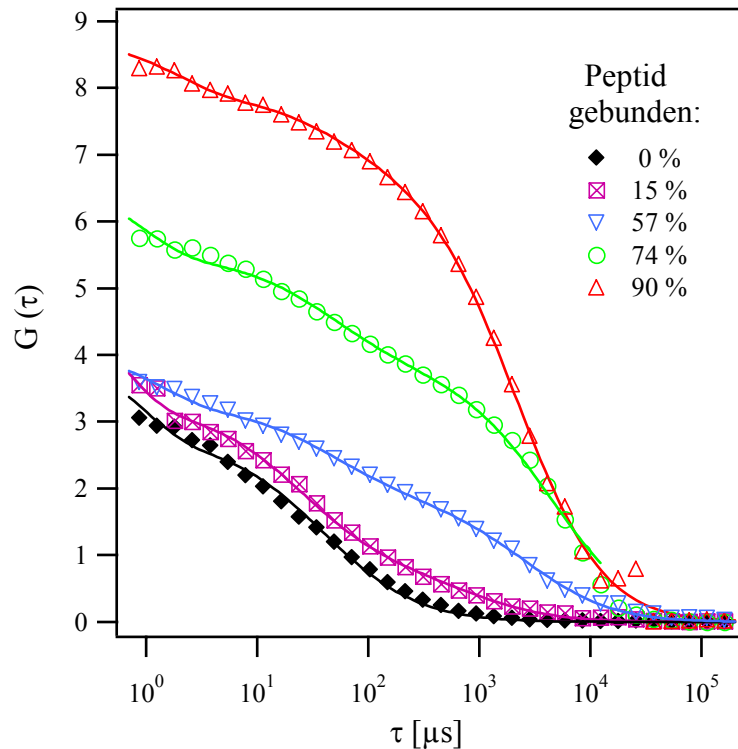


Abb. 4.9: Effekt der Lipidkonzentration (PC/PS Vesikel (5:1)) auf die Autokorrelationskurven einer 2 nM Alexa-MARCKS(151-175) Lösung. Die Kurven (von unten nach oben) sind für die Lipidkonzentrationen von 0 M, 2×10^7 M, 1×10^6 M, 2×10^6 M und 4×10^6 M dargestellt und entsprechen 0%, 15%, 57%, 74% und 90% gebundenem Peptid. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte mit dem Zwei-Komponenten-Modell (Gl. 3.5).

Eine genaue Bestimmung der mittleren Zahl der gebundenen Peptide pro Vesikel α war unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht möglich. Die Berechnung von α wurde aus den Amplituden A_P und A_V der Autokorrelationskurven mit Gl. 3.11 vorgenommen. Die Zahl der gebundenen Peptide pro Vesikel lag jedoch deutlich unter den erwarteten Werten. Der Grund für diese Diskrepanz ist auf das geringe Signal/Rausch-Verhältnis bei der Detektion der Vesikel für geringe Lipidkonzentrationen zurückzuführen. Nach den Aussagen im Zusammenhang mit Abb. 4.7 kann die Zahl der Vesikel im Fokusbereich für Lipidkonzentrationen unter 5×10^7 M nicht genau bestimmt werden. Dies entspricht bei einem Durchmesser von 100 nm einer Vesikelkonzentration von 10^{11} M. In diesem Fall befinden sich im Mittel nur noch ~ 0.001 Vesikel im effektiven Fokusbereich. Darüber hinaus kann die gegenseitige Fluoreszenzlöschung der gebundenen Peptide eine

weitere Ursache für die zu geringen \square -Werte sein (Clamme et al., 2003). Je kürzer der mittlere Abstand zwischen den gebundenen Peptiden auf einem Vesikel ist, desto höher ist im allgemeinen die Fluoreszenzlöschung. Unter den vorliegenden Bedingungen spielt dieser Effekt jedoch keine signifikante Rolle. Aus diesem Grund wurde der Anteil des gebundenen Peptids nach Gl. 3.14 aus der Amplitude des freien Peptids A_P und der gesamten Zahl an Peptiden N_0 berechnet. Beide Parameter lassen sich durch Messungen der Autokorrelationsfunktion genau bestimmen. Abb. 4.10 zeigt die Bindung von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) an PC/PS-Vesikel mit einem Anteil von 4.8 (○), 9.1 (▽), 12.5 (×), 14.3 (△), 16.7 (□), 20 (◇), 25 (+) Mol % PS. Es ist der prozentuale Anteil des gebundenen Peptids als Funktion der Lipidkonzentration angegeben. Die berechnete Standardabweichung hatte für alle Messpunkte einen annähernd konstanten Wert von ~3% des gesamten Peptids. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Standardabweichung nicht dargestellt. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde mit Gl. 3.12 vorgenommen. Die Bindung der Peptide an die Vesikel ist umso stärker, je höher der Anteil der anionischen Lipide und damit die attraktive elektrostatische Wechselwirkung ist.

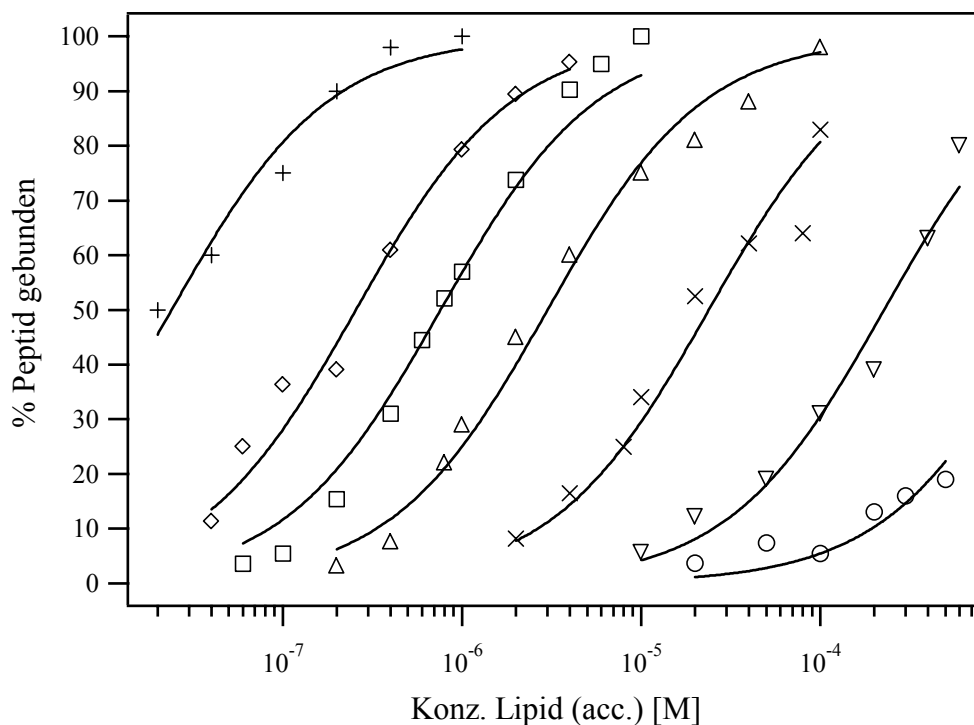


Abb. 4.10: Messungen zur Bindung von 2 nM MARCKS(151-175) an PC/PS-Vesikel mit einem Anteil von 4.8 (○), 9.1 (▽), 12.5 (×), 14,3 (△), 16.7 (□), 20 (◇), 25 (+) Mol % PS. Der prozentuale Anteil der gebundenen Peptide ist als Funktion der Lipidkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden aus den gemessenen Autokorrelationskurven analog wie in Abb. 4.9 ermittelt und die Bindungskonstante durch die numerische Anpassung mit Gl. 3.12 berechnet.

Darüber hinaus wurden die Experimente auch mit einer höheren Konzentration von 10 nM MARCKS(151-175) durchgeführt. In Abb. 4.11 sind die ermittelten Bindungskonstanten für 2 nM (○) und 10 nM Peptid (△) in Abhängigkeit von Mol % PS aufgetragen. Die Bindungskonstanten liegen in logarithmischer Darstellung auf einer Geraden und stimmen für beide Peptidkonzentrationen sehr gut überein. Aus dem exponentiellen Zusammenhang zwischen der Bindungskonstante und dem Anteil an anionischen Lipiden folgt, dass die Peptide als Monomere auf der Membran adsorbieren und es bei der Bindung der Peptide zu keiner signifikanten Änderung der Oberflächenladung der Vesikel gekommen ist. Würde das Oberflächenpotential der Vesikel durch die gebundenen Peptide abnehmen, dann würde dies zu einer Abschwächung der attraktiven elektrostatischen Wechselwirkung und damit zu niedrigeren Bindungskonstanten führen. Die Resultate lassen sich mit einem theoretischen Modell beschreiben (Arbuzova et al., 2000), das auf der Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung unter der Voraussetzung basiert, dass es bei der Bindung des Peptids zu keiner Umverteilung der einfach negativ geladenen Lipide in der Membran kommt.

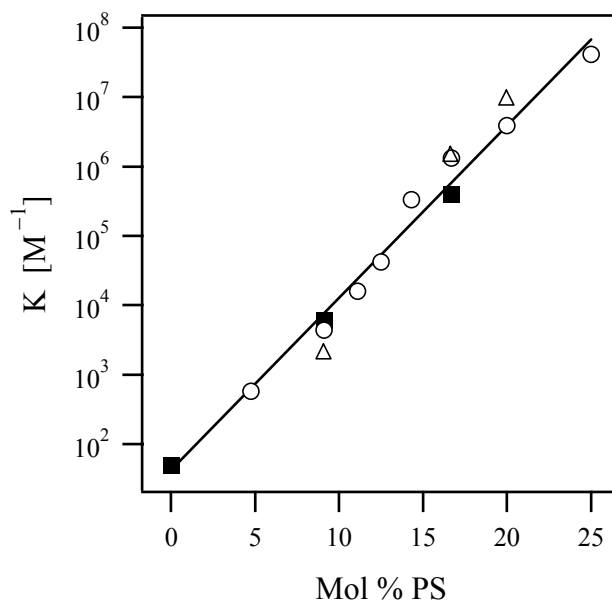


Abb. 4.11: Bindungskonstante in Abhängigkeit von Mol % PS für 2 nM (○) und 10 nM (△) Peptid (Standardabweichungen sind kleiner als die Symbole der Datenpunkte). Zum Vergleich sind auch die mit der Methode der Zentrifugation bestimmten Bindungskonstanten von 2 nM radioaktiv markiertem NEM-MARCKS(151-175) eingezeichnet (■, (Arbuzova et al., 2000)).

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich der Messungen zur Peptid/Vesikel-Bindung mit Hilfe von FCS mit den etablierten konventionellen Methoden. Die Symbole (■) in Abb. 4.11 stellen die aus der Literatur bekannten Datenpunkte der Bindung von radioaktiv markiertem MARCKS(151-175) an PC/PS-Vesikel gemessen mit Zentrifugation

dar (Arbuzova et al., 2000). Die Daten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den FCS-Messungen und demonstrieren, dass mit FCS sehr präzise Messungen zur Bindung von Peptiden an Phospholipidvesikel möglich sind.

In Abb. 4.12 sind Messungen zur Bindung von Alexa-markiertem MARCKS(151-175) mit Vesikel dargestellt, die aus den neutralen Lipiden POPC und dem mehrfach negativ geladenen PIP₂-Lipiden bestehen. Diese Experimente wurden für eine Peptidkonzentration von 2 nM und PC/PIP₂-Vesikel mit 0.5 (△) und 1.0 (□) Mol % durchgeführt. Es ist der prozentuale Anteil der gebundenen Peptide als Funktion der Lipidkonzentration aufgetragen. Die Kurven sind die numerischen Anpassungen von Gl. 3.12 an die gemessenen Datenpunkte.

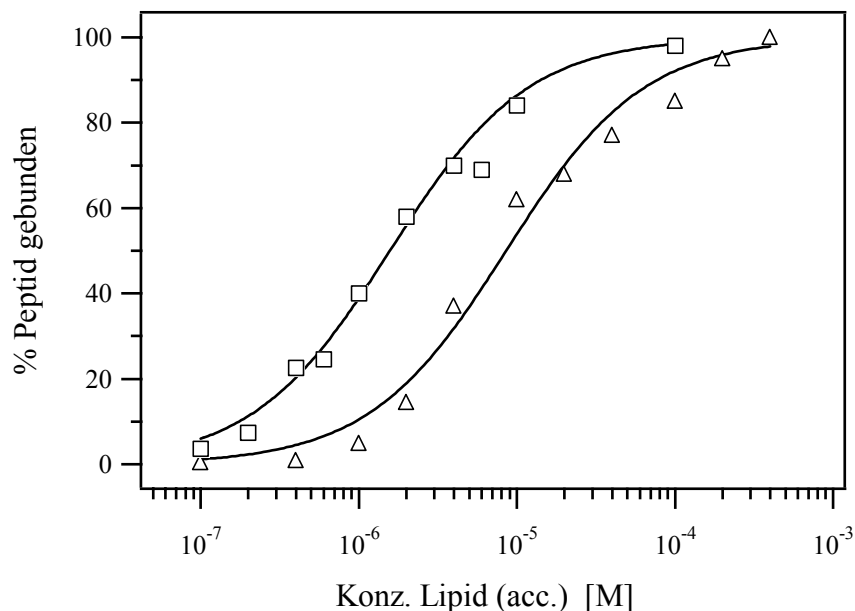


Abb. 4.12: Messungen zur Bindung von 2 nM MARCKS(151-175) an PC/PIP₂-Vesikel mit einem Anteil von 0.5 (△) und 1 (□) Mol % PIP₂. Die Datenpunkte wurden aus den gemessenen Autokorrelationskurven analog wie in Abb. 4.9 ermittelt und die Bindungskonstante durch die numerische Anpassung mit Gl. 4.12 berechnet.

Abb. 4.13 zeigt die mit FCS bestimmten Bindungskonstanten in Abhängigkeit von Mol % PIP₂ für eine Peptidkonzentration von 2 nM (○) und 10 nM (△). Zum Vergleich wurden im Graph auch noch die mit der Methode der Zentrifugation bestimmten Bindungskonstanten für 2 nM radioaktiv markierten MARCKS(151-175) (▲ und ■) eingetragen. Unter Berücksichtigung der komplizierten Präparation von PC/PIP₂-Vesikel stimmen die FCS-Messungen für 2 nM Peptid (○) mit den unabhängigen Experimenten der Zentrifugation (▲ und ■) relativ gut überein. Probleme bei der Präparation der Vesikel ergeben sich speziell durch die geringere Löslichkeit in Chloroform und die geringere thermo-

dynamische Stabilität von PIP₂ im Vergleich zu POPC. Des weiteren kann PIP₂ während der Extrusion sehr leicht am Polycarbonat-Filter adsorbieren und damit aus der Lösung verloren gehen. Aus diesem Grund werden die Vorteile und der Nutzen von FCS durch die Bindungsexperimente von MARCKS(151-175) an die relativ einfach zu präparierenden PC/PS-Vesikel (Abb. 4.10) am besten deutlich.

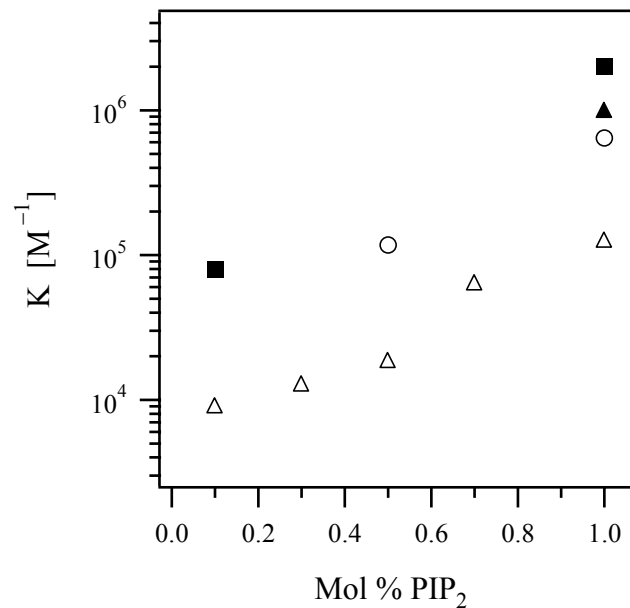


Abb. 4.13: Die Bindungskonstanten sind als Funktion von Mol % PIP₂ für eine Peptidkonzentration von 2 nM (○, folgen aus den Kurven in A), und 10 nM (△) aufgetragen. Die Standardabweichungen sind kleiner als die Symbole der Datenpunkte sind. Zum Vergleich sind auch die mit der Methode der Zentrifugation bestimmten Bindungskonstanten von 2 nM radioaktiv markiertem MARCKS(151-175) eingezeichnet (▲, (Arbuzova et al., 2000); ■, (Wang et al., 2001)).

Bei einer Peptidkonzentration von 10 nM wurde mit FCS eine schwächere Bindung (△) gemessen. Dieser Effekt wurde auch im Zusammenhang mit den Zentrifugationsmessungen beobachtet. Die Bindungskonstante nimmt mit höheren Peptidkonzentrationen ab, da mit einer steigenden Zahl von gebundenen Peptiden die Konzentration der freien PIP₂-Lipide in der Membran immer kleiner wird. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass ~3 PIP₂-Moleküle an einen Ort der Membran zusammentreffen müssen, um eine Bindungsstelle für ein Peptid zu bilden (Rauch et al., 2002; Wang et al., 2002). Die Bindungskonstante von MARCKS(151-175) und anderen basischen Peptiden an unilamellare Vesikel mit 1% PIP₂ ist mit der für 15% PS vergleichbar (Wang et al., 2002). In beiden Fällen ist die Bindung auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen und von der Konzentration der ungebundenen also der in der Membran frei diffundierenden negativ geladenen Lipiden

abhängig. Wie aus Abb. 4.13 hervorgeht, können starke Bindungen nur für sehr geringe Peptidkonzentrationen im nanomolaren Bereich gemessen werden. Ist die eingesetzte Konzentration zu hoch, dann binden viele Peptide an die Oberfläche der Vesikel und verändern damit die elektrischen Eigenschaften der Membran. Dies führt zu einer Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkung und resultiert in einer geringeren Bindungskonstante. Experimente mit einer nanomolaren Peptidkonzentration sind mit konventionellen Methoden wie der radioaktiven Markierung der Peptide sehr kompliziert und für die Techniken NMR, ITC, Spin- und Fluoreszenzmarkierung fast unmöglich. Im Kontrast dazu stellt FCS im Konzentrationsbereich von ~ 10 nM Peptid die ideale Methode zur Messung der Bindung dar.

4.4 Diskussion

Mit FCS wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von MARCKS(151-175) an PC/PS-Vesikel gemessen und die Ergebnisse mit denen aus der Literatur verglichen, die sich aus verschiedenen konventionellen Techniken ergaben (Abb. 4.11). Die basische Effektor-Domäne von MARCKS wurde für diese Experimente aus zwei Gründen eingesetzt: (i) die Bindung von MARCKS(151-175) wurde schon mit Zentrifugation, Fluoreszenz, elektro-phoretischer Mobilität und EPR untersucht und (ii) die Struktur des Peptids und seine Konformation auf der Membran sind genau bekannt. So folgt aus EPR-Messungen von Spin-markierten Peptiden, MAS NMR, zirkularer Dichroismus und den Experimenten zur Penetration an Monolagen, dass das membrangebundene Peptid keine helikale, sondern eine ausgestreckte Konformation hat. Die fünf aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin) des Peptids dringen in die Alkylketten-Region der Membran ein (Ellena et al., 2003; Qin und Cafiso, 1996; Victor et al., 1999; Wang et al., 2001; Zhang et al., 2003). Die Messungen der Bindungskonstanten mit FCS zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit denen der Zentrifugation. Die dargestellten Experimente demonstrieren, dass es mit Hilfe von FCS möglich ist, die Bindung/Wechselwirkung von Proteinen und Peptiden an Vesikel zu messen. In einem nächsten Schritt könnte die Bindung von Proteinen mit einer komplizierteren Struktur systematisch untersucht werden.

Im folgenden soll kurz auf die Vorteile von FCS bei der Bindung von Peptiden an Vesikel eingegangen werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, lassen sich mit FCS einfache und reproduzierbare Messungen für Peptidkonzentrationen im nanomolaren Bereich machen. Dies ist mit den konventionellen Methoden wie der Gleichgewichtsdialyse, Zentrifugation oder Filtration nur sehr schwer möglich. Die Gründe dafür liegen in der irreversiblen Adsorption von Peptiden und Lipiden an den Wänden von Pipetten und Behältern. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen etablierten Methoden zur Messung von Peptid/Lipid-Wechselwirkungen wurden erst kürzlich von Simon und McIntosh (2002) beschrieben. Im Gegensatz dazu ermöglicht FCS die direkte Messung der Peptidkonzentration in der Lösung. Damit können entstandene Verluste von Peptid an den Wänden der Probenkammer noch während des Experiments detektiert werden. Des weiteren lassen sich die Messungen sehr schnell durchführen, und sie erfordern nur geringe Mengen an Protein. Letzteres stellt einen wichtigen Faktor dar, wenn die Präparation der Proteine oder deren Markierung mit Fluorophoren sehr aufwendig und damit sehr kostspielig ist. Ein weiterer Vorteil von FCS ist die simultane Messung von vielen Parametern in einem relativ kleinen Volumenelement. So können aus den Autokorrelationskurven neben der Partikelkonzentration und den Diffusionskonstanten auch dynamische oder photo-

physikalische Parameter bestimmt werden, die in den folgenden kürzlich erschienenen Arbeiten detailliert beschrieben werden (Hess et al., 2002; Krichevsky und Bonnet, 2002; Schwille und Haustein, 2002; Thompson et al., 2002).

Einschränkungen in der Anwendung von FCS ergeben sich nur bei der Messung von sehr schwachen Peptid/Membran-Wechselwirkungen. In diesem Fall ist die Lebensdauer des gebundenen Peptids auf der Lipidmembran kürzer als die Diffusionszeit des Vesikels durch das effektive Fokusbildungsvolumen. Dies trifft unter der Voraussetzung einer diffusionslimitierten Bindung von MARCKS(151-175) allerdings nur für Bindungskonstanten kleiner als 10^3 M^{-1} zu. Für diesen Bereich können jedoch andere Methoden wie die der Zentrifugation oder der Gleichgewichtsdialyse eingesetzt werden.

5 Aggregation und Transport von synthetischen Gentransfer-Komplexen

5.1 Einführung

In den letzten Jahren wurden viele Anstrengungen unternommen, um die Effizienz des Gentransfers bei der Behandlung der Mukoviszidose zu verbessern (Gill et al., 1997; Rosenecker, 1998; Rosenfeld et al., 1992; Zabner et al., 1993). Es handelt sich bei dieser Krankheit um eine der häufigsten genetisch bedingten Störungen im Metabolismus einer Zelle, deren Ursache die Defizienz des Regulationsproteins CFTR² in der Plasmamembran ist. Die Patienten leiden an einer lebensbedrohlichen Verschleimung der Lunge. Mit der Klonierung des CFTR-Gens besteht nun die Möglichkeit der somatischen Gentherapie (Caplen et al., 1994). Die Transfektionseffizienz der synthetischen Gentransfer-Komplexe ist jedoch so gering, dass eine klinische Anwendung noch keinen großen therapeutischen Nutzen hat.

Ein Grund dafür liegt in der natürlichen Aufgabe des respiratorischen Trakts, inhalierte Partikel aus der Lunge zu entfernen. Daneben existieren noch weitere physikalische und biologische Barrieren, die zur Inaktivierung oder Dekomposition der therapeutischen Vektoren beim somatischen Gentransfer führen. In Abb. 5.1 ist ein schematischer Querschnitt durch das Lungenepithelium dargestellt. Die erste Barriere für die therapeutischen Genvektoren ist das Lungen-Surfactant, das eine wichtige Rolle beim Atemzyklus spielt, da es die Oberflächenspannung reduziert und damit das Kollabieren der Alveolen verhindert. Dann treffen die Gentransfer-Komplexe auf die Mucus- und die Solschicht mit den Zilien, die durch koordiniertes Schlagen für die Reinigung des respiratorischen Trakts verantwortlich sind. Hat ein Gentransfer-Komplex diese Barrieren überwunden, so kann er durch Endozytose von der Zielzelle aufgenommen werden, bevor endosomolytische Prozesse den Übergang des Gentransfer-Komplexes ins Zytoplasma ermöglichen. Nach der Dissoziation des Komplexes kann die freigesetzte DNA durch die Kernporen in den Nukleus gelangen.

² CFTR (engl.): Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein.

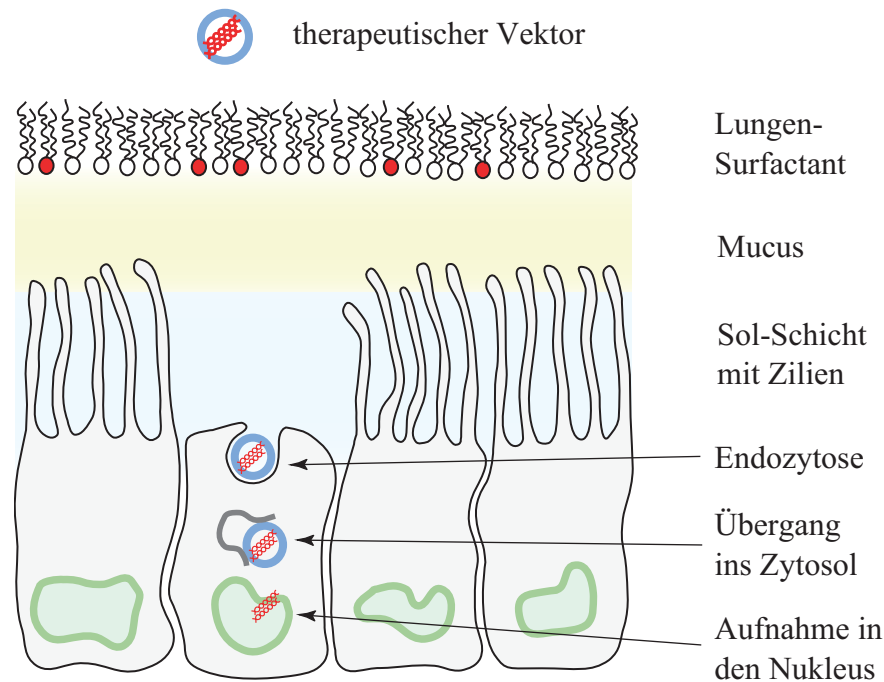


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Lungenepitheliums mit den verschiedenen Stadien des somatischen Gentransfers. Die therapeutischen Genvektoren müssen viele Barrieren überwinden, um das Zytoplasma der Zelle zu erreichen. Nach der Dissoziation des Komplexes kann die freigesetzte DNA durch die Kernporen in den Nukleus gelangen.

Die Wechselwirkung von synthetischen Gentransfer-Komplexen mit einem natürlichen Surfactant aus Rinderlungen (Alveofact) wurde schon in verschiedenen Arbeiten untersucht. So zeigten *in vitro* Experimente an pulmonalen Epithelzellen, dass Alveofact den liposomalen Gentransfer inhibiert (Duncan et al., 1997), während dies für den polymerbasierten Gentransfer nicht der Fall war (Ernst et al., 1999). Zum gleichen Resultat kamen auch *in vivo* Transfektionsexperimente an Lungengewebe mit Polyplexen (Rudolph et al., 2000). Aus diesem Grund sind die polymerbasierten Gentransfer-Komplexe bei der Behandlung der Mukoviszidose von besonderem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei Methoden beschrieben, mit denen es möglich ist, die Größenverteilung und die Kinetik der kolloidalen Aggregation von Gentransfer-Komplexen systematisch zu untersuchen. Die quantitative Fluoreszenzmikroskopie ist in Kombination mit digitaler Bildverarbeitung eine geeignete Methode, um genaue Größen- und Intensitätsverteilungen zu bestimmen und daraus die Zahl der Plasmide pro Komplex zu berechnen (Galneder, 2001). Mit dieser Technik lassen sich auch extrem polydisperse kolloidale Systeme unter physiologischen Bedingungen studieren. Weitere Vorteile sind die einfache Anwendung und die geringen Mengen an benötigtem Probenmaterial. Mit FCS wurde die Kinetik der kolloidalen Aggregation und die Wechselwirkung der Gen-

transfer-Komplexe mit Alveofact gemessen. Des weiteren wurden erste Untersuchungen zur Diffusion von Gentransfer-Komplexen in Polymernetzwerken (Mucus) unternommen.

5.2 Material und Präparation

5.2.1 Desoxyribonukleinsäure

Es handelt sich bei der Desoxyribonukleinsäure (DNA) um ein lineares anionisches Polymer, das für die Kodierung der genetischen Information in einer Zelle verantwortlich ist. Die monomeren Bausteine der DNA sind die sogenannten Nukleotide, die aus einer organischen Base, einem Zucker-Molekül (Desoxyribose) und mindestens einer Phosphatgruppe bestehen. Im allgemeinen lassen sich vier verschiedene organische Basen unterscheiden, die mit Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G) bezeichnet werden. Die Nukleotide sind über Phosphodiester-Bindungen kovalent zu einem linearen Polymer verbunden (Primärstruktur). Im Fall der DNA bilden zwei komplementäre Polynukleotid-Sequenzen durch Basenpaarung einen gewundenen Doppelstrang, der im allgemeinen eine rechtsdrehende Helix darstellt (Sekundärstruktur). Prinzipiell können nur Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin über Wasserstoffbrückenbindungen eine Basenpaarung eingehen. Da die Phosphatgruppen der DNA in wässrigen Lösungen bei einem neutralen pH-Wert dissoziieren, tragen die Basenpaare eine zweifach negative Ladung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für ein Basenpaar (bp) ein mittleres Molekulargewicht von $M_r = 660$ angenommen. Die quantitative Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit den speziellen Plasmiden pEGFP von Clontech (Palo Alto, CA, USA), die aus einer definierten Sequenz von Nukleotiden mit einer Länge von 4.7 kbp bestehen. Diese Plasmide wurden auch schon in früheren Untersuchungen zur Transfektionseffizienz von Gentransfer-Vektoren an humanen Epithelzellen der Lunge eingesetzt (Rusu, 1999). Plasmide sind zirkuläre DNA-Moleküle, die im Nukleus einer Zelle in verschiedenen Konformationen und Längen vorkommen. Das Plasmid pEGFP kodiert ein grün fluoreszierendes Protein³, das die Ribosomen im Zytoplasma nach der Transkription synthetisieren. Im allgemeinen ist die Lagerung der DNA in wässrigen Lösungen mit 10 mM TRIS, 500 μ M EDTA und pH 8 bei einer Temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ über einen längeren Zeitraum möglich.

³ Green Fluorescent Protein (GFP).

5.2.2 Reagenzien zur DNA-Kondensation

Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin ist ein kationisches Polymer mit einer linearen molekularen Struktur, das in der somatischen Gentherapie zur Kondensation von DNA eingesetzt werden kann. Das Monomer des Makromoleküls ist die Aminosäure Lysin mit ihrer hydrophilen und positiv geladenen Seitenkette. Die Aminosäuren werden bei der Synthese des Makromoleküls über Peptidbindungen zu einem linearen Polymer verbunden. Abb. 5.2 zeigt die chemische Struktur von Poly-L-Lysin in wässriger Lösung unter neutralen Bedingungen. In diesem Fall liegen die primären Amine der Seitenketten hauptsächlich im protonierten Zustand vor ($pK = 10.2$). Des Weiteren hat Lysin in Relation zu allen anderen Aminosäuren eine der längsten Seitenketten (Tang, 1997). Die beiden Spiegelbilder der Aminosäuren werden auf Grund der Chiralität als L- und D-Isomere bezeichnet. Da Proteine generell nur aus den L-Isomeren der Aminosäuren bestehen, wird im folgenden auf das Symbol des Isomers im Namen des Polymers verzichtet (Stryer, 1995). In den Experimenten zur quantitativen Fluoreszenzmikroskopie wurde Polylysin-Hydrobromid mit einem Molekulargewicht von maximal 10^4 kD verwendet (Fluka, Deisenhofen). Dies entspricht unter Berücksichtigung des Molekulargewichts für Lysin von $M_r = 209$ einem Polymer mit ~ 50 Monomeren.

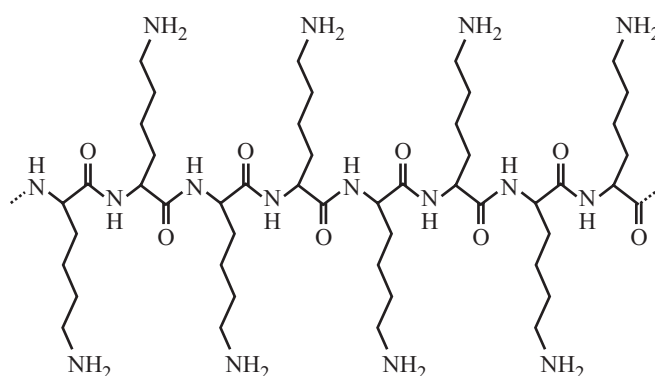


Abb. 5.2: Chemische Struktur von Polylysin. Unter neutralen Pufferbedingungen liegen die meisten primären Amine in protonierter Form vor.

Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) ist ein kationisches Polymer, das in einer linearen oder verzweigten Form existiert (Wightman et al., 2001). Die Grundeinheit des Polymer-Rückgrats besteht aus zwei Kohlenstoff-Atomen mit einem nachfolgenden Stickstoff-Atom. In den folgenden Experimenten wurde zur DNA-Kondensation nur verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 25 kD (Aldrich, München) eingesetzt. Die Synthese der verzweigten Moleküle erfolgt im allgemeinen durch die kationische Polymerisation von Aziridin-Monomeren. Es bilden sich hochverzweigte Makromoleküle, die im Gegensatz zu den Dendrimeren kein definiertes Symmetriezentrum haben. Da jedes dritte Molekül des Polymer-Rückgrats ein Stickstoff-Atom ist, besitzt PEI eine hohe Zahl an protonierbaren Aminen. Im Fall von verzweigten PEI-Molekülen handelt es sich dabei um primäre, sekundäre und tertiäre Amine (Abb. 5.3A). Die Protonierung der primären Amine findet vorwiegend unter neutralen pH-Bedingungen statt. Auf Grund der hohen Zahl an protonierbaren Aminen ist PEI das organische Makromolekül mit der höchsten kationischen Ladungsdichte (Boussif et al., 1995). Das Polymer zeichnet sich durch seine hohe Pufferkapazität von H^+ -Ionen aus und ist über einen weiten pH-Bereich positiv geladen (Godbey et al., 1999).

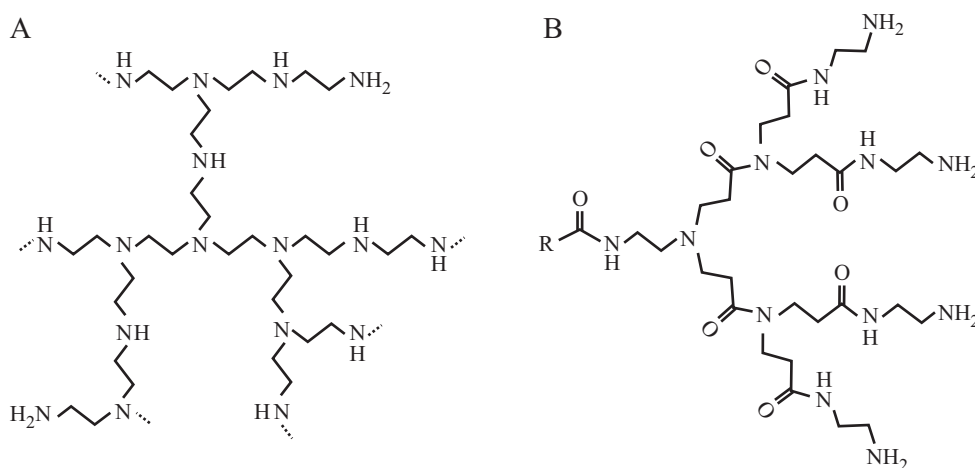


Abb. 5.3: Chemische Struktur von Polyethylenimin (A) und Dendrimeren (B).

Dendrimere

Dendrimere⁴ sind sphärische kationische Polyamidoamin-Polymere (PAMAM), die eine radialsymmetrische baumartig verzweigte Struktur haben. Die Verzweigungen beginnen an einem definierten Kern-Molekül im Zentrum und enden mit primären Aminen an der Oberfläche des Polymers, die unter neutralen Pufferbedingungen vorwiegend protoniert sind (Abb. 5.3B). Im Unterschied zu den Enden des Polymers liegen die Stickstoff-Atome im Inneren des Moleküls als tertiäre Amine vor. Die Dendrimere werden im allgemeinen durch Polymerisation der Monomere Methylacrylat und Ethylendiamin schichtweise von innen nach außen synthetisiert. Sie gehören mit ihren Derivaten zu den effizientesten Systemen der polymerbasierten Transfektion und zeichnen sich durch ihre geringe Toxizität aus (Tang et al., 1996). Für die folgenden Experimente wurde eine kommerzielle Präparation aus Dendrimeren, Superfect (Qiagen, Hilden), verwendet. Bei diesem Reagenz handelt es sich um spezielle aktivierte Dendrimere, die einer thermischen Behandlung unterzogen wurden. Dadurch kann die Zahl der Verzweigungen des Polymers deutlich reduziert und damit höhere Effizienzen bei der Transfektion von Zellen erzielt werden (Tang, 1997).

Lipofectamine

Lipofectamine (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) ist eine 3:1 (w/w) Mischung des polykationischen Lipids 2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(spermincarboxyamido) ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanammonium-trifluoroacetat (DOSPA) und dem neutralen Lipid 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE). DOSPA hat zwei identische einfach ungesättigte Alkylketten bestehend aus 18 Kohlenstoffatomen und eine Kopfgruppe mit 6 verschiedenen Aminogruppen, von denen unter den experimentellen Pufferbedingungen 5 positiv geladen (protoniert) sind. Die chemische Struktur von DOPE besitzt eine zwitterionische Kopfgruppe und zwei ungesättigte Oleoyl-Ketten mit 16 Kohlenstoffatomen. Das verwendete Transfektionsreagenz Lipofectamine wird als Suspension in einer deionisierten wässrigen Lösung geliefert.

⁴ von *dendron*: griechisch für Baum.

5.2.3 Mucin

Mucine sind makromolekulare, polydisperse, negativ geladene Glykoproteine, deren Untereinheiten (Monomere mit 2000-3000 kDa) über intramolekulare Disulfid-Bindungen zu linearen Polymerketten verbunden sind (Abb. 5.4). Sie stellen zusammen mit Proteinen den Hauptbestandteil des Mucus dar und werden aus den Speicheldrüsen von Rindern gewonnen (Fluka, Neu-Ulm). Im Mittel setzt sich das Makromolekül aus 4 bis 5 Untereinheiten zusammen. Charakteristisch ist der variierende, hohe Anteil an Oligosacchariden, der bis zu 80% der gesamten Molekülmasse betragen kann. Mucine bestehen aus alternierenden Oligosaccharid-reichen und -freien Regionen. Letztere sind gefaltete Bereiche des Protein-Rückgrats mit einem hohen Cystein-Anteil, der über Disulfid-Bindungen stabilisiert wird. Die Oligosaccharide sind über die O-glykosidische Bindung hauptsächlich an die Aminosäuren Serin und Threonin gebunden. Repetitive Einheiten aus Serin-Threonin-Prolin (STP) bilden einen großen Teil des Protein-Rückgrats. Die negative Ladung der Oligosaccharid-Seitenketten ist auf die posttranslatorische Addition von Sialinsäure und Sulfat-Gruppen im Endoplasmatischen Retikulum sowie Golgi Apparat zurückzuführen (Sanders et al., 2000).

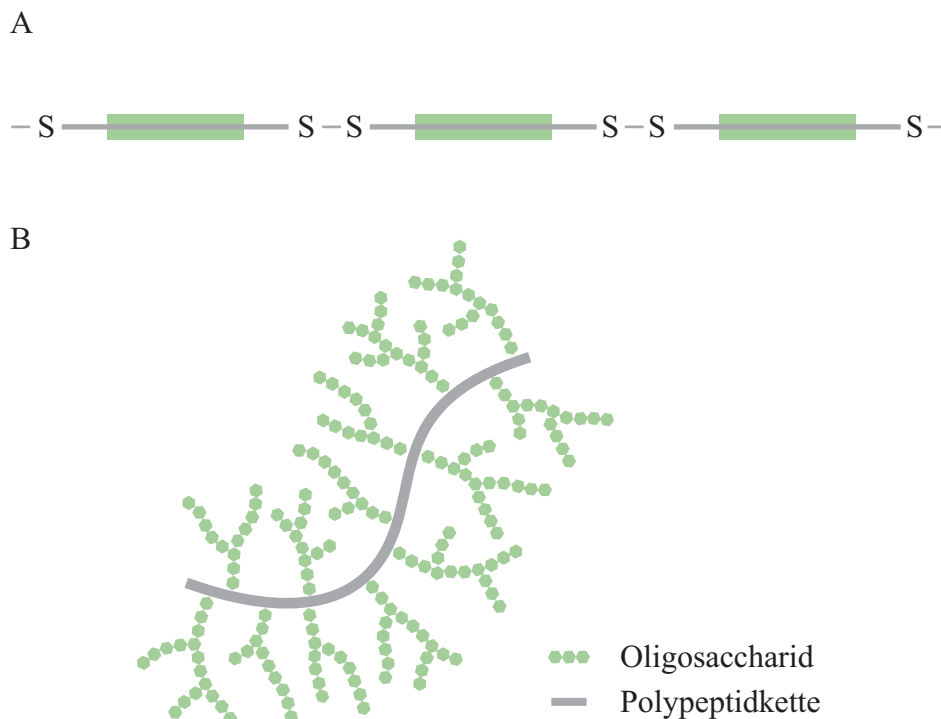


Abb. 5.4: (A) Schematische Darstellung der Struktur eines Mucin Glykoproteins. Die Monomere sind über Disulfid-Bindungen zu einer linearen Polymerkette verbunden und bestehen aus alternierenden Oligosaccharid-reichen und -freien Regionen. (B) Oligosaccharid-reiche Region eines Mucin Glykoproteins.

5.2.4 Alveofact

Alveofact (Boehringer, Ingelheim) ist ein natürliches Surfactant aus Rinderlungen, das in der Medizin zur Behandlung des neonatalen Atemnot-Syndroms eingesetzt wird. Das Surfactant besteht aus verschiedenen Lipiden (90%), Proteinen (8%) und Kohlenhydraten (~2%). Dabei setzen sich die Lipide hauptsächlich aus dem zwitterionischen Phosphatidylcholin (80%) und dem negativ geladenen Phosphatidylglycerol (12%) zusammen. Bei den Surfactant-Proteinen (SP) sind die Formen A, B, C und D bekannt, die sich in der räumlichen Struktur, den chemischen Eigenschaften und der physiologischen Funktion unterscheiden. SP-A initiiert bei der Kontraktion der Alveolen die Bildung von lamellaren Strukturen im Surfactant. Sie stellen ein extrazelluläres Reservoir von Surfactant in den Alveolen dar. Im Unterschied dazu reduzieren SP-B und SP-C die Oberflächenspannung, indem sie die lamellaren Strukturen des Surfactants bei der Expansion der Alveolen auflösen. Damit kann sich das Surfactant an die variierende Oberfläche der Alveolen beim Ein- und Ausatmen anpassen. Nach der Präparation von Alveofact sind nur noch die hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C in der Suspension enthalten. Das Produkt kann in Form eines Pulvers oder in Lösung mit einem mittleren Molekulargewicht von $M_r = 760$ bezogen werden (Boehringer, 1998).

5.2.5 TOTO

Die Farbstoffe der TOTO-Serie sind positiv geladene, symmetrische Cyanin Dimere. Die delokalisierten π -Elektronen in den konjugierten Doppelbindungen sind für die Fluoreszenz von TOTO verantwortlich (Lakowicz, 1983). Die verschiedenen Derivate der Cyanin Dimere haben eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren und interkalieren in die Doppelhelix der DNA. In den folgenden Experimenten wurde zur Markierung der DNA der Farbstoff TOTO-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) verwendet. Das Absorptions- und Emissionsspektrum von interkalierten TOTO-1 Molekülen ist in Abb 5.5 dargestellt. Die Spektren wurden mit einem konventionellen Spektrometer unter den experimentellen Pufferbedingungen (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM Ascorbinsäure, pH 7) gemessen. Die Maxima der Absorption und Emission liegen bei $\lambda_{\text{abs}} = 514$ nm bzw. $\lambda_{\text{em}} = 533$ nm.

Die Interkalation von TOTO in die Doppelhelix der DNA ist mit einer drastischen Zunahme der Fluoreszenzintensität verbunden. Der Effekt ist darauf zurückzuführen, dass die Rotation bestimmter chemischer Gruppen der Cyanin-Dimere durch die Interkalation in

die DNA eingeschränkt ist (Spielmann, 1995). Die Fluoreszenz von TOTO nimmt unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen mindestens um den Faktor 100 zu (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund spielt in den Experimenten die Fluoreszenz der ungebundenen Fluorophore in der Lösung keine Rolle. Des Weiteren ist in Abb. 5.5 die 3-dimensionale NMR-Struktur eines DNA/TOTO-Komplexes illustriert. Die symmetrischen Cyanin Dimere von TOTO ordnen sich dabei parallel zu den Basenpaaren an. Die DNA kann mit maximal einem Fluorophor pro fünf Basenpaaren (bp) markiert werden. Das Mischen des Farbstoffs mit der DNA erfolgte immer in verdünnten deionisierten wässrigen Lösungen im Volumenverhältnis von 1:1. Um den Prozess der Interkalation zu beschleunigen, wurde die Lösung für 5 min bei 50 °C und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde für die folgenden Messungen mit einem bp/TOTO-Verhältnis von 10:1 markiert.

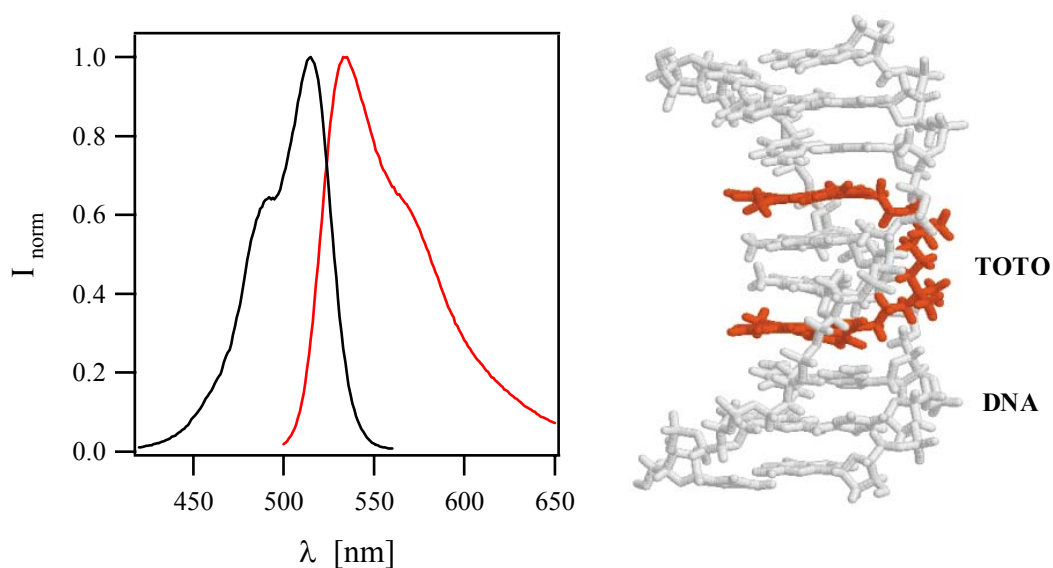


Abb. 5.5: Absorptions- und Emissionsspektrum von TOTO-1 unter den experimentellen Pufferbedingungen und Darstellung der 3-dimensionalen Struktur eines in die DNA interkalierten TOTO-Moleküls.

5.2.6 Präparation der DNA-Komplexe

Die Kondensation der DNA mit kationischen Polymeren oder Lipiden fand immer in verdünnten deionisierten wässrigen Lösungen statt. Die Konzentrationen der beteiligten Komponenten lagen beim Mischen im mikromolaren Bereich. Es wurden immer die kationischen Substanzen der fluoreszenzmarkierten DNA (bp/TOTO = 10:1) im Volumenverhältnis 1:1 zugegeben und die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung der DNA mit den kationischen Polymeren und Lipiden erfolgte in definierten Massenverhältnissen, die auch bei der *in vitro* Transfektion von eukaryontischen Zellen zur Anwendung kommen (Ernst et al., 1999). Die eingesetzten Gentransfer-Komplexe haben eine signifikante positive Überschussladung. Die Massenverhältnisse (w/w) von DNA zu kationischer Substanz sind für Polylysin 1:1.3, PEI 1:0.7, Dendrimeren 1:2 und Lipofectamine 1:10.7.

Nach der Kondensation in deionisiertem Wasser wurden die experimentellen Pufferbedingungen eingestellt und mit den Messungen nach einer weiteren Inkubation von 10 min begonnen. Der in den Experimenten eingesetzte Puffer bestand aus 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und 2 mM Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel. Ein wichtiger Faktor bei der Präparation ist auch das Entgasen aller wässrigen Lösungen. Es reduziert die Konzentration der Sauerstoff-Ionen in der Lösung, die effektive freie Radikale darstellen und zur Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs führen können.

Um den Effekt von Lungen-Surfactant auf die Größenverteilung der Aggregate zu untersuchen, wurde den Gentransfer-Komplexen nach 20 min Alveofact mit einer Konzentration von 0.5 µg/µl zugegeben und die experimentellen Pufferbedingungen eingestellt. Die polydisperse Alveofact-Suspension wurde zuvor mit einem Ultraschallgenerator für 5 min homogenisiert. Bei den Messungen ohne Alveofact wurde lediglich ein entsprechendes Volumen an Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine mindestens 1000-fache Verdünnung der Lösung mit Puffer, um die kolloidale Aggregation des Systems zu verlangsamen.

5.3 Selbstorganisation und Aggregationsverhalten

5.3.1 Theoretische Grundlagen der kolloidalen Aggregation

Die Aggregation wird im allgemeinen durch die Wechselwirkungen zwischen den kolloidalen Teilchen bestimmt. Von zentraler Bedeutung ist dabei die elektrostatische Wechselwirkung, da die Partikel eines Kolloids in der Regel gleichartig geladene Objekte darstellen. An der Oberfläche der Partikel akkumulieren die entgegengesetzt geladenen Ionen des umgebenden Puffers, während die Ionen mit gleichem Vorzeichen abgestoßen werden. Die Bildung einer sogenannten diffusen elektrischen Doppelschicht schirmt die Ladung der Partikel ab und reduziert so die Reichweite des elektrostatischen Potentials. Die geladenen Teilchen unterliegen der thermischen Bewegung und erfahren bei gegenseitiger Annäherung eine repulsive elektrostatische Kraft. Für zwei sphärische Teilchen mit einem Abstand r und einem Oberflächenpotential ψ_0 ist die elektrostatische Wechselwirkungsenergie W_{ele} proportional zu (Israelachvili, 1985):

$$W_{\text{ele}}(r) \propto R \psi_0^2 e^{-\frac{r}{\lambda_D}} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

Es bedeuten R den Radius der beiden sphärischen Teilchen und λ_D die Debye-Hückel-Abschirmlänge. Allerdings gilt dieser Zusammenhang nur für geladene Teilchen mit kleinen Oberflächenpotentialen ($<25\text{mV}$). Im Unterschied zu den repulsiven elektrostatischen Kräften ist die attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkung die Ursache für die irreversible Aggregation von kolloidalen Teilchen. Die Wechselwirkungsenergie W_{vdw} zwischen den zwei sphärischen Teilchen mit Radius R ist als Funktion ihres Abstandes r durch die folgende Proportionalität gegeben (Israelachvili, 1985):

$$W_{\text{vdw}}(r) \propto -\frac{R}{r} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Im Rahmen der DLVO-Theorie⁵ wird die Summe aus der elektrostatischen und der Van-der-Waals-Wechselwirkung betrachtet, um quantitative Aussagen über die Stabilität von kolloidalen Systemen machen zu können. Generell dominieren zwischen den Teilchen für niedrige Ionenkonzentrationen und hohen Oberflächenpotentialen langreichweitige repulsive elektrostatische Kräfte. Die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte sind nur für kleine Abstände von Bedeutung. Eine Aggregation der kolloidalen Teilchen ist also nur dann möglich, wenn sie bei der Kollision die erforderliche kinetische Energie haben, um die

⁵ Es handelt sich hier um eine von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek entwickelten Theorie.

Potentialbarriere überwinden zu können. Im Fall einer hohen Barriere ($>10 \text{ kT}$) führen die Kollisionen der Teilchen nur mit einer extrem kleinen Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Komplexes. Kolloidale Lösungen stellen unter diesen Voraussetzungen eine zeitlich stabile Suspension dar (Hunter, 1981).

Eine Erhöhung der Ionenkonzentration ist mit einer Abnahme der Potentialbarriere zwischen den geladenen Teilchen verbunden. Des weiteren bildet sich ein zweites Minimum im Potential vor der Barriere aus. Die kolloidalen Teilchen können mit ihrer thermischen Energie die Potentialbarriere nach endlich vielen Kollisionen überwinden. Die Koagulation der kolloidalen Teilchen ist unter diesen Voraussetzungen ein langsamer Prozess, der als reaktionslimitierte Aggregation (RLA) bezeichnet wird. Überhalb einer kritischen Ionenkonzentration⁶ und einem verschwindenden Oberflächenpotential existiert zwischen den kolloidalen Teilchen ein langreichweitiges attraktives Van-der-Waals-Potential. In diesem Fall setzt eine spontane Koagulation des Kolloids ein, bei der jede Kollision von Teilchen in einer Aggregation resultiert. Es handelt sich bei dieser Form der Koagulation um die sogenannte diffusionslimitierte Aggregation (DLA). Die Kinetik der Aggregation ist nur durch die Diffusionszeit der Teilchen zwischen den Kollisionen limitiert (Lin et al., 1989).

⁶ Auch als kritische Koagulationskonzentration bezeichnet.

5.3.2 Resultate und Diskussion

Mit quantitativer Fluoreszenzmikroskopie können die fluoreszenzmarkierten Gentransfer-Komplexe eines verdünnten kolloidalen Systems mit hoher Auflösung abgebildet und die Intensitätsverteilung des aufgezeichneten Bildes analysiert werden. Voraussetzung für die optische Abbildung ist jedoch die Immobilisierung der Komplexe auf einer Glasoberfläche. Dazu wurde ein definiertes Volumen einer pikomolaren Lösung von Komplexen in eine Teflon-Probenkammer mit dünnem Glasboden gegeben. Die diffundierenden kolloidalen Partikel in unmittelbarer Nähe zum Glasboden adsorbieren auf der Oberfläche. Nachdem sich eine bestimmte Zahl von Partikel auf der Oberfläche abgesetzt hatte, erfolgte das mehrfache Spülen der Probenkammer mit Puffer, um eine weitere Adsorption von Partikel zu verhindern. Sind zu viele Partikel auf der Oberfläche gebunden, dann können die einzelnen Objekte von der Bildverarbeitung nicht mehr aufgelöst werden. Des weiteren minimiert das Spülen der Kammer den Fluoreszenzhintergrund durch frei diffundierende Partikel in der Lösung. Mit der Intensitätsanalyse dieser Bilder lassen sich dann Aussagen über das Aggregationsverhalten, die Größenverteilung und die Stabilität von verdünnten kolloidalen Systemen unter physiologischen Bedingungen machen.

Es wurden verschiedene Modelloberflächen wie z. B. Kunststoff-, Hellmanex gereinigte und silanisierte Glasoberflächen für die Experimente zur quantitativen Fluoreszenzmikroskopie getestet. Auf den silanisierten Glasoberflächen konnten zum einen die negativ geladenen Plasmide als auch die positiv geladenen Gentransfer-Komplexe adhären. Eine Beschichtung der Oberfläche wäre also für die Immobilisierung der abzubildenden Objekte nicht notwendig gewesen. Die Fluoreszenzintensität der TOTO-markierten DNA war jedoch nicht konstant und nahm als Funktion der Zeit rapid ab. Dieses Verhalten ist vermutlich auf Konformationsänderungen der adsorbierten Plasmide und/oder der Verdrängung des Farbstoffs aus der DNA zurückzuführen. Des weiteren war eine signifikante Autofluoreszenz der silanisierten Oberfläche zu beobachten, die eine sinnvolle Abbildung der Objekte unmöglich machte. Die untersuchten Kunststoffe zeigten auch eine hohe Autofluoreszenz und eine geringe Adsorption der Gentransfer-Komplexe auf der Oberfläche. Die besten Resultate erzielten die Hellmanex gereinigten Glasoberflächen. In diesem Fall konnte keine Autofluoreszenz nachgewiesen werden, und die positiv geladenen Komplexe adsorbierten spontan mit der Oberfläche. Zur Reinigung wurden die Gläser 2× in einer 2% Hellmanex-Lösung (Hellma, Mühlheim) für 20 min in ein Ultraschallbad gestellt und danach gründlich (10×) mit deionisiertem Wasser gespült, um alle Reste des Reinigungsmittels zu entfernen.

Fluoreszenzlöschung

Nach den Erläuterungen von Kap. 3.1.1 ist die Quantenausbeute eines Fluorophors von vielen Faktoren abhängig. So können Änderungen in der Umgebung eines Fluorophors drastische Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität haben. Dies gilt im besonderen für die Kondensation von fluoreszenzmarkierter DNA mit kationischen Substanzen. In diesem Fall kommt es zur Fluoreszenzlöschung α des gebundenen Fluorophors, die durch die folgende Formel definiert ist:

$$\alpha = \frac{I_{\text{DNA}}}{I_{\text{Komplex}}} \quad (5.1)$$

I_{DNA} bezeichnet die Intensität der freien fluoreszenzmarkierten DNA und I_{Komplex} die Intensität einer äquivalenten Menge an kondensierter DNA. Die Fluoreszenzlöschung ist für die Berechnung der Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex von entscheidender Bedeutung. Sie wurde für alle kationischen Transfektionsreagenzien mit einem Spektrometer in einem separaten Experiment unter den gleichen Pufferbedingungen (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM Ascorbinsäure, pH 7) bestimmt. Die Werte für Fluoreszenzlöschung α liegen im vorliegenden Fall im Intervall von 1 bis 10.

Voraussetzung für die Untersuchung der Gentransfer-Komplexe mit quantitativer Fluoreszenzmikroskopie ist, dass es bei der Kondensation der markierten DNA zu keiner Verdrängung der interkalierten TOTO-Moleküle kommt. Wie in der Literatur beschrieben, wurde bei der Kondensation der DNA eine Verdrängung von Ethidiumbromid beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch verschiedene Experimente, dass eine Verdrängung von TOTO unter den vorliegenden Bedingungen ausgeschlossen werden kann (Galneder, 2001).

Plasmide

Die negativ geladenen Glasoberflächen müssen zur Abbildung der Plasmide zuvor mit kationischen Substanzen beschichtet werden. In Abb. 5.6 ist eine typische Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Plasmiden mit 4.7 kbp dargestellt, die auf einer mit Polylysin beschichteten Glasoberfläche adsorbieren. Die Plasmide wurden mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff TOTO im Verhältnis von bp/Fluorophor von 10:1 markiert. Die statistisch über die Oberfläche verteilten Objekte entsprechen einzelnen Plasmiden, die sich in ihrer Fluoreszenzintensität nur wenig voneinander unterscheiden. Mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung konnten ganze Stapel von Fluoreszenzaufnahmen mit bis zu 2×10^4 Segmen-

ten analysiert werden. Plasmide, die einen zu geringen Abstand voneinander haben, lassen sich mit dem Programm zur Bildverarbeitung nicht auflösen und werden als ein Objekt angesehen. Die normierte Häufigkeitsverteilung der gemessenen Fluoreszenzintensität pro Segment ist in Abb. 5.6B aufgetragen. Die Maxima im Histogramm korrespondieren zur mittleren Fluoreszenzintensität von einem Plasmid und von Konglomeraten aus zwei, drei und vier Plasmiden, die von der Bildverarbeitung nicht aufgelöst werden konnten. Die relativen Häufigkeiten der Maxima an der statistischen Gesamtheit lagen bei 75%, 19%, 5%, und <1%. Unter der Voraussetzung einer homogenen Markierung der DNA mit TOTO waren ~470 Fluorophore an ein Plasmid gebunden. Die numerische Anpassung des ersten Maximums in Abb. 5.6B mit einer Gauß'schen Funktion lieferte für die mittlere Fluoreszenzintensität eines einzelnen Plasmids einen Wert von 15500 ± 2000 Einheiten. Die Standardabweichung definiert die Sensitivität der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie und entspricht ~600 Basenpaaren.

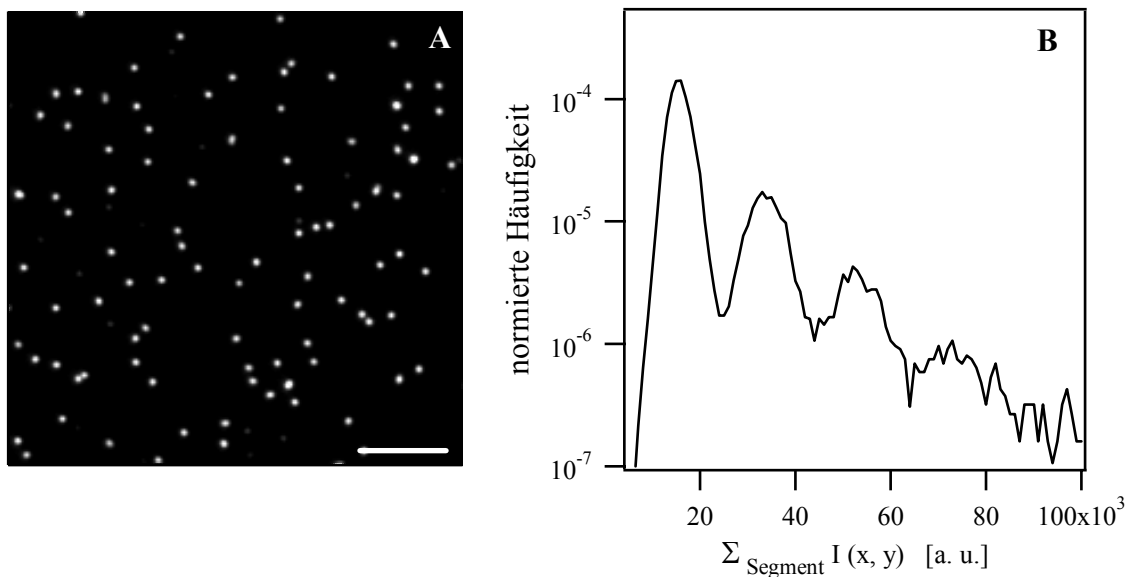


Abb. 5.6: (A) Fluoreszenzmarkierte Plasmide mit 4.7 kbp adsorbieren auf einer mit Polylysin beschichteten Glasoberfläche. Die Plasmide wurden mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff TOTO im Verhältnis von bp/Fluorophor von 10:1 markiert. (Maßstab: 5 μm) (B) Intensitätsanalyse von ~20000 fluoreszenzmarkierten Plasmiden. Es ist die normierte Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität pro Segment dargestellt. Die Maxima im Histogramm korrespondieren zur mittleren Fluoreszenzintensität von einem, zwei, drei und vier Plasmiden mit den relativen Häufigkeit von 75%, 19%, 5%, und <1%. Einzelne Plasmide zeigen eine schmale Verteilung und haben eine mittlere Intensität von ~15500 Einheiten.

Synthetische Gentransfer-Komplexe

Zur Abbildung der Gentransfer-Komplexe mit positiver Überschussladung war eine Beschichtung der Glasoberfläche nicht erforderlich. Auf Grund der elektrostatischen Anziehung adsorbierten die Komplexe spontan mit der negativ geladenen Oberfläche. Um die Fluoreszenzaufnahmen der Komplexe mit denen der Plasmide vergleichen zu können, wurden die Einstellungen am Mikroskop für alle Experimente beibehalten. Da die Fluoreszenzintensität von polydispersen Komplexen stark variieren kann, musste die Belichtungszeit und das Binning⁷ der CCD-Kamera für jede Messung optimiert werden. So sollte ohne eine Überbelichtung der Aufnahmen der gesamte dynamische Bereich der Kamera ausgenutzt werden. Die unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden dann im Rahmen der Intensitätsanalyse korrigiert und auf einen Referenzstandard bezogen. Im Gegensatz dazu verbessert das Binning das Signal/Rausch-Verhältnis des aufgenommenen Bildes ohne die absolute Intensität des Objekts zu verändern.

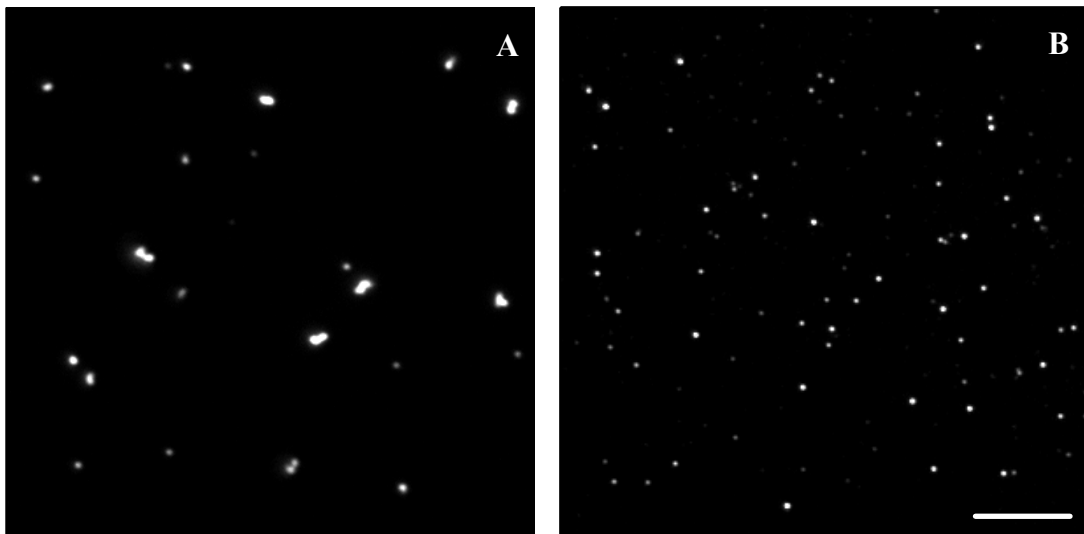


Abb. 5.7: Fluoreszenzaufnahmen von DNA/Polylysin-Komplexen (1:1.3 (w/w)) mit positiver Überschussladung auf einer Glasoberfläche. Die Bilder zeigen die Größenverteilung der Komplexe 10 min nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation durch die Einstellung der experimentellen Pufferbedingungen ohne (A) und mit Einwirkung von Alveofact der Konzentration von 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (B). (Maßstab gilt für beide Bilder: 5 μm).

In Abb. 5.7A sind fluoreszenzmarkierte DNA/Polylysin-Komplexe auf einer Glasoberfläche dargestellt. Die Aufnahme zeigt die Größenverteilung der Komplexe 10 min nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation durch die Einstellung der experimentellen

⁷ Das Zusammenfassen von angrenzenden Bildpunkten bei einer CCD-Kamera.

Pufferbedingungen (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM Ascorbinsäure, pH 7). Das kolloidale System hat eine hohe Polydispersität, da deutliche Unterschiede in Form, Größe und Fluoreszenzintensität der Komplexe zu erkennen sind. Die Aufnahmen lassen sich jedoch nicht direkt mit denen der Plasmide vergleichen, da die Intensität von der Fluoreszenzlöschung bei der Kondensation und der Skalierung bei der Darstellung des Bildes abhängt. Der Begriff der Skalierung beschreibt dabei die Tatsache, dass die Komplexe von der CCD-Kamera mit einer Auflösung von 12 bit (4096 Graustufen) abgebildet werden, bei der Darstellung auf dem Monitor bzw. beim Druck auf Papier nur 8 bit (256 Graustufen) zur Verfügung stehen. Die Intensitätsanalyse der Daten erfolgte jedoch ausschließlich mit dem gesamten dynamischen Bereich der CCD-Kamera.

Um den Effekt von Alveofact auf die Größenverteilung zu untersuchen, wurde den Komplexen nach der Kondensation in deionisiertem Wasser eine beschallte Suspension aus Alveofact der Konzentration $c = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und Puffer zugegeben. In Abb. 5.7B ist ein Fluoreszenzbild von DNA/Polylysin-Komplexen nach einer 10 minutigen Inkubation mit Alveofact dargestellt. Die Komplexe sind im Unterschied zur Aufnahme (A) wesentlich kleiner. Des weiteren ist die Zahl der adhärenierten Komplexe auf der Oberfläche deutlich höher. Das Lungen-Surfactant hat vermutlich die Oberflächenbeschaffenheit und damit das Adhäsionsverhalten der DNA/Polylysin-Komplexe verändert. Des weiteren ist eine geringere Polydispersität der Größenverteilung zu erkennen. Eine genauere Analyse der Intensitätsverteilung auf den Fluoreszenzbildern mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung bestätigte diese ersten Vermutungen. Aus der Fluoreszenzintensität der Segmente wurde die entsprechende Zahl der Plasmide pro Komplex n mit der folgenden Formel berechnet:

$$n = \frac{\alpha \cdot \sum_{\text{Komplex}} I(x, y)}{\langle \sum_{\text{Plasmid}} I(x, y) \rangle} \quad (\text{Gl. 5.3})$$

Hierbei sind α die Fluoreszenzlöschung durch die Kondensation, $\langle \sum_{\text{Plasmid}} I(x, y) \rangle$ die mittlere Intensität eines Plasmids und $\sum_{\text{Komplex}} I(x, y)$ die Fluoreszenzintensität eines Komplexes. Für die mittlere Intensität eines Plasmids konnte nach Abb. 5.6B ein Wert von 15.5×10^3 Einheiten bestimmt werden. Die ermittelten Werte für die Variable n wurden in Form eines Histogramms $h(n)$ dargestellt und die normierte Häufigkeitsverteilung mit der Formel $\rho(n) = h(n)/N$ berechnet. Der Parameter N bezeichnet dabei die gesamte Zahl der analysierten Segmente und war in den Experimenten $\geq 10^4$. In Abb. 5.8 sind die Größenverteilungen der untersuchten Gentransfer-Komplexe 10 min nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation durch das Einstellen der experimentellen Pufferbedingungen mit und ohne die Einwirkung von Alveofact ($c = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) dargestellt. In den Graphen ist die normierte Häufigkeitsverteilung als Funktion der Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplexe angegeben. Die Massenverhältnisse der DNA zu den kationischen Trans-

fektionsreagenzien sind für Polylysin 1:1.3 (A), PEI 1:0.7 (B), Dendrimeren 1:2 (C) und Lipofectamine 1:10.7 (D).

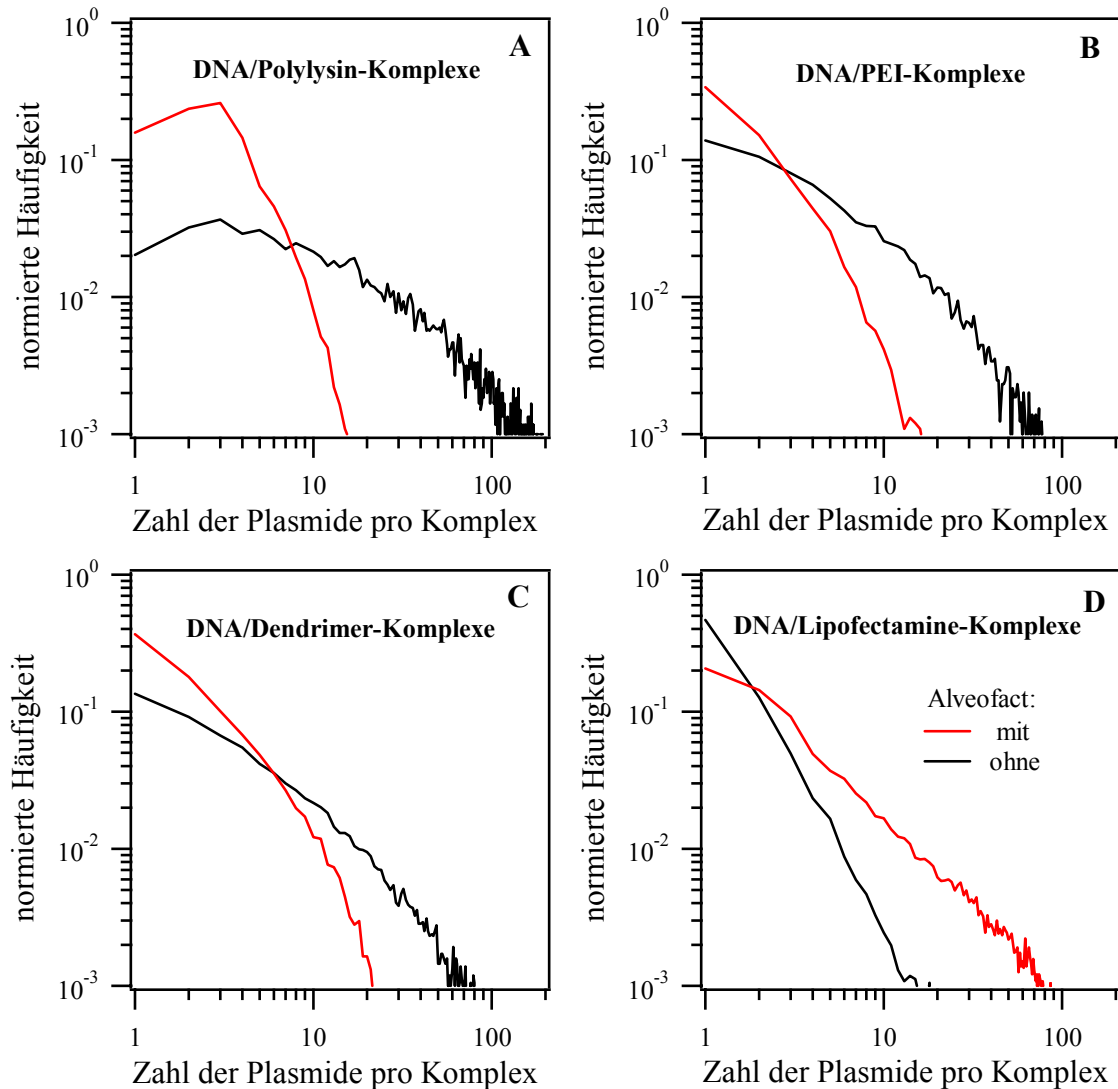


Abb. 5.8: Größenverteilung der verschiedenen Gentransfer-Komplexe 10 min nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation durch die Einstellung der experimentellen Pufferbedingungen (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM Ascorbinsäure, pH 7) mit und ohne die Einwirkung von Alveofact ($c_{\text{Alveo}} = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Massenverhältnisse (w/w) der DNA zu den kationischen Transfektionsreagenzien sind für Polylysin 1:1.3 (A), PEI 1:0.7 (B), Dendrimeren 1:2 (C) und Lipofectamine 1:10.7 (D). Es ist die normierte Häufigkeitsverteilung $\rho(n)$ als Funktion der Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex n aufgetragen.

Für die Polyplexe ist ohne den Einfluss von Alveofact eine breite, abfallende Verteilung zu erkennen. Die meisten Polyplexe bestehen 10 min nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation aus wenigen Plasmiden. Ein kleiner Teil kann jedoch bis zu 100 Plasmide enthalten. Die Mittelwerte der Verteilung $\langle n \rangle$ liegen für Polylysin, PEI und Dendrimeren

bei 52, 15 bzw. 17 Plasmiden pro Komplex. Die DNA/Lipofectamine-Komplexe zeigen im Gegensatz dazu eine deutlich geringere Polydispersität. Die Verteilungsfunktion ist in der doppellogarithmischen Darstellung durch einen linearen Zusammenhang gegeben. Die Zahl der Plasmide variiert für die Lipoplexe in einem Intervall von 1 bis 20, und im Mittel liegen nur ~ 2 Plasmide pro Komplex vor. Die Inkubation mit Alveofact hat einen bedeutenden Einfluss auf die Größenverteilung der verschiedenen Gentransfer-Komplexe. Die Polyplexe besitzen nach der Einwirkung von Alveofact eine deutlich geringere Polydispersität, da sie im Mittel nur noch aus 3-5 Plasmiden pro Komplex bestehen. Experimente mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer konnten nachweisen, dass eine Dissoziation der Polyplexe durch die eingesetzte Konzentration an Alveofact ausgeschlossen werden kann (Galneder, 2001). Eine Erklärung dafür ist die Adsorption von Alveofact (Opsonisation) auf der Oberfläche der Gentransfer-Komplexe. Die repulsive sterische Wechselwirkung zwischen den oberflächenaktiven Substanzen von Alveofact inhibiert vermutlich die kolloidale Aggregation der Komplexe. Im Gegensatz dazu haben die Lipoplexe unter den Einfluss von Alveofact eine höhere Polydispersität. Der Mittelwert der Verteilung ist bei den Lipoplexen $\langle n \rangle_{\text{Alveo}} = 17$. Dies kann damit erklärt werden, dass die kationischen Lipide der Komplexe mit den negativ geladenen Lipiden des Alveofact fusionieren. Die kompakte Struktur der Lipoplexe wird dadurch teilweise aufgelöst, und es entstehen lose zusammenhängende Gebilde aus mehreren Komplexen mit Alveofact (Ernst et al., 1999). Aus den Größenverteilungen lassen sich die mittlere Zahl an Plasmiden pro Gentransfer-Komplex mit und ohne die Einwirkung von Alveofact berechnen. Die Resultate sind in der Tabelle 5.1 für die untersuchten Transfektionsreagenzien angegeben.

Gentransfer-Komplexe	$\langle n \rangle$	$\langle n \rangle_{\text{Alveo}}$
DNA/Polylysin	52	5
DNA/PEI	15	3
DNA/Dendrimer	17	4
DNA/Lipofectamine	2	17

Tab. 5.1: Mit quantitativer Fluoreszenzmikroskopie bestimmte mittlere Zahl von Plasmiden pro Gentransfer-Komplex ohne $\langle n \rangle$ und mit Einwirkung von Alveofact $\langle n \rangle_{\text{Alveo}}$. Die angegebenen Mittelwerte wurden aus den Größenverteilungen von Abb. 5.8 berechnet.

Aggregationskinetik von Gentransfer-Komplexen

Die Messungen zur Aggregationskinetik von Gentransfer-Komplexen erfolgten mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie. Dazu wurden die Probenkammern (Labtek II, Nunc, Wiesbaden) mit einer neutralen Lipidmembran beschichtet, um die Adsorption der positiv geladenen Komplexe an der Glasoberfläche zu minimieren. Nach dem Einstellen der experimentellen Pufferbedingungen wurde die Suspension der Komplexe in die Probenkammer gegeben und sofort mit der Aufnahme von Autokorrelationskurven als Funktion der Zeit begonnen. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass es sich bei der Aggregation in Relation zur typischen Messzeit einer Autokorrelationskurve um einen langsamen Prozess handelt. Die Ionenkonzentration in der Lösung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der kolloidalen Aggregation. Mit steigender Ionenkonzentration nehmen die repulsiven elektrostatischen Kräfte zwischen den positiv geladenen Komplexen ab, während die attraktiven Dipol-Dipol-Wechselwirkungen an Bedeutung gewinnen und zu einer schnelleren Aggregation der Gentransfer-Komplexe führen. Im Gegensatz dazu sind kolloidale Systeme für geringe Ionenkonzentrationen zeitlich stabil.

Die Autokorrelationskurven von freien Plasmiden (pEGFP) und positiv geladenen Plasmid/Dendrimer-Komplexen (1:2 (w/w)) sind in Abb. 5.9A für eine niedrige Ionenkonzentration (1 mM NaCl, 1 mM HEPES, pH 7) angegeben. Eine Beschichtung der Probenkammer war im Unterschied zu den Komplexen für die Messungen mit den Plasmiden nicht notwendig. Die Plasmide hatten eine Länge von 4.7 kbp und wurden mit TOTO im Verhältnis von bp/Farbstoff von 20:1 markiert. In beiden Fällen war die eingesetzte Konzentration an Plasmiden von 4×10^{10} M identisch. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte bei den freien Plasmiden mit Gl. 3.2 für eine Komponente und bei den Plasmid/Dendrimer-Komplexen mit Gl. 3.7 für ein polydisperses System. Aus der Amplitude der Autokorrelationskurven wurde die Zahl der Plasmide N_{Plasmid} und Komplexe N_{Komplex} im effektiven Fokusvolumen bestimmt und daraus die mittlere Zahl von Plasmiden pro Komplex $\langle n \rangle$ mit der folgenden Formel berechnet:

$$\langle n \rangle = \frac{N_{\text{Plasmid}}}{N_{\text{Komplex}}} \quad (\text{Gl. 5.4})$$

Die Plasmid/Dendrimer-Komplexe stellen für niedrige Ionenkonzentrationen ein stabiles kolloidales System dar. Sie bestehen im Mittel aus ~ 4 Plasmiden und haben eine mittlere Diffusionszeit durch das effektive Volumen von ~ 2000 μs . Dagegen wurde für die freien Plasmide ein wesentlich höherer Wert von ~ 9000 μs gemessen. Die dazu korrespondierenden hydrodynamischen Radien der Partikel liegen für die Komplexe und die Plasmide bei 65 nm bzw. 290 nm. Durch die Kondensation der DNA entstehen kompakte Komplexe aus

mehreren Plasmiden, die viel kleiner als einzelne freie Plasmide sind. In den folgenden Experimenten zur Aggregationskinetik wurde immer die gleiche Menge an DNA eingesetzt. Aus diesem Grund bildet die Autokorrelationskurve der Plasmide den Referenzstandard zur Berechnung der mittleren Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex.

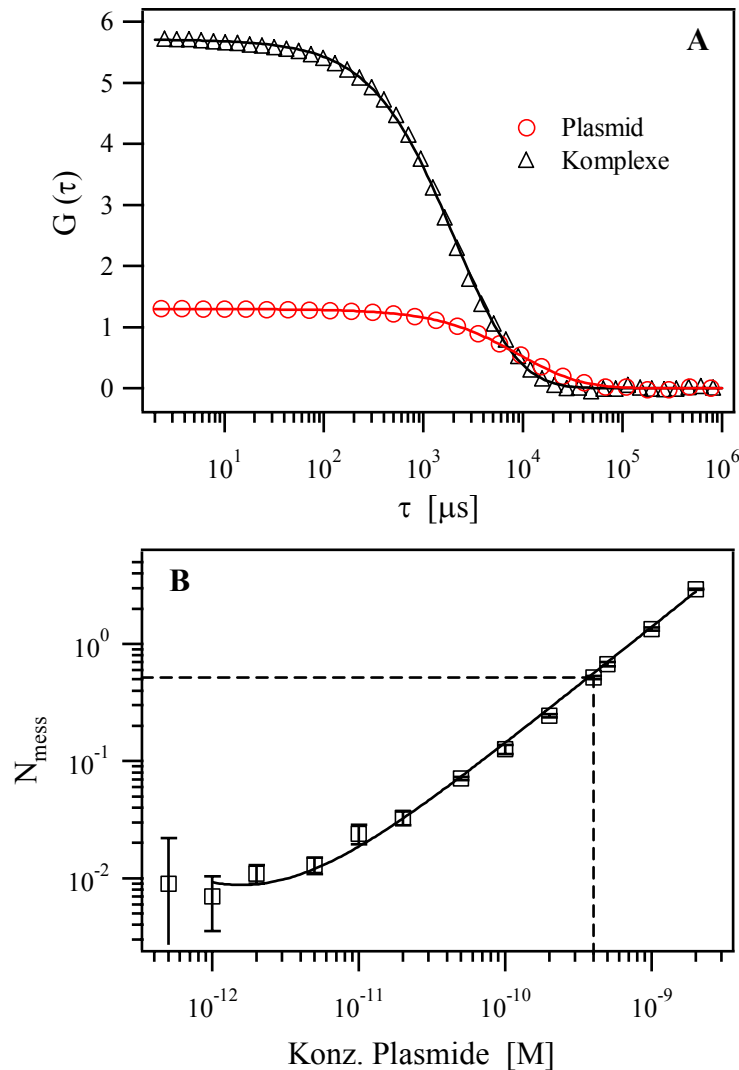


Abb. 5.9: (A) Autokorrelationskurven von freien Plasmiden (pEGFP, 4.7 kbp) und Plasmid/Dendrimer-Komplexen (1:2 (w/w)) für eine niedrige Ionenkonzentration (1 mM NaCl, 1 mM HEPES, pH 7). Die Plasmide (pEGFP) hatten eine Länge von 4.7 kbp und wurden mit TOTO im Verhältnis von bp/Farbstoff von 20:1 markiert. In beiden Fällen war die eingesetzte Konzentration an Plasmiden von 0.4 nM identisch. Die Komplexe haben eine geringere Diffusionszeit als die freie DNA und bestehen im Mittel aus ~ 4 Plasmiden. (B) Verdünnungskurve der fluoreszenzmarkierten Plasmide. Es ist die gemessene Zahl der Plasmide im effektiven Fokusbereich als Funktion der Konzentration aufgetragen. Ab einer Plasmidkonzentration von 5×10^{-12} M kann ein linearer Messbereich von FCS angenommen werden. Für die Messungen zur Aggregationskinetik der Gentransfer-Komplexe wurde eine Plasmid-Konzentration von 4×10^{-10} M eingesetzt (gestrichelte Linie).

Zur Bestimmung des linearen Messbereichs von FCS wurde eine Verdünnungskurve der fluoreszenzmarkierten Plasmide aufgenommen. In Abb. 5.9B ist die gemessene Zahl der Plasmide im effektiven Volumen in Abhängigkeit von der tatsächlichen Konzentration und die numerische Anpassung der Datenpunkte mit Gl. 3.10 angegeben. Ab einer Plasmidkonzentration von 5×10^{12} M kann ein linearer Messbereich angenommen werden. Nur in diesem Bereich lassen sich mit FCS genaue Aussagen über die Konzentration der Partikel im Fokusbereich machen. Deshalb wurde für die Messungen zur Aggregationskinetik der Gentransfer-Komplexe eine Plasmid-Konzentration von 4×10^{10} M eingesetzt (gestrichelte Linie).

Die kolloidale Aggregation beginnt in der Regel mit einer Suspension aus kleinen monodispersen Einheiten, die sich nach der Kondensation der DNA mit kationischen Reagenzien bilden. Mit der Zeit entstehen dann kleinere Komplexe, die durch Brownsche Bewegung in der Lösung diffundieren und bei Kollision zu immer größeren Komplexen fusionieren können. Aus der Aufnahme von Autokorrelationskurven als Funktion der Zeit lassen sich Aussagen über die Aggregationskinetik von Gentransfer-Komplexen machen.

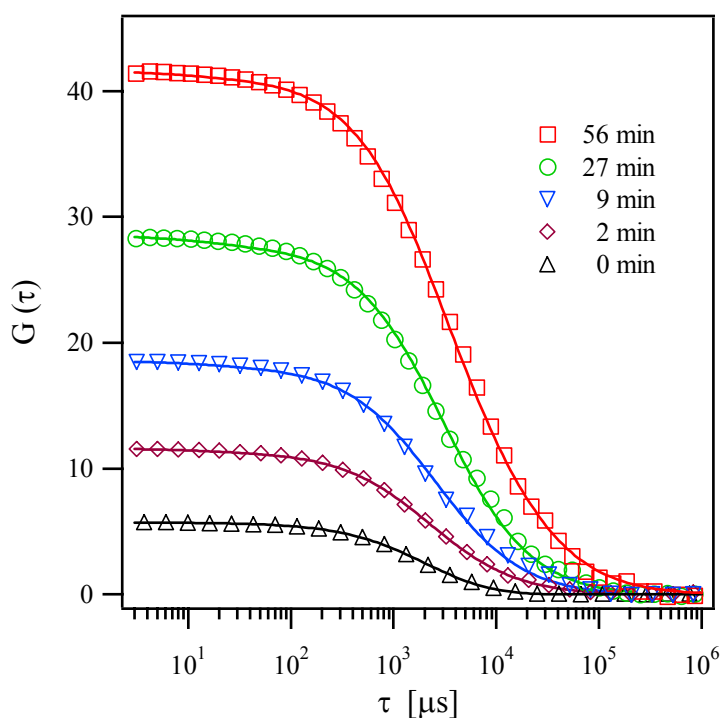


Abb. 5.10: Autokorrelationskurven für verschiedene Zeitpunkte nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation von DNA/Dendrimer-Komplexen (1:2 (w/w)) unter den Pufferbedingungen 25 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7. Die Amplitude der Autokorrelationskurven und die mittlere Diffusionszeit der Komplexe nehmen während der kolloidalen Aggregation kontinuierlich zu.

In Abb. 5.10 sind die Autokorrelationskurven für verschiedene Zeitpunkte nach dem Einsetzen der kolloidalen Aggregation von Plasmid/Dendrimer-Komplexen (1:2 (w/w)) unter den Pufferbedingungen 25 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7 dargestellt. Die Kurven wurden nach 0 (Δ), 2 (\diamond), 9 (∇), 27 (\circ) und 56 (\square) Minuten aufgenommen. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte mit Gl. 3.7 für polydisperse Systeme. Die Amplitude der Autokorrelationskurven und die mittlere Diffusionszeit der Komplexe stiegen während der kolloidalen Aggregation kontinuierlich an. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten, da größere Komplexe langsamer durch den Fokus diffundieren und die gesamte Zahl an Teilchen im effektiven Volumen während der Aggregation abnimmt.

Abb. 5.11A zeigt den Einfluss der Ionenkonzentration auf die Aggregationskinetik von positiv geladenen DNA/Dendrimer-Komplexen (1:2 (w/w)). Dazu ist die mittlere Zahl der Plasmide pro Komplex als Funktion der Zeit für 1, 10, 20, 25 und 30 mM NaCl aufgetragen. Da auch die Moleküle des Puffers zur Ionenstärke beitragen, wurde den Salzlösungen zur Einstellung von neutralen pH-Bedingungen unterschiedliche Mengen an HEPES zugesetzt. Die Konzentration des Puffers lag bis 10 mM NaCl bei 1 mM und für alle höheren bei 5 mM HEPES. Jeder Datenpunkt wurde aus einer Mittelung über 5 Autokorrelationskurven mit einer Messzeit von 20-40 s bestimmt. Mit der abnehmenden Konzentration der Komplexe war die schrittweise Verlängerung der Messzeit für eine Autokorrelationskurve sinnvoll. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte mit einer linearen Funktion. Wie erwartet, nahm die Geschwindigkeit der kolloidalen Aggregation mit der Ionenkonzentration in der Lösung kontinuierlich zu.

In Abb. 5.11B sind die Steigungen der linearen Funktionen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration angegeben. Die Komplexe aggregieren bis zu einer Konzentration von ~ 20 mM NaCl extrem langsam und stellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen ein stabiles kolloidales System dar (Daten nicht gezeigt). Für höhere Ionenkonzentrationen steigt die Geschwindigkeit der kolloidalen Aggregation drastisch an. Mit FCS kann jedoch die Kinetik von sehr schnell ablaufenden Prozessen mit dem beschriebenen Verfahren nicht gemessen werden, da die Zeitauflösung durch die Messzeit für eine Autokorrelationskurve vorgegeben ist. Im Fall der DNA/Dendrimer-Komplexe kann die Kinetik bis zu einer Ionenkonzentration von maximal 80-100 mM bestimmt werden.

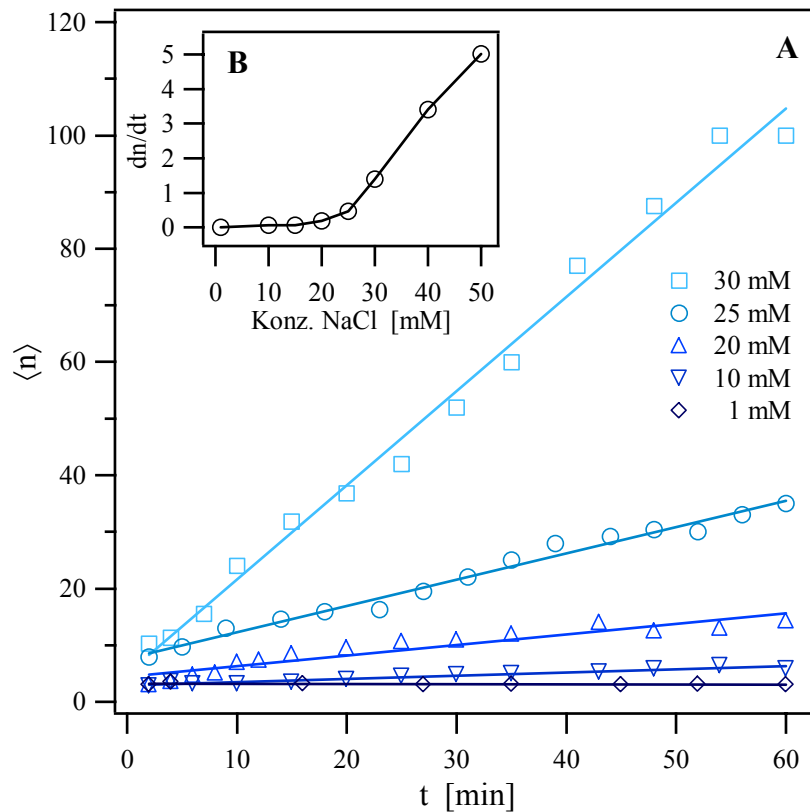


Abb. 5.11: (A) Aggregationskinetik von DNA/Dendrimer-Komplexen (1:2 (w/w)) als Funktion von der Ionenkonzentration. Es ist die mittlere Zahl der Plasmide pro Komplex gegen die Zeit für 1, 10, 20, 25 und 30 mM NaCl aufgetragen. Die Geschwindigkeit der kolloidalen Aggregation nahm mit der Ionenstärke in der Lösung kontinuierlich zu. (B) Steigung der linearen Funktionen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Ab 20 mM NaCl ist eine drastische Zunahme der Aggregationsgeschwindigkeit zu erkennen.

Es wurde mit der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie ein signifikanter Effekt von Alveofact auf die Größenverteilung der Komplexe beobachtet. Mit den folgenden Experimenten zur Kinetik sollen diese Resultate bestätigt und darüber hinaus weitere Erkenntnisse zum Aggregationsverhalten gewonnen werden. In Abb. 5.12 ist der Effekt von Alveofact auf die Aggregationskinetik von positiv geladenen Gentransfer-Komplexen für eine niedrige Ionenkonzentrationen (10 mM NaCl, 1 mM HEPES, pH 7) dargestellt. Das Mischungsverhältnis (w/w) der DNA mit den kationischen Transfektionsreagenzien ist für Polylysin 1:1.3 (A), PEI 1:0.7 (B), Dendrimere 1:2 (C) und Lipofectamine 1:10.7 (D). Es ist die mittlere Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex in Abhängigkeit von der Zeit angegeben. Die kolloidale Aggregation der Polyplexe wird ohne die Einwirkung von Alveofact nur durch die Ionenkonzentration in der Lösung bestimmt. Unter den vorliegenden Bedingungen erreichten die Polyplexe nach 60 min eine mittlere Größe von 6-20 Plasmiden pro Komplex. Die Aggregationsprozesse liefen mit zunehmenden Ionenkonzentrationen analog zu Abb. 5.11 immer schneller ab. Die Polyplexe können in

physiologischem Puffer bereits nach wenigen Minuten aus mehr als 100 Plasmiden pro Komplex bestehen (Daten nicht gezeigt). Die extrem schnelle kolloidale Aggregation und die daraus resultierende hohe Polydispersität des Systems limitieren jedoch die Messungen der Kinetik mit FCS. Im Gegensatz dazu inhibiert die Zugabe von Alveofact ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) die kolloidale Aggregation der Polyplexe. Dieser Effekt konnte auch unter physiologischen Pufferbedingungen nachgewiesen werden. Polyplexe sind nach der Inkubation mit Alveofact auch unter physiologischen Pufferbedingungen ein stabiles kolloidales System und bestehen im Mittel nur aus 3-5 Plasmiden. Eine Erklärung für dieses Verhalten wäre die Adsorption (Opsonisation) von Alveofact auf der Oberfläche der Polyplexe. Dies würde zu einer drastischen Änderung der Oberflächeneigenschaften und damit auch des Aggregationsverhaltens führen. Zetapotential-Messungen an DNA/Polylysin-Komplexen konnten einen signifikanten Effekt von Albumin auf die Oberflächenladung der Komplexe zeigen (Dash et al., 1999). So hatte mit steigender Albumin-Konzentration das positive Zetapotential kontinuierlich abgenommen. Für hohe Proteinkonzentrationen kam es sogar zur Umladung der Komplexe. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Komponenten des Alveofact (hauptsächlich neutrale und anionische Lipide sowie Surfactant-Proteine) auf der Oberfläche adsorbieren und durch repulsive elektrostatische und sterische Wechselwirkungen das kolloidale System stabilisieren.

Die DNA/Lipofectamine-Komplexe zeigen im Unterschied zu den Polyplexen ein völlig anderes Aggregationsverhalten (Abb. 5.12D). Sie stellen ohne die Einwirkung von Alveofact ein stabiles kolloidales System dar und bestehen im Mittel aus ~ 2 kondensierten Plasmiden. Dieses Verhalten wurde für niedrige bis physiologische Ionenkonzentrationen beobachtet. Dagegen führte die Inkubation mit Alveofact zu einer langsamen kolloidalen Aggregation. Die Lipoplexe erreichten in diesem Fall nach 60 min eine Größe von $\sim 3-4$ Plasmiden pro Komplex. Die Geschwindigkeit der Aggregation ist dabei mit zunehmender Ionenkonzentration leicht angestiegen. Unter physiologischen Pufferbedingungen verdoppelte sich die Zahl der Plasmide pro DNA/Lipofectamine-Komplex. Vermutlich fusionieren die kationischen Lipide der Komplexe mit den neutralen und negativ geladenen Lipiden des Alveofact. Dadurch würde sich die innere Bindung des Lipoplexes abschwächen und lose zusammenhängende Gebilde aus mehreren Komplexen mit Alveofact entstehen (Ernst et al., 1999).

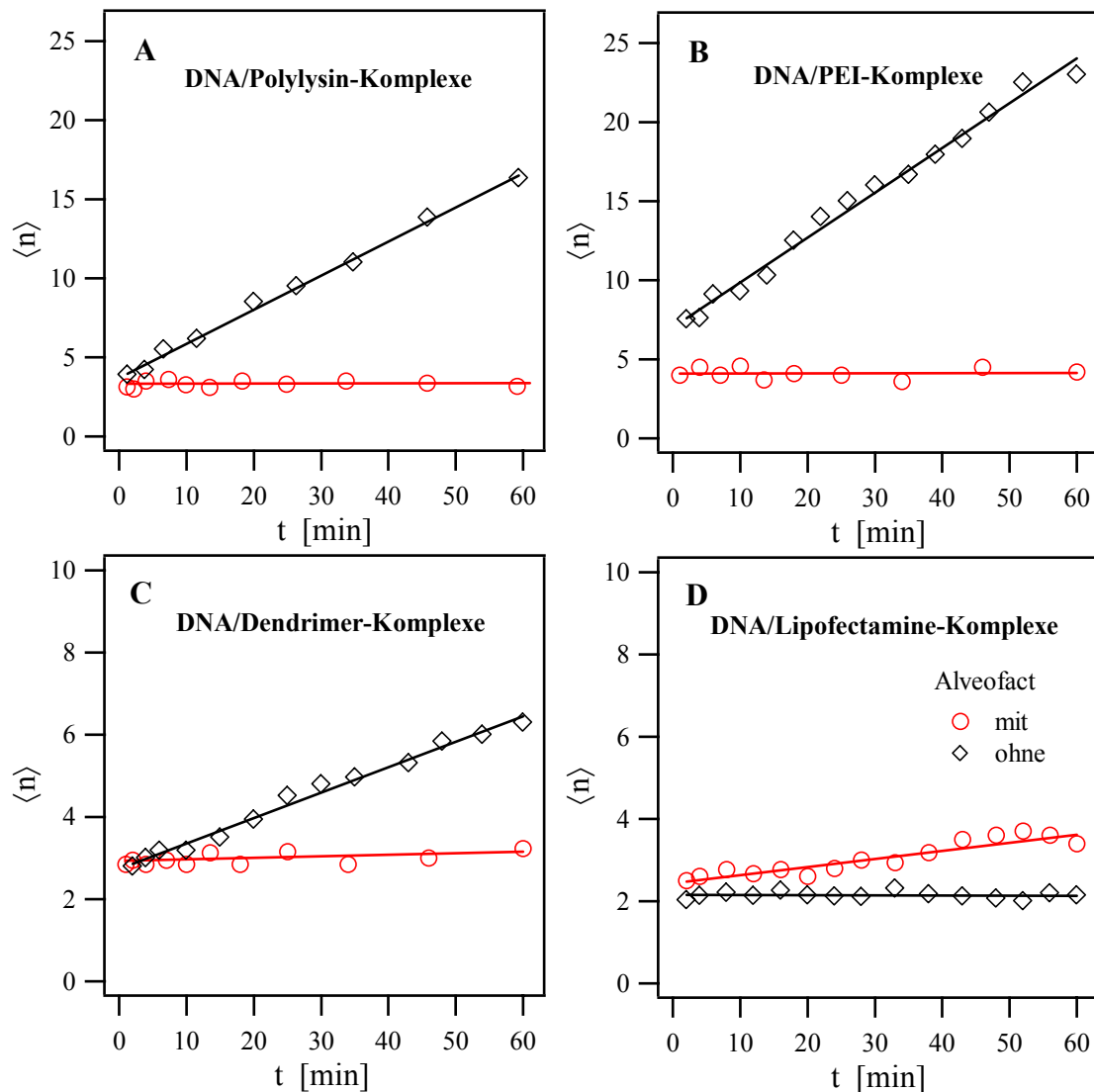


Abb. 5.12: Einfluss von Alveofact ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) auf die Aggregationskinetik der untersuchten Gentransfer-Komplexe in 10 mM NaCl, 1 mM HEPES und pH 7. Die Massenverhältnisse (w/w) der DNA zu den kationischen Transfektionsreagenzien sind für Polylysin 1:1.3 (A), PEI 1:0.7 (B), Dendrimeren 1:2 (C) und Lipofectamine 1:10.7 (D). Es ist die mittlere Zahl der Plasmide pro Gentransfer-Komplex in Abhängigkeit von der Aggregationszeit angegeben. Die Ordinate hat für die Dendrimer- und Lipofectamine-Komplexe eine andere Skalierung.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Proteine und/oder die Phospholipide des Alveofact für die Stabilisierung der Polyplexe verantwortlich sind. Da für diese Experimente keine reinen Surfactant-Proteine zur Verfügung standen, wurde für diese Untersuchungen Albumin verwendet. Das Protein wird in der Leber gebildet und in hohen Mengen in das Blut abgegeben. Des weiteren kamen in den Messungen beschallte anionische PC/PS-Vesikel (9:1) zum Einsatz, die ein geeignetes Modellsystem für die Phospholipide des

Alveofact darstellen. Abb. 5.13 zeigt den Einfluss des Proteins und der PC/PS-Vesikel auf die Aggregationskinetik der Polylysin- und Lipofectamine-Komplexe in einem Puffer mit hoher Ionenkonzentration (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7). In den Experimenten wurden $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Albumin und $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ PC/PS-Vesikel eingesetzt. Es ist die mittlere Zahl der Plasmide pro Komplex als Funktion der Zeit aufgetragen. Die Inkubation mit Albumin oder PC/PS-Vesikel inhibierte die kolloidale Aggregation der DNA/Polylysin-Komplexe. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Kinetik zwischen Alveofact und PC/PS-Vesikel. In beiden Fällen befanden sich im Mittel ~ 3 -4 Plasmide in einem Komplex. Nach der Zugabe von Albumin bildeten sich locker gebundene DNA/Polylysin-Komplexe, die nur noch aus einem einzelnen Plasmid bestanden. Obwohl die Diffusionszeit der DNA/Polylysin-Komplexe mit Albumin der von freien Plasmiden entsprach, kann eine Dissoziation der Komplexe für die eingesetzten Proteinkonzentrationen ausgeschlossen werden (Dash et al., 1999).

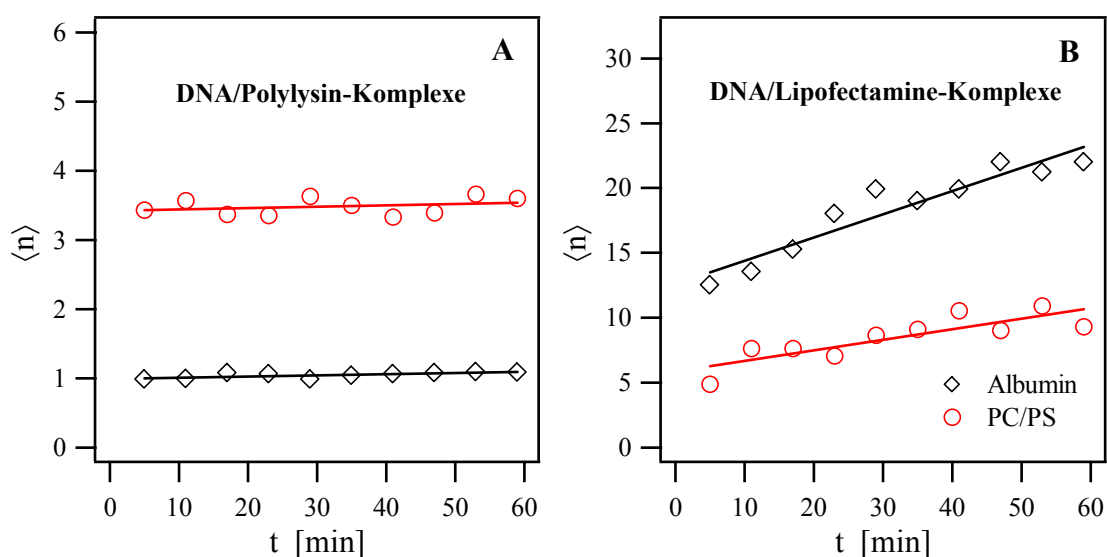


Abb. 5.13: Effekt von Albumin und PC/PS-Vesikel (9:1) auf die Aggregationskinetik von Polylysin- und Lipofectamine-Komplexe für eine hohe Ionenkonzentration im Puffer (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7). Es ist die mittlere Zahl der Plasmide pro Komplex als Funktion der Zeit angegeben. Die Proteine und PC/PS-Vesikel inhibieren die kolloidale Aggregation der Polyplexe. Im Gegensatz dazu führen sie bei den Lipoplexen zu einer deutlich schnelleren Aggregation als unter dem Einfluss von Alveofact.

Die DNA/Lipofectamine-Komplexe zeigen auch hier ein ganz anderes Verhalten. So induzierte die Zugabe von Albumin oder der PC/PS-Vesikel eine langsame kolloidale Aggregation der Lipoplexe. Die Kinetik der Komplexe ist unter der Einwirkung der anionischen Vesikel geringfügig schneller als bei Alveofact. Es kann also davon aus-

gegangen werden, dass die kolloidale Aggregation hauptsächlich auf die Fusion der verschiedenen Lipide der Komplexe mit denen der Vesikel zurückzuführen ist. Die Präsenz von Albumin verdoppelte die Geschwindigkeit der kolloidalen Aggregation der Lipoplexe. Durch die Adsorption von Albumin auf der Oberfläche der Komplexe nahm das positive Zetapotential und damit die repulsiven elektrostatischen Kräfte zwischen den Teilchen ab, die für die Stabilisierung des kolloidalen Systems verantwortlich sind.

Modell der kolloidalen Aggregation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen

Die dargestellten Ergebnisse lassen sich mit dem folgenden Modell der kolloidalen Aggregation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen beschreiben (Abb. 5.14):

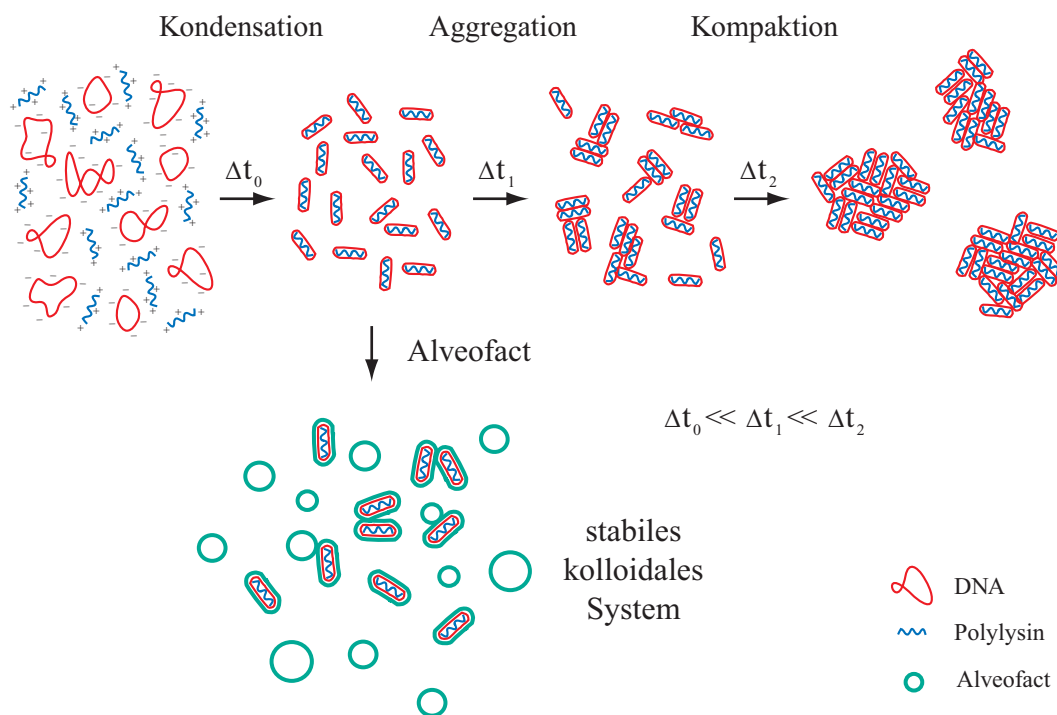


Abb. 5.14: Modell der kolloidalen Aggregation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen. Nach der Kondensation der DNA mit den kationischen Polymeren entstehen kleine monodisperse Einheiten, die im folgenden zu immer größeren Komplexen aggregieren. Der Prozess ist erst dann abgeschlossen, wenn sich ein sogenanntes „Superaggregat“ gebildet hat. Die Zugabe von Alveofact führt zur Beschichtung (Opsonisation) der polymerbasierten Gentransfer-Komplexe und inhibiert die kolloidale Aggregation.

Die Formation von polymerbasierten Gentransfer-Komplexen ist in diesem Modell ein mehrstufiger Prozess, der sich durch Kondensation, Aggregation und Kompaktion be-

schreiben lässt. In einem Zeitintervall Δt_0 bilden sich durch Kondensation der DNA mit den kationischen Polymeren kleine monodisperse Einheiten. Die Kondensation läuft durch die elektrostatische Anziehung der verschiedenen Komponenten im allgemeinen sehr schnell ab. Ein weiterer Grund ist die Freisetzung der gebundenen Gegenionen, die zu einer Erhöhung der Entropie des gesamten Systems führen. Nach der Kondensation der DNA aggregieren die monodispersen Einheiten mit der Zeit (Δt_1) zu kleineren Komplexen. Die Kinetik der kolloidalen Aggregation ist hauptsächlich durch die Ionen-Konzentration in der Lösung und das Oberflächenpotential der Komplexe bestimmt. Über einen längeren Zeitraum (Δt_2) fusionieren die Aggregate zu immer größeren Komplexen. Dieser Prozess wird als Kompaktion bezeichnet und ist erst dann abgeschlossen, wenn ein sogenanntes „Superaggregat“ entstanden ist. Die Zugabe von Alveofact führt zu einer Beschichtung (Opsonisation) und damit zu einer Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der polymerbasierten Gentransfer-Komplexe. Repulsive sterische Wechselwirkungen zwischen den beschichteten kolloidalen Teilchen inhibieren die weitere kolloidale Aggregation.

5.4 Transportverhalten in Polymer-Netzwerken

5.4.1 Theoretische Grundlagen

Der kolloidale Transport in Polymerlösungen wird im allgemeinen durch Partikel/Partikel- und Partikel/Polymer-Wechselwirkungen bestimmt. Für verdünnte kolloidale Lösungen lassen sich jedoch die Partikel/Partikel-Wechselwirkungen vernachlässigen. Dies gilt auch für die folgenden Experimente zum Transportverhalten von Gentransfer-Komplexen. Der Reibungskoeffizient der Partikel ist im Polymer-Netzwerk von der lokalen oder mikroskopischen Viskosität abhängig. Sie muss jedoch von der makroskopischen Viskosität der Polymerlösung unterschieden werden, die eigentlich nur für kontinuierliche viskose Medien definiert ist. Entscheidend für das Transportverhalten ist die Größe der kolloidalen Partikel relativ zur Maschenweite des Polymer-Netzwerks. Sind die Partikel größer als die Maschenweite, dann kann die Polymerlösung als ein kontinuierliches Medium mit einer definierten makroskopischen Viskosität betrachtet werden. Im Gegensatz dazu erfahren kleinere oder mit der Maschenweite vergleichbare Partikel die lokale Viskosität im Polymer-Netzwerk. Die Messung der makroskopischen Viskosität erfolgt mit einem Viskosimeter, während mit mikroskopischen Methoden wie FCS die lokale Diffusionskonstante D_c der Partikel als Funktion der Polymer-Konzentration c_p bestimmt werden kann. Mit der Stokes-Einstein-Relation lässt sich bei bekanntem hydrodynamischen Radius des Partikels die mikroskopische Viskosität berechnen:

$$D_c(c_p) = \frac{k T}{6 \pi \eta_c(c_p) R_h} \quad (\text{Gl. 5.5})$$

Es bedeuten k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und R_h den hydrodynamischen Radius der Partikel. Gl. 5.5 wird im allgemeinen auf kolloidale Systeme von nicht wechselwirkenden sphärischen Teilchen angewendet. In verschiedenen Experimenten wurden Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation beobachtet. Es lassen sich prinzipiell drei Bereiche unterscheiden. Positive und negative Abweichungen sind durch die Ungleichungen $D_c(c_p)\eta_p/D_c(0)\eta_0 > 1$ bzw. $D_c(c_p)\eta_p/D_c(0)\eta_0 < 1$ definiert. Verhalten sich kolloidale Systeme nach der Stokes-Einstein-Relation, dann gilt die Gleichung: $D_c(c_p)\eta_p/D_c(0)\eta_0 = 1$. Hierbei sind η_p die makroskopische Viskosität, $D_c(0)$ die gemessene mikroskopische Diffusionskonstante im Puffer und η_0 die Viskosität des Lösungsmittels.

Die Gründe für die Abweichungen vom idealen Verhalten sind noch nicht genau verstanden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass sie aus direkten oder indirekten Wechsel-

wirkungen zwischen den kolloidalen Teilchen und den Polymeren resultieren. Auch andere Effekte wie die mikroskopische Struktur des Netzwerks, die Adsorption von Polymeren auf der Partikeloberfläche oder die Bildung von Kolloid/Polymer-Aggregaten können eine Rolle spielen (Gold et al., 1996).

Die numerische Anpassung der gemessenen mikroskopischen Diffusionskonstante $D_c(c_p)$ als Funktion der Polymer-Konzentration wird in der Literatur mit einer sogenannten „gestreckten“ Exponentialfunktion⁸ vorgenommen (Busch et al., 2000; Langevin und Rondelez, 1978; Ye und Tong, 1998):

$$D_c(c_p) = D_c(0) \exp[-(\gamma c_p)^\nu] \quad (\text{Gl. 5.6})$$

Hierbei sind $D_c(0)$ die Diffusionskonstante der Partikel im reinen Lösungsmittel, γ und ν die freien Parameter im Exponenten der Funktion. Die aus der numerischen Anpassung gewonnenen Werte für den Parameter ν sollten dabei im Intervall von 0.55 bis 1 liegen. Um die Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation bei der Diffusion eines Partikels durch ein Polymer-Netzwerk berechnen zu können, muss die makroskopische Viskosität einer Polymerlösung mit einem Viskosimeter bestimmt werden. Die makroskopische Viskosität η_p kann als Funktion von der eingesetzten Polymerkonzentration c_p mit einer parabolischen Funktion beschrieben werden (Davidson et al., 1987):

$$\eta_p = \eta_0 \left(1 + [\eta] c_p + k_H ([\eta] c_p)^2 \right) \quad (\text{Gl. 5.7})$$

Es bezeichnen $[\eta]$ die intrinsische Viskosität des Polymers, η_0 die Viskosität des Lösungsmittels und k_H der Huggins-Koeffizient. Der Zusammenhang der intrinsischen Viskosität mit dem Molekulargewicht des Polymers ist durch die Formel $[\eta] = 2.05 \times 10^{-2} M_p^{0.73} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ gegeben (Ye und Tong, 1998).

⁸ In der Literatur als *stretched exponential function* bezeichnet.

5.4.2 Resultate und Diskussion

Vor den Experimenten zum Transport von Gentransfer-Komplexen in Mucin wurde die Diffusion extrudierter Vesikel unterschiedlicher Größe und Ladung im Polymer-Netzwerk systematisch untersucht. Extrudierte Vesikel stellen ein geeignetes Modellsystem dar, da sie eine definierte Größe haben und bereits zum Transport von pharmazeutischen Substanzen eingesetzt werden. Die Fluoreszenzmarkierung der Vesikel erfolgte mit dem neutralen Phospholipid NBD-C₁₂-HPC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), bei dem an eine Alkylkette mit 12 Kohlenstoffatomen der Fluorophor NBD kovalent gebunden ist. Jedes Vesikel war im Mittel mit ~10 NBD-C₁₂-HPC Farbstoffen markiert. Zu jedem Datenpunkt wurden 5 Autokorrelationskurven mit einer Messzeit von 60 s aufgenommen, die mittlere Diffusionszeit der Vesikel durch den Laserfokus bestimmt und daraus die Diffusionskonstante im Polymer-Netzwerk berechnet.

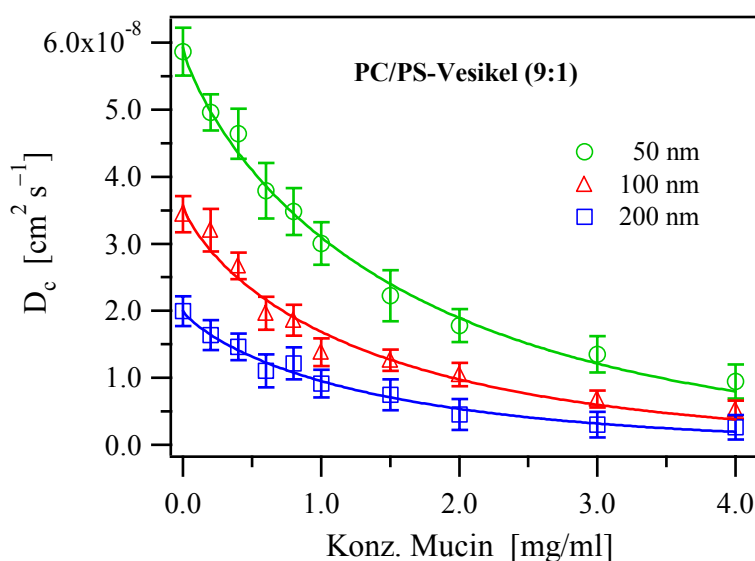


Abb. 5.14: Diffusionskonstante von anionischen PC/PS-Vesikel (9:1) mit einem Durchmesser von 50 nm (○), 100 nm (△) und 200 nm (□) als Funktion der Mucin-Konzentration in 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und pH 7. Die Werte nahmen mit der steigenden Polymer-Konzentration und Größe der Vesikel kontinuierlich ab. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde in beiden Graphen mit Gl. 5.6 vorgenommen.

In Abb. 5.14 ist die Diffusionskonstante von anionischen PC/PS-Vesikel (9:1) mit einem Durchmesser von 50 nm (○), 100 nm (△) und 200 nm (□) als Funktion der Mucin-Konzentration in 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und pH 7 dargestellt. Eine Korrektur der endlichen Ausdehnung nach Gl. 3.4 war nur für die Experimente mit den 200 nm Vesikel notwendig. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde in beiden Graphen mit

Gl. 5.6 vorgenommen. Die Diffusionskonstante der anionischen Vesikel im negativ geladenen Polymer-Netzwerk nahm als Funktion der Mucin-Konzentration für alle untersuchten Größen exponentiell ab. Je kleiner die eingesetzten Vesikel waren, desto höhere Diffusionskonstanten wurden gemessen. Für die PC/PS-Vesikel (9:1) konnten keine signifikanten Abweichungen vom Stokes-Einstein-Verhalten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss die Oberflächenladung der Vesikel auf die Diffusion in einem negativ geladenen Polymer-Netzwerk hat. In Abb. 5.15 sind die Diffusionskonstanten für 100 nm Vesikel aus POPC (∇), PC/PS 9:1 (\triangle) und 1:1 (\diamond) in Abhängigkeit von der Mucin-Konzentration angegeben. Für die neutralen Vesikel ist schon bei geringen Mucin-Konzentrationen ein drastischer Abfall der Diffusionskonstante zu erkennen. Die gemessenen Datenpunkte der neutralen Vesikel lassen sich jedoch für höhere Mucin-Konzentrationen mit Gl. 5.6 nicht mehr richtig beschreiben, was durch eine gestrichelte Linie angedeutet ist. Je niedriger die negative Oberflächenladung der Vesikel ist, desto steiler verlaufen die exponentiell abnehmenden Kurven. Der Grund für dieses Verhalten ist vermutlich auf die reversible Bindung der Vesikel am Polymer-Netzwerk zurückzuführen. Nach einer mittleren Bindungsdauer können die Vesikel jedoch wieder vom Netzwerk dissoziieren. Zwischen der Adsorption und der Dissoziation stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein. Findet kein aktiver Transport entlang der Filamente statt, dann können die Vesikel nur im ungebundenen Zustand durch das Netzwerk diffundieren. Je stärker die Bindung zu den Polymeren ist, desto geringer ist die Diffusion der Partikel im Netzwerk. Im vorliegenden Fall nahmen die repulsiven elektrostatischen Kräfte mit der negativen Ladung der Vesikel zu. Auf Grund der geringeren Affinität zum Polymer-Netzwerk wurden höhere Werte für die Diffusionskonstante gemessen.

Darüber hinaus hat auch das sogenannte „ausgeschlossene“ Volumen⁹ einen Einfluss auf die Diffusion im Polymer-Netzwerk. Es ist durch das Volumen der Raumbereiche definiert, die von den Polymeren eingenommen werden und für die Diffusion der kolloidalen Partikel nicht zur Verfügung stehen. Neben den molekularen Abmessungen spielt im Fall geladener Partikel und Polymere auch die Ausdehnung der diffusen elektrischen Doppelschicht eine Rolle, die durch die Debye-Hückel-Abschirmlänge gegeben ist. Nach diesem Modell ist die Diffusionskonstante im allgemeinen direkt proportional zum relativen Anteil des zugänglichen Volumens, das sich aus der Differenz des gesamten zum ausgeschlossenen Volumen berechnet (Busch et al., 2000). Im konkreten Fall führen die repulsiven elektrostatischen Kräfte zwischen Vesikel und Polymer-Netzwerk zu einer Erhöhung des ausgeschlossenen Volumens. Auf Grund der hohen Salzkonzentrationen in

⁹ In der Literatur unter dem Ausdruck *excluded volume* bekannt.

der Polymerlösung und den daraus folgenden geringen Debye-Hückel-Abschirmmlängen kann dieser Effekt in erster Näherung vernachlässigt werden. Der in Abb. 5.15 beobachtete Einfluss der Oberflächenladung auf das Transportverhalten ist hauptsächlich auf die reduzierte Bindung der Vesikel an das Polymer-Netzwerk zurückzuführen.

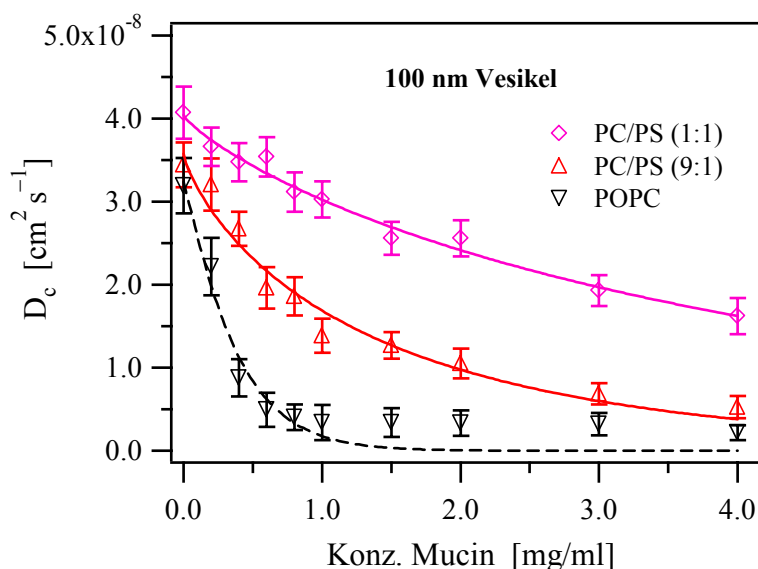


Abb. 5.15: Einfluss der Oberflächenladung auf die Diffusion im negativ geladenen Mucin-Netzwerk. Es sind die Diffusionskonstanten für 100 nm Vesikel aus POPC (∇), PC/PS 9:1 (\triangle) und 1:1 (\diamond) gegen die Mucin-Konzentration aufgetragen. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde in beiden Graphen mit Gl. 5.6 vorgenommen.

Um die Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation bei der Diffusion eines Partikels durch ein Polymer-Netzwerk berechnen zu können, muss die makroskopische Viskosität der Polymerlösung bestimmt werden. Die Messungen der Viskosität erfolgten mit einem Ubbelohde Viskosimeter in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 22 °C. In Abb. 5.16 ist die makroskopische Viskosität der Mucin-Lösung als Funktion der Polymerkonzentration aufgetragen. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde mit der parabolischen Funktion aus Gl. 5.7 vorgenommen. Für geringe Polymerkonzentrationen könnte in erster Näherung auch eine lineare Funktion angesetzt werden. Aus der numerischen Anpassung folgten die Werte für die intrinsische Viskosität $[\eta] = (2.76 \pm 0.22) \times 10^3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ und den Huggins-Koeffizienten $k_H = 0.42 \pm 0.03$. Eine Berechnung der intrinsischen Viskosität von Mucin mit der Formel $[\eta] = 2.05 \times 10^{-2} M_p^{0.73} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (Anmerkung zu Gl. 5.7) lieferte unter der Annahme eines mittleren Molekulargewichts von $1 \times 10^4 \text{ kDa}$ einen Wert von $[\eta] = 2.64 \times 10^3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. In beiden Fällen zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Werten vergleichbarer Polymerlösungen.

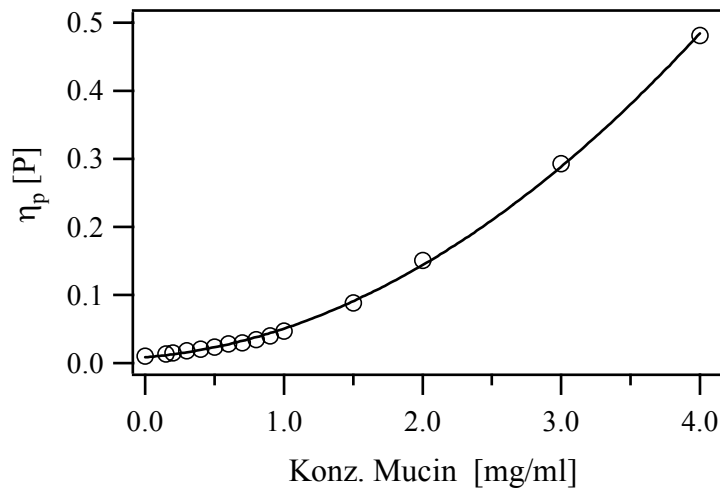


Abb. 5.16: (A) Makroskopische Viskosität der Mucin-Lösung in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration. Die Kurve kann mit der parabolischen Funktion aus Gl. 5.7 beschrieben werden.

Die Diffusion kolloidaler Partikel in einem Polymer-Netzwerk kann durch den folgenden dimensionslosen Quotienten $D_c(c_p)\eta_p/D_c(0)\eta_0$ charakterisiert werden. Es setzt die gemessenen mikroskopischen Diffusionskonstanten in Relation zur makroskopischen Viskosität der Polymerlösung. Verhalten sich die kolloidalen Partikel nach der Stokes-Einstein-Relation, dann hat der dimensionslose Quotient den Wert 1 und es gilt die Gleichung: $D_c(c_p)\eta_p = D_c(0)\eta_0$. In Abb. 5.17 sind die Abweichungen vom idealen Verhalten für die 100 nm Vesikel aus POPC (∇), PC/PS 9:1 (\triangle) und 1:1 (\diamond) als Funktion von der Mucin-Konzentration dargestellt. Für die neutralen Vesikel wurde schon bei niedrigen Polymer-Konzentrationen eine signifikante negative Abweichung vom Stokes-Einstein-Verhalten beobachtet. Die Diffusion durch das Netzwerk ist deutlich geringer als dies durch die makroskopische Viskosität der Polymerlösung zu erwarten wäre. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die reversible Bindung der POPC-Vesikel an das negativ geladene Polymer-Netzwerk zurückzuführen. Im Unterschied dazu kann die Diffusion der PC/PS-Vesikel (9:1) mit der Stokes-Einstein-Relation beschrieben werden. Geringe negative Abweichungen vom idealen Verhalten ergaben sich erst ab einer Mucin-Konzentration von 2 mg/ml. In diesem Fall ist die Diffusion der Vesikel so, als würden sie sich in einem kontinuierlichen viskosen Medium bewegen. Vermutlich spielt die Bindung der Vesikel an das Polymer-Netzwerk auf Grund der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung kaum noch eine Rolle. Die PC/PS-Vesikel (1:1) zeigten schon für niedrige Mucin-Konzentrationen signifikante positive Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation. Eine plausible Erklärung für dieses Verhalten wäre, dass die Vesikel frei durch die Maschen des Polymer-Netzwerks diffundieren können und dadurch einem geringeren

lokalen Reibungskoeffizienten ausgesetzt sind als dies der makroskopischen Viskosität der Polymerlösung entsprechen würde.

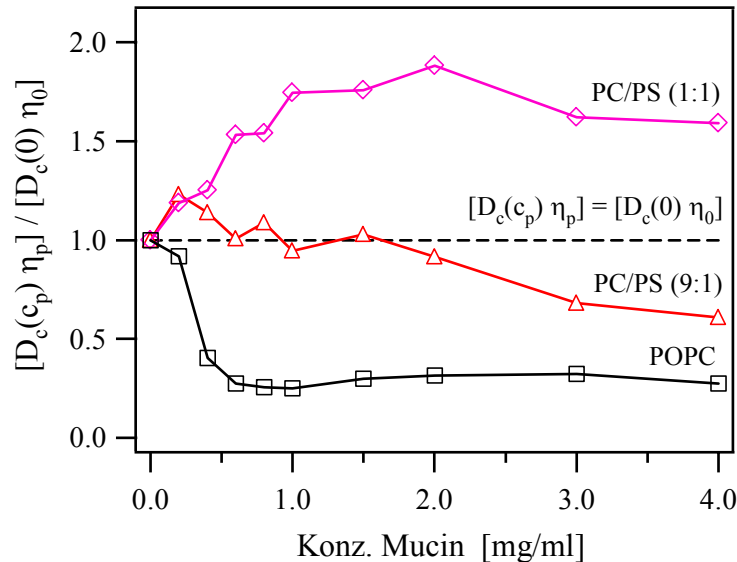


Abb. 5.17: Abweichungen vom Stokes-Einstein-Verhalten für 100 nm Vesikel aus POPC (∇), PC/PS 9:1 (\triangle) und 1:1 (\diamond) in Abhängigkeit von der Mucin-Konzentration. POPC und PC/PS-Vesikel (1:1) zeigten negative bzw. positive Abweichungen vom idealen Verhalten. Im Unterschied dazu kann die Diffusion der PC/PS-Vesikel (9:1) für Konzentrationen bis 2 mg/ml mit der Stokes-Einstein-Relation beschrieben werden.

Das Diffusionsverhalten anionischer Vesikel wurde zum Vergleich auch in einem positiv geladenen Kollagen-Netzwerk untersucht. Kollagene sind eine Familie von verschiedenen filamentartigen Proteinen der extrazellulären Matrix. Sie stellen den Hauptbestandteil von Haut und Knochen dar und sind die am häufigsten vorkommenden Proteine in allen Säugtieren (25% an der gesamten Proteinmasse). Typische Kollagen-Moleküle bestehen aus drei Polypeptidketten, die zu einer ~ 300 nm langen, relativ steifen Superhelix gewunden sind. Die folgenden Experimente wurden mit Kollagen von Typ-I (Biomol, Hamburg) durchgeführt. In Abb. 5.18 sind die Diffusionskonstanten für 100 nm Vesikel aus POPC (∇), PC/PS 9:1 (\triangle) und 1:1 (\diamond) als Funktion der Kollagen-Konzentration angegeben. Auch in diesem Fall hat die Oberflächenladung der Vesikel einen entscheidenden Einfluss auf die Diffusion im Polymer-Netzwerk. So ist für die PC/PS-Vesikel (1:1) schon bei geringen Kollagen-Konzentrationen ein drastischer Abfall der Diffusionskonstante zu beobachten. Je kleiner die negative Ladung der Vesikel ist, desto flacher verlaufen die exponentiell abfallenden Kurven. Die numerische Anpassung der Datenpunkte erfolgte wieder mit Gl. 5.6. Wie schon im Zusammenhang mit der Abb. 5.15 erläutert, lassen sich die Unterschiede in der Diffusion auf die reversible Bindung der anionischen Vesikel an das positiv geladene Kollagen-Netzwerk zurückführen. Je stärker die Bindung auf Grund

der elektrostatischen Anziehung zwischen Vesikel und Polymer ist, desto geringer ist die Diffusion in der Polymerlösung.

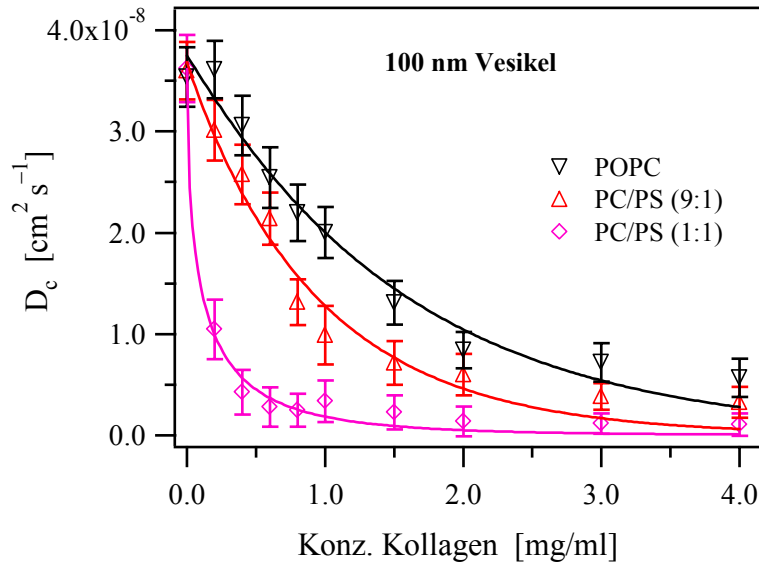


Abb. 5.18: Diffusionsverhalten von anionischen 100 nm Vesikel in einem leicht positiv geladenen Kollagen-Netzwerk. Im Unterschied zu Abb. 5.15 laufen die Diffusionsprozesse um so langsamer ab, je höher die negative Oberflächenladung der Vesikel ist. Es sind die Diffusionskonstanten für die Vesikel aus POPC (∇), PC/PS 9:1 (\triangle) und 1:1 (\diamond) aufgetragen.

Das Transportverhalten von synthetischen Gentransfer-Komplexen im Mucin-Netzwerk wurde in einem Puffer mit geringerer Ionenkonzentration (10 mM NaCl, 1 mM HEPES und pH 7) untersucht, um den Einfluss der kolloidalen Aggregation auf die Diffusion der Komplexe zu minimieren. In Abb. 5.19A ist die Diffusionskonstante von DNA/Polylysin-Komplexen mit einer zweifach positiven (\diamond) und negativen (\circ) Überschussladung als Funktion der Mucin-Konzentration dargestellt. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde mit Gl. 5.6 vorgenommen. Auch in diesem Fall spielt die Ladung der kolloidalen Partikel beim Transport durch das Netzwerk eine zentrale Rolle. Bei den positiv geladenen DNA/Polylysin-Komplexen ist ein drastischer Abfall in der Diffusionskonstante für geringe Polymer-Konzentrationen zu erkennen. Der Grund für dieses Verhalten ist vermutlich auch hier auf die reversible Bindung der Komplexe an das Polymer-Netzwerk zurückzuführen. Im Gegensatz dazu ist für die Komplexe mit der zweifach negativen Überschussladung eine deutlich geringere Abnahme der Diffusionskonstanten als Funktion der Mucin-Konzentration zu beobachten. Der effizientere Transport resultiert aus der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung und der damit verbundenen geringeren Affinität der Komplexe zum Polymer-Netzwerk. Die Diffusionskonstanten der positiv und negativ geladenen Komplexe haben im reinen Puffer nach der

Stokes-Einstein-Relation einen hydrodynamischen Radius von ~ 75 nm. Des weiteren wurde auch der Transport von DNA/PEI- und DNA/Dendrimer-Komplexen untersucht. Es zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie bei den DNA/Polylysin-Komplexen (Daten nicht dargestellt).

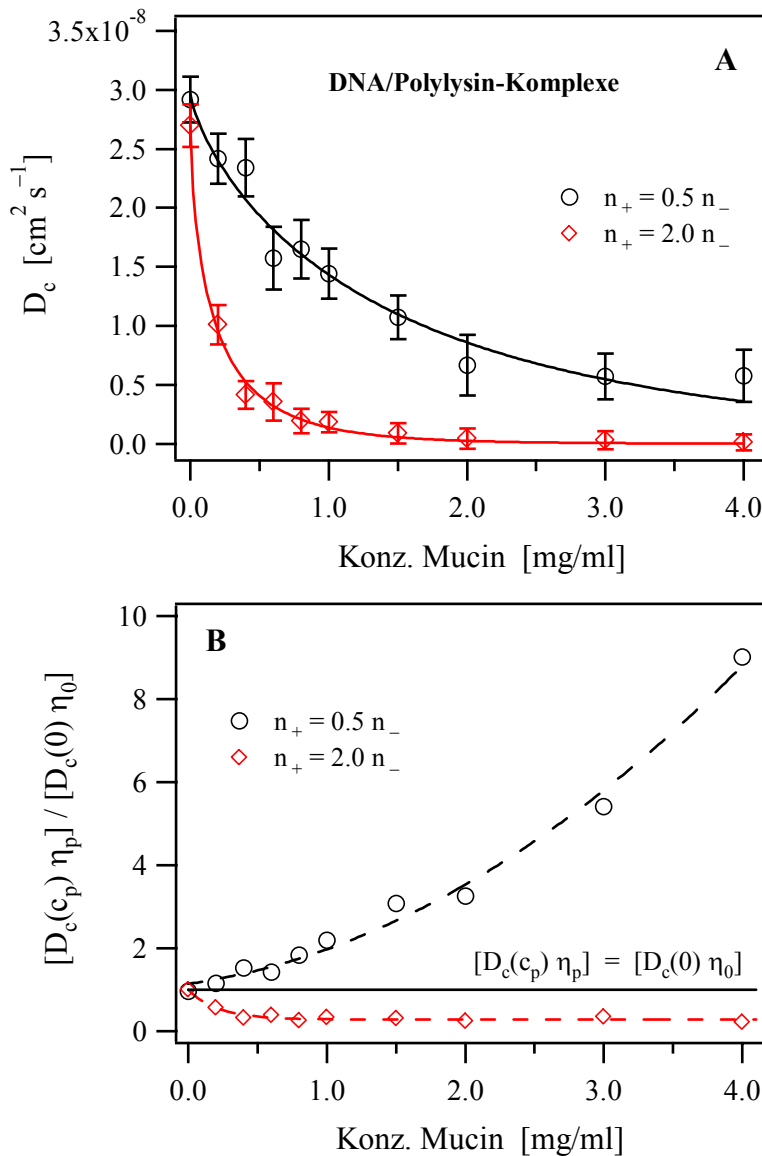


Abb. 5.19: (A) Diffusionskonstante von DNA/Polylysin-Komplexen mit zweifach positiver (\circ) und negativer (\diamond) Überschussladung als Funktion der Mucin-Konzentration in 10 mM NaCl, 1 mM HEPES und pH 7. Bei den positiv geladenen DNA/Polylysin-Komplexen ist auf Grund der Bindung an das Polymer-Netzwerk ein drastischer Abfall in der Diffusionskonstante zu erkennen. Dagegen zeichnen sich die negativ geladenen Komplexe durch einen effizienteren Transport durch das Polymer-Netzwerk aus. (B) Die kationischen DNA/Polylysin-Komplexe zeigten negative Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation, während für die anionischen Komplexe positive Abweichungen vom idealen Verhalten beobachtet wurden. Die gestrichelten Linien sollen den Kurvenverlauf andeuten.

In Abb. 5.19B sind die Abweichungen von der Stokes-Einstein-Relation für die DNA/Polylysin-Komplexe in Abhängigkeit von der Mucin-Konzentration aufgetragen. Für die positiv geladenen Komplexe ist schon bei niedrigen Polymerkonzentrationen eine negative Abweichung vom idealen Verhalten zu erkennen. Die Diffusion ist durch die reversible Bindung der Komplexe an das Netzwerk geringer als dies durch die makroskopische Viskosität der Polymerlösung zu erwarten wäre. Dagegen zeigten die Komplexe mit der zweifach negativen Überschussladung signifikante positive Abweichungen vom Stokes-Einstein-Verhalten. Der dimensionslose Quotient $D_c(c_p)\eta_p/D_c(0)\eta_0$, der die gemessene lokale Diffusionskonstante in Relation zur makroskopischen Viskosität der Polymerlösung setzt, nahm als Funktion der Mucin-Konzentration kontinuierlich bis auf einem Wert von ~ 9 zu. Sind die Komplexe kleiner als die Maschenweite des Polymer-Netzwerks, dann wird das Diffusionsverhalten im allgemeinen durch die mikroskopische Struktur des Systems bestimmt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Komplexe durch die Maschen des Polymer-Netzwerks diffundieren können und dadurch einem geringeren lokalen Reibungskoeffizienten ausgesetzt sind. Darüber hinaus kann eine Bindung der Komplexe an das Polymer-Netzwerk auf Grund der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen zur Aggregationskinetik haben ergeben, dass Polyplexe nach einer Inkubation mit Alveofact ein stabiles kolloidales System darstellen und im Mittel aus 3-5 Plasmiden pro Komplex bestehen. Die Inhibierung der kolloidalen Aggregation wurde mit der Adsorption (Opsonisation) von Alveofact auf der Oberfläche und einer damit verbundenen Umladung der positiv geladenen Polyplexe erklärt. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss Alveofact auf das Transportverhalten der Gentransfer-Komplexe im Polymer-Netzwerk hat. In Abb. 5.20 ist die Diffusionskonstante von positiv geladenen DNA/Polylysin-Komplexen nach der Inkubation mit Alveofact in Abhängigkeit von der Mucin-Konzentration angegeben. Für die Messungen wurde ein Puffer aus 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und pH 7 verwendet. Bei einem Vergleich mit Abb. 5.19A sind deutliche Unterschiede im Transportverhalten der positiv geladenen Komplexe mit und ohne Einwirkung von Alveofact zu erkennen. Die DNA/Polylysin-Komplexe mit der positiven Überschussladung verhalten sich nach der Inkubation mit Alveofact sogar wie die negativ geladenen Komplexe. Dies ist eine Bestätigung für die Annahme, dass die Adsorption von Alveofact zu einer Umladung der kationischen DNA/Polylysin-Komplexe führt. Entsprechende Experimente zum Transportverhalten von DNA/PEI- und DNA/ Dendrimer-Komplexen zeigten unter dem Einfluss von Alveofact ein ähnliches Verhalten (Daten nicht dargestellt).

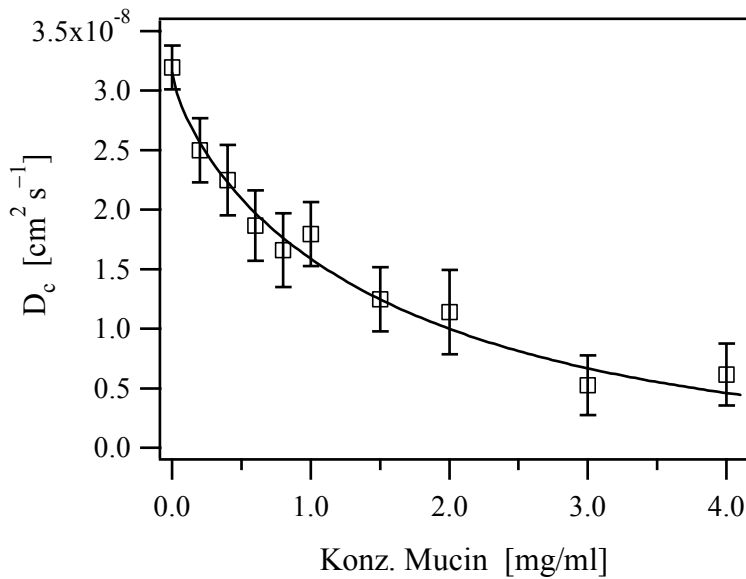


Abb. 5.20: Einfluss von Alveofact auf das Transportverhalten von DNA/Polylysin-Komplexen mit einer zweifach positiven Überschussladung in 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und pH 7. Die numerische Anpassung der Datenpunkte wurde mit Gl. 5.6 vorgenommen. Die Adsorption (Opsonisation) von Alveofact führt zu einer Umladung der positiv geladenen DNA/Polylysin-Komplexe.

Die beschriebenen Experimente haben demonstriert, dass ein effektiver Transport durch die Mucusschicht nur für kleine synthetische Gentransfer-Komplexe mit einer hohen negativen Oberflächenladung möglich ist. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den gewonnenen Erkenntnissen aus *in vitro* Transfektionsexperimenten. So zeigen Gentransfer-Komplexe mit einer optimierten positiven Überschussladung eine hohe Effizienz bei der Transfektion, da sie unspezifisch über negativ geladene Proteoglykane an die Plasmamembran binden können bevor sie durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Dies gilt im besonderen für die Wechselwirkung mit dem Heparan Sulphat Proteoglycan Rezeptor (Mislick und Baldeschwieler, 1996; Mounkes et al., 1998). Darüber hinaus spielt auch die Größe der Gentransfer-Komplexe bei der Sedimentation auf die Zelloberfläche und dem Aufbrechen des Endosoms eine Rolle. Die Aufnahme von kleineren Komplexen reduziert die Wahrscheinlichkeit für das Aufbrechen des Endosoms durch osmotische Schwellung (Ogris et al., 1998).

Bei der Behandlung der Mukoviszidose werden synthetische Gentransfer-Komplexe in der Regel auf topischem Weg in Form eines Aerosols oder durch das direkte Auftragen auf dem betroffenen Gewebe appliziert. In diesem Fall müssen die Komplexe in einer endlichen Zeit die extrazellulären Barrieren überwinden, bevor sie inaktiviert oder durch das Schlagen der Zilien aus der Lunge entfernt werden. Um einen effektiven Transport durch

die Mucusschicht zu erreichen, könnten positiv geladene Gentransfer-Komplexe mit einer anionischen Lipidmembran und/oder Proteinen beschichtet werden. In dieser Arbeit wurde für kationische DNA/Polylysin-Komplexe nach der Inkubation mit Alveofact ein besseres Transportverhalten durch ein Mucin-Netzwerk beobachtet. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Adsorption von Alveofact (Opsonisation) auf der Oberfläche der Gentransfer-Komplexe zurückzuführen. Zetapotential-Messungen an DNA/Polylysin-Komplexen konnten einen signifikanten Einfluss von Albumin auf die Oberflächenladung der Komplexe zeigen (Dash et al., 1999). So führten in diesem Fall hohe Konzentrationen an Albumin zu einer Umladung der Komplexe. Darüber hinaus könnte eine Beschichtung der Gentransfer-Komplexe mit einem natürlichen Surfactant eine Inaktivierung durch das Immunsystem verhindern, die Zytotoxizität reduzieren und vor einer Dissoziation durch extrazelluläre Matrix-Proteine schützen. Des Weiteren stellen beschichtete Komplexe eine zeitlich stabile monodisperse Suspension auch unter physiologischen Bedingungen dar, was für die klinische Anwendung von Interesse ist. Gentransfer-Komplexe mit einer anionischen Membranbeschichtung zeichnen sich im allgemeinen durch eine höhere Transfektions-effizienz und Biokompatibilität aus (Lee und Huang, 1996). Das Integrieren von speziellen Rezeptoren auf der Oberfläche würde die Bindung an die Plasmamembran und die Spezifität der beschichteten Komplexe erhöhen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen und Akronyme

bp	Basenpaar
DAG	Diacylglycerol
DLA	Diffusionslimitierte Aggregation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LUV	Große unilamellare Vesikel
MARCKS	Myristoyliertes Alanin-reiches C Kinase Substrat
NBD-C ₁₂ -HPC	2-(12-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino) dodecanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PEI	Polyethylenimin
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phosphoserin]
RLA	Reaktionslimitierte Aggregation
SUV	Kleine unilamellare Vesikel
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

6.2 Referenzen

- Adam, G., and M. Delbrück. 1968. Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. *In Structural Chemistry and Molecular Biology*. A. Rich and N. Davidson, Editors. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 198-215.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing. Pages.
- Allen, L. A., and A. Aderem. 1996. Mechanisms of phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 36-40.
- Aderem, A. 1992. The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* 71: 713-716.
- Arbuzova, A., D. Murray, and S. McLaughlin. 1998. MARCKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1376: 369-379.
- Arbuzova, A., A. A. P. Schmitz, and G. Vergeres. 2002. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem. J.* 362: 1-12.
- Arbuzova, A., J. Wang, D. Murray, J. Jacob, D. S. Cafiso, and S. McLaughlin. 1997. Kinetics of interaction of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate, membranes, and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 272: 27167-27177.
- Arbuzova, A., L. Wang, J. Wang, G. Hangyas-Mihalyne, D. Murray, B. Honig, and S. McLaughlin. 2000. Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry* 39: 10330-10339.
- Behr, J. P. 1994. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug. Chem.* 5: 382-389.
- Ben-Tal, N., B. Honig, C. Miller, and S. McLaughlin. 1997. Electrostatic binding of proteins to membranes. Theoretical predictions and experimental results with charybdotoxin and phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 73: 1717-1727.
- Berg, H. C., and E. M. Purcell. 1977. Physics of chemoreception. *Biophys. J.* 20: 193-219.
- Blackshear, P. J. 1993. The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* 268: 1501-1504.

- Boehringer, Editor 1998. Alveofact: Das natürliche Surfactant. Boehringer Ingelheim Pharma KG.
- Boussif, O., F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 7297-7301.
- Busch, N. A., T. Kim, and V. A. Bloomfield. 2000. Tracer diffusion of proteins in DNA solutions. 2. Green fluorescent protein in crowded DNA solutions. *Macromolecules* 33: 5932-5937.
- Caplen, N. J., X. Gao, P. Hayes, R. Elaswarapu, G. Fisher, E. Kinrade, A. Chakera, J. Schorr, B. Hughes, J. R. Dorin, D. J. Porteous, E. W. F. W. Alton, D. M. Geddes, C. Coutelle, R. Williamson, L. Huang, and C. Gilchrist. 1994. Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposome-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process. *Gene Ther.* 1: 139-147.
- Clamme, J. P., J. Azoulay, and Y. Mely. 2003. Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine/DNA Complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* 84: 1960-1968.
- Cullen, P. J. 2003. Calcium signalling: the ups and downs of protein kinase C. *Curr. Biol.* 13: R699-R701.
- Dash, P. R., M. L. Read, L. B. Barrett, M. A. Wolfert, and L. W. Seymour. 1999. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* 6: 643-650.
- Davidson, N. S., L. J. Fetters, W. G. Funk, N. Hadjichristidis, and W. W. Graessley. 1987. Measurement of chain dimensions in dilute polymer solutions: a light scattering and viscometric study of linear polyisoprene in cyclohexane. *Macromolecules* 20: 2614-2619.
- DiNitto, J. P., T. C. Cronin, and D. G. Lambright. 2003. Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci. STKE* 213: re16.
- Dorn, I. T., K. R. Neumaier, and R. Tampe. 1998. Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 2753-2763.
- Duncan, J. E., J. A. Whitsett, and A. D. Horowitz. 1997. Pulmonary surfactant inhibits cationic liposome-mediated gene delivery to respiratory epithelial cells in vitro. *Hum. Gene Ther.* 8: 431-438.

- Ellena, J. F., M. C. Burnitz, and D. S. Cafiso. 2003. Location of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) effector domain in negatively charged phospholipid bicelles. *Biophys. J.* 85: 2442-2448.
- Elson, E., and D. Magde. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* 13: 1-27.
- Elson, E. L. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic* 2: 789-796.
- Erbacher, P., J. S. Remy, and J. P. Behr. 1999. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* 6: 138-145.
- Ernst, N., S. Ulrichskotter, W. A. Schmalix, J. Radler, R. Galneder, E. Mayer, S. Gersting, C. Plank, D. Reinhardt, and J. Rosenecker. 1999. Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J. Gene Med.* 1: 331-340.
- Felgner, J. H., R. Kumar, C. N. Sridhar, C. N. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Broder, P. Ramsey, M. Martin, and P. L. Felgner. 1994. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Bio. Chem.* 269: 2550-2561.
- Felgner, P. L., Y. Barenholz, J. P. Behr, S. H. Cheng, P. R. Cullis, L. Huang, J. A. Jessee, L. Seymour, F. C. Szoka, A. R. Thierry, E. Wagner, and G. Wu. 1997. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* 8: 511-512.
- Galneder, R. 2001. Enzymkinetik von Phospholipase C und Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen. Eine Untersuchung mittels Laserfallen-kontrollierter Mikroelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie. *Physik-Department. Technische Universität, München.*
- Gambhir, A., G. Mihalyne, I. Zaitseva, D. S. Cafiso, J. Wang, D. Murray, S. N. Pentylala, S. O. Smith, and S. McLaughlin. 2004. Electrostatic sequestration of PIP₂ on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys. J.* 86: 2188-2207.
- Gill, D. R., S. K. W., K. A. Mofford, T. Seddon, L. Huang, F. Sorgi, A. Thomson, L. J. MacVinish, R. Ratcliff, D. Bilton, D. J. Lane, J. M. Littlewood, A. K. Webb, P. G. Middleton, W. H. Colledge, A. W. E. Cuthbert, M. J. Evans, C. F. Higgins, and S. C. Hyde. 1997. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4: 199-210.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, and A. G. Mikos. 1999. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Controlled Release* 60: 149-160.

- Gold, D., C. Onyenemezu, and W. G. Miller. 1996. Effect of solvent quality on the diffusion of polystyrene latex spheres in solutions of poly(methyl methacrylate). *Macromolecules* 29: 5700-5709.
- Haleva, E., N. Ben Tal, and H. Diamant. 2003. Increased concentration of polyvalent phospholipids in the adsorption domain of a charged protein. *Biophys. J.* in the press.
- Hess, S. T., S. Huang, A. A. Heikal, and W. W. Webb. 2002. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry* 41: 697-705.
- Hope, M. J., M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812: 55-65.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. 1982. Biophysik. Springer-Verlag. Pages.
- Huang, C. 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 8: 344-352.
- Hunter, R. J. 1981. Zeta potential in colloid science. Academic Press, New York. Pages.
- Israelachvili, J. N. 1985. Intermolecular and surface forces. Academic Press, London. Pages.
- Jankowski, T., and R. Janka. 2001. ConfoCor2- The second generation of Fluorescence Correlation Spectroscopy. *In* Fluorescence Correlation Spectroscopy. R. Rigler and E. S. Elson, Editors. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 331-345.
- Kholodenko, B. N., J. B. Hoek, and H. V. Westerhoff. 2000. Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends Cell Biol.* 10: 173-178.
- Koppel, D. E. 1974. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev A* 10: 1938-1945.
- Krichevsky, O., and G. Bonnet. 2002. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.* 65: 251-297.
- Lakowicz, J. R. 1983. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York. Pages.
- Langevin, D., and F. Rondelez. 1978. Sedimentation of large colloidal particles through semidilute polymer solutions. *Polymer* 19: 875-882.
- Langowski, J., M. Wachsmuth, K. Rippe, and M. Tewes. 2000. Biomolecular shape and interactions determined by fluorescence correlation spectroscopy. *In* *Energies et*

- Forces de l'Interaction entre Macromolécules Biologiques: l'Aspect Quantitatif. J.-P. Frénoy, Editor. Publications CNRS, Paris. 65-77.
- Lee, R. J., and L. Huang. 1996. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* 271: 8481-8487.
- Li, S., and L. Huang. 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7: 31-34.
- Lin, M. J., H. M. Lindsay, D. A. Weitz, R. C. Ball, R. Klein, and P. Meakin. 1989. Universality of fractal aggregates as probed by light scattering. *Proc. R. Soc. Lond. A* 423: 71-87.
- Magde, D., E. Elson, and W. W. Webb. 1972. Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 64: 2026-2029.
- Magde, D., E. L. Elson, and W. W. Webb. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* 13: 29-61.
- Martin, T. F. J. 1998. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell & Develop. Biol.* 14: 231-264.
- May, S., D. Harries, and A. Ben-Shaul. 2000. Lipid demixing and protein-protein interactions in the adsorption of charged proteins on mixed membranes. *Biophys. J.* 79: 1747-1760.
- McCloskey, M. A., and M. Poo. 1986. Rates of membrane-associated reactions: reduction of dimensionality revisited. *J. Cell Biol.* 102: 88-96.
- McLaughlin, S., and A. Aderem. 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20: 272-276.
- McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir, and D. Murray. 2002. PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31: 151-175.
- Mellor, H., and P. J. Parker. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332: 281-292.
- Mislick, K. A., and J. D. Baldeschwieler. 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 12349-12354.

- Mounkes, L. C., W. Zhong, G. Cipres-Palacin, T. D. Heath, and R. J. Debs. 1998. Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 273: 26164-26170.
- Muller, J., Y. Chen, and E. Gratton. 2003. Fluorescence correlation spectroscopy. *In Methods in Enzymology*. G. Marriott and I. Parker, Editors. Academic Press. 69-92.
- Murray, D., L. H. Matsumoto, C. A. Buser, J. Tsang, C. T. Sigal, N. Ben-Tal, B. Honig, M. D. Resh, and S. McLaughlin. 1998. Electrostatics and the membrane association of src: theory and experiment. *Biochemistry* 37: 2145-2159.
- Newton, A. C. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation : protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370: 361-371.
- Ogris, M., P. Steinlein, M. Kurs, K. Mechtler, R. Kircheis, and E. Wagner. 1998. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy* 5: 1425-1433.
- Ohmori, S., N. Sakai, Y. Shirai, H. Yamamoto, E. Miyamoto, N. Shimizu, and N. Saito. 2000. Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrates, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *J. Biol. Chem.* 275: 26449-26457.
- Peitzsch, R. M., and S. McLaughlin. 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: Pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32: 10436-10443.
- Qin, Z., and D. S. Cafiso. 1996. Membrane structure of the protein kinase C and calmodulin binding domain of myristoylated alanine rich C kinase substrate determined by site-directed spin labeling. *Biochemistry* 35: 2917-2925.
- Rauch, M. E., C. G. Ferguson, G. D. Prestwich, and D. S. Cafiso. 2002. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) sequesters spin-labeled phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 277: 14068-14076.
- Rigler, R., and E. S. Elson, Editors. 2001. Fluorescence Correlation Spectroscopy. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Rosenecker, J., Schmalix, W. A., Schindelbauer, D., Plank, C., Reinhardt, D. 1998. Towards gene therapy of cystic fibrosis. *Eur. J. Med. Res.* 3: 149-156.
- Rosenfeld, M. A., K. Yoshimura, B. C. Trapnell, K. Yoneyama, E. R. Rosenthal, W. Dalemans, M. Fukayama, J. Bargon, L. E. Stier, M. Stratford-Pericaudet, W. B. Guggino, A. Pavirani, J. P. Lecocq, and R. G. Crystal. 1992. In vivo transfer of the

- human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 68: 143-155.
- Rudolph, C., J. Lausier, S. Naundorf, R. H. Muller, and J. Rosenecker. 2000. In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med* 2: 269-78.
- Rusu, L. 1999. Aggregationsverhalten und Oberflächenaktivität von lipid- und polymerbasierten Gentransfer-Komplexen. *Physik-Department*. Technische Universität, München.
- Sanders, N. N., S. C. De Smedt, and J. Demeester. 2000. The physical properties of biogels and their permeability for macromolecular drugs and colloidal drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 89: 835-849.
- Schwille, P., and E. Haustein. 2002. Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Tutorial for the Biophysics Textbook Online (BTOL). Pages.
- Simon, S. A., and T. J. McIntosh, Editors. 2002. Peptide-Lipid Interactions. Academic Press, San Diego, CA.
- Spielmann, H. P., Wemmer, D. E., Jacobson, J. P. 1995. Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34: 8542-8553.
- Starchev, K., J. Buffle, and E. Perez. 1999. Applications of fluorescence correlation spectroscopy: polydispersity measurements. *J. Colloid Interface Sci.* 213: 479-487.
- Starchev, K., J. Zhang, and J. Buffle. 1998. Applications of fluorescence correlation spectroscopy - particle size effect. *J. Colloid Interface Sci.* 203: 189-196.
- Stryer, L. 1995. Biochemistry. W. H. Freeman and Company. Pages.
- Takakuwa, Y., C. G. Pack, X. L. An, S. Manno, E. Ito, and M. Kinjo. 1999. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of the hydrophobic interactions of protein 4.1 with phosphatidyl serine liposomes. *Biophys. Chem.* 82: 149-155.
- Tang, M. X., C. T. Redemann, and F. C. Szoka. 1996. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chem.* 7: 703-714.
- Tang, M. X., Szoka, F. C. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy* 4: 823-832.
- Thompson, N. L. 1991. Fluorescence correlations spectroscopy. *In Topics in Fluorescence Spectroscopy*. R. Lakowicz, Editor. Plenum Press, New York. 337-378.

- Thompson, N. L., A. M. Lieto, and N. W. Allen. 2002. Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 634-641.
- Toner, M., G. Vaio, and S. McLaughlin. 1988. Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 27: 7435-7443.
- Van Craenenbroeck, E., and Y. Engelborghs. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy: molecular recognition at the single molecule level. *J. Mol. Recognit.* 13: 93-100.
- Victor, K., J. Jacob, and D. S. Cafiso. 1999. Interactions controlling the membrane binding of basic protein domains: phenylalanine and the attachment of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate protein to interfaces. *Biochemistry* 38: 12527-12536.
- Wagner, E., M. Cotten, R. Foisner, and M. L. Birnstiel. 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 4255-4259.
- Wagner, E., C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, and M. L. Birnstiel. 1992. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: Toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 7934-7938.
- Wang, J., A. Arbuzova, G. Hangyás-Mihályiné, and S. McLaughlin. 2001. The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 276: 5012-5019.
- Wang, J., A. Gambhir, G. Hangyas-Mihalyne, D. Murray, U. Golebiewska, and S. McLaughlin. 2002. Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* 277: 34401-12.
- Wang, J., A. Gambhir, S. McLaughlin, and D. Murray. 2004. A computational model for the electrostatic sequestration of PI(4,5)P₂ by membrane-adsorbed basic peptides. *Biophys. J.* 86: 1969-1986.
- Wightman, L., R. Kircheis, V. Rössler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursá, and E. Wagner. 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 3: 362-372.
- Ye, X., and P. Tong. 1998. Transport of probe particles in semidilute polymer solutions. *Macromolecules* 31: 5785-5793.
- Zabner, J., L. A. Couture, R. J. Gregory, S. M. Graham, A. E. Smith, and M. J. Welsh. 1993. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75: 207-216.

- Zeiss, C. 2001. Advanced imaging microscopy. *Applications Manual ConfoCor2*. Zeiss, Jena.
- Zhang, W., E. Crocker, S. McLaughlin, and S. O. Smith. 2003. Binding of peptides with basic and aromatic residues to bilayer membranes: phenylalanine in the MARCKS effector domain penetrates into the hydrophobic core of the bilayer. *J. Biol. Chem.* 278: 21459-21466.

6.3 Publikationen

Zantl, R., L. Baicu (Rusu), F. Artzner, I. Sprenger, G. Rapp and J. O. Rädler. 1999. Thermotropic Phase Behavior of Cationic Lipid-DNA Complexes compared to binary lipid mixtures. *J. Phys. Chem.* 103: 10300-10310.

Rusu, L., A. Gambhir, S. McLaughlin, J. O. Rädler. 2004. Fluorescence Correlation Spectroscopy Studies of Peptide and Protein Binding to Phospholipid Vesicles. *Biophys. J.* 87(2): 1044-1053.

Galneder, R., L. Rusu, S. Gersting, C. Rudolph, J. Rosenecker and J. O. Rädler. Characterization of synthetic gene delivery complexes using fluorescence microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Submitted*.

Rusu, L., S. Sun, D. Lumma and J. O. Rädler. Transport of liposomes and gene transfer complexes in polymer networks. *In preparation*.

LEBENS LAUF

Name: Rusu
Vorname: Laura
Geburtstag: 03.01.1970
Geburtsort: Corni (Rumänien)
Staatsangehörigkeit: rumänisch
Kinder: Elena Matilda, geboren am 06.12.2003.

Schulausbildung und Studium:

1976–1984 Grundschule in Brasov.
1984–1988 Gymnasium für Philologie und Geschichte „UNIREA“ Brasov.
1989–1992 Studium der technischen Physik an der Universität Bukarest.
1994–1999 Studium der Physik an der Technischen Universität München.
2000–2002 Promotion am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz.
2002–2004 Fortsetzung der Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Experimentalphysik.

Weitere Ausbildung:

1992–1994 Deutschkurs für Ausländer an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
April 1994 Prüfung zum Nachweis deutscher Sprachkenntnisse (PNdS).
1997–1999 Stipendiatin der Hanns-Seidel-Stiftung.